



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DANIEL RODRIGO CAVALCANTE DE ARAÚJO

**PURIFICAÇÃO BIOGUIADA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS
ATIVOS DE FOLHAS DE *Anadenanthera colubrina* var. *Cebil.* (Griseb.) Altschul**

Recife
2018

DANIEL RODRIGO CAVALCANTE DE ARAÚJO

**PURIFICAÇÃO BIOGUIADA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS
ATIVOS DE FOLHAS DE *Anadenanthera colubrina* var. *Cebil*. (Griseb.) Altschul**

Tese de doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração:
Biotecnologia

Orientador (a): Prof^ª Dr^a. Maria T. S. Correia
Co-orientador: Prof^º. Dr. Alexandre Macedo

Recife
2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Araújo, Daniel Rodrigo Cavalcante de

Purificação bioguiada e caracterização química de compostos ativos de folhas *Anadenanthera colubrina* var. *Cebil*. (Griseb.) Altschul / Daniel Rodrigo Cavalcante de Araújo. – 2018.

76 f. : il.

Orientadora: Profª Drª. Maria T. S. Correia.

Coorientador: Prof. Dr. Prof. Dr. Alexandre Macedo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Plantas medicinais. 2. Matéria médica vegetal 3. Agentes anti-infecciosos. I. Correia, Maria T. S. (Orientadora). II. Macedo, Alexandre (Coorientador). III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 152

DANIEL RODRIGO CAVALCANTE DE ARAÚJO

**PURIFICAÇÃO BIOGUIADA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS
ATIVOS DE FOLHAS DE *Anadenanthera colubrina* var. *Cebil*. (Griseb.) Altschul**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas.

Área de concentração:
Biotecnologia

Aprovado em 01/03/18

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Maria Tereza dos Santos Correia (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Márcia Vanusa da Silva (Examinadora Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Sant'Anna da Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Túlio Diego da Silva (Examinador Externo)
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

AGRADECIMENTOS

Agradeço com enorme satisfação aos profissionais do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e aos profissionais da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia – FACEPE pelo apoio e financiamento deste projeto de pesquisa. Agradeço pelo apoio técnico aos profissionais do Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA; aos profissionais dos departamentos de Bioquímica, Biofísica, Nutrição, Antibióticos, Genética e Botânica da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE; Aos profissionais do departamento de fitoquímica e departamento de química da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB; aos profissionais do departamento de farmácia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS; aos profissionais do departamento de farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN; aos profissionais da central analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE; aos profissionais do complexo de laboratórios multiusuários do Instituto Nacional do Semiárido - INSA; aos profissionais da Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos da Universidade Federal do Vale do São Francisco - CAFMA-UNIVASF e aos profissionais da Associação dos Guias do Vale do Catimbau – Buíque detentores do conhecimento tradicional de plantas da Caatinga.

RESUMO

A espécie *Anadenanthera colubrina* var. *Cebil* (Griseb.) Altschul é uma árvore com ocorrência na caatinga, cerrado e mata atlântica, sendo conhecida como Angico, ela é usada tradicionalmente para tratar doenças respiratórias. A abordagem etnodirigida foi o critério de escolha desta espécie, e por isso o objetivo deste trabalho foi o de estudar o potencial terapêutico das folhas e os principais compostos secundários encontrados neste tecido. Para isso foram usadas técnicas *in vitro* para verificar o potencial antimicrobiano, antioxidante e citotóxico dos extratos, seguido de atividades de isolamento bioguiado de compostos ativos. No primeiro momento foi feita uma extração fracionada com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade com o material vegetal do período seco e chuvoso. Todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana sendo o mais promissor o extrato acetato de etila (AcEOEt) de folhas e frutos (EALE e EAFE), ambos do período chuvoso (3), por exemplo, o extrato EALE3 apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 0,195; 0,390; 0,781 e 0,390 mg/mL e o extrato EAFE3 apresentou CIM de 0,097; 0,390; 0,195 e 0,195 mg/mL frente as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *S. aureus* UFPEDA 733, *S. aureus* UFPEDA 709 e *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 respectivamente. Já os resultados frente a bactérias gram-negativas os melhores resultados também foram visualizados em EALE3 e EAFE3 com CIM de 0,390 mg/mL e 0,195 mg/mL frente a *Escherichia coli*. Foi realizado o isolamento bioguiado dos compostos no extrato AcOEt usando a cromatografia flash (Biotage Isolera one) onde foram obtidas cinco frações, sendo as frações F2 e F4 mais ativas, ambas com CIM de 0,019 mg/mL para *S. aureus* UFPEDA 02, já na análise de sequestro de DPPH, a fração F4 foi mais significativa com IC₅₀ de 133 ± 9 µg/mL. Essas frações foram encaminhadas ao sistema de purificação (CLAE-EM preparativa) onde foram isolados os componentes principais e foi constatado por RMN que a fração F2 tem como componente principal o ácido p-hidroxibenzóico m/z 137 [M+H]⁻ e na fração F4 o componente principal é o hiperosídeo m/z 487 [M+H]⁺. Ambos apresentam atividade anti- *Staphylococcus aureus* com CIM de 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL respectivamente, e anti-formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* em concentrações subinibitórias (0,1 mg/mL). Nossos resultados colaboram com estudos que apontam um efeito positivo da pluviosidade no efeito de extratos de plantas e associam esta atividade com o maior conteúdo de derivados de quercetina em amostras do período chuvoso. Os componentes principais foram isolados e testados e nossos resultados estão de acordo com os achados na literatura quanto ao seu potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Isolamento. Purificação. *Anadenanthera colubrina*

ABSTRACT

Anadenanthera colubrina var. *cebil* (Griseb.) Altschul is a common tree native to the Caatinga, Cerrado and Atlantic Rainforest biomes. It is popularly known as *Angico* and traditionally used as tinctures to treat respiratory diseases. We chose this species following an ethnodirected approach with the objective of studying the therapeutic potential of leaves and their secondary compounds. The antimicrobial, antioxidant and cytotoxic potential of extracts were examined through in vitro techniques. The active compounds were then isolated by analytic techniques. A fractioned extraction was completed using organic solvents of increasing polarity over plant material from dry and wet seasons. All of these extracts showed antimicrobial activity but the most promising was the ethyl-acetate extract of leaves and fruits (EALE and EAFE) from wet season (3). For example, EALE3 extract had a minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.195; 0.390; 0.781 and 0.390 mg/mL and EAFE3 extract had MIC values of 0.097; 0.390; 0.195 and 0.195 mg/mL against gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *S. aureus* UFPEDA733, *S. aureus* UFPEDA 709 and *Bacillus subtilis* UFPEDA 86, respectively. The best results against gram-negative bacteria were also observed in EALE3 and EAFE3 with MIC values of 0.390 mg/mL and 0.195 mg/mL on *Escherichia coli*. Thin layer chromatography identified abundant flavonoids and proanthocyanidins in leaves and fruits. Five different fractions were obtained from ethyl-acetate extracts through flash chromatography (Biotage Isolera One). Fractions F2 and F4 were the most active only against *S. aureus* UFPEDA 02, both with MIC values of 0.019 mg/mL. The DPPH scavenging analysis showed that F4 fraction was the most significant with IC₅₀ of 133 ± 9 µg/mL. These fractions were sent to the purification system (preparative HPLC-MS) to isolate main compounds. The NMR was then used to corroborate that main compound for F2 fraction was p-hydroxybenzoic acid with a $[M+H]^+$ value of m/z 137 and main compound for F4 fraction was quercetin-3-O-β-galactopyranose (hyperoside) with $[M+H]^+$ value of m/z 487. Both compounds showed anti-*Staphylococcus aureus* activity with MIC of 0.5 mg/mL and 0.25 mg/mL, respectively. They also showed anti- biofilm formation for *Staphylococcus aureus* in sub-inhibitory concentrations (0.1 mg/mL) besides antioxidant activity for in vitro conditions. Our results agreed with other studies that pointed out the positive effect of pluviosity on plant extracts effectiveness and associate this activity to a higher concentration of glycosylated quercetin compounds from wet season samples. Our results were also in agreement with those found on literature regarding biotechnological potential of isolated main compounds.

Keywords: Isolation. Purification. *Anadenanthera colubrina*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
1.1	OBJETIVOS.....	10
1.1.1	Objetivo geral.....	10
1.1.2	Objetivos específicos.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	PLANTAS MEDICINAIS E SUA RELAÇÃO COM A HUMANIDADE.....	12
2.2	CONSIDERAÇÕES MEDICINAIS SOBRE A ESPÉCIE <i>Anadenanthera colubrina</i> var <i>cebil</i> (Griseb.) altschul.....	13
2.3	IMPACTOS E AVANÇOS CAUSADOS PELA DESCOBERTA DE PRODUTOS NATURAIS.....	16
2.4	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E SUAS PRINCIPAIS CLASSES.....	16
2.4.1	A classe dos compostos fenólicos.....	17
2.4.2	A classe dos compostos nitrogenados.....	18
2.4.3	A classe dos terpenos.....	21
2.5	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	23
2.6	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A BACTÉRIAS DE INTERESSE PARA A SAÚDE HUMANA.....	26
2.7	ATIVIDADE ANTI-FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS DE INTERESSE DA SAÚDE HUMANA.....	26
2.8	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E A SAÚDE HUMANA.....	28
3	MÉTODO.....	29
3.1	LOCAL DE ESTUDO.....	29
3.2	TIPO DE ESTUDO E EXPERIMENTOS.....	29
4	RESULTADOS.....	30
4.1	ARTIGO 1 - PURIFICAÇÃO BIOGUIADA DE COMPOSTOS ATIVOS DE FOLHAS DE <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>Cebil</i> (Griseb.) Altschul.....	30
4.2	ARTIGO 2 - ATIVIDADE ANTI-FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>Cebil</i> (Griseb.) Altschul.....	48

5	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS.....	56
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA	
	PHARMACOGNOSYJOURNAL.....	63
	ANEXO A – SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÕES	
	DA BIODIVERSIDADE – SISBIO.....	68
	ANEXO B –VOUCHER DO HERBÁRIO IPA.....	69
	ANEXO C – ESPECTROS DE RMN DO COMPOSTO ÁCIDO P-	
	HIDROXIBENZÓICO.....	70
	ANEXO D – ESPETROS DE RMN DO COMPOSTO	
	HIPEROSÍDEO.....	73
	ANEXO E – NORMAS DAS REVISTAS: FRONTIERS IN	
	MICROBIOLOGY AND NATURAL PRODUCT RESEARCH:	
	FORMERLY NATURAL PRODUCT.....	76

1 INTRODUÇÃO

As plantas apresentam, em seu metabolismo, algumas vias importantes que não estão presentes nos seres humanos e, além de serem responsáveis pela formação de aminoácidos essenciais à dieta humana, também produzem compostos com ação antioxidante e antimicrobiana (TAIZ;ZEIGER, 2004;TISSIER *et al.*, 2014). Estas propriedades fizeram do reino vegetal não só fonte de alimento para os humanos e outros animais, mas também, como fonte de cura (CARVALHO, 2016; BENTO *et al.*, 2016).

A observação da natureza pelo homem o fez perceber outros potenciais, como a tintura, é caso do vermelho extraído da *Caesalpinia echinata*, o pau-brasil, (ALMEIDA *et al.*, 2017). No século XIX as plantas medicinais pouco se diferenciavam dos remédios convencionais da época, ou seja, eram equivalentes a fitoterápicos, não puros (FIRMO *et al.*, 2011), porém na metade do século XX passaram a ser comercializados formulações purificadas, contendo somente o princípio ativo, um exemplo de um medicamento revolucionário, com alta pureza, está o paclitaxel, ou taxol, extraído das folhas do gênero *Taxus*, e prescrito para o tratamento de vários tipos de câncer (TISSIER *et al.*, 2014).

Ainda existe uma demanda por novas moléculas antioxidantes, antimicrobianas e anti-tumorais ou fontes de maior rendimento para substâncias já conhecidas, e as plantas, são peças chave neste processo. O procedimento geral para o isolamento de compostos ativos envolve a característica polar ou apolar das substâncias. Ela começa geralmente com a elaboração de extratos brutos, seguida de uma partição líquido-líquido com o uso de solventes em ordem crescente de polaridade (CECHINEL-FILHO, YUNES, 1997; CAMPOS *et al.*, 2014), seguindo para a cromatografia, a forma mais usada na separação e isolamento de compostos (COLLINS *et al.*, 2011). O mecanismo mais usado para separação dos compostos é por partição e adsorção, onde o material de interesse é empurrado por um fluido (fase móvel) dentro de um cilindro recheado por um material de polaridade oposta (fase estacionária) e por migração diferencial dos compostos é dada a separação (COLLINS *et al.*, 2011). Técnicas clássicas e modernas apresentam este mesmo conceito geral e são repetidas inúmeras vezes visando identificar e/ou purificar um composto ativo. Quando a substância desejada já é conhecida outros processos para a purificação podem ser utilizados como a cristalização (CECHINEL-FILHO, YUNES, 1997; COLLINS *et al.*, 2011).

A espécie *Anadenanthera colubrina* var. *Cebil* (Griseb.) Altschul, o angico, se destaca principalmente pelo uso medicinal de sua casca com poucos relatos sobre as folhas, frutos e sementes (WEBER *et al.*, 2011). O gênero *Anadenanthera* é encontrada ao sul da linha do Equador (ALTSCHUL, 1964; WEBER, 2011), e é usado para fins terapêuticos em comunidades do Brasil, Argentina, Venezuela e Bolívia (WEBER, 2011).

No entanto levando em consideração a possibilidade desta espécie passar a ser fonte de compostos para a indústria, é essencial que a matriz seja de uma fonte renovável, como a folha, acarretando em matéria prima disponível na maior parte do ano, e com menos risco de comprometimento a saúde da planta. Neste sentido, o presente estudo, de caráter fitoquímico e com abordagem etnodirigida para a escolha da planta, tem como objetivo a extração e purificação de compostos ativos das folhas de *A. colubrina* por método bioguiado.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

- Purificar e caracterizar substâncias ativas das folhas de *Anadenanthera colubrina* var. *Cebil* (Griseb.) Altschul por abordagem biodirecionada.

1.2.2 Objetivos específicos

- Coletar folhas de *A. colubrina* var. *Cebil* (Griseb.) Altschul no Parque Nacional do Catimbau, Buíque, Pernambuco;
- Elaborar extratos das folhas e frutos por métodos clássicos e modernos usando solventes orgânicos P.A hexano, acetato de etila e metanol;
- Fracionar o extrato mais ativo com relação aos ensaios *in vitro* por cromatografia flash;
- Analisar extrato, frações e compostos isolados por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE;

- Testar *in vitro* se o extrato, frações e compostos isolados apresentam atividade antimicrobiana por método de microdiluição seriada;
- Verificar se os extratos, coletados em período seco e chuvoso apresentam diferença quanto a atividade antimicrobiana;
- Testar *in vitro* se o extrato, frações e compostos isolados apresentam atividade anti formação de biofilme bacteriano;
- Testar *in vitro* se o extrato, frações e compostos isolados apresentam atividade antioxidante pelo método DPPH, FRAP e ATT;
- Purificar a fração mais ativa em relação aos ensaios testados por meio da cromatografia líquida de alta eficiência de configuração preparativa (CLAE-EM);
- Analisar o extrato mais ativo em relação aos ensaios testados em espectrômetro de massas;
- Analisar compostos isolados por ressonância magnética nuclear (RMN 400Hz);
- Verificar se os compostos identificados apresentam variação nos teores em decorrência da época do período de coleta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PLANTAS MEDICINAIS E SUA RELAÇÃO COM A HUMANIDADE

Plantas medicinais são definidas como vegetais que apresentam compostos com ação terapêutica (CARVALHO, 2016), sendo considerada a mais antiga forma empregada pelo homem no tratamento de enfermidades e na prevenção de doenças (BENTO *et al.*, 2016). Acredita-se que esta relação com a natureza sempre existiu (FIRMO *et al.*, 2011) visto que os primatas mais próximos evolutivamente do homem aparentemente apresentam hábitos intencionais de se alimentarem de plantas com intenção de cura (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006). Não se sabe ao certo em que época aconteceu o primeiro registro de plantas medicinais, mas pesquisas apontam que registros ocorrem desde 4.000 anos a.C. (FIRMO *et al.*, 2011). Até o século XIX os recursos terapêuticos eram predominantemente plantas medicinais (extratos, tinturas, xaropes etc) e naquela época pouco se diferenciavam dos medicamentos da medicina moderna (FIRMO *et al.*, 2011). No entanto, ainda hoje, mesmo com tantas mudanças nos hábitos das pessoas no século XXI, estima-se que de 70% a 90% da população mundial ainda preferem o uso de plantas medicinais (ALCÂNTARA *et al.*, 2015).

Desde o século XX, os medicamentos produzidos a partir de plantas, sem o emprego de substâncias isoladas mesmo que de origem vegetal, são chamados de fitoterápicos (CAVALCANTE, 2013). Dessa forma o fitoterápico constitui-se de uma solução de complexidade significativa, e pode ser apresentado de diversas formas, como tinturas, extratos, chás, óleos essenciais, resinas, xaropes, elixir, pomadas, pastas, cápsulas e comprimidos (MS, 2012).

O uso de plantas consideradas medicinais é bastante difundido no Brasil devido não só a diversidade de espécies no país, mas a tradição e principalmente aos baixos recursos aquisitivos da população (MESSIAS *et al.*, 2015).

Hoje a fitoterapia é uma alternativa de tratamento e vem sendo novamente valorizada nos últimos anos devido à insatisfação pessoal da medicina convencional, o uso abusivo ou incorreto de drogas sintéticas, e pela acessibilidade de grande parte da população (BENTO *et al.*, 2016). Paralelamente, a indústria de drogas segue o mesmo caminho e estima-se que 60% dos medicamentos em fase de triagem clínica ou inseridas no mercado são de origem natural (BENTO *et al.*, 2016).

A comunidade científica estima que no Brasil há um número de aproximadamente 50 a 100 mil espécies vegetais e que aproximadamente 2 mil espécies foram estudadas até a última

década (REZENDE *et al.*, 2002). Dados mais recentes apontam que o número de estudos com plantas medicinais cresce 8% ao ano (CARNEIRO *et al.*, 2014). Este conhecimento é de grande interesse para a ciência por se tratar de um acúmulo de saber, transmitidos e mantidos principalmente pela oralidade e frutos de uma observação sistemática (LEAL *et al.*, 2015). Esse é o principal foco da Etnobotânica, que busca conhecer o relacionamento entre o homem e as plantas, principalmente, as medicinais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006) no contexto ecológico, evolutivo, simbólico e cultural com as plantas (SOARES *et al.*, 2015). Já a Etnofarmacologia consiste em combinar informações da flora medicinal com estudos químicos e farmacológicos existente na literatura, permitindo a formulação de hipóteses quanto as atividades farmacológicas e às substâncias ativas responsáveis pelas ações terapêuticas relatadas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2015). A Farmacognosia ou Fitoquímica se detém a detecção ou purificação de compostos com ou sem potencial terapêutico, de origem vegetal ou animal utilizando para isso ferramentas clássicas ou modernas (DESTRUTI, 1999; ALBUQUERQUE *et al.*, 2006; CAVALCANTE, 2013).

Estas grandes áreas atuam juntas em vários momentos e estão a serviço da população na valorização das plantas medicinais ou na busca de novos recursos de matéria prima medicinal. Foram ações nestas áreas que levaram o Ministério do Meio Ambiente a produzir a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME (MS, 2018).

2.2 CONSIDERAÇÕES MEDICINAIS SOBRE A ESPÉCIE *Anadenanthera colubrina* var *cebil*

O gênero *Anadenanthera* pertence a subfamília Mimosoideae da Família Fabaceae (ou Leguminosae) e Ordem Fabales. Este gênero foi sugerido pela primeira vez por J. P. M. Brenan (1955) e Reis Altschul (1964, 1967), sendo dividido na época em quatro espécies, anteriormente incluídas no gênero *Piptadenia*, de autoria de Bentham (1840, 1841-1842, 1874-1875) devido às suas semelhanças morfológicas. No entanto, o pesquisador Siri Von Reis Altschul (1964, 1967), em sua revisão taxonômica do gênero, considerou este ser composto de apenas duas espécies, *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, cada uma delas contendo duas variedades (QUEIROZ, 2009; WEBER *et al.*, 2011). As espécies são distinguidas por meio de poucas características morfológicas correlacionado com localizações geográficas distintas (QUEIROZ, 2009; WEBER *et al.*, 2011). Outros nomes podem ser relatados para indicar *Anadenanthera colubrina* e são considerados sinônimos como: *Acacia*

cebil Griseb; *Peptadenia macrocarpa* Benth, *Peptadenia macrocarpa* var *cebil* (Griseb.) e *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan (QUEIROZ, 2009; WEBER et al., 2011).

No Brasil é uma das espécies lenhosas típicas da Caatinga, ocorrendo do Maranhão até São Paulo, passando por Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, (LORENZI, 1998). No entanto *A. colubrina* não é uma espécie exclusiva do Brasil, sendo encontrada ao sul da linha do Equador (ALTSCHUL, 1964; WEBER, 2011).

Além do Brasil estudos realizados na América Latina relatam que comunidades da Argentina, Venezuela e Bolívia utilizam este vegetal para diversos fins terapêuticos (WEBER, 2011). *A. colubrina* (Figura 1) é um arbusto alto, com caule entre 30 e 50 cm de diâmetro (ALTSCHUL, 1964; WEBER, 2011), casca espessa de coloração acinzentada, e aspecto liso ou espiculado. Fornece madeira, compacta, não elástica, rígida e pesada. As folhas são compostas, folíolos rígidos, as flores brancas e o seu fruto é descrito como uma vagem achatada (CORRÊA, 1978; LORENZI, 1998; QUEIROZ, 2009; WEBER et al., 2011).

A casca de *A. colubrina* é o tecido mais relatado pelos estudos etnobotânicos com atividade terapêutica (Tabela 1) (WEBER et al., 2011), enquanto o uso das folhas só foi relatado uma única vez para tratar anemia, inflamações em geral, câncer etc (ALBUQUERQUE et al., 2007b). As indicações para casca e sementes são para o tratamento de doenças hepáticas, infecções gonocócicas, leucorreia, infecção ovariana, piorreia, bronquites, dores de cabeça, resfriados e sinusites sendo as formas de preparo por cocção da casca seguido de gargarejo e inalação das sementes moídas e secas (PAULA, 1981). Em outro estudo etnobotânico, cascas e folhas são indicadas para tratamento da tosse, tosse crônica, bronquite e inflamação em geral através do uso de tinturas (ALBUQUERQUE, U.P; OLIVEIRA, R.F, 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007a).



Figura 1. *Anadenanthera colubrinai* var. *cebil* em campo, Vale do Catimbau, Buíque-PE

Fonte: Autor

Tabela 1. Principais indicações terapêuticas para a espécie *Anadenanthera colubrina*

Parte da Planta	Indicação	Formas de uso	Referência
Casca	Utilizado no tratamento da tosse, bronquite e coqueluche	Maceração em bebida alcoólica destilada e ingestão da bebida	Agra et al., 2007
Casca	Tratamento de anemia, tosse, processo inflamatório, asma e gripe	Solução hidroalcoólica com bebida destilada e ingestão da bebida	Albuquerque et al., 2007a
Cascas, folhas, flor, fruto	Tratamento de anemia, tosse, asma, bronquite, gripe, prisão de ventre, processos inflamatórios, neoplasias, distúrbios hemostáticos, trauma, difteria, fissuras nos pés, gastrite e usado como expectorante	Maceração e cocção da casca do caule associado ao açúcar ou mel. Maceração em bebida alcoólica e ingestão da bebida.	Albuquerque et al., 2007b
Casca	Tratamento de doenças respiratórias		Lucena et al., 2007
Casca	Para inflamação	Extrato alcoólico produzido com bebida destilada	Araújo et al., 2008
Casca	Propriedade expectorante, antiinflamatório	2,3 cascas em meio litro de açúcar. Levar ao fogo até a mistura ficar na consistência de mel	Lucena et al 2018
Casca e sementes	Tratamento de doenças hepáticas, infecções gonocócicas, leucorreia e infecção ovariana, piorreia e bronquite, dores de cabeça, resfriados e sinusites.	Cocção da casca do caule, gargarejo. Inalação de sementes moídas secas.	Paula, 1981
Cascas	Tratamento de tosse, tosse crônica, bronquite e inflamações gerais	A partir da maceração em um litro de vinho ou cachaça. A mistura é ingerida três vezes ao dia até que os sintomas desapareçam.	Agra et al, 1994; Agra et al 1996, Agra et al 1999; Albuquerque e Oliveira 2007.
Cascas	Ação anti-inflamatória e antipirética	Cocção e infusão	Hilgert, 2001
Sementes	Utilizado com o objetivo de retardar menstruação	Cocção e infusão	Marcia;Garcia;Vidaurre, 2005
Cascas	Tratamento de bronquite e pneumonia.	Ingestão da cocção e inalação da infusão	Almeida et al., 2006
Cascas	Tratamento da tosse	Cocção e preparo com açúcar ou mel (xarope) e ingestão da mistura	Albuquerque, 2006
Cascas	Tratamento de processos inflamatórios, tratamento de feridas, tratamento de doenças do aparelho geniturinário e respiratório	Cocção e ingestão ou produção do extrato alcoólico para uso externo	Monteiro et al., 2006

2.3 IMPACTOS E AVANÇOS CAUSADOS PELA DESCOBERTA DE PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais são moléculas orgânicas geradas por reações biossintéticas, e apresentando funções e propriedades biológicas diferentes, sendo comumente relacionados a metabólitos secundários e originárias das mais diversas fontes de organismos vivos (EMERY *et al.*, 2010). Os produtos naturais possuem uma enorme diversidade estrutural e química e ainda são considerados as melhores fontes de drogas e fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2012; CARVALHO, 2016). O homem comum tem uma relação mais próxima dos produtos naturais do que se imagina, pois, a história da humanidade está cheia de momentos notáveis de como a descoberta de um produto natural impactou profundamente não só a medicina (SHEN, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2017) como também o meio ambiente. Por exemplo, a tecelagem do século XVI aumentou o uso de corantes naturais como bixina, genipina e brasileína isolados da *Bixa orellana*, *Genipa americana* e *Caesalpinia echinata*, respectivamente e a exploração destes produtos mudou completamente a paisagem da costa brasileira devido o desmatamento (ALMEIDA *et al.*, 2017). Já na medicina, o maior impacto na humanidade ocorreu no século XX: a penicilina isolada do fungo *Penicillium chrysogenum* e a estreptomicina isolada da actinobactéria *Streptomyces griseus* revolucionaram o tratamento a doenças infecciosas; o paclitaxel, alcalóide isolado da árvore *Taxus brevifolia* revolucionou o tratamento do câncer (SHEN, 2015). O final do século XX foi marcado pelo avanço da triagem de alto desempenho e da síntese combinatória, por isso, as empresas deixaram de lado ano após ano, seus programas sobre produtos naturais (LI; VEDERAS, 2009). No entanto com as pesquisas recentes de William C. Campbell e Satoshi Omura, na descoberta de avermectinas microbianas na redução de incidência de oncocercose e filariose linfática e de pesquisadores como Youyou Tu na descoberta do produto natural artemisinina, uma droga capaz de reduzir significativamente as taxas de mortalidade para pacientes que sofrem de malária, todos eles ganhadores do prêmio Nobel 2015, trouxeram otimismo para a comunidade de produtos naturais em todo o mundo (SHEN, 2015). Dessa forma acredita-se, que juntamente com os recentes avanços em genômica microbiana e metagenômica, biologia sintética e tecnologias analíticas, que estamos entrando em uma nova era de descoberta de produtos naturais (SHEN, 2015).

2.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E SUAS PRINCIPAIS CLASSES

O conjunto de reações bioquímicas presente nos seres vivos constitui o metabolismo. A maior parte do carbono disponibilizado pelo metabolismo gera moléculas comuns a todas as

células, como aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídios, desempenhando as mesmas funções todos os organismos sendo chamados de metabólitos primários (GARCIA; CARRIL, 2009; TISSIER *et al.*, 2014).

No entanto, a planta transfere uma grande quantidade de carbono e energia para a síntese de uma variedade de compostos orgânicos que aparentemente não apresentam função direta em processos fotossintéticos, respiratórios, assimilação de nutrientes, transporte de soluto ou síntese de proteínas, carboidratos ou lipídios. Esses compostos orgânicos são chamados de metabólitos secundários, também chamados de produtos secundários ou produtos naturais (GARCIA; CARRIL, 2009). Por muitos anos, foi defendido que estes compostos eram produtos laterais do metabolismo sem nenhuma função específica na planta sendo considerada como lixo metabólico e por esta razão foram chamados de produtos secundários (MARINHO, 2001). No entanto à medida que o metabolismo foi melhor estudado percebeu-se que estes compostos apresentam diversas funções, dentre elas, como um dos sistemas de defesa da planta (STEVENSON *et al.*, 2016; CLEMENSEN *et al.*, 2017), sendo hoje referidos também como metabólitos especializados (TISSIER *et al.*, 2014).

O termo produto natural apesar de estar intrinsecamente relacionada a toda e qualquer molécula proveniente da natureza, na área química seu uso é comumente aplicado aos metabólitos secundários (EMERY *et al.*, 2010). Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: compostos fenólicos, compostos nitrogenados e terpenos (TAIZ; ZEIGER, 2004; EMERY *et al.*, 2010; TISSIER *et al.*, 2014). A maior classe são os terpenoides, com 25.000 compostos identificados até o momento, seguido dos compostos nitrogenados com 21.000 compostos e por último os fenólicos com 10.000 compostos já descritos (TISSIER *et al.*, 2014).

2.4.1 A classe dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos têm origem por meio de duas rotas diferentes: a rota do ácido chiquímico (LAGE, 2009; TISSIER *et al.*, 2014) e a rota do ácido malônico (TAIZ; ZEIGER, 2004). A rota do ácido chiquímico participa na síntese da maioria dos fenóis (TISSIER *et al.*, 2014) (Figura 2). Esta rota não está presente nos animais e é responsável pela formação de aminoácidos como fenilalanina, tirosina e triptofano que são essenciais na dieta humana (TAIZ; ZEIGER, 2004). A classe mais abundante dos compostos fenólicos, os hidroxicinâmicos, é derivada do aminoácido fenilalanina (TAIZ; ZEIGER, 2004; TISSIER *et al.*, 2014). Na via metabólica, a fenilalanina forma o ácido cinâmico, e este dá origem ao 4-Coumaril CoA

responsável pela síntese dos fenóis simples, lignina, flavonóides, taninos e outros compostos fenólicos (Figura 2). A enzima Fenilalanina amonialiase (PAL) é a mais importante neste processo (PERES, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004; TISSIER *et al.*, 2014). Os compostos fenólicos estão presentes nas plantas na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas e incluem desde moléculas simples até estruturas complexas com alto grau de polimerização (LAGE, 2009). Alguns compostos fenólicos são originados diretamente do ácido cinâmico ou do ácido benzoico e são chamados respectivamente de ácidos hidroxinâmicos e ácidos hidroxibenzoicos (SILVA *et al.*, 2013) Exemplos de ácidos hidroxicinâmicos são os ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico e sinápico e os exemplos de ácidos hidroxibenzoicos são o ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e sirínico (SILVA *et al.*, 2013).

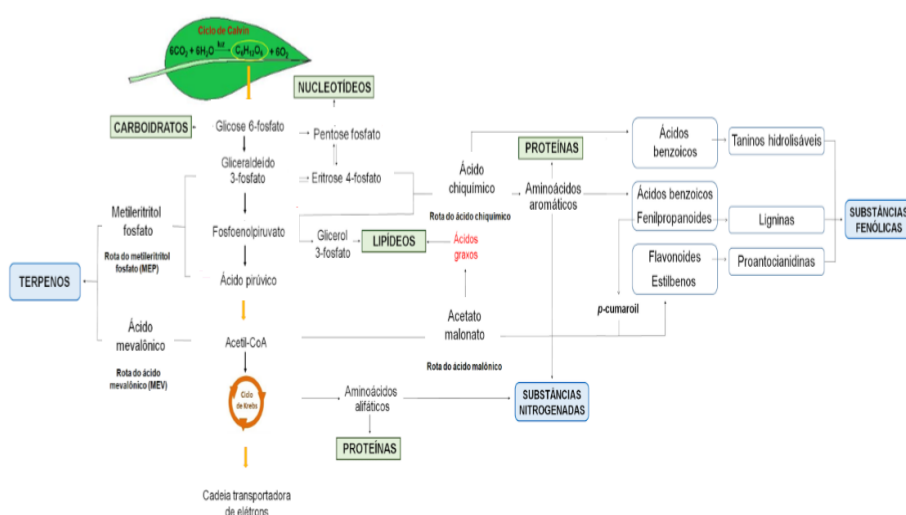


Figura 2. A rota do ácido chiquímico é a principal rota para a síntese dos compostos fenólicos

2.4.2 A classe dos compostos nitrogenados

Os alcaloides compreendem um grupo de compostos secundários de planta com mais de 21000 estruturas já elucidadas. A natureza básica destes compostos compreende pela presença de pelo menos um átomo de nitrogênio em sua estrutura (Figura 3) derivado dos aminoácidos (PERES *et al.*, 2004; TISSIER *et al.*, 2014). Os compostos nitrogenados são produzidos utilizando como precursores os aminoácidos aromáticos produzidos pela via do ácido chiquímico ou os aminoácidos alifáticos produzidos pelo ciclo de Krebs (CARVALHO, 2016). A natureza dos aminoácidos determina a classe de alcalóides (TISSIER *et al.*, 2014). Algumas classes de alcalóides são: piperidina, piridina, tropano, pirrolizidina, indol, ipecacuanha e benzil-isoquinolina (TISSIER *et al.*, 2014). A classe piperidina compreende derivados do

aminoácido lisina, através da descarboxilação dos derivados da molécula cadaverina. O ácido nicotínico pode ser ligado ao anel piperidina formando os alcalóides de piridina (Figura 4). A piridina mais proeminente é a nicotina, onde o anel de piridina está ligado a um anel de pirrolidina (C4N), que é derivado do aminoácido glutamina via ornitina e, após descarboxilação, putrescina (TISSIER *et al.*, 2014). O anel de pirrolidina pode ser modificado com adição sequencial de unidades de C2 e formar os alcalóides de tropano (Figura 4).

A estrutura da classe dos tropanos pode ser condensada levando a moléculas como cocaína e atropina (Figura 4). Ornitina e putrescina alimentam a biossíntese da pirrolizidina. Terpenos fazem parte da estrutura dos alcalóides indol (Figura 5); estes terpenos são produtos da condensação da secologanina, um monoterpene glucósido e triptamina, que é gerado pela descarboxilação do triptofano (TISSIER *et al.*, 2014). A secologanina também pode ser resumida à dopamina, derivada da descarboxilação e hidroxilação da tirosina, levando à formação de ipecacuanhas. Derivados de tirosina também formam os blocos para a formação de benzi-lisoquinolina (TISSIER *et al.*, 2014).

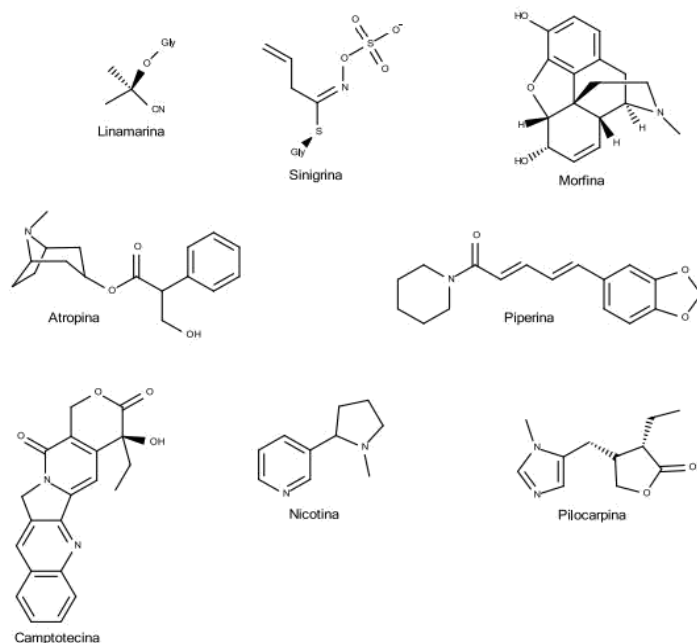


Figura 3. Exemplos de compostos nitrogenados

2.4.3 A classe dos Terpenos

Terpenoides pertencem a grande classe dos compostos isoprenóides que são feitos de unidades de isoprenos C5 (DUARTE *et al.*, 2017). Usualmente essa classe é formada por até 8 unidades de isoprenos e o número de unidades encontrado em uma molécula define a qual subgrupo este terpenóide pertence. Os termos terpenos e terpenóides são considerados geralmente equivalentes porém, terpenos são usualmente usados para se tratar de compostos olefinicos e terpenóides para produtos originados da oxidação dos terpenos (TISSIER *et al.*, 2014). Os hemiterpenóides contém uma única unidade de isopreno, já os monoterpenoides são produtos de duas unidades e frequentemente encontrados em óleos essenciais de aromas e temperos como limoneno, pineno e mentol. Sesquiterpenoides são formadas por três unidades de isopreno e também são encontrados nos óleos essenciais (TISSIER *et al.*, 2014; BENELLI *et al.*, 2016). Oxidados os sesquiterpenoides são menos voláteis e podem desempenhar papéis na defesa da planta, como as fitoalexinas (TISSIER *et al.*, 2014) e o capsidiol. O sesquiterpeno artemisinina oriundo da *Artemisia anna* é usado como ingrediente farmacêutico contra a malária. Diterpenoides são formados por 20 átomos de carbono oriundos de quatro unidades de isoprenos (CARVALHO, 2016); os hormônios vegetais conhecidos como ácidos giberélicos são diterpenos. Alguns ingredientes farmacêuticos usam diterpenos, como o taxol (TISSIER *et al.*, 2014) (Figura 6) encontrado em árvores do gênero *Taxus sp.*, que é prescrito para o tratamento de vários tipos de câncer.

Todos os terpenoides são derivados dos mesmos blocos de construção (CARVALHO, 2016). Estes são compostos de cinco carbonos isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalil pirofosfato (DMAPP) formados por unidades de isoprenos e fosfatos. A via mevalonato (MEV) pode fornecer precursores para a biossíntese de isoprenóides e terpenóides. A via MEV está localizada no citosol e começa a partir de acetil-CoA (Figura 6) (CARVALHO, 2016). A via MEV dará origem aos sesquiterpenos e triterpenos (TISSIER *et al.*, 2014). Estudos com algumas bactérias levou a descoberta de um caminho alternativo (TISSIER *et al.*, 2014). Na rota alternativa, no ciclo de Calvin, gliceraldeído-3-fosfato e piruvato são combinados com 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP), que é então reduzido a 2- C- Metileritritol 4-fosfato (MEP) (CARVALHO, 2016). O MEP é então conjugado com um nucleotídeo de citidina para produzir 4-(citidina-5'-difosfa)-2-Cimetil-D-eritritol (CDP-ME), que é fosforilado para 4-difosfocitil-2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (CDP-MEP). As próximas duas etapas são uma ciclização de CDP-MEP a 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (ME-cPP), e uma redução para 4-hidroxi-

3-metilbut-2-enil difosfato (HMBPP). Na última etapa, HMBPP é reduzido ainda mais para IPP, com menores quantidades de DMAPP (Figura 6). A isomerização de IPP e DMAPP é controlada pelo IPP isomerase (TISSIER *et al.*, 2014). A partir deste ponto estruturas maiores são formadas com o esqueleto de IPP e DMAPP (GPP, FPP e GGPP) (Figura 6) e darão origem a monoterpenos, diterpenos e triterpenos (TISSIER *et al.*, 2014). Este caminho é chamado de via MEP e ocorre nos cloroplastos (CARVALHO, 2016) (Figura 6). Carotenóides, saponinas e compostos esteroidais também pertencem à classe dos terpenos (TISSIER *et al.*, 2014; CARVALHO, 2016; DUARTE *et al.*, 2017).

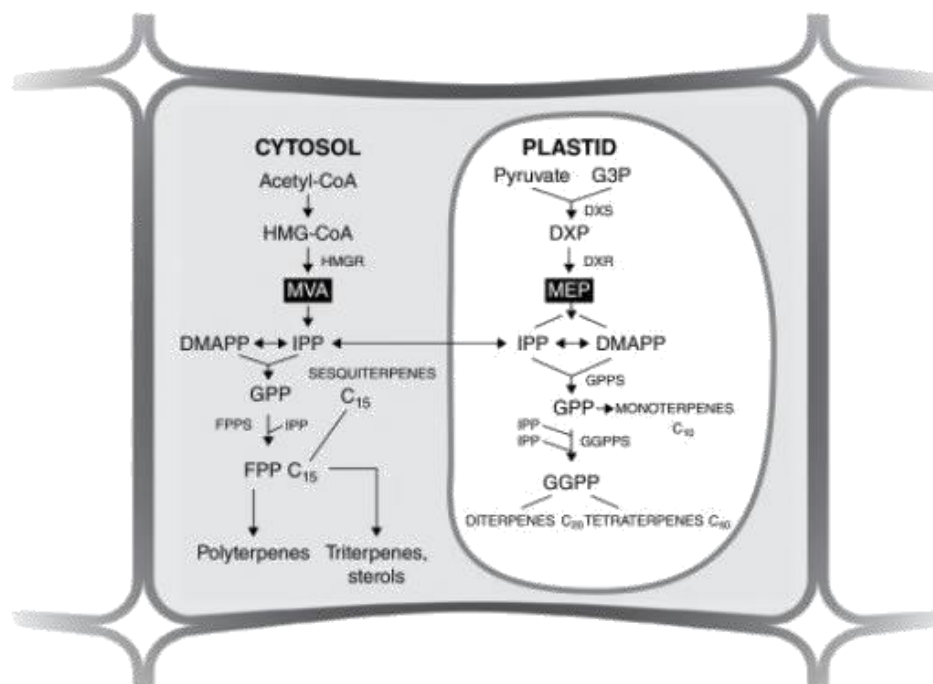


Figura 6. Principais vias para a síntese dos terpenos

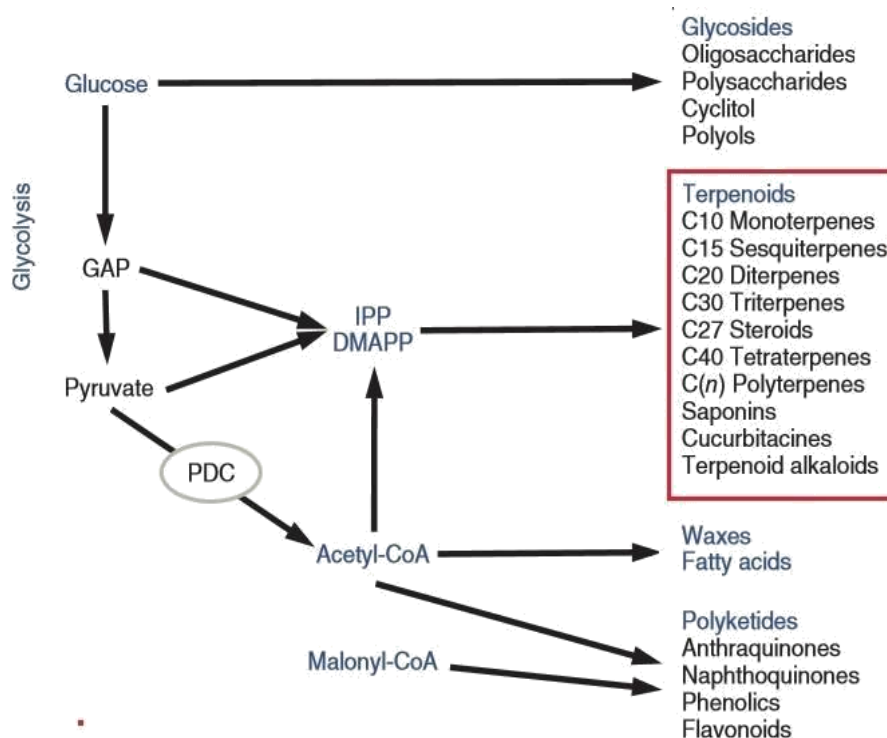


Figura 7. Classes de terpenos oriundos dos intermediários isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalil pirofosfato (DMAPP).

2.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O isolamento de compostos naturais a partir de plantas se inicia pela escolha da espécie vegetal, por meio de quatro abordagens distintas: randômica, quimiotaxonômica, etnodirigida e etológica (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006). A abordagem etnodirigida, por exemplo, é um dos caminhos mais utilizados devido ao tempo e o baixo custo envolvidos na coleta dessas informações, e consiste na seleção de espécies de acordo com a indicação de grupos populacionais específicos em determinados contextos de uso sendo um método que se beneficia diretamente da etnobotânica e da etnofarmacologia (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006). A abordagem randômica, consiste em coletar aleatoriamente plantas para rastreo fitoquímico e farmacológico (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014). Essas abordagens auxiliam a bioprospecção, que tem como definição de um modo geral, a busca por produtos naturais oriundos de microrganismos, plantas e animais que sejam úteis para a humanidade (ASTOLFI-FILHO, 2014). No entanto, ainda não há um consenso na determinação da melhor abordagem. Alguns estudos, por exemplo, compararam a abordagem etnodirigida com a randômica e em vários casos, os resultados da investigação etnodirigida são melhores comparados com a pesquisa

aleatória de plantas para fins terapêuticos específicos, como antibacteriano, mas de modo geral não há consenso quanto à eficiência desta abordagem para seleção de plantas promissoras. Por exemplo, a abordagem randômica vem fazendo boas contribuições na busca de novas drogas anticancerígenas realizadas pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014).

Depois da escolha do tecido vegetal o material é triturado e geralmente segue para a preparação de extratos brutos, como por exemplo, hidroalcoólico (ARAUJO *et al.*, 2014). Este extrato é semelhante às tinturas realizadas na cultura popular onde se misturam as partes ativas das plantas com bebidas alcoólicas (MS, 2012) e nesta fase a atividade biológica de interesse é testada. Caso a atividade se confirme o extrato é submetido a uma extração de polaridade crescente (Figura 8) para a obtenção de extratos fracionados onde são novamente levados para ensaios biológicos (CAMPOS *et al.*, 2014). O material vegetal pode seguir direto para a extração fracionada, como por exemplo, o aparato Soxhlet ou por métodos modernos como a extração acelerada por solvente (BARROS *et al.*, 2013). O CO₂ supercrítico (MOURA *et al.*, 2016) pode ser usado diretamente visando a obtenção de extratos apolares. Em seguida o extrato fracionado de interesse é submetido a um método cromatográfico clássico, como a cromatografia líquida em coluna (CC) ou cromatografia flash e as frações são agrupadas por cromatografia de camada delgada (CCD) e biologicamente testadas (CAMPOS *et al.*, 2014). Após a determinação da fração de interesse segue novamente para CC ou cromatógrafo flash (PATSAVAS *et al.*, 2013) até a aquisição do composto puro (figura 9). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem um papel importante para o acompanhamento de todas as etapas, como exemplo, o rastreamento de espectros UV dos picos cromatográficos de interesse. Após a cromatografia flash, CC ou outro método cromatográfico para obtenção das frações, as amostras podem ser submetidas a CLAE preparativo visando o isolamento com maior reprodutibilidade (CHEN *et al.*, 2014). Uma vez em que os compostos ativos estão isolados, o uso de técnicas espectrais como UV, IV e RMN tem permitido propor com segurança a estrutura molecular de produtos naturais (CECHINEL-FILHO, YUNES, 1997).

Quanto à escolha da atividade biológica a ser testada, devem ser levados em consideração a simplicidade, rapidez e a reprodutibilidade dos ensaios devido ao grande número de amostras a serem analisadas. Ensaios que requerem grandes quantidades de amostra devem ser evitados em trabalhos iniciais que visam a busca de componentes ativos, principalmente quando as frações ou os compostos alvos ainda não foram definidos. A fase de cromatografia costuma ser bastante laboriosa e reunir frações na escala de gramas é um grande desafio.

Dessa forma, os métodos *in vitro* como ensaios antimicrobianos e antioxidante são os mais indicados para trabalhos que visam definir frações ou compostos ativos (CECHINEL-FILHO, YUNES, 1997).

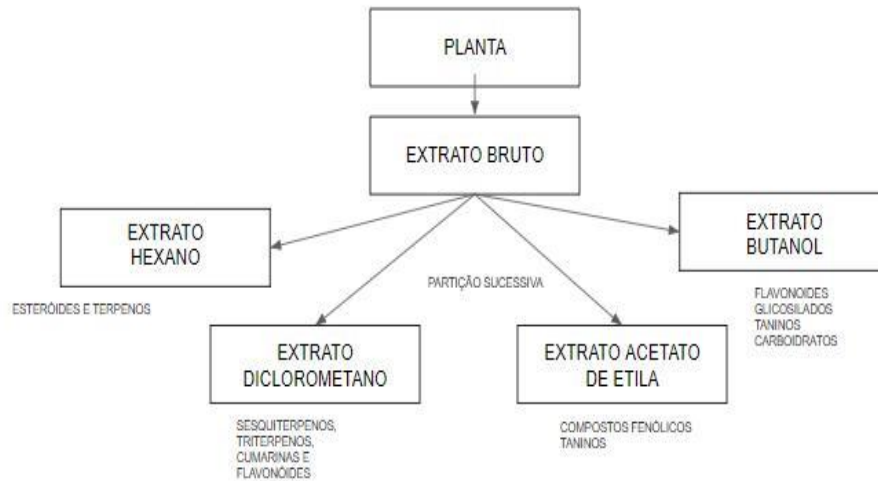


Figura 8. O método mais usado consiste na preparação de um extrato bruto, geralmente hidroalcoólico, seguido de partição líquido-líquido.

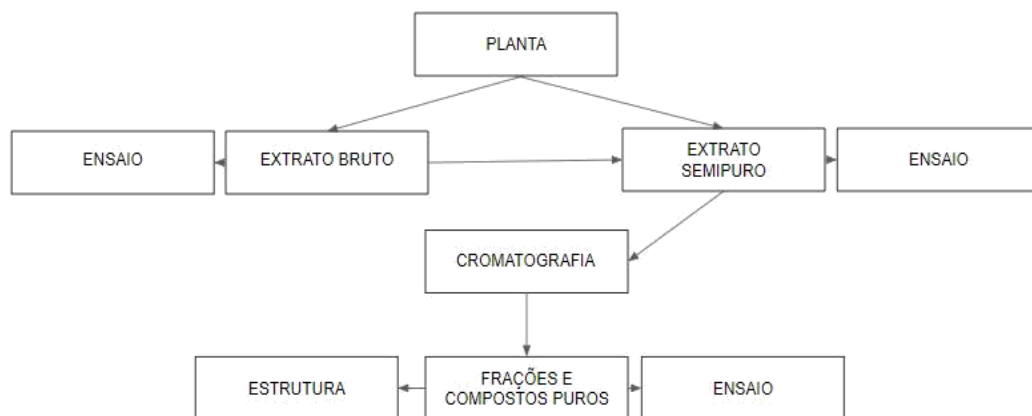


Figura 9. Procedimento bioguiado para isolamento e identificação de compostos ativos

2.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A BACTÉRIAS DE INTERESSE PARA A SAÚDE HUMANA

Os agentes antimicrobianos ou antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de bactérias ou fungos (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Os antibióticos extraídos da natureza e seus derivados semi-sintéticos compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico e podem ser classificados em β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas etc). Os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (GUIMARÃES *et al.*, 2010; BALOUIRI *et al.*, 2016).

Dentre as classes citadas, os β -lactâmicos se destacam por ser uma das classes de antibióticos mais vendidas, e são agentes que inibem irreversivelmente a enzima transpeptidase, que catalisa a reação de transpeptidação entre as cadeias de peptideoglicano da parede celular bacteriana. A atividade desta enzima leva à formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas da estrutura do peptideoglicano, que confere à parede celular uma estrutura rígida importante para a proteção da célula bacteriana contra as variações osmóticas do meio. Esse grupo constitui a primeira classe de derivados de produtos naturais utilizados no tratamento terapêutico de infecções bacterianas (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

A descoberta e uso destes agentes foram intensificados a partir da década de 1940 para o tratamento de doenças infecciosas e caracterizou a “era de ouro”, onde quase todos os grupos de antibióticos importantes foram descobertos. Contudo, desde o fim do século XX poucos novos antibióticos foram lançados no mercado, ao mesmo tempo em que ocorreu um aumento na incidência de resistência bacteriana (GUIMARÃES *et al.*, 2010; CARVALHO, 2016; BALOUIRI *et al.*, 2016).

2.7 ATIVIDADE ANTI-FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS DE INTERESSE DA SAÚDE HUMANA

O aumento do uso de biomateriais implantados vem elevando a expectativa de vida das pessoas, no entanto, foi evidenciado problemas de infecções associadas a biomateriais, passando a ser reconhecido como um dos maiores problemas hospitalares. Este problema está intrinsecamente relacionado com a capacidade que algumas espécies de bactérias possuem de aderir a materiais e formar biofilmes bacterianos (BUSSCHER *et al.*, 2012). Estudos revelam

que a maioria das bactérias não crescem como células individuais, mas em comunidades estruturadas como organismos pseudomulticelulares ou biofilmes (TRENTIN *et al.*, 2013). A adesão bacteriana em superfícies abióticas ou bióticas é o primeiro estágio da formação de biofilmes (Figura 10) e ocorre através de células em estado planctônico. Após a adesão ocorre o aumento de moléculas sinalizadoras autoindutoras, produzidas pelas bactérias, que induzem a produção de matriz exopolissacarídica (EPS) e a formação de biofilme. Este processo de comunicação é chamado de *Quorum sensing* (QS) (RUTHERFORD; BASSLER, 2012). Posteriormente os micro-organismos consolidam o biofilme, através da produção de EPS, com capacidade de ligar uma célula bacteriana a outra, formando agregados firmemente ligados à superfície (STOODLEY *et al.*, 2002; TRENTIN *et al.*, 2013). As estratégias de combate são: inibição da formação de biofilme via bloqueio da adesão bacteriana à superfície, rompimento de comunicação celular bacteriana e erradicação e tratamento de biofilmes já formados (TRENTIN *et al.*, 2013).

Considerando os produtos naturais, extratos aquosos oriundos da Caatinga inibiram a formação de biofilme em testes *in vitro* (TRENTIN *et al.*, 2011). O composto ácido p-hidroxi-mercuribenzóico isolado da espécie *Coccullus trilobus*, é um inibidor de sortases, uma enzima responsável pela catalisação de estruturas proteicas de ancoragem bacteriana, chamado de pili (CHEM;WHEN, 2012).

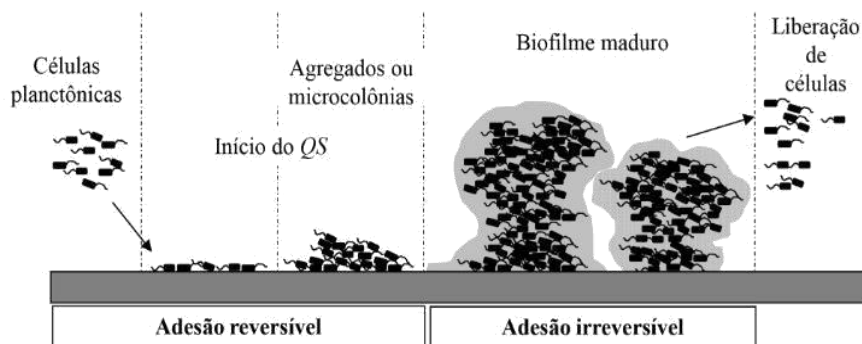


Figura 10. Estágios de desenvolvimento do biofilme bacteriano

2.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E A SAÚDE HUMANA

O oxigênio molecular (O_2) permite que os seres humanos assim como outros organismos aeróbios, o utilizem como aceptor de elétron terminal durante a respiração celular, que proporciona um rendimento de energia superior ao da respiração anaeróbica. Porém, o O_2 leva à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em eventos metabólicos que ocorrem nas mitocôndrias em animais e nos cloroplastos e peroxissomos em vegetais (BHATTACHARJEE, 2010; KARUPPANAPANDIAN *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2014).

A espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), além de outras espécies reativas, são parte de um processo natural do metabolismo humano e vegetal e apresentam importante função biológica, como na fagocitose, durante a eliminação de agente agressor, apoptose e na sinalização celular. No entanto, quando sua produção é exacerbada, o organismo aciona um sistema antioxidante para controlar e estabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante (VASCONCELOS *et al.*, 2007; CARVALHO, 2016). O predomínio dos oxidantes em humanos, causa um aumento no estresse oxidativo, e pode resultar em diversas doenças degenerativas. Fatores exógenos podem aumentar a produção de EROs, tais como os xenobióticos, radiações ionizantes, metais pesados, tabagismo e ingestão de álcool (CARVALHO, 2016).

Entre as espécies reativas, os mais comuns são o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($OH\cdot$), o hidroperóxido (LOOH), óxido nítrico (NO) e o dióxido de nitrogênio (NO_2), sendo a hidroxila o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares (VASCONCELOS *et al.*, 2007; CARVALHO, 2016). O radical hidroxila, uma vez formado, reage com uma série de endobióticos causando modificações no DNA, danos nas proteínas, inativação enzimática e peroxidação lipídica (VASCONCELOS *et al.*, 2007). O corpo humano dispõe de antioxidantes naturais como vitaminas A, C e E e de enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx). No entanto para auxiliar no combate ao estresse oxidativo os animais podem encontrar nos alimentos fontes de nutrientes antioxidantes. Alimentos como frutas são ricos em compostos fitoquímicos antioxidantes como carotenoides e compostos fenólicos. Evidências apontam que o consumo de vegetais ricos em tais compostos reduzem a morbidade por algumas doenças crônicas não transmissíveis (SUCUPIRA *et al.*, 2012). Neste sentido, é grande o interesse pela investigação de antioxidantes provenientes de fontes naturais (MERLIN *et al.*, 2017) seja para alimentar a indústria cosmética ou para auxiliar no aumento do tempo de prateleira de alimentos.

3 MÉTODO

3.1 LOCAL DE ESTUDO

O material vegetal foi coletado no Parque Nacional do Vale do Catimbau, localizado no município de Buíque, no estado de Pernambuco e foi encaminhado para os laboratórios do grupo de pesquisa. Os ensaios *in vitro* foram realizados no departamento de bioquímica, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e as aplicações analíticas foram realizadas no departamento de farmácia, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), na central analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), no Instituto Nacional do Semiárido (INSA) e na central analítica de fármacos da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF).

3.2 TIPO DE ESTUDO E EXPERIMENTOS

De acordo com os conceitos descritos em Fontelles *et al.*, 2009, a pesquisa desenvolvida neste trabalho usou mecanismos de uma pesquisa laboratorial, com natureza experimental e teve a finalidade de contribuir para a pesquisa básica ou fundamental. Os experimentos estão especificados no artigo publicado ou submetidos pelo autor e se encontram nos tópicos subsequentes.

4 RESULTADOS

4.1 PURIFICAÇÃO BIOGUIADA DE COMPOSTOS ATIVOS DE FOLHAS DE *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul.

Artigo submetido à revista *Frontiers in Microbiology*

Purificação Bioguiada de compostos ativos de folhas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul

Daniel Rodrigo Cavalcante de Araújo^{1,2}; Túlio Diego da Silva^{3,2}; Wolfgang Harand²; Claudia Sampaio de Andrade Lima⁴; João Paulo Ferreira Neto⁴; Bárbara de Azevedo Ramos^{1,2}; Tamires Alves Rocha^{1,2}; Harley da Silva Alves⁶; Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida^{5,2}; Fernanda Granja S. Oliveira^{5,2}; Ana Paula de Oliveira^{5,2}; Márcia Vanusa da Silva²; Maria Tereza dos Santos Correia²

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

² Núcleo de Bioprospecção da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido (INSA)

³ Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE)

⁴ Laboratório de Biofísica Química, Departamento de Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

⁵ Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos (CAFMA), Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

⁶ Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

RESUMO

Anadenanthera colubrina var. *cebil* (Griseb.) Altschul é uma espécie conhecida como Angico e é encontrada em todo o semiárido brasileiro. Ela é procurada pelo povo local tanto para a exploração madeireira quanto para fins terapêuticos, sendo conhecido por tratar doenças respiratórias através do uso de tinturas. Com base neste relato a planta foi selecionada para estudos visando identificar e isolar substâncias ativas presentes nas folhas, para isso foram usados técnicas avançadas de extração e cromatográficas para a realização de uma purificação bioguiada. Na fase de extração, o extrato mais promissor foi o AcOEt com concentração inibitória mínima (CIM) de 312 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 e >500 µg/mL contra *S. aureus* UFPEDA 705. Este extrato foi encaminhado para cromatografia flash, que resultou em cinco frações denominados de F1, F2, F3, F4 e F5. Sendo as frações F2 e F4 as mais promissoras com CIM de 19 µg/mL para *S. aureus* UFPEDA 02 e UFPEDA 705. O ensaio de sequestro de DPPH realizado com as frações indicou a fração F4 como a mais ativa com IC₅₀ de 133±9 µg/mL. As frações mais ativas foram encaminhadas para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e foi constatado por intermédio de um CLAE preparativa e por ressonância magnética nuclear (RMN) que a fração F2 apresenta o ácido p-hidroxibenzóico como majoritário e que a fração F4 apresenta como majoritário o flavonoide hiperosídeo. Testes com estes compostos isolados evidenciaram que outros compostos atuam em sinergismo na ação antimicrobiana e antioxidante, visto que hiperosídeo e o ácido p-hidroxibenzóico testados isoladamente apresentaram CIM de 250 µg/mL e 500 µg/mL frente a *S.aureus* UFPEDA 02 respectivamente. No entanto o composto hiperosídeo, que por sua vez é relatado pela primeira

vez em folhas de *A. colubrina*, se mostrou com CIM de 62 µg/mL contra *S. aureus* UFPEDA 705. O presente trabalho evidencia os principais componentes majoritários que podem ser encontrados em extratos hidroalcoólicos e AcOEt de folhas de *A.colubrina* e dá suporte a pesquisa básica em bioprospecção de compostos ativos.

Introdução

A Organização Mundial de Saúde (OMS) em seu documento, *Estratégias sobre a medicina tradicional* promove o fortalecimento da garantia de qualidade, segurança e uso adequado de plantas medicinais, regulando seus produtos, práticas e profissionais (OMS, 2014). A falta destas garantias colabora com a falta de confiança dos profissionais médicos em receitar para seus pacientes o uso de plantas medicinais, que podem conter ou não o princípio ativo em quantidade adequada, por várias razões, seja devido à época do ano em que o material foi coletado ou devido à ausência de nutrientes no solo (Moreira *et al.*, 2014), outras questões também preocupantes quanto a segurança se referem a contaminação do solo por agentes químicos ou microbiológicos. O procedimento para trazer segurança para as plantas medicinais é um processo longo e se inicia com a elaboração de extratos visando a caracterização química da parte da planta estudada e definição de marcadores químicos.

Neste sentido, apesar da população utilizar chás ou tinturas com intenção de cura, a obtenção de compostos purificados para uma identificação com alta precisão ainda é necessária para caracterizar a composição de fitoterápicos ou de outros produtos à base de plantas medicinais. Para isso, são necessários o uso de solventes orgânicos em técnicas extrativas e cromatográficas que podem ser acompanhadas de ensaios químicos ou biológicos visando direcionar o isolamento para os compostos ativos (Cechinel-Filho; Yunes, 1997, Campos *et al.*, 2014)

Dentre as espécies encontradas no Brasil, *Anadenanthera colubrina* var *cebil* (Griseb.) Altschul tem sido explorada pelo meio científico para rastreio de compostos ativos (Da Silva *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2014; Araújo *et al.*, 2015). *A. colubrina* var *cebil* pertence a família Fabaceae e ocorre na Bolívia, Equador, Brasil e Argentina (Lewis *et al.*, 2005). As partes aéreas de *A. colubrina* var *cebil* são usadas para tratar inflamações em geral (Albuquerque *et al.*, 2007) e é conhecida por “angico” (Queiroz, 2009; Weber *et al.*, 2011). Sendo assim o presente trabalho visa contribuir com estudos futuros para obtenção de marcadores químicos para espécie e bioprospecção, e por esse motivo tem o objetivo de rastrear e isolar a partir de partes aéreas de *A. colubrina* var *cebil* os compostos com atividade antimicrobiana e antioxidante por abordagem bioguiada.

Materiais e Métodos

Coleta do Material Vegetal e preparação dos extratos

Material vegetal

As partes aéreas de um indivíduo de *A.colubrina* var *cebil* foi coletada próximo a “pedra do cachorro” em março de 2015 no *Parque Nacional do Vale do Catimbau*, Buíque, Pernambuco – Brasil com coordenada aproximada de: 08°34’240’’ de latitude e 37°14’820’’ de longitude. Os autores confirmam que a autoridade designada *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMbio) concedeu permissão através do *Sistema de autorização e informação em biodiversidade* (SISBIO) com código de autenticação nº86962334.

Identificação da espécie Anadenanthera colubrina var cebil

Uma exsicata foi preparada e o espécime incorporado ao herbário Dárdano de Andrade Lima, do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA-PE) onde foi identificado e gerado um protocolo voucher IPA nº80351

Preparação dos extratos vegetais

As partes aéreas foram secas em estufa a 45°C (Marconi MA 035/5l) por 3 dias e em seguida foram trituradas em liquidificador industrial (Skymssen Inox LB-25MB) até a obtenção de um pó, que foi peneirado (Mesh 35 e 14) e lavado para o extrator acelerado por solvente (ASE 350 Thermo Scientific). No extrator, seis celas de extração contendo 20g do pó vegetal foram submetidos a extrações seguindo série eluotrópica (hexano, acetato de etila e metanol). Cada solvente extraiu por um tempo total de 45min, com fluxo de 5mL/min a 40°C sob pressão de $\pm$ 1500 psi. Desta forma foram obtidos os extratos hexano (ASE-Hex) com 2,9% de rendimento, acetato de etila (ASE-AcOEt) com 4,5% e metanol ASE-MeOH) com 22,5%. O extrato previamente filtrado em ASE 350 foi concentrado em Rocket Evaporator (Thermo Scientific) a 40°C.

Análise fitoquímica e purificação

Cromatografia flash

O extrato ASE-AcOEt seguiu para o fracionamento em cromatografia flash (Biotage Isolera one). A separação ocorreu na coluna SNAP KP-SIL 50g através de um gradiente de fase móvel tolueno :acetato de etila (PhME:AcOEt, 20:70) com 1 volume de coluna (1CV)

seguido para AcOEt 100% (6CV) e em seguida para AcOEt:MeOH 70:20 (6CV) com fluxo de 70mL/min e detecção em varredura de 200-800 nm. As frações foram agrupadas pelo software que sugerem as frações de acordo com o espectro de absorção UV, sendo assim foram agrupadas cinco frações: F1, F2, F3, F4 E F5.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

O extratos, frações e compostos isolados foram analisados por CLAE (1260 infinity LC System-DAD. Software Agilent OpenLAB CDS EZChrom Edition, versão 04.05 da Agilent Technologies). As amostras foram preparadas visando obter ao final uma concentração de 5mg/mL e posteriormente foram sonicadas até completa solubilização, sendo filtradas com filtros 0,22 µm PTFE e em seguida analisadas por CLAE. A separação dos compostos ocorreu por intermédio da coluna: Zorbax, SB-C18, 5µm e 4,6 x 250mm com pré-coluna Zorbax SB-C18 5µm e 4,6 x 12,5mm. Os solventes usados foram: água Mili-Q com 0,3% de ácido acético (A) e Acetonitrila (B) (LiChrosolv, Merck) seguindo um gradiente linear de 92% - 65% (A) 0 - 15 min; voltando as condições iniciais 65%-92% (A) em seguida a 30°C, fluxo de 2,4 mL/min, pressão inicial de 210 bar e detecção em varredura de 190-400 nm. Este método foi alcançado após um método exploratório de 60 minutos e fluxo de 1mL/min, e foi tido como satisfatório para análise do conteúdo das amostras e dos padrões: ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, catequina, ácido ferúlico, luteolina, isoquercetrina, ácido clorogênico, quercetina, rutina, ácido elágico e geraniina.

Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa acoplado a espectrometria de massas (CLAE-EM)

As frações F2 e F4 originadas do sistema de cromatografia flash foram analisadas por meio do CLAE preparativa (Sistema de autopurificação – Waters) com coletor de frações, detector UV 2489 e ACQUITY QDa. As frações foram dissolvidas em MeOH e filtradas com filtros 0,22 µm PTFE até se obter várias amostras com valor final de 15mg/mL. A separação e isolamento dos compostos ocorreram por intermédio da coluna preparativa XBridge Prep C18, de 5µm e 10x100mm por meio da seguinte fase móvel: água Mili-Q 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B) (LiChrosolv, Merck) com gradiente linear de 94%-65% (A) 0-9 min; voltando as condições iniciais em seguida, com temperatura ambiente, fluxo de 9ml/min e detecção em 256nm; apenas os constituintes principais e desconhecidos foram coletados.

Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLUE-EM)

O extrato ASE-AcOEt foi analisado em AQUITY H-Class em coluna BEH 2,1 x 100mm, 1,7µm. As fases móveis consistiram de solução aquosa contendo 2% de MeOH, 5mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico (A) e solução metanólica contendo 0,1% de ácido fórmico (B), que foram bombeadas em uma vazão de 0,3mL/min. Foi injetado 10µl da amostra e a eluição foi realizada em modo gradiente e a condição inicial 98% do eluente A foi mantido por 0,25 minutos. A proporção de B foi aumentando linearmente para 99% em 8,5 minutos, se mantendo em 99% por 1 minuto, voltando em seguida para as condições iniciais de análise. O forno de coluna foi mantido em 40°C. A aquisição dos dados foi feita no modo fullscan, buscando massas entre 100 e 1000 Da, em ionização negativa. A aquisição dos cromatogramas e espectros de massas foi feita através do software MassLynx.

Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os compostos isolados por CLAE-EM preparativa foram analisados por RMN. Os dados de RMN 1D (^1H e ^{13}C { ^1H }) e 2D (^1H - ^1H COZY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC) foram adquiridos a 296 K em DMSO- d_6 num sistema de RMN Bruker ASCEND III 400 a 9,4 T, observando ^1H e ^{13}C a 400 e 100 MHz, respectivamente. O espectrômetro de RMN foi equipado com uma sonda de detecção direta multinuclear de 5 mm (sonda BBO) com gradiente z. Os experimentos de correlação de RMN ^1H - ^{13}C de uma ligação (HSQC) e longo alcance (HMBC) foram otimizados para a constante de acoplamento média 1J (C, H) e LRJ (C, H) de 140 e 8 Hz, respectivamente. Todos os desvios químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (δ) são dados em ppm relativos ao sinal de TMS a 0,00 ppm como uma referência interna, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

Atividade Antimicrobiana

Microorganismo

O ensaio antimicrobiano foi realizado com as bactérias *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 e *Staphylococcus aureus* UFPEDA 705. Cedidos pelo Hospital das Clínicas (HC), Pernambuco, Brasil e fornecidos pela coleção de culturas UFPEDA do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada de acordo com os critérios adotados pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011). O extrato ASE-AcOEt, frações F1, F2, F3, F4, F5 e os compostos: hiperosídeo, ácido p-hidroxibenzóico e as proantocianidinas foram dissolvidos em água esterilizada com 10% de DMSO até que uma mistura homogênea de 5000µg/mL (solução estoque) fosse obtida. Em uma microplaca de 96 poços, todos os poços receberam 100 µl de caldo Muller-Hilton. A primeira coluna correspondeu ao controle de esterilidade, que continha apenas meio de cultura, na segunda coluna, 10% do inóculo padronizado foram adicionados ao meio (100% do controle de crescimento). Na terceira coluna foram colocados 100µl da solução mãe da amostra. Dessa coluna foram feitas diluições em série até a décima segunda coluna. Em cada linha, o inóculo padronizado (20µl) de uma das cepas testadas foi adicionado a todos os poços contendo o extrato. O inóculo bacteriano foi averiguado por espectrofotometria com leitura a 600 nm, DO entre 1,5 e 2,0 constatou-se a escala McFarland $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. As placas foram lidas em espectrofotômetro a 600 nm após a diluição seriada (T_{0h}) e após 24h (T_{24h}) de condicionamento em estufa a 37°C. Posteriormente foi calculado o % de inibição segundo Quave *et al.*, 2008 e considerado CIM a última concentração com inibição igual a 50%. Cálculo: $\% \text{ inibição} = \frac{DOT_{24h} - DOT_{0h}}{DO_{gc24h} - DO_{gc0h}} \times 100$.

Onde: DOT_{24h} = densidade óptica (600 nm) da placa de teste às 24 horas após a inoculação;

DOT_{0h} = densidade óptica (600 nm) da placa de teste logo após a inoculação;

DO_{gc24h} = densidade óptica (600 nm) dos poços de controle de crescimento bacteriano após 24 horas de inoculação;

DO_{gc0h} = densidade óptica (600 nm) dos poços de controle de crescimento bacteriano logo após a inoculação.

Atividade Antioxidante

Sequestro de radicais livres

Neste ensaio a atividade sequestradora de radical livre O extrato ASE-AcOEt, frações F1, F2, F3, F4, F5 e os compostos: hiperosídeo, ácido p-hidroxibenzóico e as proantocianidinas foram medidas em termos de doação de hidrogênio usando o radical 2,2-difenil 1-picrihidrazil (DPPH) (Blois, 1958). Foi misturado 0,25 mL da solução metanólica de DPPH (1 mM) em 0,04

mL de diferentes concentrações da amostra, que foram previamente dissolvidas em metanol (31,25; 62,5; 125; 500 e 1000 µg/mL). Após 25 minutos foi medida a absorbância em 517 nm. Ácido gálico foi usado como composto de referência e o controle foi a solução de DPPH adicionado a 0,04 mL de metanol. A eliminação de radicais de DPPH foi calculada pela fórmula: $SRL [DPPH] (\%) = [(Aa-Ac)/Ac] \times 100$. Onde Aa = absorbância da amostra; Ac = absorbância do controle e expresso em IC50.

Atividade antioxidante total (ATT)

Os compostos: hiperosídeo, ácido p-hidroxibenzóico e as proantocianidinas purificados foram dissolvidos para a concentração de 1mg/mL em metanol; e 0,1 mL de cada amostra foi misturado a 1mL da solução de fosfomolibdênio (600mM de ácido sulfúrico, 28mM de fosfato de sódio e 4mM de molibdato de amônio), e posteriormente incubados em água a 95°C por 90 minutos. Após voltarem a temperatura ambiente, as absorbâncias das amostras foram medidas a 695nm contra um branco (1 mL de solução e 0,1 mL de metanol) (Pietro *et al.*, 1999). A atividade antioxidante total foi expressa em relação ao ácido ascórbico, calculada pela fórmula: $ATT(\%) = [(Aa-Ac)/(Aaa-Ac)] \times 100$, onde Ac= absorbância do controle, Aa = absorbância da amostra e Aaa = absorbância do ácido ascórbico.

Redução do íon férrico (Método FRAP)

O ensaio de redução de íon férrico foi feito com os compostos: hiperosídeo, ácido p-hidroxibenzóico e proantocianidinas purificadas. O ensaio foi feito segundo Benzie, *et al.* (1996) com modificações. A solução estoque foi preparada com 300mM de tampão acetato (3,1 g CH₃COONa e 16 mL CH₃COOH) em pH 3,6 com 10mM de TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazine) solubilizado em 40mM de HCl e 20mM de FeCl₃. A solução de trabalho foi preparada na hora do ensaio no qual 25 mL do tampão acetato, 2,5 mL de TPTZ e 2,5mL de FeCl₃. Foram usadas 0,07 mL dos compostos purificados em uma concentração de 1mg/mL sendo misturadas com 0,2 mL do reagente FRAP e deixadas em repouso por 30 minutos a 37°C no escuro. Posteriormente as amostras foram lidas a 593 nm. Foi feito uma curva de padrão com FeSO₄ (0 - 1000µg/mL) ($y=0,0054x + 0,1465$ e $r^2 = 0,9847$). Os resultados são expressos em µg Fe(II)/mg e comparado com ácido gálico nas mesmas condições.

Análise estatística

Os dados de DPPH foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para comparações entre as médias utilizou-se o teste tukey através do software Past versão 2.17. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

Resultados

Análise fitoquímica e purificação de compostos ativos

A análise qualitativa por CLAE-DAD do extrato ASE-AcOEt por intermédio de padrões indicaram para a presença de quercetina e teores mais baixos de catequina, ácido p-cumárico e ácido gálico. A aquisição do cromatograma 3D com varredura de 190 a 400 nm (Figura 1) apontam para a presença de aproximadamente dez compostos com absorção superior a 200 mAU. Entre os compostos majoritários, especificamente entre os tempos de retenção (Rt) 4 e 6 minutos está o ácido p-hidroxibenzóico m/z 137 $[M+H]^-$ que foi purificado por CLAE preparativa e identificado por RMN (Figura 1), e entre os tempos de retenção de 8 e 10 minutos, temos dois sinais com espectros UV característico de derivados de quercetina, dentre eles o composto hiperosídeo m/z 487 $[M + Na]^+$ que também foi purificado e identificado como descrito anteriormente (Figura 1), este é o primeiro relato de purificação e identificação de hiperosídeo em partes aéreas de *A. colubrina*, este composto representa aproximadamente 15% de toda amostra. Nos intervalos de tempo de 10 e 12 minutos foi possível verificar duas proantocianidinas m/z 530 $[M]$ (Figura 1), esta sugestão está embasada em análises de espectrometria de massas.

O extrato ASE-AcOEt apresentou CIM de 312 $\mu\text{g/mL}$ frente a *S. aureus* UFPEDA 02 e $>500 \mu\text{g/mL}$ frente a cepa de *S. aureus* multirresistente UFPEDA 705 e no ensaio de DPPH o resultado foi de $\text{IC}_{50} 142 \pm 10 \mu\text{g/mL}$. O fracionamento por cromatografia flash do extrato ASE-AcOEt geraram 35 frações que foram agrupadas de acordo com o perfil de absorção UV em cinco grupos (F1, F2, F3, F4 e F5) (Figura 2) com rendimentos de 7, 16, 16, 43 e 7,6% respectivamente. As frações F2 e F4 se mostraram mais promissoras como antioxidantes no ensaio de DPPH (IC_{50} de 202 ± 6 e $133 \pm 9 \mu\text{g/mL}$ respectivamente) (Tabela 1) e como antimicrobianos (CIM de 19 $\mu\text{g/mL}$ para ambas amostras frente a *S. aureus* UFPEDA 02) (Tabela 1). Estas duas frações seguiram para o sistema CLAE preparativa.

Na fração F2 foi isolado com alta pureza o composto majoritário com máxima absorção em 255 nm, identificado por RMN como ácido p-hidroxibenzóico (**1**) (Figura 2). Nesta mesma fração também foram isolados dois compostos que parecerem se tratar de proantocianidinas (**2**

e **3**) (531.44 m/z ES⁺) (Figura 3). Na amostra F4 os compostos derivados de quercetina se mostraram em maior teor, sendo um deles identificado como hiperosídeo (**4**) (Figura 2). Por último, a amostra ASE-AcOEt foi novamente analisada, desta vez por CLUE-EM visando rastrear os compostos identificados para trazer mais confiabilidade aos achados (Figura 3 a 5).

No entanto quando os compostos ácido p-hidroxibenzóico (**1**), proantocianidinas (**2** e **3**) e hiperosídeo (**4**) isolados das frações mais ativas F2 e F4 foram testados isoladamente e os valores de CIM aumentaram para 500, 500, 62 e 250 $\mu\text{g/mL}$ frente a *S. aureus* UFPEDA 02 respectivamente.

Ressonância Magnética Nuclear – RMN

Ácido p-hidroxibenzóico – O composto (**1**) foi obtido como um sólido amorfo bege; UV (solvente) λ máx 255 nm; RMN de ¹H (MeOD-d₄, 400 MHz) δ H 7,87 (2H, d, J = 8,8 Hz, H-2 e H-6), 6,87 (2H, d, J = 8,8 Hz, H-3 e H-5); RMN ¹³C (MeOD-d₄, 100 MHz), δ C 170,56 (-COOH), 163,38 (C-4), 133,1 (C-2 e C-6), 123,2 (C-1), 116,1 (C-3 e C-5). O Composto (**1**), no espectro de RMN de ¹H foi observado, a presença de um par de dupletos com constante de acoplamento constante de 8,8 Hz (7,87 e 6,87) característicos dos anéis aromáticos 1-4 substituídos (Silva et al., 2009). O espectro de RMN ¹³C exibiu 5 sinais de carbono onde este perfil e os sinais de hidrogênio confirmaram a sugestão de um composto aromático 1-4 substituído. O sinal a 170,56 ppm foi atribuído ao carbono do grupo ácido carboxílico e o sinal a 163,3 ppm foi atribuído a um carbono aromático oxigenado (C-4). A posição dos grupos foi confirmada pela análise do espectro bidimensional em que a correlação homonuclear ¹H x ¹H COSY mostrou-nos uma única correlação entre os sinais 7,87 e 6,87. A correlação heteronuclear de ligações múltiplas ¹H x ¹³C HMBC mostrou as correlações entre o sinal em 7,87 (H-2 e H-6) e os sinais 170,56 (-COOH, J₃), 163,38 (C-4, J₃), 116,11 (C-3 e C-5, J₂) e ainda, correlações entre o sinal 6,87 (H-3 e H-5) e os sinais 163,38 (C-4, J₂) e 123,23 (C-1, J₃). A análise de dados e a comparação com a literatura permitiram identificar o composto como ácido p-hidroxibenzóico (CHO et al., 1998).

Quercetina 3-O- β -galactopiranosose ou Hiperosídeo – O composto (**4**) HMRS: RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): 3,29 (1H, H-5'), 3,34 (1H, H-4'), 3,36 e 3,45 (2H, H-6'), 3,60 (1H, H-2'), 3,66 (1H, H-3'), 5,36 (1H, H-1'), 6,21 (1H, H-8), H-6), 6,81 (1H, d, J = 8,8 Hz, H-5), 7,47 (1H, H-2'), 7,59 (1H, d, J = 8,8 Hz, H-6'), 12,64 (1H, OH-5). A estrutura da quercetina 3-O- β -galactopiranosose composta foi identificada através da análise de sinais-chave de dados espectroscópicos de RMN 1D e 2D e comparação com a literatura. O espectro

de RMN de ^1H mostrou um sinal em δH 12,64 característico de um grupo hidroxilo C-5 quelado em um flavonol estrutural e singletos a δH 6,21 e 6,43 típico do anel A meta-substituído. Observou-se dupletos distorcidos a δH 6,81 e 7,59 com acoplamento a 8,8 Hz e um singlete a δH 7,47 sugerindo a presença de derivado de quercetina. A unidade de açúcar mostrou o acoplamento entre sinais em δH 5,37 e 101,5 típico da estrutura de galactose e teve sua posição baseada em dados de literatura (Pereira et al., 2012).

Discussão

As partes aéreas de *A. colubrina* são objeto de estudo de alguns trabalhos que apontam para o potencial biotecnológico de plantas da Caatinga. Vários destes estudos utilizam também um sistema eluotrópico com hexano, acetato de etila e metanol, e eles servem para indicar o caminho das substâncias ativas, por exemplo, Silva-Bessa *et al* (2019) apontam para o potencial inseticida dos extratos acetato de etila e ciclohexano obtidas das folhas. Campos *et al* (2014) realizaram uma purificação bioguiada com ensaios antifúngicos e acabaram no extrato hexano como mais ativo tanto de folhas como de frutos e constataram atividade contra o fungo *Alternaria alternata*, eles atribuíram esta atividade a presença de três substâncias esteroidais, incluindo β -sitosterol e β -sitosteril linoleato. No entanto nossos estudos anteriores com foco em ensaios anti-*staphylococcus aureus* apontam para o extrato acetato de etila como sendo o mais ativo tanto em trabalhos com frutos como com folhas (Araujo *et al.*, 2014; Araújo *et al.*, 2017).

Neste sentido o presente estudo focou na purificação bioguiada do extrato acetato de etila (ASE-AcOEt) de folhas de *A. colubrina*, que em ensaios anti-*staphylococcus aureus* do extrato ASE-AcOEt variou entre CIM de 312 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa de *S. aureus* UFPEDA 02 e CIM de >500 $\mu\text{g/mL}$ frente a cepa de *S. aureus* UFPEDA 705 (Tabela 1), essa diferença pode estar relacionada ao fato de que a cepa menos sensível, chamada de UFPEDA 705 é um isolado clínico multirresistente. De acordo com Vieitez *et al* (2018) e Santos *et al* (2018) extratos de plantas podem ser classificadas, de acordo com o CIM, como forte inibidor de crescimento bacteriano ($\text{CIM}_{50} \leq 500$ $\mu\text{g/mL}$), inibidor moderado de crescimento bacteriano (CIM entre 600 e 1600 $\mu\text{g/mL}$) e fraco inibidor de crescimento bacteriano ($\text{CIM}_{50} > 1600$ $\mu\text{g/mL}$). Correlacionando essas informações com nossos resultados a atividade antimicrobiana do extrato ASE-AcOEt foi ativa, mas fraca para *S. aureus* multirresistente UFPEDA 705 e forte para a cepa padrão *S. aureus* UFPEDA 02. No entanto, as frações F2

e F4 apresentaram os valores de CIM de 19 µg/mL para *S. aureus* padrão, mas frente a *S. aureus* multirresistente os valores CIM permanecem em >500 µg/mL. Nossos dados evidenciam que a atividade antimicrobiana de folhas de *A. colubrina* estão relacionados às proantocianidinas (**2 e 3**), ácido p-hidroxibenzóico (**1**) e hiperosídeo (**4**), sendo proantocianidinas e ácido p-hidroxibenzóico componentes majoritários da fração F2 e hiperosídeo e outro derivado de quercetina majoritários em F4.(Figura 2) As frações em que estes compostos estão em quantidades menores é visualizada um aumento nos valores CIM (Tabela 1), por exemplo, na fração F5 em que não é possível visualizar o ácido p-hidroxibenzóico (**1**), hiperosídeo(**4**) e outro derivado de quercetina (Figura 2) o valor CIM sobe para >500 µg/mL frente a UFPEDA 02 e nenhuma atividade frente a UFPEDA 705 (a maior concentração não inibe o crescimento bacteriano $\geq 50\%$) (Tabela 1), o mesmo na fração F1 no qual apenas um composto fenólico desconhecido é majoritário, os valores CIM sobem para >500 µg/mL frente a UFPEDA 02 e 705.

Porém quando estes compostos são purificados e testados isoladamente temos também um aumento nos valores CIM, indicando que estes componentes agem para um melhor desempenho antimicrobiano em sinergia, por exemplo, o ácido p-hidroxibenzóico (**1**) testado isoladamente apresenta CIM de 500 µg/mL frente a UFPEDA 02 e >500 µg/mL contra *S. aureus* multirresistente (Tabela 1), já hiperosídeo (**4**) apesar de apresentar um valor CIM superior ao de sua fração de origem é o que apresenta os melhores resultados quando testados isoladamente com CIM de 250 µg/mL frente a UFPEDA 02 e CIM de 62 µg/mL frente a UFPEDA 705. Já no quesito ensaio antioxidante os compostos testados isoladamente foram mais ativos, os melhores dados foram para proantocianidinas (compostos **2 e 3**) com IC₅₀ de 124,8±7 e 178,4±5 µg/mL para o ensaio de DPPH respectivamente e atividade antioxidante total de 60±3,3% e 35±0,67% para os compostos **2 e 3** respectivamente.

Os ensaios antimicrobianos encontrados com o composto **1** estão de acordo com Cho *et al* (1996) que verificaram a CIM para o ácido p-hidroxibenzóico de 926 µg/mL frente a *S. aureus*. Já Mandal *et al* testaram p-hidroxibenzóico frente a *Staphylococcus epidermis* e encontraram CIM de 128 µg/mL. Estes dados evidenciam que o composto **1** é um forte inibidor para bactérias do gênero *Staphylococcus* e é uma das moléculas mais usadas no desenvolvimento de conservantes cosméticos e formulações farmacêuticas visando aumentar a vida útil do produto e impedir o desenvolvimento de microorganismos, sendo usado geralmente na forma de ésteres de p-hidroxibenzóico (Aulton *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2013). Quanto aos compostos **2, 3 e 4** nossos achados corroboram com Dall'Agnol *et al* (2003) que descreveram que os extratos metanólicos de *Hypericum* sp. apresentam atividade

antimicrobiana, principalmente frente a bactérias do gênero *Staphylococcus*, o potencial foi atribuído às classes dos taninos e hiperosídeo. Nossos dados divergem dos dados apresentados por Monte *et al* (2015) quanto à contribuição do composto hiperosídeo: em nosso caso este composto foi primordial para os menores valores CIM, como podemos ver na tabela 1, a fração F3 com hiperosídeo ausente apresenta um valor CIM superior (CIM de 78 µg/mL) em comparação com a fração F4 (CIM de 19 µg/mL) em que hiperosídeo é um componente majoritário.

Conclusão

A atividade antimicrobiana visualizada em extratos de folhas de *A. colubrina* é atribuída a ação sinérgica entre os compostos proanticianidinas, ácido p-hidroxibenzóico, hiperosídeo e quercetina.

Conflito de interesse

Os autores não declararam nenhum conflito de interesse

Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco (AMD-0141-2.00/2016) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- Albuquerque, U.P., Medeiros, P.M., Almeida, J.M., Lins-neto, E.M.F., Melo, J.G., Santos, J.P. (2007). Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach Journal of Ethnopharmacology .114, 325-354. doi:10.1016/j.jep.2007.08.017
- Araújo, D.R.C., Da Silva, L.C.N., Harand, W., Fernandes, J.M., Soares, T.C., Langassner, S.M.Z., Giordani, R.B., Ximenes, R.M., Silva, A.G., Silva, A.G; Silva, M.V., Correia, M.T.S.(2017). Effects of Rainfall on the Antimicrobial Activity and Secondary Metabolites Contents of Leaves and Fruits of *Anadenanthera colubrina* from Caatinga Area. Pharmacogn J.,9,4,435-440. DOI : 10.5530/pj.2017.4.73
- Araújo, D.R.C., Da Silva, L.C.N., Silva, A.G., Araújo, J.M., Macêdo, A.J., Correia, M.T.S., Siva M.V.(2014) Comparative analysis of anti-Staphylococcus aureus action of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul Afr. J. Microbiol. Res.2014, 8(28),2690-2696.DOI: 10.5897/AJMR2014.6901
- Araújo, T.A.S., Castro, V.T.N.A., Solon, L.G.S., Silva, G.A., Almeida, M.G., Costa, J.G.M., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P. (2015). Does rainfall affect the antioxidant capacity and production of phenolic compounds of an important medicinal species? / Industrial Crops and Products 76, 550–556. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.008>
- Behling, E.B., Antunes, L.M.G., Biachi, M.L.P. (2008). Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas.
- Cechinel-Filho, V., Yunes, R.A .(1997). Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre a modificação estrutural para otimização da atividade. Quím. Nova 21(1),99-105. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421998000100015>.
- Campos, V.A.C., Perina, F.J., Alves, E., Sartorelli, J., Moura, A.M., Oliveira, D.F. (2014) *Anadenanthera colubrina*(Vell.)Brenan produces steroidal substances that are active against *Alternaria alternata*(Fr.) Keissler and that may bind to oxysterol-binding proteins Pest Manag Sci. 70,1815-1822. DOI10.1002/ps.3722
- Cho, J.Y., Moon, J., Seong, K., Park, K.H. (1998). Antimicrobial Activity of 4-Hydroxybenzoic Acid and *trans* 4-Hydroxycinnamic Acid Isolated and Identified from Rice Hull. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62(11), 2273-2276.<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.62.2273>
- Carvalho, V. (2016). Espécies reativas de oxigênio. VI Botânica no Inverno 2016 / Org. Miguel Peña H. [et al.]. – São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica. 223p.
- Pereira, C., Barreto-Júnior, C.B., Kuster, R.M., Simas, N.K., Sakuragui, C.M. (2012). Flavonoids and a neolignan glucoside from *Guarea macrophylla* (MELIACEAE). Quimica Nova, 35 (6), 1123-1126, 2012.<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000600010>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2011). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement. CLSI.M100-S21.
- Da Silva, L.C.N., Miranda, R.C.M., Gomes, B; Macedo, A.J., Araújo, J.M., Figueiredo, R.C.B.Q., Silva, M.V., Dos Santos Correia, M.T.(2013). Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus* Journal Of Medicinal Plants Research .7:2358-2364, 201. DOI: 10.5897/JMPR2013.2597

- Da Silva, L.C.N., Junior, C.A.S., Souza, R.M., Macêdo, A.J., Silva, M.V., Correia, M.T.S. (2011). Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits Food Chem Toxicol. 49,2222-2228. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.019>
- Fernandes, J.P.S., Savino, G., Amarante, A.C.G., Sousa, M.R., Silva, G.R., Cianciulli, M.E., Correa, M.F.;Ferrarini, M.(2013).Study of the structure-activity relationships of parabens: a practical class Quim. Nova. 36(6), 890-893.<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000600026>
- Indriana, A., Lee, K.J., Kim, Y.S.(2016). Bioassay-Guided Isolation and Identification of Compounds from *Arecae* Pericarpium with Anti-inflammatory, Anti-oxidative, and Melanogenesis Inhibition Activities. 22(3), 193-200.
- Lewis, G., Shrire, B., Mackinder, B., Lock, M. (2005) Legumes of the World. Kew:Royal Botanic Gardens. 592p.
- Lima, R.F., Alves, E.P., Rosalen, P.L., Ruiz, A.L.T.G., Duarte, M.C.T., Goés, V.F.F., Medeiros, A.C.D., Pereira, J.V., Godoy, G.P., Costa, E.M.M.B. (2014). Antimicrobial and Antiproliferative Potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan J Evid Based Complementary Altern Med. 2014, 14,1-8.<http://dx.doi.org/10.1155/2014/802696>
- Mandal, S.M., Dias, R.O., Franco, O.L. (2017) Phenolic Compounds in Antimicrobial Therapy J Med Food 00 (0), 1–8 DOI: 10.1089/jmf.2017.0017
- Gordon, N.C., Wareham, D.W. (2010). Antimicrobial activity of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*.36, 129-131. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2010.03.025
- Sousa-Moreira, T., Salgado, H.R.N., Pietro, R.C.R.L. (2010) Brazil in the context of plants and derivatives quality control. Rev. Bras. Farmacogn. 20(30), 435-440. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000300023>
- Quave, C.L., Plano, R.L.W., Pantuso, T., Bennett, B.C.(2008) Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* J Ethnopharmacol 118(3), 418-428.doi:10.1016/j.jep.2008.05.005.
- Queiroz LP . Legumes of the Caatinga.Royal Botanic Garden Edinburgh,2009.443..
- Silva, T.M.S., Carvalho, M.G., Braz-Filho, R.B.(2009) Estudo espectroscópico em elucidación estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee E S. paludosum Moric. Quim.Nova. 32, 1119-1128.<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000500008>.
- Weber, C.R., Soares, C.M.L., Lopes, A.B.D., Silva, T.S., Nascimento, M.S., Ximenes, E.C.P.A.(2011) *Anadenanthera colubrina*: um estudo do potencial terapêutico. Artigo Revista brasileira de farmácia. 2011,92(4): 235-244.
- WHO traditional medicine strategy: 2014-2023.
- Dall'Agnol, R., Ferraz, A., Bernardi, A.P., Albring, D., Nör, C., Sarmiento, L., Lamb, L., Hass, M., von Poser, G., Schapoval, E.E.S., Antimicrobial activity of some *Hypericum* species Phytomedicine 2003, 10: 511–516.
- Li, S., Zhang, Z., Cain, B., Wang, B., Long, M., Taylor, J. Antifungal Activity of Camptothecin, Trifolin, and Hyperoside Isolated from *Camptotheca acuminata*. Journal Agricultural Food Chemistry. 2005,53,32–37.

Monte, D.D., Martino, L.D., Marandino, A., Fratianni, F., Nazzaro, F., Feo, V.D. Phenolic content, antimicrobial and antioxidant activities of *Hypericum perforatum* L. *Industrial Crops and Products*. 2015, 74, 342-347.

Olech, M., Nowak R., Nowacka, N., Pecio, L., Oleszek, W., Los, R., Malm A., Rzymowska, J. Evaluation of rose roots, a post-harvest plantation residue as a source of phytochemicals with radical scavenging, cytotoxic, and antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*. 2015, 69, 129-136.

Piao, M.J., Kang, K.A., Zhang, R., Ko, D.O., Wang, Z.H., You, H.J., Kim, H.S., Kim, J.S., Kang, S.S., Hyun, J.H. Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via antioxidant effect. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008, 1718, 1448-1457.

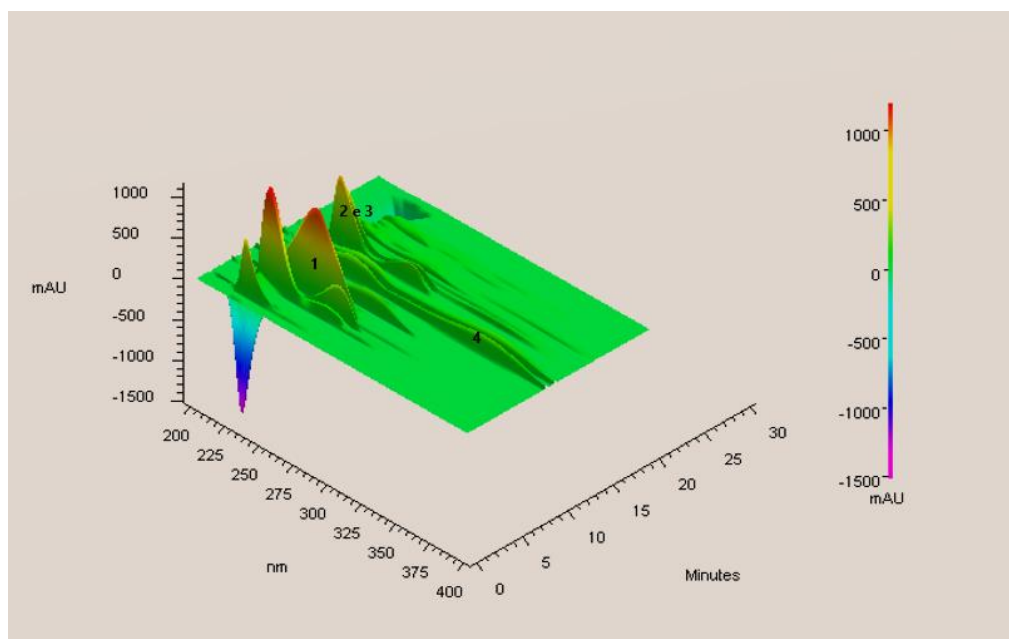


Figura 1. Cromatograma 3D de uma análise exploratória do extrato ASE-AcOEt. Na imagem podemos ver aproximadamente 10 compostos majoritários. Composto 1: ácido p-hidroxibenzoico; compost 2 e 3: proantocianidinas; compost 4: hiperosídeo.

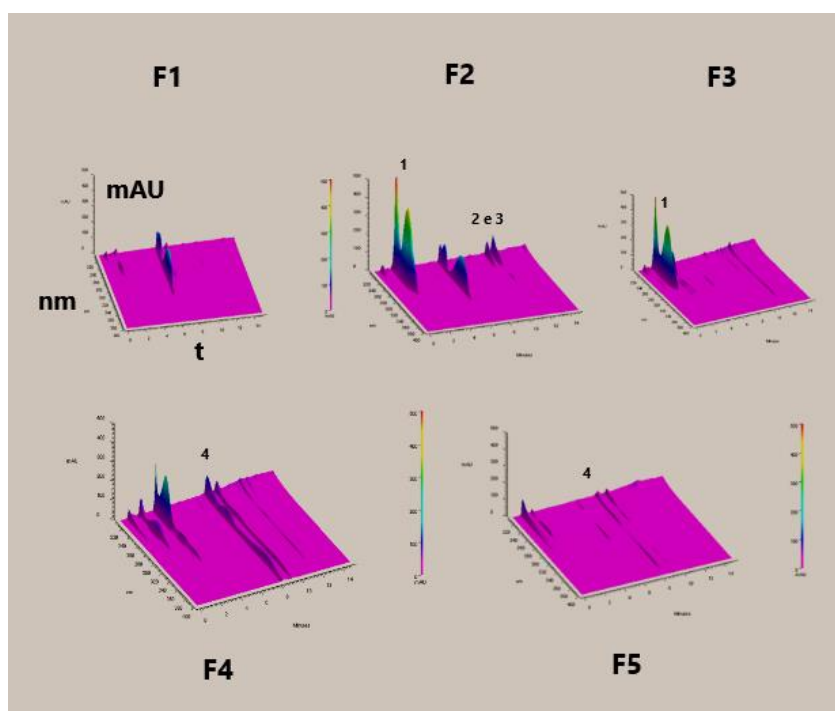


Figura 2. Cromatograma 3D das frações F1, F2, F3, F4 e F5. O cromatograma 3D permite visualizar os compostos por meio dos seus respectivos espectros UV (1: ácido p-hidroxibenzoico, 2 e 3: proantocianidinas e 4: hiperosídeo), seu posicionamento no cromatograma em relação ao tempo em uma escala de 190 a 400 nm. mAU: Intensidade do sinal, nm: comprimento de onda e t: tempo.

Tabela 1. . Ensaio antimicrobiano e antioxidante do extrato, frações e compostos isolados de *Anadenanthera colubrina* var *cebil*.

Amostras	Atividade		Atividade Antioxidante		
	Antimicrobiana		DPPH	ATT	FRAP
	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>			
	UFPEDA	UFPEDA			
	02	705			
	CIM ₅₀	CIM ₅₀	CIM ₅₀	1000	µg
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	µg/mL	FeSO4/mg
Extrato ASE-AcOEt	312	>500	142 ± 10	-	-
Fração 1 (F1)	>500	>500	N/A	-	-
Fração 2 (F2)	19	>500	202 ± 6 a	-	-
Fração 3 (F3)	78	>500	263 ± 17 b	-	-
Fração 4 (F4)	19	>500	133 ± 9 c	-	-
Fração 5 (F5)	>500	>500	218 ± 7,6 a,b	-	-
Ácido p-hidroxibenzoico (1)	500	>500	N/A	-	-
Pronatocianidina (2)	500	>500	124,8 ± 7 *	60 ± 3,3	550,22 ± 10,43
Proantocianidina (3)	62	>500	178,4 ± 5 *	35 ± 0,67	552,62 ± 5,23
Hiperosídeo (4)	250	62	258 ± 20 *	4,31 ± 0,81	529,91 ± 21,55
Ampicilina	< 2	3,9	-	-	-
Tetraciclina	< 2	15	-	-	-
Trolox	-	-	-	-	566,08 ± 13,81
Ácido gálico	-	-	< 312	-	-

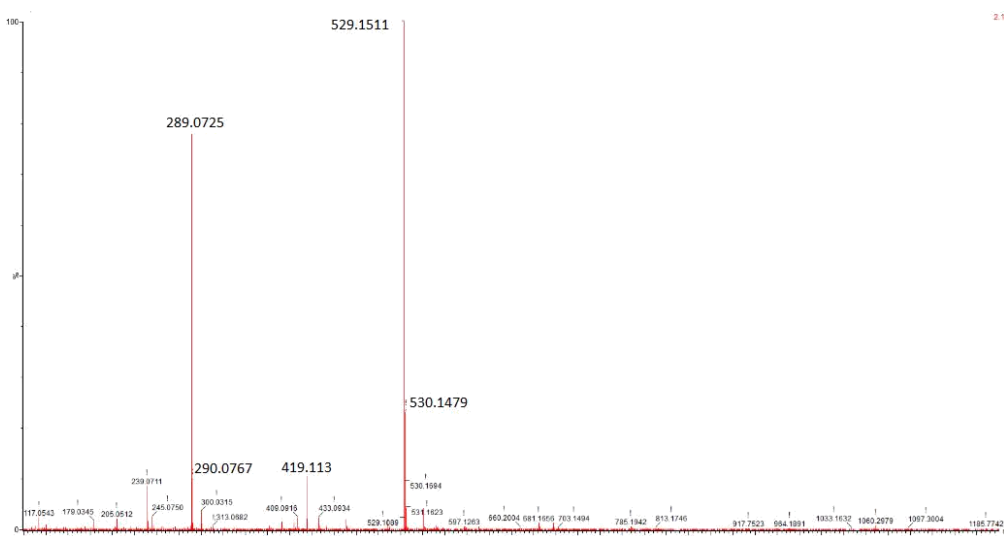


Figura 3. Perfil de fragmentação da massa rastreada 530 m/z. O fragmento de 290 m/z característico de catequina assegura uma maior probabilidade dos compostos isolados com UV de λ 281 nm (2) e λ 280 nm (3) se tratarem de uma proantocianidina. UPLC Acquity H-Class (Waters) ES-

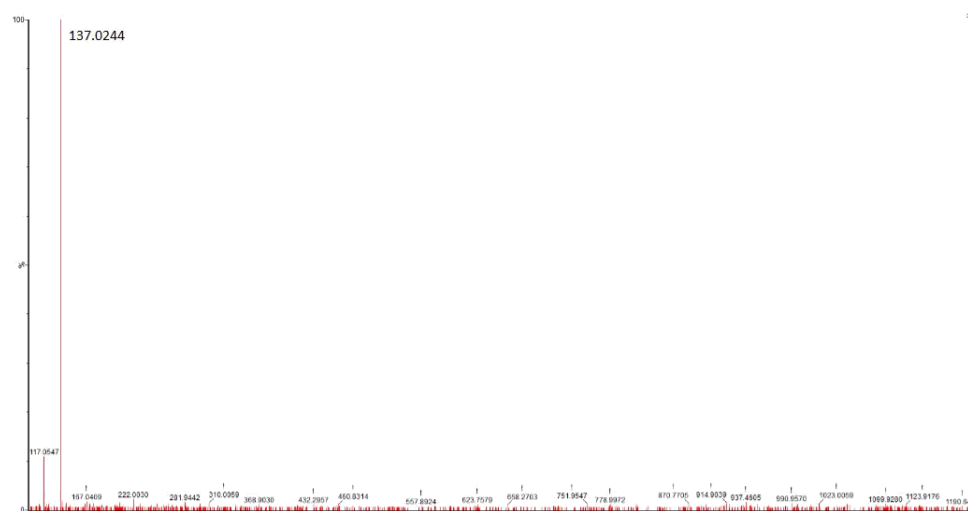


Figura 4. Massa rastreada indica a presença do ácido p-hidroxibenzóico no extrato ASE-AcOEt (1). UPLC Acquity H-Class (Waters) ES-

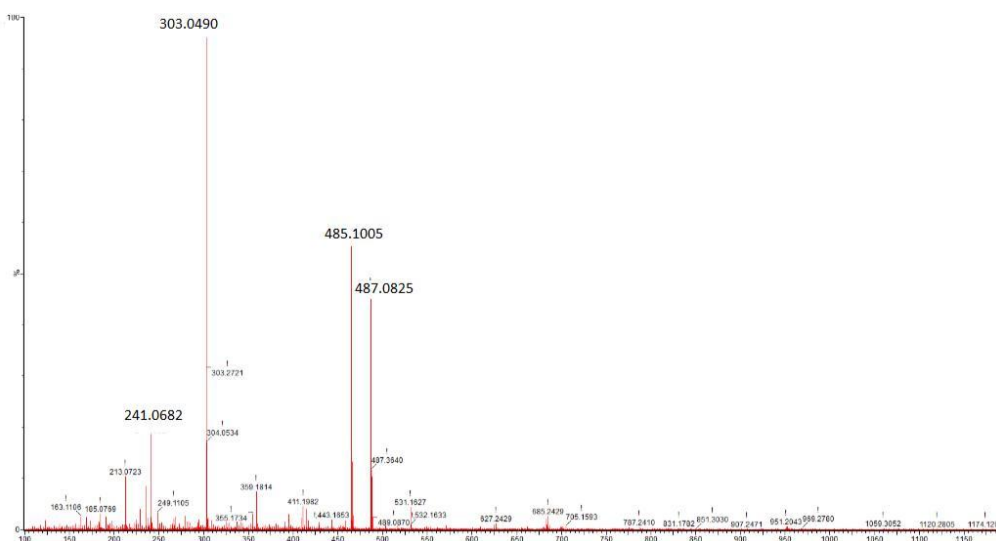


Figura 5. Massa rastreada indica a presença de hyperoside (**4**) no extrato ASE-AcOEt. UPLC Acquity H-Class (Waters) ES-.

4.2 ATIVIDADE ANTI-FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Anadenanthera colubrina* var. *Cebil* (Griseb.) Altschul

Artigo submetido à revista Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters

Flavonoide hiperosídeo isolado de *Anadenanthera colubrina* var *cebil* (Griseb.) Altschul inibe formação de biofilme de *Staphylococcus aureus*

Daniel Rodrigo Cavalcante de Araújo^{1,2} Vitória Araújo¹; Wolfgang Harand ²;Dominick Spindola Correia³ José Rafael da Silva Araújo³; José Luís Ferreira Sá²; Márcia Vanusa da Silva¹; Maria T.S. Correia¹

¹ Departamento Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

² Núcleo de Bioprospecção da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido/Ministério da Ciência, Tecnologia, Informação e Comunicação (INSA/MCTIC), Campina Grande, Paraíba, Brasil

³ Laboratório de Radiobiologia, Departamento de Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

⁴ Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Resumo

O aumento do uso de materiais biomédicos como cateteres e próteses tem revelado o risco de infecção bacteriana associado ao uso destes dispositivos médicos, sendo uma das principais causas de infecção a capacidade que as bactérias, principalmente *Staphylococcus aureus*, tem de aderir em superfícies e formar biofilmes bacterianos. Diante desta problemática o presente trabalho visou buscar substâncias de origem natural com potencial anti-adesão bacteriana. Neste sentido a espécie *Anadenanthera colubrina* var *cebil* foi selecionada e as folhas escolhidas para o ensaio. As folhas foram submetidas a técnicas avançadas de extração e purificação de compostos para aquisição das amostras e apresentou os seguintes resultados: o extrato acetato de etila de folhas (ASE-AcOEt) de *A.colubrina* var *cebil* foi testado frente a *S aureus* e inibiu em 73% a formação de biofilme (ou formação de biofilme de $27 \pm 3\%$ para *S. aureus*). Por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) foi possível constatar que as folhas de *A. colubrina* são constituídas principalmente por hiperosídeo e por ácido p-hidroxibenzóico, desta forma frações enriquecidas com estes constituintes foram preparados: FAPH (enriquecido com ácido p-hidroxibenzóico) e FH (enriquecido com hiperosídeo), e constatou-se que FAPH inibe a formação de biofilme em 67% e FH em 78% para *S. aureus*. Quando testados isoladamente, o ácido p-hidroxibenzóico inibiu a formação de biofilme de *S. aureus* em 76% e hiperosídeo 81%. Nossos resultados sinalizam para o potencial de folhas de *A. colubrina* var *cebil* em ensaios anti-adesão bacteriana.

1 Introdução

O aumento da expectativa de vida do homem está associado com o aumento tecnológico na área médica, por exemplo, os dispositivos intravenosos estão cada vez mais modernos (Nicolao *et al.*, 2013). O aumento no uso desses materiais e de outros dispositivos médicos tornaram evidente o risco de infecções atrelados a eles (Trentin *et al.*, 2013). Uma das principais causas está associado à capacidade que as bactérias têm para formar biofilme. Dentre elas, temos *Staphylococcus spp* considerada como o principal gênero causador de infecções associados a dispositivos médicos (Antunes *et al.*, 2011; Trentin *et al* 2013). Dados da última década apontam que 8% das infecções no Brasil foram por cateter venoso central e taxa de mortalidade entre os pacientes era de 47,1%. Diante desta problemática se faz necessário estudos para buscar novas moléculas ativas com propriedades anti-adesão bacteriana. Dessa forma o presente estudo verificou o potencial antibiofilme do extrato AcOEt de folhas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*.

2 Resultados e Discussão

Extratos de folhas da espécie *Anadenanthera colubrina* var *cebil* foi uma das espécies que se destacaram em uma triagem para verificar a atividade antimicrobiana de plantas da

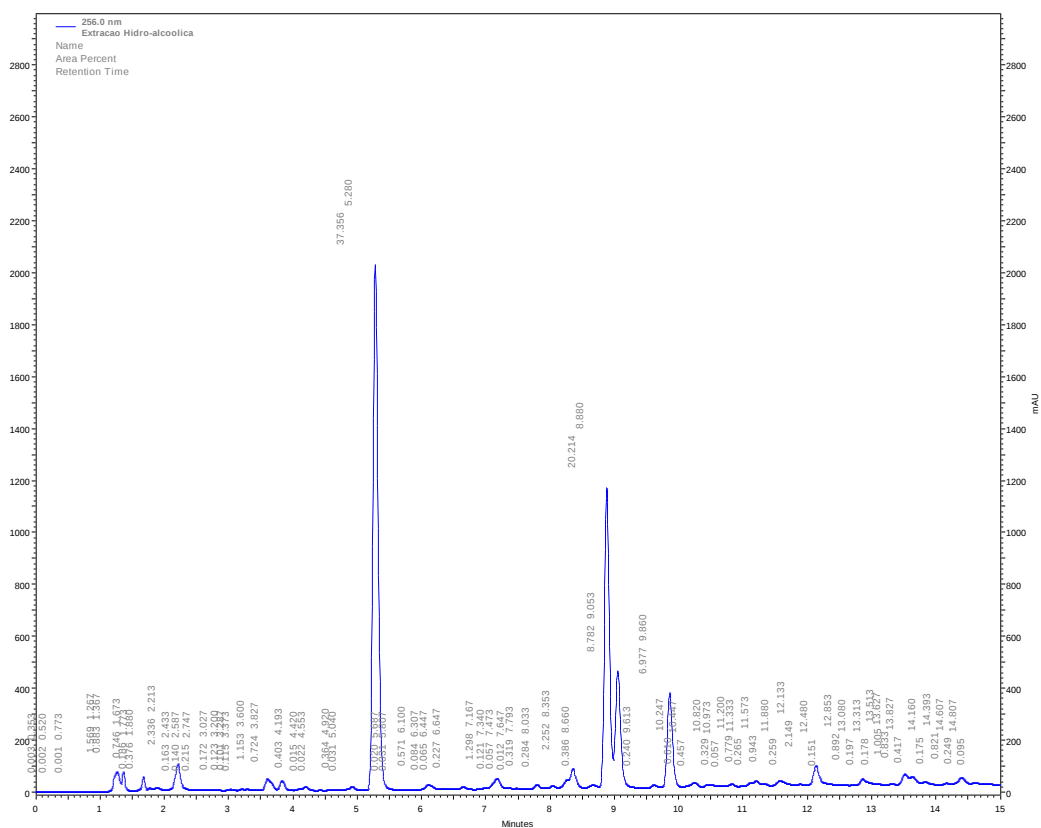
vegetação da região semiárida do Brasil (Silva *et al.*, 2013). Desde então a atividade anti-*Staphylococcus aureus* foi revelada, na ocasião o extrato hidroalcoólico de folhas apresentou um halo de inibição do crescimento bacteriano de $14,67 \pm 0,57$ mm frente a *Staphylococcus aureus* e concentração inibitória mínima (CIM) de 780 µg/mL e concentração bactericida mínima (CBM) de 12500 µg/mL. Outros dados constatarem que, uma extração líquido-líquido fracionada do extrato hidroalcoólico usando os solventes ciclohexano, acetato de etila, n-butanol e água, o extrato mais ativo foi aquele oriundo do solvente acetato de etila e que possui perfil bacteriostático (Araújo *et al.*, 2014). Neste sentido o presente estudo revela que o extrato acetato de etila (ASE-AcOEt), em concentrações subinibitórias de 100µg/mL, inibiu a formação do biofilme em 73%, ou seja, apenas $27 \pm 3\%$ do biofilme foi formado (Tabela 1). Nossos dados revelam que tanto o extrato hidroalcoólico quanto o extrato acetato de etila apresentam os mesmos componentes fitoquímicos majoritários (Figura 1), são eles: ácido p-hidroxibenzóico e hiperosídeo. Frações oriundos do sistema de cromatografia flash, no qual tais compostos foram rastreados pelo espectro de UV apresentaram valores significativos, apenas $33 \pm 2,1\%$ do biofilme de *S. aureus* foi formado frente fração contendo o ácido p-hidroxibenzóico (FAPH) enquanto que $22,1 \pm 3,7\%$ do biofilme foi formado frente a fração contendo hiperosídeo (FH), representando uma inibição de 67% e 77,9% para FAPH e FH respectivamente (Tabela 1). Já os testes diante dos compostos purificados indicaram uma inibição na formação de biofilme de 76% para o ácido p-hidroxibenzóico e 81% para flavonoide hiperosídeo (Tabela 1).

Nossos dados estão de acordo com Moran *et al* (2014) que relataram efeito antibiofilme do ácido p-hidroxibenzóico frente a *S. aureus*, e sinalizaram também para o possível efeito específico para a espécie visto que este mesmo composto induziu o biofilme de *S. epidermidis*. Já Frantianni *et al* (2013) observou efeito anti-quorum-sensing do extrato etanólico de *Hipericum connatum* no qual o composto hiperosídeo era o mais abundante. O presente estudo não sinaliza para efeitos citotóxicos do extrato ASE-AcOEt em que estes compostos são majoritários, no entanto, embora a terapia com produtos naturais seja considerada segura há relatos de interações entre flavonoides e medicamentos, problemas relacionados ao estrogênio e outros efeitos ligados a exposição destes compostos (Galati; O'Brien, 2004) e por isso ensaios ligados a toxicidade devem ser exaustivamente explorados.

Tabela 1. Ensaio de formação de biofilme de *S. aureus* frente ao extrato, frações e compostos isolados de *A. colubrina* var. *cebil*.

Amostras (100 µg/mL)	Micro-organismo <i>S. aureus</i> UFPEDA 02	
	Formação biofilme (%)	Crescimento bacteriano (%)
Extrato ASE-AcOEt	27 ± 3	123,9 ± 11
Fração com ácido p-hidroxibenzóico (FAPH)	33 ± 2,1	187 ± 15
Fração com hiperosídeo (FH)	22,1 ± 3,7	163,3 ± 15
Ácido p-hidroxibenzóico	24 ± 1	115 ± 6,9
Hiperosídeo	19 ± 1	104 ± 9

Figura 1. Cromatograma do extrato hidroalcoólico de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*. Nele podemos visualizar o composto ácido p-hidroxibenzóico (Rt 5.2 min), majoritário, correspondendo a 37% da amostra e em seguida o flavonoide hiperosídeo (Rt 8.8 min), correspondendo a 20% da amostra. Ambos foram majoritários também no extrato ASE-AcOEt de onde foram purificados.



3 Experimental

3.1 Extração e purificação dos compostos

As folhas foram coletadas em março de 2015 próximo a “Pedra do Cachorro” no *Parque Nacional do Catimbau* (Pernambuco, Brasil) com a devida autorização (SISBIO 49344-4) e incorporada ao herbário Dárdano de Andrade Lima, da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) com o voucher 80351. O extrato das folhas foi feito usando o extrator acelerado por solvente (ASE® 350 DIONEX) realizando uma extração eluotrópica que originou os extratos hexano (ASE-Hex), acetato de etila (ASE-AcOEt) e metanol (ASE-MeOH), no qual o extrato ASE-AcOEt seguiu para cromatografia flash (Biotage® Isolera One) para aquisição das frações, que posteriormente foi encaminhado para o HPLC preparativa (Autopurification System®) onde foi purificado com alta pureza. Os compostos isolados foram identificados por RMN (Bruker® ASCEND III).

3.2 Ensaio de formação de biofilme

A formação de biofilme foi avaliada utilizando o ensaio com cristal violeta usando placas de microtitulação de 96 poços como descritos por Trentin *et al* (2013) com adaptações nas proporções de meio (160µL), amostra (20µL) e inóculo (20µL).

3.3 Isolamento do PBMC e teste MTT

As PBMCs foram semeadas em microplacas de 96 poços, nas quais foram pipetadas 8×10^5 células por poço em 100 µL de meio de cultura completo (RPMI 1640 + Soro Bovino Fetal) mais 50 µL de diferentes concentrações do extrato ASE-AcOEt das folhas. Como controle negativo e positivo, foi utilizado meio de cultura RPMI 1640 e Triton-X a 1%, respectivamente. Como controle solvente, foi utilizado metanol 2%.

4 Conclusão

Nossos ensaios constatam que o flavonoide hiperosídeo e o composto p-hidroxibenzóico inibem a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus*

5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco (AMD-0141-2.00/2016) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- Nicolao C, Paczkoski RF, Ellensohn L. 2013.A história da venopunção: A evolução dos cateteres agulhados periféricos ao longo do tempo. Rev.Conhe.Online 1:1-11
- Trentin DS, Giordani RB, Macedo AJ. 2013. Biofilmes bacterianos patogênicos: Aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. Rev. Liberato,. 14(22):113-238.
- Antunes ALS, Bonfanti JW, Peres LR, Pinto CC, Freitas AL, Macedo AJ,Barth AL. 2011. High vancomycin resistance among biofilms produced by Staphylococcus species isolated from central venous catheters. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 106: 51-55.
- Uçkai I,Pittet D, Vaudaux P, Sax H, Lew D, Waldvogel F.2009. Foreign body infections due to Staphylococcus epidermidis. Ann Med. 41:109-119.
- Araújo DRC, Silva LCN, Silva AG, Araújo JM, Macedo AJ, Correia MTS, Silva MV. 2014 Comparative analysis of anti-Staphylococcus aureus action of leaves and fruits of Anadenanthera colubrina var. cebil (Griseb.) Altschul.
- Araújo DRC, Silva LCN, Harand W, Fernandes MJ, Soares TC, Langassner SMZ, Giordani BR, Ximenes RM, Silva AG, Silva MV, Correia MTS. 2017.Effects of Rainfall on the Antimicrobial Activity and Secondary Metabolites Contents of Leaves and Fruits of Anadenanthera colubrina from Caatinga Area.
- Salomão R, Rosenthal VD, Grimberg G, Nouer S, Blecher S, Buchner-Ferreira S, Vianna R, Maretti-da-Silva MA.2008. Device-associated infection rates in intensive care units of Brazilian hospitals: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. Rev Panam Salud Publica .24: 195-202.
- Cechinel-Filho V, Yunes RA. 1997. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre a modificação estrutural para otimização da atividade. Quím. Nova 21(1):99-105.
- Oliveira-Filho EC, Paumgartten FJR. 2000. Toxicity of Euphorbia milii latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. Ecotox Environ Safe. 46(3):342-350
- Sá JLF, Siqueira WN, Silva HAMF, Santos MLO, Santos FTJ, Silva LRS, Cabral DLV, Bezerra ICF, Soares, LAL, Melo AMMA. 2016.Evaluation of molluscicidal activity of Anadenanthera colubrina extracts on adult mollusc and embryos of the species Biomphalaria glabrata (Say, 1818). Sci.Plena. 10: 1001.
- Chen, L; Wen, Y 2011. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. International Journal of Oral Science 3: 66-73 doi: 10.4248/IJOS11022
- Sun, Y; Sun, F; Feng, W; Qiu, X; Liu, Y; Yang, B; Chen, Y; Xia, P. 2017. Hyperoside inhibits biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* . Experimental and Therapeutic Medicine. 14(2): 1647–1652.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho constatou que os compostos ativos presente nas folhas da espécie *Anadenanthera colubrina* var *cebil* são componentes majoritários, são eles: ácido p-hidroxibenzóico, hiperosídeo, proantocianidinas, quercetina e outros dois compostos derivados de quercetina. Para esta descoberta foram usados técnicas avançadas de extração, cromatografia e detecção acompanhados de ensaios *in vitro* que demonstraram a ação antioxidante, antimicrobiana e antibiofilme dos extratos, frações e compostos purificados de *A. colubrina* var *cebil*. Por último, foi visualizado uma tendência para uma melhor ação antimicrobiana em extratos do período chuvoso e a provável explicação para esta observação é a de que os compostos derivados de quercetina, como o hiperosídeo, foram mais abundantes em extratos no período chuvoso.

REFERÊNCIAS

_____.BRASIL.Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2012.

AGRA, M.F. Plantas da Medicina Popular dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil: espécies mais comuns. João Pessoa: União, 1996, 125p.

AGRA, M.F. Plantas medicinais dos cariris velhos, Paraíba: um projeto interdisciplinar. In: Araújo FD (Ed.) et al. Plantas do nordeste, anais do I workshop geral. London: Royal Botanic Gardens. 1999. p. 16–21.

AGRA, M.F; BARACHO, G.S; NURITA, K et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. J Ethnopharmacol, 111 (2): 383–395, 2007.

AGRA, M.F; LOCATELLI, E; ROCHA, E.A et al. Plantas Medicinais dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil, Parte II: Subclasses Magnoliidae, Caryophylliidae, Dilleniida e Rosidae. Rev Bras Farm, 77 (1): 97–102, 1996.

AGRA, M.F; ROCHA, E.A; FORMIGA S.C et al. Plantas medicinais dos cariris velhos, Paraíba, Brasil, parte I: subclasse Asteridae. Rev Bras Farm, 75 (1): 61–64, 1994.

ASTOFI-FILHO, S; SILVA, C.G.N; BIGI, M.F.M.A. Bioprospecção e biotecnologia. Parcerias Estratégicas. v 19 (38) p 45-80, 2014.

ALBUQUERQUE, U.P; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. Revista Brasileira de Farmacognosia v 16 p 678-689, 2006.

ALMEIDA, M.R; MARTINEZ, S.T; PINTO, A.C. Química de Produtos Naturais: Plantas que Testemunham Histórias. Revista Virtual de Química v 9(3) p 1117-1153, 2017.

ALBUQUERQUE, U.P; OLIVEIRA, R.F. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? J Ethnopharmacol, 113 (1): 156–170, 2007.

ALBUQUERQUE, U.P; MEDEIROS, P.M; ALMEIDA, A.L et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of ne Brazil: a quantitative approach. J Ethnopharmacol, 114 (3): 325–354, 2007.

ALBUQUERQUE, U.P; MONTEIRO, M; RAMOS, M.A et al. Medicinal and magic plants from a public market in Northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol*, 110 (1): 76–91, 2007.

ALBUQUERQUE, U.P; LUCENA, R.F.P; MONTEIRO, J.M et al. Evaluating two quantitative ethnobotanical techniques. *Ethnobotany Res Appl*, 4 (1): 51–60. 2006

ALBUQUERQUE, U.P; MEDEIROS, P.M; RAMOS, M.A; FERREIRA-JUNIOR, W.S; NASCIMENTO, A.L.B; AVILEZ, W.M.T; MELO, J.G. Are ethnopharmacological surveys useful for the discovery and development of drugs from medicinal plants?. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v 24 p 110-115, 2014.

ALSTCHUL, S.R. A taxonomic study of the genus *Anadenanthera*. *Contr Gray Herb*, (193): 3-65, 1964.

ALCANTARA, R.G.L; JOAQUIM, R.H.V.T; SAMPAIO, S.F. Plantas medicinais: o conhecimento e uso popular. *Revista de Atenção Primária à Saúde* v 18(4) p 470-482, 2015.

ARAÚJO, T.A.S; ALENCAR, N.L DE AMORIM, E.L.C et al. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *J Ethnopharmacol*, 120 (1): 72-80, 2008

ARAÚJO, D.R.C; DA SILVA, L.C.N; HARAND,W; FERNANDES, J.M; SOARES, T.C; LANGASSNER, S.M.Z; GIORDANI, R.B; XIMENES, R.M; SILVA, A.G; SILVA, M.V; CORREIA, M.T.S. Effects of Rainfall on the Antimicrobial Activity and Secondary Metabolites Contents of Leaves and Fruits of *Anadenanthera colubrina* from Caatinga Area. *Pharmacognosy Journal*,v9(4) p,435-440, 2017.

ARAUJO, D.R.C; DA SILVA, L.C.N; DA SILVA, A.G; MACEDO, A.J; CORREIA, M.T.S; DA SILVA, M.V. Comparative analysis of anti-Staphylococcus aureus action of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina* var.Cebil (Griseb.) Altschull. *African Journal Microbiology Research* v8 p 2690-2696, 2014

BARROS, F; DYKES, L; AWIKA, J.M; ROONEY, L.W. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds from sorghum brans. *Journal of Cereal Science* v 58(2) p 305-312, 2013

BALOUIRI, M; SADIKI, M; IBNSOUDA, S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* v 6 p 71–79, 2016.

BRANDÃO, M.G; ZANETTI, N.N; OLIVEIRA, P et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the official pharmacopoeia. *J Ethnopharmacol*, 120 (2): 141–148, 2008.

BARBOSA, M.R; SILVA, M.M.A; WILLADINO, L; ULISSES, C.; CAMARA, T.R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v 44 (3) p 453-460, 2014

BENTO, E.B; MONTEIRO, A.B; LEMOS, I.C.S; BRITO-JUNIOR, F.E; OLIVEIRA, D.R; MENEZES, I.R.A; KERNTOPF, N.R. Ethnopharmacological comparative study in the region of the Araripe of *Annona muricata* L. (Graviola). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. v 21(1) p 9-19, 2016.

BENTHAM, G. Contributions towards a flora of South America – enumeration of plants collected by Mr. Schomburgk in British Guiana. *J Bot*, 2: 38-103, 1840.

BENTHAM, G. Notes of Mimoseae, with a short synopsis of species. *London J Bot*, 1: 494-518, 1842.

BENTHAM, G. Revision of suborder Mimoseae. *Transac Linn Soc*, 30: 335-664, 1875.

BENELLI, G; PAVELA, R; CANALE, A; NICOLETTI, M; PETRELLI, R; CAPPELLACCI, L; GALASSI, R; MAGGI, F. Isofuranodiene and germacrone from *Smyrniololus* essential oil as acaricides and oviposition inhibitors against *Tetranychus urticae*: impact of chemical stabilization of isofuranodiene by interaction with silver triflate. *Journal of Pest Science* v 90 p 693-699, 2016.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. *Enfield: Science Publishers*. p 1-30, 2010.

CAVALCANTE, R. *Fitodontologia*. ed 1 Rio Branco, 2013.

CARNEIRO, F.M; SILVA, M.J.P; BORGES, L.L; ALBENAZ, L.C; COSTA, J.D.P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. *Revista Sapiência: Sociedade, Saberes e Práticas Educacionais*. v 3 p 44-75, 2014.

CAMPOS, V.A.; PERINA, F.J.; ALVES E.; SARTORELLI, J.; MOURA, A.M.; OLIVEIRA, D.F. *Anadenanthera colubrina* (vell) Brenan produces steroidal substances that are active against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler and that may bind to oxysterol-binding proteins. *Pest Management Science*. v70 p 1815-1822, 2014

CARVALHO, W.R.S. Ensaios in vitro para determinação do potencial medicinal de extratos de plantas VI Botânica no Inverno. Org. Miguel Peña H. [et al.]. – São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica. 223p, 2016.

CECHINEL-FILHO, V; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre a modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova* v 21(1) p 99-105, 1997.

CORRÊA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978, p. 125-126.

CRAGG, G.M; NEWMAN, D.J. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* v 75 p 311 - 335, 2012.

CLEMENSEN, A.K; PROVENZA, F.D; LEE, S.T; GARDNER, D.R; ROTTINGHAUS, G.E; VILLALBA, J.J. Plant Secondary Metabolites in Alfalfa, Birdsfoot Trefoil, Reed Canarygrass, and Tall Fescue Unaffected by Two Different Nitrogen Sources. *Crop Science* v 57 p 964-970, 2017.

CHEN, T; LIU, W; ZOU, D; CHEN, C; YOU, J; ZHOU, G; SUN, J; LI, Y. Application of an efficient strategy based on liquid–liquid extraction, high-speed counter-current chromatography, and preparative HPLC for the rapid enrichment, separation, and purification of four anthraquinones from *Rheum tanguticum*. *Journal of Separation Science* v 37 p 165-170, 2014.

CHEN, L; WEN, Y. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *International Journal of Oral Science* 3: 66-73, 2011 doi: 10.4248/IJOS11022

DESTRUTI, A.B.C.B; ARONE, E.M; PHILLIP, M.L.S. Introdução a farmacologia. ed senac, 1999.

DUARTE, M.C.T; DUARTE, R.M.T; RODRIGUES, R.A.F; RODRIGUES, M.V.N. Essential oils in food processing: Chemistry, Safety and Applications. *Institute of Food Technologists Series* eds Hashemi, S.M.B; Khaneghah, A.M; Sant’anna, A.S., ed John Wiley & Sons, 2017.

EMERY, F.S.; SANTOS, G.B.; BIANCHI, R.C. A química na natureza. 7 ed. São Paulo: Design LTDA, 2010.

FIRMO, W.C.A; MENEZES, V.J.M; PASSOS, C.E.C; DIAS, C.N; ALVES, L.P.L; DIAS, I.C.L; NETO, M.S; OLEA, R.S.G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Caderno de Pesquisa* v 18 p 90-95, 2011.

GARCIA, A.A; CARRIL, E.P. Metabolismo secundário de plantas. *Reduca* v 2(3) p 119-145, 2009.

GUIMARÃES, D.O; MOMESSO, L.S; PUPO, M.T. Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents. *Química Nova* v 33(3), 667-679, 2010

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p.374-381, 2007.

HILGERT, N.I. Plants used in home medicine in the Zenta river basin, northwest Argentina. *J Ethnopharmacol*, 76 (1): 11–34, 2001.

KARUPPANAPANDIAN, T. et al. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, V 5(6) p 709-725, 2011.

LAGE, F.F. Caracterização química e quantificação de compostos fenólicos em forrageiras. Dissertação apresentada à universidade de Lavras - MG. Programa de pós-graduação em agroquímica p 93, 2009.

LORENZI, H. Árvores brasileiras - manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. vol. 2. São Paulo: Plantarum, 1998, p. 97.

LUCENA, R.F.P, ALBUQUERQUE, U.P; MONTEIRO, J.M et al. Useful plants of the semi-arid northeastern region of Brazil – a look at their conservation and sustainable use. *Environ Monit Assess*, 125 (1-3): 281–290, 2007.

LUCENA, R.F.P, LUCENA C.M; CARVALHO, T.K.N et al. Plantas e animais medicinais da Paraíba: um olhar da etnobiologia e etnoecologia [recurso eletrônico] / organizadores, Reinaldo Farias Paiva de Lucena, Camila Marques de Lucena, Thamires Kelly Nunes Carvalho, Ezequiel Costa Ferreira. - Cabedelo, PB: Editora IESP, 2018. 280 p.

LEAL, L.R; TELLIS, C.J.M. Farmacovigilância de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: uma breve revisão. *Revista Fitos* v 9(4) p 253-303, 2015.

LI, J.W; VEDERAS, J.C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier?. *Science* v 325 p 161-165, 2009.

MACÍA, M.J; GARCÍA, E; VIDAURRE, P.J. An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. *J Ethnopharmacol*, 97 (2): 337–350, 2005

MARINHO, S.R.M. Função dos Alcalóides Indólicos Monoterpenóides de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do grau de Mestre em Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal. Departamento de Botânica Faculdade de Ciências Universidade do Porto. p 24, 2001.

MESSIAS, M.C.T.B; MENEGATTO, M.F; PRADO, A.C.C; SANTOS, B.R; GUIMARÃES, M.F.M. O uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. v 17 p 76-104, 2015.

MERLIM, N; KARLING, M; MORALES, R.G.F; OLDONI, T.LC. Potencial antioxidante e perfil de compostos fenólicos em plantas com indicativo medicinal. *Synergismus scyentifica UTFPR* v 12(1), p 94–101, 2017.

MONTEIRO, J.M; ALBUQUERQUE, U.P; LINS-NETO, E.M et al. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. *J Ethnopharmacol*, 105 (1-2): 173-186, 2006.

MOURA, B.S; CATUNDA-JUNIOR, F.E.A; CARVALHO, M.G; MENDES, M.F. Evaluation of bioactive extracts of *Piptadenia gonoacantha* and *Piptadenia rigida* using supercritical CO₂. *Revista Fitos* v 10(2) p 199-212, 2016.

PAULA, J.E. Estudo das estruturas internas das madeiras de dezesseis espécies da flora brasileira visando o aproveitamento econômico para a produção de álcool, carvão, coque e papel. *Brasil Florestal*, 11 (47): 23-50, 1981

PATSAVAS, M.C; BYRNE, R.H; LIU, X. Purification of meta-cresol purple and cresol red by flash chromatography: Procedures for ensuring accurate spectrophotometric seawater pH measurements. *Marine Chemistry* v 150 p 19-24, 2013

PERES, L. E. P. Metabolismo secundário. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP p. 01 – 26, 2004.

QUEIROZ LP . Legumes of the Caatinga. *Royal Botanic Garden Edinburgh*, 2009. 443p.

REZENDE, H.A; MONTEIROCOCCO, M.I. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. *Revista da Escola de Enfermagem da USP* v 36(3) p 282-288, 2002

SILVA, C.M.A. Metabólitos secundários de plantas do semi-árido de Pernambuco - Uma inovação no controle de fitopatógenos. Dissertação apresentada ao Programa de Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco p 27, 2013.

STEVENSON, P.C; NICOLSON, S.W; WRIGHT, G.A. Plant secondary metabolites in nectar: impacts on pollinators and ecological functions. *Functional ecology* v 31 p 65-75, 2017.

SOARES, F.P; FRAGA, A.F; NEVES, J.P.O; ROMERO, N.R; BANDEIRA, M.A.M. Estudo etnofarmacológico e etnobotânico de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (janaguba). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Campinas, v 17n.4, p 900-908, 2015.

SUCUPIRA, N.R; SILVA, A.B; PEREIRA, G; COSTA, J.N. Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits. *UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde* v 14(4) p 263-9, 2012.

SHEN, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. *Cellpress*. v 163 p 1297 - 1300, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TISSIER, A; ZIEGLER, J; VOGT, T. Specialized Plant Metabolites: Diversity and Biosynthesis, in *Ecological Biochemistry: Environmental and Interspecies Interactions* eds G.-J. Krauss and D. H. Nies, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. 2014.

VASCONCELOS, S.M.L; GOULART, M.O.F; MOURA, J.B.F; BENFATO, V.M.M.S ; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*. v 30(5) p 1323-1338, 2007.

WEBER, C.R.; SOARES, C.M.L.; LOPES, A.B.D.; SILVA, T.S.; NASCIMENTO, M.S.; XIMENES, E.C.P.A. *Anadenanthera colubrina*: um estudo do potencial terapêutico. Artigo de revisão. *Revista brasileira de farmácia*. 92(4): 235-244, 2011

APÊNDICE A

ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA PHARMACOGNOSY JOURNAL

Pharmacogn J. 2017; 9(4): 435-440

A multifaceted peer-reviewed journal in the field of Pharmacy
www.jyoungpharm.org | www.phcog.net

Original Article

Effects of Rainfall on the Antimicrobial Activity and Secondary Metabolites Contents of Leaves and Fruits of *Anadenanthera colubrina* from Caatinga Area.Daniel Rodrigo Cavalcante de Araújo¹, Luís Cláudio Nascimento da Silva², Wolfgang Harand³, Júlia Morais Fernandes⁴, Thaciane da Cunha Soares⁵, Silvana Maria Zucolotto Langassner⁶, Raquel Brandt Giordani⁷, Rafael Matos Ximenes⁸, Alexandre Gomes da Silva⁹, Márcia Vanusa da Silva¹, Maria Tereza dos Santos Correia^{1*}

Daniel Rodrigo Cavalcante de Araújo¹, Luís Cláudio Nascimento da Silva², Wolfgang Harand³, Júlia Morais Fernandes⁴, Thaciane da Cunha Soares⁵, Silvana Maria Zucolotto Langassner⁶, Raquel Brandt Giordani⁷, Rafael Matos Ximenes⁸, Alexandre Gomes da Silva⁹, Márcia Vanusa da Silva¹, Maria Tereza dos Santos Correia^{1*}

¹Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, BRASIL.

²Programa de Mestrado em Biologia, Paratibania, Universidade CEUMA, Maranhão, BRASIL.

³Laboratório de Fitoquímica, Instituto Nacional do Semi-Árido (INSA), Paraíba, BRASIL.

⁴Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, BRASIL.

⁵Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, BRASIL.

Correspondence

Maria Tereza dos Santos Correia

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, BRASIL.

Phone number: +558121268540

Email: mtsccorreia@gmail.com

History

- Submission Date: 18-10-2016;
- Review completed: 01-12-2016;
- Accepted Date: 18-12-2016.

DOI : 10.5530/pj.2017.4.73

Article Available online

http://www.phcogj.com/v9/i4

Copyright

© 2016 Phcog.Net. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



ABSTRACT

Background: *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) is a plant widely used for medicinal purposes in Brazilian Northeast. **Objective:** This study aimed to analyze the influence of rainfall indexes (RI) in antimicrobial activity and phytochemical constituents of extracts from leaves and fruits of *A. colubrina*. **Material and Methods:** Samples were collected in Catimbau National Park (Buique, Pernambuco, Brazil) at September 2010 (RI: 75 mm) and January (RI: 65 mm), April (RI: 162 mm) and June 2011 (RI: 73 mm). The extracts were prepared by Soxhlet extraction using cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. The antimicrobial activity was determined by MIC and MBC values. **Results:** All extracts showed antimicrobial activity, but ethyl acetate extracts (from all periods) were more active. Strong correlations were found between the RI and the average MIC of MLE (p: -0.99), EALE (p: -0.81), CHFE (p: -0.81), EAFE (p: -0.80); while moderate and weak correlations were found for other extracts. Through a HPLC analysis was possible to reveal that the samples collected from dry periods had more chemical diversity (as they presented more peaks). Gallic acid and quercetin (and derivative compounds) were identified. The levels of quercetin were enhanced in extracts from dry months. **Conclusion:** Our results showed that the rainfall has a positive effect on the antimicrobial activity of leaves and fruits of *A. colubrina*, however these extracts showed more chemical diversity during dry months.

Key words: Natural products, Semi arid area, Antimicrobial agents, Medicinal plants.

INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) has been drawing attention to the increasing problem of microbial resistance to conventional antibiotics for more than a decade.¹ This scenario of antimicrobial resistance has encouraged research using medicinal plants, especially those from under-exploited biomes, such as the Caatinga. This is a unique biome from Northeast of Brazil where traditional communities use hundreds of plant species for medicinal purposes, such as the control of microbial infections.^{2,3} For some of those, scientific evidences confirm these therapeutic aptitudes.^{4,7} In recent years, the ethnomedicinal knowledge has stimulated several studies about the pharmaceutical potential of natural products of northeastern Brazil.⁸ This is justified by the fact that the intrinsic features of Caatinga area (drought, high solar radiation rates and other environmental stresses) influence the synthesis of secondary metabolites of its plants,⁹ making them attractive targets for bioprospecting programs.¹⁰ In traditional medicine, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Alstschull (1964), popularly known as Angico (synonyms: *Acacia cebil*, *Peptadenia macrocarpa*, *Anadenanthera macrocarpa*),¹¹ is frequently used by inhabitants of the Caatinga biome

to treat anemia, cancer and inflammatory diseases.^{2,3} Previous studies demonstrated the antimicrobial potential of leaves and fruits of this plant, especially against *Staphylococcus aureus*.^{4,6,12} In this context, the present study aims to analyze the effects of rainfall on the antimicrobial activity and secondary metabolites contents of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina*. With this information, the best collection time to maximize the bioactive compounds extraction for medicinal purposes may be determined.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and extract preparation

Leaves and fruits of a single individual of *A. colubrina* were collected at Catimbau National Park (Buique, Pernambuco, Brazil) at September 2010 and January, April and June 2011. The rainfall index for this months were 75 mm, 65 mm, 162 mm and 73 mm, respectively (as provided by Agronomic Institute of Pernambuco; IPA/PE). The voucher specimen (IPA 84.039) is deposited at IPA/PE. The plant material was dried at 45°C and after 3 days milled to a fine powder in a Macsalab Mill (Model 200 LAB, Eriez, Bramley), and stored at room temperature in closed containers in the dark until used.

Cite this Article: Araújo DRC, Silva LCN, Harand W, Fernandes JM, Soares TC, Langassner SMZ, Giordani RB, Ximenes RM, Silva AG, Silva MV, Correia MTS. Effects of Rainfall on the Antimicrobial Activity and Secondary Metabolites Contents of Leaves and Fruits of *Anadenanthera colubrina* from Caatinga Area. Pharmacogn J. 2017;9(4):435-440.

Samples (100g) from each tissue were subjected to Soxhlet extraction using an eluotropic series of solvents in the following order: cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. All samples were subjected to saturation at reflux for 24 hours. After this time, the extracts were filtered (Whatman filter paper No 1). Solvent was completely removed from all extracts from leaves (L) or fruits (F) (cyclohexane: ChLE and ChFE; chloroform: CLE and CFE; ethyl acetate: EALE and EAFE; methanol: MLE and MFE) on a rotating evaporator at 45° under reduced pressure and stored for later antimicrobial and phytochemical analyses.

Antimicrobial assays

Microorganisms

The microorganisms used in this work were provided by Culture Collection UFPEDA (Department of Antibiotics, UFPE), consisting of: *Staphylococcus aureus* (three strains; UFPEDA 02, 733 and 709), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396) and *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416).

Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method.¹² Twofold serial dilutions of each extract (initial concentration: 50 mg/mL) were prepared in Müller-Hinton broth (MHB) and 10 µL of bacterial suspension (approximately 1.5×10^8 CFU/mL) were added. The samples were incubated for 24 h at 37°C. Resazurin solution (0.01%) was used as an indicator by color change visualization: any color changes from purple to pink were recorded as bacterial growth. The lowest concentration at which no color change occurred was taken as the MIC. Afterwards, cultures were seeded in MHA and incubated for 24 h at 37°C to determine the minimum bactericidal concentration (MBC), which corresponds to the minimum concentration of the sample that eliminated the bacteria.

Phytochemical Analysis

Thin layer chromatography (TLC) analysis

The qualitative phytochemical analysis was performed by Thin layer chromatography (TLC) using aluminum-precoated plates of silica gel 60 F254 (Merck) and adequate visualization techniques (Dragendorff, NEU-PEG, KOH-Ethanol, Liebermann-Burchard, vanillin-sulfuric acid and others reagents, according to the respective method).¹³

High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis

Investigations of phenolic content were performed by a High-performance liquid chromatography system (HPLC; ProStar, Varian) which is comprised by a quaternary pump, diode array detector, auto-sampler. The reagents used were acetonitrile HPLC grade (Panreac) and acetic acid (Vetec). Water was purified through a milli-Q (Merck) system. Phenolic compounds were analysed on a Phenomenex C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), applying mobile phase gradient of acidified water (0.3% acetic acid) (solvent A) and acetonitrile (B) as follows: Linear gradient from 10 to 20% (B) from 0 to 10 min; and linear gradient from 20 to 28% (B) from 10 to 60 min. The flow rate was kept constant at 0.8 mL/min and detection was in the range of 190 to 450 nm. Phenolic compounds were identified by comparison of their retention times and their absorption spectra of ultraviolet light (UV). Gallic acid, chlorogenic acid, ellagic acid, rutin and quercetin were used as standard compounds (all purchased from Sigma-Aldrich).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed by One-way analysis of variance (ANOVA). All analyses were carried out using software Graph Prism, version 4. The correlation indices were calculated using the Pearson coefficient (ρ). Only for correlation between Rainfall Index and MIC values a negative p -value is considered as direct correlation.

RESULTS

Effects of rainfall on the antimicrobial activity of *Anadenanthera colubrina*

All extracts from of *A. colubrina* showed antimicrobial activity, being more active against gram-positive organisms (Table 1). Most tested bacteria were more sensitive to ethyl acetate extracts (from all periods). Taking into account the results for Gram-positive bacteria (all *S. aureus* strains and *B. subtilis*), ethyl acetate extracts from leaves showed the lowest average MIC values (1.06 mg/mL), this value was significantly lower than those observed for other extracts ($p < 0.05$). In the same way, among fruits extracts, the lowest average of MIC values was found to ethyl acetate extracts (17.50 mg/mL), however no significant differences were observed between the results. For this reason, the ethyl acetate extracts were selected for chemical analysis.

Regarding the effect of the collection period on antimicrobial activity, the lowest MIC values were observed in the months with the highest rainfall index (RI) for extract from both tissues (Table 1). Strong correlations were found between the RI and the average MIC of MLE (ρ : -0.99), EALE (ρ : -0.81), CHFE (ρ : -0.81), EAFE (ρ : -0.80); moderate correlation was observed for CLE (ρ : -0.62); while weak correlations were found for CFE (ρ : -0.48), MFE (ρ : -0.42), and CHLE (ρ : -0.27).

Effects of rainfall on phytochemical composition of *Anadenanthera colubrina*

It was observed by TLC analysis that the ethyl acetate extracts from both tissues exhibited flavonoids, cinnamic derivatives, terpenes, cyanogenic glycosides and proanthocyanidins. Whereas TLC assays did not show qualitative differences between the extracts obtained from leaves or fruits (Table S1), we were able to detect 15 phenolic compounds with different retention time (Rt) and UV spectra in HPLC chromatograms. The presence and concentration of these compounds varied with tissue and rainfall index.

The extracts from fruits showed more compounds than those from leaves: peaks 2 and 5 were found at all fruits samples, EAFE1 had the highest chemical phenolic diversity as 13 peaks were detected and some compounds were only found in this sample (peaks 3 and 4). EAFE2, EAFE3 and EAFE4 showed 10 peaks. The concentration of some compounds also varied according to collection time. For example, peak 6 had maximum detection on September (EAFE1); while peaks 8, 12 and 15 apparently were more found in April and January (Figure 1). Regarding the qualitative results for leaf extracts, EALE2 showed the highest number of peaks (8). Only two peaks were specific for EALE2 (12 and 13) and peak 14 was only absent for EALE1; the other peaks were present in all extracts. However, quantitative differences for some compounds contents could also be observed, for example, peak 1 was larger in January, and peak 15 in September and January (Figure 1).

The identity of gallic acid (peak 1) and quercetin (peak 15) were confirmed by co-injection of an internal standard for each compound (Figure S1). Some compounds (peak 10 and 11) are presumably quercetin derivatives due to the close similarity in the UV absorption spectra (Figure S2). Gallic acid, quercetin (and its derivatives) had already been

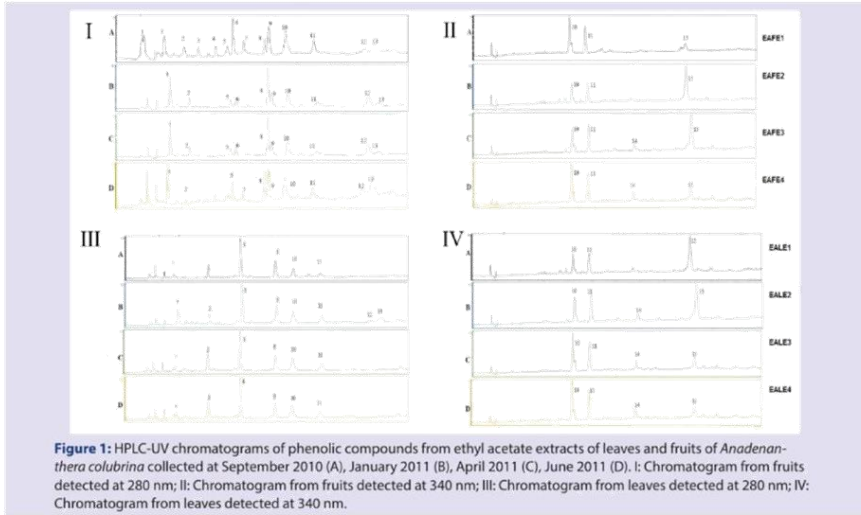


Table 1: Antimicrobial activity of ethyl acetate extracts from leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina*.

Tissues	Strain	September		January		April		June	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Leaves	<i>S. aureus</i> 02	0.390	6.25	0.781	12.5	0.195	0.781	0.390	1.562
	<i>S. aureus</i> 733	0.781	3.125	0.781	25	0.390	0.781	6.25	12.5
	<i>S. aureus</i> 709	1.562	50	1.562	>50	0.781	3.125	0.390	12.5
	<i>E. coli</i>	6.25	6.25	6.25	50	0.390	>50	6.25	25
	<i>P. aeruginosa</i>	3.125	6.25	6.25	50	12.5	12.5	0.781	6.25
	<i>B. subtilis</i>	0.781	1.5625	0.781	50	0.390	0.390	0.781	>50
	<i>K. pneumoniae</i>	25	>50	25	>50	1.562	6.25	25	>50
Fruits	<i>S. aureus</i> 02	0.390	3.125	0.390	12.5	0.097	0.390	0.781	>50
	<i>S. aureus</i> 733	0.781	3.125	1.562	6.25	0.390	0.781	1.562	3.125
	<i>S. aureus</i> 709	0.193	6.25	1.562	6.25	0.195	0.781	0.019	0.039
	<i>E. coli</i>	6.25	6.25	6.25	6.25	0.195	>50	6.25	6.25
	<i>P. aeruginosa</i>	1.562	1.5625	1.562	3.125	6.25	12.5	6.25	6.25
	<i>B. subtilis</i>	0.781	3.125	0.781	50	0.195	0.390	0.390	6.25
	<i>K. pneumoniae</i>	25	>50	25	>50	0.781	>50	6.25	6.25

Results are expressed in mg/mL.

Table S1: Phytochemical profile of ethyl acetates from leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina*.

Class of secondary metabolite	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>Cebil</i>							
	Leaves				Fruits			
Flavonoids	++	++	++	++	++	++	++	++
Cinnamic Acid Derivatives	traces	traces	traces	traces	++	++	++	++
Triterpenes and Steroids	+	+	+	+	+	traces	traces	traces
Mono and Sesquiterpenes	-	-	-	-	-	-	-	-
Alkaloids	-	-	-	-	-	-	-	-
Proanthocyanidins	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++

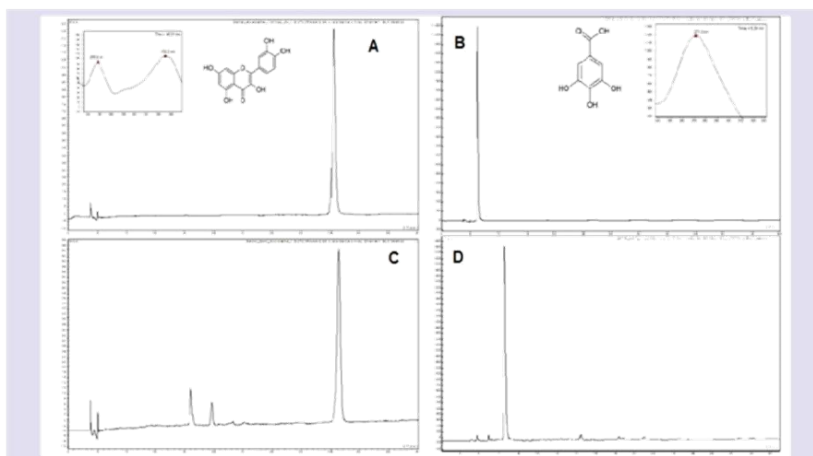


Figure S1: HPLC-UV chromatograms of quercetin (A), gallic acid (B), quercetin + ethyl acetate extracts of *A. colubrina* leaves (C) and gallic acid + ethyl acetate extracts of *A. colubrina* leaves (D). Detection at 340 nm.

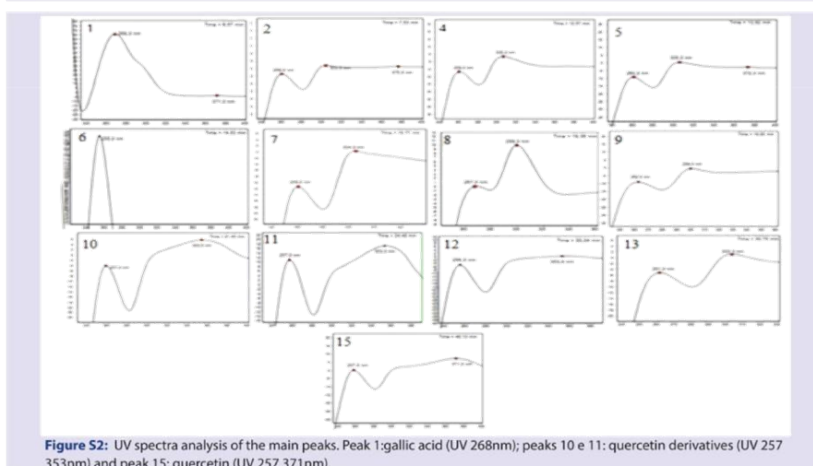


Figure S2: UV spectra analysis of the main peaks. Peak 1: gallic acid (UV 268nm); peaks 10 e 11: quercetin derivatives (UV 257 353nm) and peak 15: quercetin (UV 257 371nm).

detected in the extracts from *A. colubrina*.^{6,21} Antimicrobial activity of plants is commonly attributed to these compounds.¹⁴⁻¹⁶

DISCUSSION

This work analyzed the effects of rainfall on the antimicrobial action and phytochemical constituents of extracts from leaves and fruits of *A. colubrina*. This plant has been subject of several studies about its pharmaceutical potential.^{4,7,12,17} In our previous studies the antimicrobial action of extracts and fractions from leaves and fruits of *A. colubrina* was reported against Gram-positive bacteria, and no activity was observed against Gram negative bacteria.^{4-6,12} In the present work we employed a different extraction method, by which we obtained extracts with ac-

tivity against tested Gram negative bacteria. Anyway, the best activity was found against *S. aureus* and *B. subtilis*, and ethyl acetate extracts had the best activity. It is also important to highlight that some variation on antimicrobial activity of products derived from *A. colubrina* has been found according with area of cultivation. For example, extracts derived of samples from Cerrado biome did not show antagonist activity,¹⁸ while others from Caatinga area were able to inhibit microbial growth.¹⁹

Since the production of secondary metabolites is influenced by environmental conditions (such as temperature, soil composition, solar irradiation, water availability), we attempted to evaluate the influence of rainfall on the antimicrobial action and chemical composition of extracts from both leaves and fruits. First we analyzed the variation on antimicrobial

activity of those extracts. We correlated the RI for each month where the collection was performed with the MIC average obtained. Strong correlations were found for most of extracts. There is no consensus on the effect of rainfall index in the biological activity of plants, both positive and negative correlations are reported.^{20,21} Our results corroborate with several reports which showed positive effects of rainfall on the biological activity of plant extracts.^{20,21}

The influence of rainfall on the phytochemical composition of *A. colubrina* extracts was first analyzed by TLC based assay. In general, we observed the same composition reported in our previous work.¹² It was not noted qualitative differences between the extracts prepared in each period. Thus, we attempted to perform a HPLC analysis which revealed some quantitative differences: the samples collected from dry periods had more diversity (as they presented more peaks). Some compounds were identified: gallic acid (peak 1), quercetin (peak 15) and two quercetin derivatives (peaks 10 and 11). In addition, quercetin levels increased in those extracts from dry months. Enhanced levels of quercetin have been reported to other plants during dry seasons.²² The production of quercetin and other flavonoids was shown to be up-regulated during stressful conditions such as excessive ultra-violet radiation and high salinity.²³ These findings could explain the well-known photoprotective effect of quercetin.²⁴

CONCLUSION

Our results confirm that the rainfall levels have influence on the antimicrobial activity and chemical diversity of leaves and fruits of *A. colubrina*. Specifically, the antimicrobial activity was enhanced during months with higher rainfall levels, while the most chemical diversity was found in dry months. The increased levels of quercetin found in samples from dry months suggest metabolic alterations in order to produce compounds related to plant resistance during stressful conditions. These analyses may direct for the best collection time for obtain antimicrobial products derived from *A. colubrina* which can be applied for biomedical purposes.

CONFLICT OF INTEREST

Nil

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE, AMD-0156-2.00/12) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

ABBREVIATIONS USED

A. colubrina: *Anadenanthera colubrina*; **B. subtilis:** *Bacillus subtilis*; **CFE:** Chloroform Fruits Extract; **CHFE:** Cyclohexane Fruits Extract; **CHLE:** Cyclohexane Leaves Extract; **CLE:** Chloroform Leaves Extract; **E. coli:** *Escherichia coli*; **EAFE:** Ethyl Acetate Fruits Extract; **EAFE1:** Ethyl Acetate Fruits Extract September; **EAFE2:** Ethyl Acetate Fruits Extract January; **EAFE3:** Ethyl Acetate Fruits Extract April; **EAFE:** Ethyl Acetate Fruits Extract June; **EALE:** Ethyl Acetate Leaves Extract; **EALE1:** Ethyl Acetate Leaves Extract September; **EALE2:** Ethyl Acetate Leaves Extract January; **EALE3:** Ethyl Acetate Leaves Extract April; **EALE4:** Ethyl Acetate Leaves Extract June; **HPLC:** High Performance Liquid Chromatography; **IPA:** Agronomic Institute of Pernambuco; **K. pneumoniae:** *Klebsiella pneumoniae*; **MBC:** Minimum Bactericidal Concentration; **MFE:** Methanol Fruits Extract; **MIC:** Minimal Inhibitory Concentration; **MLE:** Methanol Leaves Extract; **P. aeruginosa:** *Pseudomonas aeruginosa*; **PE:** Pernambuco; **RI:** Rainfall Indexes; **Rt:** Retention Time; **S. aureus:** *Staphylococcus aureus*; **TLC:** Thin Layer Chromatography; **UPPEDA:** Culture

Collection of Department of Antibiotics; **UFPE:** UV: Ultraviolet; **WHO:** World Health Organization.

REFERENCES

- World Health Organization. The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action. World Health Organization. 2012;2:14-21.
- Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida JM, Linsneto EMF, Melo JG, Santos JP, Santos JP. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A qualitative approach. *J. Ethnopharmacol.* 2007;114(3):325-54. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.017> PMID:17900836
- Agra MF, Baracho GS, Nurit K, Basilio LLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2008;18(3):472-508. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300023>
- Da Silva LCN, Silva-Junior CA, Souza RM, Macedo AJ, Silva MV, Correia MTS. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Ptyrocarpa moniliformis*. *Food Chem. Toxicol.* 2011;49:2222-8. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.019> PMID:21712063
- Da Silva LCN, Sandes JM, Paiva MM, Araújo JM, Figueiredo RCBQ, Silva MV, Correia MTS. Anti-Staphylococcus aureus action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Nat. Prod. Res.* 2013;27:1492-6. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.722090> PMID:2294409
- Da Silva LCN, Miranda RCM, Gomes B, Macedo AJ, Araújo JM, Figueiredo RCBQ, Silva MV, Correia MTS. Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Ptyrocarpa moniliformis* fruits extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Plants Res.* 2013;7:2358-64.
- Tretin DS, Silva DB, Amaral MW, Zimmer KR, Silva MV, Lopes NP, Giordani RB, Macedo, A. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. *Plos One.* 2013;8(6):66257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066257> PMID:23776646 PMCid:PMC3679067
- Saraiva ME, De Alencar Ulisses, AVR, Ribeiro DA, De Oliveira LGS, De Macêdo DG, De Sousa FDFS, De Almeida Souza MM. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 2015;171:141-53. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.05.034> PMID:26026371
- Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Contorno de Metabólitos Secundários. *Quim. Nova.* 2007;30(2):374-381. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>
- Albuquerque UP, De Medeiros PM, Ramos MA, Júnior WSF, Nascimento ALB, Avilez WMT, De Melo J G. Are ethnopharmacological surveys useful for the discovery and development of drugs from medicinal plants? *Rev. Bras. Farmacogn.* 2014;24(2):110-5. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.04.003>
- Queiroz LP. Legumes of the Caatinga. Feira de Santana: Royal Botanic Garden Edinburgh; 2009. p.440-3.
- Araújo DRC, De Silva LCN, Da Silva AG, Macedo AJ, Correia MTS, Da Silva MV. Comparative analysis of anti-Staphylococcus aureus action of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina* var. Cebil (Griseb.) Altschull. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2014; 8(28):2690-6. <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.6901>
- Wagner, H, Bladt S, Zgainsky EM. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer. 1984. p. 320. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-02398-3>
- Kim DH, Je JY. Antimicrobial activity of gallic acid-grafted-chitosan against fish pathogens. *Int. J. Carbohydr. Chem.* 2015;34(3):163-71. <https://doi.org/10.1080/07328303.2015.1018993>
- Sarjit A, Wang Y, Dykes GA. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. *Food microbiol.* 2015;46:227-33. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.002> PMID:25475290
- Fu R, Zhang Y, Guo Y, Chen F. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of chinese tallow tree leaves. *Ind.Crop. Prod.* 2015;76:374-7. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.030>
- Campos VAC, Perina FJ, Alves E, Sartorelli J, Moura AM, Oliveira DF. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan produces steroidal substances that are active against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler and that may bind to oxysterol-binding proteins. *Pest Manag. Sci.* 2014;70(12):1815-22. <https://doi.org/10.1002/ps.3722> PMID:24408227
- Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq. Inst. Biol.* 2005;72(3):353-8.
- Costa EMMB, Barbosa AS, Florentino VGB, Silva JDF, Trovão DMBM, Medeiros ACD. *In vitro* antimicrobial activity of plants extracts of semi-arid region of Paraíba, PB, Brazil. *J. Dental Science* 2013;28(4):100-4.
- Hussain AI, Anwar F, Sherazi, STH, Przybylski R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of Basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem.* 2008;108(3):985-95. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.010> PMID:26065762
- Araújo TAS, Castro VTNA, Solon LGS, Da Silva GA, Almeida MG, Costa JGM, Amorim ELC, Albuquerque UP. Does rainfall affect the antioxidant capacity and production of phenolic compounds of an important medicinal species? *Ind. Crop. Prod.* 2015;76:550-6. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.008>
- Mao Ma, Cheng-Lin Hong, Shu-Qing An, Bo Li. Seasonal, spatial and interspecific variation in quercetin in *Apocynum venetum* and *Psycnium hendersonii*.

ANEXO A

SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE (SISBIO)



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 49344-4	Data da Emissão: 22/06/2017 00:35	Data para Revalidação*: 22/07/2018
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Daniel Rodrigo Cavalcante de Araújo	CPF: 083.042.814-30
Título do Projeto: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS E SUA APLICAÇÃO NA BIOFUNCIONALIZAÇÃO EM SUPERFÍCIES	
Nome da Instituição : UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	CNPJ: 24.134.488/0001-08

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material vegetal	06/2015	06/2015
2	Coleta de material vegetal	07/2015	07/2015
3	Preparação dos extratos	07/2015	11/2015
4	Coleta de material vegetal	09/2015	09/2015
5	Coleta de material vegetal	10/2015	10/2015
6	Coleta de material vegetal	11/2015	11/2015
7	Isolamento e purificação de compostos	12/2015	03/2017
8	Identificação dos compostos	12/2015	12/2017
9	Atividades biológicas	01/2017	01/2018
10	Apresentação do trabalho PPGCB	03/2019	03/2019

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Sem ressalvas
---	---------------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
---	-----------	----	--------------------	------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 86962334



Página 1/4

ANEXO B

VOUCHER DO HERBÁRIO IPA



Secretaria de
Agricultura e
Reforma Agrária

PERNAMBUCO
ESTADO DO ESTADO

HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA
FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB N° 03/2018

	N° de Tombo	Nome popular	Família	Nome Científico	Identificada por
1	80350	Angico	Leg. Mim.	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul	M. Oliveira
2	80351	Angico	Leg. Mim.	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul	M. Oliveira

Rita de Cássia Pereira
Dr^ª Rita de Cássia Pereira
Curadora do Herbário IPA

Consulta: Daniel Rodrigo Cavalcante de Araújo

Procedência: PE - Buíque - Vale do Catimbau.

Coletor: diversos coletores em 10/01/2018.

Determinada em: 19.01.2018.

Obs.: Amostra botânica em estudo na UFPE para tese de Doutorado do aluno Daniel Rodrigo Cavalcante de Araújo do PPGCB.

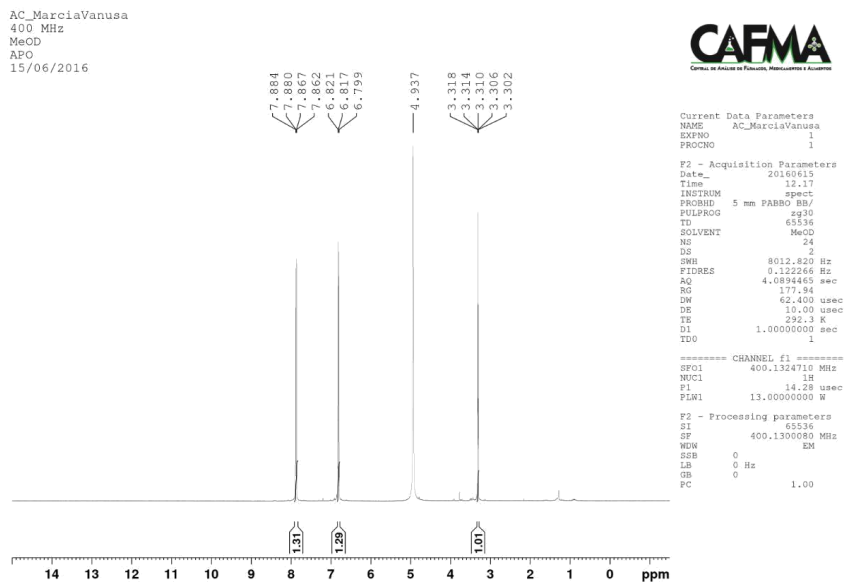
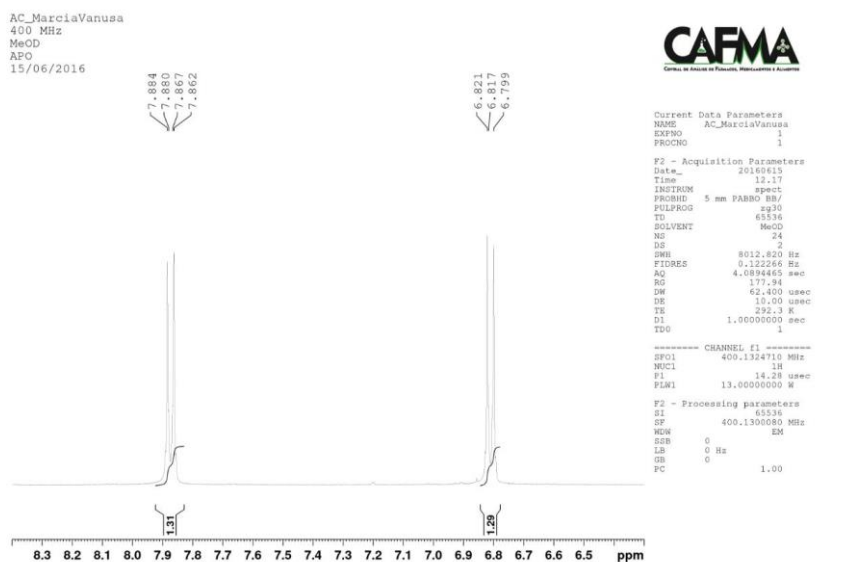
Resultado encaminhado por e mail: paulaanandaa@hotmail.com em 22/02/2018.

Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA
Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária
Av. Gal. San Martin, 1371 – Bongi – 50761-000 – Recife – PE – C.P. 1022
CNPJ 10.912.293/0001-37 – PABX: (81) 3184-7200 – Fax: (81) 3184-7211
Home Page: www.ipa.br / E-mail: ipa@ipa.br

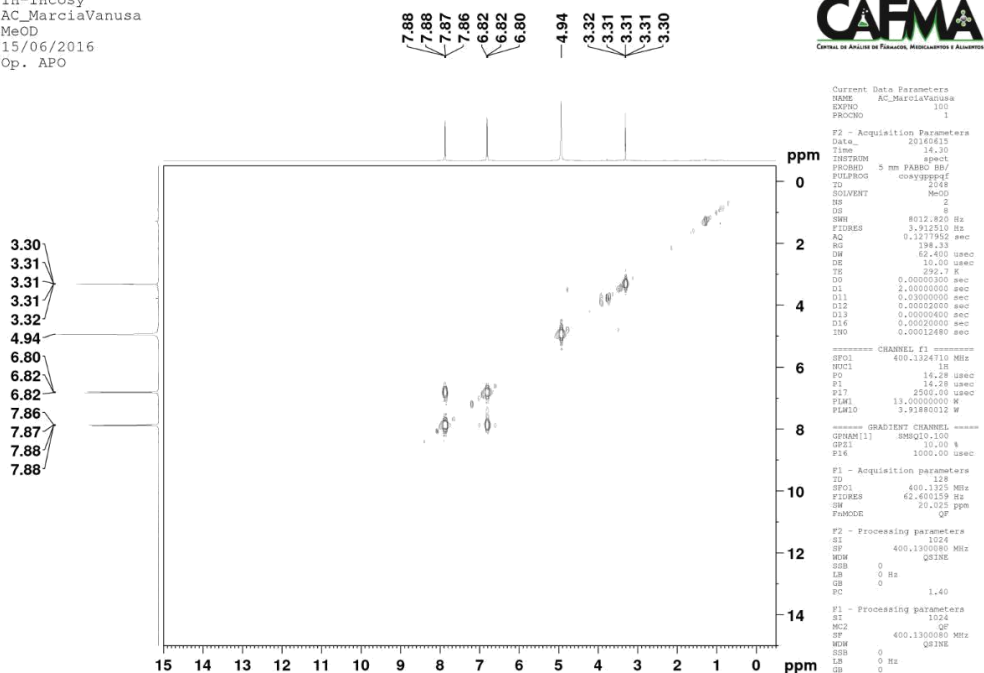
IPA – 77 anos semeando conhecimento

ANEXO C

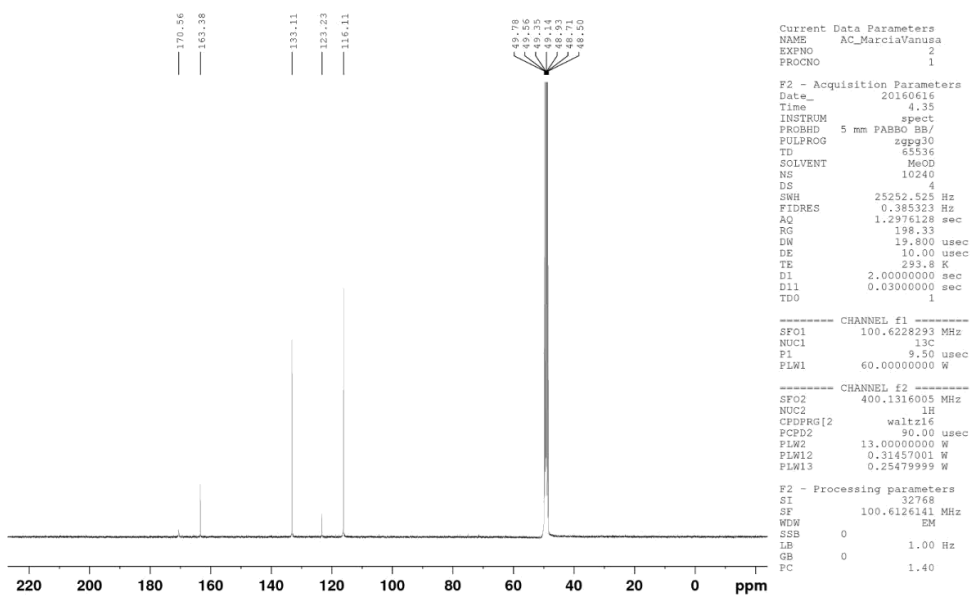
ESPECTROS DE RMN DO COMPOSTO ÁCIDO P-HIDROXIBENZÓICO



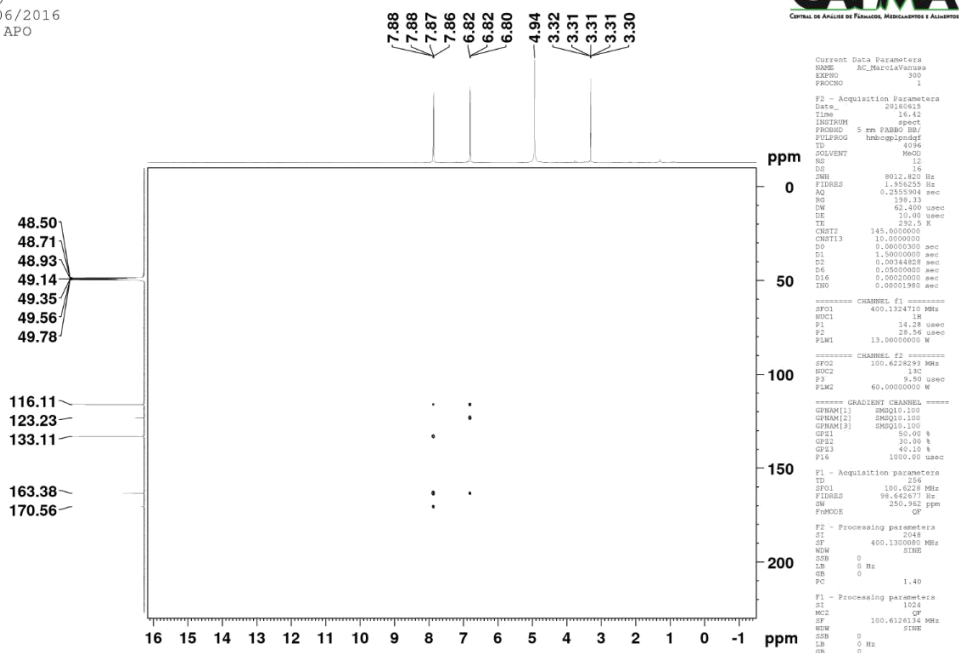
1H-1Hcosy
AC_MarciaVanusa
MeOD
15/06/2016
Op. APO



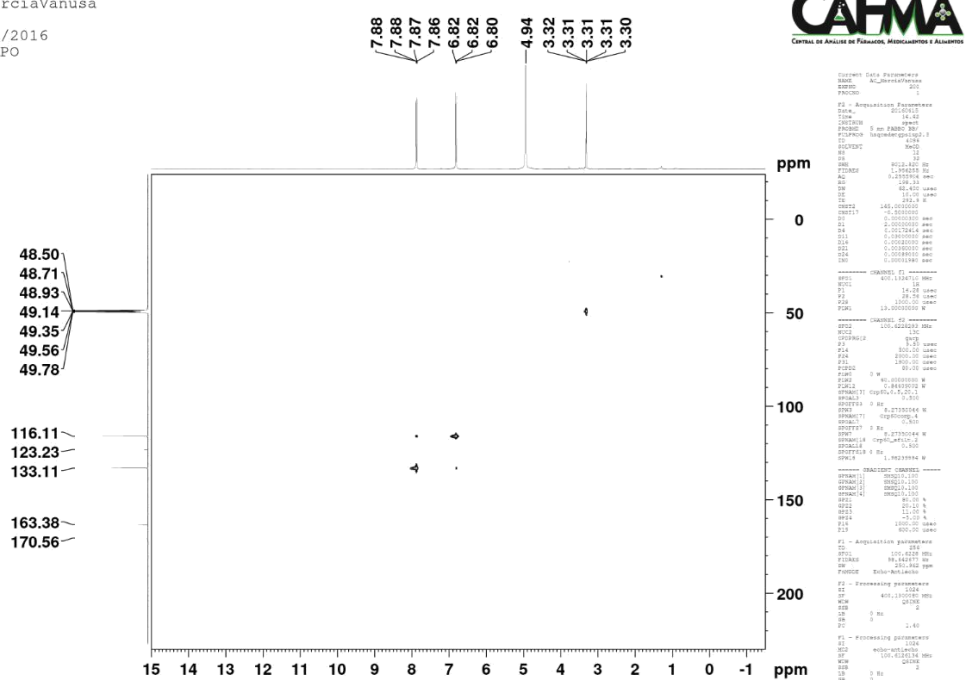
AC_MarciaVanusa
MeOD
15/06/2016
Op. APO



1H - 13C - hmbc
AC_MarciaVanusa
MeOD
15/06/2016
op. APO

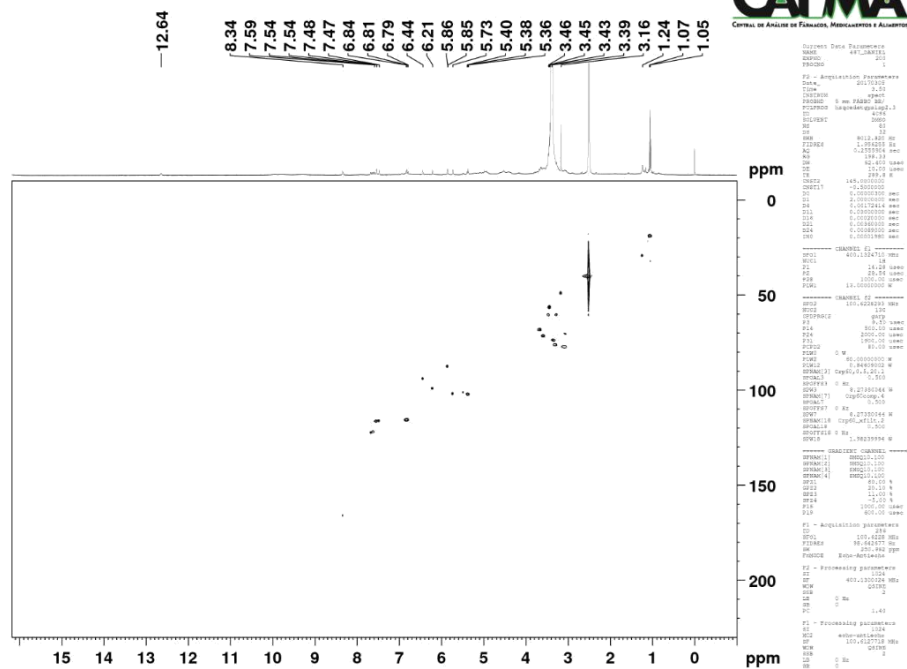


1H - 13C - hsqc - editado
AC_MarciaVanusa
MeOD
15/06/2016
op. APO

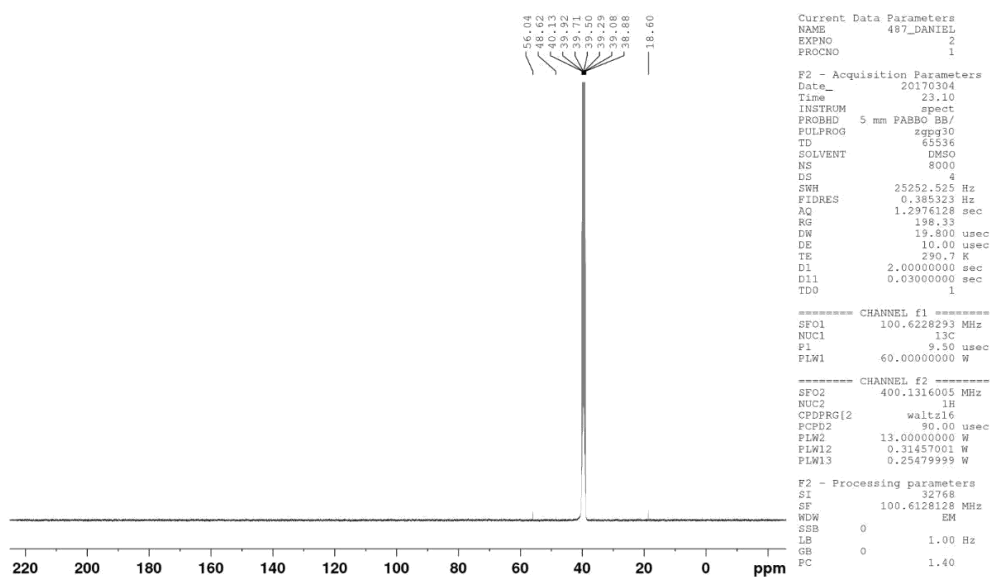




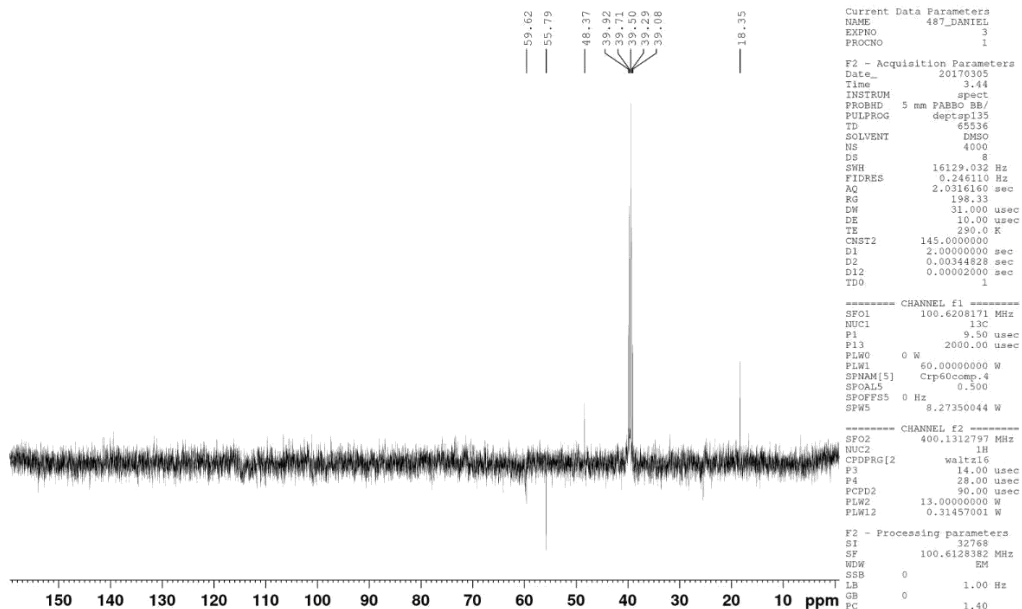
1H - 13C - hsqc - editado
487_DANIEL
DMSO
04/03/2017
op. APO



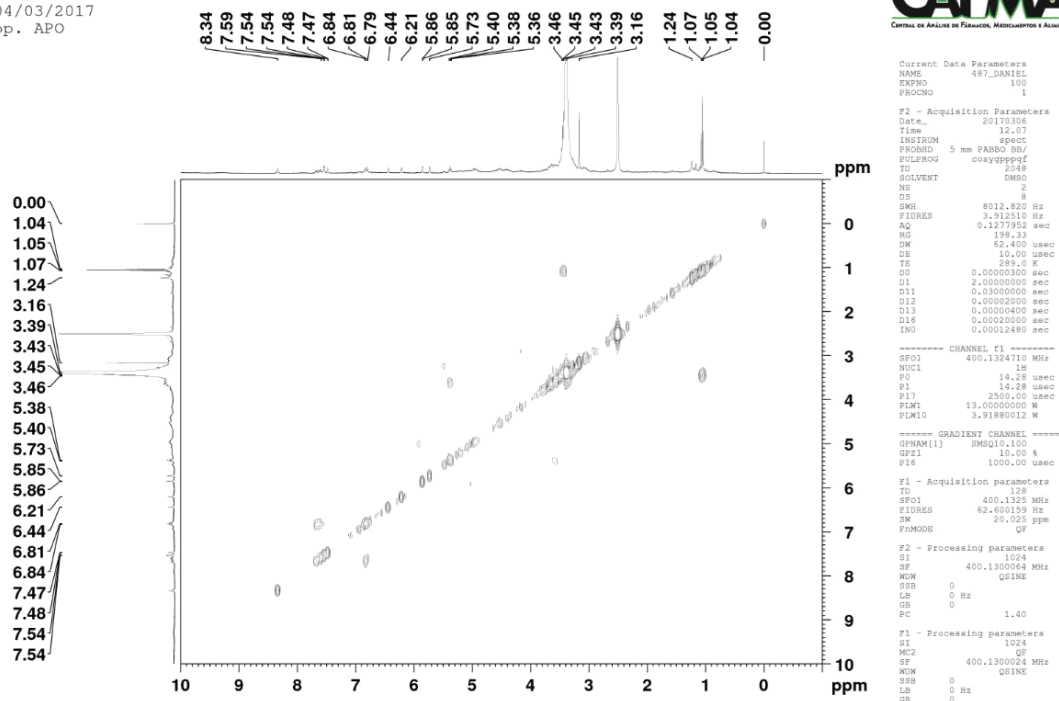
487_DANIEL
DMSO
04/03/2017
OP. APO



487_DANIEL
RMN 13C DEPT 135
DMSO
04/03/2017
Op. APO



1H-1Hcosy
487_DANIEL
DMSO
04/03/2017
Op. APO



ANEXO E

NORMAS DAS REVISTAS: FRONTIERS IN MICROBIOLOGY AND NATURAL PRODUCT RESEARCH: FORMERLY NATURAL PRODUCT LETTERS

<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology#author-guidelines>

<https://www.tandfonline.com/action/authorSubmission?show=instructions&journalCode=gnpl20>