

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Arthur Woyames de Castro Velasco**

**Estudo do perfil químico e biológico do extrato hidroalcoólico de folhas de  
*Casearia selloana* Eichler por CLAE-DAD**

Juiz de Fora

2025

**Arthur Woyames de Castro Velasco**

**Estudo do perfil químico e biológico do extrato hidroalcoólico de folhas de  
*Casearia selloana* Eichler por CLAE-DAD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira  
Coorientador: Prof. Dr. Luciana Moreira Chedier

Juiz de Fora  
2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Woyames de Castro Velasco, Arthur .  
Estudo do perfil químico e biológico do extrato hidroalcoólico de folhas de *Casearia selloana* Eichler por CLAE-DAD / Arthur Woyames de Castro Velasco. – 2025.  
97 p.

Orientador: Marcone Augusto Leal de Oliveira  
Coorientadora: Luciana Moreira Chedier  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2025.

1. *Casearia selloana*. 2. Fitoquímicos. 3. CLAE-DAD. 4. Atividade antimicrobiana e antiparasitária. 5. Citotoxidez. I. Leal de Oliveira, Marcone Augusto, orient. II. Moreira Chedier, Luciana, coorient. III. Título.

**Arthur Woyames de Castro Velasco**

**Estudo do perfil químico e biológico do extrato hidroalcoólico de folhas de *Casearia selloana* Eichler por CLAE-DAD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em 12 de junho de 2025.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira - Orientador**

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Luciana Moreira Chedier - Coorientadora**

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Alessandra Leda Valverde**

Universidade Federal Fluminense

**Prof. Dr. Richard Michael Grazul**

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 27/05/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Moreira Chedier, Professor(a)**, em 12/06/2025, às 16:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Richard Michael Grazul, Professor(a)**, em 12/06/2025, às 17:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcene Augusto Leal de Oliveira, Professor(a)**, em 13/06/2025, às 11:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Leda Valverde, Usuário Externo**, em 23/06/2025, às 15:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2420879** e o código CRC **265589C1**.

Dedico este trabalho aos meus pais, Olívia e Carlos Maurício, e à minha irmã, Ana Clara, que sempre serão o meu lugar seguro.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus, por me dar forças e estar sempre do meu lado nos momentos mais difíceis de continuar.

À minha família e meus amigos, pelo companheirismo, confiança e apoio quando eu mais precisei.

Ao meu orientador, Professor Dr Marcone Augusto Leal de Oliveira, por aceitar trabalhar comigo neste projeto, por todos ensinamentos e suporte para o meu crescimento pessoal e científico.

À minha coorientadora, Professora Dr<sup>a</sup> Luciana Moreira Chedier, pela parceria, dedicação e por todas as contribuições que me ajudaram no desenvolvimento do trabalho, assim como me aproximar dos alunos Vinícius Coutinho, Layla Marques e do Dr. Ari Sérgio de Oliveira Lemos, os quais foram peças essenciais para a conclusão deste trabalho.

A todos os colaboradores do Grupo de Química Analítica e Quimiometria da UFJF, pelo ótimo ambiente no qual convivemos e que foi fundamental na elaboração deste trabalho. Um agradecimento especial à Luiz Henrique Cantarino Adriano, que além de contribuir fortemente para este trabalho, transformou-se num grande amigo.

À Professora Dr<sup>a</sup> Paula Rocha Chellini, Lorena Rodrigues Riani, e às demais colaboradoras da Faculdade de Farmácia da UFJF, pela contribuição nos ensaios cromatográficos.

Ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e ao Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP) pela contribuição geral no preparo de amostras.

Ao Programa de Pós Graduação em Química da UFJF, por me dar todo suporte necessário para realização do curso.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, por contribuir no meu processo de formação acadêmica e me proporcionar crescer profissionalmente e às agências de fomento CAPES, Fapemig, Finep e CNPq.

Menções Honrosas: Julliana Fonseca Alves, Fillipe Caitano Calzavara, Luiz Felipe Cantarino Adriano, Gabriel Pereira Portes Cerqueira.

“Ninguém faz samba porque prefere. Sobre o poder da criação força nenhuma no mundo interfere.” Marcelo D2

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil fitoquímico e avaliar a atividade biológica de extratos hidroalcoólicos obtidos das folhas de *Casearia selloana* Eichler, espécie endêmica do Brasil ainda pouco explorada cientificamente. Para isso, foram utilizadas diferentes proporções de etanol e água como solventes extratores, e as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD), com enfoque na composição fenólica. Observou-se que extratos mais com maior proporção de etanol apresentaram maior diversidade de substâncias apolares, enquanto os extratos mais aquosos favoreceram a extração de metabólitos polares. Os ensaios biológicos revelaram atividade antimicrobiana moderada frente à *Staphylococcus aureus* (CIM = 125 µg/mL), efeito citotóxico seletivo em células tumorais murinas 4T1 e atividade antiparasitária significativa contra formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* (IS = 2,42 µg/mL). A condição mais promissora foi atribuída ao extrato A, mais apolar, que apresentou os melhores resultados biológicos, o que tornou desnecessária a construção de modelos matemáticos de misturas. Além disso, destaca-se o caráter ambientalmente favorável do método, baseado em solventes considerados verdes, como etanol e água, em conformidade com os princípios da Química Verde. Os achados reforçam o potencial farmacológico de *C. selloana* e sua relevância como fonte de substâncias bioativas.

Palavras-chave: *Casearia selloana*; fitoquímicos; CLAE-DAD; atividade antimicrobiana; atividade antiparasitária; citotoxidez.

## ABSTRACT

This study aimed to characterize the phytochemical profile and evaluate the biological activity of hydroalcoholic extracts obtained from the leaves of *Casearia selloana* Eichler, a Brazilian endemic species that remains underexplored scientifically. Different proportions of ethanol and water were used as extraction solvents, and the samples were analyzed by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD), focusing on the phenolic composition. Extracts with a higher ethanol content showed greater diversity of nonpolar compounds, while more aqueous extracts favored the extraction of polar metabolites. Biological assays revealed moderate antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (MIC = 125 µg/mL), selective cytotoxic effects on murine 4T1 tumor cells, and significant antiparasitic activity against *Leishmania amazonensis* amastigote forms (SI = 2.42 µg/mL). The most promising condition was attributed to extract A, the most nonpolar, which exhibited the best biological results, making the development of mixture models unnecessary. Additionally, the environmentally friendly nature of the method is highlighted, as it is based on green solvents such as ethanol and water, in accordance with the principles of Green Chemistry. These findings reinforce the pharmacological potential of *C. selloana* and its relevance as a source of bioactive compounds.

Keywords: *Casearia selloana*; phytochemicals; HPLC-DAD; antimicrobial activity; antiparasitic activity; cytotoxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários .....	17
Figura 2 -	Estrutura molecular plana da estrutura fundamental dos flavonoides.....	20
Figura 3 -	Estrutura molecular plana de: (a) morfina e (b) nicotina.....	21
Figura 4 -	Distribuição geográfica de <i>Casearia selloana</i> Eichler.....	28
Figura 5 -	Detalhes das faces abaxial e adaxial dos ramos vegetativos de <i>Casearia selloana</i> .....	29
Figura 6 -	a) <i>Casearia selloana</i> Eichler a) Exsicata depositada no Herbário CESJ. b) Representações e dimensões dos órgãos vegetais encontrados na literatura.....	39
Figura 7 -	Planejamento de Misturas (Etanol x Água) .....	41
Figura 8 -	a) Extração no tempo zero; b) Soluções após extração por 24 horas e filtradas.....	50
Figura 9 -	Extratos secos após liofilização .....	51
Gráfico 1 -	Gráfico de barras do rendimento médio de cada nível.....	53
Figura 10 -	Cromatograma construído para o padrão de quercetina lido à 371 nm.....	54
Figura 11 -	Cromatogramas de A1 (preto) e A1.1 (vermelho) sobrepostos, monitorados à 371 nm.....	55
Figura 12 -	Cromatogramas das réplicas do nível A monitorados à 371 nm e sobrepostos.....	56
Figura 13 -	Cromatogramas das réplicas do nível A monitorados à 235 nm e sobrepostos.....	57
Figura 14 -	Cromatogramas de A1 monitorados à 371 e 235 nm sobrepostos.....	58
Figura 15 -	Cromatogramas lidos à 371 e 235 nm e sobrepostos para os níveis A – G.....	59
Figura 16 -	Distribuição dos cromatogramas de A – G a 371 e 235 nm.....	66
Figura 17 -	Cromatograma extraídos pelo software da Waters para o Extrato A e espectros de absorção UV-Vis para os sinais majoritários.....	67
Gráfico 2 -	Gráficos de barras representando a viabilidade celular (%) das linhagens 4T1 tratadas com diferentes proporções dos extratos, em diferentes concentrações.....	71

Gráfico 3 - Gráficos de barras representando a viabilidade celular (%) das linhagens não tumorais L929 e das linhagens 4T1 tratadas com o extrato A (100% etanol) .....73

Figura 18 - a) espectro no UV do sinal relativo à casearina B no cromatograma do extrato etanólico de folhas e modelo diênico com ligações duplas em C12 e C14. b) espectro no UV do sinal relativo ao diterpeno 1b do extrato etanólico de raízes e modelo diênico com ligações duplas em C13(16) e C14.....83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Condensação de unidades de isopreno na formação de terpenoides.....	23
Tabela 2 -	Legenda pontos amostrais do planejamento de misturas.....	42
Tabela 3 -	Esquema de eluição para cromatografia líquida de alta eficiência.....	43
Tabela 4 -	Cálculo do rendimento obtido nas extrações realizadas.....	52
Tabela 5 -	Valores de CIM, CBM e CFM para os extratos.....	70
Tabela 6 -	Valores obtidos de IC <sub>50</sub> (promastigota e amastigota), CC <sub>50</sub> (macrófagos peritoneais) e IS para os extratos testados.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASE	<i>Accelerated Solvent Extraction</i>
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i> (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCC	Cromatografia Contra Corrente
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG	Cromatografia a Gás
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CN	Controle Negativo
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DES	<i>Deep Eutetic Solvent</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC	Eletroforese Capilar
GPS	<i>Global Positioning System</i> (Sistema de posicionamento global)
IS.	Índice de Seletividade
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LMC	Leishmaniose Muco cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
MAE	<i>Microwave Assisted Extraction</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometria de massas)
MTT	Ensaio de Viabilidade Celular
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução Tampão Fosfato)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada (ANVISA)
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i>
SFB	Soro Fetal Bovino (Meio de Cultivo)
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i>

UAE	<i>Ultrasound-Assisted Extraction</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV-Vis	Ultravioleta – Visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	PRODUTOS NATURAIS	2
<b>1.1.1</b>	<b>Principais classes de fitoquímicos</b>	<b>4</b>
1.1.1.1	Flavonoides	6
1.1.1.2	Alcaloides	7
1.1.1.3	Terpenoides	8
1.2	GÊNERO CASEARIA	9
<b>1.2.1</b>	<b>Potencial Antimicrobiano de extratos de Casearia</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Leishmania spp.</b>	<b>12</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Casearia selloana Eichler</b>	<b>13</b>
1.3	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	15
1.4	PLANEJAMENTO DE MISTURAS	16
1.5	ANÁLISE DE FITOQUÍMICOS POR MÉTODOS DE SEPARAÇÃO	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E REAGENTES</b>	<b>21</b>
3.1	MATERIAL VEGETAL	21
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>23</b>
4.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL	23
4.2	EXTRAÇÃO E PLANEJAMENTO DE MISTURAS	23
4.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	25
4.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS DOS EXTRATOS	27
<b>4.4.1</b>	<b>Ensaio para Determinação da CIM, CBM e CFM</b>	<b>27</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Ensaio de Análise da Citotoxidez</b>	<b>28</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Ensaio de Atividade Antileishmania</b>	<b>29</b>
4.4.3.1	Cultivo de parasitos	29
4.4.3.2	Manutenção da infectividade das linhagens de L. amazonenses	29
4.4.3.3	Avaliação da toxidez dos extratos em promastigotas de L. amazonensis	29
4.4.3.4	Avaliação da toxidez dos extratos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c	30
4.4.3.5	Avaliação da toxidez dos extratos em amastigotas intracelulares de L. amazonenses	31
4.4.3.6	Determinação do Índice de Seletividade (IS) dos extratos	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>33</b>
5.1	EXTRAÇÕES	33
5.2	SEPARAÇÕES	36
<b>5.2.1</b>	<b>Repetibilidade do Método Cromatográfico</b>	<b>37</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Perfis Cromatográficos das Amostras A1 a G1</b>	<b>41</b>
5.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS DOS EXTRATOS	52
<b>5.3.1</b>	<b>Atividade Antibacteriana e Antifúngica</b>	<b>52</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Atividade de Citotoxidez</b>	<b>54</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Atividade Antileishmania</b>	<b>57</b>
5.4	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	58
<b>5.4.1</b>	<b>Método Cromatográfico</b>	<b>58</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Ensaio Biológico</b>	<b>60</b>
5.4.2.1	Atividade Antimicrobiana	60
5.4.2.2	Atividade Citotóxica contra células tumorais 4T1	62
5.4.2.3	Atividade Antileishmanial	64
<b>5.4.3</b>	<b>Correlação entre Atividades Biológicas, Classes Fitoquímicas e Dados Espectroscópicos em Espécies do Gênero Casearia</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>68</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>70</b>
	<b>ANEXO A – PARECER CEUA</b>	<b>80</b>
	<b>ANEXO B – PARECER CEUA</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A exploração das plantas e seus constituintes químicos tem sido uma prática fundamental desde os primórdios da humanidade, com registros históricos que remontam ao Egito Antigo e à Mesopotâmia, onde já se utilizavam produtos naturais para fins medicinais (Atanasov *et al.*, 2015; Cragg and Newman, 2020). Ao longo dos séculos, diversas culturas, como a chinesa, indiana e as civilizações greco-romanas, contribuíram para o acúmulo de conhecimento sobre as propriedades terapêuticas das plantas (Atanasov *et al.*, 2015; Patwardhan, 2005). No entanto, apenas a partir do século XIX que seus constituintes químicos começaram a ser isolados e estudados de forma planejada e sistemática, permitindo a descoberta de substâncias como a morfina, que revolucionou a medicina (Viegas *et al.*, 2006). Hoje, os produtos naturais derivados de plantas continuam a desempenhar um papel crucial na descoberta de novos fármacos, especialmente no tratamento de doenças complexas como o câncer e infecções, onde os medicamentos sintéticos muitas vezes apresentam limitações (Lahlou, 2013; Atanasov *et al.*, 2015; Harvey *et al.*, 2000).

A importância medicinal das plantas reside na diversidade de metabólitos especiais que elas produzem, como alcaloides, flavonoides, terpenoides e fenólicos, os quais desempenham funções essenciais na defesa das plantas contra patógenos e estresses ambientais (Cragg and Newman, 2020; Pagare *et al.*, 2015; Atanasov *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016; Sarker *et al.*, 2020). Essas substâncias, além de garantir a sobrevivência das plantas, apresentam potenciais propriedades biológicas que podem ser exploradas para o desenvolvimento de medicamentos (Clardy *et al.*, 2004).

Nesse contexto, *Casearia selloana* Eichler, espécie endêmica do Brasil, se apresenta como um objeto de estudo relevante. Diante de sua ocorrência em regiões como o Nordeste e Sudeste do país (Flora do Brasil, 2025), poucos estudos foram realizados para investigar sua composição química e potenciais aplicações medicinais. A exploração de sua diversidade fitoquímica pode revelar novas substâncias com atividades biológicas importantes, contribuindo para o desenvolvimento de novos fármacos (Marquete *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2014). Portanto, este trabalho visa contribuir cientificamente sobre a composição química e as propriedades medicinais de *Casearia selloana* Eichler.

## 1.1 PRODUTOS NATURAIS

Os primeiros registros conhecidos sobre o uso medicinal de plantas remontam ao Egito Antigo, em épocas próximas a 2900 a.C., sendo o documento mais significativo o Papiro de Ebers (cerca de 1550 a.C.), que descreve mais de 700 medicamentos, majoritariamente de origem vegetal. Além disso, são conhecidos registros, por volta de 2600 a.C., contendo uma vasta lista de cerca de mil medicamentos baseados em produtos naturais extraídos de plantas, os quais foram encontrados na região da Mesopotâmia (Atanasov *et al.*, 2015; Cragg and Newman, 2020).

A medicina tradicional chinesa e o sistema Ayurveda indiano também possuem registros milenares sobre o uso de plantas medicinais (Atanasov *et al.*, 2015; Patwardhan, 2005). No Ocidente, o conhecimento sobre essas aplicações foi fortemente influenciado pela cultura grecoromana, com obras de referência escritas entre os séculos I e II d.C. Durante a Idade Média, os árabes desempenharam um papel crucial na preservação e expansão desse conhecimento, integrando influências da medicina grega, romana, indiana e chinesa aos próprios saberes (Atanasov *et al.*, 2015; Cragg and Newman, 2020).

Entretanto, os conhecimentos obtidos sobre plantas medicinais eram adquiridos empiricamente, sem estudos e análises científicas que comprovassem sua eficácia ou segurança para suas aplicações. Esse intervalo entre o uso empírico das plantas e a descoberta científica de suas propriedades pode ser observado no caso da morfina, famoso alcaloide conhecido por seu efeito analgésico e indutor do sono. A morfina foi extraída pela primeira vez a partir do ópio no século XIX, e foram publicadas informações detalhadas sobre sua estrutura cristalina e propriedades farmacêuticas, com testes em animais e humanos (Atanasov *et al.*, 2015; Viegas *et al.*, 2006).

De acordo com Sharma *et al.* (2021) e Atanasov *et al.* (2021), as espécies químicas encontradas em plantas com potencial medicinal, conhecidas como fitoquímicos, são substâncias bioativas não-nutrientes derivadas do metabolismo especial das plantas. Essas substâncias são resultado de um processo evolutivo que otimizou funções bioquímicas específicas, como a manutenção e a sobrevivência das plantas. Tais substâncias desempenham um papel essencial na defesa das plantas contra pragas, infecções e estresses ambientais, como secas, aumento da salinidade

e exposição a radiações UV (Silva *et al.*, 2016; Sarker *et al.*, 2020; Pagare *et al.*, 2015; Naczki *et al.*, 2006). Além disso, os fitoquímicos atuam na regulação dos mecanismos endógenos de defesa e na interação competitiva com outras espécies, o que está diretamente associado às suas propriedades anticâncer e à eficácia no combate a doenças infecciosas (Porto *et al.*, 2023; Atanasov *et al.*, 2021).

Os produtos naturais têm sido uma fonte contínua de novos fármacos e substâncias bioativas. A natureza oferece uma diversidade química e estrutural que tem sido explorada para o desenvolvimento de medicamentos eficazes (Cragg and Newman, 2020). Como destacado por Cragg e Newman (2020), muitos dos medicamentos mais importantes atualmente utilizados foram derivados de produtos naturais, incluindo antibióticos, agentes anticancerígenos e imunossupressores. Os produtos naturais oferecem características únicas em comparação com moléculas sintéticas convencionais, trazendo tanto vantagens quanto desafios para o processo de descoberta de fármacos (Atanasov *et al.*, 2021). Eles são conhecidos por sua enorme diversidade estrutural e complexidade molecular, apresentando maior massa molar, maior número de átomos de carbono  $sp^3$  e oxigênio, mas menos átomos de nitrogênio e halogênios em comparação com substâncias sintéticas. Além disso, possuem mais doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, coeficientes de partição octanol-água (Log P) mais baixos (indicando maior hidrofiliabilidade) e maior rigidez molecular (Atanasov *et al.*, 2021; Lawson *et al.*, 2017; Atanasov *et al.*, 2015; Clardy *et al.*, 2004; Feher *et al.*, 2002).

Essas características podem ser vantajosas, especialmente nas interações proteína-proteína, onde a rigidez dos produtos naturais se mostra bastante útil (Atanasov *et al.*, 2021; Lawson *et al.*, 2017). A rigidez molecular permite que essas moléculas estabilizem conformações específicas das proteínas, o que é crucial para inibir, ativar ou ajustar a função proteica. Moléculas rígidas podem manter a proteína em uma conformação biologicamente vantajosa, impedindo que ela retorne a estados indesejados, o que é essencial para a eficiência terapêutica em interações proteína-proteína (Lawson *et al.*, 2017). A abordagem farmacológica baseada em produtos naturais complementa a abordagem sintética, fornecendo acesso a diferentes estruturas iniciais promissoras, enquanto a química combinatória serve como uma ferramenta poderosa para otimizar essas estruturas, potencializando sua aplicação no desenvolvimento de novos fármacos (Cragg and Newman, 2020).

Produtos com base em plantas têm sido utilizados para o tratamento de diversos tipos de doenças devido à variedade de atividades biológicas como propriedades antioxidantes, anti-inflamatorias, antibacterianas, antifúngicas, antiparasitárias, analgésicas, antidiabética e anti-proliferativa (células cancerígenas) (Mihaylova *et al.*, 2023). Apenas cerca de 20% das plantas conhecidas foram empregadas em estudos quanto à possibilidade de suas aplicações farmacêuticas, o que implica em uma pequena contribuição para o conhecimento fornecido para o sistema de saúde pública, especialmente no tratamento do câncer (Altemimi *et al.*, 2017).

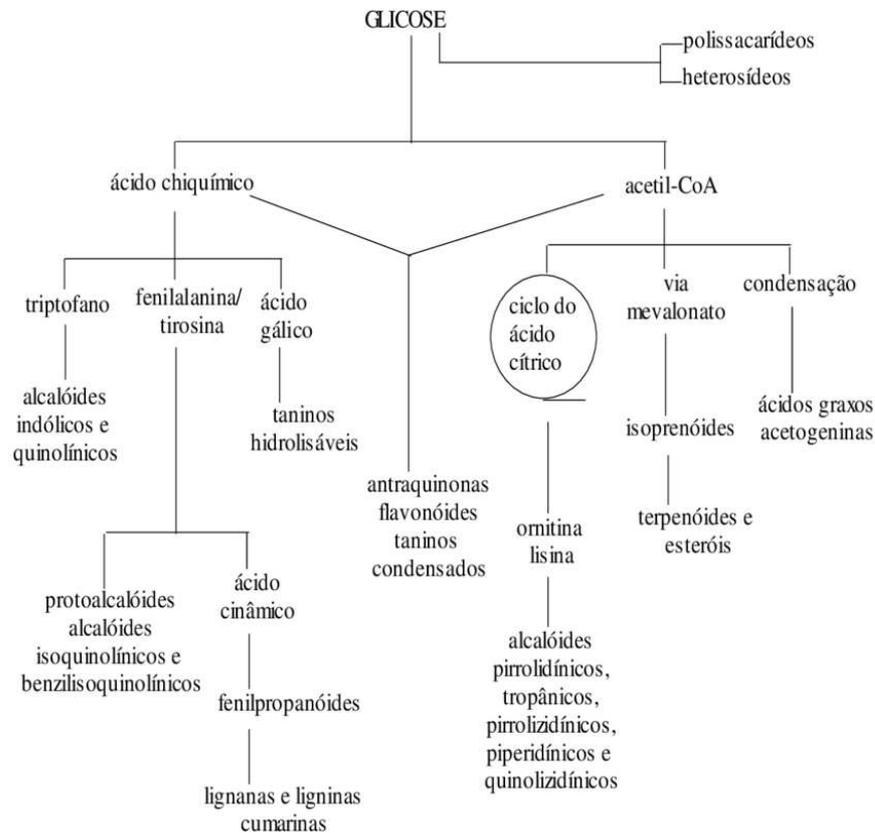
### 1.1.1 Principais classes de fitoquímicos

As espécies vegetais produzem um grande número de substâncias bioativas, com uma atenção especial para os fenólicos, tais como os flavonoides, taninos e ligninas, que são fortemente associadas à atividade antioxidante. Esta propriedade é importante devido ao controle e redução do dano oxidativo, sendo responsável por atrasar ou inibir a oxidação causada pelos radicais livres (Altemimi *et al.*, 2017; Boots *et al.*, 2008; Sarker *et al.*, 2020). Essas substâncias bioativas são capazes de interagir com várias células vivas, prevenir danos no DNA e reduzir a taxa de crescimento de células cancerígenas (Sharma *et al.*, 2021; Forbes-Hernández *et al.*, 2014).

Segundo Simões *et al.* (2004), as vias metabólicas de produtos naturais são específicas e geralmente ativadas apenas em determinados estágios do desenvolvimento da planta ou em resposta a estresses oxidativos, nutricionais, ambientais ou microbiológicos. A origem dos metabólitos especiais pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: os ácidos chiquímico e o acético. Os fitoquímicos podem ser agrupados em diferentes classes, sendo os principais: pigmentos, fenólicos, flavonoides, não flavonoides, alcaloides, glicosídeos e terpenoides (Sharma *et al.*, 2021). Entretanto, essas classificações não levam em consideração a via biossintética desses produtos, as quais estão representadas na Figura 1. O ácido chiquímico dá origem a diversas substâncias fenólicas, como os taninos hidrolisáveis, lignanas, cumarinas e alcaloides derivados de aminoácidos aromáticos, como os indólicos e quinolínicos. Já o acético é um precursor fundamental para a síntese de terpenoides e esteroides via mevalonato,

além de contribuir para a formação de ácidos graxos e acetogeninas por condensação. (Simões *et al.*, 2004).

Figura 1 – Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.



Fonte: Simões *et al.*, 2004.

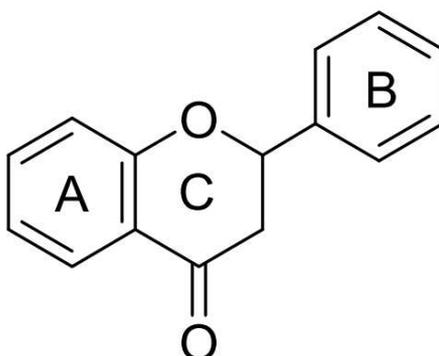
Além dessas vias principais, ocorre também a biossíntese mista, na qual produtos naturais são formados a partir da integração de diferentes rotas metabólicas. Um exemplo disso são os flavonoides, taninos condensados e antraquinonas, que combinam unidades derivadas tanto do metabolismo do ácido chiquímico quanto do metabolismo do ácido acético, resultando em uma diversidade estrutural e funcional significativa entre os metabólitos secundários das plantas (Simões *et al.*, 2004).

### 1.1.1.1 Flavonoides

Os flavonoides são uma subclasse de fenólicos amplamente reconhecida por suas atividades biológicas, incluindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos e cardioprotetores (Durazzo *et al.*, 2019). Eles são classificados em flavonóis (quercetina, miricetina, catequina, epicatequina), flavanonas (hesperetina, naringenina), antocianidinas (cianidina, pelargonidina) e isoflavonoides (genisteína, daidzeína) (Kawser Hossain *et al.*, 2016). Essas substâncias estão presentes em diversas frutas e vegetais, como maçãs (ricas em quercetina e epicatequina), laranjas (ricas em hesperetina e naringenina) e repolho roxo (rico em antocianinas), contribuindo para o controle da obesidade, prevenção de doenças cardiovasculares e proteção hepática (Kawser Hossain *et al.*, 2016; Karak, 2019).

Os flavonoides são considerados como antioxidantes potentes devido a sua capacidade de capturar e neutralizar espécies oxidantes como o ânion superóxido, radicais hidroxila e peróxido, atuando com sinergia juntamente com antioxidantes como vitaminas C e E, ainda são capazes de se ligar a íons metálicos, atuando como um agente sequestrante desses íons, impedindo que atuem como catalisadores na produção de radicais livres (Simões *et al.*, 2004). Os flavonoides possuem uma estrutura comum baseada no núcleo flavônico, conforme ilustrado na Figura 2 (Dos Santos *et al.*, 2017; Simões *et al.*, 2004).

Figura 2 – Estrutura molecular plana da estrutura fundamental dos flavonoides.

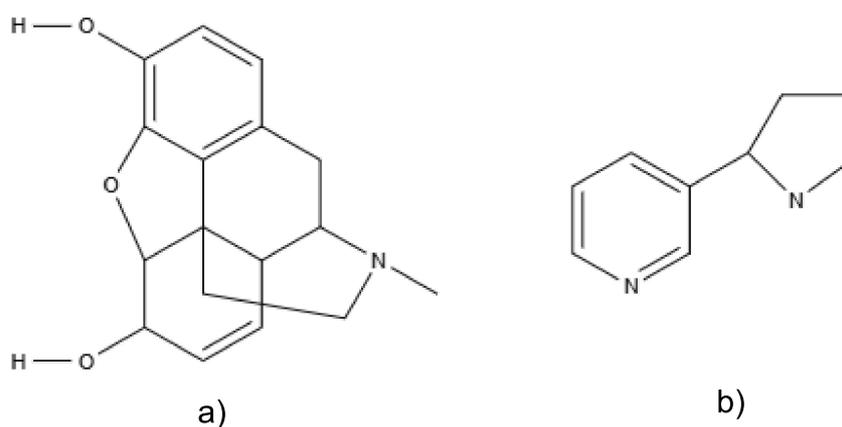


Fonte: Dos Santos *et al.*, 2017.

### 1.1.1.2 Alcaloides

Os alcaloides são uma classe de nitrogenados bioativos amplamente distribuídos no reino vegetal, conhecidos por suas propriedades farmacológicas e terapêuticas (Habartová *et al.*, 2016). Estruturalmente, essas substâncias nitrogenadas podem ser encontradas na forma de sais de ácidos orgânicos, ésteres ou combinados com açúcares e taninos, apresentando uma grande diversidade química e funcional (Kukula-Koch e Widelski, 2017). Devido às suas atividades antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, anti-inflamatória e neuroativa, muitos alcaloides são utilizados na formulação de fármacos, como a galantamina no tratamento do Alzheimer e a quinina como antimalárico (Rehman e Khan, 2017). Além disso, eles podem ser classificados com base em sua estrutura química, como alcaloides indólicos, quinolínicos e tropânicos, ou de acordo com sua origem botânica, como os alcaloides do *Papaver* (morfina) e da *Nicotiana* (nicotina) (Figura 3) (Funayama E Cordell, 2014). A solubilidade variável dessas substâncias influencia sua absorção e transporte no organismo, sendo um fator determinante na sua aplicação farmacêutica (Battu *et al.*, 2010; Yalavarthi e Thiruvengadarajan, 2013).

Figura 3 – Estrutura molecular plana de: (a) morfina e (b) nicotina.



Fonte: Kurek, J. 2019.

### 1.1.1.3 Terpenoides

Os terpenoides são uma ampla e diversificada classe de produtos naturais encontrados em quase todos os organismos vivos, sendo os principais constituintes dos óleos essenciais de plantas aromáticas (Cox-Georgian *et al.*, 2019). Sua biossíntese ocorre predominantemente a via do ácido mevalônico (Bergman *et al.*, 2019), e sua classificação baseia-se no número de unidades de isopreno, incluindo monoterpenos (como carvona e limoneno), sesquiterpenos (como farnesol), diterpenos (como retinol), triterpenos (como lupeol) e tetraterpenos (como  $\beta$ -caroteno) (Stephane e Jules, 2020; Singh e Sharma, 2014). A unidade isoprênica é definida como uma cadeia ramificada de cinco carbonos em uma estrutura básica, os quais podem se ligar de diferentes formas, como pode ser observado na Tabela 1 (Simões *et al.*, 2004).

Tabela 1: Condensação de unidades de isopreno na formação de terpenoides.

Nº DE UNID.	Nº DE ÁTOMOS DE CARBONO	NOME OU CLASSE
1	5	isopreno
2	10	monoterpenoides
3	15	sesquiterpenoides
4	20	diterpenoides
5	25	sesterpenos
6	30	triterpenoides
8	40	tetraterpenoides
n	n	polisoprenoides

Fonte: Simões *et al* 2004.

Além de sua presença em resinas, ceras e borrachas, substâncias como cânfora, mentol, canabinoides e curcuminoides possuem importantes propriedades bioativas (Mbaveng *et al.*, 2014). Os terpenoides exibem diversas atividades farmacológicas, incluindo efeitos anticancerígenos, anti-inflamatórios, analgésicos e hepatoprotetores (Ludwiczuk *et al.*, 2017), sendo amplamente utilizados na medicina tradicional e na indústria farmacêutica para a síntese de fármacos (Reyes *et al.*, 2018) (Pagare *et al.*, 2015).

## 1.2 GÊNERO *Casearia*

Espécies do gênero *Casearia* Jacq. (Salicaceae) são amplamente utilizadas na medicina de países tropicais desde os tempos antigos. Em regiões em desenvolvimento do sul tropical, a população depende direta ou indiretamente de práticas medicinais baseadas no uso de plantas nativas para cuidados primários de saúde. As espécies desse gênero são particularmente conhecidas na América Latina, África, Índia e China, onde desempenham um papel crucial no bem-estar das populações locais (Xia *et al.*, 2014).

Até 2013 haviam sido identificadas 180 espécies do gênero *Casearia*, distribuídas em diferentes regiões tropicais e subtropicais do planeta. É importante destacar que, por estarem adaptadas a climas e ecossistemas específicos, essas plantas possuem propriedades medicinais conhecidas por serem eficazes para o tratamento de doenças prevalentes nessas regiões, como enfermidades cutâneas e gastrointestinais (Xia *et al.*, 2014; Marquete *et al.*, 2015).

De acordo com a etnofarmacologia dessas regiões, diversas espécies de *Casearia* são utilizadas para fins medicinais. Por exemplo, o extrato bruto das folhas de *Casearia sylvestris* Sw. é amplamente empregado na América Latina como inibidor de apetite, anestésico tópico, antisséptico e cicatrizante para doenças de pele. Na medicina tradicional, é comumente utilizado no tratamento de hanseníase tópica e obesidade, enquanto povos indígenas da Amazônia o aplicam no tratamento de picadas de cobras. *Casearia grewiifolia* Vent., nativa do norte e nordeste da Tailândia, tem grande importância na medicina tradicional tailandesa. Na Índia, *Casearia esculenta* Roxb. é frequentemente utilizada no tratamento do diabetes *mellitus*. Além disso, diferentes partes dessas plantas, como folhas, cascas do caule, raízes, flores e sementes, são empregadas para diversos fins medicinais (Xia *et al.*, 2014; Flora do Brasil, 2025; Marquete *et al.*, 2015).

Conforme descrito por Xia *et al.* (2014), em uma revisão sobre substâncias isoladas e aplicações medicinais de extratos de espécies de *Casearia*, a extração aquosa à quente de *Casearia esculenta* Roxb. é reconhecida como um remédio eficaz contra a diabetes na medicina tradicional indiana. No entanto, um estudo publicado em 1967 mostrou que o consumo diário da planta não afetou significativamente os níveis basais de açúcar no sangue dos animais testados quando em jejum, embora tenha sido observada uma redução nos níveis de açúcar após duas horas da

administração dos extratos aquosos e alcoólicos. Após uma série de estudos sobre a influência da aplicação do extrato aquoso das raízes de *C. esculenta* em animais diabéticos, foi possível observar uma diminuição significativa na atividade das enzimas glicose-6-fosfatase e frutose-1,6-bisfosfatase. Estas enzimas são responsáveis pela metabolização da produção de glicose livre, resultando na redução da quantidade de açúcar no sangue dos animais testados (Prakasam *et al.*, 2003).

Ainda neste sentido, *Casearia sylvestris* Sw. ou “guaçatonga”, é uma planta conhecida por ser utilizada pelos indígenas na região amazônica para tratar eventuais picadas de cobras. Os extratos aquosos, assim como algumas substâncias individuais das folhas de *C. sylvestris* apresentaram atividade significativa quanto à inibição enzimática, toxicidade e atividade anticoagulante de venenos de diversas cobras e abelhas. No entanto, os mecanismos de ação ainda não são conhecidos, porém há evidências de que estas atividades são associadas à presença de moléculas quelantes complexadas com íons metálicos. Esta planta ainda apresentou atividade de bloqueio neuromuscular parcial, que foi associada ao alto teor de flavonoides e fenóis, esta atividade apresentou redução significativa do dano muscular causada por venenos do tipo PLA2 enzimática. Além disso, foi mostrado que extratos polares em metanol inibiam a ação de mionecrose e aumentava a liberação de acetilcolina no organismo, um importante neurotransmissor (Borges *et al.*, 2000; Oshima-Franco *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2014).

Em outros estudos conduzidos com o propósito de investigar as possíveis aplicações dos extratos de *C. sylvestris*, foram apontadas suas atividades anti úlceras, onde os extratos eram aplicados para tratar lesões de pele. Os extratos mostraram atividade promissora para supressão de secreção gástrica, onde estudos relataram que esses extratos promoveram uma proteção das mucosas do estômago dos ratos que foram submetidos aos testes, sem que houvesse alteração no pH gástrico. Ainda determinaram que os extratos das folhas secas foram ainda mais eficientes do que aqueles preparados a partir das folhas frescas, e que diante das úlceras induzidas por ácido acético, os extratos reduziram de forma semelhante o tamanho das feridas e aumentaram a produção de colágenos (Sertie *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 2014).

### 1.2.1 Potencial Antimicrobiano de extratos de *Casearia*

Extratos hidroalcoólicos de espécies de *Casearia* têm demonstrado atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antifúngicas significativas. A atividade anti-inflamatória está associada à presença de terpenos, com extratos de *Casearia tomentosa* Roxb. exibindo efeitos comparáveis ao fármaco fenilbutazona, amplamente utilizado no tratamento de inflamações e alívio da dor (Esteves *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2014). Além disso, substâncias isoladas de *C. sylvestris*, particularmente as casearvestrinas, apresentaram atividade inibitória contra o fungo *Aspergillus niger*, com eficácia semelhante ao antifúngico anfotericina B (Oberlies *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2014).

A literatura científica confirma que espécies como *Casearia sylvestris* e *Casearia tomentosa* possuem substâncias bioativas com ação antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória, especialmente contra microrganismos patogênicos de relevância clínica. A atividade antibacteriana tem sido observada principalmente contra *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram-positiva associada a diversas infecções humanas. O óleo essencial das folhas de *C. sylvestris* mostrou eficácia contra 14 cepas clínicas de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina, destacando-se as substâncias  $\alpha$ -cariofileno e biciclogermacreno, conhecidos por sua ação antimicrobiana (Xia *et al.*, 2014). Adicionalmente, a psicorrubrina, uma naftoquinona isolada de espécies do gênero, demonstrou atividade contra cepas resistentes de *S. aureus*, reforçando seu potencial terapêutico frente a microrganismos multirresistentes (Lemos *et al.*, 2018).

Em relação a bactérias Gram-negativas, embora os estudos sejam menos numerosos, extratos etanólicos de *C. sylvestris* apresentaram atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* e *Escherichia coli*, microrganismos frequentemente mais resistentes a agentes naturais (Xia *et al.*, 2014). Esses resultados sugerem que as substâncias presentes na planta podem ultrapassar as barreiras estruturais dessas bactérias, oferecendo possibilidades para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Lemos *et al.*, 2018).

No contexto de infecções fúngicas, o gênero *Casearia* também se mostra promissor. Extratos etanólicos de *C. sylvestris* exibiram atividade antifúngica contra espécies de *Candida*, incluindo *Candida albicans*, principal agente da candidíase. Esses achados são corroborados por estudos que identificaram a escopoletina, um

metabólito presente em *Casearia*, como eficaz contra cepas multirresistentes e biofilmes de leveduras (Lemos *et al.*, 2020). A eficácia observada tanto *in vitro* quanto *in vivo* sugere a viabilidade de aplicação desses extratos em formulações antifúngicas tópicas ou sistêmicas.

### 1.2.2 *Leishmania spp.*

Além das atividades antimicrobianas e antifúngicas, os extratos de *Casearia* demonstram notável potencial antiparasitário, com destaque para sua eficácia contra *Leishmania spp.*, agente causador da leishmaniose. Estudos comprovam que diversas espécies do gênero apresentam atividade anti-*Leishmania*, complementando seu espectro de ação que inclui ainda efeitos antimaláricos, tripanocidas e larvicidas (Kanokmedhakul *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2014). Essa versatilidade farmacológica está associada à presença de uma diversidade de substâncias bioativas, como terpenoides, glicosídeos fenólicos e flavonoides, que não apenas conferem atividade antiparasitária, mas também sustentam outras propriedades medicinais já bem documentadas, incluindo ações anti-inflamatórias, antiofídicas e antiulcerogênicas (Xia *et al.*, 2014).

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania spp.*, transmitidas por insetos vetores dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (WHO, 2025). Estão distribuídas em aproximadamente 90 países, predominantemente em regiões tropicais e subtropicais e afetam mais de um bilhão de pessoas em áreas de risco (WHO, 2025; Mann *et al.*, 2021; CDC, 2025). Fatores como pobreza, deslocamento populacional e mudanças ambientais contribuem para sua expansão (WHO, 2025). As manifestações clínicas são variadas e causadas por múltiplas espécies de *Leishmania spp.*, além disso podem ser classificadas em três formas principais: cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV), sendo esta última potencialmente fatal se não tratada (Mann *et al.*, 2021).

*Leishmania spp.* apresenta um ciclo de vida digenético, adaptando-se a ambientes radicalmente distintos. No intestino do vetor flebotomíneo, desenvolve-se como promastigota - forma flagelada extracelular alongada. Ao longo do processo natural de infecção, após serem inoculadas no hospedeiro mamífero, as promastigotas são rapidamente fagocitadas por macrófagos, onde a temperatura e o

ambiente ácido desencadeiam sua transformação em amastigotas - formas intracelulares não flageladas e imóveis que se replicam ativamente no interior dessas células imunológicas (Mann *et al.* 2021).

*Leishmania (L.) amazonensis* é uma espécie de grande relevância no contexto da leishmaniose cutânea devido à sua ampla distribuição e à diversidade de manifestações clínicas associadas à infecção. Além de causar lesões ulceradas típicas da LC, essa espécie também pode levar ao desenvolvimento da leishmaniose cutânea difusa (LCD), uma forma mais severa e de difícil tratamento, relacionada à falha na resposta imunológica do hospedeiro. Diante das limitações terapêuticas atuais, como efeitos adversos e resistência parasitária, a busca por novas substâncias bioativas a partir de produtos naturais tem se intensificado nas últimas décadas, especialmente para doenças negligenciadas como a leishmaniose (Mann *et al.*, 2021; WHO, 2025).

### 1.2.3 *Casearia selloana* Eichler

No Brasil, espécies do gênero *Casearia* ocorrem em todas as regiões do país. A espécie *Casearia selloana* Eichler “pau preto” é nativa, sendo considerada endêmica no território nacional. A maior ocorrência desta espécie no Brasil se dá nas regiões do Nordeste e Sudeste, sendo encontrada em estados como Alagoas, Bahia, Paraíba, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, como pode ser observado na Figura 4, que representa a distribuição geográfica da espécie nas regiões de maior ocorrência (Marquete *et al.*, 2015).

Figura 4 – Distribuição geográfica de *Casearia selloana* Eichler.



Fonte: Marquete e Medeiros (2025).

Considerando que as técnicas de investigação estão em constante evolução, é importante direcionar a pesquisa para plantas não estudadas. Como é o caso de *C. selloana*, que é definida por Marquete *et al.*, (2015) como uma árvore ou arbusto de 3 - 8m de altura com folhas persistentes, discolores e opacas nas duas faces (Figura 5). Esta espécie, até o momento, não apresentou resultados significativos nas bases de dados científicas. Embora seja uma espécie nativa do Brasil, não há registros de estudos abrangentes sobre sua composição ou potenciais aplicações medicinais (Govaerts *et al.*, 1999; Marquete *et al.*, 2015).

Figura 5 – Detalhes das faces abaxial e adaxial dos ramos vegetativos de *Casearia selloana*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Diante dos dados fornecidos por organizações botânicas de conservação e catalogação de plantas, como a Flora e Funga do Brasil e Royal Botanic Gardens, existem poucos artigos científicos que tratam sobre essa espécie. Ao acessar as bases fornecidas por essas organizações nota-se que apenas três artigos no total são associados a essa planta, os quais tratam apenas sobre sua catalogação, o que abre portas para o pioneirismo no tratamento dos dados que podem ser obtidos no presente trabalho a partir de métodos de extração e separação (Govaerts *et al.*, 1999; Marquete *et al.*, 2015).

Essa abordagem contribui para a aplicação prática dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU), especificamente no que se refere à produção e consumo responsáveis. Os ODS representam um chamado global para a proteção do meio ambiente e do clima, além de promoverem a paz e a prosperidade para todas as pessoas. Um exemplo disso é o estudo de uma espécie nativa da Mata Atlântica brasileira, que evidencia a importância da pesquisa científica para a sua conservação. Dessa forma, a investigação química e a avaliação de suas atividades biológicas estão alinhadas com as metas estabelecidas para os ODS 2030 (Nações Unidas, 2015).

Portanto, é crucial enriquecer e expandir os estudos sobre os componentes presentes em plantas desse gênero, especialmente aquelas que não possuem estudos quanto a investigação detalhada sobre suas potencialidades e possíveis aplicações como fontes precursoras para a síntese ou otimização de substâncias inéditas. A exploração da composição química e biológica dessas plantas pode revelar novas substâncias com propriedades úteis.

### 1.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

De acordo com Nortjie e colaboradores (2022) em sua revisão sobre métodos de extração de plantas medicinais, o solvente empregado na extração é capaz de solvatar classes de substâncias específicas cujas polaridades e coeficientes de partição são características determinantes. Nesse contexto, foi descrita uma relação de solventes por Nortjie *et al.* (2022) e Pandey *et al.* (2014) de possível aplicação na extração de classes de fitoquímicos. Segundo esses autores, extrações realizadas com água e etanol permitem a obtenção de substâncias como fenois, polifenois, quinonas, taninos, flavonoides, terpenoides, lectinas, alcaloides e glicosídeos, entre outros.

Dentre os métodos convencionais de extração, estão aqueles onde o uso de solventes é fundamental, como, por exemplo, a maceração, infusão, decocção e percolação. Todos esses métodos se baseiam no mesmo princípio, em que a amostra é mantida em contato com um solvente, ou uma mistura de solventes, por um tempo programado, variando ou não a temperatura, para que ocorra a dissolução dos fitoquímicos no solvente, permitindo a posterior análise dos extratos obtidos (Salah e Allouche 2019; Sharma *et al.*, 2021).

A maceração consiste na imersão da amostra vegetal em um solvente por um período prolongado, geralmente dias, à temperatura ambiente, com agitação ocasional. Esse método é adequado para a extração de constituintes termolábeis, mas pode ser demorado e menos eficiente para alguns fitoquímicos. Já a infusão é semelhante à maceração, porém o tempo de contato entre a amostra e o solvente é mais curto, podendo ser feito com água fria ou quente, dependendo da estabilidade térmica das substâncias de interesse. No processo de decocção, a amostra é fervida em água por um período específico, sendo adequada para substâncias solúveis em água e estáveis ao calor.

#### 1.4 PLANEJAMENTO DE MISTURAS

Em parâmetros estatísticos, a utilização de um planejamento de misturas é uma ferramenta muito poderosa para se medir os efeitos individuais de cada variável dentro do contexto geral de um experimento. Pode-se afirmar que modelos matemáticos e estatísticos auxiliam fortemente nas tomadas de decisões e otimização do trabalho experimental. Assim, o objetivo de se construir um planejamento de misturas é verificar qual proporção relativa das variáveis fornece o melhor resultado (Adriano *et al.*, 2024). No contexto da extração de metabólitos especiais de tecidos vegetais, essa ferramenta permite estudar as combinações sistemáticas de diferentes solventes para verificar a influência de cada um destes na efetividade da extração, assim como suas interações relativas com o material vegetal (Marcheafave *et al.*, 2019).

De acordo com Cornell *et al.* (2002) e Reis *et al.* (1996), na aplicação de um planejamento de misturas, a resposta, ou no contexto atual, sinal analítico, irá depender apenas da mudança na proporção relativa entre os componentes da mistura, sendo a soma das proporções igual a 1 ou 100%, como pode ser observado na Equação 1, sendo  $q$  o número de componentes presentes na mistura:

$$\sum_{i=1}^q x_i = 1 \text{ onde } 0 \leq x_i \leq 1 \quad (1)$$

A principal vantagem do planejamento de misturas é a capacidade de otimizar processos empíricos, maximizando a geração de informações úteis enquanto

minimiza o esforço experimental e os custos associados. Isso é particularmente relevante em contextos onde a interação entre os componentes da mistura pode influenciar significativamente a resposta final, como na extração de substâncias bioativas de plantas, onde diferentes solventes podem apresentar efeitos sinérgicos ou antagônicos (Adriano *et al.*, 2024).

Além disso, o planejamento de misturas permite a construção de modelos matemáticos que descrevem o comportamento do sistema em estudo. Esses modelos podem ser lineares, quadráticos ou cúbicos, dependendo da complexidade das interações entre os componentes. Por exemplo, um modelo linear pode ser suficiente para descrever misturas ideais, enquanto modelos quadráticos e cúbicos são necessários para capturar interações mais complexas entre os componentes (Adriano *et al.*, 2024). A escolha do modelo adequado é crucial para garantir que o sistema seja bem representado e que as previsões sejam precisas. É possível descrever um modelo linear que representa a mistura de dois componentes, onde a resposta será determinada pela Equação 2.

$$\hat{y} = b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + \varepsilon \quad (2)$$

É importante mencionar que os coeficientes de regressão ( $i = 1, 2$ ) são representados com um sobrescrito em asterisco para enfatizar que não se tratam de variáveis independentes, mas sim das variáveis vinculadas à Equação 1, ou seja, a quantidade de componentes na mistura que, somando suas proporções, sempre é obtido um valor constante igual a um, sendo  $\varepsilon$  o termo associado ao erro aleatório. Para representar as possíveis interações entre os componentes de uma mistura entre dois componentes, é possível se descrever um modelo quadrático conforme representado na Equação 3, onde as interações binárias entre os componentes são representadas pelo termo de interação quadrática, terceiro termo da Equação 3.

$$\hat{y} = b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + b_{12}^*x_1x_2 + \varepsilon \quad (3)$$

Outra vantagem significativa do planejamento de misturas é a possibilidade de explorar diferentes regiões experimentais, como os planejamentos em rede simplex, centroide-simplex e vértices extremos. Esses métodos permitem a avaliação de uma ampla gama de combinações de componentes, facilitando a identificação de

proporções ideais que maximizam ou minimizam a resposta desejada (Adriano *et al.*, 2024).

A utilização de *software* livre, como o RStudio e o LibreOffice, permitem a execução de análises estatísticas complexas de forma eficiente e acessível, sem a necessidade de investimentos em software pagos. O RStudio, em particular, oferece pacotes específicos, que facilitam a construção de modelos de misturas e a visualização de superfícies de resposta, tornando a análise mais intuitiva e didática (Adriano *et al.*, 2024).

Em resumo, o planejamento de misturas é uma ferramenta essencial para a otimização de processos experimentais, permitindo a identificação de proporções ideais de componentes e a compreensão das interações entre eles. Sua aplicação em diversas áreas, como a química, a engenharia de materiais e a biotecnologia, demonstra sua versatilidade na redução de custos e tempo, além de proporcionar a tomada de decisões baseadas em dados (Adriano *et al.*, 2024).

## 1.5 ANÁLISE DE FITOQUÍMICOS POR MÉTODOS DE SEPARAÇÃO

A descoberta de propriedades terapêuticas em espécies vegetais negligenciadas demanda a construção de perfis químicos, os quais podem revelar produtos bioativos com potencial aplicação farmacêutica (Leitzmann, 2016; Khan *et al.*, 2021; Mihaylova *et al.*, 2023). Entre as técnicas analíticas disponíveis, destacam-se métodos cromatográficos como a cromatografia de camada fina (unidimensional e bidimensional) (Huang *et al.*, 2018); cromatografia com fase gasosa (CG) (Mlozi *et al.*, 2022); cromatografia contracorrente (CCC) (Zhang *et al.*, 2015) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD), que se destaca como método amplamente empregado na separação e identificação de metabólitos secundários (Huang *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2021).

Correia *et al.* (2023), por exemplo, utilizaram diferentes métodos de extração em mudas de capim-limão juntamente com cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) para realizar análises dos extratos. A análise cromatográfica ocorreu em fase reversa com uma coluna C18, utilizando gradiente linear de água/acetoneitrila como fases móveis. O método de detecção aplicado foi o de arranjo de diodos, que permite uma varredura do espectro eletrônico em ampla faixa de comprimentos de onda para cada substância separada, fornecendo

dados mais precisos quanto à absorção específica da substância na região do ultravioleta e do visível (UV-Vis) do espectro eletromagnético. Entretanto, foi dada maior atenção para os espectros obtidos entre 254-281 nm, pois é a faixa onde a maioria dos metabólitos secundários absorve com maior intensidade (Correia *et al.*, 2023).

O CLAE-DAD tem sido amplamente empregado como método preferencial para a separação e identificação de metabólitos secundários em diversas espécies botânicas, conforme evidenciado por estudos publicados na última década (Merino *et al.*, 2015; Santi *et al.*, 2014; Pires *et al.*, 2023; Correia *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2018). Nesses trabalhos, a fase reversa com coluna C18 e eluição em gradiente de água acidificada e solventes orgânicos, como por exemplo acetonitrila, destacam-se como condições analíticas recorrentes. Segundo Simões *et al.* (2004), a acidificação das fases móveis inibe a ionização de substâncias polares, assegurando maior estabilidade nos tempos de retenção e melhorando a resolução cromatográfica.

Em contraste com as técnicas cromatográficas, métodos espectrofotométricos qualitativos, como o ensaio de *Folin-Ciocalteu* para fenóis totais, oferecem análises rápidas, porém menos seletivas (Merino *et al.*, 2015; Santi *et al.*, 2014; Pires *et al.*, 2023; Filho *et al.*, 2021). Além disso, análises espectrofotométricas em faixas de 250-850 nm podem prever quais substâncias estão presentes nos extratos vegetais com base nas bandas características de alcaloides, fenólicos, flavonoides e carotenoides (Garcia Díaz *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2018; Bernardi *et al.*, 2017). Entretanto, a identificação precisa de fitoquímicos exige o uso de padrões de referência, como ácido gálico, catecol, catequina, ácido clorogênico, vanilina e quercetina, que são comumente utilizadas como padrões devido à sua presença generalizada em plantas e sua relevância no ciclo biossintético de metabólitos secundários. Assim, os tempos de retenção e espectros permitem a realização de calibração quantitativa (Pires *et al.*, 2023). Diante do exposto, técnicas como CLAE-DAD destacam-se pela capacidade de combinar seletividade e sensibilidade, sendo adequada para estudos fitoquímicos em matrizes complexas.

## 2 OBJETIVOS

As próximas seções estão focadas em expor os principais objetivos estipulados para realização deste trabalho de forma sistemática e coerente.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um perfil cromatográfico dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Casearia selloana* por meio de um planejamento de misturas binárias, avaliando as variações nos cromatogramas em função das diferentes proporções de solventes. Além disso, realizar ensaios biológicos com os extratos obtidos para investigar seus potenciais efeitos bactericidas, fungicidas, citotóxico e antileishmania.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a extração de fitoquímicos de *Casearia selloana* utilizando misturas hidroalcoólicas em diferentes proporções;
- Desenvolver método analítico por CLAE-DAD para separação e identificação dos constituintes dos extratos;
- Avaliar parâmetros de otimização do método cromatográfico;
- Submeter os dados a análises estatísticas para correlação entre composição química e proporções de solventes;
- Investigar atividades biológicas por meio de ensaios farmacológicos *in vitro* e/ou *in vivo*.

### 3 MATERIAIS E REAGENTES

Os reagentes utilizados no estudo foram adquiridos das empresas VETEC Química Fina Ltda., Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Sigma Aldrich Corporation e Cromoline Química Fina. A água utilizada foi purificada por um sistema de osmose reversa. Foram empregados reagentes de grau analítico, como etanol, para a extração das folhas secas de *Casearia selloana*. Além disso, solventes de grau analítico, como metanol e solução de ácido fórmico a 1%, foram utilizados nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido da marca Waters, modelo Arc, equipado com detector de arranjos de diodos (DAD) e uma coluna cromatográfica da marca Welchrom de 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno, preenchida com sílica octadecilsilanizada (5 µm).

Para a realização dos ensaios biológicos, foram utilizados meios de cultura específicos, como ágar Mueller-Hinton (Kasvi) e ágar Sabouraud (Kasvi), além de caldo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com L-glutamina (2 mM), soro fetal bovino (SFB, 5–20%) e solução de antibióticos contendo penicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As linhagens bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC® 33591™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 2742™ e a fúngica *Candida albicans* ATCC® 10231™ foram utilizadas nos ensaios de atividade antimicrobiana, conduzidos segundo o protocolo da CLSI. Células murinas L929 (fibroblastos), 4T1 (tumor de mama) e macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram empregadas para os ensaios de citotoxicidade. As formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 20% de SFB. O ensaio de viabilidade celular foi realizado com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico (MTT, Sigma Chemical Co.), dissolvido em PBS a 5 mg/mL, e a absorbância foi mensurada a 570 nm em espectrofotômetro Multiskan EX (Thermo Electron Corporation). A miltefosina foi utilizada como fármaco de referência nos ensaios antileishmaniais.

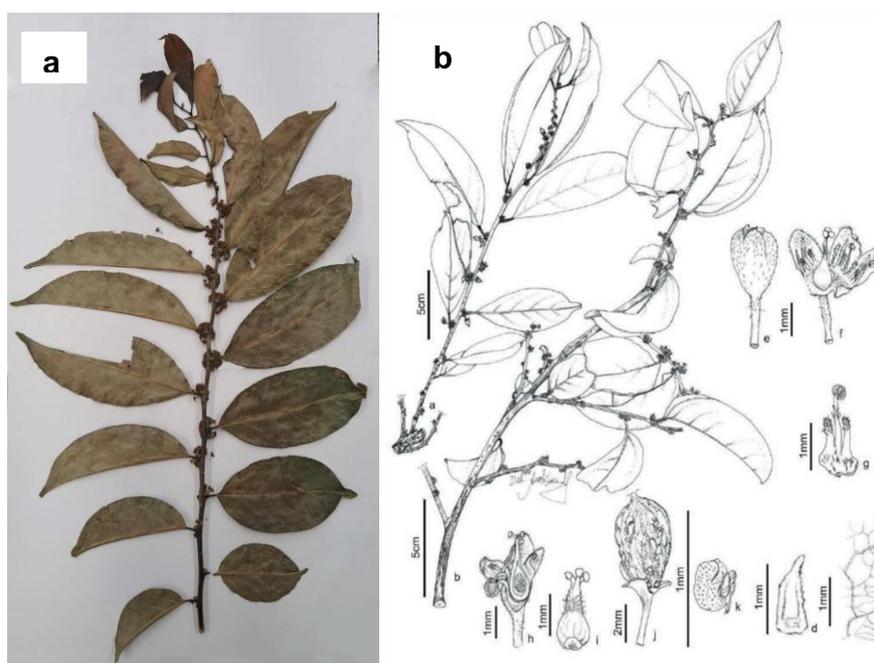
#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas frescas de *Casearia selloana* Eichler foram coletadas em 19 de setembro de 2023, na cidade de Juiz de Fora – MG, em um fragmento florestal

localizado no perímetro urbano, 21°41'15.96" S; 43°19'09.71" W; 822 m acima do nível do mar. A maioria das espécies vegetais dessa área já tinha sido identificada por trabalhadores da empresa Cimo Engenharia Ambiental e Saneamento, em conjunto com estudantes do curso de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

O trabalho realizado pelos estudantes teve como objetivo a identificação das espécies presentes na região, bem como a obtenção de tecidos vegetais para manutenção e registro. As árvores do local foram marcadas com placas numeradas, permitindo a catalogação das espécies. A equipe responsável possuía uma lista relacionando os números de identificação ao nome da espécie, além de dados sobre localização exata (obtidos por GPS), diâmetro e altura de cada indivíduo arbóreo. Após a coleta, um galho contendo o maior número de folhas e flores foi utilizado para a construção de uma exsicata, que posteriormente foi comparada com imagens e informações disponíveis na literatura (Figura 6). A exsicata encontra-se depositada no Herbário CESJ sob o número 81694, com licenças de coleta registradas no SISBIO (48834) e no SISGEN (A14036E).

Figura 6 – *Casearia selloana* Eichler. a) Exsicata depositada no Herbário CESJ. b) Representações e dimensões dos órgãos vegetais encontrados na literatura.



Fonte: a) Elaborado pelo autor. b) Marquete *et al.*, 2016.

## 4 METODOLOGIA

As próximas seções focam em explicar as metodologias aplicadas em cada etapa do presente trabalho e as ações que foram tomadas.

### 4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Foram coletados aproximadamente 2 kg de material fresco, contendo galhos e flores, as folhas foram separadas para dar início ao processo de secagem. Após a separação, elas foram transferidas para uma estufa a 40 °C, com ventilação de ar, onde permaneceram por 48 horas até atingirem massa constante. Esse processo resultou na obtenção de aproximadamente 600 g de folhas secas, prontas para a etapa de extração.

### 4.2 EXTRAÇÃO E PLANEJAMENTO DE MISTURAS

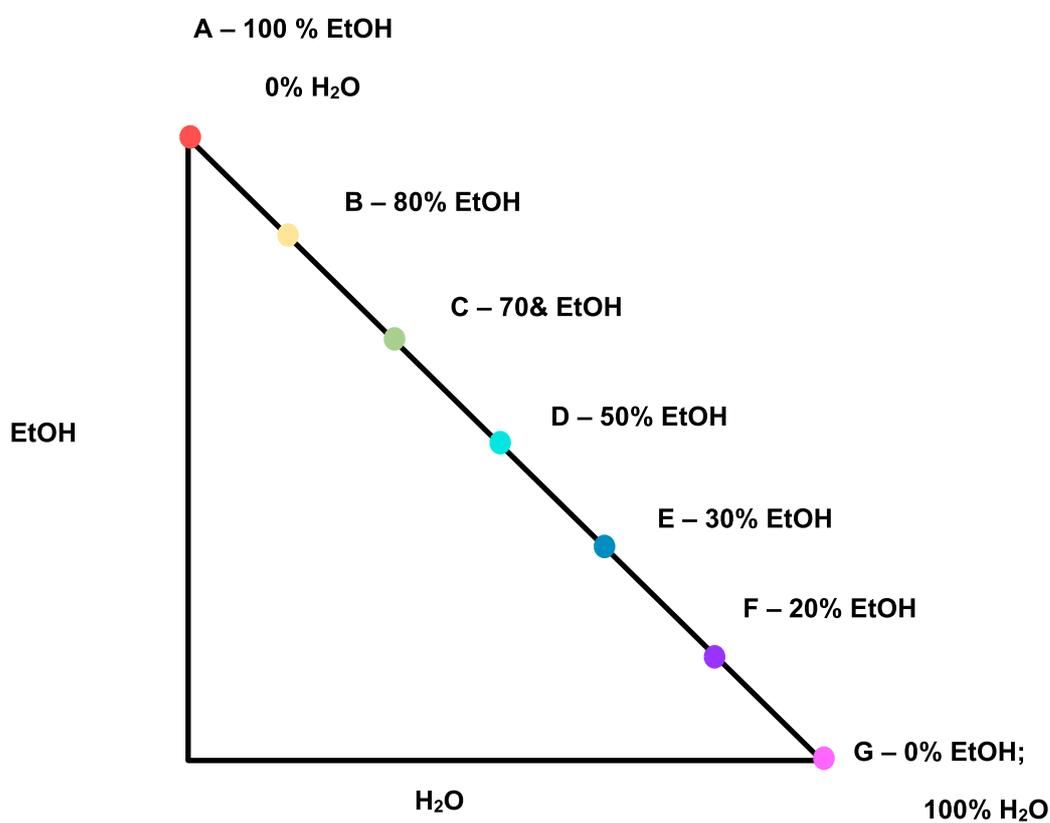
Com o objetivo de obter um perfil abrangente dos fitoquímicos presentes em *C. selloana*, adotou-se a extração hidroalcoólica, em conformidade com os princípios da química verde, uma vez que os solventes - água e etanol apresentam baixa toxidez ambiental. Além disso, essa escolha se aproxima da forma como esse extrato é tradicionalmente consumido, uma vez que a mistura água/etanol é amplamente utilizada pela população, sendo composta por solventes não tóxicos, de fácil acesso e amplamente reconhecidos.

Optou-se pela técnica de maceração estática por 24 horas (Sanchez *et al.*, 2017). Uma vez que esse tempo favorece a difusão eficiente dos metabólitos da planta para o solvente, sem causar degradação de compostos sensíveis. Esse tempo de extração é amplamente adotado na literatura, como evidenciado no estudo de Iranawati *et al.* (2020), no qual a maceração por 24 h com metanol foi a que proporcionou maior atividade antioxidante em folhas de *Sonneratia caseolaris*, superando os tempos de 48 e 72 h. Isso demonstra que o tempo de 24 h é eficaz para a extração de compostos bioativos, mantendo sua integridade química. Para otimizar a extração, as folhas foram trituradas, aumentando a área de contato com a solução extratora e, conseqüentemente, a eficiência do processo. A composição da solução extratora foi definida conforme um planejamento de misturas binárias, variando as

proporções de água e etanol para avaliar o impacto dessas condições na extração das substâncias.

O planejamento de misturas experimental consistiu em sete pontos amostrais, com extrações realizadas em triplicata autêntica e aleatória para cada condição, totalizando 21 amostras (Figura 7 e Tabela 2). Para cada extração, aproximadamente 5 g do material vegetal foram pesados em béqueres de 100 mL, seguidos da adição de 50 mL da solução extratora correspondente. Os recipientes foram vedados com filme plástico de parafina, cobertos com papel alumínio e mantidos sob refrigeração a 9 °C durante 24 horas.

Figura 7 – Planejamento de Misturas (Etanol x Água).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 – Legenda pontos amostrais do planejamento de misturas.

Nível	Ensaio	Etanol X1	Água X2
A	1	1	0
	2	1	0
	3	1	0
B	4	0,8	0,2
	5	0,8	0,2
	6	0,8	0,2
C	7	0,7	0,3
	8	0,7	0,3
	9	0,7	0,3
D	10	0,5	0,5
	11	0,5	0,5
	12	0,5	0,5
E	13	0,3	0,7
	14	0,3	0,7
	15	0,3	0,7
F	16	0,2	0,8
	17	0,2	0,8
	18	0,2	0,8
G	19	0	1
	20	0	1
	21	0	1

Fonte: Elaborado pelo autor

Após o período de extração, as soluções foram filtradas com papel filtro de 0,16 mm de espessura para remoção do material vegetal e partículas em suspensão. O volume das soluções foi reduzido por rotaevaporação a 60 °C, eliminando a fração etanólica. Em seguida, as amostras contendo apenas a fração aquosa foram congeladas e submetidas ao processo de liofilização. O extrato seco obtido foi pesado para cálculo de rendimento.

#### 4.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

O método cromatográfico utilizado neste estudo foi baseado em metodologias descritas na literatura, incluindo a Farmacopeia Brasileira, para determinação de quercetina em folhas de *Psidium guajava* L. Assim como realizado nos trabalhos de

Merino *et al.* (2015), Santi *et al.* (2014), Pereira *et al.* (2018), Pires *et al.* (2023) e Correia *et al.* (2023), no presente trabalho, os extratos foram obtidos com solventes como água, etanol e metanol. Esses estudos serviram como referência para a aplicação do método deste trabalho.

O cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Waters foi utilizado para a análise dos extratos, empregando uma coluna C18 (250 mm, 4.6 mm × 5 µm) em fase reversa. A fase móvel consistiu em um sistema de gradiente de água à 0,1% de ácido fórmico (Eluente A) e metanol (Eluente B). O gradiente foi programado de acordo com os dados apresentados na Tabela 3. Um padrão de quercetina foi preparado com a concentração de 0,038 mg/mL, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (2019), monografia PM048-00. Para isso, 0,038 mg do padrão de quercetina foi solubilizada em 1 mL de metanol. As amostras foram injetadas, em duplicata, em um volume de 10 µL. O tempo total de análise foi de 21 minutos, garantindo a eluição completa dos analitos. A detecção foi realizada utilizando um detector UV-Vis ajustado para leituras à 371nm, conforme recomendado na Farmacopeia Brasileira, garantindo alta sensibilidade na identificação dos fenólicos.

A escolha da quercetina como padrão analítico neste trabalho também se justifica pela sua reconhecida ocorrência em extratos de espécies do gênero *Casearia*. Vieira Júnior (2010) demonstrou a presença de quercetina em extratos etanólicos das folhas de *Casearia gossypiosperma*, corroborando a relevância do flavonoide como marcador químico em estudos fitoquímicos com espécies do gênero.

Tabela 3: Esquema de eluição para cromatografia líquida de alta eficiência.

Tempo	B %	Eluição
0 - 3	40	Constante
3 - 15	100	Varição
15 - 16	40	Varição
16 - 21	40	Constante

Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS DOS EXTRATOS

A avaliação das atividades biológicas dos extratos hidroalcoólicos de *C.selloana* foi realizada com o objetivo de correlacionar as propriedades bioativas observadas com o perfil fitoquímico desenvolvido para as diferentes proporções de solventes. Para isso, 5mg dos extratos secos foram separados para investigação dos efeitos citotóxicos, antileishmania, bactericidas e fungicidas dos extratos elaborados no planejamento de misturas, permitindo uma investigação eficiente dos potenciais farmacológicos dos extratos.

##### 4.4.1 Ensaio para Determinação da CIM, CBM e CFM

O ensaio foi conduzido conforme o protocolo da CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). As linhagens bacterianas (*Staphylococcus aureus* ATCC® 33591™ e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 2742™) foram cultivadas em ágar Mueller Hinton e a linhagem fúngica (*Candida albicans* ATCC® 10231™) em ágar Sabouraud. Utilizou-se o método de microdiluição em caldo com diluições de 1000 a 125 µg/mL das amostras. As microplacas de 96 poços foram preenchidas com solução de amostras, meio de cultura e inóculo ( $3 \times 10^6$  UFC/mL para bactérias e  $3 \times 10^4$  UFC/mL para fungos). Os controles de crescimento e brancos foram incluídos. As placas foram incubadas (37°C para bactérias e 35°C para fungos) por 24 horas, e os experimentos foram realizados em triplicata.

As concentrações bactericidas (CBM) e fungicidas (CFM) mínimas foram determinadas com base no método de Spencer e Spencer (2004). Após definir os valores da CIM, amostras de 10 µL das culturas sem crescimento visível foram transferidas para placas de ágar MH (para bactérias) e ágar Sabouraud (para fungo). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para bactérias e a 35°C por 24 horas para fungos.

#### 4.4.2 Ensaio de Análise da Citotoxicidade

Fibroblastos L929 e células tumorais de câncer de mama 4T1 murinos, foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 5% de SFB e solução de antibióticos, penicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Tanto os fibroblastos L929 quanto macrófagos peritoneais foram mantidos em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até o dia do experimento.

A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA), que permite estimar a viabilidade celular por meio da conversão do tetrazólio, amarelo, em cristais de formazan, lilás, um processo dependente da atividade mitocondrial cuja intensidade de cor é proporcional ao número de células viáveis (Mosmann, 1983). Os fibroblastos L929 e as células tumorais 4T1 cultivados foram transferidos para microplacas de 96 poços (1x10<sup>5</sup> e 2x10<sup>5</sup> células/poço respectivamente). Ambos foram tratados com os extratos em concentrações que variaram de 18,75 a 300,00 µg/mL. Para o controle, foram utilizadas células tratadas apenas com dimetilsulfóxido (DMSO). As células L929 foram incubadas por 24 horas e as células 4T1 foram incubadas durante 48 h em 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C. Após esse período, o sobrenadante foi removido e adicionaram-se 90 µL de meio suplementado acrescidos de 10 µL de solução de MTT à 5 mg/mL, para que então as placas fossem incubadas por 2:30 h à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. A experiência foi realizada em duplicata e em três réplicas para as concentrações testadas. A absorbância (Abs) foi lida a 570 nm em espectrofotômetro e a viabilidade celular (%) obtida pela equação 4:

$$\% \text{ Células Viáveis} = \frac{\text{Abs (Amostra)}}{\text{Abs (Controle Negativo)}} \times 100 \quad (4)$$

Onde: Abs (Amostra): absorbância medida após tratamento das células com a amostra; Abs (Controle Negativo): absorbância medida após tratamento das células com DMSO (veículo).

### 4.4.3 Ensaio de Atividade Antileishmania

As próximas seções são responsáveis por demonstrar as metodologias aplicadas para análises biológicas de atividade antileishmania dos extratos testados.

#### 4.4.3.1 Cultivo de parasitos

Neste estudo foi utilizada a cepa selvagem de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8). As células foram cultivadas em garrafas para cultivo celular (Corning 430168), mantidas em incubadora denominada BOD (do inglês Biochemical Oxygen Demand” ou Demanda Bioquímica de oxigênio) a 25 °C.

#### 4.4.3.2 Manutenção da infectividade das linhagens de *L. amazonenses*.

Para garantir a infectividade das linhagens de *L. amazonensis* utilizadas neste estudo, foram utilizadas fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c com 4 a 6 semanas de idade. Então, as formas promastigotas de *L. amazonensis*, em fase estacionária da curva de crescimento, foram contadas em câmara de Neubauer, ajustadas em PBS (“*Phosphate Buffer Solution*”) para  $2 \times 10^6$  parasitos e foram inoculados 10 µL no coxim plantar da pata direita traseira dos animais. Após aproximadamente 40 dias de infecção os parasitos foram isolados através de punção da lesão, onde as formas amastigotas foram isoladas e semeadas em meios de cultivos descritos acima, suplementado com 20% de SFB e 1% de solução de penicilina/estreptomicina e mantidas em BOD para conversão das formas amastigotas em promastigotas. Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFJF (CEUA nº 009/2018, Anexo I).

#### 4.4.3.3 Avaliação da toxidez dos extratos em promastigotas de *L. amazonensis*

A atividade citotóxica dos extratos foi avaliada por meio do método colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico (MTT), conforme descrito por Mosmann (1983). O ensaio foi realizado tanto em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c quanto em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa PH8), permitindo estimar a seletividade dos extratos com base nos efeitos sobre células de mamíferos e protozoários.

As formas promastigotas, em fase logarítmica de crescimento, foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração de  $2 \times 10^6$  parasitos/poço em placas de 96 poços (Sarstedt 83.3924.500), contendo o meio de cultivo apropriado. Os extratos foram testados em duplicata, em concentrações variadas (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125  $\mu\text{g/mL}$ ), obtidas por diluição seriada. A miltefosina foi utilizada como fármaco de referência, e os experimentos foram repetidos de forma independente em triplicata. Poços sem extratos foram utilizados como controle negativo.

Após 72 horas de incubação em BOD a 25 °C, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de solução de MTT (5 mg/mL) a cada poço, com posterior incubação por mais 4 horas à mesma temperatura. Em seguida, adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol acidificado (0,7% de HCl 10N) para interromper a reação. A absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro (Multiskan EX - Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlândia).

Os valores obtidos foram convertidos em porcentagem de inibição do crescimento em relação ao controle. A partir desses dados, foi determinado o valor de  $\text{CI}_{50}$  (concentração inibitória de 50%), utilizando o *software* GraFit 5 (Erithacus Software Ltd., Horley, UK). A relação entre a concentração citotóxica capaz de reduzir 50% da viabilidade celular  $\text{CC}_{50}$  e o  $\text{CI}_{50}$  foi utilizada para o cálculo do índice de seletividade (IS), um parâmetro essencial na identificação de candidatos promissores a fármacos.

#### 4.4.3.4 Avaliação da toxidez dos extratos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c

O potencial citotóxico dos extratos em células de mamíferos foi avaliado utilizando macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Para a obtenção dos macrófagos, os animais foram previamente estimulados com 2 mL de caldo tioglicolato a 3%, 72 horas antes da coleta. Após a eutanásia, realizou-se o lavado peritoneal com 6 mL de solução de Hank estéril, aplicado duas vezes em cada animal para maximizar a recuperação celular. A suspensão obtida foi transferida para tubos cônicos e centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos (centrífuga Thermo Fisher Scientific D37520). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), sendo posteriormente contadas em câmara de Neubauer para ajuste da concentração.

As células foram ajustadas para  $2 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 0,5% de solução de penicilina/estreptomicina. Essa suspensão foi distribuída em placas de 96 poços (KASVI K12-096) e incubada por 16 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, para permitir a adesão dos macrófagos. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS para remoção das células não aderidas, e novo volume de meio RPMI foi adicionado.

Os poços foram então tratados com diferentes concentrações dos extratos (300,0; 150,0; 75,0; 37,5; 18,75 e 9,37 µg/mL), preparadas por diluição seriada, e incubados por mais 72 horas nas mesmas condições. Em seguida, foram adicionados 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL) em cada poço, com posterior incubação por 2 horas, conforme descrito por Mosmann (1983). A reação foi então interrompida com a adição de solução de isopropanol acidificado (7% de HCl 10N), e a absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro.

A viabilidade celular foi determinada com base na porcentagem de inibição dos macrófagos tratados em relação ao controle negativo. A partir desses dados, foi calculado o valor de CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica capaz de reduzir 50% da viabilidade dos macrófagos), utilizando o *software* GraFit 5 (Erithacus Software Ltd., Horley, UK). Foram realizados três experimentos independentes, em duplicata, utilizando poços sem tratamento como controle negativo. A miltefosina foi utilizada como fármaco de referência. Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFJF (CEUA nº 007/2018, Anexo II).

#### 4.4.3.5 Avaliação da toxidez dos extratos em amastigotas intracelulares de *L. amazonenses*

A atividade anti-amastigota dos extratos foi avaliada utilizando a cepa PH8 de *L. amazonensis*, conforme descrito por Granato *et al.* (2018). Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, obtidos como descrito anteriormente, foram ajustados para  $2 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI-1640 e plaqueados em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas (KASVI K12-024). As células foram incubadas por 16 horas a 33 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, para adesão. Após lavagem com PBS, promastigotas em fase logarítmica foram adicionadas na proporção de 10:1 (parasito:macrófago), e as placas foram incubadas por 4 horas para permitir a infecção. Em seguida, os poços foram lavados para remoção dos parasitos não

fagocitados e adicionou-se novamente meio RPMI suplementado. Os extratos foram testados em duplicata, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12  $\mu\text{g/mL}$ , preparadas por diluição seriada. As placas foram incubadas por 72 horas nas mesmas condições. Após o tratamento, o meio foi removido, as lamínulas fixadas com etanol absoluto e coradas com Giemsa. A desidratação foi feita por passagem em gradientes de acetona/xilol (100% acetona  $\rightarrow$  100% xilol), e as lamínulas montadas em lâminas de vidro para análise em microscópio de luz (Olympus BX41). A atividade antileishmania foi determinada pela contagem de 200 macrófagos (infectados e não infectados) e das amastigotas intracelulares. A eficácia foi expressa como porcentagem de inibição da carga parasitária em relação ao controle negativo, sendo o  $\text{CI}_{50}$  determinado por análise Probit. A miltefosina foi utilizada como fármaco de referência. Três experiências independentes foram realizadas em duplicata.

#### 4.4.3.6 *Determinação do Índice de Seletividade (IS) dos extratos*

O IS demonstra o quanto uma substância/extrato pode ser ativo em uma forma parasitária sem causar danos à célula hospedeira. É dado pela razão entre o  $\text{CC}_{50}$  obtido no teste de citotoxicidade em macrófagos e o  $\text{CI}_{50}$  obtido para as formas amastigotas, que neste caso é a forma parasitária de interesse, já que é a responsável pelas manifestações clínicas das leishmanioses (Tempone, Oliveira e Berlinck, 2011).

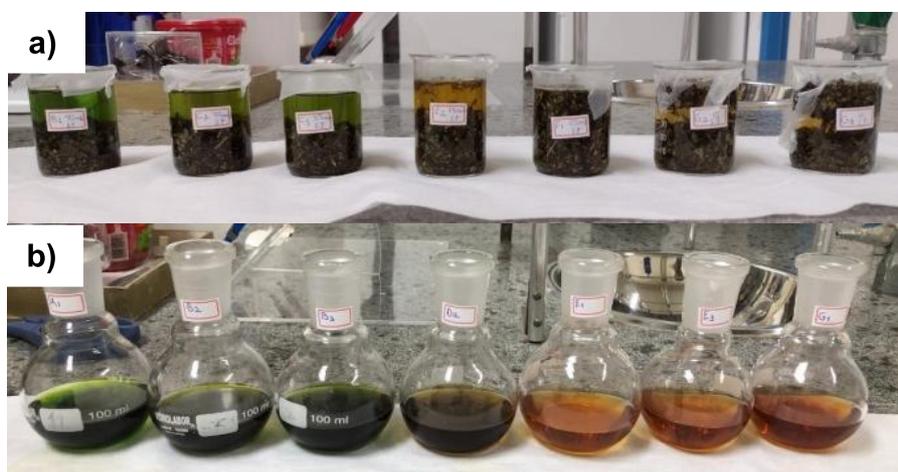
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seção que segue está focada em apresentar os resultados que foram obtidos após a realização dos objetivos estipulados para conclusão do trabalho.

### 5.1 EXTRAÇÕES

Diante dos resultados obtidos após extração nos diferentes níveis amostrais, verificou-se uma diferença na coloração das soluções das diferentes proporções de etanol/água. Observou-se que extrações com maior proporção de etanol se tornaram mais esverdeadas enquanto que as soluções com maior proporção de água possuíam a cor mais alaranjada. A Figura 8 mostra as soluções imediatamente após ser adicionado o material vegetal na solução extratora e após o período de extração de 24 horas.

Figura 8: a) Extração no tempo zero; b) Soluções após extração por 24 horas e filtradas.



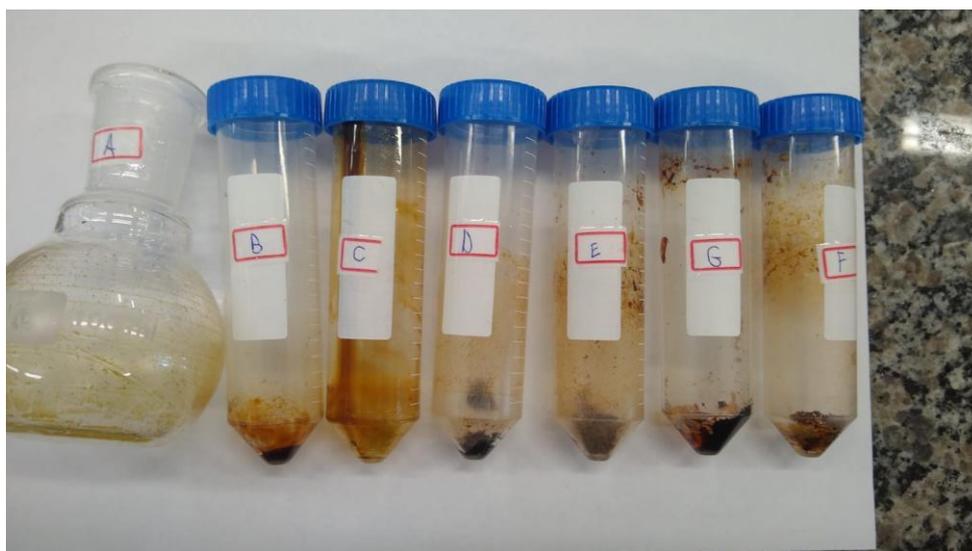
Fonte: Elaborado pelo autor.

A presença da coloração esverdeada nas soluções com maior proporção de etanol pode ser explicada pela maior solubilidade da clorofila nesse sistema. A clorofila  $\alpha$ , principal pigmento verde das plantas, é mais eficientemente extraída em solventes orgânicos menos polares como o etanol, em comparação com a água (Ngcobo *et al.* 2023). Além disso, observou-se que as amostras correspondentes ao ponto central

do planejamento experimental apresentavam uma coloração resultante da mistura de tons verde e alaranjado, o que conferia um aspecto amarronzado a solução.

Após os processos de extração, as soluções que continham frações etanólicas foram levadas para redução de volume em evaporador rotativo à 60° C até que não houvesse mais etanol presente na mistura. Assim, todas as soluções foram levadas para congelamento em *freezer* de geladeira convencional para posterior processo de liofilização. As amostras do ponto A, as quais continham 100% de etanol em sua composição não foram liofilizadas, pois todo o etanol pôde ser removido no rota-evaporador. A liofilização das soluções congeladas levou aproximadamente uma semana para ser concluída, fornecendo o extrato seco de cada nível amostral. A Figura 9 representa os extratos secos após liofilização.

Figura 9 – Extratos secos após liofilização.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A obtenção do extrato seco é muito importante para que seja calculado o rendimento da extração, o qual pode ser obtido a partir da Equação 4 e representado de forma sistemática na Tabela 4.

$$\text{Rendimento (\%)} = \left( \frac{\text{Massa seca (g)}}{\text{Massa de Amostra (g)}} \right) \times 100 \quad (5)$$

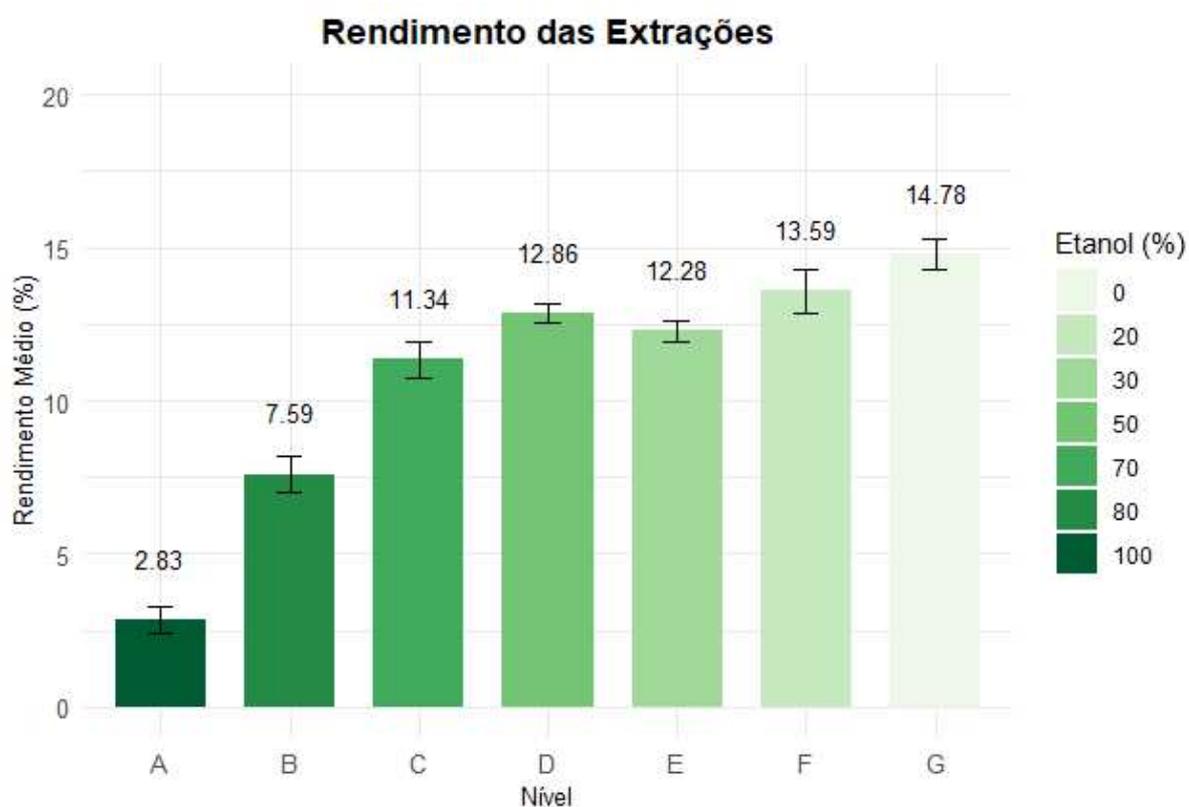
Tabela 4 – Cálculo do rendimento obtido nas extrações realizadas.

Extrações	Etanol (%)	Massa de Amostra (g)	Massa Extrato Seco (g)	Rendimento (%)	Média (%)	Desvio Padrão (%)
A1	100	5,088	0,159	3,125	2,829	0,428
A2		5,036	0,112	2,224		
A3		5,100	0,160	3,137		
B1	80	5,070	0,383	7,554	7,586	0,595
B2		5,063	0,348	6,873		
B3		5,018	0,418	8,330		
C1	70	5,021	0,555	11,054	11,341	0,597
C2		5,020	0,542	10,797		
C3		5,044	0,614	12,173		
D1	50	5,089	0,631	12,399	12,860	0,333
D2		5,015	0,652	13,001		
D3		5,084	0,670	13,179		
E1	30	5,082	0,649	12,771	12,280	0,351
E2		5,074	0,614	12,101		
E3		5,138	0,615	11,970		
F1	20	5,100	0,648	12,706	13,588	0,701
F2		5,001	0,682	13,637		
F3		5,055	0,729	14,421		
G1	0	5,065	0,722	14,255	14,776	0,511
G2		5,088	0,743	14,603		
G3		5,081	0,786	15,469		

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 4 apresenta os rendimentos obtidos nas extrações realizadas com diferentes proporções de etanol e água como solventes. Observa-se uma clara tendência de aumento no rendimento à medida que a proporção de água na mistura extratora aumenta. As menores eficiências foram registradas para as extrações com 100% de etanol (grupo A), cujo rendimento médio foi de 2,83%. Por outro lado, os maiores rendimentos foram observados no grupo G (0% etanol e 100% água), com valor médio de 14,78%. Essa diferença pode ser atribuída à maior solubilidade de substâncias polares e hidrossolúveis, como polissacarídeos, ácidos fenólicos e outros metabólitos secundários em sistemas aquosos. O Gráfico 1 mostra a relação inversa entre a porcentagem de etanol e o rendimento.

Gráfico 1 – Gráfico de barras do rendimento médio de cada nível



Fonte: Elaborado pelo autor.

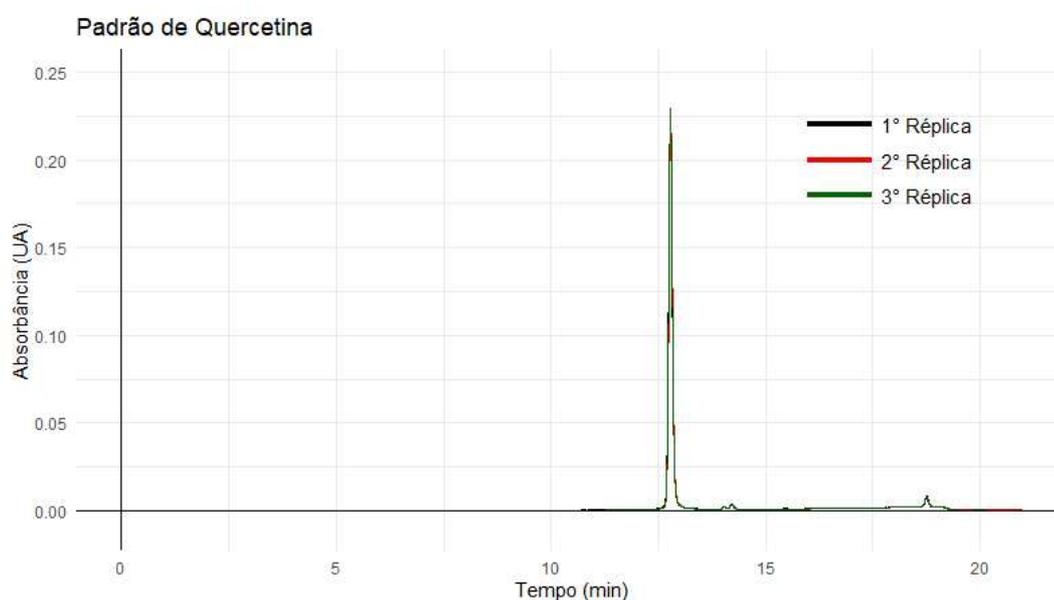
## 5.2 SEPARAÇÕES

Para o processo de separação cromatográfica, os extratos secos obtidos foram completamente diluídos em solução hidroalcoólica a 50% (etanol:água, v/v), com o objetivo de se obter um perfil cromatográfico representativo da composição total extraída. Após a diluição em 15 mL, as amostras foram transferidas para tubos Falcon de mesmo volume, visando um armazenamento compacto. Em seguida, alíquotas foram acondicionadas em frascos (*vials*) de 1 mL específicos para o cromatógrafo e seladas com septos adequados para injeção automática das amostras, sendo previamente filtradas com o auxílio de uma seringa, em filtros de membranas de 0,22  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.1 Repetibilidade do Método Cromatográfico

O cromatograma representado na Figura 10 refere-se à análise do padrão de quercetina, realizada em triplicata e monitorada a 371 nm, comprimento de onda característico para detecção deste flavonoide, o qual foi utilizado na Farmacopeia Brasileira (2019).

Figura 10 – Cromatograma construído para o padrão de quercetina lido à 371 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

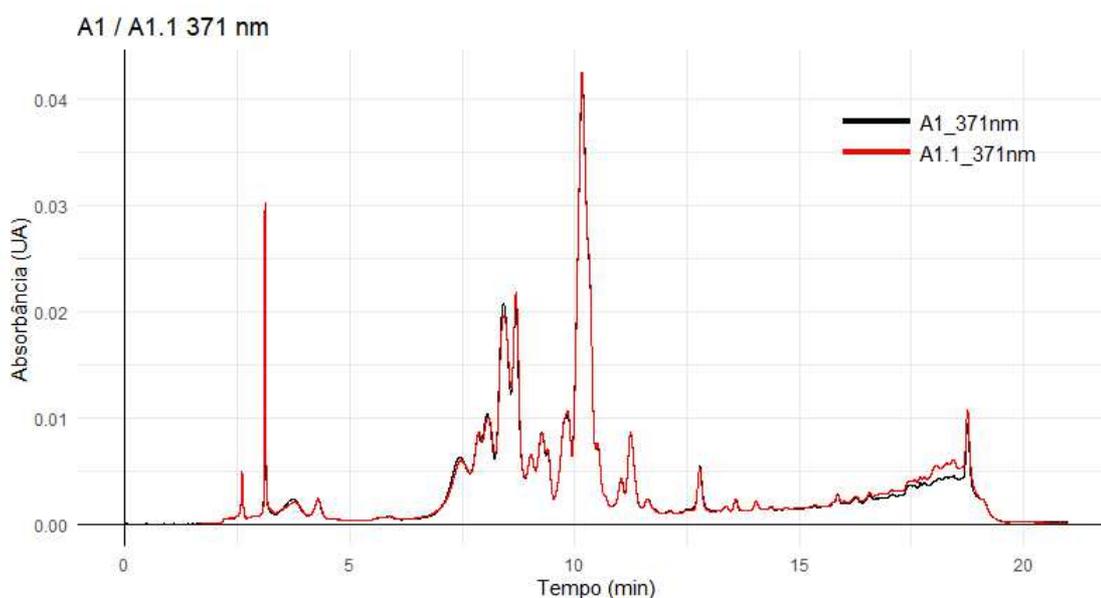
A repetibilidade foi avaliada por meio de três injeções consecutivas de uma solução padrão de quercetina a concentração fixa. Embora a RDC nº 166/2017 da ANVISA recomende o uso de seis réplicas para validação completa de repetibilidade em um único nível, o presente estudo apresenta dados preliminares com três réplicas, frequentemente utilizados para avaliação de verificação de sistema e consistência da resposta analítica. Os tempos de retenção obtidos foram 12,785; 12,790 e 12,787 minutos, com média de 12,7873 minutos, desvio padrão de 0,0025 e desvio padrão relativo (%RSD) de 0,020%, evidenciando excelente estabilidade do sistema cromatográfico. As áreas dos sinais foram 1.389.909; 1.399.107 e 1.402.577 unidades, com média de 1.397.198 e %RSD de 0,46%, demonstrando boa precisão do detector e consistência na resposta analítica. Os parâmetros de precisão foram

calculados conforme recomendado pela Resolução RDC nº 166/2017 da ANVISA, que orienta o uso do %RSD para expressar a repetibilidade, componente da avaliação da precisão de métodos analíticos (ANVISA, 2017).

A ausência de sinais significativos antes e depois do tempo de retenção principal sugere elevada pureza do padrão e seletividade do método cromatográfico para a quercetina, fatores fundamentais para a validação e a aplicação do método. Além disso, a sobreposição quase perfeita dos sinais das três réplicas reforça a precisão do sistema, contribuindo para a confiabilidade dos dados gerados nas análises subsequentes.

O método de separação foi aplicado em duplicata para cada uma das amostras injetadas. A Figura 11 apresenta os cromatogramas sobrepostos das amostras A1 e A1.1, réplicas cromatográficas da mesma amostra, monitorados a 371 nm.

Figura 11 – Cromatogramas de A1 (preto) e A1.1 (vermelho) sobrepostos, monitorados à 371 nm.



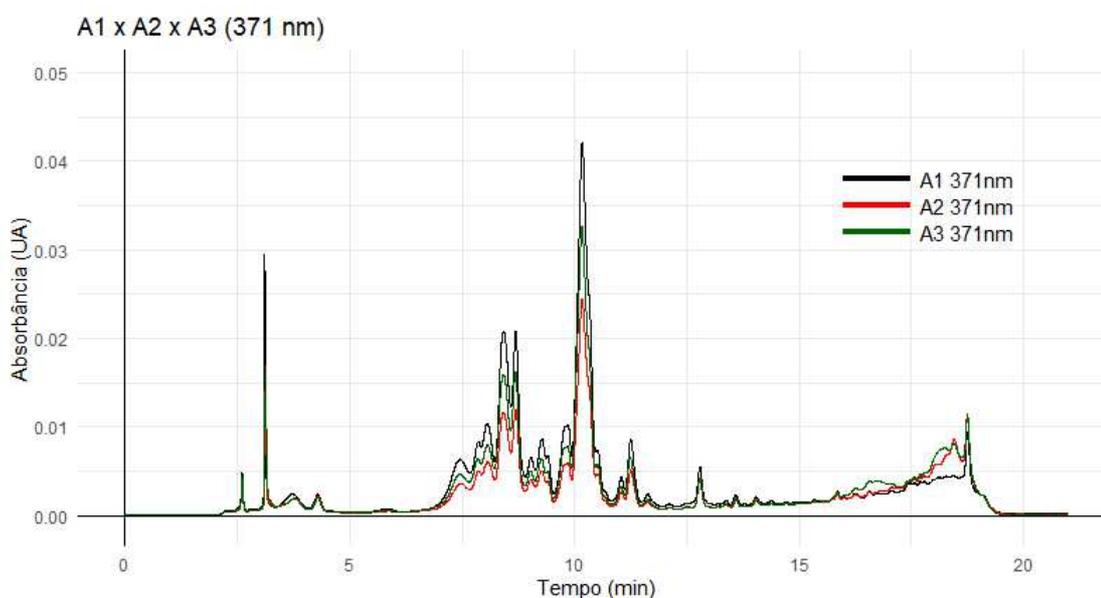
Fonte: Elaborado pelo autor

As amostras foram injetadas em duplicata e os perfis obtidos mostram uma alta similaridade entre si, evidenciada pela correspondência nos tempos de retenção

e na forma dos sinais. Essa sobreposição consistente indica que o método de separação apresenta boa precisão analítica, sendo capaz de gerar resultados confiáveis mesmo em diferentes execuções. A estabilidade do sinal e a preservação do perfil qualitativo da amostra reforçam a robustez do método experimental utilizado, o que é essencial para a aplicação do método em análises comparativas.

Para facilitar a demonstração dos resultados, é importante que se trabalhe com dados representativos das réplicas para que não seja necessário o trabalho com grandes volumes de dados. A Figura 12 apresenta a sobreposição dos cromatogramas obtidos das réplicas A1, A2 e A3, todas realizadas com 100% de etanol, e monitoradas a 371 nm. A semelhança entre os perfis cromatográficos demonstra uma boa repetibilidade do método de extração e análise, evidenciada pela coincidência dos tempos de retenção. A consistência observada nas três réplicas confirma que o procedimento adotado é confiável, o que é especialmente relevante em estudos que envolvem a comparação entre diferentes condições experimentais.

Figura 12 – Cromatogramas das réplicas do nível A monitorados à 371 nm e sobrepostos.



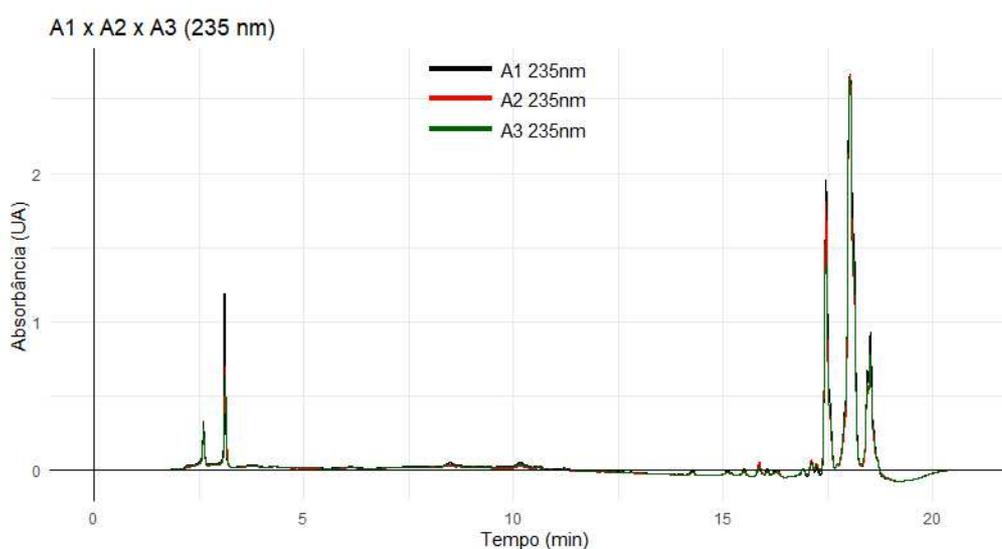
Fonte: Elaborado pelo autor.

Embora os cromatogramas das réplicas A1, A2 e A3 apresentem perfil qualitativo semelhante, com alinhamento dos tempos de retenção e padrão de distribuição dos sinais, observa-se uma variação na intensidade/área dos sinais entre as réplicas. Essa diferença sugere que, embora o método apresente consistência em

termos de separação dos constituintes, podem ocorrer variações na eficiência de extração ou no preparo das amostras que afetam a quantidade relativa dos analitos extraídos ou injetados. Tais oscilações podem ser explicadas pela natureza da amostra, a qual se trata de uma matriz mais complexa, envolvendo parâmetros como diferença de concentração entre as folhas utilizadas, efeitos de sazonalidade e variação de indivíduos na coleta.

As leituras das amostras A1, A2 e A3 a 235 nm foram realizadas com o objetivo de ampliar a detecção de substâncias presentes na matriz analisada, visto que diferentes substâncias apresentam absorção em comprimentos de onda diferentes. Conforme observado na Figura 13, o perfil cromatográfico obtido a 235 nm é consideravelmente diferente daquele observado a 371 nm, apresentando novos sinais e alterações significativas nas intensidades relativas dos sinais. Isso indica a presença de substâncias que absorvem fortemente nessa região do espectro, que não são detectados ou são menos expressivos a 371 nm, onde a quercetina e outros flavonoides costumam apresentar máxima absorção. Assim, a análise em múltiplos comprimentos de onda enriquece a investigação química das amostras, permitindo uma avaliação mais abrangente do perfil fitoquímico e aumentando a sensibilidade do método para substâncias de diferentes naturezas químicas.

Figura 13 – Cromatogramas das réplicas do nível A monitorados à 235 nm e sobrepostos.

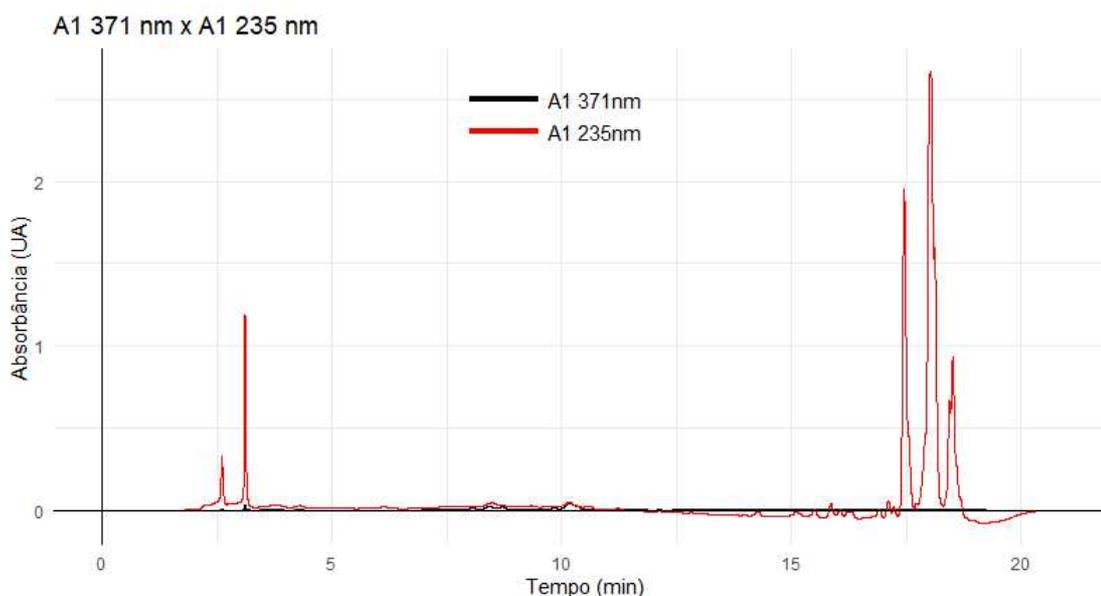


Fonte: Elaborado pelo Autor.

A sobreposição dos cromatogramas obtidos para a amostra A1 nos comprimentos de onda de 371 nm e 235 nm permite uma avaliação comparativa

detalhada quanto à seletividade do método e à diversidade de substâncias presentes na amostra. Como evidenciado na Figura 14, a leitura a 235 nm revela sinais com intensidades significativamente mais elevadas em relação à leitura a 371 nm.

Figura 14 – Cromatogramas de A1 monitorados à 371 e 235 nm sobrepostos.



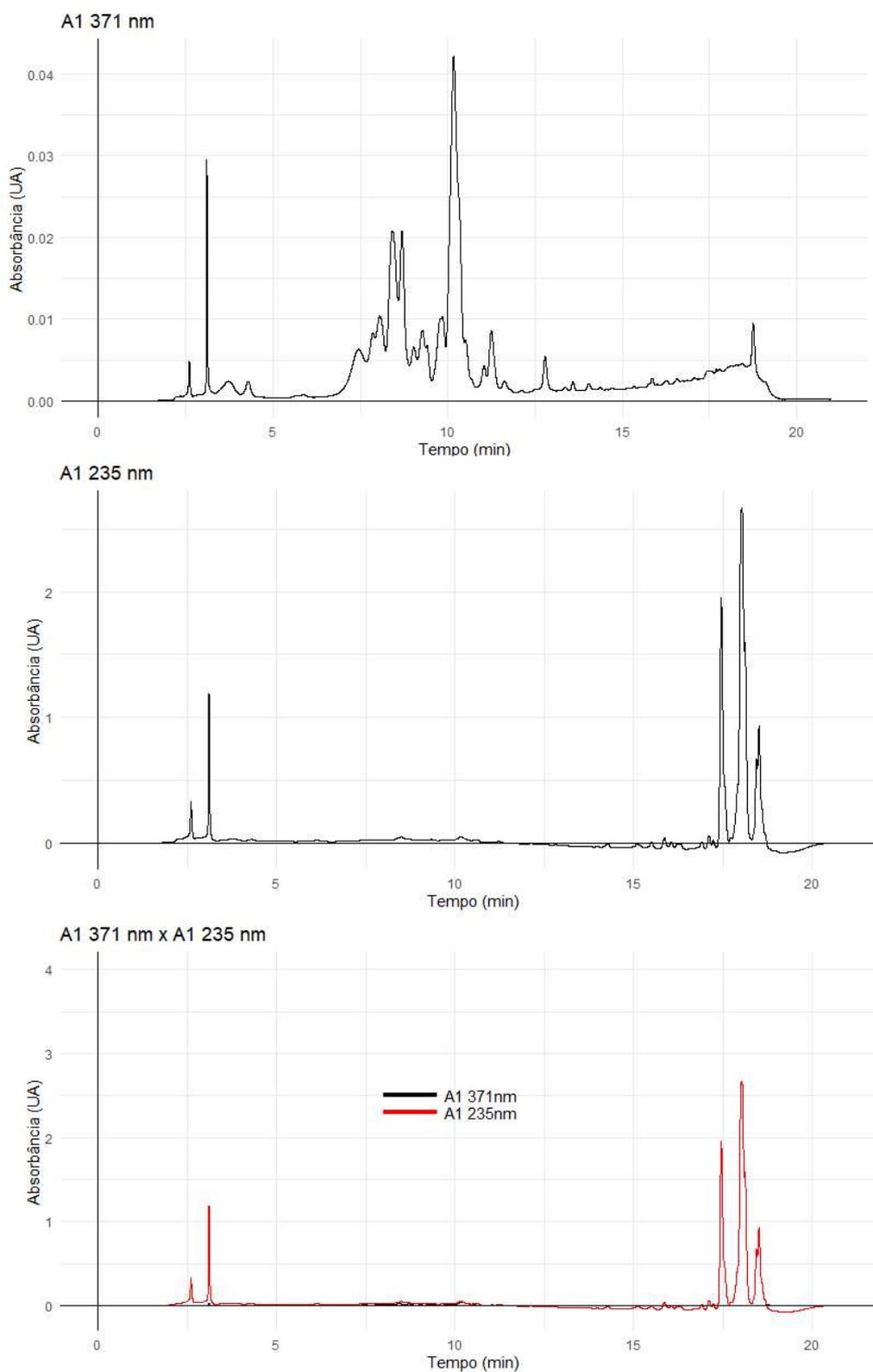
Fonte: Elaborado pelo autor.

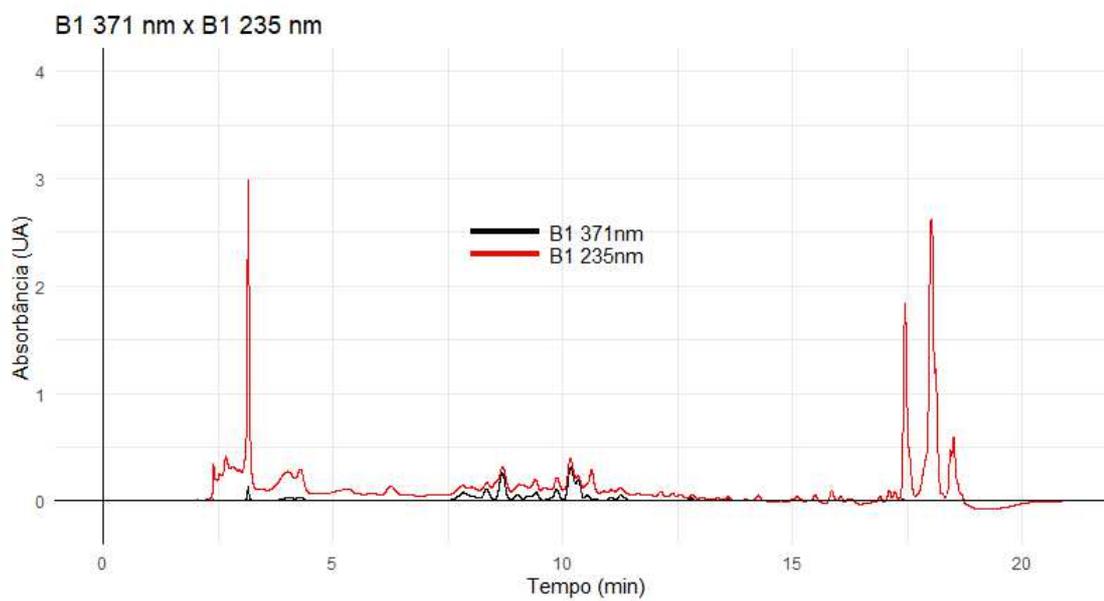
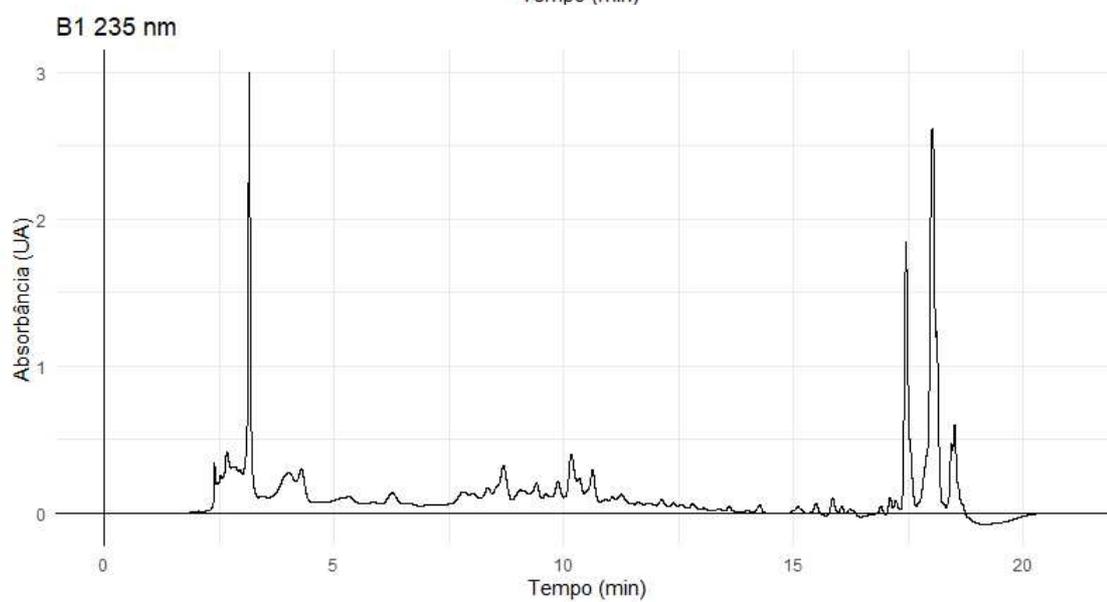
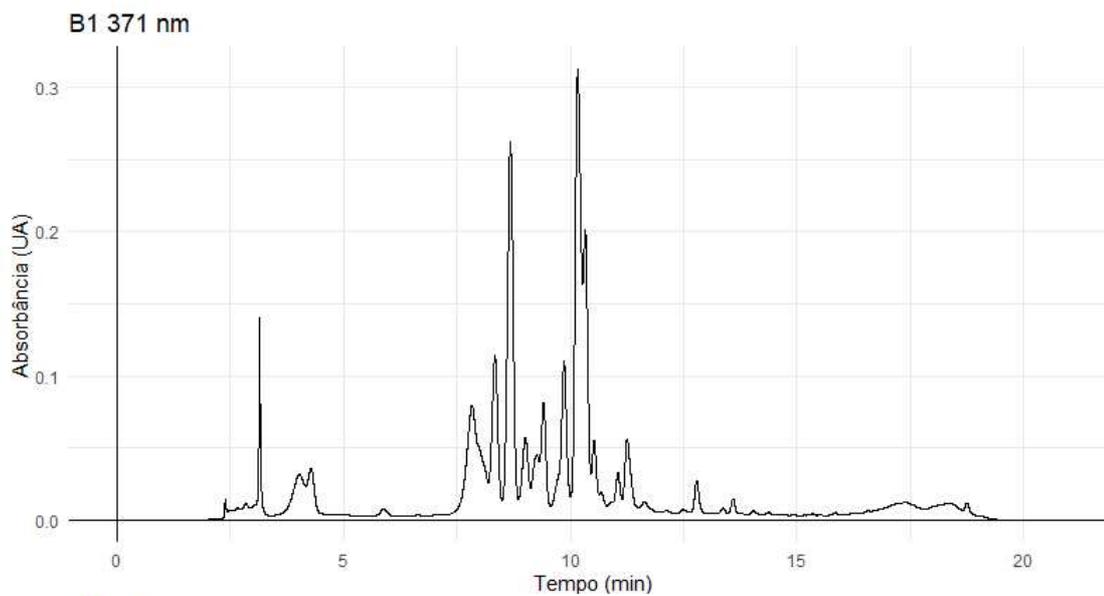
Essa discrepância sugere que certos constituintes da amostra possuem estruturas que absorvem preferencialmente em 235 nm, como fenólicos mais simples e outros metabólitos secundários não detectáveis ou menos expressivos a 371 nm, onde a detecção é mais direcionada a flavonoides como a quercetina. Dessa forma, a sobreposição dos cromatogramas reforça a importância da análise em múltiplos comprimentos de onda, ampliando a abrangência do perfilamento químico da amostra e evidenciando a complexidade do extrato analisado

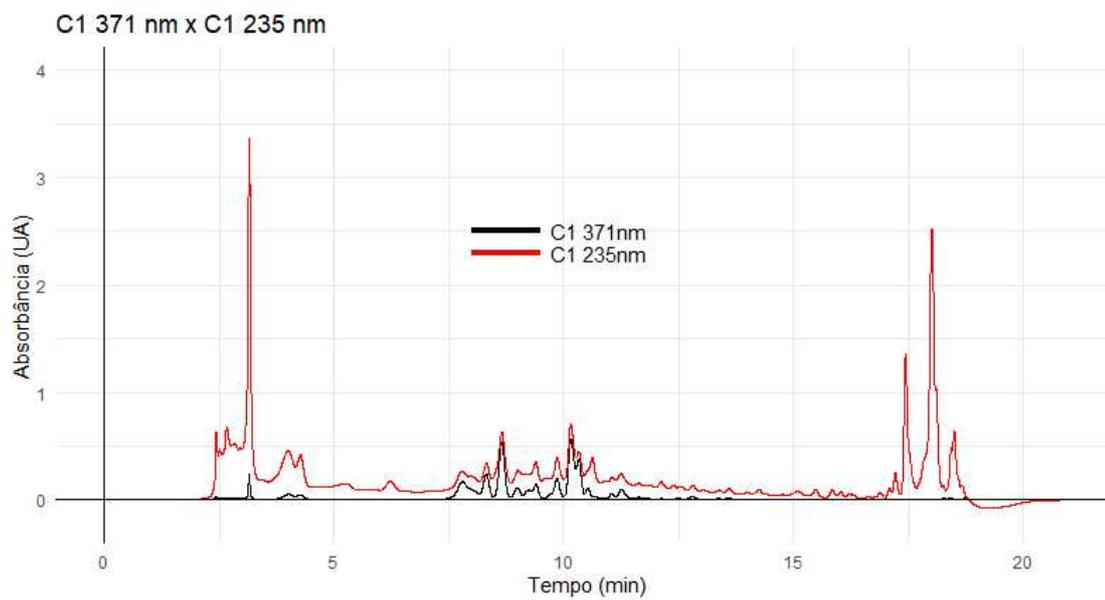
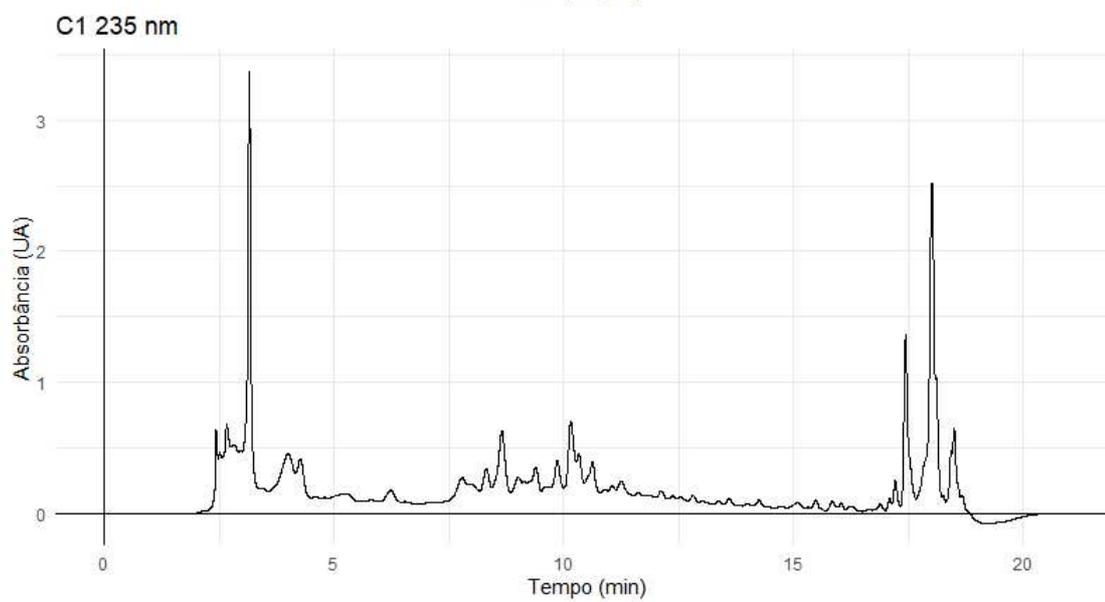
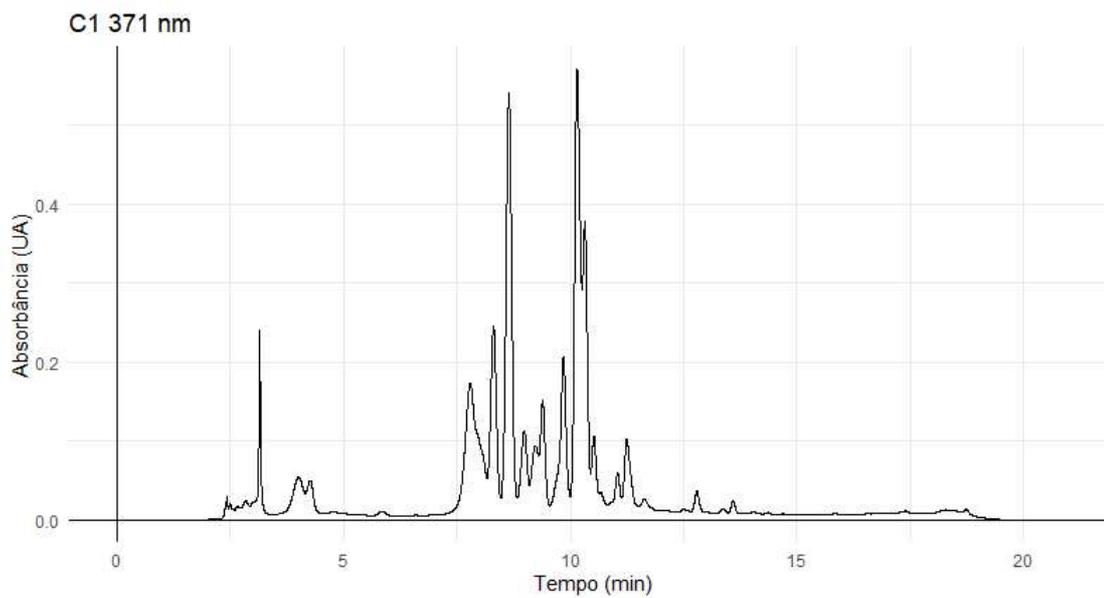
### 5.2.2 Perfis Cromatográficos das Amostras A1 a G1

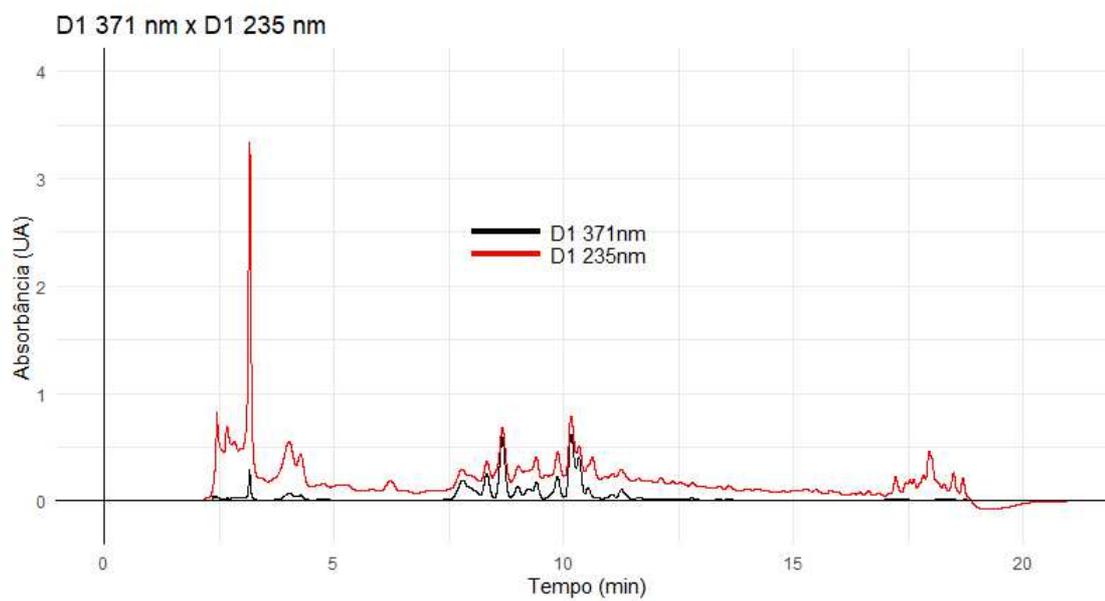
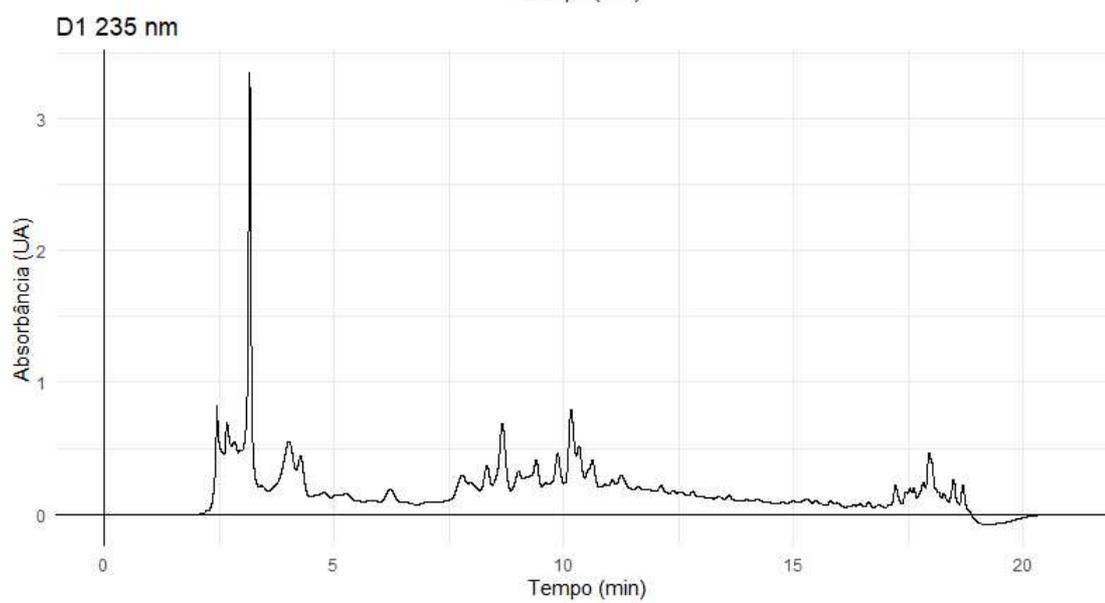
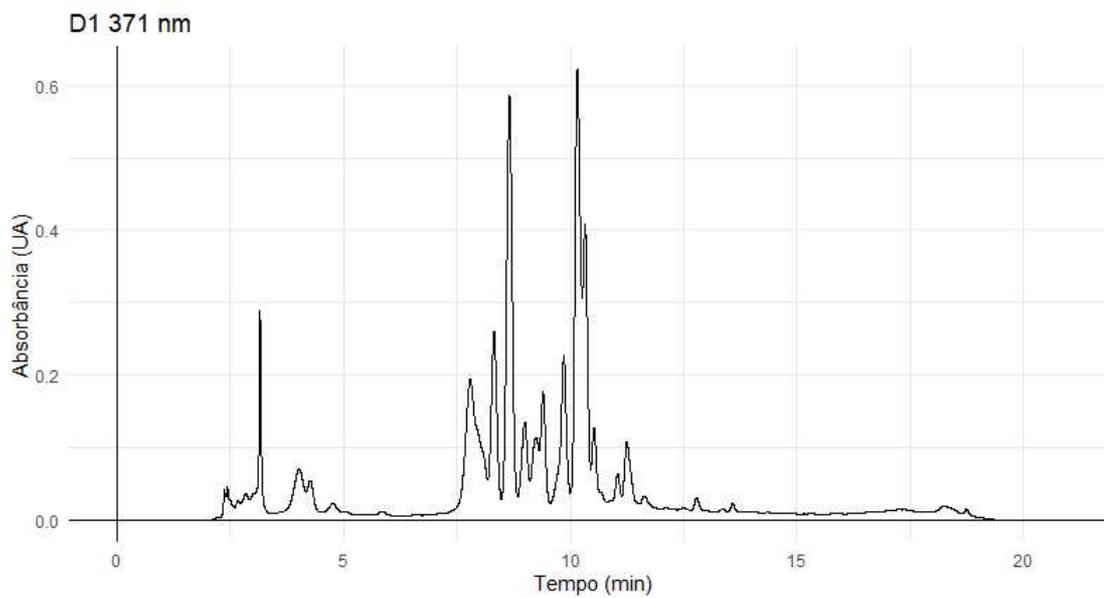
Após a verificação da consistência do método analítico, podemos avançar para a análise comparativa dos perfis cromatográficos de todas as condições de extração. A Figura 15 expõe os cromatogramas obtidos pela leitura nos diferentes comprimentos de onda e sobrepostos, demonstrando a diferença na escala de intensidade entre as duas leituras.

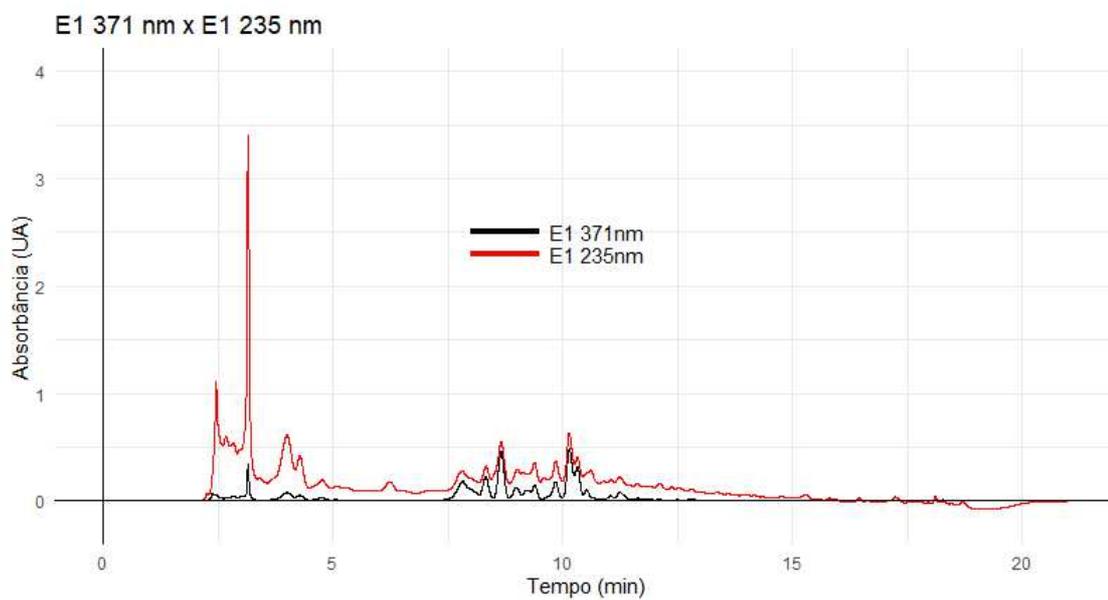
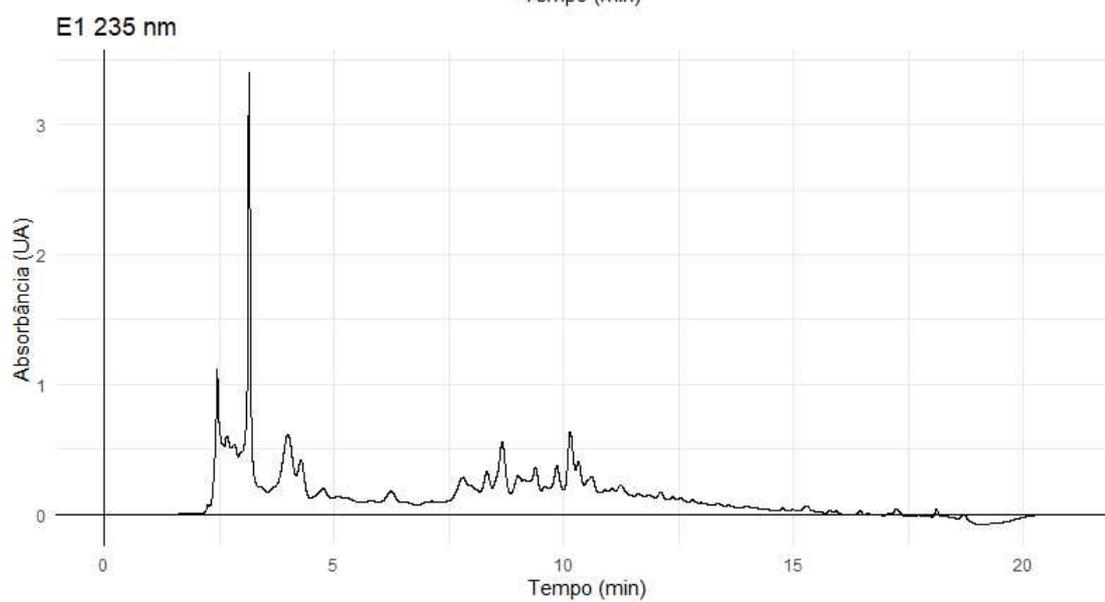
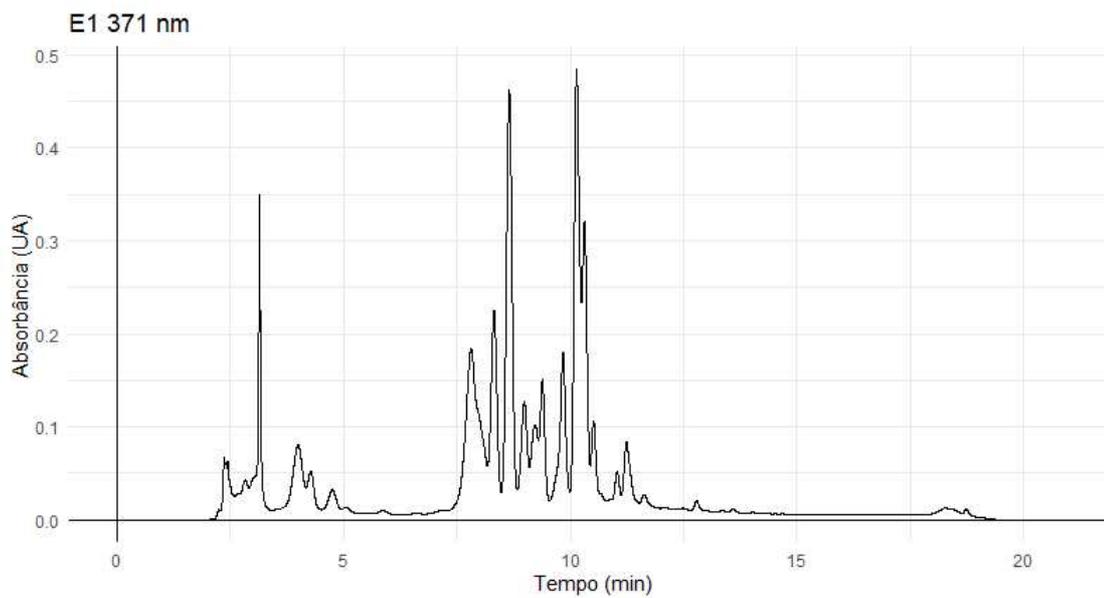
Figura 15 – Cromatogramas lidos à 371 e 235 nm e sobrepostos para os níveis A – G.

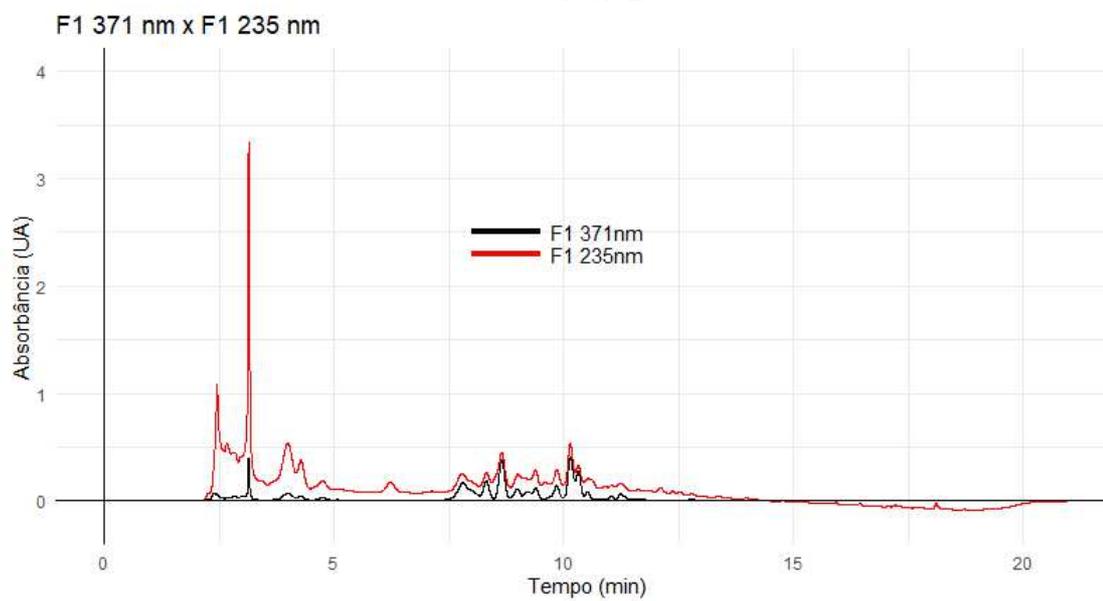
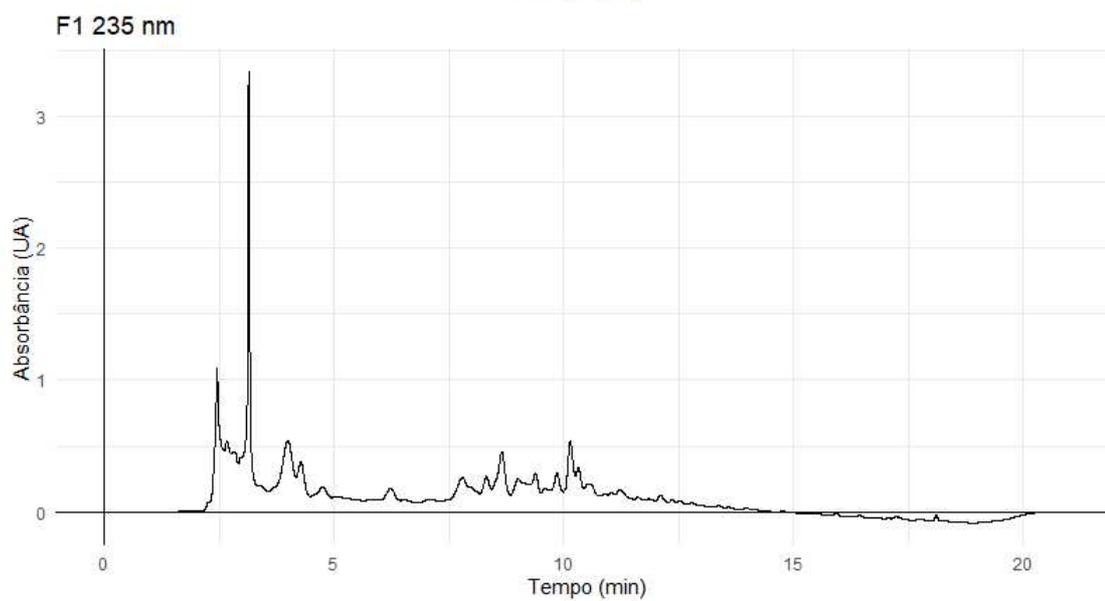
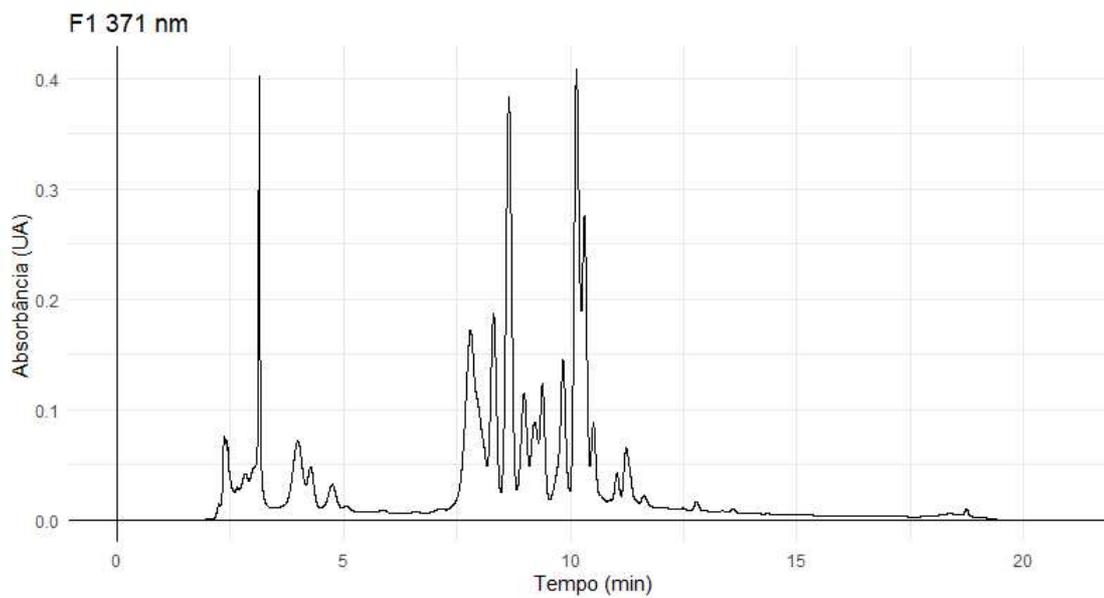


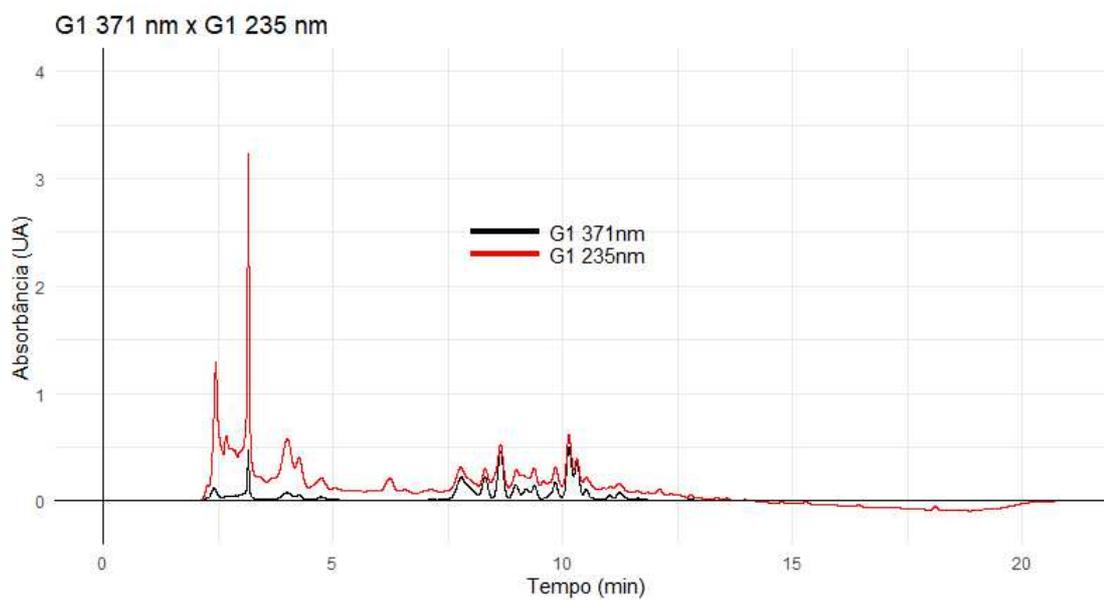
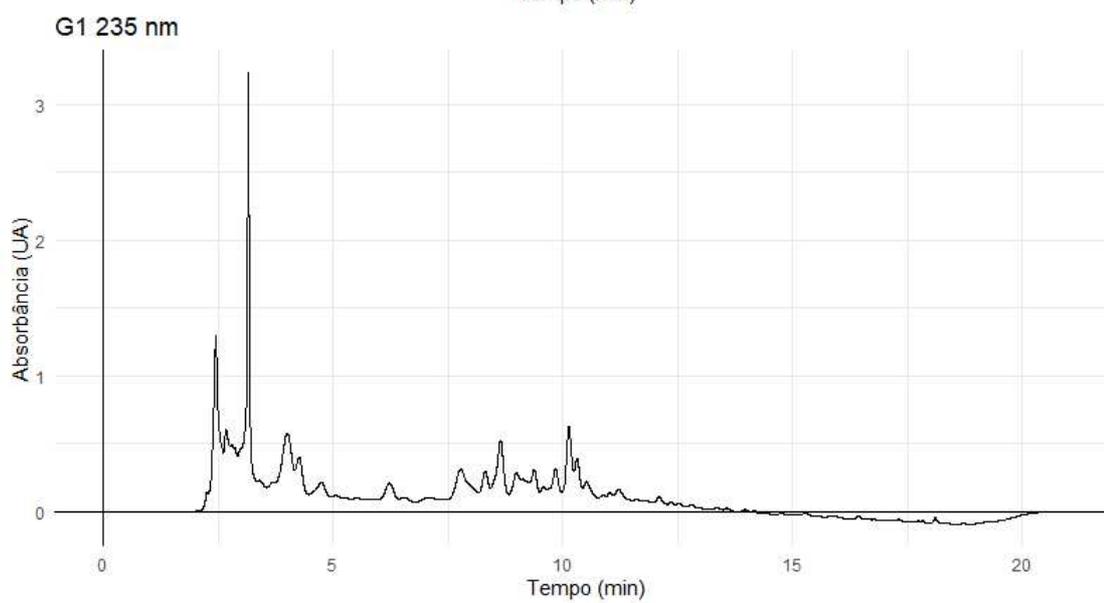
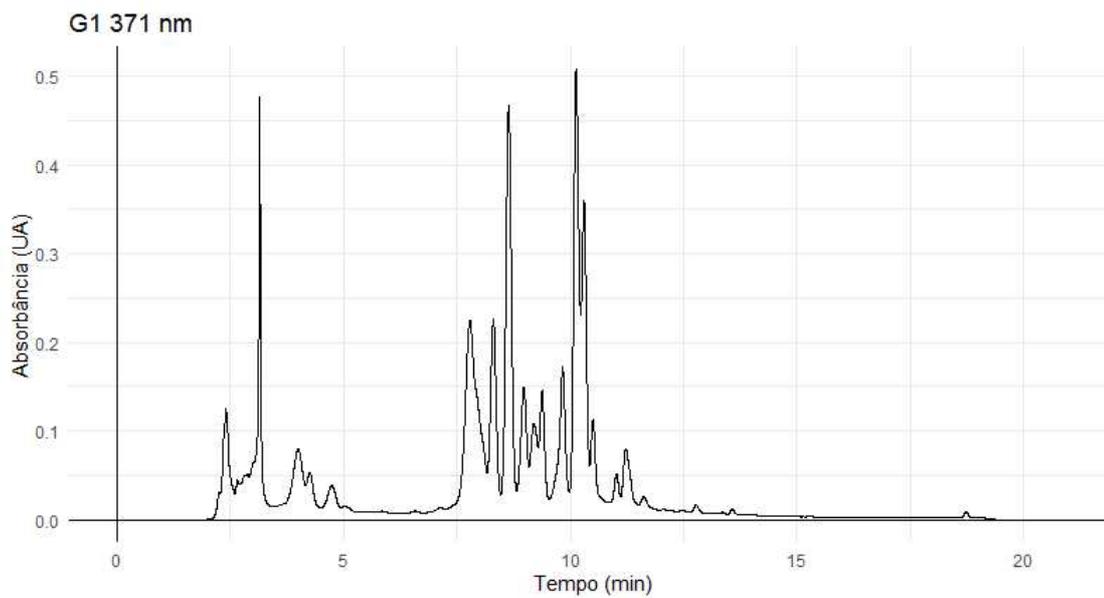








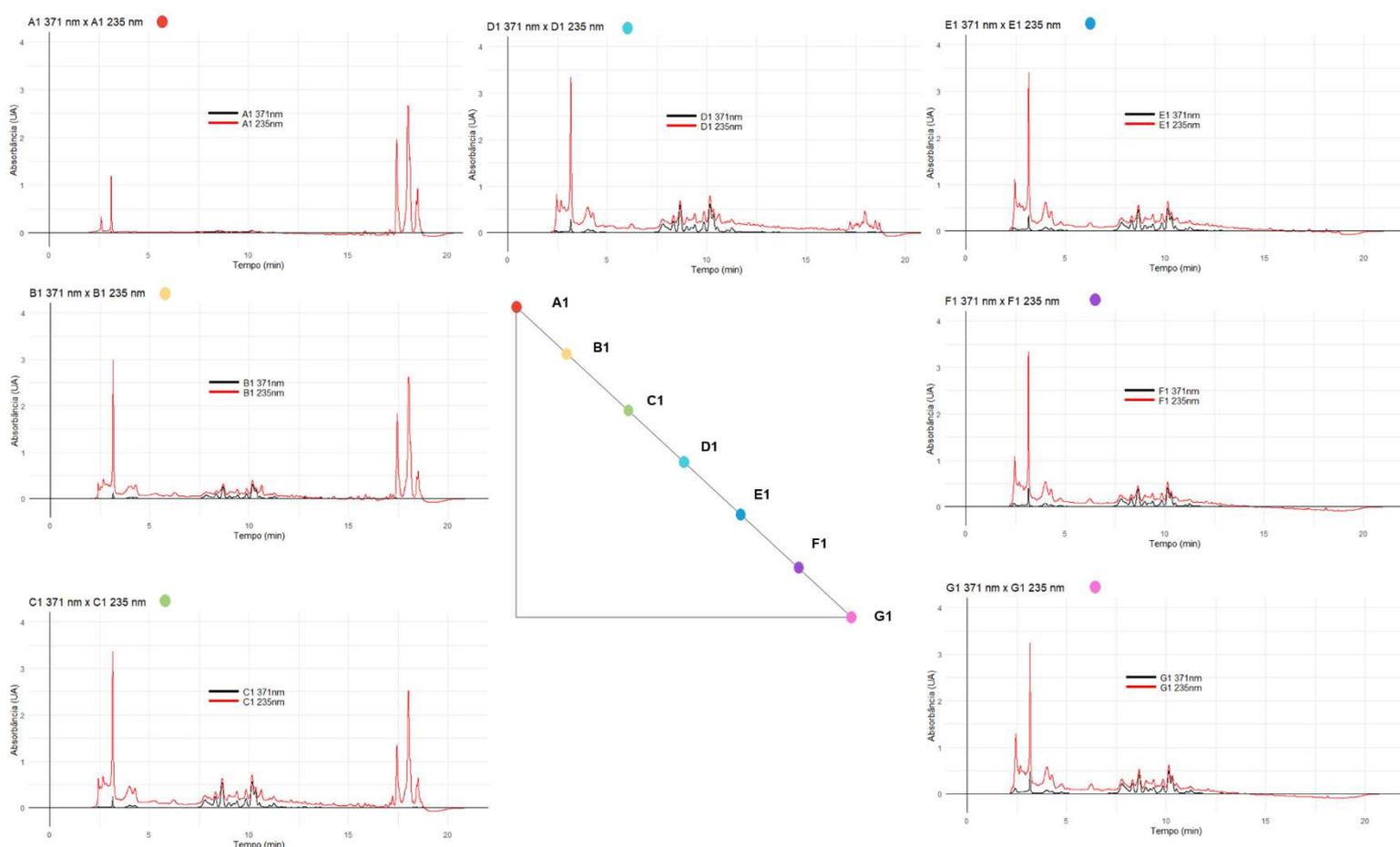




Fonte: Elaborado pelo autor.

Com o intuito de integrar visualmente os dados e evidenciar a progressão da extração sequencial, foi elaborada a Figura 16, que contém os cromatogramas sobrepostos de todos os níveis amostrais (A1 a G1), organizados ao redor do triângulo representativo do planejamento de misturas. Cada gráfico apresenta os sinais obtidos a 235 nm (linha vermelha) e 371 nm (linha preta), destacando a evolução qualitativa e quantitativa dos perfis cromatográficos ao longo do processo. Essa representação gráfica resume de maneira clara e objetiva a distribuição dos constituintes ao longo das diferentes etapas, contribuindo para a visualização integrada dos resultados e fortalecendo a discussão sobre seletividade e eficiência do método empregado.

Figura 16 – Distribuição dos cromatogramas de A – G a 371 e 235 nm.



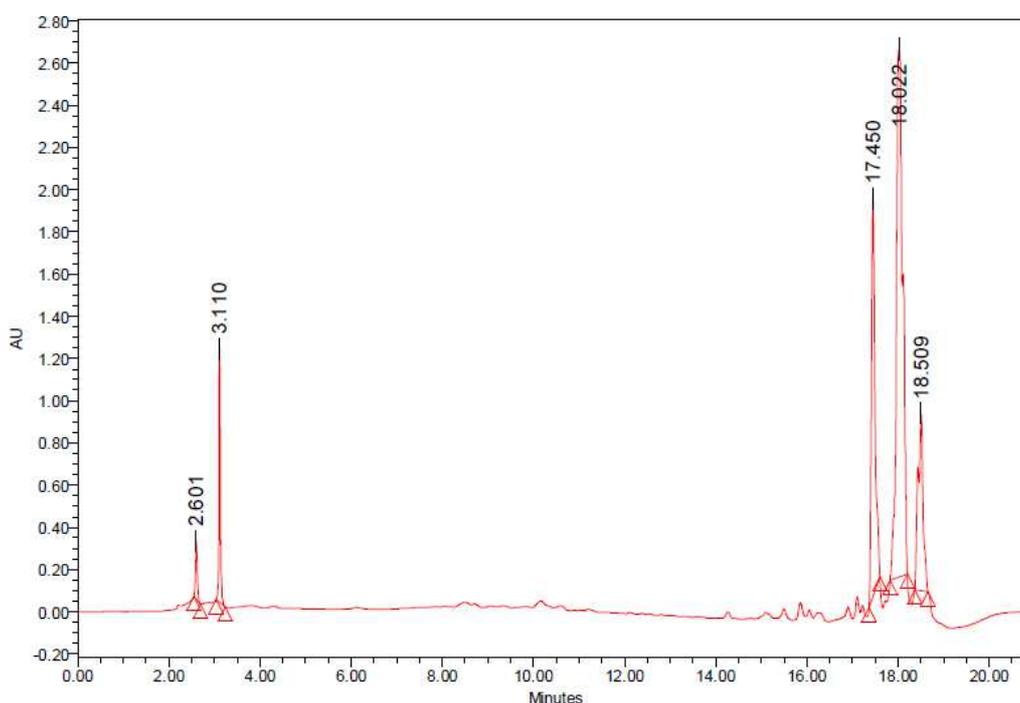
Fonte: Elaborado pelo autor.

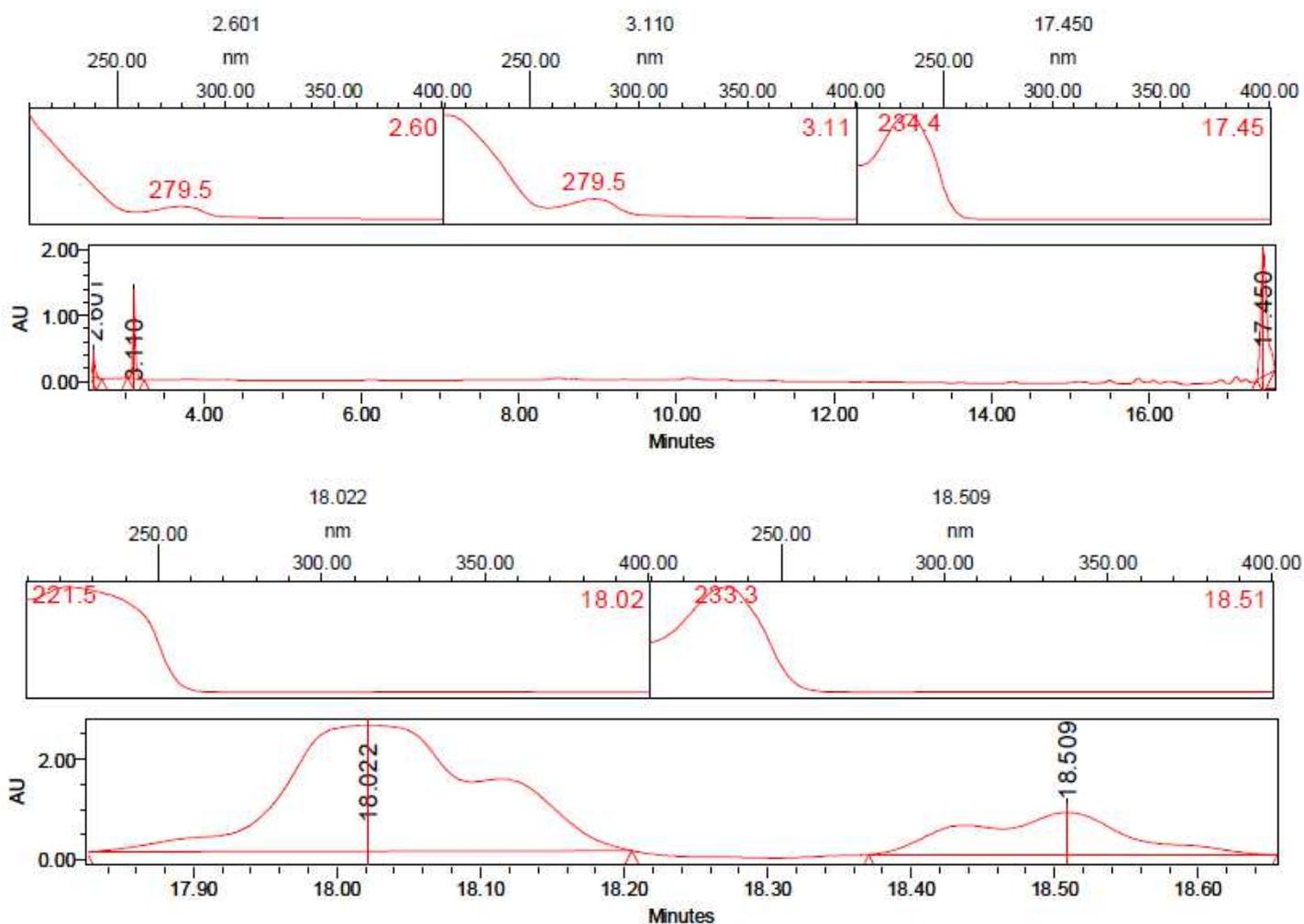
A análise dos cromatogramas obtidos a 235 nm revela a presença de sinais característicos que não são visíveis ou apresentam intensidade significativamente

menor a 371 nm, indicando a predominância de substâncias com estruturas menos conjugadas, como fenóis simples, ácidos orgânicos e outras substâncias com anéis aromáticos isolados. Esses sinais exclusivos ou mais intensos a 235 nm se distribuem de maneira diferenciada ao longo dos níveis amostrais, refletindo a variação na composição química extraída conforme o teor de etanol é reduzido e a polaridade do solvente aumenta.

Em todos os extratos obtidos, observa-se uma maior diversidade de sinais, com intensidades moderadas a elevadas na região inicial do cromatograma (entre 2 e 5 minutos), sugerindo a presença de substâncias mais polares, menos retidas pela fase estacionária, com alguma absorção nessa faixa de comprimento de onda. Já nos extratos obtidos com maiores proporções de etanol (amostras A, B, C e D), observa-se uma diversidade de sinais com intensidades elevadas na região final do cromatograma (entre 16 e 20 minutos), indicando substâncias mais apolares, as quais foram mais retidas pela fase estacionária da coluna cromatográfica, eluídas no final da corrida, e com maior preferência de absorção a 235 nm. A Figura 17 expõe o cromatograma obtido para o extrato A e os respectivos espectros de absorção obtido para os sinais no final da corrida, os quais foram associados à atividade biológica demonstrado pelo extrato A.

Figura 17 – Cromatograma extraídos pelo *software* da Waters para o Extrato A e espectros de absorção UV-Vis para os sinais majoritários.





Fonte: Elaborado pelo Autor

À medida que se aumenta a proporção de água no solvente (amostras D a G), esses sinais entre 16 e 20 minutos deixam de ser registrados, ou então são registrados com uma intensidade muito baixa. Há, portanto, uma mudança no padrão dos sinais a 235 nm: alguns sinais desaparecem, enquanto outros mantêm a intensidade. Além disso, observa-se que os cromatogramas obtidos para os níveis E, F e G não apresentam diferenças significativas entre os comprimentos de onda de 371 e 235 nm, sendo a principal distinção a intensidade do sinal que é mais expressiva a 235 nm. Esse comportamento reforça o papel do comprimento de onda de 235 nm como ferramenta sensível para monitorar a presença e distribuição de fenólicos simples e substâncias hidrossolúveis ao longo do planejamento de misturas aplicado, além de demonstrar a seletividade do sistema cromatográfico frente à complexidade da matriz vegetal analisada.

### 5.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS DOS EXTRATOS

Após a análise cromatográfica, os extratos foram submetidos a uma série de ensaios biológicos que serão apresentados a seguir.

#### 5.3.1 Atividade Antibacteriana e Antifúngica

A Tabela 5 expõe a concentração inibitória mínima (CIM) e as concentrações bactericida e fungicida mínimas (CBM e CFM).

Tabela 5 – Valores de CIM, CBM e CFM para os extratos.

Amostras	Microrganismos	CIM (µg/mL)	Efeito no Valor de CIM	CBM (µg/mL)
<b>A</b> (100% EtOH)	<i>S. aureus</i> ATCC® 33591™	125	Bacteriostático	>1000
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 2742™	1000	Bacteriostático	>1000
	<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1000	Fungistático	>1000
<b>B</b> (80% EtOH)	<i>S. aureus</i> ATCC® 33591™	>1000	-	-
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 2742™	1000	Bacteriostático	>1000
	<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1000	Fungistático	>1000
<b>C</b> (70% EtOH)	<i>S. aureus</i> ATCC® 33591™	>1000	-	-
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 2742™	1000	Bacteriostático	>1000
	<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1000	Fungistático	>1000
<b>D</b> (50% EtOH)	<i>S. aureus</i> ATCC® 33591™	>1000	-	-
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 2742™	1000	Bacteriostático	>1000
	<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1000	Fungistático	>1000
<b>E</b> (30% EtOH)	<i>S. aureus</i> ATCC® 33591™	>1000	-	-
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 2742™	>1000	-	-
	<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1000	Fungistático	>1000
<b>F</b> (20% EtOH)	<i>S. aureus</i> ATCC® 33591™	>1000	-	-
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 2742™	>1000	-	-
	<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1000	Fungistático	>1000
<b>G</b> (0% EtOH)	<i>S. aureus</i> ATCC® 33591™	>1000	-	-
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 2742™	>1000	-	-
	<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1000	Fungistático	>1000

Fonte: Elaborado pelo autor.

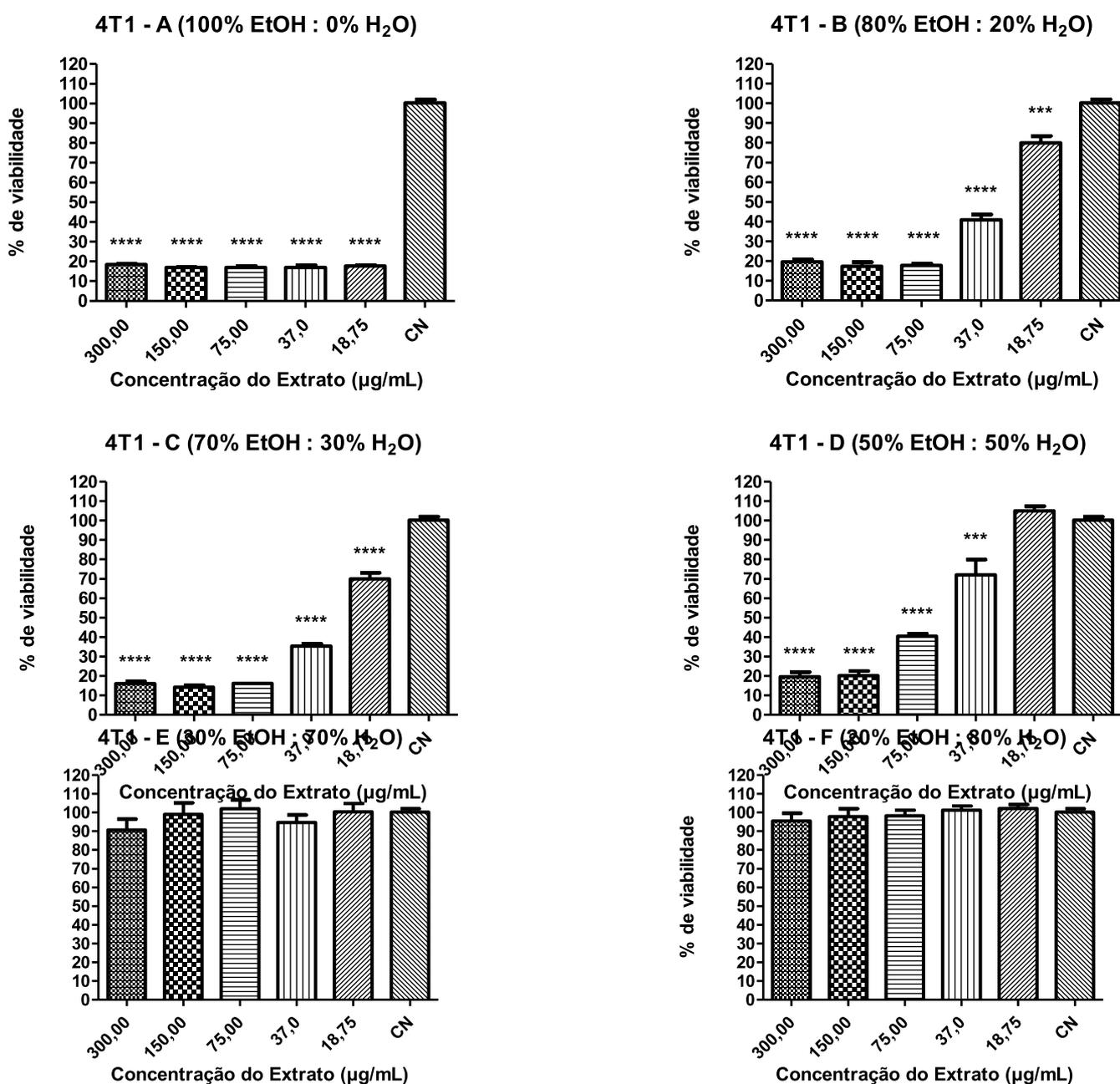
A fim de investigar o potencial antimicrobiano dos extratos obtidos, foram conduzidos ensaios para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), bem como das concentrações bactericida (CBM) e fungicida (CFM) mínimas. Os testes foram realizados utilizando cepas padrão de duas linhagens bacterianas (*Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) e uma linhagem fúngica (*Candida albicans*). Essa etapa permite a identificação de extratos com atividade antimicrobiana expressiva, contribuindo para a seleção de perfis extrativos com maior potencial de aplicação terapêutica. Além disso, a correlação entre os perfis cromatográficos previamente obtidos e os dados biológicos possibilita uma análise integrada da composição fitoquímica e da eficácia funcional dos extratos.

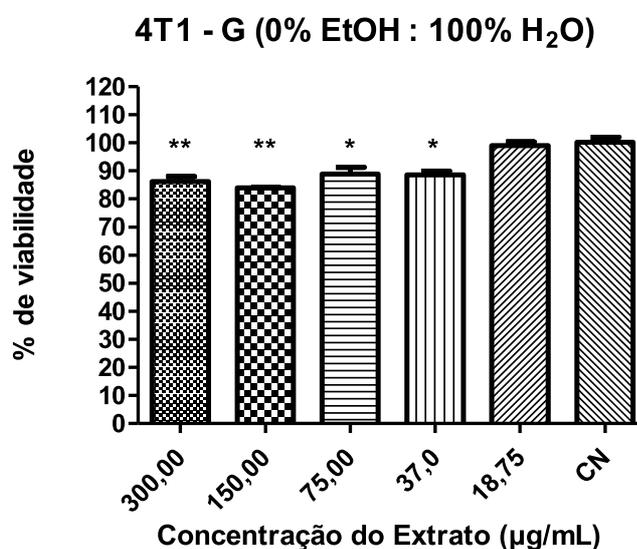
A avaliação da atividade antimicrobiana das amostras A a G frente aos micro-organismos testados revelou um perfil de ação predominantemente inibitório, sem ação microbicida efetiva nas concentrações avaliadas. Dentre as amostras analisadas, a amostra A destacou-se por apresentar a menor CIM contra *S. aureus* (125 µg/mL), sugerindo uma atividade bacteriostática significativa frente a esta cepa. Além disso, essa mesma amostra exibiu efeitos bacteriostáticos e fungistáticos sobre *P. aeruginosa* e *C. albicans*, respectivamente, com CIMs de 1000 µg/mL. As amostras B, C e D também mostraram atividade bacteriostática contra *P. aeruginosa* e fungistática contra *C. albicans*, embora com CIMs fixos em 1000 µg/mL e ausência de efeito sobre *S. aureus*. Por sua vez, as amostras E, F e G apresentaram atividade exclusivamente fungistática contra *C. albicans*, sem efeito detectável frente às cepas bacterianas. Em todos os casos, os valores de CBM e CFM foram superiores a 1000 µg/mL, indicando que os extratos não promoveram a morte efetiva dos micro-organismos nas concentrações testadas. Esses resultados sugerem que, embora algumas amostras apresentem potencial inibitório — especialmente frente ao fungo testado —, novos estudos com concentrações mais elevadas, frações purificadas ou substâncias isoladas se fazem necessários para a investigação de um possível efeito microbicida.

### 5.3.2 Atividade de Citotóxico

O Gráfico 2 expõe os resultados obtidos para a % viabilidade celular das células tumorais 4T1 com o objetivo de investigar o potencial seletivo dos extratos testados. A citotoxicidade foi analisada em diferentes concentrações (300, 150, 75, 37, 18,75 µg/mL) e proporções dos extratos de *Casearia* (A – G).

Gráfico 2 – Gráficos de barras representando a viabilidade celular (%) das linhagens 4T1 tratadas com diferentes proporções dos extratos, em diferentes concentrações.





Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi realizada análise estatística por meio do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, com o objetivo de verificar se havia diferenças significativas entre o grupo controle (CN) e as diferentes concentrações do extrato testado. Esse teste permite identificar quais pares de grupos apresentam diferenças estatisticamente significativas após uma análise de variância ANOVA. Os resultados obtidos indicaram que diversas concentrações do extrato diferiram significativamente do controle, especialmente nas maiores concentrações. Para representar visualmente essas informações, foram adicionados asteriscos nos gráficos de barras, os quais indicam o nível de significância estatística:  $p < 0,05$  ( $\cdot$ ),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*), e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). Essa representação reforça os efeitos dependentes da concentração sobre a viabilidade celular observados nos diferentes tratamentos.

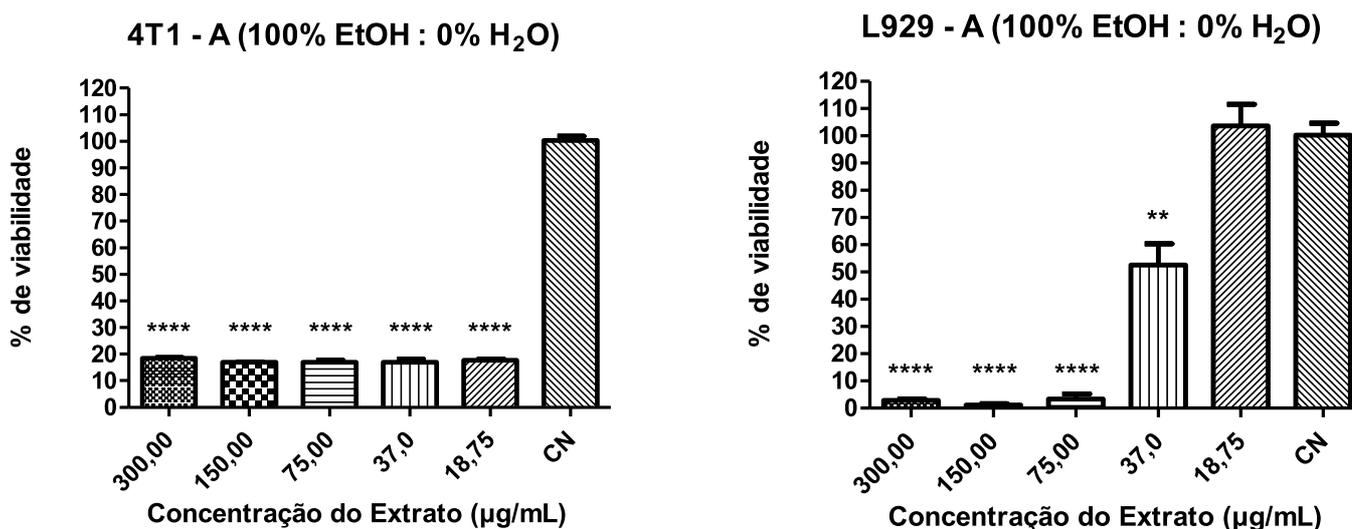
Dentre as amostras testadas, o extrato A (100% etanol) foi o que apresentou maior atividade citotóxica frente às células tumorais 4T1, promovendo uma diminuição significativa da viabilidade celular em todas as concentrações avaliadas (300 a 18,75 µg/mL), com significância estatística altamente expressiva (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ) em comparação com o controle. As formulações B, C e D, contendo proporções decrescentes de etanol, também reduziram a viabilidade celular de forma significativa,

porém com intensidade progressivamente menor à medida que a proporção de etanol diminuía.

Em contraste, os extratos com predominância de água (E, F e G) apresentaram atividade citotóxica reduzida ou ausente frente às células 4T1. Os extratos E (30% etanol) e F (20% etanol) não promoveram nenhuma redução significativa da viabilidade celular, mantendo os níveis de viabilidade próximos aos do controle negativo. Já a formulação G (0% etanol) apresentou leve diminuição da viabilidade nas concentrações mais altas (300 e 150  $\mu\text{g/mL}$ ), com significância estatística (\*\* $p < 0,01$ ), mas ainda assim manteve viabilidade acima de 80%.

Adicionalmente, foi realizado um ensaio de viabilidade com fibroblastos L929, utilizando o extrato A, com o objetivo de avaliar a citotoxicidade frente a células não tumorais, Gráfico 3. Observou-se que o extrato também reduziu a viabilidade dos fibroblastos em concentrações mais elevadas, com diferença estatística significativa, embora mantendo maior viabilidade celular que a observada nas células 4T1 em todas as concentrações.

Gráfico 3 – Gráficos de barras representando a viabilidade celular (%) das linhagens não tumorais L929 e das linhagens 4T1 tratadas com o extrato A (100% etanol).



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.3.3 Atividade Antileishmania

A Tabela 6 apresenta os valores de concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) frente às formas promastigota e amastigota de *Leishmania amazonensis*, a concentração citotóxica média (CC<sub>50</sub>) em macrófagos e o índice de seletividade (IS) das amostras testadas.

Tabela 6 – Valores obtidos de IC<sub>50</sub> (promastigota e amastigota), CC<sub>50</sub> (macrófagos peritoneais) e IS para os extratos testados.

Amostra	Promastigota (IC <sub>50</sub> -µg/mL)	Toxidez em macrófagos (CC <sub>50</sub> -µg/mL)	Amastigota (IC <sub>50</sub> -µg/mL)	IS
A	1,59 ± 0,03	21,42 ± 2,88	8,82 ± 0,433	2,42
B	47,07 ± 19,61	31,72 ± 5,24	22,02 ± 1,56	1,44
C	24,20 ± 9,9	32,62 ± 4,78	25,46 ± 1,94	1,28
D	49,94 ± 0,23	65,92 ± 4,78	49,87 ± 3,66	1,32
E	>100	>150	>100	-
F	>100	>150	>100	-
G	>100	>150	>100	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

A avaliação da atividade antileishmania demonstrou que os extratos de *Casearia selloana* apresentaram perfis distintos de ação frente às formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. A amostra A foi a mais ativa, com valor de IC<sub>50</sub> igual a 1,59 ± 0,03 µg/mL para promastigotas e 8,82 ± 0,433 µg/mL para amastigotas. As amostras B, C e D também apresentaram atividade moderada, com IC<sub>50</sub> entre 22 e 50 µg/mL para amastigotas. As amostras E, F e G não apresentaram atividade significativa (IC<sub>50</sub> > 100 µg/mL para ambas as formas).

No ensaio de citotoxidez com macrófagos peritoneais, a amostra A também apresentou a maior toxidez (CC<sub>50</sub> = 21,42 ± 2,88 µg/mL), enquanto as amostras E, F e G apresentaram baixa ou nenhuma toxidez (CC<sub>50</sub> > 150 µg/mL). O índice de seletividade (IS), calculado a partir da razão entre CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> frente às formas amastigotas, indicou que a amostra A possui o melhor perfil (IS = 2,42), seguida das amostras B, C e D (IS entre 1,28 e 1,44).

## 5.4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

As próximas seções estão dedicadas a discussão dos resultados obtidos para as etapas de maior relevância do presente trabalho.

### 5.4.1 Método Cromatográfico

Durante a análise cromatográfica das amostras A1 a G1 por CLAE-DAD, foi adotado inicialmente o comprimento de onda de 371 nm, conforme sugerido na Farmacopeia Brasileira (2019) para a detecção de flavonoides totais utilizando quercetina como padrão. No entanto, os cromatogramas obtidos a este comprimento de onda apresentaram sinais de baixa intensidade em todos os extratos, sugerindo que flavonoides do tipo quercetina não estão presentes em concentrações significativas ou não representam os constituintes majoritários nos extratos obtidos.

Por outro lado, os sinais registrados a 235 nm revelaram maior complexidade e intensidade cromatográfica, indicando a predominância de substâncias que absorvem luz nesta faixa do espectro. Essa observação está de acordo com a literatura, a qual relata que fenólicos simples, taninos hidrolisáveis, ácidos fenólicos (como ácido gálico e ferúlico), lignanas e cumarinas possuem bandas de absorção intensas próximas a 230–270 nm (Mwelasi, 2015; Rajhard *et al.*, 2021). Assim, a baixa resposta a 371 nm evidencia uma limitação importante do método original, que se mostra específico para uma classe restrita de flavonoides altamente conjugados, mas minimamente sensível à diversidade de fenólicos possivelmente presentes.

Além disso, Rajhard *et al.* (2021) demonstraram que a absorção UV de flavonoides e outros polifenóis varia significativamente em função do tipo de substituição na estrutura e da polaridade do meio. Esses autores destacam que substâncias como luteolina, catequina e ácido gálico apresentam perfis espectrais distintos em diferentes solventes, reforçando a importância de múltiplas faixas de monitoramento para uma análise fitoquímica mais abrangente. Mwelasi (2015) também apontou que a aplicação de métodos baseados exclusivamente em padrões como a quercetina pode levar à subestimação da presença de outros constituintes bioativos relevantes.

Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que o método de leitura única a 371 nm é inadequado para a identificação de classes de fitoquímicos de interesse nos

extratos de *Casearia selloana*. Recomenda-se, portanto, a adoção de abordagens com leitura em múltiplos comprimentos de onda, especialmente entre 230 e 280 nm, e a inclusão de diferentes padrões representativos das classes fenólicas mais prováveis, como ácido gálico, ácido clorogênico e catequina. Essa estratégia proporcionaria uma visão mais precisa e representativa da composição fitoquímica dos extratos analisados.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi conduzida utilizando uma coluna de fase reversa C18, sob eluição em gradiente com fase móvel composta por água acidificada com 1% de ácido fórmico e metanol. O programa de eluição envolveu fases constantes e com variações lineares, gradiente segmentado com tempo total de análise de 21 minutos. Esse sistema promove separação eficiente de fenólicos, polares e apolares, com eluição progressiva conforme a afinidade relativa com a fase estacionária. Como esperado para um sistema em fase reversa, substâncias mais polares tendem a eluir nas primeiras regiões do cromatograma, enquanto os mais apolares, que interagem mais intensamente com a coluna, eluem mais tardiamente.

Em A, B, C e D observam-se nos cromatogramas obtidos a 235 nm, um agrupamento significativo de sinais entre 16 e 20 minutos, o que sugere a presença de substâncias de caráter apolar como flavonoides metoxilados, terpenoides apolares ou fenólicos de cadeia longa. Adicionalmente, a região inicial (entre 2 e 6 minutos) mostra de intensidade variável entre os grupos, compatíveis com substâncias mais polares, como ácidos fenólicos de baixa massa molar ou flavonoides glicosilados, que são mais solúveis em água e têm baixa retenção em colunas C18

Nos cromatogramas obtidos a 235 nm para os extratos E, F e G, observa-se um perfil contrastante ao dos extratos A, B, C e D. À medida que se aumenta a proporção de água na mistura extratora, há um aumento expressivo na intensidade dos sinais entre 8 e 14 minutos de tempo de retenção. Essa faixa intermediária da corrida cromatográfica é compatível com substâncias de maior polaridade, como ácidos fenólicos simples, flavonoides glicosilados e outras substâncias hidrossolúveis. A extração mais eficiente desses constituintes em solventes mais aquosos está de acordo com sua natureza química e maior afinidade com fases móveis de caráter polar. Além disso, nota-se a ausência de sinais relevantes após os 16 minutos, indicando que substâncias apolares – retidas por mais tempo na coluna C18 – estão ausentes ou em baixíssimas concentrações nesses extratos. Esses resultados reforçam que a polaridade da mistura extratora exerce papel determinante na

seletividade do perfil fitoquímico obtido, permitindo discriminar classes de metabólitos conforme sua solubilidade.

Do ponto de vista químico, a composição polar do eluente A (água + ácido fórmico) favorece a eluição inicial de substâncias hidrossolúveis, enquanto o metanol (mais apolar) contribui para arrastar substâncias retidas no final do gradiente. A acidificação da fase móvel é estratégica, pois promove protonação de grupos ionizáveis dos fenólicos, melhorando a simetria dos sinais e reduzindo interações indesejadas com grupos silanóis residuais da coluna. Dessa forma, o perfil cromatográfico obtido está coerente com a matriz vegetal analisada, que é rica em fenólicos de diferentes polaridades, mas supostamente não possui flavonóis livres em destaque. A abordagem por gradiente e leitura a múltiplos comprimentos de onda mostrou-se essencial para a revelação completa do espectro químico dos extratos.

#### **5.4.2 Ensaios Biológicos**

A seguir, os resultados obtidos para os ensaios biológicos serão discutidos e comparados com informações da literatura para verificar sua eficiência frente a formulações atualmente empregadas para combater aos referidos agentes patógenos.

##### *5.4.2.1 Atividade Antimicrobiana*

A triagem biológica de extratos brutos é considerada uma etapa essencial na prospecção de novos fármacos, pois permite identificar amostras com atividade relevante que poderão ser estudadas em profundidade. De acordo com Ríos e Recio (2005), os extratos de plantas não apenas têm sido historicamente utilizados no tratamento de infecções, como também representam uma importante base para o isolamento de novos princípios ativos. Kuete (2010) reforça que a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais constitui um dos melhores indicadores iniciais de valor terapêutico, justificando sua investigação sistemática para a descoberta de medicamentos.

Entre os extratos avaliados, apenas o extrato A apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, com valor de CIM igual a 125 µg/mL, caracterizando um efeito bacteriostático. Segundo Kuete (2010), extratos vegetais com CIM entre 100 e 500 µg/mL são considerados moderadamente ativos, o que

confere destaque ao extrato A em relação aos demais, que foram inativos (CIM > 1000 µg/mL). Embora os valores de CIM para antibióticos de referência como a vancomicina sejam muito inferiores (0,5 a 2 µg/mL), resultados como este são promissores em ensaios com extratos brutos (Wiegand *et al.*, 2008).

Para *Pseudomonas aeruginosa*, os extratos A, B, C e D também apresentaram os menores valores de CIM (1000 µg/mL), embora ainda classificado como pouco ativo, segundo os critérios de Kuete (2010), que considera CIM > 500 µg/mL como fraca atividade. Os demais extratos foram inativos ou apresentaram mesmo valor limite (CIM > 1000 µg/mL). Essa baixa atividade pode ser atribuída à elevada resistência intrínseca de *P. aeruginosa*, que apresenta membrana externa seletiva e sistemas de efluxo que dificultam a ação de produtos naturais (Kuete. 2010).

No caso de *Candida albicans*, todos os extratos exibiram efeito fungistático com CIM = 1000 µg/mL. Apesar da baixa potência observada, esses resultados sugerem a presença de metabólitos com algum efeito inibitório sobre a levedura. Possamai Rossatto *et al.* (2021) mostraram que fenólicos puros como ácido elágico apresentam valores de CIM muito inferiores (0,125–64 µg/mL), o que reforça a hipótese de que a confecção fracionada dos extratos, com variedade de polaridade de solvente, pode revelar substâncias mais ativas com potencial antifúngico.

Para avaliar o potencial dos extratos de *Casearia selloana*, os valores de CIM obtidos foram comparados com os de fármacos antimicrobianos de referência. No caso de *Staphylococcus aureus*, o extrato A apresentou uma CIM de 125 µg/mL, enquanto a vancomicina, um dos antibióticos de referência para cepas Gram-positivas, apresenta CIM variando de 0,5 a 2 µg/mL (Wiegand *et al.*, 2008). Embora o valor do extrato seja significativamente superior ao do fármaco, ele ainda é considerado moderadamente ativo segundo critérios estabelecidos por Kuete (2010).

Para *Pseudomonas aeruginosa*, o extrato A apresentou CIM de 1000 µg/mL. Em comparação, a ciprofloxacina, um antibiótico de amplo espectro utilizado contra essa bactéria, possui CIM entre 0,25 e 1 µg/mL (Kuete, 2010). Esse resultado evidencia a menor atividade do extrato frente a microrganismos Gram-negativos, possivelmente devido às barreiras estruturais e mecanismos de efluxo presentes nesses patógenos.

Em relação à levedura *Candida albicans*, todos os extratos (A a G) apresentaram CIM de 1000 µg/mL, com ação fungistática. O fluconazol, antifúngico de referência, apresenta CIM entre 0,25 e 64 µg/mL para essa espécie (Possamai

Rossatto *et al.*, 2021). Embora os extratos brutos tenham apresentado menor potência, estudos com substâncias isoladas, como o ácido elágico, demonstraram CIM entre 0,125 e 64 µg/mL frente a cepas de *Candida*, indicando que a fração bioativa pode estar presente e concentrada em níveis reduzidos nos extratos (Possamai Rossatto *et al.*, 2021).

Os dados obtidos com os extratos de *Casearia selloana* revelam um potencial biológico modesto na forma bruta, com destaque para o extrato A, que apresentou atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Embora os valores de CIM observados ainda estejam consideravelmente acima dos apresentados por antibióticos comerciais como vancomicina e ciprofloxacino, eles indicam a presença de metabólitos secundários com possível atividade biológica. Além disso, o efeito fungistático observado contra *C. albicans* por todos os extratos sugere que fenólicos ou terpenoides presentes em sua composição podem estar contribuindo para essa ação, conforme já relatado na literatura (Carvalho *et al.* 2010; Oberlies *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2014). A comparação com substâncias isoladas como ácido elágico reforça a importância da continuidade dos estudos, com objetivo de identificar constituintes com maior atividade antimicrobiana e antifúngica.

#### 5.4.2.2 Atividade Citotóxica contra células tumorais 4T1

As células 4T1 constituem um modelo amplamente utilizado para o estudo do câncer de mama triplo-negativo (TNBC), caracterizado pela ausência de expressão de receptores hormonais e pela elevada agressividade clínica (Pulaski E Ostrand-Rosenberg, 2000). Este modelo é particularmente relevante para a avaliação de terapias anticâncer devido à sua capacidade de metastatizar espontaneamente para múltiplos órgãos, de forma análoga ao comportamento da doença em humanos. Considerando a limitada eficácia dos tratamentos convencionais para o TNBC, a busca por novas alternativas terapêuticas, como substâncias derivadas de produtos naturais, tem ganhado destaque. Extratos vegetais como os de *Petiveria alliacea* e *Caesalpinia spinosa* têm demonstrado capacidade de reduzir a viabilidade celular e modular a resposta imune em modelos de câncer de mama (Lasso *et al.*, 2023). Nesse contexto, os resultados obtidos com os extratos de *Casearia selloana* reforçam a relevância da investigação fitoquímica e biológica de espécies vegetais como fontes de novos agentes bioativos com potencial terapêutico para o tratamento do TNBC.

Os dados obtidos indicam que os extratos de *Casearia selloana* apresentam efeitos citotóxicos fortemente dependentes da composição do solvente de extração. A atividade antitumoral mais expressiva foi observada nos extratos com maior proporção de etanol (A, B, C e D), o que sugere que substâncias bioativas com ação citotóxica são extraídas preferencialmente por solventes menos polares. O extrato A, em especial, reduziu significativamente a viabilidade das células tumorais 4T1, alcançando valores inferiores a 20% de viabilidade, mesmo em baixas concentrações, o que o destaca como o mais promissor dentre os testados.

Por outro lado, os extratos obtidos com predominância de água (E, F e G) não demonstraram atividade citotóxica relevante, mantendo os níveis de viabilidade celular elevados. Esses dados reforçam o papel predominante do etanol na atividade antitumoral observada, sugerindo que sua ausência ou presença em baixas proporções compromete significativamente o potencial citotóxico dos extratos frente às células tumorais 4T1. A expressiva atividade citotóxica observada nos extratos com maior proporção de etanol pode estar diretamente relacionada à presença de substâncias bioativas extraídas preferencialmente por solventes menos polares.

No entanto, a eficácia de um extrato citotóxico frente a células tumorais perde seu valor terapêutico caso ele também afete negativamente células saudáveis. Por esse motivo, foi realizado um ensaio adicional utilizando fibroblastos L929, uma linhagem de células não tumorais, com o extrato A — aquele que apresentou os melhores resultados contra as células 4T1, Gráfico 3. Esse teste é fundamental para avaliar a seletividade do extrato, ou seja, sua capacidade de agir preferencialmente sobre células cancerígenas sem comprometer a viabilidade das células normais. Tal seletividade é um requisito essencial para o desenvolvimento de substâncias com potencial uso farmacológico seguro e eficaz.

O ensaio com fibroblastos L929 revelou que o extrato A também foi citotóxico para células não tumorais em concentrações mais altas (300, 150 e 75 µg/mL). Entretanto, em concentrações mais baixas, especialmente a 18,75 µg/mL, observou-se uma importante seletividade do extrato: houve redução significativa da viabilidade das células tumorais, enquanto as células L929 mantiveram viabilidade próxima aos valores do grupo controle. Esse perfil de ação sugere que, em doses adequadas, o extrato A pode apresentar potencial seletivo contra células tumorais, característica desejável no desenvolvimento de novas substâncias bioativas. Como destacado por Mosmann (1983), a redução da atividade mitocondrial detectada pelo ensaio de MTT

é um indicativo confiável de viabilidade celular comprometida, reforçando a validade dos dados obtidos. Assim, os resultados justificam a continuidade dos estudos com o extrato A, com foco no fracionamento e isolamento de substâncias, visando a identificação de moléculas com maior seletividade e atividade antitumoral, que possam vir a compor estratégias terapêuticas mais seguras e eficazes.

Comparando com substâncias isoladas da literatura, observa-se que o  $\beta$ -2-himachalen-6-ol, extraído de do óleo essencial de *Daucus carota* (*Linnaeus*) *ssp*, apresenta IC<sub>50</sub> de 7  $\mu$ g/mL frente a células 4T1 (Taleb *et al.*, 2016). Embora os extratos brutos de *Casearia selloana* não tenham atingido tais valores, os dados obtidos indicam uma atividade relevante em extratos complexos, os quais frequentemente apresentam ações combinadas e menos potentes que substâncias puras. Segundo De Mesquita *et al.* (2016), extratos vegetais com IC<sub>50</sub> abaixo de 30  $\mu$ g/mL frente a linhagens tumorais podem ser considerados promissores, especialmente se apresentarem seletividade.

#### 5.4.2.3 Atividade Antileishmanial

Os extratos de *Casearia selloana* apresentaram atividade leishmanicida variável, com destaque para o extrato A, que exibiu potente inibição das formas promastigotas (IC<sub>50</sub> = 1,59  $\mu$ g/mL) e amastigotas (IC<sub>50</sub> = 8,82  $\mu$ g/mL) de *Leishmania amazonensis*. O índice de seletividade (IS = 2,42) não apresentou um valor alto o suficiente para considerar que o extrato A é efetivo contra as formas promastigotas e amastigotas sem que cause danos às células de macrófagos peritoneais. Estudos anteriores consideram extratos com IC<sub>50</sub> < 50  $\mu$ g/mL frente a formas amastigotas como ativos e com potencial farmacológico (Bezerra *et al.*, 2006). Nesse contexto, a amostra A pode ser considerada uma candidata inicial à investigação. As amostras B, C e D, embora apresentem valores de IC<sub>50</sub> mais elevados, mantiveram IS superior a 1. A atividade observada pode estar associada à presença de substâncias lipofílicas bioativos, como diterpenos e lignanas, conhecidos por seu potencial antiparasitário e amplamente relatados em espécies do gênero *Casearia* (Xia *et al.*, 2014).

Por outro lado, os extratos E, F e G mostraram ausência de atividade significativa (IC<sub>50</sub> > 100  $\mu$ g/mL) e baixa toxidez celular. Esses resultados sugerem que as substâncias leishmanicidas presentes na espécie vegetal em estudo estão concentrados nas frações obtidas com maior teor etanólico. Esse comportamento

pode ser atribuído à polaridade dos solventes utilizados na extração, fator determinante na obtenção de metabólitos secundários bioativos (Kanokmedhakul *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2014).

#### **5.4.3 Correlação entre Atividades Biológicas, Classes Fitoquímicas e Dados Espectroscópicos em Espécies do Gênero *Casearia***

Os resultados biológicos obtidos neste estudo com extratos hidroacoólicos de *Casearia selloana* indicam um perfil de atividade compatível com o que é descrito na literatura para espécies do mesmo gênero, especialmente no que se refere às atividades antimicrobiana, antifúngica, citotóxica e antileishmania. Estudos etnofarmacológicos e fitoquímicos prévios já mostraram que diversas espécies de *Casearia* possuem substâncias bioativas relevantes, como diterpenos clerodanos, lignanas, flavonoides, ácidos fenólicos e naftoquinonas, os quais têm sido relacionados a diferentes propriedades farmacológicas (Xia *et al.*, 2014; Kanokmedhakul *et al.*, 2005).

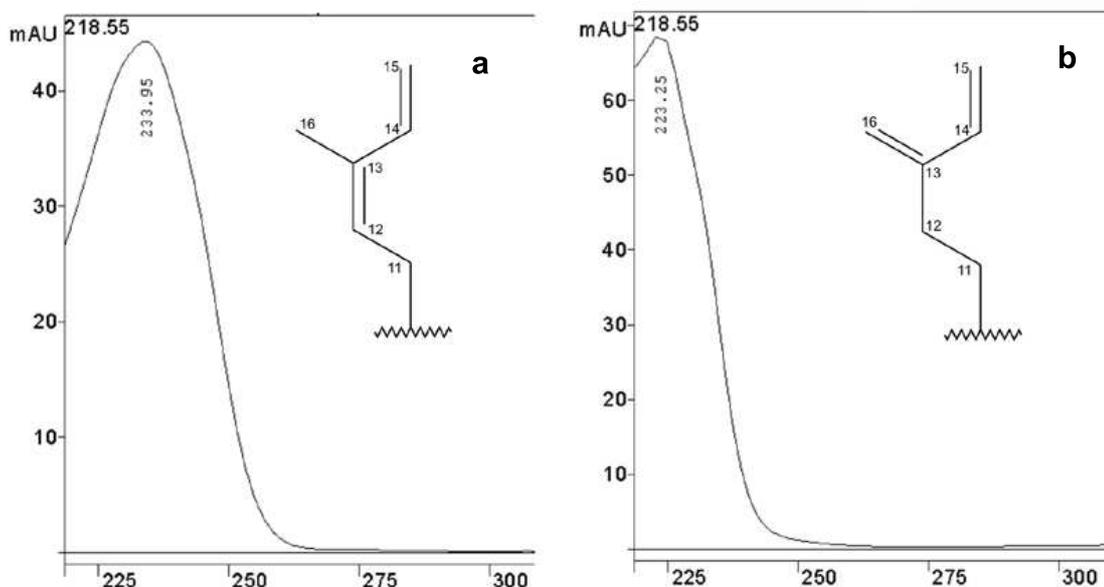
Entre os principais constituintes relatados, os diterpenos clerodanos são característicos de várias espécies de *Casearia* e têm sido associados à atividade antimicrobiana e antiparasitária, incluindo ações contra *Leishmania spp.* e *Staphylococcus aureus* (Xia *et al.*, 2014). As lignanas, por sua vez, possuem atividade citotóxica bem documentada, com mecanismos frequentemente relacionados à indução de apoptose e interferência em vias oxidativas celulares. Já os flavonoides, amplamente distribuídos em plantas medicinais, são reconhecidos por sua ação antioxidante, antimicrobiana e antifúngica, especialmente contra cepas de *Candida albicans*, como demonstrado para *Casearia sylvestris* (Lemos *et al.*, 2020; Possamai Rossatto *et al.*, 2021).

Como observado nos resultados biológicos, os extratos com maior teor etanólico (A a D) apresentaram as atividades mais expressivas, o que é compatível com a maior solubilidade de flavonoides, diterpenos e lignanas em solventes de polaridade intermediária. Esse padrão já foi descrito para outras espécies do gênero, como *C. sylvestris*, *C. tomentosa* e *C. esculenta*, cujos extratos etanólicos concentram a fração bioativa responsável pelas atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antiparasitárias (Xia *et al.*, 2014; Oberlies *et al.*, 2002; Lemos *et al.*, 2018). Dessa forma, os dados obtidos neste estudo, associados às evidências fitoquímicas e

espectrais, indicam que as atividades observadas nos extratos de *C. selloana* podem estar relacionadas à presença de diterpenos, lignanas e flavonóis menos conjugados.

A análise dos espectros UV-Vis obtidos por CLAE-DAD para os extratos de *Casearia selloana* revelou a presença de sinais característicos de diterpenos clerodânicos, como demonstrado por Carvalho *et al.* (2010), que identificaram diterpenos clerodânicos - casearina B e composto 1b em diferentes órgãos de *C. sylvestris*, relacionando esses perfis com atividades citotóxica e antiparasitária previamente descritas para esses metabólitos.

Figura 18 – a) espectro no UV do sinal relativo à casearina B no cromatograma do extrato etanólico de folhas e modelo diênico com ligações duplas em C12 e C14. b) espectro no UV do sinal relativo ao diterpeno 1b do extrato etanólico de raízes e modelo diênico com ligações duplas em C13(16) e C14.



Fonte: Carvalho *et al.* (2010).

Em *C. sylvestris*, diterpenos do tipo casearina, contendo um dieno conjugado posicionado entre os carbonos C12 e C14, apresentaram  $\lambda_{\text{máx}}$  entre 232–235 nm. Já o diterpeno 1b, com dieno deslocado para C13(16) /C14, mostrou absorção em comprimentos de onda ligeiramente inferiores (223–229 nm), atribuída ao menor grau de conjugação do sistema cromóforo (Carvalho *et al.* 2010).

Nos dados experimentais de *C. selloana*, os três últimos sinais cromatográficos (tR = 17,45; 18,02; e 18,51 min) exibiram espectros com  $\lambda_{\text{máx}}$  em 234,4 nm, 221,5 nm e 233,3 nm, respectivamente. O primeiro e o último são compatíveis com os valores descritos para as casearinas e sugerem a presença de diterpenos clerodânicos com dieno conjugado em C12–C14. Por outro lado, o segundo sinal, com absorção máxima em 221,5 nm, aproxima-se do perfil espectral do diterpeno 1b, indicando a possível ocorrência de uma estrutura com menor conjugação eletrônica (Carvalho *et al.* 2010).

Esses resultados reforçam a hipótese de que *C. selloana* compartilha padrões estruturais semelhantes aos encontrados em outras espécies do gênero, como *C. sylvestris*, especialmente no que diz respeito à presença de diterpenos clerodânicos com variações no sistema diênico. A semelhança nos perfis espectrais aponta para uma possível conservação biossintética dessas estruturas dentro do gênero *Casearia*, o que pode ter implicações relevantes no estudo de suas atividades biológicas e potencial farmacológico.

## 6 CONCLUSÕES

O presente estudo buscou investigar o perfil fitoquímico e a atividade biológica de extratos das folhas de *Casearia selloana* preparados com diferentes proporções de etanol e água. A análise cromatográfica por CLAE-DAD demonstrou que a escolha do comprimento de onda influencia fortemente a detecção das substâncias presentes. Os sinais mais intensos e representativos foram observados a 235 nm, sugerindo a predominância de substâncias mais apolares. A separação por CLAE, utilizando gradiente de polaridade com fase reversa, permitiu a visualização de perfis químicos distintos entre os extratos, conforme se alterava a composição do solvente extrator. Extratos preparados com maior proporção de etanol apresentaram maior conteúdo de substâncias apolares, enquanto solventes mais aquosos favoreceram a extração de metabólitos polares. Tais resultados evidenciam o papel crucial da polaridade da mistura extratora na seletividade e composição química dos extratos vegetais. Ressalta-se que o método adotado foi inicialmente voltado à quantificação de flavonoides totais, utilizando quercetina como padrão. No entanto, a baixa representatividade dessas substâncias na amostra revelou uma limitação da abordagem, sugerindo que a separação cromatográfica poderia ter sido mais eficiente se adaptada à natureza química predominante do extrato.

Não foi necessário realizar a construção de modelos matemáticos de misturas para observar e prever o comportamento do sistema nas diferentes condições de extração, uma vez que os resultados biológicos obtidos demonstraram de forma clara que o nível A, mais apolar, foi o que apresentou a melhor resposta. Essa tendência foi observada tanto nos ensaios de citotoxicidade frente às células tumorais murinas 4T1 quanto nos testes antiparasitários realizados com *Leishmania amazonensis*, em que o extrato A apresentou os menores valores de IC<sub>50</sub>, evidenciando maior atividade biológica. Assim, a escolha das condições ótimas de extração pôde ser feita com base direta nos dados experimentais, simplificando a interpretação e reforçando a aplicabilidade do método proposto. Nos ensaios microbiológicos, o extrato A destacou-se por apresentar atividade antimicrobiana moderada contra *Staphylococcus aureus*, com CIM de 125 µg/mL, indicando um potencial bacteriostático relevante. Contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, os extratos apresentaram atividade fraca ou limite, mas indicam a presença de

substâncias com potencial bioativo a ser melhor investigado por meio de fracionamento e isolamento.

Além disso, destaca-se o aspecto ambientalmente favorável das análises realizadas. Os extratos foram preparados com misturas de etanol e água, dois solventes reconhecidamente menos tóxicos e mais sustentáveis em comparação com solventes orgânicos halogenados ou derivados do petróleo. O etanol, por exemplo, é classificado como um solvente verde, por ser biodegradável, de baixa toxicidade, obtido de fontes renováveis e amplamente aceito em aplicações farmacêuticas e alimentícias (Capello *et al.*, 2007). Essa escolha está alinhada aos princípios da Química Verde, minimizando o impacto ambiental dos processos químicos e tornando os métodos aplicados não apenas eficazes, mas também ambientalmente conscientes.

De maneira geral, os resultados reforçam o potencial fitoquímico e antimicrobiano de *Casearia selloana*, apontando para a importância de estratégias analíticas abrangentes e condições de extração otimizadas para revelar sua diversidade química e funcional. Estudos futuros devem focar no isolamento de substâncias específicas, avaliação de sinergismo entre constituintes e testes *in vivo* para confirmação do potencial terapêutico identificado neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ADRIANO *et al.* Tutorial para aplicação didática de planejamentos de misturas utilizando libreoffice e rstudio. **Química Nova**, v. 47, 1 jan. 2024.
- AGUILERA, Y. *et al.* Phenolic compounds in fruits and beverages consumed as part of the mediterranean diet: their role in prevention of chronic diseases. **Phytochem Rev**, 2015.
- ALTEMIMI, Ammar; NAOUFAL LAKHSSASSI; AZAM BAHARLOUEI; *et al.* Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, v. 6, n. 4, 2017.
- ÁLVAREZ, R. *et al.* Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids. **Chemical reviews**, v. 114, n. 1, p. 1–125, 2014.
- BRASIL. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Ministério da Saúde. ANVISA. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0166\\_24\\_07\\_2017.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0166_24_07_2017.pdf). Acesso em: 05 maio. 2025.
- ATANASOV, Atanas G; WALTENBERGER, Birgit; EVA MARIA PFERSCHY-WENZIG; *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.
- ATANASOV, Atanas G; ZOTCHEV, Sergey B; DIRSCH, Verena M; *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021.
- AWUCHI, C. G. The Biochemistry, Toxicology, and Uses of the Pharmacologically Active Phytochemicals: Alkaloids, Terpenes, Polyphenols, and Glycosides. **J.Food Pharm.Sci**, v. 2019, n. 3, p. 131–150, 2019.
- AZIZULLAH, A.; MURAD, W. Chlorophyll derivatives for pest and disease control: Are they safe? **Environmental Impact Assessment Review**, v. 50, p. 156–157, jan. 2015.
- AZWANIDA. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 04, n. 03, 2015.
- BARRETT, A. H.; FARHADI, N. F.; SMITH, T. J. Slowing starch digestion and inhibiting digestive enzyme activity using plant flavanols/tannins— A review of efficacy and mechanisms. **LWT**, v. 87, p. 394–399, jan. 2018.
- BATTU, S. K. *et al.* Physicochemical Characterization of Berberine Chloride: A Perspective in the Development of a Solution Dosage Form for Oral Delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1466–1475, set. 2010.

BERGMAN, M. E.; DAVIS, B.; PHILLIPS, M. A. Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3961, 1 nov. 2019.

BERNARDI, F.; NICOLINI, K. P.; NICOLINI, J. Infarma - Ciências Farmacêuticas. **Infarma Ciências Farmacêuticas**, v. 29, 2017.

BEZERRA, J. L. *et al.* Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 631–637, dez. 2006.

BHATTACHARYA, A. High-Temperature Stress and Metabolism of Secondary Metabolites in Plants. **Effect of High Temperature on Crop Productivity and Metabolism of Macro Molecules**, p. 391–484, 2019.

BOOTS, Agnes W; GUIDO R.M.M. HAENEN; BAST, Aalt. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, n. 2-3, p. 325–337, 2008.

BORGES *et al.* Neutralization of proteases from Bothrops snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, n. 12, p. 1863–1869, 1 dez. 2001.

CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 927, 2007.

CARVALHO, E. S. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 2010.

CDC. Centers for Disease Control. Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/>. Acessado em 17 de abril de 2025.

CHEYNIER, V. Phenolic compounds: from plants to foods. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 2-3, p. 153–177, jun. 2012.

CLARDY, Jon; WALSH, Christopher. **Lessons from natural molecules**. Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, 2004. Disponível em: [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature).

CORNELL, J. A. **Experiments with Mixtures**. Wiley–Blackwell; 2nd Edition, 2002.

CORREIA, D. C. C. *et al.* Métodos de extração de metabólitos secundários da planta jovem de capim limão (*Cymbopogon citratus*) para identificação por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 7, p. 22251–22266, 18 jul. 2023.

COX-GEORGIAN, D. *et al.* Therapeutic and Medicinal Uses of Terpenes. **Medicinal Plants**, p. 333–359, 2019.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, [S.l.], v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

DA SILVA FERREIRA, V.; SANT'ANNA, C. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 1, 1 dez. 2016.

DE MESQUITA, M. L. *et al.* Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 439–445, jun. 2009.

DOS SANTOS, D. S.; FARIAS RODRIGUES, M. M. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 3, p. 29, 6 nov. 2017.

DURAZZO, A. *et al.* Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 9, p. 2221–2243, 29 jul. 2019. Elsevier.

ESTEVES, I. *et al.* Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 191–196, out. 2005.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Goiabeira, folha (*Psidium guajava* L.). Monografia PM048-00. In: **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed., Suppl. 1. Brasília: Anvisa, 2019.

FEHER, M.; SCHMIDT, J. M. Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and Molecules from Combinatorial Chemistry. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, n. 1, p. 218–227, 11 dez. 2002.

FERNANDES, A. S. *et al.* Introductory Chapter: Carotenoids - A Brief Overview on Its Structure, Biosynthesis, Synthesis, and Applications. **Progress in Carotenoid Research**, 26 set. 2018.

FLORA DO BRASIL 2025. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 17 abr. 2025.

FORBES-HERNÁNDEZ, Tamara Y; GIAMPIERI, Francesca; GASPARRINI, Massimiliano; *et al.* The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 154–182, 2014.

FUNAYAMA, S., CORDELL, G.A., 2014. Alkaloids: a Treasury of Poisons and Medicines, 2014.

GAO, Ziting; ZHONG, Wenwan. Recent (2018–2020) development in capillary electrophoresis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, n. 1, p. 115–130, 2021.

GARCÍA DÍAZ, J. *et al.* Antimicrobial activity of leaf extracts and isolated constituents of *Croton linearis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 236, p. 250–257, maio 2019.

GOVAERTS, R. **World checklist of seed plants. Vol. 3, Pt. 1 The species.** [s.l.] Antwerp Mim, 1999.

HABARTOVÁ, K. *et al.* The Biological Activity of Alkaloids from the Amaryllidaceae: From Cholinesterases Inhibition to Anticancer Activity. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 10, out. 2016.

HARVEY, D. **Modern analytical chemistry.** Boston: Mcgraw-Hill, Cop, 2000.

HUANG, Yang; JANSEN, Olivia; FRÉDÉRICH, Michel; *et al.* **CE, HPLC, and TLC analyses of phenolic compounds from rapeseed plants and evaluation of their antioxidant activity.** Institute of Pharmaceutical Analysis, 2018.

İNANÇ, A. Chlorophyll: Structural Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils. **Akademik Gıda**, v. 9, n 2, 2011.

IQBAL, J. *et al.* Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 12, p. 1129–1150, dez. 2017.

IRANAWATI, Feni; NARULITAI, Rizqi; DEWI, Citra Satrya Utami; ARIFIN, Sunanto. Web evaluation of maceration length period on antioxidant potency of *Sonneratia caseolaris* leaf. **E3S Web of Conferences**, v. 153, p. 01010, Jan. 2020. DOI: 10.1051/e3sconf/202015301010.

JIA, Y.-P. *et al.* The Pharmacological Effects of Lutein and Zeaxanthin on Visual Disorders and Cognition Diseases. **Molecules**, v. 22, n. 4, p. 610, 20 abr. 2017.

KANOKMEDHAKUL, S. *et al.* New Bioactive Clerodane Diterpenoids from the Bark of *Casearia grewiaefolia*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 2, p. 183–188, 21 jan. 2005.

KARAK, P. BIOLOGICAL ACTIVITIES OF FLAVONOIDS: AN OVERVIEW. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 4, 2019.

KAWSER HOSSAIN, M. *et al.* Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 569, 15 abr. 2016.

KHAN, J. *et al.* Hplc characterization of phytochemicals and antioxidant potential of *alnus nitida* (Spach) endl. **Horticulturae**, v. 7, n. 8, ago. 2021.

KUETE, V. Potential of Cameroonian Plants and Derived Products against Microbial Infections: A Review. **Planta Medica**, v. 76, n. 14, p. 1479–1491, 8 jun. 2010.

KUKULA-KOCH, W. A.; WIDELSKI, J. Alkaloids. **Pharmacognosy**, p. 163–198,

2017.

KUREK, Joanna. Introductory chapter: **Alkaloids – their importance in nature and for human life**. In: KUREK, Joanna (ed.). *Alkaloids – Alternatives in synthesis, modification and application*. IntechOpen, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85400>. Acesso em: 17 abr. 2025.

LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 04, n. 03, p. 17–31, 2013.

LEITZMANN, Claus. Characteristics and health benefits of phytochemicals. **Forschende Komplementarmedizin**, v. 23, n. 2, p. 69–74, 2016.

LEMOS, A.S.O. *et al.* Antibacterial and Antibiofilm Activities of Psychorubrin, a Pyranonaphthoquinone Isolated From *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae). **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 1-11, 2018.

LEMOS, A.S.O. *et al.* Antifungal Activity of the Natural Coumarin Scopoletin Against Planktonic Cells and Biofilms From a Multidrug-Resistant *Candida tropicalis* Strain. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 1-11, 2020.

LUDWICZUK, A.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GEORGIEV, M. I. Terpenoids. **Pharmacognosy**, p. 233–266, 2017.

MANN, S.; FRASCA, K.; SCHERRER, S.; HENAO-MARTÍNEZ, A.F.; NEWMAN, S.; RAMANAN, P.; SUAREZ, J.A. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**. v.8:121–132, 2021.

MARCHEAFAVE, G. G. *et al.* Experimental mixture design solvent effects on pigment extraction and antioxidant activity from *Coffea arabica* L. leaves. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 713–721, 1 maio 2019.

MARQUETE, R.; MANSANO, V. F. O gênero *Casearia* Jacq. no Brasil / The genus *Casearia* Jacq. in Brazil. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 13, n. 1, p. 69, 10 dez. 2015.

MBAVENG, A. T.; HAMM, R.; KUETE, V. Harmful and Protective Effects of Terpenoids from African Medicinal Plants. **Toxicological Survey of African Medicinal Plants**, p. 557–576, 2014.

MENEZES FILHO, Antônio Carlos.; MARIANA CHAVES SANTOS; FREDERICO, C. Estudo fitoquímico, bioativo, fotoprotetor e físico-químico do extrato floral de *Cochlospermum regium* (Schrank.) Pilg. – Bixaceae (algodãozinho do cerrado). **Revista Arquivos Científicos - IMMES**, v. 3, n. 2, p. 59–71, 12 mar. 2021.

MERINO, F. J. Z. *et al.* Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente a *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 1031–1040, 2015.

MIHAYLOVA, Dasha; POPOVA, Aneta. Phytochemicals of natural products: Analysis and biological activities. **Horticulturae**, v. 9, n. 2, 2023.

MLOZI, STEPHANO; MMONGOYO, J. A.; CHACHA, M. GC-MS analysis of bioactive phytochemicals from methanolic leaf and root extracts of *Tephrosia vogelii*. **Scientific African**, v. 16, jul. 2022.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MWELASI, P. Analysis of phenolic compounds in *Carica papaya*, *Zingiber officinale*, *Ipomoea batatas* and *Myrothamnus flabellifolius* using RP-HPLC-UV/VIS-DAD, and in vitro evaluation of antifungal activity on plant pathogenic fungi of economic importance, 2015. Acesso em: 5 maio. 2025.

NAÇÕES UNIDAS. Transformando nosso mundo: a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável. Resolução A/RES/70/1 da Assembleia Geral. Nova Iorque, 2015. Disponível em: <https://brasil.un.org/sites/default/files/2020-09/agenda2030-pt-br.pdf>. Acesso em: 30 junho. 2025.

NACZK, Marian; SHAHIDI, Fereidoon. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 5, p. 1523–1542, 2006.

NGCOBO, S. *et al.* Optimal chlorophyll extraction conditions and postharvest stability in *Moringa* (*M. Oleifera*) leaves. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 18, n. 3, p. 1611–1626, 13 dez. 2023.

NORTJIE, E. *et al.* Extraction Methods, Quantitative and Qualitative Phytochemical Screening of Medicinal Plants for Antimicrobial Textiles: A Review. **Plants**, v. 11, n. 15, p. 2011, 2 ago. 2022.

OBERLIES, N. H. *et al.* Novel Bioactive Clerodane Diterpenoids from the Leaves and Twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 95–99, fev. 2002.

OLIVEIRA, Marcone; LEE, Brenda; DANIELE, Isaura; *et al.* 20 years of fatty acid analysis by capillary electrophoresis. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14094–14113, 2014.

ONAOLAPO, A. Y.; ONAOLAPO, O. J. Herbal Beverages and Brain Function in Health and Disease. **Functional and Medicinal Beverages**, p. 313–349, 2019.

OSHIMA-FRANCO, Y. *et al.* Neutralization of the neuromuscular activity of bothropstoxin-i, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom, by a hydroalcoholic extract of *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, 1 dez. 2005.

PAGARE, Saurabh; BHATIA, Manila; TRIPATHI, Niraj; *et al.* **Secondary metabolites of plants and their role: Overview.** Department of Biological Science, 2015.

PANDEY, Amita; TRIPATHI, Shalini. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. **115 Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 5, p. 115–119, 2014.

PATEL, S. Plant-derived cardiac glycosides: Role in heart ailments and cancer management. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1036–1041, dez. 2016.

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 50–52, ago. 2005.

PEREIRA, J. *et al.* Potencial alelopático e identificação dos metabólitos secundários em extratos de *Canavalia ensiformis* L. **Ceres**, v. 65, n. 3, p. 243–252, 1 jun. 2018.

PIRES, E. V. Atividade antioxidante e identificação de compostos fenólicos por CLAE/UV de seis espécies de Plantas. **Perspectiva**, v. 47, n. 179, p. 7–18, 14 nov. 2023.

PORTO, Brenda; VALDÉS, Alberto; CIFUENTES, Alejandro; *et al.* Capillary electrophoresis in phytochemical analysis: Advances and applications in the period 2018–2021. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 161, 2023.

POSSAMAI ROSSATTO, F. C. *et al.* Antifungal Activity of the Phenolic Compounds Ellagic Acid (EA) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) against Drug-Resistant *Candida auris*. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 9, p. 763, 15 set. 2021.

PRAKASAM; SUBRAMANIAM SETHUPATHY; PUGALENDI, K. V. Effect of *Casearia esculenta* root extract on blood glucose and plasma antioxidant status in streptozotocin diabetic rats. **PubMed**, v. 55, n. 1, p. 43–9, 15 jul. 2003.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. **Current Protocols in Immunology**, v. 39, n. 1, out. 2000.

RAJHARD, S. *et al.* Solubility of Luteolin and Other Polyphenolic Compounds in Water, Nonpolar, Polar Aprotic and Protic Solvents by Applying FTIR/HPLC. **Processes**, v. 9, n. 11, p. 1952, 30 out. 2021.

REHMAN, S.; KHAN, H. Advances in antioxidant potential of natural alkaloids. **Current Bioactive Compounds**, v. 13, n. 2, p. 101-108, 2017.

REIS, C.; DE ANDRADE, J. C.; *Quim. Nova* **1996**, 19, 313.

REYES, B. A. S. *et al.* Selected Phyto and Marine Bioactive Compounds: Alternatives for the Treatment of Type 2 Diabetes. **Studies in Natural Products Chemistry**, p. 111–143, 2018.

RICHTER, P. R. *et al.* Chlorophyllin as a possible measure against vectors of human

parasites and fish parasites. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, 5 jun. 2014.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 80–84, ago. 2005.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, C. *et al.* Naturally Lignan-Rich Foods: A Dietary Tool for Health Promotion? **Molecules**, v. 24, n. 5, p. 917, 6 mar. 2019.

SALAH, B.; ALLOUCHE, N. Plant-based chemicals extraction and isolation. In: LI, Y.; CHEMAT, F. (Eds.). **Plant Based “Green Chemistry 2.0”**. Springer Singapore, 2019. p. 89–117.

SANCHEZ, Patrícia M; PAULI, Elis D; SCHEEL, Guilherme L; *et al.* Irrigation and light access effects on coffea arabica l. Leaves by FTIR-Chemometric analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 1, p. 168–176, 2017.

SANGEETHA, S K. S.; UMAMAHESWARI, S.; UMA MAHESWARA REDDY, C.; NARAYANA KALKURA, S. Flavonoids: therapeutic potential of natural pharmacological agents. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 7, n. 10, p. 3924–3930, 2016.

SANTI, M. M. *et al.* Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal Cordia verbenacea DC. por HPLC-DAD. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 256–261, jun. 2014.

SARKER, Umakanta; OBA, Shinya. The response of salinity stress-induced a. tricolor to growth, anatomy, physiology, non-enzymatic and enzymatic antioxidants. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

SEN, S.; CHAKRABORTY, R. The Role of Antioxidants in Human Health. **ACS Symposium Series**, p. 1–37, jan. 2011.

SERTIÉ, J. A. A.; CARVALHO, J. C. T.; PANIZZA, S. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of casearia sylvestris. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 112–119, 2000.

SHAH, Z. A. *et al.* Cytotoxic and anti-inflammatory salicin glycosides from leaves of Salix acmophylla. **Phytochemistry Letters**, v. 17, p. 107–113, set. 2016.

SHARMA, Meenakshi; KAUSHIK, Prashant. Vegetable phytochemicals: An update on extraction and analysis techniques. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 36, 2021.

SIENIAWSKA, E.; BAJ, T. Tannins. **Pharmacognosy**, p. 199–232, 2017.

SILVA, Beatriz; JOÃO C.M. BARREIRA; P.P, Beatriz. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 50, p. 144–158, 2016.

SIMÕES, C. M. O.; AL, E. **Farmacognosia : da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora Da Ufsc ; Porto Alegre Editora Da Ufrgs, 2007.

SINGH, B.; SHARMA, R. A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 129–151, 29 abr. 2014.

SOUZA, C. S. *et al.* Análise físico-química do teor de lípideos da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) com e sem caroço. **Saber Científico**, v. 7, n. 1, p. 23, 27 jul. 2018.

STEPHANE, F. F. Y.; JULES, AND B. K. J. **Terpenoids as Important Bioactive Constituents of Essential Oils** IntechOpen, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.87184>. Acesso em: 17 abr. 2025.

SUBRAMONIAM, A. *et al.* Chlorophyll Revisited: Anti-inflammatory Activities of Chlorophyll a and Inhibition of Expression of TNF- $\alpha$  Gene by the Same. **Inflammation**, v. 35, n. 3, p. 959–966, 25 out. 2011.

TAIZ, L; ZEIGER, E. Fisiologia e desenvolvimento vegetal; tradução: Alexandra Antunes Mastroberti *et al.*]; revisão técnica: Paulo Luiz de Oliveira. – 6. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2017.

TALEB, R. I. *et al.*  $\beta$ -2-himachalen-6-ol: A novel anticancer sesquiterpene unique to the Lebanese wild carrot. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 190, p. 59–67, ago. 2016.

TEMPONE, A. G.; OLIVEIRA, C. M. DE; BERLINCK, R. G. S. Current Approaches to Discover Marine Antileishmanial Natural Products. **Planta Medica**, v. 77, n. 6, p. 572–585, abr. 2011.

VENADO, R. *et al.* Genetic analysis of provitamin A carotenoid  $\beta$ -cryptoxanthin concentration and relationship with other carotenoids in maize grain (*Zea mays* L.). **Molecular Breeding**, v. 37, n. 127, 2017.

VIEGAS, C. *et al.* Divulgação. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

VIEIRA JÚNIOR, Gerardo Magela. **Contribuição ao estudo dos metabólitos secundários do gênero *Casearia* e de algumas de suas atividades biológicas**. 2010. 364 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2010.

VIVEK, P.; PRABHAKARAN, S.; SHANKAR, S. Assessment of nutritional value in selected edible greens based on the chlorophyll content in leaves. **Research in Plant Biology**, v. 3, n. 5, p. 45–49, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health topics- **Leishmaniasis**. 2025. [https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1). Acesso em 14 de abril de 2025.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p. 163–175, 17 jan. 2008.

XIA, Li; GUO, Qiang; TU, Pengfei; et al. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 1, p. 99–135, 2014.

YALAVARTHI, C.; THIRUVENGADARAJAN, V. S. A review on identification strategy of phyto constituents present in herbal plants. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 123–140, 2013.

ZHANG, Y. *et al.* Development of “ultrasound-assisted dynamic extraction” and its combination with CCC and CPC for simultaneous extraction and isolation of phytochemicals. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 26, p. 111–118, set. 2015.

## ANEXO A – Parecer CEUA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

## CERTIFICADO

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 08/05/2018, analisou o protocolo nº.009/2018 intitulado "Manutenção da infectividade das cepas de *leishmania sp* através de passagens em camundongos BALB/c", projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Elaine Soares Coimbra e colaboração de Ayla das Chagas Almeida e Juliana da Trindade Granato a ser realizado no período de 01/01/2019 a 31/12/2021. Por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela CEUA. Serão utilizados 24 fêmeas de Camundongo isogênico BALB/c de 4-6 semanas, projeto a ser realizado no biotério Localizado no Centro de Biologia da Reprodução(CBR) no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto de acordo com orientação técnica do CONCEA.

## CERTIFICATE

We certify that the protocol no. 009/2018 - CEUA about "Manutenção da infectividade das cepas de *leishmania sp* através de passagens em camundongos BALB/c" under responsibility of Elaine Soares Coimbra and collaboration of Ayla das Chagas Almeida and Juliana da Trindade Granato is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 08/05/2018. For the development of this research 24 mice of lineage BALB/C (24 females) of 4-6 week old, will be delivered as requested in the period period of 01/01/2019 to 12/31/2021. The Project will be performed at Biology Reproduction Center located at Federal University of Juiz de Fora. The term of validity of this certificate might be extended for one more year by means of justification during the period of vality.

Juiz de Fora, 09 de Maio de 2018.

Vice-coordenadora  
CEUA

Coordenadora  
CEUA

## ANEXO B – Parecer CEUA



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

**CERTIFICADO**

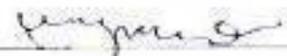
Certificamos que o protocolo nº. 007/2018 – CEUA sobre "Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, referentes aos lotes 2019, 2020 e 2021", projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Elaine Soares Coimbra a colaboração de Ayla das Chagas Almeida e Juliana da Trindade Granato, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF em reunião realizada em 03/04/2018. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 108 fêmeas sendo Camundongo isogênico BALB/c de 4-6 semanas, projeto a ser realizado no biotério localizado no Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, conforme solicitado e que serão utilizados no período 01/01/2019 a 31/12/2021. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviado justificativa a CEUA durante a vigência do projeto.

**CERTIFICATE**

We certify that protocol no. 007/2018 - CEUA on "Evaluation of the *in vitro* cytotoxicity of synthetic or natural compounds in peritoneal macrophages of BALB / c mice, for lots 2019, 2020 and 2021", research project under the responsibility of Elaine Soares Coimbra Ayla collaboration of Chagas Almeida and Juliana da Trindade Granato, is in accordance with the Ethical Principles on Animal Experimentation, adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the ANIMAL ETHICS COMMISSION (CEUA) of PRÓ- REITORIA DE PESQUISA / UFJF at a meeting held on 04/03/2018. For the development of the research, 108 females will be used, being a BALB / c isogenic mouse of 4-6 weeks, a project to be carried out in the laboratory located at the Institute of Biological Sciences Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, according to and will be used in the period 01/01/2019 to 12/31/2021. The term of validity of this certificate is equivalent to the validity of the project extendable for another year, provided that justification is sent to CEUA during the validity of the project.

Juiz de Fora, 04 de abril de 2018.

  
 \_\_\_\_\_  
 Vice-coordenadora  
 CEUA

  
 \_\_\_\_\_  
 Coordenadora  
 CEUA