



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS TRINDADE
CENTRO DE CIENCIAS FISICAS E MATEMATICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUIMICA

Kheytianny Hellen da Silva Lopes

**Análise de metabólitos secundários de nove espécies do gênero
Polygala utilizando multiplataformas analíticas**

Florianópolis-SC

2022

Kheytianny Hellen da Silva Lopes

**Análise de metabólitos secundários de nove espécies do gênero
Polygala utilizando multiplataformas analíticas**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de doutora em química.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Florianópolis-SC

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lopes, Kheytianny Hellen da Silva
ANÁLISE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE NOVE ESPÉCIES DO
GÊNERO Polygala UTILIZANDO MULTIPLATAFORMAS ANALÍTICAS /
Kheytianny Hellen da Silva Lopes ; orientador, Gustavo
Amadeu Micke, 2022.
115 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Química. 2. Polygala. 3. análise fitoquímica. 4.
metabólitos secundários. 5. produtos naturais. I. Micke,
Gustavo Amadeu. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Kheytianny Hellen da Silva Lopes

**Análise de metabólitos secundários de nove espécies do gênero
Polygala utilizando multiplataformas analíticas**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Professora Dra. Cristiane Luisa Jost
Universidade Federal de Santa Catarina

Professor Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Professora Dra Michele Debiasi Alberton
Universidade Regional de Blumenau

Professor Dr Louis Pergaud Sandjo
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Diogo Alexandre Siebert (Suplente)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Química.

Prof. Dr. Giovanni Finoto Caramori
Coordenador do Programa

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke
Orientador

Florianópolis-SC

2022

Este trabalho é dedicado ao meu filho, aos meus pais e a todas as pessoas que estiveram comigo
nessa caminhada da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a oportunidade da vida, assim como aos meus pais e toda minha família. Vocês me fizeram acreditar que posso ser muito mais. Obrigada por estarem sempre torcendo e me apoiando em cada etapa dos meus sonhos, sem vocês eu não chegaria até aqui. Que a vida nos permita desfrutar muitas conquistas e vitórias juntos.

Agradeço em especial ao meu filho Josué Lopes Quintilhan, por ter surgido no meio do meu doutorado, e por ter me mostrado que minha força era mil vezes maior do que a que eu acreditava que tinha. Obrigada por ser o ser que faltava em mim para eu me desenvolver mais e acreditar mais nas minhas habilidades. Você é o meu maior tesouro e essa tese existe por que você também existe. Assim como agradeço ao Manolo e sua família, que me incentivou e foram grandes parceiros nessa jornada.

Aos meus amigos que me acompanharam nessa jornada em Florianópolis, Janaína, Juliana Arruda, Ana Paula Ruani, Carolina Cardoso, Samantha, Diogo, Victor Rodrigues, Guilherme, Tizzi, Riani, Geovana, Ana Paula Kovalski, Mayara, Camila, Alysson, Franco, Maria, Amanda. Vocês foram incríveis, cada um entregou muito amor, dedicação, empatia, diversão, alegria e crescimento pra mim. Obrigada por me abraçarem nesse caminho. Levarei cada um de vocês no meu coração para sempre.

Agradeço ao meu orientador Gustavo Amadeu Micke por todo apoio, confiança e por todas as lições e tempo dedicado ao nosso crescimento como profissionais. Assim como agradeço ao prof Luciano por todos os seus respaldos sobre etapas aleatórias desse trabalho.

Aos momentos de café e lazer de toda equipe do LABEC que convivi. Das conversas sobre as pesquisas e sobre as adversidades encontradas e dribladas nos caminhos. Vocês me ensinaram muito: Juliana Campos, Joana, Máira, Lizandra, Dalila, Bruno, Roberta Marine, Bruno, Igor, Alan, Binho, Deba, Camila, Giovana, Rafaela. A cada um de vocês, meu muito obrigada por cada papel e cada compartilhamento.

Agradeço a Rafaela Stok por ser tão gentil e nos ajudar nessa reta final que foi tão massacradora. Você com certeza tem seu lugar no céu muito bem guardado. Anjo.

Agradeço ao Prof Massuo Jorge Kato da USP, por ter compartilhado ideias sobre o trabalho e por ter realizado com sua equipe as análises de RMN ^1H obtidas.

Ao professor Dr. Prof.a, Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira, da Universidade Federal de Juiz de Fora por aceitar o convite para ser a relator deste trabalho.

Agradeço aos professores (a) Dr. Louis Sandjo, Dra Cristiane Jost e Dra Michele Debiasi Alberton e Dr. Diogo Siebert por aceitarem avaliarem o trabalho.

Agradeço a todos os professores e funcionários que contribuíram de diversas formas para a minha formação e crescimento, em especial aos professores Miguel, Ademir, Tatiane Maranhão, Caraseck, e ao Jadir e à Andrezza pelo suporte e apoio. À Andrezza fica meu abraço especial de agradecimento por toda torcida e empatia pela minha luta.

À UFSC, ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-graduação em Química.

À CAPES, ao CNPQ e ao INCT catálise pelo apoio financeiro.

“Vencer a si próprio é a maior das vitórias”.

(Platão)

RESUMO

Considerando o potencial econômico dos metabólitos secundários, pesquisas têm focalizado diversas estratégias a fim de explorar e potencializar o enriquecimento desses metabólitos em matrizes vegetais em um contexto amplo. Ou seja, uma dessas estratégias é o desenvolvimento ou otimização de metodologias adequadas para a determinação, avaliação e quantificação desses metabólitos em plantas. Este estudo avaliou os constituintes químicos das espécies de *Polygala pulchella*, *P. linoides*, *P. campestris*, *P. brasiliensis*, *P. sabulosa*, *P. paniculata*, *P. lancifolia*, *P. densiracemosa* e *P. altomontana* utilizando as técnicas de Eletroforese Capilar de Zona com detecção no Ultravioleta-visível (CZE-UV), Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção no UV (HPLC-UV), Cromatografia Líquida com detecção por massas (LC-ESI-MS/MS), Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e análise *in vitro* da atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo frente às bactérias com parede celular *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). As espécies foram coletadas na região de Rancho Queimado e na ilha de Florianópolis. Após coleta das espécies, as amostras de extrato foram obtidas após total secagem do material botânico, seguido por extração com 5 ciclos de 7 dias em etanol 98% e posterior filtração. O método desenvolvido utilizando CZE-UV foi validado e evidenciou a presença de ácido salicílico nas espécies de *Polygala*. O método utilizou de um eletrólito de fundo (BGE) de 15 mmol L⁻¹ de hidroximetil-aminometano e 30 mmol L⁻¹ de ácido 2-hidroxi-isobutírico, pH = 3,9. O método apresentou desempenho rápido, tempo de migração menor que 0,76 min para ácido salicílico e ftálico (padrão interno), resultados de precisão para área de pico foram melhores que 2,9% (intra-dia) e 2,8% (inter-dia) e as respostas para os analitos foram lineares (intervalo de 1-5 mg L⁻¹), com limites de detecção e quantificação de 0,2 e 0,6 mg L⁻¹, respectivamente. O método analisou amostras de extratos *Polygala*, levando em conta as 9 espécies avaliadas, resultando em 4 extratos distintos para cada espécie (caule, raiz, folhas e flores), totalizando 39 amostras. Outro método utilizando CZE-UV foi desenvolvido com o objetivo de validar a autenticidade do perfil químico para espécies desse gênero. O método consiste na quantificação da 1,5dihidroxi-2,3-dimetoxi xantona e rutina em *P. paniculata*. O eletrólito para as separações foi composto por 30 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio e 20% de MeOH em pH = 9,10. A separação foi realizada em um capilar de sílica fundida com comprimento total de 38,5 cm e diâmetro interno de 75 µm, com injeção de 50 mBar/30s pela extremidade mais distante do detector e detecção de UV a 280 nm. As respostas para os analitos foram lineares em uma faixa de 5-25 mg L⁻¹, os limites de detecção foram 1,62 e 1,18 mg L⁻¹ e os limites de quantificação foram 4,92 e 3,59 mg L⁻¹ para Rutina e 1,5dihidroxi-2,3dimetoxi xantona, respectivamente. Uma amostra de extrato de *Polygala paniculata* foi analisada. Os resultados mostraram que 1,5dihidroxi-2,3-dimetoxi xantona e Rutina estavam presentes na amostra de extrato. Os constituintes fenólicos considerados marcadores químicos no gênero *Polygala*, como rutina, entre outros fenólicos foram determinados por LC-ESI-MS/MS e o preparo das amostras consistiu em diluição seguida da filtração do extrato. A qualidade dos extratos de *Polygala* pôde ser avaliada de acordo com parâmetros e figuras de mérito analíticos, visando analisar os metabólitos bioativos, como flavonoides, cumarinas entre outros. As técnicas HPLC-UV e RMN de ^1H foram as ferramentas escolhidas para avaliar as informações qualitativas dessas amostras. Os espectros de RMN de ^1H dos extratos de *Polygala* permitiram uma análise qualitativa de parâmetros de qualidade dos diferentes perfis de composição química das espécies. A avaliação da atividade antibacteriana frente às bactérias com parede celular *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* demonstrou atividade moderada para as espécies *P. altomontana*, *P.*

sabulosa, *P. campestris* e *P. paniculata*. Os resultados demonstraram atividade dos extratos principalmente contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* CIM= 250-500 μ L.

Palavras-chave: *Polygala*, análise fitoquímica, metabólitos secundários, produtos naturais.

ABSTRACT

Considering the economic potential of secondary metabolites, research has focused on several strategies in order to explore these metabolites in plant matrices in a broad context. In other words, one of these strategies is the development or optimization of suitable methodologies for the determination, evaluation and quantification of these metabolites in plants. This study evaluated chemical constituents of *Polygala pulchella*, *P. linoides*, *P. campestris*, *P. brasiliensis*, *P. sabulosa*, *P. paniculata*, *P. lancifolia*, *P. densiracemosa* and *P. altomontana* species using hyphenated techniques namely Capillary Electrophoresis coupled to a Visible Ultraviolet Detection Zone (CZE-UV), High Performance Liquid Chromatography coupled to a UV Detection (HPLC-UV), Liquid Chromatography coupled to a Mass Detection (LC-ESI-MS/MS), ^1H Nuclear Magnetic Resonance and *in vitro* antimicrobial activity by broth microdilution against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) cell wall bacteria. The species were collected in the region of Rancho Queimado and on the island of Florianópolis. After collecting the species, extract samples were obtained after total drying of the botanical material, followed by extraction with 5 cycles of 7 days in 98% ethanol and subsequent filtration. The method developed using CZE-UV was validated and it evaluated the presence of salicylic acid in *Polygala* species. The method developed for electrophoresis analysis, used a background electrolyte (BGE) of 15 mmol L⁻¹ of hydroxymethylaminomethane and 30 mmol L⁻¹ of 2-hydroxy-isobutyric acid, pH = 3.9. The method showed fast performance, migration time less than 0.76 min for salicylic and phthalic acid (internal standard), precision results for peak area were better than 2.9% (intraday) and 2.8% (inter-day) and responses to analytes were linear (range 1-5 mg L⁻¹), with detection and quantification limits of 0.2 and 0.6 mg L⁻¹, respectively. The method analyzed samples of *Polygala* extracts, considering that 9 species was studied, resulting 4 different extracts for each species (stem, root, leaves and flowers), leading to 39 sample extracts. Another method using CZE-UV was developed in order to validate the authenticity of the chemical profile for species of this genus. The method consists in the quantification of 1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxy xanthone and rutin in *P. paniculata*. The electrolyte for the separations consisted of 30 mmol L⁻¹ of sodium tetraborate and 20% of MeOH at pH = 9.10. The separation was performed in a fused silica capillary with a total length of 38.5 cm and an internal diameter of 75 μm , with an injection of 50 mBar/30s at the far end of the detector and UV detection at 280 nm. Responses for analytes were linear over a range of 5-25 mg L⁻¹, limits of detection were 1.62 and 1.18 mg L⁻¹ and limits of quantification were 4.92 and 3.59 mg L⁻¹ for Rutin and 1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxyxanthone, respectively. The analysis of a sample of *Polygala paniculata* extract led to identification of 1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxy xanthone and Rutin. Phenolic constituents present in the studied *Polygala* species such as rutin, among other phenolics were identified by LC-ESI-MS/MS analysis. The quality of *Polygala* extracts could be evaluated according to parameters and figures of analytical merit, aiming to identify the bioactive metabolites, such as flavonoids, coumarins, among others. The HPLC-UV and ^1H NMR techniques were the tools chosen to evaluate the qualitative information of these samples. The ^1H NMR spectra of *Polygala* extracts allowed a qualitative analysis for the quality parameters of the different chemical composition profiles of the species. The evaluation of antibacterial activity against bacteria with cell walls *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* showed the extracts of *P. altomontana*, *P. sabulosa*, *P. campestris* and *P. paniculata* showed moderate antibacterial activity mainly against the gram positive bacteria *S. aureus* with MIC values ranging 250-500 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: *Polygala*, phytochemical analysis, secondary metabolites, natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da família Polygalaceae.	27
Figura 2. Principais classes de compostos isolados no gênero <i>Polygala</i> (continua). .	29
Figura 3. Núcleo principal das Xantonas	30
Figura 4. Estrutura das principais subclasses (A) flavonóis, (B) flavonas, (C) flavanonol, (D) flavan-3-ols e as (E) antocianidinas.....	32
Figura 5. Análise do perfil químico dos extratos de acetato de etila de <i>S. lineare Thunb</i> de vários locais em diferentes épocas do ano. Cromatogramas das amostras colhidas em ambiente ensolarado em abril (A), em ambiente ensolarado e úmido em agosto (B e C).	39
Figura 6. Espectros de RMN de ¹ H de <i>C. longa</i> e <i>C. heyneana</i> e espectros de <i>C. longa</i> pura e adulterada (5-100 % de pureza de <i>C. longa</i>).	41
Figura 7. Esquema representativo de um equipamento de CE com sistema de injeção hidrodinâmica e detecção por espectroscopia de UV- VIS.	42
Figura 8. Esquema de preparação de exsicata para depósito em herbário.	49
Figura 9. Indicador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio sendo reduzido a trifenilformazan.	56
Figura 10. Cromatogramas referentes aos extratos etanólicos de espécies de <i>Polygala</i>	57
Figura 11. Cromatogramas das substâncias monitoradas em <i>Polygala</i>	58
Figura 12. Gráfico biplote da análise de componentes principais da concentração dos compostos e variáveis partes das plantas do gênero <i>Polygala</i> analisadas.	63
Figura 13. Gráfico de barras da análise ANOVA da concentração dos compostos nas diferentes espécies do gênero <i>Polygala</i> analisadas.	65
Figura 14. Esquema resumo da metodologia desenvolvida para quantificação de ácido salicílico em matrizes vegetais, utilizando eletroforese capilar de zona (CZE).	66
Figura 15. Curva de mobilidade dos compostos interferentes levando em consideração a mobilidade do fluxo (EOF) nas condições de análise versus pH.....	68
Figura 16. Mobilidade de μ_{act} , μ_{osm} e μ_{eff} na condição de análise versus curva de pH.....	69

Figura 17. Eletroferogramas e espectros de UV obtidos usando o método otimizado por CE:	71
Figura 18. Eletroferogramas da curva de calibração para o método CE com IS fixado em 5 mg L ⁻¹ :	72
Figura 19. Eletroferogramas simulados obtidos pelo método otimizado por CE utilizando o software PeakMaster com AS e AF (IS) e todos os possíveis compostos interferentes na matriz vegetal disponíveis no banco de dados software.	73
Figura 20. Eletroferogramas obtidos pelo método otimizado por CE das amostras injetadas dos extratos referentes as folhas (F).	74
Figura 21. Estrutura da X ₁ e R ₁	78
Figura 22. Eletroferogramas obtidos usando o método otimizado por CE: (a) extrato (b) Solução de padrões X ₁ e R ₁	79
Figura 23. Espectro de RMN de ¹ H de 500 MHz das amostras de extrato etanólico dos caules dos 9 extratos de <i>Polygala</i> com massa de 10 mg de cada extrato em 500 µL de DMSO-d ₆ . Área expandida na faixa 0,5 – 3,00 ppm.	82
Figura 24. Espectro de RMN de ¹ H de 500 MHz das amostras de extrato etanólico dos caules dos 9 extratos de <i>Polygala</i> com massa de 10 mg de cada extrato em 500 µL de DMSO-d ₆ . Área expandida na faixa 2,9 – 4,00 ppm.	83
Figura 25. Espectro de RMN de ¹ H de 500 MHz das amostras de extrato etanólico dos caules dos 9 extratos de <i>Polygala</i> com massa de 10 mg de cada extrato em 500 µL de DMSO-d ₆ . Área expandida na faixa 4,0 – 9,00 ppm.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais atividades biológicas reportadas para o gênero <i>Polygala</i>	34
Tabela 2. Coordenadas geográficas dos locais de coleta das espécies.....	48
Tabela 3. Resultados da análise de fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS nos 39 extratos de <i>Polygala</i>	61
Tabela 4. Parâmetros que foram analisados para validação do método CE-UV desenvolvido para quantificação de AS.	75
Tabela 5. Resultados da quantificação do AS para as amostras de extratos vegetais.	76
Tabela 6. Parâmetros analisados para validação do método CE-UV desenvolvido para quantificação dos metabólitos Rutina e Xantona.....	80
Tabela 7. Resultado da Atividade antibacteriana dos extratos das espécies <i>P. sabulosa</i> , <i>P. brasiliensis</i> , <i>P. linoides</i> , <i>P. altamontana</i> , <i>P. pulchella</i> , <i>P. campestris</i> , <i>P. lancifolia</i> , <i>P. densinracemosa</i> frente às bactérias <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CZE	Eletroforese Capilar de Zona, do inglês <i>Capillary Zone Electrophoresis</i>
BGE	Eletrólito de corrida (<i>background electrolyte</i>)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos do inglês <i>Diode Array Detection</i>
D.E.	Diâmetro externo
D.I.	Diâmetro interno
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Eletroforese capilar
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EOF	fluxo eletrosmótico do inglês <i>electroosmotic flow</i>
EtOH	Etanol
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
inlet	Extremidade mais distante do detector
IV	Radiação Infravermelha,
MeOH	Metanol
PI	Padrão interno
rpm	Rotações por minuto
LQ	Limite de Quantificação
L_{tot}	Comprimento total do capilar
CCD	Cromatografia em Camada Fina
pH	Potencial de Hidrogênio
R²	Coefficiente de determinação
NaOH	Hidróxido de Sódio
outlet	Extremidade mais próxima ao detector
μ_{eff}	Mobilidade efetiva
μ_{EOF}	Mobilidade do fluxo eletrosmótico

SUMARIO

RESUMO	9
1 INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. Biodiversidade e Produtos Naturais	21
2.1.1 Elicitores	22
2.1.3 Potencial antimicrobiano de Plantas medicinais	23
2.2. Metabolismo vegetal.....	24
2.2.1. Metabolismo primário das plantas	24
2.2.3. Metabolismo secundário das plantas.....	25
2.2. Família Polygalaceae: Considerações Gerais	26
2.3. Gênero <i>Polygala</i>	27
2.3.1 Compostos identificados no gênero <i>Polygala</i>	28
2.3.2 Aspectos farmacológicos gerais	32
2.3.3. Aspectos farmacológicos e etnofarmacológicos do gênero <i>Polygala</i>	33
2.4. Espécies do gênero <i>Polygala</i> avaliadas nesse trabalho	37
2.3. Análises de Perfil Químico	37
2.3.1 HPLC – <i>High Performance Liquid Chromatography</i> - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	38
2.3.2 RMN – Ressonância Magnética Nuclear na análise do perfil químico.....	40
2.3.3. Eletroforese Capilar	41
2.3.5. Quimiometria	45
2.3.6. Validação de dados analíticos	46
3. OBJETIVOS	47
3.1. Objetivo Geral.....	47
3.2 Objetivos Específicos	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1. Material Vegetal e Extração	48
4.1.1. Material botânico	48
4.1.2. Instrumentação	49
4.1.3 Solventes e reagentes	49

4.1.4 Métodos para Obtenção dos Extratos	49
4.1.5. Amostras de extratos.....	50
4.2. Obtenção do perfil fitoquímico dos Extratos por HPLC-UV	50
4.3. Identificação de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS.....	51
4.4. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO SALICÍLICO EM PLANTAS POR CZE	52
4.4.1 Instrumentação.....	52
4.4.2 Reagentes	52
4.4.3 Validação.....	52
4.5 Desenvolvimento de metodologia para quantificação dos metabólitos bioativos 1,5 dihidroxi-2,3dimetoxi xantona e Rutina em extratos de <i>Polygala</i>	53
4.5.1. Instrumentação.....	53
4.5.2. Reagentes e soluções.....	53
4.5.3. Amostras	54
4.5.4. Validação.....	54
4.6 Análises do perfil químico das espécies de <i>Polygala</i> por RMN de ¹ H.....	54
4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Polygala</i> através de metodologias <i>in vitro</i>	55
4.7.1. Cultivo das cepas bacterianas.....	55
4.7.2. Método de microdiluição em caldo frente às bactérias com parede celular	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.2. Obtenção do perfil cromatográficos dos Extratos por HPLC-UV	57
5.3.1 Análise estatística	62
5.4. Determinação de ácido salicílico em Plantas por Eletroforese Capilar de Zona	66
5.4.1. Desenvolvimento do Método	66
5.4.2. Parâmetros de mérito	74
5.4.3. Análise de amostra.....	75
5.4.4. Comparação com métodos relatados.....	77
5.5. Desenvolvimento de metodologia para quantificação dos metabólitos bioativos 1,5 dihidroxi-2,3dimetoxi-xantona e Rutina em extratos de <i>Polygala</i>	78

5.5.1 Desenvolvimento do método	78
5.5.2. Parâmetros de Validação	79
5.5.3. Análise da amostra	80
5.6. Identificação do perfil dos extratos de <i>Polygala</i> por RMN de ¹ H	81
5.7. atividade antibacteriana dos extratos de <i>Polygala</i> através de metodologia <i>in vitro</i>	85
6. CONCLUSÕES.....	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1 INTRODUÇÃO

As plantas têm um papel fundamental para a manutenção da vida na Terra. Todo e qualquer ecossistema possui organismos que dependem das plantas para sobrevivência, sendo responsáveis diretamente pela sobrevivência de diversas espécies. Plantas medicinais são conhecidas e altamente valorizadas em todo o mundo como fonte para a descoberta de novos fármacos, tendo seu uso iniciado pela população há milhares de anos como forma terapêutica alternativa para tratar doenças. Entretanto, a busca pelos constituintes ativos presentes nas plantas medicinais só começou no século XIX, levando assim à obtenção dos primeiros compostos bioativos com as características conhecidas de hoje (PAWAN KAUSHIK; PAHWA; DHIRENDER, 2014).

Existe um interesse científico e comercial considerável na descoberta contínua de novos agentes medicinais a partir de fontes de produtos naturais, devido a diversas propriedades farmacológicas já comprovadas. A importância dos produtos naturais em diversas áreas é ressaltada na literatura, tendo em vista que entre o início de 1981 e final de 2014, foram registrados um total de 136 fármacos contra o câncer no mundo, sendo que apenas 17% eram de origem totalmente sintética e 83% desses medicamentos eram produtos naturais ou foram baseados neles, ou mimetizavam produtos naturais. Uma descoberta relevante, que amplifica e estimula a pesquisa na área, é a descoberta de um fármaco antineoplásico, o Paclitaxel[®], utilizado para o tratamento do câncer de mama, sendo o mesmo isolado das cascas de *Taxus brevifolia* (AMARAL *et al.*, 2019). Dentre as diversas abordagens na área da pesquisa por produtos naturais, está nítida sua grande participação com relação à pesquisa e desenvolvimento de fármacos e agentes inibidores de diversos mecanismos deenvolvidos em doenças, além dos compostos oriundos do metabolismo vegetal que já foram descobertos e relacionados como fontes antivirais, antibióticos, dentre muitos outros.

As pesquisas em produtos naturais seguem rumos promissores, haja vista que os cientistas têm desenvolvido métodos que facilitem a descoberta de novos compostos bioativos, através de técnicas analíticas de ampla varredura. Nesse sentido, uma tendência inovadora e promissora é a análise do metaboloma, definido pelo conjunto de todos os metabólitos, ou seja, os componentes sintetizados por um organismo seja ele planta, microorganismo ou animal. Existem diferentes tipos de abordagens nessa área, sendo elas a análise metabolômica, e o perfil metabólico (CHAGAS-PAULA, 2013). O perfil metabólico é a identificação e quantificação de um grupo de metabólitos de interesse que podem ser

identificados com o emprego de uma determinada técnica analítica. As diferentes abordagens dessa área de estudo têm em comum a busca por metodologias hífenadas, mais apuradas, rápidas e eficazes, que sejam capazes de mensurar a imensa diversidade química presente nas plantas, para a descoberta de novos compostos e compostos bioativos, até mesmo em espécies que já foram estudadas. Dentre as técnicas de análise usadas para tal estão a ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM), cromatografia com detecção por massas e espectroscopia no ultravioleta.

O gênero *Polygala L* é o mais abundante da família Polygalaceae. Existem 39 espécies desse gênero presentes no Sul do Brasil, sendo o mesmo caracterizado quimicamente pela presença de xantonas, flavonóides, saponinas triterpênicas, polissacarídeos, estirilpironas, cumarinas, e esteróis. Alguns estudos, *in vitro* e *in vivo* destacaram importantes efeitos biológicos de plantas do gênero, como a atividade anti-inflamatória de esteróis, isoflavonas e saponinas triterpênicas, a atividade antitumoral de polissacarídeos e xantonas, a atividade antidepressiva de estirilpironas e a atividade antinociceptiva de flavonóides (TIZZIANI *et al.*, 2017).

O ácido salicílico (AS), que tem sido utilizado medicinalmente desde a antiguidade e é um dos mais importantes compostos fenólicos simples de produtos naturais, apresenta intensa pesquisa relacionada as plantas. Nesse sentido, tem revelado seu envolvimento em diversos aspectos fisiológicos e respostas de desenvolvimento como: germinação de sementes, movimentos estomáticos, acúmulo de pigmentos, fotossíntese, biossíntese de etileno, produção de calor, atividades enzimáticas, absorção de nutrientes, indução na produção de flores, funções de membrana, nodulação de leguminosas e crescimento e desenvolvimento geral de plantas (ALI, 2020; LEFEVERE; BAUTERS; GHEYSEN, 2020; MURPHY; ZHOU; CARR, 2020). Estudos demonstram claramente que o AS pode recuperar eficientemente a biossíntese de metabólitos secundários e também aumentar a concentração desses compostos nas espécies vegetais. Uma estratégia no avanço dessas pesquisas é o desenvolvimento de novas metodologias para análise da qualitativa e quantitativa de AS em matrizes vegetais.

Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi realizar uma pesquisa química e biológica nas espécies de *Polygala* utilizando métodos analíticos de *screening* para análise de metabólitos bioativos, assim como avaliar o conteúdo do AS nessas plantas, utilizando a CZE como metodologia analítica, desenvolvendo e validando um método rápido, mais verde, que gere menores quantidades de resíduos e seja menos laborioso na análise dos constituintes de matrizes vegetais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIODIVERSIDADE E PRODUTOS NATURAIS

A caracterização de como a biodiversidade de plantas (principalmente a riqueza de espécies) influencia o funcionamento do ecossistema tem sido um dos temas mais importantes em ciências da vida (DYER *et al.*, 2018; WARDLE, 2016). Um grande fator que torna desafiadora a conservação da biodiversidade é a mudança climática. Tendo em vista que milhares de espécies e dinâmicas ecológicas já estão respondendo a mudanças climáticas recentes, considera-se que as reservas vegetais atualmente existentes não conseguirão manter o suporte de proteção a todas as espécies para o qual seriam designadas a proteger. Esses problemas são exacerbados por outras mudanças globais e as pesquisas recentes recomendam medidas para a adaptação e conservação frente às mudanças climáticas (HELLER; ZAVALETA, 2009). A conciliação e integração de grandes teorias acerca da ecologia e suas implicações tem se tornado alvo promissor de perguntas científicas para os pesquisadores, com níveis de inferência do futuro da biodiversidade extremamente relevantes, a fim de proporcionar robustas formas de compreensão das mudanças espaço-temporal agregadas a essa importante temática (DYER *et al.*, 2018).

A vasta quantidade de plantas existentes no planeta promove a geração de medicamentos, desenvolvimento científico, equilíbrio ambiental e ecológico. O Brasil, com um território de 8.565.000 km², contém seis importantes biomas, sendo eles a Mata Atlântica, o Cerrado, a Amazônia, a Caatinga, o Pampa e o Pantanal. Contrapondo tamanha biodiversidade, além da maior diversidade vegetal do planeta, a maioria das plantas brasileiras ainda não foram estudadas, o que representa um grande potencial econômico, de identificação de novos compostos, atividades biológicas e estudos ecológicos a serem explorados (BOLZANI *et al.*, 2012).

Espécies de plantas medicinais e suas interações ecológicas têm sido exploradas de uma maneira mais precisa pela era atual das metodologias *ômicas* (genômica, transcriptômica e proteômica), técnicas essas que tem o potencial de produzir uma compreensão mecanicista sem precedentes sobre o tema. Estas técnicas permitem a determinação de processos regulatórios envolvidos na adaptação de plantas a estresses abióticos e bióticos e têm orientado o desenvolvimento de espécies de plantas que são resistentes, afetadas, e não afetadas por tais tensões, o que aumenta sua produtividade (CANUTO *et al.*, 2018).

A efetiva participação nas interações bioquímicas de convivência e comunicação entre as plantas e os outros vários organismos vivos no ecossistema evidencia claramente o papel fundamental desempenhado por eles em processos ecológicos naturais (DYER *et al.*, 2018). O metabolismo das plantas produz sinais através de compostos voláteis que são usados para detectar fontes de alimentação para herbívoros. Esse processo faz com que as plantas desenvolvam sistemas de defesa para proteção contra insetos. Uma defesa direta da planta está relacionada à liberação de toxinas ou substâncias que atuam dentro do sistema nervoso do inseto, como nicotina, cafeína, cocaína ou outras substâncias neuroativas. Quando se trata de uma defesa indireta, os compostos emitidos atraem parasitas ou predadores dos insetos que se alimentam dos mesmos e podem reduzir o número de insetos que atacam a planta. Ou seja, a interação entre plantas e inseto se dá após um ataque de herbívoros, pela emissão de voláteis de partes da planta que o inseto se alimentou e pode alertar outras partes para preparar uma resposta a um possível ataque. Esses sinais podem evoluir para uma comunicação com plantas vizinhas e pode ser projetado para atrair predadores ou parasitas do herbívoro atacante (DYER *et al.*, 2018; HANSSON; WICHER, 2016). Tais interações podem evolutivamente mudar e direcionar a planta, submetendo, eventualmente, a mesma a produzir metabólitos secundários muito diferentes do que a mesma vem produzindo a milhares de anos. Tais interações descritas podem promover avanços em muitas áreas afins, como a agronomia, farmacologia, entre outras.

2.1.1 Elicitores

Os elicitores são compostos que estimulam qualquer tipo de anormalidade fisiológica da planta. Uma definição mais ampla inclui tanto substâncias de origem patogênica (elicitores exógenos) quanto compostos liberados de plantas pela ação do patógeno (elicitores endógenos). Os elicitores são usados para potencializar a síntese de metabólitos secundários das plantas e podem desempenhar um papel importante nas vias biossintéticas para aumentar a produção de compostos comercialmente importantes. Os metabólitos secundários são biossintetizados devido às respostas de defesa que são desencadeadas e ativadas pelos elicitores, que podem ser de dois tipos: bióticos e abióticos. Os elicitores bióticos têm origem biológica, derivada do patógeno ou da própria planta, enquanto os abióticos não têm origem biológica e são subdivididos em fatores físicos e químicos (ALI, 2020; BAENAS; GARCÍA-VIGUERA; MORENO, 2014; CHAMKHI *et al.*, 2021).

A literatura trás que a elicitação do sistema de cultura de células vegetais também pode ser promissora, pois os estudos mostram resultados favoráveis na fermentação de

antibióticos, entre muitos outros produtos fermentados. Existem vários hormônios vegetais que atuam como elicitores, sendo o ácido salicílico (AS) e o jasmônico (AJ) os principais sinalizadores para a expressão gênica de defesa da planta, já que o AS regula a resistência a patógenos como bacterianos, fúngicos e virais, enquanto o AJ regula a produção de proteínas pela via octadecanóide. A via octadecanoide consiste na biossíntese do AJ, onde o mesmo é sintetizado a partir do ácido alfa-linolênico, que pode ser liberado na membrana plasmática por determinadas enzimas do tipo lipases. Por exemplo, em um ataque por um herbívoro que cause algum dano na planta, uma resposta de defesa é gerada, então a fosfolipase C promove a liberação de ácido alfa-linolênico para a síntese de AJ. O estudo das vias biossintéticas do AS e do AJ são extremamente úteis no processo de elicitação de plantas (NUNES DA SILVA *et al.*, 2021; PATEL; KRISHNAMURTHY, 2013; PÉREZ-BALIBREA; MORENO; GARCÍA-VIGUERA, 2011).

2.1.3 Potencial antimicrobiano de Plantas medicinais

Os produtos naturais representam uma fonte significativa para potenciais moléculas de estrutura química única com novos mecanismos de ação pelos quais os patógenos de resistência antimicrobiana possam ser erradicados ou controlados. As bactérias desenvolvem continuamente novos mecanismos para evitar a ação dos antibióticos, portanto, as mesmas apresentam diversas vantagens na luta pela sobrevivência não só de humanos (CHOUDHURY *et al.*, 2020; GULUMA *et al.*, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) alerta para conscientização sobre o uso de antimicrobianos, devido à resistência microbiana. De acordo com o órgão, se ações não forem tomadas estima-se que até 2050 o problema causará, anualmente, a perda de 10 milhões de vidas em todo o mundo, além de um prejuízo econômico de 100 trilhões de dólares. Essa capacidade de bactérias, fungos, parasitas e outros microrganismos que causam doenças, resistirem à ação de um antimicrobiano, diminui ou elimina a eficácia dos medicamentos para curar ou prevenir infecções. O problema tem várias causas, sendo uma delas o consumo inadequado de antimicrobianos e a OMS alerta, ainda, sobre o uso indevido de antibióticos durante a pandemia de Covid-19, que pode levar à aceleração do surgimento e disseminação da resistência microbiana (OMS, 2020).

Portanto, as bactérias persistentes necessitam de uma maior atenção da ciência e tecnologia, a fim da busca de solução por novos agentes antimicrobianos. Novos antimicrobianos derivados de produtos naturais podem ser a solução para esta problemática, haja vista que a literatura já traz estudos de novos mecanismos de ação contra patógenos

multirresistentes usando bancos de dados disponíveis de antibióticos que já foram usados como estratégias.

A eficácia de antimicrobianos à base de plantas, como exemplo contra *Salmonella Newport* e *Listeria monocytogenes* em cascas de melão foi avaliada por ZHU e colaboradores (ZHU, LIBIN *et al.*, 2022), onde foram testadas quatro variedades de melão. As amostras das cascas dos melões foram imersas em 5% de extrato de azeitona e 0,5% de óleo de orégano como soluções antimicrobianas. Os antimicrobianos à base de plantas reduziram a população de *Salmonella* e *L. monocytogenes* em todas as amostras, independentemente dos tipos de melão, variedades ou locais de cultivo e os autores concluíram que esses antimicrobianos podem potencialmente ser usados como antimicrobianos para descontaminar o cultivo.

Sendo assim, a investigação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais, como as do gênero *Polygala*, contra patógenos bacterianos fazem parte dos objetivos desse trabalho (ALKUFEIDY *et al.*, 2022).

2.2. METABOLISMO VEGETAL

2.2.1. Metabolismo primário das plantas

O metabolismo vegetal é caracterizado por um complexo ciclo de reações bioquímicas que utilizam componentes abundantes na natureza, tais como a água, o dióxido de carbono, o nitrogênio, os compostos de fósforo e os sais inorgânicos, para obtenção de substâncias necessárias às inúmeras atividades fisiológicas. Tais transformações bioquímicas são reações que objetivam a produção de energia e metabólitos importantes para a perpetuação da espécie no reino vegetal. Os metabólitos advindos do metabolismo primário estão largamente distribuídos em todos os organismos do reino vegetal, dispondo de moléculas relativamente simples que estão diretamente relacionadas ao crescimento, desenvolvimento e reprodução normais da planta. Ou seja, desempenha uma função fisiológica no organismo (função intrínseca). Exemplos comuns de metabólitos primários incluem, lipídios, ácidos orgânicos de baixo peso molecular e derivados, aminoácidos, amidas, proteínas e ácidos nucleicos (FANG; FERNIE; LUO, 2019; JUNIOR, 2002). Nas plantas, cada um desses metabólitos possui funções específicas, destacando-se a atuação nos processos de captação de radiação, assimilação e transporte de nutrientes, proteção externa, respiração e reprodução. Além do mais, alguns se apresentam como metabólitos que sinalizam pontos de partida das rotas biossintéticas que levam aos produtos do metabolismo secundário. Basicamente o

metabolismo primário deriva das sequenciais reações de fotossíntese (fase clara) e ciclo de Calvin (fase escura) (DEWICK, 2009).

2.2.3. Metabolismo secundário das plantas

Estudos crescentes nas pesquisas de produtos naturais têm gerado conhecimento significativo das principais funções dessas substâncias orgânicas micromoleculares, denominadas como produtos do metabolismo secundário. Dentre as diversas funções desses metabólitos, pode-se destacar a atuação como agentes de defesa para repelir e até mesmo matar possíveis organismos patogênicos, como herbívoros. Também se destaca a atuação como agentes de competição, pelo mecanismo de modificadores do comportamento germinativo e no crescimento de espécies estranhas. Em outras palavras, abrangendo mecanismos para garantir a perpetuação e reprodução de sua espécie. Diante do exposto, diz-se brevemente que os produtos do metabolismo secundário são compostos evolutivamente produzidos para conferir vantagens adaptativas às espécies produtoras. Estes são também referidos como metabólitos especiais, muitas vezes relacionados a um conjunto restrito de espécies dentro de um grupo filogenético (DEWICK, 2009; FANG; FERNIE; LUO, 2019).

O estudo dos compostos originados no metabolismo secundário tem crescido ainda mais com os estudos *ômicos*, porém, a etapa metabolômica ainda apresenta grandes desafios devido à alta diversidade de compostos secundários de plantas, além de haver vias biossintéticas ainda não resolvidas. Avanços são observados com o desenvolvimento de poderosas ferramentas analíticas baseadas em dados de massa de alta resolução e espectroscopia de RMN de alto campo combinada com a bioinformática, prometendo uma tradução da informação metabolômica em dados utilizáveis para se fundir com outras análises *ômicas*. No entanto, uma enorme quantidade de trabalho ainda é necessária para a caracterização de compostos dentro um perfil químico. Estudos atuais apresentam a relevância da combinação das abordagens tradicionais e de alta performance na determinação de estruturas, com análises de bioatividades de compostos puros, assim como também de análises das atividades biológicas das misturas contendo um grande número de compostos desconhecidos (DYER *et al.*, 2018).

A biossíntese das moléculas produzidas pelas plantas tem origem sobre hipóteses, que são baseadas em análises minuciosas da grande quantidade de estruturas químicas, marcadas isotopicamente, de um vasto número de plantas estudadas. Existem, a princípio, três rotas biossintéticas que proporcionam a formação dos metabólitos secundários nas plantas, sendo a via do ácido chiquimico, a via do ácido mevalônico e a via do acetato-malonato. De forma

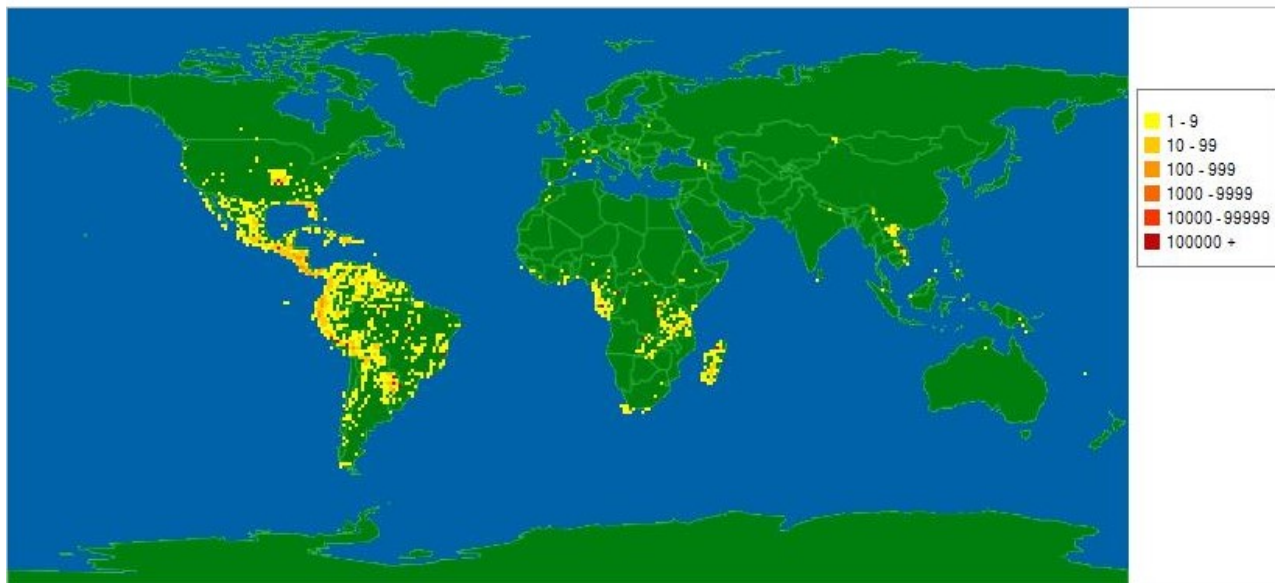
resumida, a via do acetato-malonato é um dos mecanismos reacionais que conduz à produção de substâncias com estruturas moleculares contendo anéis aromáticos. Tendo a via do chiquimato um caminho metabólico precursor dos aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, tirosina, indol e seus derivados, triptofano, e outros metabolitos, como os flavonoides, taninos, etc. Já a via do ácido mevalônico, junto com a via MEP (metil eritritol fosfato) são os caminhos reacionais para biossíntese de todos os tipos de compostos terpenoídicos (DEWICK, 2009; JUNIOR, 2002).

2.2. FAMÍLIA POLYGALACEAE: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A família Polygalaceae compreende 20 gêneros com 1.200 espécies distribuídas em regiões tropicais e temperadas, especialmente nas Américas. No Brasil esta família é representada por onze gêneros e 200 espécies, que ocorrem em todas as formações vegetais. As plantas dessa família comumente apresentam estruturas secretoras, que têm importante contribuição genérica e específica dentro da família, mas o conhecimento sobre elas é escasso e, muitas vezes, são referidas apenas como presentes ou ausentes. Dentre essas estruturas estão os nectários extraflorais nodais, que são glândulas ou tecidos especializados que secretam néctar e são encontrados nas partes vegetativas de muitas espécies de plantas, geralmente funcionando como um mecanismo defensivo contra herbívoros (FILGUEIRA; KIKUCHI; COELHO-FERREIRA, 2016).

As espécies da família Polygalaceae são encontradas principalmente em regiões de clima tropical e temperado, exceto as encontradas na Nova Zelândia e zonas árticas e antárticas (**Figura 1**). A figura 1 representa as espécies da família Polygalaceae distribuídas no mapa global. Sendo que, as cores mais quentes, próximas do vermelho, representam regiões com maiores quantidades de espécies relatadas.

Figura 1. Distribuição da família Polygalaceae.



Fonte: Trópicos. Missouri Botanical Garden. (<http://www.tropicos.org/Name/42000249?tab=maps>, acesso em 10/06/2020)

Os gêneros *Acanthocladus*, *Barnhartia*, *Bredemeyera*, *Diclidanthera*, *Monnina*, *Moutabea*, *Polygala* e *Securidaca* representam a família Polygalaceae no Brasil. São encontrados na região Sul do Brasil os gêneros *Acanthocladus*, *Bredemeyera*, *Monnina*, *Polygala* e *Securidaca*. O interesse pela família Polygalaceae, uma das quatro famílias da ordem Fabales, aumentou, especialmente devido à sua importância medicinal e taxonômica (MARIE-ALETH LACAILLE-DUBOIS; CLÉMENT DELAUDE, 2013; R., LUDTKE; SOUZA-CHIES, T. T; MIOTTO, 2013).

2.3. GÊNERO *Polygala*

O gênero mais representativo da família Polygalaceae é *Polygala*, compreendendo uma quantidade acima de 725 espécies distribuídas em todo globo terrestre. Muitas dessas espécies têm sido usadas na medicina tradicional chinesa e em muitos outros países, para o tratamento de distúrbios do sistema nervoso central (SNC) e inflamação (MARIE-ALETH LACAILLE-DUBOIS; CLÉMENT DELAUDE, 2013; R., LUDTKE; SOUZA-CHIES, T. T; MIOTTO, 2013). As espécies que compreendem o gênero vêm sendo estudadas ao longo do tempo devido as suas propriedades terapêuticas utilizadas pela medicina popular e

comprovadas pelos estudos químicos e farmacológicos (DALILA VENZKE, 2015; LIU JIAYUE; *et al.*, 2019; YAO *et al.*, 2018).

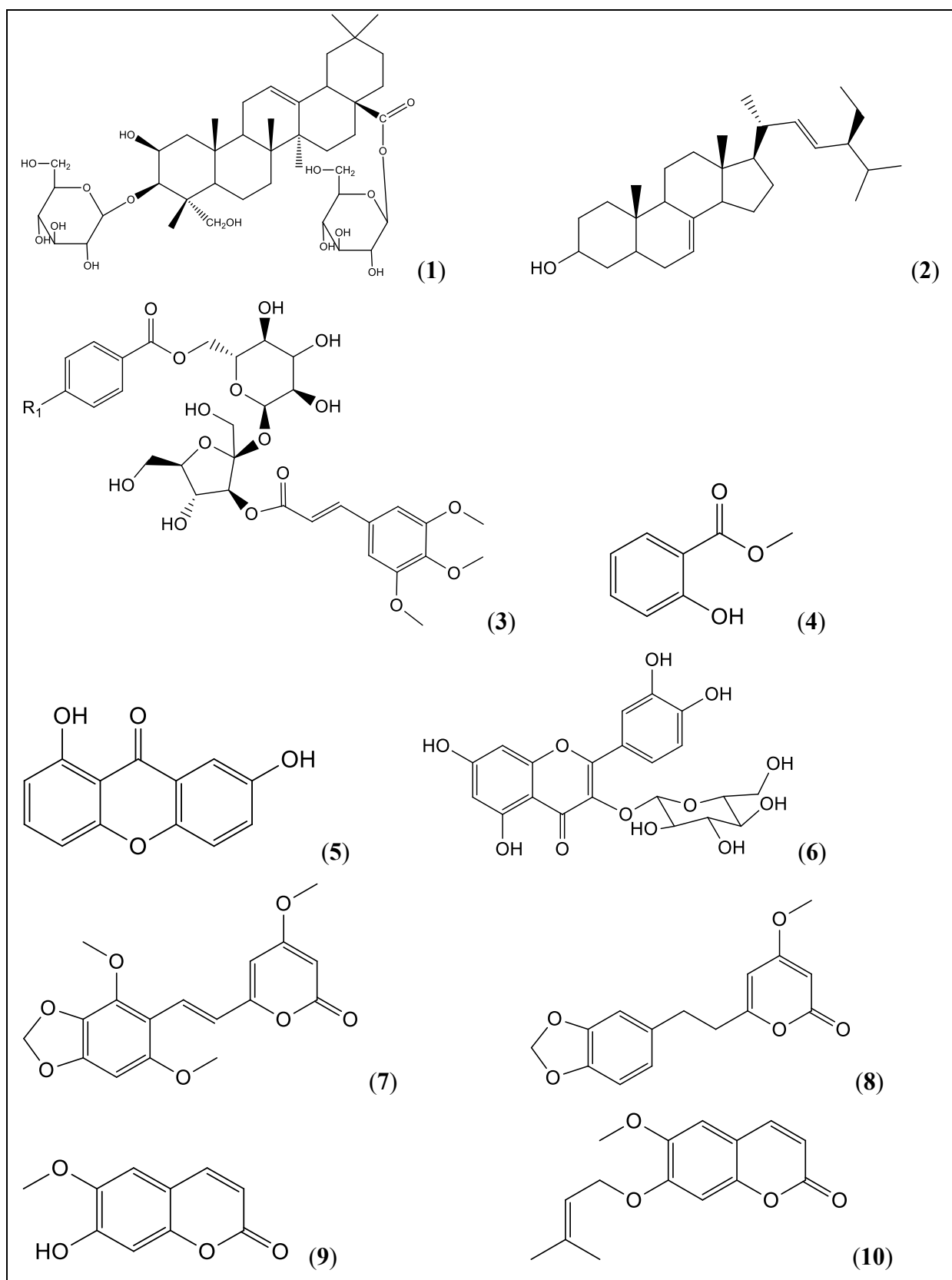
Aproximadamente 110 espécies representam o gênero no Brasil, porém apenas 39 espécies são descritas e reconhecidas na região Sul brasileira. As espécies apresentam característica de ervas e pequenos arbustos com delicadas flores de cores que vão do branco ao roxo (R., LUDTKE; SOUZA-CHIES, T. T; MIOTTO, 2013).

Muitas espécies estudadas revelam potenciais farmacológicos comprovados, tendo como exemplo a espécie *Polygala senega*, a primeira espécie avaliada química e farmacologicamente, que apresentou comprovada e efetiva atividade contra bronquiolite crônica e faringite - Resolução nº 89, de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (TIZZIANI, 2019).

2.3.1 Compostos identificados no gênero *Polygala*

Os estudos fitoquímicos realizados ao longo dos anos nas espécies do gênero *Polygala* revelam a ocorrência de uma rica diversidade de metabólitos secundários, sendo eles, saponinas triterpênicas (1) (ZHANG, D., MIYASE, T., KUROYANAGI, M., UMEHARA, K.; H., 1998; ZHANG *et al.*, 1995), esteroides (2) (BORGES *et al.*, 2014a; JUNIOR, 2002), oligossacarídeos esterificados (3) (LING *et al.*, 2013; MIYASE, T.; NOGUCHI, H.; CHEN, 1999), compostos fenólicos (4) (DA ROCHA, 2012), xantonas (5) (DAO *et al.*, 2012; LI, CHUANG-JUN *et al.*, 2014), flavonoides livres e glicosilados (6) (LIU, JIAYUE *et al.*, 2019; MARTINS, R. D. P. ET AL., 2009), estirilpironas e dihidroestirilpironas (7 e 8) (PIZZOLATTI, 2004; TIZZIANI, 2019), cumarinas (9-10) (CAPRA *et al.*, 2010a), entre outros. As xantonas são mais comumente encontradas nas plantas desse gênero, sendo consideradas marcadores quimiotaxonômicos no mesmo. Tais metabólitos estão representados na **Figura 2**.

Figura 2. Principais classes de compostos isolados no gênero *Polygala* (continua).

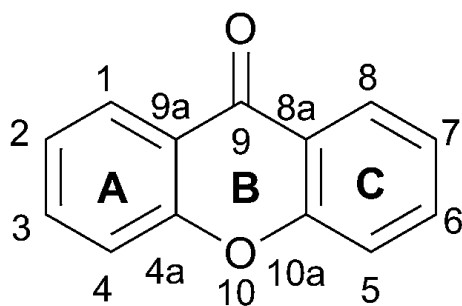


Embora a maioria das espécies do gênero *Polygala* sejam caracterizadas pelo acúmulo de salicilato de metila em suas raízes, sendo o principal composto responsável pelas características organolépticas nestas plantas, novos constituintes químicos produzidos pelo metabolismo secundário dessas espécies veem sendo reportados na literatura. Nesse sentido, as pesquisas relatam que novas xantonas, estilipironas e dihidroestirilpironas têm sido reportadas recentemente em artigos científicos (DUARTE *et al.*, 2018; LI, SHENGNAN *et al.*, 2019).

As xantonas que ocorrem com expressiva abundância nas plantas do gênero *Polygala* têm esse nome derivado do grego, xanthos, que remete a amarelo, devido à coloração característica destes produtos naturais. A dibenzo- γ -pirona (**Figura 3**) corresponde ao núcleo básico, monomérico de uma xantona e, a numeração da cadeia carbônica obedece à conversão biossintética. Tais metabólitos identificados neste gênero caracterizam-se pela variação do padrão e da quantidade de O-substituição na composição aromática, podendo os grupos fenólicos aparecerem livres, na forma de éteres metílicos, como grupos metilenodioxi ou também como acetais com glicosídeos. A literatura também reporta um padrão C de substituição para os anéis benzênicos. A química das xantonas é extremamente rica, principalmente devido ao efeito conjugado doador-aceptor do anel B que confere a essas estruturas interações com alto grau de relevância ao que sua estrutura central aparentemente simples poderia sugerir (DEWICK, 2009; JUNIOR, 2002; MISSAU, 2008; TIZZIANI, 2019).

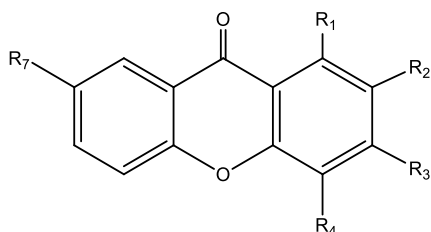
Essa classe de produtos naturais estruturalmente diversa, biologicamente ativa e sinteticamente desafiadora exhibe atividades biológicas pronunciadas, como efeitos antitumorais. Tais substâncias têm sido estudadas e investigadas por mais de um século, particularmente as espécies monoméricas derivadas de plantas. (BRÄSE *et al.*, 2015).

Figura 3. Núcleo principal das Xantonas

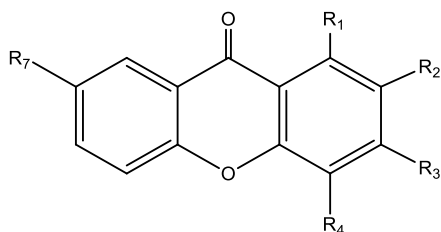


Uma série de xantonas foram isoladas desde 1960, apresentando-se desde a forma dioxigenada até a oxidação de todos os carbonos de sua cadeia aromática. Em 1969 Dreyer e

colaboradores isolaram diversas xantonas de *P. macradenia* (**11-15**), estruturas essas com padrão de oxidação na maioria dos carbonos aromáticos, exceto os carbonos nas posições R₅, R₆ e R₈.



Além disso, estudos mais recentes na espécie de *P. tenuifolia*, relatam as xantonas com oxidações nas posições 6 e também glicosilações (**16-19**; LING, 2013).



R₁=OH, R₂=OCH₃, R₃=OH, R₄=H, R₆=OH, R₇= OCH₃ (**16**)

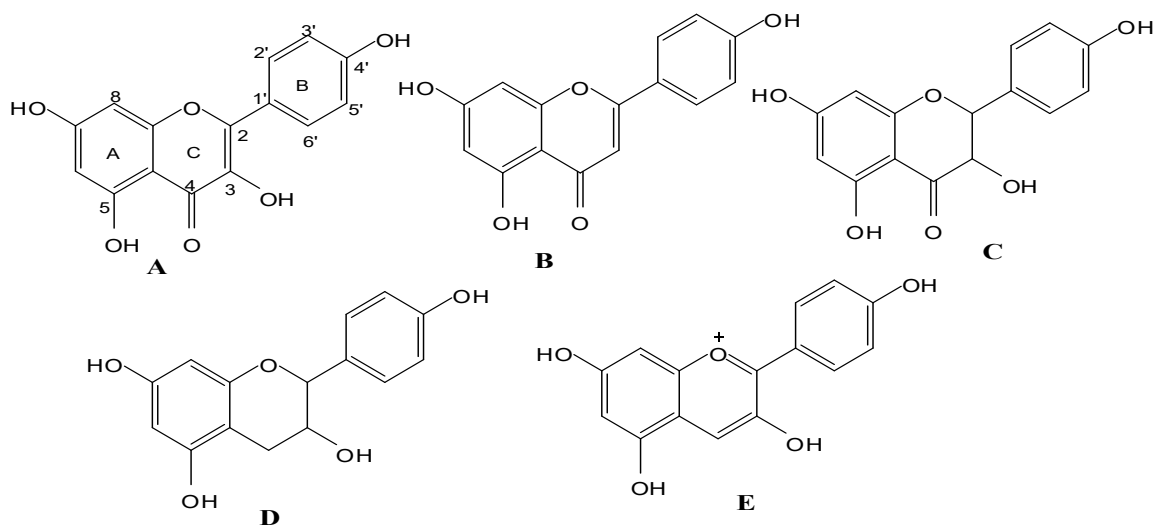
R₁= OH, R₂=Api (1→6) Glc, R₃=OH, R₇=OH (**17**)

R₁= OH, R₂=H, R₃=OH R₄=Glc, R₇=OH (**18**)

R₁= OH, R₂=H, R₃=OH R₄=Glc, R₇=OH (**19**)

Além das xantonas, o gênero também é caracterizado pela presença de flavonoides, cumarinas, estilpironas e diidroestirilpironas. Os flavonóides fazem parte de uma família de compostos fenólicos quase onipresentes nas plantas. Mais de 5000 distintos compostos flavonoídicos já foram identificados. Quimicamente, os flavonóides consistem de um heterociclo benzopirano ligado a um anel benzênico. Eles podem ser divididos em diferentes grupos, dependendo do grau de oxidação do C na posição 4, o padrão de substituição e a hidroxilação da posição C3, os mesmos apresentam esqueleto de carbono abreviado como C6-C3-C6 (figura 4). As seis principais subclasses de flavonoides são: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavan-3-ols e antocianidinas (HARBONE, 2010).

Figura 4. Estrutura das principais subclasses (A) flavonóis, (B) flavonas, (C) flavanonol, (D) flavan-3-ols e as (E) antocianidinas.



A presença de tais metabólitos no gênero era comumente observada apenas na espécie *P. sabulosa* e recentemente foi também observada na espécie *P. altomontana* (TIZZIANI, 2019). Tal característica deste fenômeno que ocorre na espécie *P. sabulosa* pode ser explicado pela semelhança na rota biossintética de xantonas, dihidroestirilpironas e estililpironas (PIZZOLATTI, 2004).

2.3.2 Aspectos farmacológicos gerais

Explicações a cerca das propriedades farmacológicas de substâncias oriundas de plantas, utilizando dos conhecimentos prévios da medicina popular, são extremamente úteis para a pesquisa e exploração de novos fármacos. Essas explicações também são úteis para entender os papéis das prescrições e aplicações fitoterápicas na medicina moderna. Diante disso, na medicina moderna tem se tornado cada vez maior tal correlação, direcionando que se deve considerar alguns dos conceitos básicos da medicina tradicional, pois eles podem conter relevantes hipóteses de cura e tratamento contra diversas doenças (DUTRA *et al.*, 2016; TSUTOMU HATANO, 2012).

Plantas medicinais como *Bulbine latifolia*, *Pouzolzia mixta*, *Securidaca longipedunculata* e *Typha capensis* são usadas para contracepção na África do Sul, assim como algumas plantas que são utilizadas na medicina tradicional contra o diabetes, cicatrização de feridas entre outros problemas de saúde (CHINGWARU *et al.*, 2019; HAMZA *et al.*, 2019; HUDLICKY, 2018; MOROOLE *et al.*, 2019). A demanda mundial por

fitofármacos está em constante crescimento, e como resultado, nos últimos anos o interesse nos metabólitos secundários das plantas tem sido rapidamente intensificado. Há grandes razões para tal, sendo a primeira delas o fato de que as plantas medicinais são a principal fonte de produção econômica de fitofármacos (visão farmacêutica), sequencialmente e não obstante, a questão do cultivo de plantas medicinais, geralmente realizados em grandes áreas, podendo ser considerado como uma interessante oportunidade para economia (visão industrial). Além do mais, é de grande interesse do ponto de vista agrícola, pois muitos metabólitos secundários das plantas exibem o comportamento inibitório contra agentes patogênicos diversos.

2.3.3. Aspectos farmacológicos e etnofarmacológicos do gênero *Polygala*

Muitas espécies desse grande gênero são estudadas devido ao uso na medicina tradicional. A planta *Polygala fallax* é utilizada no Sul da China como agente tônico e no tratamento da hepatite, além da *Polygala japonica* que é utilizada como expectorante, anti-inflamatório, agente antibacteriano e no tratamento da faringite. Espécies como *Polygala tenuifolia* (Yuanzhi), são amplamente usadas na medicina tradicional chinesa como agente expectorante, tônico e sedativo. Além disso, a planta Yuanzhi é utilizada no tratamento de insônia, amnésia, depressão, ansiedade, desorientação e prevenção de demência e deficiência de memória. As partes aéreas dessa planta, também são utilizadas na medicina popular pelos seus efeitos anti-inflamatórios (ZHANG *et al.*, 1995).

A espécie *Polygala tenuifolia*, a espécie mais estudada, é encontrada no sul da China. Os resultados dos estudos mostram o potencial desta planta principalmente como agente antidepressivo, anti-inflamatório e no aumento da memória e aprendizagem (DALILA VENZKE, 2015).

No Brasil algumas espécies são abundantes, como a *Polygala cyparissias*, também conhecida como “pinheirinho da praia”, que pode ser encontrada na costa atlântica do país de forma abundante e tem sido usada na medicina tradicional no tratamento de várias doenças como distúrbios do intestino e rins. Esta espécie também pode ser utilizada como anestésico tópico pela medicina popular, devido a abundante presença de salicilato de metila em suas raízes o que justifica seu uso para tal finalidade (DA ROCHA, 2012; CAMPOS *et al.*, 2013 *apud* VENZKE 2015). Espécies como *P. sabulosa* e *P. paniculata*, que são amplamente encontradas em Santa Catarina, também tem mostrado um grande potencial farmacológico como atividades antidepressiva, anti-inflamatória, antinociceptiva, tripanocida, neuroprotetora, ansiolítica e anticonvulsivante (**Tabela 1**) e estas atividades estão

possivelmente relacionadas à presença de compostos como cumarinas, flavonoides, xantonas e diidroestirilprionas e estirilprionas.

Tabela 1. Principais atividades biológicas reportadas para o gênero *Polygala*.
(Continua).

Espécie	Atividade Biológica	Extrato Fração Composto	Referência
<i>P. alpestris</i>	Antioxidante	Flavonoides e Xantonas	(CERVELLATI <i>et al.</i> , 2004)
	Citotóxica	Xantonas	(DALL'ACQUA <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. caudata</i>	Euritogenica Antioxidante Vasodilatadora Citoprotetora	Xantonas	(HA <i>et al.</i> , 2006; LI, SHENGNAN <i>et al.</i> , 2019; LIN <i>et al.</i> , 2005; MAK <i>et al.</i> , 2001)
	Anticancer	Xantonas	(REN <i>et al.</i> , 2019)
<i>P. cyparissias</i>	Antiulcerogenica	Frações, extratos, xantonas	(KLEIN-JÚNIOR, LUIZ CARLOS <i>et al.</i> , 2013; KLEIN <i>et al.</i> , 2010)
	Antihiperálgica	Extrato, esteróis	(KLEIN-JÚNIOR, LUIZ C <i>et al.</i> , 2012)
	Antinociceptiva	extratos e xantonas	(DE CAMPOS <i>et al.</i> , 1997)
<i>P. fallax</i>	Antioxidante	Xantonas	(LIN <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. glomerata</i>	Neuroprotetora	Xantonas	(LI, CHUANG-JUN <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. javana</i>	Antitumoral	Extrato etanólico	(ALAGAMMAL, M.; PAULPRIYA, K.; MOHAN, 2013)
<i>P. japonica</i>	Anti-inflamatória e neuroprotetora	Saponinas triterpênicas	(LI, 2012; QUANG, 2018; YAN, 2015).
<i>P. hongkongensis</i>	Neuroprotetiva	Flavonoides	(ZHAN, 2013)
	Antioxidante	Xantonas	(HA <i>et al.</i> , 2006)

Tabela 1- Principais atividades biológicas reportadas para o gênero *Polygala*. (Continua).

<i>P. karensium</i>	Antiviral	Xantonas	(DAO <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. myrtifolia</i>	Antibacteriana	Extrato	(LALL, N.; MEYER, 1999)
	Antifúngica	Extrato	(MOTSEI <i>et al.</i> , 2003)
<i>P. molluginifolia</i>	Anticolinesterásica e Antioxidante	Extrato, frações e isoflavonas	(VENZKE <i>et al.</i> , 2013)
	Anti-inflamatória	Isoflavonas	(ARRUDA-SILVA <i>et al.</i> , 2014)
	Antinociceptiva	Extrato	(NUCCI-MARTINS <i>et al.</i> , 2016)
<i>P. paniculata</i>	Neuroprotetora	Extrato	(BETTIO <i>et al.</i> , 2011; FARINA <i>et al.</i> , 2005)
	Gastroprotetora		(LAPA, FERNANDA DA ROCHA <i>et al.</i> , 2007)
	Antifúngica		(JOHANN <i>et al.</i> , 2011)
	Antidepressiva		(BETTIO <i>et al.</i> , 2011)
	Vasorelaxante		(DA ROCHA LAPA <i>et al.</i> , 2011)
	Hipotensiva		
	Antinociceptiva	Flavonoides	(LAPA, FERNANDA DA R <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. sabulosa</i>	Tripanocida	Extrato e Frações	(PIZZOLATTI, M.G. <i>et al.</i> , 2003)
		Estirilpironas e cumarinas	(PIZZOLATTI, MOACIR G <i>et al.</i> , 2008)
	Ansiolítica	Estirilpironas	(DUARTE <i>et al.</i> , 2007).
	Ansiolítica e Anticonvulsante	Extrato	(DUARTE <i>et al.</i> , 2018)
	Neuroprotetora	Flavonoide	(MARTINS, R. D. P. ET AL., 2009)
	Antidepressiva	Cumarina	(CAPRA <i>et al.</i> , 2010b)
	antifungica	Extrato e Cumarinas	(JOHANN <i>et al.</i> , 2011).
	Anti-inflamatória	Esterol	(BORGES <i>et al.</i> , 2014b)
	Anti-inflamatória	Cumarinas	(NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2015)

Tabela 1- Principais atividades biológicas reportadas para o gênero *Polygala*. (Conclusão).

<i>P. senega</i>	Hipoglicêmico	Xantonas	(KAKO <i>et al.</i> , 1997)
	Imonopotenciação	Saponinas triterpênicas	(ESTRADA <i>et al.</i> , 2000).
	Antioxidante	Flavonoides	(AMAROWICZ <i>et al.</i> , 2004)
	Anti-inflamatória	Extrato	(VAN <i>et al.</i> , 2009)
	Antitumoral	Extrato	(PAUL <i>et al.</i> , 2010, 2011; SHARMA <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. tenuifolia</i>	Antipsicótica	Saponinas	(CHUNG <i>et al.</i> , 2002)
	Neuroprotetora	Extrato	(WANG <i>et al.</i> , 2013)
		Saponinas	(GUO <i>et al.</i> , 2016; LI, CHUANGJUN <i>et al.</i> , 2008)
	Anti-isquêmica	Extrato	(PARK <i>et al.</i> , 2006)
	Antidepressiva	Glicosídeos	(LIU, P <i>et al.</i> , 2010)
	Anti-inflamatória	Extrato	(CHEONG <i>et al.</i> , 2011)
		Glicosídeos	(SHI; JIANG, 2013)
	Antitumoral	Extrato	(XIN; ZHANG; JIANG; CHEN; HUANG; LI; <i>et al.</i> , 2012)
		Polissacarídeo	(XIN; ZHANG; JIANG; CHEN; HUANG; LV; <i>et al.</i> , 2012)
	Antioxidante	Extrato	(NAGAJYOTHI <i>et al.</i> , 2015)
	Toxicidade		(SHIN <i>et al.</i> , 2015)
Anticonvulsiva	Derivado do ácido cinâmico	(ZHAO <i>et al.</i> , 2019)	
<i>P. tricornis</i>	Anti-inflamatória	γ -butirolactamas	(LI, JUN <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. vulgaris</i>	Citotóxica	Xantonas	(DALL'ACQUA <i>et al.</i> , 2002)

Fonte: Atualizada e adaptada de TIZZIANI 2019.

2.4. Espécies do gênero *Polygala* avaliadas nesse trabalho

Este trabalho descreve avaliação química e biológica das espécies *Polygala paniculata*, *Polygala campestris*, *Polygala altomontana*, *Polygala linoides*, *Polygala sabulosa*, *Polygala lancifolia*, *Polygala densiracemosa*, *Polygala pulchella* e *Polygala brasiliensis*. É importante ressaltar que a espécie *P. brasiliensis* está sendo estudada pela primeira vez neste estudo.

2.3. Análises de Perfil Químico

Atualmente métodos de controle de qualidade mais robustos de amostras de produtos naturais, tanto no âmbito alimentício, como farmacêutico e agroindustrial têm sido atraído maior atenção dos pesquisadores em ramos promissores dessas ciências. As técnicas de análise do perfil cromatográfico são exemplos, afinal enfatizam a caracterização integral de composições de amostras com um grau quantitativo de confiabilidade, além de ser possível a identificação e avaliação da estabilidade e robustez da composição química das plantas. Com essa abordagem é possível acessar informações químicas de diferentes matrizes, com cromatogramas, espectros e outros gráficos por meio de diferentes técnicas analíticas. A variedade de técnicas analíticas envolvendo *fingerprints* ou perfis químicos incluem: espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Detector de massas de alta resolução (HRMS), Cromatografia Líquida de Alta Resolução, Cromatografia em Cama Delgada (CCD), eletroforese capilar (CE). Além do mais, sabe-se que existe uma resolução da ANVISA sobre validação de fitoterápicos através dessas técnicas, a Instrução Normativa nº 4, de 18 de Junho de 2014.

Uma tendência geral na última década é melhorar a análise, tecnologias e métodos para a triagem de metabólitos ocorrendo em matrizes complexas. De fato, a química analítica abrange hoje vários campos de estudo inovadores e entre eles metabolômica, uma abordagem relativamente nova baseada principalmente em plataformas analíticas aplicadas para análise de larga escalas, quali ou quantitativa, de misturas complexas de metabólitos de amostras biológicas, desempenhando um papel fundamental quando um grande número de amostras é comparado (Maldini et al 2016 Rosemary). Estudos com desenvolvimento de métodos de análise de perfil químico com monitoração bioguiada têm sido muito explorados em diversos campos da ciência, e tem por objetivo monitorar a atividade biológica de

interesse, aumentando as chances de isolar ou identificar um composto com elevado potencial biológico (LIU et al 2017).

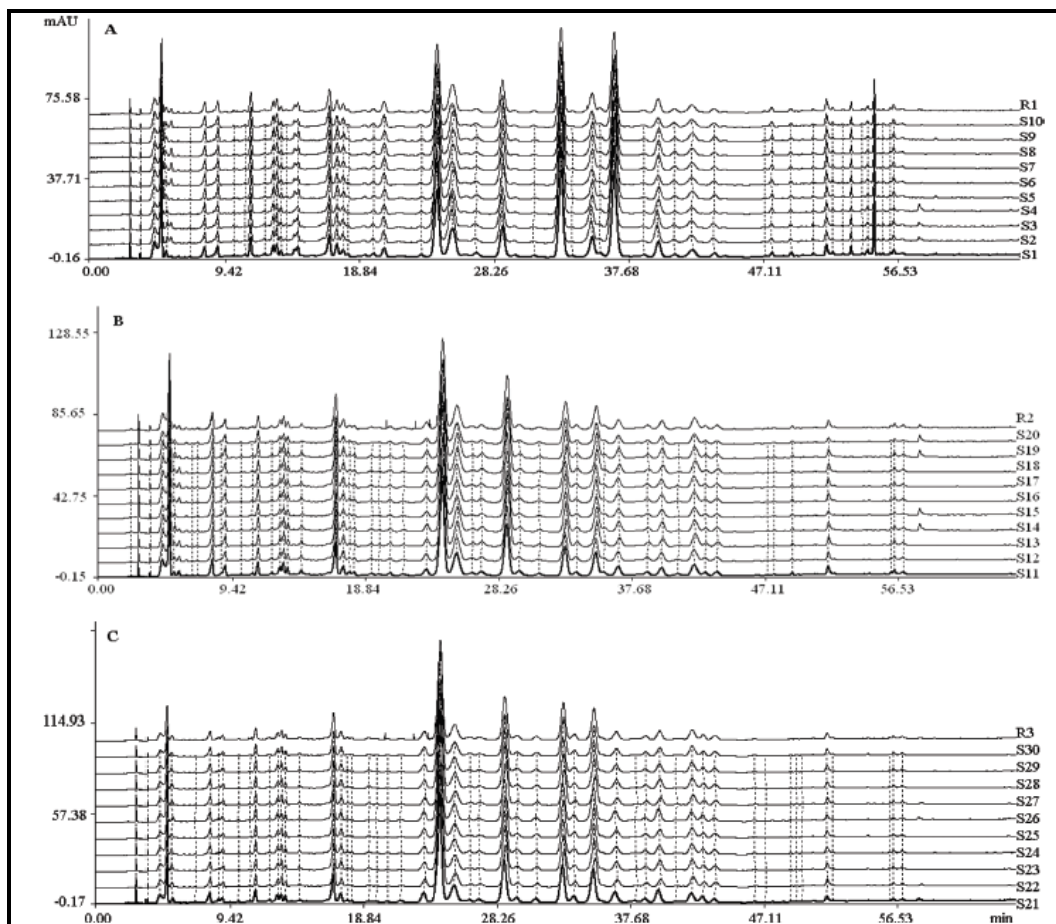
2.3.1 HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A técnica de HPLC com diversos tipos de detectores acoplados é muito utilizada em análises de perfil químico, mostrando assim um perfil químico de toda composição detectável no extrato bruto. O objetivo da análise não é apenas identificar cada composto detectado, mas sim comparar os diferentes perfis metabólicos existentes em função de uma resposta apropriada. Devido às suas vantagens e popularização, a análise de perfil químico por HPLC tem sido extensivamente utilizada. Tendo essa técnica vantagens em termos de controle de qualidade, abordagens sobre a determinação do teor de ingredientes podem implicar numa avaliação abrangente da qualidade de produtos naturais de forma bruta (PINTO, 2014).

Muitas referências apresentam resultados de pesquisa a cerca da qualidade de medicamentos fitoterápicos e mostram que a análise de impressões digitais por HPLC, em frações bioativas, podem correlacionar seus estudos de qualidade aos efeitos curativos e, portanto, deve ser eficaz e apropriado para avaliar a qualidade das plantas para esse fim (LIU, DIANGANG *et al.*, 2017).

Um método utilizando análise de perfil por HPLC analisou extratos de acetato de etila de *Sedi lineare* Thunb, onde os autores avaliam amostras colhidas em diferentes estações e diferentes habitats, além da quantificação de dois compostos ativos contra o câncer e um composto anti-inflamatório. Uma análise resumida diante do estudo permite observar que a melhor época para colheita de *S. Lineare* Thunb. deva ser durante a temporada de floração (**Figura 5**). Além disso, a qualidade das amostras cultivadas em ambientes úmidos foi melhor que em ambientes ensolarados (LIU, DIANGANG *et al.*, 2017).

Figura 5. Análise do perfil químico dos extratos de acetato de etila de *S. linearis* Thunb de vários locais em diferentes épocas do ano. Cromatogramas das amostras colhidas em ambiente ensolarado em abril (A), em ambiente ensolarado e úmido em agosto (B e C).



Fonte: LIU et al, 2017.

O perfil químico cromatográfico pode mostrar as principais características químicas de extratos de plantas com a característica de rapidez dispensando um laborioso trabalho de separação fitoquímica clássica. A título de exemplo, Zhu e colaboradores (ZHU, MINGJUAN *et al.*, 2018) desenvolveram uma metodologia para análise do perfil químico cromatográfico para avaliar a espécie *Toddalia asiatica* e detectou um total de 59 compostos por UPLC-QTOF-MS/MS, incluindo 29 cumarinas, 25 alcalóides, quatro flavonóides e um ácido fenólico em um total de 105 minutos.

Entretanto, o perfil químico cromatográfico não permite a identificação dos principais componentes bioativos nas amostras de forma exata. Para avaliar de forma mais concreta essa questão, a análise quimiométrica pode ser empregada para estabelecer uma relação entre o

perfil químico cromatográfico e bioatividade de extratos vegetais. Uma vez que a quimiometria tem uma grande vantagem para obter informações relevantes de sistemas complexos com métodos de análise multivariada nas áreas de pesquisa ambiental, farmacêutica e alimentos. Alguns métodos estatísticos são clássicos na quimiometria, como análise de cluster (CA), análise de componentes principais (PCA) e análise de regressão de mínimos quadrados parciais (PLS), entre outras.

2.3.2 RMN – Ressonância Magnética Nuclear na análise do perfil químico

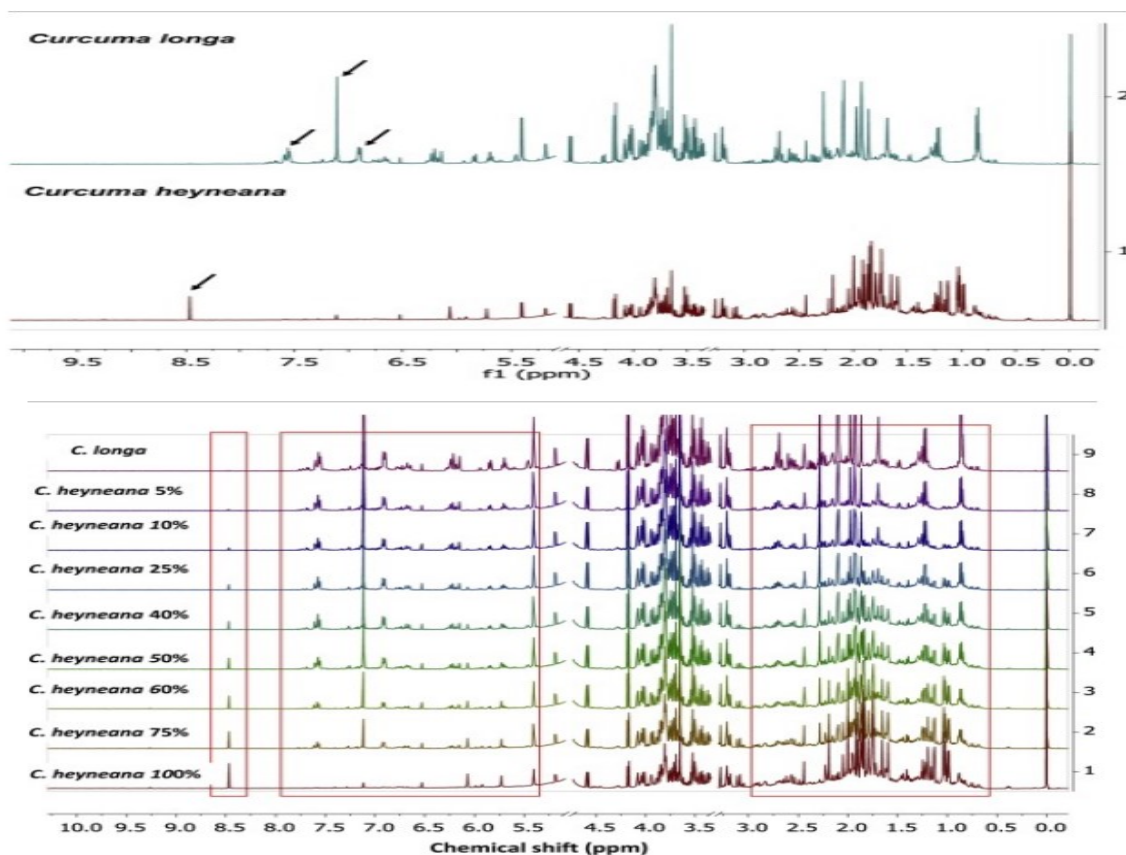
Para uma análise de compostos químicos menores que 1.500 Da, de diferentes funções químicas cuja concentração varia entre pmols a mmols as plataformas analíticas mais empregadas são a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (EM), ambas em conjunto com a análise estatística multivariada. A RMN é uma técnica que não necessita de derivatização dos componentes da amostra, não destrutiva, reprodutível e quantitativa, porém apresenta característica de ser menos sensível comparada a espectrometria de massas. Além do mais, não é necessário introduzir mudanças estruturais nas substâncias envolvidas a fim de se obter alteração nas propriedades físicas dessas, tais como: solubilidade, ponto de fusão, ponto de ebulição entre outras. Com essas vantagens, a RMN foi introduzida como uma das principais técnicas para obtenção e caracterização de perfis metabólicos (TASIC, 2017).

A RMN permite a análise de uma ampla faixa de concentrações de analitos, mesmo em matrizes complexas como plantas, e é uma técnica não destrutiva que pode detectar seletivamente um grande número de compostos simultaneamente. Tendo em vista o sinergismo entre os constituintes químicos das plantas e seu significado medicinal em materiais vegetais, uma análise abrangente do perfil fitoquímico é preferível sobre os constituintes químicos a uma análise para cada composto. As técnicas metabolômicas oferecem uma ótima plataforma para estudar matrizes complexas, pois fornece informações sobre as variações de constituintes químicos em diferentes circunstâncias, assim como também a análise de compostos bioativos sinérgicos. A RMN ^1H é uma ferramenta poderosa na detecção e quantificação de metabólitos dentro de uma matriz de amostra (DE SOUZA ARAÚJO *et al.*, 2019; ROCHA BAQUETA *et al.*, 2021)

Trabalhos que empregam as técnicas de análise de perfis químicos de metabólitos baseados em RMN de ^1H e quimiometria evidenciam a eficiência das mesmas. Na figura 9, está um perfil químico espectroscópico, onde os autores demonstram que há distinção entre o

pó puro e o adulterado de *Curcuma longa* com *C. heyneana* (Curcuma). Os espectros ^1H -RMN representativos demonstraram uma clara diferença na região aromática quando comparados os extratos de *C. longa* e *C. heyneana* (Figura 6; WINDARSIH; ROHMAN; SWASONO, 2019).

Figura 6. Espectros de RMN de ^1H de *C. longa* e *C. heyneana* e espectros de *C. longa* pura e adulterada (5-100 % de pureza de *C. longa*).



Fonte: WINDARSIH; ROHMAN; SWASONO, 2019.

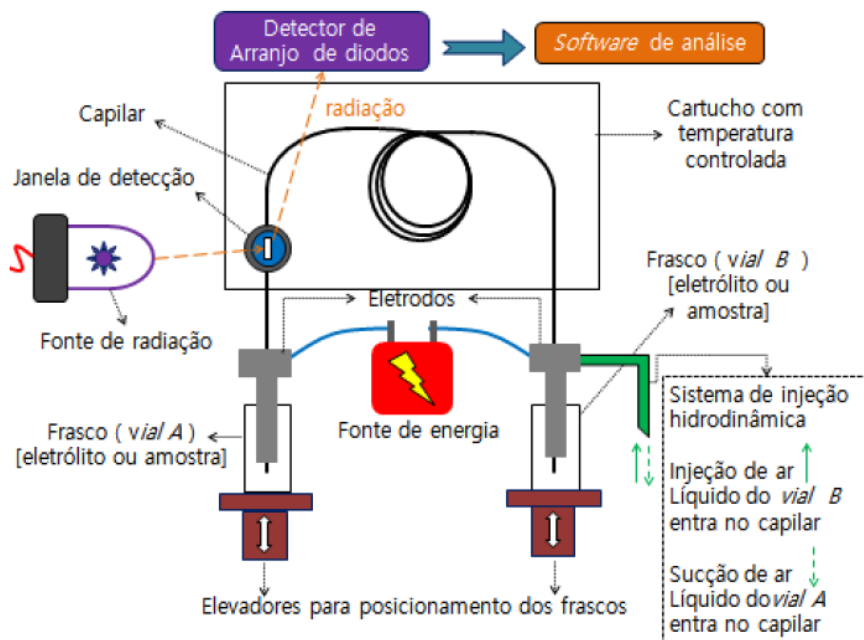
2.3.3. Eletroforese Capilar

A CE se baseia em uma técnica de separação de compostos iônicos ou ionizáveis contidos em um tubo oco, fundamentado pela migração diferencial dos compostos na presença de um campo elétrico, que é obtido por meio da aplicação de uma diferença de potencial nas extremidades do tubo (capilar). As grandes vantagens da CE incluem o baixo custo analítico, o simples manuseio e operação, a alta eficiência de separação, tempo de execução das análises, o baixo consumo de amostra e solvente, sendo a água o solvente mais utilizado, gerando quantidade mínima de resíduo, além do rápido desenvolvimento de métodos (SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, 2012; WORSFOLD *et al.*, 2019).

Na técnica podem ser utilizados capilares de sílica com diâmetros internos diferentes, capilares retos, com percurso de luz ampliada ou capilares revestidos, tornando a mesma promissora com relação à versatilidade na instrumentação. A composição do tampão (aquosos, não-aquoso) diretamente depende dos analitos em questão e do modo de separação escolhido. A detecção se dá desde o uso dos detectores mais comumente utilizados como o de UV-Vis e de arranjo de diodos (DAD) a outros já descritos, como detectores de fluorescência, amperométricos, eletroquimioluminescência e a espectrometria de massas (GANZERA, 2008; SCRIBA, G. K. E.; BELAL, 2015).

Na **figura 7** está representado um equipamento de eletroforese capilar com detecção por UV-VIS e sistema de injeção hidrodinâmica. Nesse sistema, um cartucho acondiciona o capilar e a temperatura pode ser monitorada no mesmo. Os eletrodos para aplicação da voltagem ficam parcialmente submersos no interior dos frascos durante a injeção das amostras. A diferença de potencial aplicada gera a migração diferencial dos analitos no interior do capilar, alcançando então uma janela de detecção. Os sinais analíticos obtidos pelo detector são transformados pelo software de análise em eletroferogramas (Sako 2019).

Figura 7. Esquema representativo de um equipamento de CE com sistema de injeção hidrodinâmica e detecção por espectroscopia de UV- VIS.



Fonte: Sako, 2019.

2.3.3.1 Eletroforese Capilar de Zona

A modalidade mais simples da técnica é a eletroforese capilar de zona (CZE), onde os analitos migram em zonas discretas e em velocidades diferentes. Porém, para separar analitos neutros, é necessário utilizar estratégias diferentes. Na eletroforese capilar os compostos migram em diferentes velocidades devido ao campo elétrico presente no canal de separação. Esse campo elétrico proporciona uma mobilidade para cada íon, além de uma direção específica para uma das extremidades do capilar. A força iônica do meio é um dos fatores que determina a mobilidade dos íons, se a força iônica do meio for baixa, a mobilidade iônica do íon pode ser calculada. Sendo assim, um mesmo analito pode ter formas iônicas distintas, portanto as frações molares de cada forma ionizada do analito devem ser consideradas. Existe ainda, um termo reportado como mobilidade aparente, que é a mobilidade calculada levando em consideração o comprimento do capilar que o analito percorre até atingir a janela de detecção.

Quando o interior do capilar está em contato com um eletrólito de pH superior a 3, a sua superfície interna se apresenta carregada negativamente, com os grupos silanóis moderadamente protonados. Os cátions do eletrólito de corrida são encontrados em leve excesso na região próxima a superfície carregada, exercendo um papel de contrabalancear a carga negativa, além de alguns cátions que adsorvem fortemente na superfície. Existindo ainda, adjacente à superfície do capilar, uma camada compacta de cátions não adsorvidos que não se movem durante a aplicação de potencial devido a fortes interações do tipo dipolo entre as moléculas de água quando o campo elétrico é aplicado. Adjacente à essa camada compacta é formada uma camada difusa, onde os cátions ainda estão em razoável excesso e se movem livremente devido a diferença de potencial aplicada, gerando a migração dos cátions e suas camadas de hidratação, o que acarreta num fluxo de toda solução em direção ao eletrodo de carga negativa, sendo então denominado como fluxo eletrosmótico (POOLE, 2003; SAKO *et al.*, 2018; VITALI *et al.*, 2014).

Apesar de algumas desvantagens que o fluxo gera, o mesmo permite realizar análises de cátions e ânions em uma mesma corrida. A susceptibilidade a variações acarreta num prejuízo na reprodutibilidade dos métodos, além de fatores como condições de ausência de equilíbrio entre eletrólito e superfície do capilar, variações de temperatura, a composição da matriz amostral, a eletrólise dos componentes do eletrólito e o volume de amostra injetada (SCHAEFER; SEPANIAK, [S.d.]). A distribuição desigual das cargas da superfície também

pode gerar fluxos não axiais com efeitos imprevisíveis sobre a separação (SLATER GW, TESSIER F, 2010).

2.3.3.2 Análises de matrizes vegetais por CE

Um método de eletroforese capilar de alta performance (HPCE) foi utilizado para estabelecer uma análise de perfil químico dos compostos bioativos da planta *Schisandra Chinensis* para controle de qualidade. Os autores concluíram que o método foi preciso e confiável, podendo fornecer uma base científica para a avaliação da qualidade dos materiais medicinais das espécies de *Schisandra*. (SUN *et al.*, 2019)

Para avaliar a qualidade do pólen *Typhae* usado na medicina tradicional chinesa, um método de eletroforese capilar de alto desempenho (HPCE) foi desenvolvido e validado para análise do perfil químico e quantificação de oito principais flavonóides bioativos na espécie (naringenina, isorhamnetina 3-O-2(g)- α -1-ramnosil-rutinosídeo, ramnetina 3-O-neohesperidosídeo, isorhamnetina, quercetina 3-O-2(g)- α -1-ramnosil-rutinosídeo, quercetina 3-O-neohesperidosídeo, canferol e quercetina. A análise do perfil químico foi baseado na seleção de nove picos cromatográficos característicos e a análise quantitativa foi eficiente, já que a recuperação de todos os oito compostos ficou na faixa de 98,5 a 102,2% com boa linearidade ($R^2 > 0,9919$). O método analisou 14 amostras diferentes e os resultados indicaram que o ensaio foi reprodutível e preciso na análise da qualidade do pólen *Typhae* (HAN *et al.*, 2012).

Um estudo realizado com a quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), um grão andino com propriedades nutricionais excepcionais, muito rico em proteínas e com amplo espectro de aminoácidos, apresentou o desenvolvimento de um método rápido e simples de eletroforese capilar com detecção de arranjo de diodos de absorção ultravioleta (CE-UV-DAD), para obtenção dos perfis eletroforéticos de extratos de proteínas solúveis de diferentes variedades de grãos de quinoa. Os autores utilizaram ainda, métodos quimiométricos como análise multivariada alternando mínimos quadrados, MCR-ALS, seguido de análise de componentes principais, PCA e análise discriminante de mínimos quadrados parciais, PLS-DA. Os pesquisadores concluíram que o método desenvolvido e aplicado às variedades de quinoa foi útil para classificação da composição proteica diferencial das amostras e análise dos componentes presentes nos eletroferogramas (GALINDO-LUJÁN *et al.*, 2021).

2.3.5. Quimiometria

A ciência tem se avançado muito em diversas áreas de estudo, e a quimiometria tem grandes responsabilidades nesse quesito. A mesma tem se difundido rapidamente, demonstrando grande utilidade na extração de informações dos mais variados sistemas químicos. Além do uso na academia, a indústria química utiliza a análise multivariada para aperfeiçoar seus processos e, nesse sentido, promove também a demanda por formação de profissionais com o conhecimento necessário, sendo então de grande importância para o desenvolvimento de diversos setores no país (WINNING *et al.*, 2008).

A análise quimiométrica envolve a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para investigar, interpretar, classificar e principalmente, fazer previsões a partir de compêndios de dados de interesse químico. O planejamento de experimentos está inserido dentro das mais importantes subdivisões da quimiometria, além do reconhecimento de padrões e a calibração multivariada. A busca pelas variáveis que mais afetam determinados processos, e as interações entre elas é a principal ideia na área de planejamento de experimentos. Já quando se trata do reconhecimento de padrões, pretende-se encontrar agrupamentos de amostras (objetos), derivados de uma grande quantidade de informações (espectros, cromatogramas, etc), que sejam similares entre si e, assim, analisar e detectar tendências nos dados. Por outro lado, na calibração multivariada, a intenção se estabelece em encontrar um modelo que correlacione as medidas realizadas com algumas propriedades, como por exemplo, a concentração (DA-COL; DANTAS; POPPI, 2017).

Nestes métodos, modelos matemáticos multivariados correlacionam a concentração do analito com toda a faixa espectral, possibilitando predições estatisticamente confiáveis mesmo na presença de interferentes, desde que estes sejam conhecidos. O uso destas técnicas permite uma significativa redução no custo, tempo e resíduos gerados, quando comparado às técnicas cromatográficas sem esse tipo associação (DE SOUZA; POPPI, 2012).

A quimiometria está fortemente vinculada à pesquisa de produtos naturais. Porém, nem sempre houve tais ferramentas associadas a essa linha de pesquisa. A rotina numa pesquisa de produtos naturais, de síntese e na indústria farmacêutica se dá pelo uso de técnicas espectroscópicas diversas para a elucidação estrutural de substâncias isoladas de produtos naturais ou resultantes de sínteses. Quando se trata de substâncias desconhecidas, para a determinação de suas estruturas é imprescindível a utilização de técnicas espectroscópicas avançadas e a análise integrada dos vários tipos de espectros obtidos. Porém, o que ocorre é uma constante no isolamento de substâncias com estruturas já conhecidas,

resultando em gastos desnecessários de tempo e elevação de custos. Com a quimiometria, a proposta para a identificação e quantificação de substâncias pode ganhar tempo e economizar recursos financeiros, devido ao uso de técnicas mais simples e de menor custo (LIU *et al.*, 2011).

2.3.6. Validação de dados analíticos

Metodologias desenvolvidas para propostas de análises utilizando as técnicas analíticas relatadas nesse trabalho devem ser submetidas à validação através da avaliação de parâmetros como: especificidade, linearidade, repetibilidade e precisão intermediária, recuperação, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). A especificidade dos compostos deve ser analisada por meio de varreduras espectrais a fim de verificar o seu comportamento espectral no pH dos testes e avaliar a interferência dos solventes e soluções tampão nas análises (INDRAYANTO, 2018).

A linearidade pode ser avaliada através do coeficiente de correlação (r) e do coeficiente de determinação (R^2) construindo-se uma curva de calibração para cada composto em, pelo menos em cinco níveis de concentração (em duplicata), variando de acordo com as concentrações utilizadas em cada análise (ARAGÃO, NÁDIA MACHADO DE, VELOSO, MÁRCIA CRISTINA DA CUNHA E ANDRADE, 2009).

A repetibilidade pode ser expressa através do coeficiente de variação (CV%), como por exemplo pela injeção de três concentrações, baixa, média e alta, em triplicata. A precisão intermediária pode ser avaliada através de injeções em triplicata em três dias diferentes (Anvisa).

A recuperação pode ser avaliada através da adição da substância a uma matriz isenta de substância em três concentrações (baixa, média e alta) seguida de extração e quantificação (INDRAYANTO, 2018).

O limite de detecção e o limite de quantificação podem ser calculados com base nas equações (1) e (2), respectivamente,

$$LD = \frac{(3,3 \times s)}{a} \quad (1) \qquad LQ = \frac{(10 \times s)}{a} \quad (2)$$

onde s é o desvio padrão do intercepto e a é a inclinação da curva analítica (Aragão *et al.*, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os constituintes químicos e a atividade antibacteriana das espécies de *Polygala* do Sul do Brasil empregando multiplataformas analíticas, desenvolvendo e validando as metodologias em questão para análise e investigação dos dados de extratos e amostras isoladas de espécies de *Polygala*.

3.2 Objetivos Específicos

- i. Coletar as espécies do gênero *Polygala* descritas no sul do Brasil e, eventualmente, de outras regiões, preparando as exsiccatas e depositando-as no herbário;
- ii. Preparar os extratos brutos das folhas, flores, caules e raízes das espécies coletadas;
- iii. Caracterizar dados de perfil metabólico nos extratos utilizando HPLC-UV
- iv. Desenvolver metodologia por CZE para quantificação do elicitor ácido salicílico nos extratos das diferentes partes das plantas.
- v. Desenvolver metodologia por CZE para análise qualitativa e quantitativa de biomarcadores do gênero.
- vi. Caracterizar o perfil químico dos extratos utilizando métodos espectroscópicos de RMN.
- vii. Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) através do método de microdiluição em caldo.
- viii. Submeter os extratos para identificação e quantificação dos fenólicos bioativos no gênero *Polygala* através de metodologia LC -MSMS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal e Extração

4.1.1. Material botânico

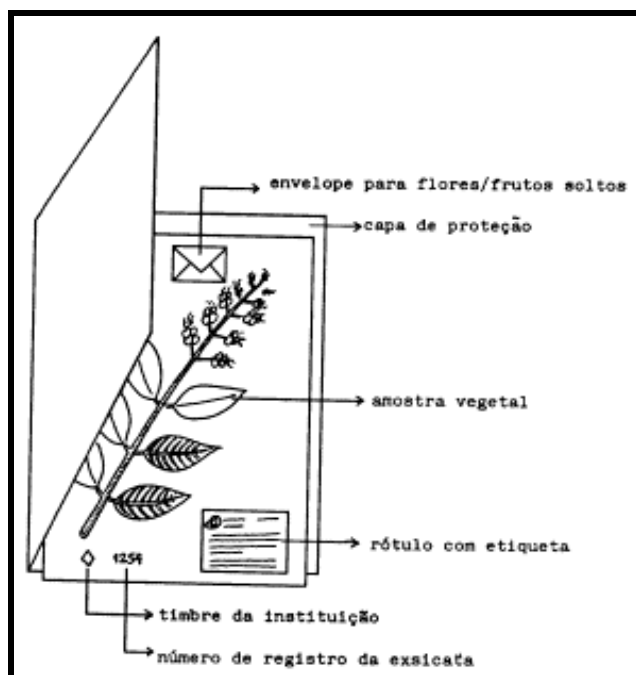
As nove espécies de *Polygala* (**Tabela 2**) foram coletadas no Sul do Brasil, nos municípios de Rancho Queimado, Urubici e Florianópolis, no estado de Santa Catarina. A coleta foi realizada no período da manhã. Parte do material foi destinada à preparação das exsiccatas para realização da avaliação da identidade das espécies (realizada na UFSC pela Silvia Venturi), como representado pela **Figura 8**, e depositadas no Herbário FLOR da Universidade Federal de Santa Catarina e na UPCB da Universidade Federal do Paraná. As coordenadas geográficas, datas de coleta e comprovante de espécime também estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Coordenadas geográficas dos locais de coleta das espécies.

Espécies	Data de coleta	Coordenadas geográficas		Registro de exsiccatas
		longitude	latitude	
<i>Polygala pulchella</i>	09/2014	27° 40' 21'' S	49° 01' 18" W	28555
<i>Polygala lancifolia</i>	08/2014	26° 19' 25'' S	49° 18' 26'' W	5005
<i>Polygala densiracemosa</i>	09/2014	28° 09' 32'' S	49° 45' 25'' W	5009
<i>Polygala altomontana</i>	10/2014	28° 09' 38'' S	49° 37' 10'' W	55186
<i>Polygala brasiliensis</i>	09/2014	28° 00' 54'' S	49° 35' 30" W	5008
<i>Polygala sabulosa</i>	11/2019	27°40' 58.8'' S	49°08'54.4" W	68970
<i>Polygala linoides</i>	11/2019	27° 40' 59'' S	49° 08' 54.4"W	68969
<i>Polygala campestris</i>	11/2019	27°40' 58.8'' S	49° 08' 54.4"W	68968
<i>Polygala paniculata</i> D.*	10/2019	27° 26'54.5'' S	48°31'53.1" W	68967
<i>Polygala paniculata</i> G.*	03/2020	27° 36' 32'' S	48° 26 '17'' W	68971

Legenda: * D foi coletado na praia da Daniela e G na praia do Gravatá em Florianópolis.

Figura 8. Esquema de preparação de exsicata para depósito em herbário.



Fonte: Etnobotânica em:

<http://www.iepa.ap.gov.br/pnpg/Oficinas/Etnobotanica/Etnobotanical.htm>

4.1.2. Instrumentação

Para evaporação dos solventes dos extratos e frações foi utilizado rotavapor BUCHI modelo R3000 e estufa de secagem a vácuo UNIQUE modelo USC3380. As pesagens foram efetuadas em balança analítica Shimadzu AX2008.

4.1.3 Solventes e reagentes

Na cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram utilizadas Sílica gel 60G, Sílica gel 60GF₂₅₄, e cromatofolhas de alumínio CCF-C/25 20X20 cm, da Merck. Para a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram utilizadas Sílica gel 60G e Sílica gel 60 PF₂₅₄, também da Merck.

Os solventes de grau HPLC utilizados foram da marca Merk e os de grau PA são da marca NEON e LabSynth. Já os solventes para análise espectroscópica por RMN ¹H foram solventes deuterados da marca Merck.

4.1.4 Métodos para Obtenção dos Extratos

Após coleta, o material botânico foi seco à temperatura ambiente durante 7 dias, na sombra. Todo o material vegetal (9 espécies) foi, separadamente (caule, flores, raízes e flores) triturado em moinho de facas (tamiz 40 mesh), tamizados (20-25 mesh), resultando em 39

amostras secas, que foram armazenados ao abrigo da luz e do calor. Depois de seco o material botânico, ou seja, as 39 amostras foram colocadas em maceração com etanol, realizando assim este processo de 3-7 ciclos de sete dias, seguido de filtração e concentração em evaporador rotativo à pressão reduzida. Os extratos concentrados foram mantidos em estufa (máximo 40 °C) até total secagem do material, obtendo-se assim o extrato bruto para as posteriores análises.

4.1.5. Amostras de extratos

Após obtenção dos 39 extratos etanólicos brutos secos, os mesmos foram protegidos da exposição à luz durante todo o processo, para preservação dos metabólitos secundários fotossensíveis eventualmente presentes. Após o procedimento de extração, a massa sólida dos extratos foi pesada e foram preparadas soluções estoque de 5000 mg L⁻¹ em etanol. As soluções estoque foram armazenadas a 25 °C até a análise. Para a injeção no sistema CE, as amostras foram diluídas em água até concentração de 1000 mg L⁻¹, sonicadas, homogeneizadas em vórtex por 1 min, ultrasonizadas (42 kHz) a 25 °C por 1 min e centrifugadas.

4.2. OBTENÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS POR HPLC-UV

As separações cromatográficas foram feitas empregando-se sistema HPLC-DAD *Agilent Technologies 1200 Series*, equipado com detector de arranjo de diodos, degaseificador online, bomba quaternária, que conduziu a fase móvel empregada em um gradiente de água e acetonitrila, de 0 a 5 minutos 60% de ACN e 40% de H₂O; entre 5 e 10 minutos 100% de ACN e; de 10 a 20 minutos, retorna para 60% de ACN e 40% de H₂O sob uma taxa de fluxo de 0,250 mL·min⁻¹ e pressão máxima de 400 bar. Utilizou-se coluna *Synergi Polar-RP* (30 cm x 150 mm x 2 mm), com tamanho de partícula de 4µm e porosidade de 80 Å, marca *Phenomenex*, acomodada no compartimento de colunas com controle de temperatura independente a 30 °C. O volume de injeção das amostras e dos padrões foi de 5 µL, utilizando autoamostrador e os analitos foram monitorados em comprimento de onda 256 nm e 360 nm. Para aquisição e tratamento de dados foi utilizado o software *Chemstation*[®], versão Rev. B.04.03 fornecido pelo fabricante do equipamento.

4.3. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR LC-ESI-MS/MS

As análises das 39 amostras de extratos foram realizadas em um cromatógrafo Agilent® 1200, com coluna Phenomenex® Synergi 4 μ Polar-RP 80A (150 mm x 2 mm DI, tamanho de partícula de 4 μ m) a uma temperatura de 30 ° C. Os solventes do eluente foram A (MeOH / H₂O na proporção de 95: 5, v v-1) e B (ácido fórmico 0,1%) da seguinte forma: 1º estágio - 10% solvente A e 90% B (modo isocrático) por 5 minutos ; 2ª etapa - gradiente linear dos solventes A e B (de 10% a 90% de A) por 2 minutos; 3º estágio - 90% de A e 10% de B (modo isocrático) por 3 minutos; 4ª etapa - gradiente linear dos solventes A e B (de 90% a 10% de A) por 7 minutos com vazão de 250 μ L min⁻¹ na fase móvel. O volume injetado em todas as análises foi de 5 μ L.

O cromatógrafo líquido foi acoplado a um sistema de espectrometria de massa constituído de um espectrômetro de massa híbrido triplo quadrupolo / Ion trap Qtrap® 3200 (Applied Biosystems / MDS SCIEX, EUA) com TurboIonSpray® como fonte de ionização, em modo de ionização positiva. Os parâmetros de fonte usados foram: interface de spray iônico (temperatura de solvatação) a 400 ° C; voltagem da energia de ionização 4500 V; gás de cortina, 10 psi; gás nebulizador, 45 psi; gás auxiliar, 45 psi.. O software Analyst® (versão 1.5.1) foi utilizado para registro e processamento dos dados. Os pares de íons foram monitorados no modo MRM (Multiple Reaction Monitoring). A análise de HPLC-ESI-MS / MS foi realizada usando os parâmetros de pré-tratamento da amostra, cromatográficos e espectrômetro de massa previamente descritos por Schulz et al., (2015). As amostras foram preparadas dissolvendo 50 mg do material (extratos de metanol) em uma solução de 5 mL de ácido clorídrico a pH 2. Essas soluções foram extraídas três vezes com 2 mL de éter etílico de cada vez e os três extratos foram combinados. Depois de secar o extrato combinado, ele foi armazenado em um recipiente selado em -20 ° C. Antes das análises, o material seco foi dissolvido em 1 mL de MeOH e centrifugado a 12.000 rpm por 120 s.

Para a identificação e quantificação dos compostos, 4 fenólicos padrão foram analisados nas mesmas condições descritas acima, sendo eles a Rutina, escopoletina, apigenina e quercetina.

4.4. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO SALICÍLICO EM PLANTAS POR CZE

4.4.1 Instrumentação

Para desenvolvimento do método para quantificação de ácido salicílico, os experimentos foram realizados em um sistema CE HP 3D (da Agilent Technologies, Palo Alto, EUA) equipado com um detector de arranjos de diodos (DAD) e software ChemStation para controle, processamento e aquisição de dados. A separação foi realizada em um capilar de sílica fundida de 32,0 cm de comprimento total (8,5 cm de comprimento efetivo \times 50 μ m D.I. \times 375 μ m D.O.) da Polymicro Technologies (Phoenix, EUA). O BGE era composto por 15 mmol L⁻¹ de TRIS e 30 mmol L⁻¹ de HIBA em pH 3,9 (preparado diariamente). O capilar foi condicionado por lavagem com NaOH 1 mol L⁻¹, água e BGE por 5 min cada. Entre as corridas, o capilar foi enxaguado por um minuto com o BGE. As 39 amostras dos extratos e padrões foram injetados hidrodinamicamente (50 mbar por 3s) a 25 ° C e analisados usando detecção a 214 nm. A tensão de separação aplicada foi de 30 kV, com polaridade positiva no lado da injeção.

4.4.2 Reagentes

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico, solventes de alta pureza cromatográfica e água ultrapura Milli-Q, Millipore, Bedford, EUA. O hidróxido de sódio (NaOH) (\geq 97%) foi fornecido pelo Labsynth (São Paulo, Brasil). O metanol e o etanol foram obtidos na Tedia (São Paulo, Brasil). Ácido α -hidroxiisobutírico (HIBA), adquirido da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil) e tris (hidroximetil) aminometano (TRIS), adquirido da Labsynth (Diadema, SP, Brasil), foram usados no eletrólito de base (BGE) Soluções padrão (1000 mg L⁻¹) de ácido salicílico (SA) e ácido ftálico (PA - Padrão Interno) foram obtidas da Sigma Aldrich e diluições foram preparadas em água diariamente.

4.4.3 Validação

A validação do método foi realizada com base nos parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ). Curvas de calibração com cinco níveis de SA e PA na faixa de 1-5 mg L⁻¹ foram preparadas em três réplicas genuínas e injetadas em triplicata. LOD e LOQ foram calculados usando as equações $LOD = (3,3 \times s) / S$ e $LOQ = (10 \times s) / S$, onde s é o desvio padrão de interceptação e S é a inclinação da equação da curva analítica externa.

O parâmetro de precisão foi avaliado em termos de repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia). Para intra-dia, AS e AF foram injetados em três repetições independentes e a precisão inter-dia foi avaliada por meio da análise de três níveis de concentração de soluções padrão em três repetições independentes ao longo de três dias. Os resultados foram expressos como o desvio padrão relativo (RSD), que foi calculado usando a equação $RSD = (P / \bar{u}) \times 100$, onde P é o desvio padrão absoluto e \bar{u} é a média aritmética da razão da área do analito para o padrão interno, média aritmética do tempo de migração ou tempo de migração corrigido do analito em função do tempo de migração do padrão interno.

O método de adição padrão foi a metodologia usada para avaliar a precisão, onde uma amostra de extrato de planta foi testada, duas quantidades conhecidas de ácido salicílico foram adicionadas às amostras (1 mg L^{-1} e 5 mg L^{-1}) e as amostras foram novamente testadas. A diferença entre os resultados da amostra com e sem adição de padrão foi comparada com a resposta esperada.

4.5 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS BIOATIVOS 1,5 DIHIDROXI-2,3DIMETOXI XANTONA E RUTINA EM EXTRATOS DE *POLYGALA*.

4.5.1. Instrumentação

Todos os experimentos foram realizados em um sistema CE (AgilentTechnologies, modelo 7100, Palo Alto, EUA) equipado com detector de arranjo de diodos e software de tratamento de dados (HP ChemStation). A separação foi realizada em um capilar de sílica fundida de 38,5 cm de comprimento total (32 cm de comprimento efetivo \times $75\mu\text{m}$ I.D. \times $375\mu\text{m}$ O.D.) da Polymicro Technologies (Phoenix, EUA). O eletrólito de fundo (BGE) foi composto por 30 mmol L^{-1} de TBS e 20% de metanol a pH 9,10 (preparado diariamente). O capilar foi condicionado por lavagem com 1 mol L^{-1} de NaOH, água e BGE por 10 min cada. Entre as corridas, o capilar foi lavado por um minuto com o BGE. A amostra foi injetada hidrodinamicamente ($50 \text{ mbar}\cdot\text{s}^{-1}$) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e analisada usando detecção a 280 nm. A tensão de separação aplicada foi de 25 kV, com polaridade positiva no lado da injeção.

4.5.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas usando reagentes de grau analítico, solventes de pureza cromatográfica e água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Bedford, EUA). O tetraborato de sódio (STB) ($\geq 99\%$) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). O hidróxido de sódio (NaOH) ($\geq 97\%$) foi fornecido pela Labsynth (São Paulo, Brasil). O metanol foi obtido da Tedia (São Paulo, Brasil). Soluções padrão (1000 mg L^{-1}) de 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (X1) e Rutina (R1) foram obtidas de *Polygala paniculata* por isolamento usando métodos cromatográficos e 2 naftol (Padrão Interno - IS) foram preparados em água Diário. O extrato (1000 mg.L^{-1}) foi preparado em água diariamente. As soluções estoque (100 mmol.L^{-1}) de X1 e R1 foram preparadas separadamente em água.

4.5.3. Amostras

A amostra de extratos foi obtida da extração da maceração de *Polygala paniculata* pelo laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As amostras foram armazenadas em solvente de metanol a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ até a análise. A amostra foi diluída em água até a concentração de 1250 mg.L^{-1} , triturada, homogeneizada e pesada $5,0 \pm 0,1 \text{ g}$ em frascos de polietileno de 5 mL . As amostras foram agitadas em vórtex por 2 min e colocadas em banho ultrassônico (42 kHz) a 25°C por 5 min e então analisadas no sistema CE.

4.5.4. Validação

A validação do método foi realizada com base nas diretrizes da ANVISA (PINTO, 2014), visando garantir o monitoramento dos fitoterápicos. Os parâmetros avaliados foram linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação.

4.6 ANÁLISES DO PERFIL QUÍMICO DAS ESPÉCIES DE *POLYGALA* POR RMN DE ^1H

As análises de RMN ^1H foram realizadas no instituto de química da USP em São Paulo, sob supervisão do Prof Massuo Jorge Kato e seu grupo de pesquisa. O solvente utilizado foi Dimetilsufóxido deuterado ($\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$). Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em espectrômetros Bruker operando na frequência de 500 MHz em um campo de 11.7440 Tesla , equipado com sonda dual de 5 mm .

4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE *POLYGALA* ATRAVÉS DE METODOLOGIAS *IN VITRO*.

4.7.1. Cultivo das cepas bacterianas

A atividade antibacteriana foi avaliada frente à bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e às bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Para fins de proporcionar um meio de crescimento desses patógenos, os mesmos foram adicionados ao caldo BHI durante 24 h a 37 °C em estufa, e posteriormente semeados em ágar Mueller Hinton (24 h a 37°C), para a reativação das cepas bacterianas.

O inóculo bacteriano foi preparado adicionando-se algumas colônias bacterianas em solução fisiológica estéril, e sua turbidez foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland (5×10^8 UFC mL⁻¹) a 620 nm em espectrofotômetro.

4.7.2. Método de microdiluição em caldo frente às bactérias com parede celular

A microdiluição em caldo, em placas contendo 96 micropoços foi a metodologia utilizada, conforme recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Os extratos foram diluídos a 20 mg mL⁻¹ em dimetilsulfóxido (DMSO) e colocados nos primeiros poços da microplaca, em seguida transferidas para os micropoços adjacentes, os quais já continham caldo Mueller-Hinton (MH), com o objetivo de se obter diluição seriada de ordem dois. Ao inóculo bacteriano foi adicionado (10 µL) em cada micropoço. Alguns poços de cada microplaca foram reservados para a realização do controle negativo (caldo (MH) + DMSO + inóculo bacteriano), controle de crescimento (caldo (MH) + inóculo bacteriano) e para o controle de esterilidade do meio de cultura (caldo MH). Como controle positivo, as bactérias em estudo foram incubadas com o antibiótico gentamicina, em concentrações variando de 40 a 0,31 µg mL⁻¹.

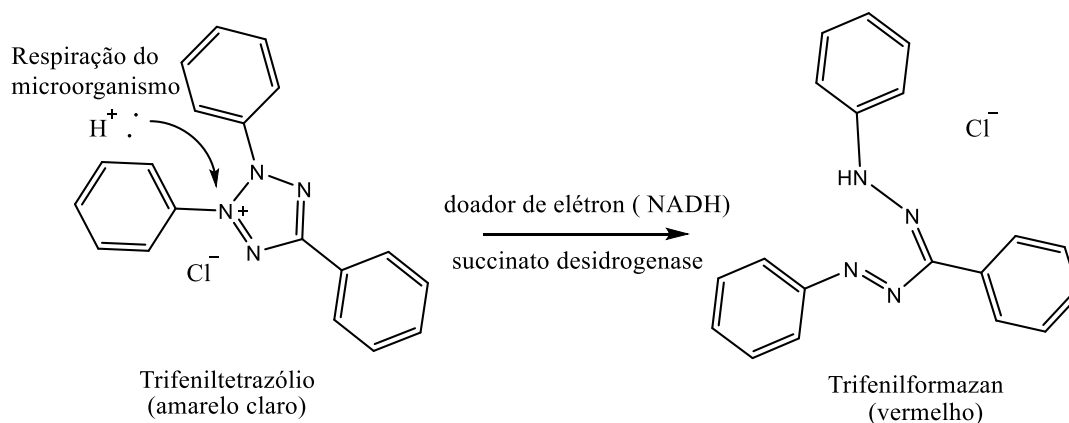
Posteriormente as microplacas foram incubadas aerobicamente a 37 °C ± 1 °C, por 24 horas. Após a incubação, o crescimento bacteriano foi verificado adicionando-se 10 µL de uma solução metanólica de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (5 mg mL⁻¹) em cada micropoço. O crescimento bacteriano foi avaliado após duas horas, observando a formação de um “botão”

avermelhado no meio de cultura. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a última concentração da amostra capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Para análise dos resultados obtidos da avaliação da atividade antibacteriana foram usados os critérios descritos por Machado e colaboradores (2005), onde valores de CIM abaixo de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ tem boa atividade antimicrobiana; CIM de 100 a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ representa atividade antimicrobiana moderada; CIM de 500 a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ representa uma fraca atividade e CIM acima de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ sugere que o extrato ou fração é inativo.

Um indicador foi utilizado para a visualização do crescimento bacteriano nos micropoços, sendo o mesmo o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TCC; **Figura 9**). Quando este composto entra em contato com um microrganismo que seja capaz de degradar fontes de carbono, reage com os elétrons que são liberados e é reduzido a trifenilformazan (TPF), que, diferente do NADH, não é metabolizado e “envenena” o sistema, mas torna possível a medida da atividade metabólica pela visualização da coloração vermelha, conforme ilustrado na **Figura 9** (OLGA *et al.*, 2008).

Figura 9. Indicador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio sendo reduzido a trifenilformazan.



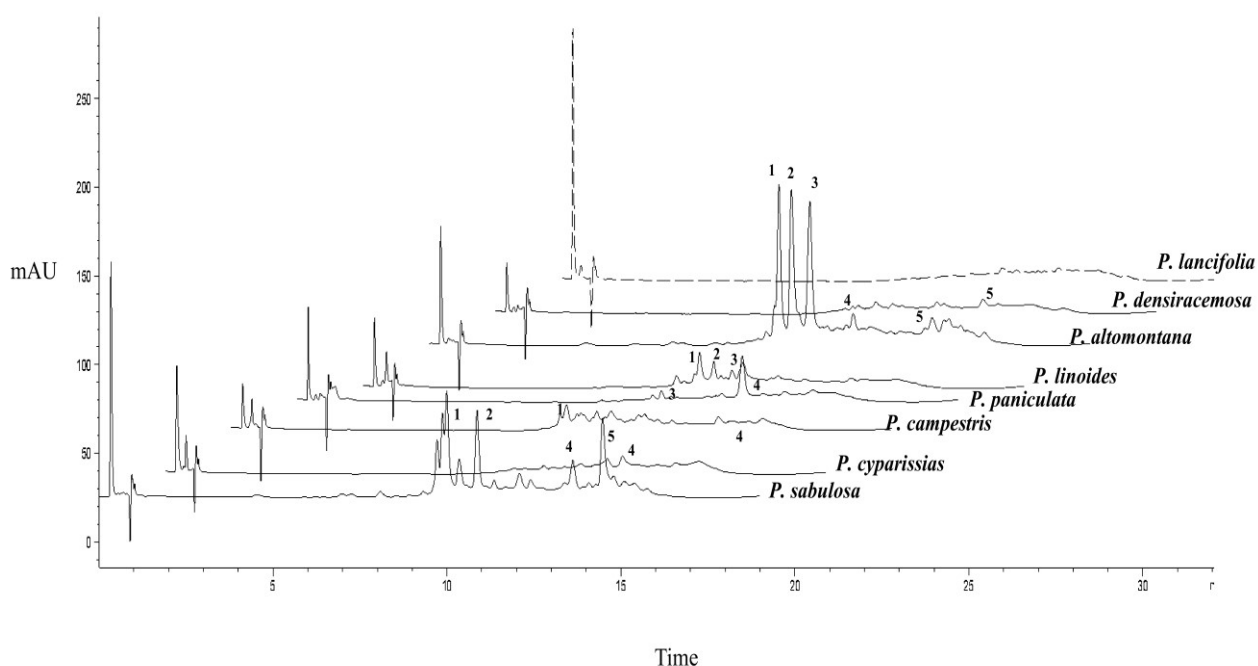
Fonte: Paganelli (2020).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2. Obtenção do perfil cromatográficos dos Extratos por HPLC-UV

Uma análise de triagem dos extratos de diferentes espécies do gênero *Polygala* foi realizada para obtenção de um perfil cromatográfico para análise *target* de alguns compostos comumente isolados no gênero. Na **figura 10** são apresentados os cromatogramas dos extratos injetados das espécies de *Polygala*, na concentração de 500 ppm, sendo elas; *P. sabulosa* (A₁), *P. cyparissias* (A₂), *P. campestris* (A₃), *P. paniculata* (A₄), *P. linoides* (A₅), *P. altomontana* (A₆), *P. desinracemosa* (A₇) e *P. lancifolia* (A₈).

Figura 10. Cromatogramas referentes aos extratos etanólicos de espécies de *Polygala*.

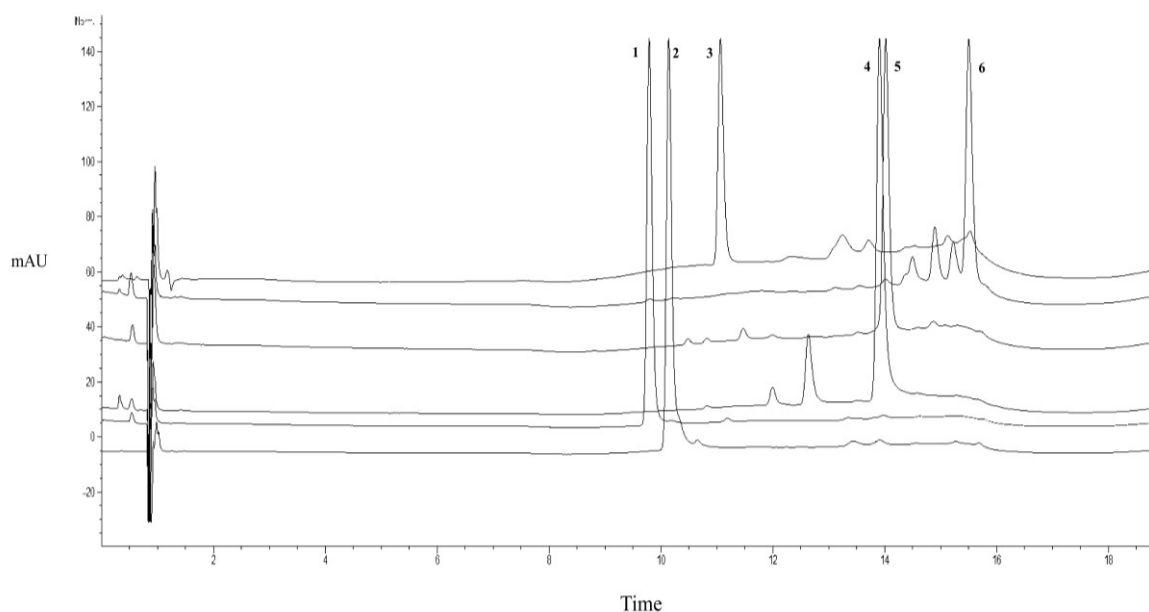


Legenda: 1- Escopoletina, 2- Rutina, 3 – Umbeliferona, 4 – Xantona, 5 – Febalosina, 6 – Estirilpirona.
Fonte: Prória autora.

Os cromatogramas referentes aos extratos sugerem a perpetuação de marcadores químicos como os compostos fenólicos de amostras padrão, analisados no mesmo método, mostrado na **figura 11**. Os analitos em questão são considerados marcadores químicos nas espécies de *Polygala*, e os mesmos apresentam alto valor biológico. Esses perfis cromatográficos revelam que para as espécies *altomontana* (A₆), *desinracemosa* (A₇) e *P.*

lancifolia a presença dos metabólitos em questão é investigada pela primeira vez na literatura, onde se observa a confirmação de um perfil metabólico rico em fenólicos. A quantificação de alguns desses metabólitos no gênero como um todo, além da análise do perfil cromatográfico das espécies aqui citadas complementam as análises nas outras sessões desse trabalho quanto à investigação fitoquímica das espécies desse gênero. Os analitos (**Figura 11**) em questão apresentam satisfatórios tempos de retenção quando comparados entre si, com um tempo de análise de 19 minutos no total. O método permitiu confirmar um perfil cromatográfico bem característico dos fenólicos analisados separadamente. Cabe ressaltar que dentre os fenólicos presentes estão flavonoides (Rutina), cumarinas (escopoletina e febalosina), xantonas e estirilpironas, todos já reportados em pelo menos uma espécie do gênero *Polygala*. Os extratos de *P.lancifolia*, *P. densiracemosa* e *P. cyparissias* apresentaram baixa ou nula detecção dos compostos *target* analisados.

Figura 11. Cromatogramas das substâncias monitoradas em *Polygala*.



Legenda: Legenda: **1-** Escopoletina, **2-** Rutina, **3** – Umbeliferona, **4** – Xantona, **5** – Febalosina, **6** – Estirilpirona.

Fonte: Própria autora.

As condições cromatográficas otimizadas permitiram melhor separação e faixa de retenção com as seguintes condições: Coluna Synergi Polar RP, com vazão de 0,5 mL.min⁻¹, volume de injeção de 20 µL, e eluição gradiente: 0-5 min 10% MeOH, 5-7min 30%-50%, 7-13min 80%, 13-15min 80-50%, 15-16 min 50-30% e 16-17 min 10% de MeOH para condicionamento da coluna. Todos os cromatogramas apresentados nas **figuras 10 e 11** foram

monitorados no comprimento de onda 254nm, além de outros que foram armazenados na biblioteca.

A literatura relata que o desempenho do perfil cromatográfico na representatividade de amostras vegetais é diretamente relacionado e dependente da separação cromatográfica e da intensidade dos sinais ao longo de toda a análise. Em adição, fases móveis de composição simples são preferíveis, uma vez que aumentam a robustez do método (MARTINS, LUCIA REGINA ROCHA., 2008). Diante disso percebe-se que a intensidade dos picos 1, 2 e 3 no extrato de *Polygala altomontana* sugerem maiores concentrações desses metabólitos, quando se compara a intensidade desses mesmos picos ou faixa de tempo de retenção, com os outros extratos.

Extratos vegetais obtidos com solventes polares apresentam uma quantidade consideravelmente grande de compostos ionizáveis, bem como de compostos fenólicos. Esses compostos podem se apresentar de forma parcial ou totalmente ionizada e a realização da supressão da ionização torna-se favorável, pois permite que as espécies estejam mais hidrofóbicas, aumentando sua retenção. Diante disso a diminuição do pH da fase móvel pela adição de ácidos fracos colaborou na otimização da separação cromatográfica (PRESTES *et al.*, 2009).

Esse tipo de análise prévias dos extratos, sem a necessidade de gastos com grandes quantidades de solventes orgânicos para isolamento, permite uma análise química de produtos naturais mais verde, onde gera-se menos resíduos, permitindo ainda, o uso de menores quantidades de amostras.

5.3. Identificação de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS

Os 39 extratos brutos de 9 espécies diferentes de *Polygala* foram também analisados pela técnica hifenada de HPLC-ESI-MS/MS, para identificar e quantificar os compostos fenólicos que já foram isolados em espécies distintas de *Polygala*, com enfoque nos marcadores quimiotaxonômicos e biomarcadores no gênero. Esta técnica, para análise complementar dos metabólitos dessas matrizes vegetais foi escolhida, pois apresenta alta sensibilidade, haja vista que os espectrômetros de massa modernos são altamente sensíveis (PRESTES *et al.*, 2009). A identificação e/ou quantificação dos compostos é realizada através do monitoramento da transição do íon precursor para o íon fragmento, já que a probabilidade

de dois compostos distintos de partilharem a mesma razão m/z do íon precursor e do íon fragmento ser baixa.

O método consiste do uso de uma biblioteca para análise de quarenta e sete padrões de compostos fenólicos, porém, para essa varredura, apenas 4 substâncias foram quantificadas nos 39 extratos, sendo elas três flavonoides e uma cumarina: rutina, apigenina, quercetina e escopoletina (**tabela 3**). Todos os analitos monitorados foram detectados nos extratos analisados, porém, percebe-se que a rutina, quercetina e escopoletina foram os compostos com maiores concentrações em todos.

De modo geral as espécies vegetais apresentam uma quantidade de fenólicos mais abundante nas partes das flores (HARBONE, 2010). Porém, as espécies de *Polygala* apresentaram um perfil misto, haja vista que o caule e as raízes dessas plantas apresentam também altas concentrações dessa classe de metabólitos.

Constituintes fenólicos de plantas como flavonoides, xantonas e cumarinas são responsáveis por atividades antioxidantes no organismo e atuam na prevenção e também tratamento de vários tipos doenças. Algumas classes de flavonóides podem quelar metais e prevenir a peroxidação lipídica, dano oxidativo de lipídios e lipoproteínas. Além de possuírem atividades anti-alérgicas, anti-inflamatórias e antivirais, outros diferentes componentes fenólicos, com capacidade de se ligar a íons metálicos, podem prevenir a oxidação do substrato e bloquear o oxigênio singlete, um grande responsável por vários processos oxidativos nas células. Tais compostos têm sido relatados como agentes quimioterápicos e têm sido considerados valiosos nas pesquisas para fins clínicos e medicamentosos (CHAMKHI *et al.*, 2021; HARBONE, 2010).

Tabela 3. Resultados da análise de fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS nos 39 extratos de *Polygala*

Rutina			Escopoletina			apigenina			Quercetina		
tR (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íon Produto (m/z)	tR (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íon produto (m/z)	tR (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íon produto (m/z)	tR (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íon produto (m/z)
10,83	609,2	151	10,79	190,9	176	12,40	268,9	117	11,72	300,9	151
Concentração na amostra e desvio padrão (mg.L⁻¹)											
P.pu.F	19.18	±0.69	2.60	±0.04	2.42	±0.29	7.84	±0.48			
P.pu.c	35.58	±3.84	3.25	±0.27	3.26	±0.02	9.37	±0.83			
P.pu.Fl	26.28	±3.19	2.61	±0.04	3.22	±0.01	8.70	±0.15			
P.pu.R	50.87	±0.87	2.81	±0.16	2.58	±0.08	7.87	±0.32			
P.l.F	12.61	±0.02	2.58	±0.02	3.22	±0.01	6.57	±0.11			
P.l.c	12.53	±0.37	2.54	±0.02	3.18	±0.07	6.22	±0.09			
P.l.Fl	16.28	±0.91	2.60	±0.03	3.19	±0.08	7.98	±0.61			
P.l.R	12.22	±0.02	2.58	±0.02	3.25	±0.01	6.04	±0.03			
P.c.F	22.81	±0.09	3.09	±0.20	3.27	±0.01	6.99	±0.13			
P.c.c	33.24	±0.97	3.21	±0.17	3.24	±0.05	7.71	±0.64			
P.c.Fl	21.64	±9.19	2.76	±0.09	3.26	±0.00	7.11	±0.28			
P.c.R	13.24	±0.12	3.75	±0.11	3.26	±0.02	6.05	±0.04			
P.b.F	16.52	±0.50	2.69	±0.01	3.29	±0.00	8.78	±0.15			
P.b.c	28.38	±1.49	2.94	±0.03	3.28	±0.00	10.15	±0.00			
P.b.Fl	139.22	±9.10	2.57	±0.04	3.12	±0.03	13.42	±1.28			
P.b.R	12.38	±0.02	2.58	±0.04	3.27	±0.02	6.00	±0.04			
P.s.F	12.90	±0.07	15.26	±0.50	2.38	±0.11	9.13	±1.07			
P.s.c	13.66	±0.01	10.21	±0.37	-0.03	±0.06	7.07	±0.15			
P.s.Fl	12.84	±0.08	20.38	±0.61	2.32	±0.12	7.46	±0.24			
P.s.R	12.55	±0.05	9.01	±0.15	2.53	±0.20	6.39	±0.02			
P.p.D.F	44.54	±2.02	2.66	±0.04	3.24	±0.01	6.19	±0.05			
P.p.D.c	239.40	±1.21	3.06	±0.05	3.24	±0.01	6.96	±0.30			
P.p.D.Fl	293.94	±6.84	2.66	±0.04	3.25	±0.03	6.63	±0.10			
P.p.D.R	74.74	±1.58	3.40	±0.08	3.28	±0.01	6.16	±0.01			
P.p.G.F	88.78	±3.20	3.20	±0.01	3.24	±0.02	6.42	±0.20			
P.p.G.c	127.76	±4.66	3.43	±0.16	3.24	±0.01	6.32	±0.13			
P.p.G.Fl	35.60	±2.04	2.79	±0.05	3.25	±0.05	6.02	±0.01			
P.p.G.R	13.18	±0.16	2.56	±0.01	3.26	±0.02	5.96	±0.01			
P.la.F	12.32	±0.02	2.51	±0.01	3.26	±0.02	6.09	±0.01			
P.la.c	12.39	±0.06	2.78	±0.02	3.19	±0.00	6.12	±0.19			
P.la.Fl	12.82	±0.06	2.60	±0.02	1.91	±0.15	7.07	±0.13			
P.la.R	12.21	±0.00	2.49	±0.00	3.30	±0.00	5.93	±0.00			
P.d.F	17.89	±0.14	2.51	±0.00	2.74	±0.03	6.22	±0.14			
P.d.c	14.17	±0.10	2.57	±0.01	3.25	±0.01	5.96	±0.01			
P.d.Fl	19.87	±0.66	2.53	±0.03	3.28	±0.01	8.29	±0.11			
P.d.R	12.47	±0.09	2.75	±0.03	3.22	±0.00	5.96	±0.00			
P.a.F	21.80	±1.30	8.07	±0.69	3.29	±0.00	20.94	±1.31			
P.a.c	18.33	±0.22	7.07	±0.70	3.27	±0.00	20.18	±0.78			
P.a.Fl	13.09	±0.06	7.21	±0.16	3.24	±0.00	11.20	±0.21			
P.a.R	18.88	±0.47	4.47	±0.03	3.27	±0.00	10.18	±0.06			

Os valores de concentração observados para o metabólito Rutina nos extratos das flores e caule de *P. paniculata* comprovam os achados sobre o mesmo ser considerado marcador quimiotaxonomico nessa espécie, devido a discrepância observada na alta concentração do mesmo nessa espécie. Um marcador quimiotaxonomico é um composto químico que se apresenta na maioria ou todas as espécies de um gênero de plantas.

Nesse estudo são apresentados dados de análises químicas pela primeira vez para a espécie *Polygala brasiliensis*, que também apresenta valores de concentração altos de rutina e

Quercetina para os extratos de flor, caule, folhas e raízes (**Tabela 3**). Já a análise desses compostos para a espécie *Polygala altomontana*, *Polygala densiracemosa* e *Polygala lancifolia*, que apresentam poucos estudos químicos, resultaram em maiores concentrações de rutina e quercetina e muito provavelmente xantonas. Sendo que as xantonas não constam no método de quantificação, mas pode-se considerar devido a sua rota biossintética (TIZZIANI, 2019).

Em todas as amostras analisadas, o composto de maior quantidade encontrada foi a rutina, o que corrobora para o estudo na sessão 5.5, que trás metodologia para quantificação da rutina e de uma xantona em extratos de *Polygala*, haja vista que os mesmos são considerados biomarcadores no gênero. Além dos compostos previamente citados, foram encontrados num *screening* da análise de fenólicos LC-MS/MS, os ácidos salicílico, ferúlico, cumárico, elágico e a umbeliferona nos extratos. Ressaltando aqui as concentrações observadas para o extrato de *Polygala brasiliensis*, onde foi observado valores relativamente altos de ácido p-cumárico.

5.3.1 Análise estatística

Para investigar o padrão metabólico de acúmulo dessas substâncias nas diferentes partes das plantas, como folhas, caule, flor e raízes, uma análise estatística multivariada de PCA (*Principal component analysis*) foi aplicada a esses dados de massa obtidos por HPLC-MS/MS (CANUTO *et al.*, 2018). Porém o gráfico de *score* não permitiu diferenciar os metabólitos por parte das plantas (**Figura 12**). Em todas as partes da planta, alguns metabólitos como a rutina estão presentes, porém, observou-se que nos caules da maioria das espécies a quantidade de metabólitos se apresentou mais expressiva, comparada as outras partes das plantas.

No gráfico de *score* da PCA (**Figura 12**) todos os círculos estão sobrepostos, demonstrando que não há formação de grupos dentro das espécies. Não se pode assumir que um grupo, por exemplo, os extratos de flores de todas as espécies, apresentam maiores ou menores concentrações de algum composto, comparada as outras partes da planta. O que se pode afirmar com uma análise de forma geral, é em relação ao tamanho dos círculos do gráfico. Círculos muito grandes demonstram alta variação das partes das plantas que produzem tais compostos, e como os círculos apresentam-se de forma sobreposta, não se pode atribuir diferenciação dessas partes da planta na produção dos compostos.

1 **Figura 12.** Gráfico biplote da análise de componentes principais da concentração dos compostos e variáveis partes das plantas do gênero
 2 *Polygala* analisadas.



3
 4 Legenda: *pan*: *Polygala paniculata*, *cam*: *Polygala campestris*, *alt*: *Polygala altomontana*, *lin*: *Polygala linoides*, *sab*: *Polygala sabulosa*, *lan*:
 5 *Polygala lancifolia*, *den*: *Polygala densiracemosa*, *pul*: *Polygala pulchella* e *bra*: *Polygala brasiliensis*

1 Os resultados da PCA não demonstram distinção com relação às diferentes partes das
2 plantas, portanto, não apresentou grupos bem definidos. Porém, apesar da análise de PCA não
3 permitir a formação de grupos, alguns pontos podem ser analisados por suas diferenças. Por
4 exemplo, o círculo amarelo que é referente à concentração dos compostos nos extratos das
5 raízes das plantas (amarelo) apresentou uma menor variação dessas componentes, assim como
6 o referente às folhas (verde).

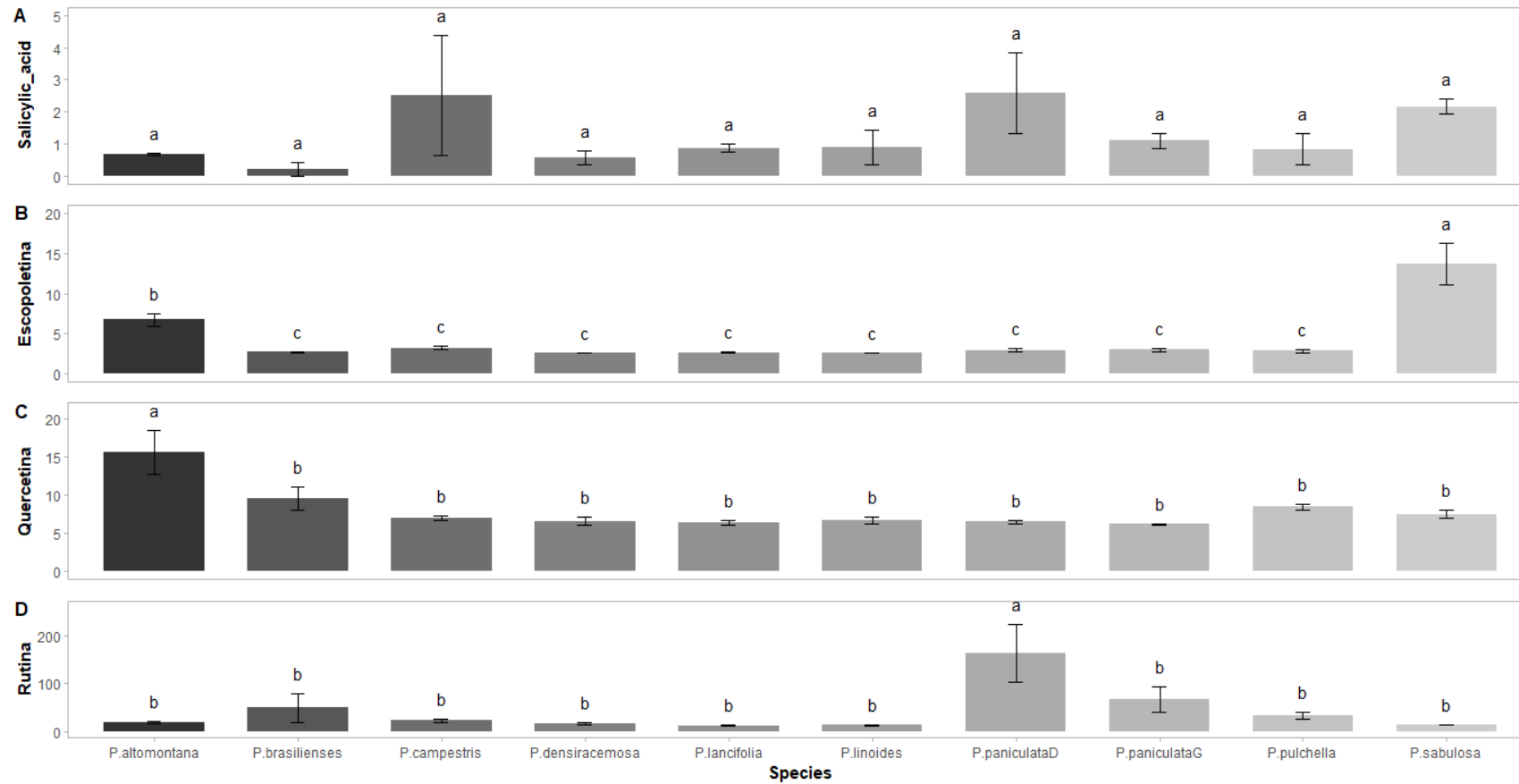
7 8 Análise da ANOVA

9
10 Essa análise estatística permitiu observar a separação por composto e por espécie, ou
11 seja, quais dos compostos analisados apresentam maiores concentrações nas espécies
12 analisadas. De forma resumida, essa análise possibilitou uma comparação da concentração
13 desses compostos entre as espécies analisadas. O ácido salicílico, analisado por CZE como
14 descrito no capítulo 2, não apresentou grandes diferenças, porém duas espécies apresentaram
15 variação muito alta, sendo a *Polygala paniculata* D. e a *Polygala campestris* (**Figura 13**).

16 Os grupos de variância ficaram subdivididos em a, b e c. No grupo com maiores
17 variações (a) está a escopoletina, que se apresenta em maiores concentrações para os extratos
18 da espécie *Polygala sabulosa* e *Polygala altomontana*. Para o composto quercetina, a espécie
19 que demonstrou maiores concentrações foi a *Polygala altomontana*. Já para a Rutina, a
20 espécie *Polygala paniculata* demonstrou maiores concentrações. De forma geral, percebe-se
21 que a espécie *P. paniculata* apresenta como marcador químico em maiores concentrações a
22 Rutina, já a *P. altomontana* a quercetina e a *P. sabulosa* a escopoletina.

1

Figura 13. Gráfico de barras da análise ANOVA da concentração dos compostos nas diferentes espécies do gênero *Polygala* analisadas.



2

3

4

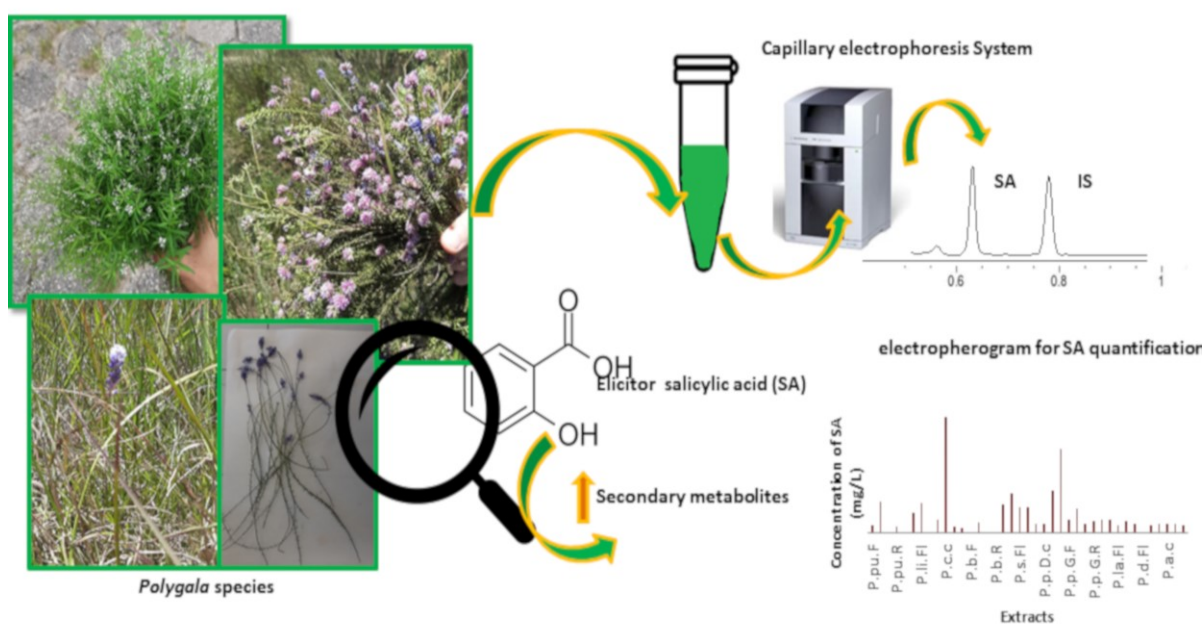
Legenda: *pan*: *Polygala paniculata*, *cam*: *Polygala campestris*, *alt*: *Polygala altomontana*, *lin*: *Polygala linoides*, *sab*: *Polygala sabulosa*, *lan*: *Polygala lancifolia*, *den*: *Polygala densiracemosa*, *pul*: *Polygala pulchella* e *bra*: *Polygala brasiliensis*.

5.4. Determinação de ácido salicílico em Plantas por Eletroforese Capilar de Zona

5.4.1. Desenvolvimento do Método

Para desenvolver uma metodologia por eletroforese de Zona Capilar (CZE), técnica esta de grande versatilidade, que se enquadra como uma técnica analítica verde, permitindo um consumo reduzido de reagentes e geração mínima de resíduos, foram utilizadas estratégias que envolvem o uso de curvas de mobilidade versus pH em conjunto com simulações usando software como o PeakMaster. Usando esta estratégia, foi possível eliminar amplamente a árdua tarefa do método de tentativa e erro ou o uso de procedimentos de planejamento fatorial na fase de otimização. Além disso, também nessa abordagem foi possível utilizar a versatilidade da eletroforese capilar para aumentar a seletividade do método por meio da manipulação das condições de análise a fim de encontrar propriedades que diferenciam o analito em estudo de outros possíveis compostos interferentes, uma vez que um extrato vegetal é uma amostra de alto grau de complexidade. Um esquema representativo sobre a metodologia desenvolvida para quantificar esse elicitor em matrizes vegetais está representado na **figura 14**.

Figura 14. Esquema resumo da metodologia desenvolvida para quantificação de ácido salicílico em matrizes vegetais, utilizando eletroforese capilar de zona (CZE).



21

22 Fonte: Própria autora.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

Alguns parâmetros para análise do elicitador de metabólitos secundários, o ácido salicílico, são importantes, como sua estrutura química, que possui um anel aromático, permitindo sua absorção no detector de UV no instrumento CE. Outra característica importante é o valor de pKa de 3,0 e a mobilidade eletroforética de $35,4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

A CZE pode ser usada no modo co ou contra-eletoosmótico. No segundo caso, comumente o método é projetado para ter a velocidade do fluxo eletroosmótico (EOF) maior que a velocidade do analito. Outra possibilidade seria utilizar uma condição contra-eletoosmótica em que o analito tenha uma velocidade maior que a velocidade do EOF, de forma que apenas analitos com menor valor de pKa em baixos valores de pH cheguem ao detector, podendo assim aumentar a seletividade do método. Como prova de conceito, todos os analitos aniônicos contidos no banco de dados do Prof. T. HIROKAWA, (1982) foram usados.

O banco de dados contém 364 compostos aniônicos e foi possível dividir o banco de dados em 3 grandes grupos: pKa entre (-3 e 2,7), com 88 compostos (G1), pKa (2,7 a 3,46) tendo 61 compostos (G2) e pKa maior do que 4,17, com 215 compostos (G3). Com relação às motilidades, é possível dividir o banco de dados em 3 grupos considerando os valores absolutos $\mu_0 > -43 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ com 35 compostos (G1M), μ_0 entre -37 e $-25 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ com 256 compostos (G2M) e valores de $\mu_0 < -25 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ com 73 compostos (G3M). A partir dessa estratificação do banco de dados, é possível colocar AS nos grupos G2 e G2M, o que possibilitou verificar que, de um total de 363 possíveis compostos interferentes (n-1), houve uma grande redução neste número. Assim, a combinação dos dois grupos coloca SA em uma região com alta seletividade, na qual apenas 16 dos 364 compostos possuem mobilidade, pKa e absorvidade molar para serem possíveis interferentes nessa análise (**Figuras 15 e 16**). Também é importante notar que os compostos catiônicos migram na direção oposta ao AS, uma seletividade que é característica do CZE.

Para simular o perfil de migração do SA, foi necessário conhecer o comportamento do EOF em função do pH. Dessa forma, uma função empírica foi ajustada aos dados apresentados por VITALI *et al.* (2014), onde os autores avaliam o comportamento do EOF em um capilar de sílica fundida, resultando na Equação 1.

$$\mu_{\text{osm}} = \frac{55,4}{1 + \exp(7,57 - 1,22\text{pH})} \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad R^2 > 0,99 \quad (1)$$

1 Para construir a curva de mobilidade, as Equações 2 e 3 foram usadas, onde μ_{act} é a
2 mobilidade do SA na condição de análise, μ_{eff} é a mobilidade efetiva obtida usando a Equação
3 3, μ_0 é a mobilidade absoluta do analito e μ_{osm} é a mobilidade de a EOF obtida pela Equação
4 empírica 1.

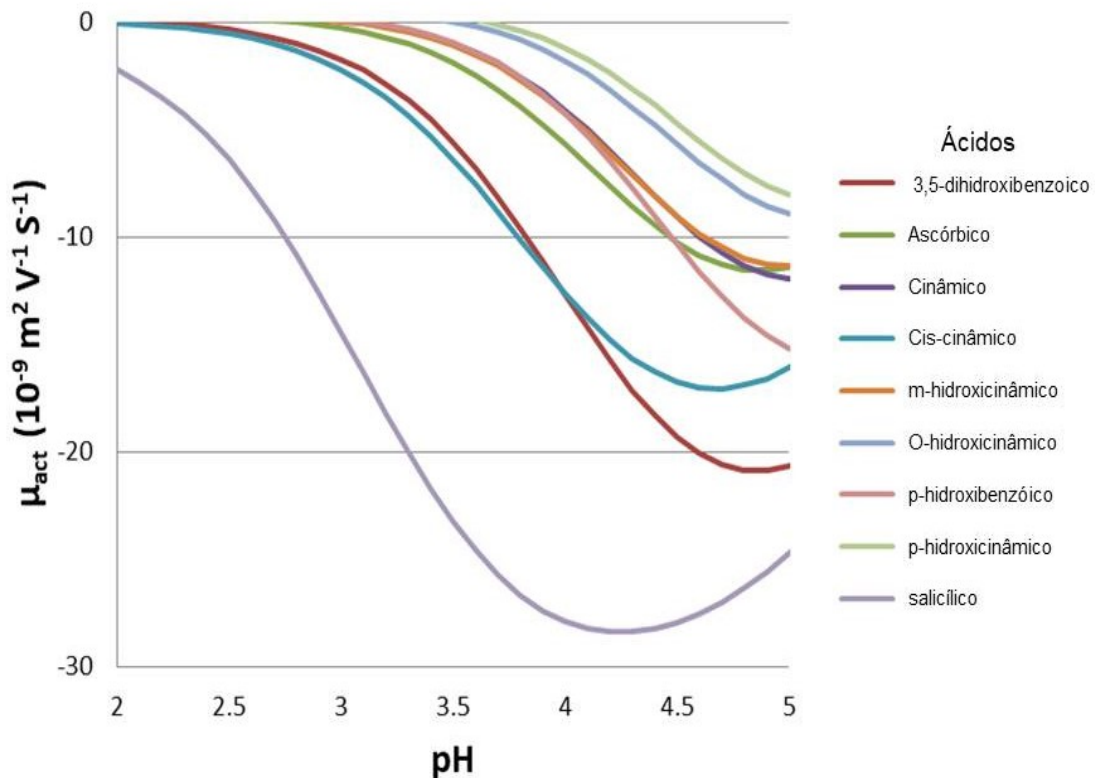
5

$$\mu_{act} = \mu_{eff} + \mu_{osm} \quad (2)$$

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_0}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (3)$$

6

7 **Figura 15.** Curva de mobilidade dos compostos interferentes levando em consideração
8 a mobilidade do fluxo (EOF) nas condições de análise versus pH.



9

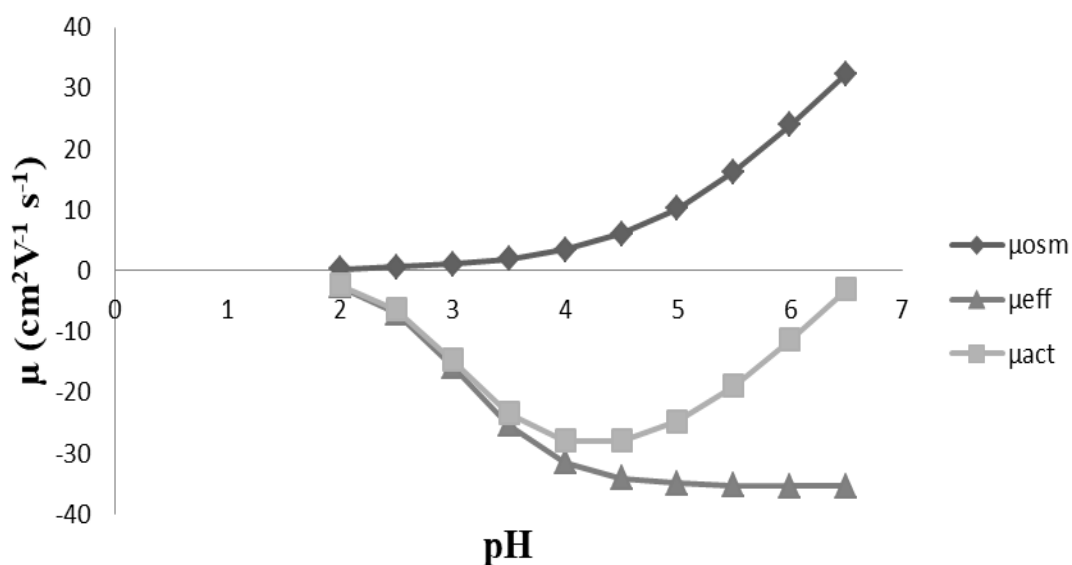
10 Fonte: Própria autora.

11

1 Portanto, com os dados de pKa, mobilidade iônica e predição da mobilidade do EOF,
2 foi possível traçar uma curva de μ_{act} , μ_{osm} e μ_{eff} versus pH, apresentada na **Figura 15**, na qual
3 pode-se observar que, em pH em torno de 4, o AS migra em modo contra o EOF (μ_{act}
4 negativo) com um valor μ_{act} alto de aproximadamente $-25 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Então, observou-
5 se um aumento na seletividade conforme discutido acima e a obtenção de um método CZE
6 altamente seletivo e rápido foi alcançada.

7 A **figura 16** demonstra todo o comportamento das mobilidades à medida que o pH
8 varia, mostrando através do resultado da equação 2 (μ_{act}) que a forma final da curva forneceu
9 informações para o comportamento do analito na condição de análise, o que permitiu escolher
10 o pH em torno de 4 para maior seletividade.

11
12 **Figura 16.** Mobilidade de μ_{act} , μ_{osm} e μ_{eff} na condição de análise versus curva de
13 pH.



14
15 Fonte: Própria autora.

16
17 Nem todos os compostos utilizados no estudo de seletividade apresentado
18 anteriormente necessariamente estão presentes nessa matriz vegetal. Alguns compostos que
19 podem estar presentes no extrato vegetal são alguns ácidos fenólicos como ácido cafeico (pKa
20 4,62), ácido elágico (pKa 6,69), ácido ferúlico (pKa 4,68), ácido gálico (pKa 4,51), ácido 4-
21 hidroxibenzóico (pKa 4,54), ácido p-cumárico (pKa 4.14), ácido trans-cinâmico (pKa 4.44) e
22 ácido vanílico (pKa 4.16). O pKa desses compostos os coloca em G3, de forma que não

1 interfiram na análise de AS. Outros possíveis compostos interferentes podem ser os ácidos
2 alifáticos, como o ácido cítrico e o ácido tartárico, mas não absorvem na radiação ultravioleta.
3 Da mesma forma, ácidos fenólicos de cadeias maiores, como flavonóides, cumarinas,
4 xantonas, comumente presentes nas plantas, também não interferem na análise, pois na faixa
5 de pH escolhida (pH = 3,9), essas substâncias não se ionizam.

6 Usando um procedimento proposto por SPUDEIT *et al.* (2016), e com um
7 conhecimento prévio de faixa de pH desejado (4,0), um padrão interno (PI), co-íon e contra-
8 íon foram escolhidos para manter alta a capacidade tamponante e reduzir os valores de
9 Dispersão de Eletromigração (EMD) no desempenho do método. O PI escolhido foi o ácido
10 ftálico (AF) e o BGE foi composto por 15 mmol L⁻¹ de Tris, 30 mmol L⁻¹ de HIBA,
11 resultando em pH 3,927, EMD -1 e -0,2 para AS e AF respectivamente, com tampão
12 capacidade de 17,5 mmol L⁻¹. O valor de EOF obtido pela Equação 1 em pH 3,9 foi de 3,1
13 cm² V⁻¹s⁻¹. Para reduzir o tempo de análise, foi utilizado um capilar com as seguintes
14 dimensões - L_{tot} 32 cm e L_{det} 8,5 cm (modo de injeção pela extremidade mais próxima do
15 detector) , foi aplicada uma tensão de -30 kV ao capilar de 32 cm, gerando um campo elétrico
16 (E = -937,5 V cm⁻¹), de forma que foi possível separar os dois compostos em 0,76 min. A
17 metodologia otimizada para análise de extratos vegetais é uma alternativa extremamente
18 vantajosa, visto que a literatura apresenta métodos de análise da qualidade de extratos
19 vegetais em diferentes tópicos de aplicações, com várias etapas de limpeza, derivatizações,
20 entre outros. Este método mostra como trabalhar a seletividade, estudando a matriz da
21 amostra pode propiciar um método simples de diluir e injetar (BENSEMMANE *et al.*, 2021;
22 EL-YAZBI *et al.*, 2021; SHARMA; KUMAR; RANA, 2020). A preparação dos extratos das
23 amostras por simples diluição em água, sonicação e centrifugação sem a necessidade de outro
24 tratamento resultou em menor tempo total de análise.

25 Os eletroferogramas do método otimizado podem observados na **Figura 17 e 18**, que
26 apresenta a análise resumida das separações experimentais e simuladas, demonstrando a
27 eficácia do software PeakMaster no desenvolvimento de métodos em CZE.

28

29

30

31

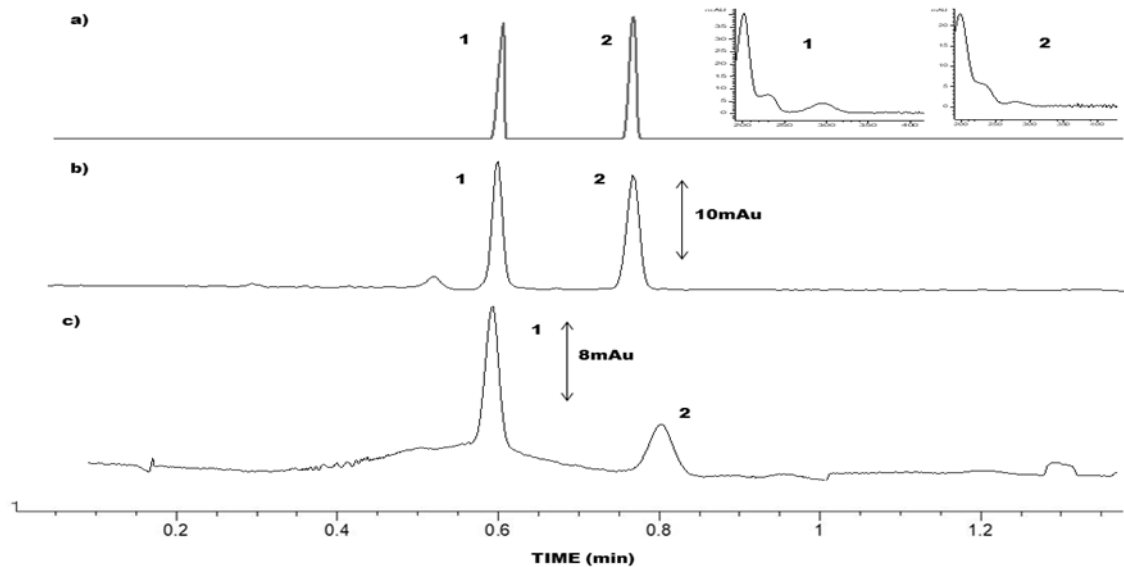
1

2

Figura 17. Eletroferogramas e espectros de UV obtidos usando o método otimizado

3

por CE:



4

5

Legenda: (a) Simulação da análise no software PeakMaster, (b) Mistura da solução padrão com 5 mg L⁻¹ cada, (c) Extrato de Amostra da Haste de *Polygala campestris*. Sistema eletrolítico composto por 15 mmol L⁻¹ de TRIS e 30 mmol L⁻¹ de HIBA (pH 3,9), detecção direta em 214 nm e ácido salicílico (1, AS) e padrão interno ácido ftálico (2, AF).

8

9

Desta forma, uma alta seletividade foi alcançada, com o analito de interesse apresentando uma mobilidade efetiva mais rápida quando comparado a qualquer outro possível interferente, demonstrando, portanto, que a manipulação das condições eletroforéticas, levando em consideração a composição da matriz, é uma excelente estratégia para atingir uma ótima seletividade. É importante destacar que toda a estratégia foi elaborada *in silico*, com a utilização de poucas quantidades de amostras e reagentes, o que nos permite considerar o método utilizado como uma ferramenta analítica ecologicamente sustentável para o meio ambiente. A **figura 18** apresenta as injeções das concentrações de AS e do PI para a curva de calibração externa.

18

19

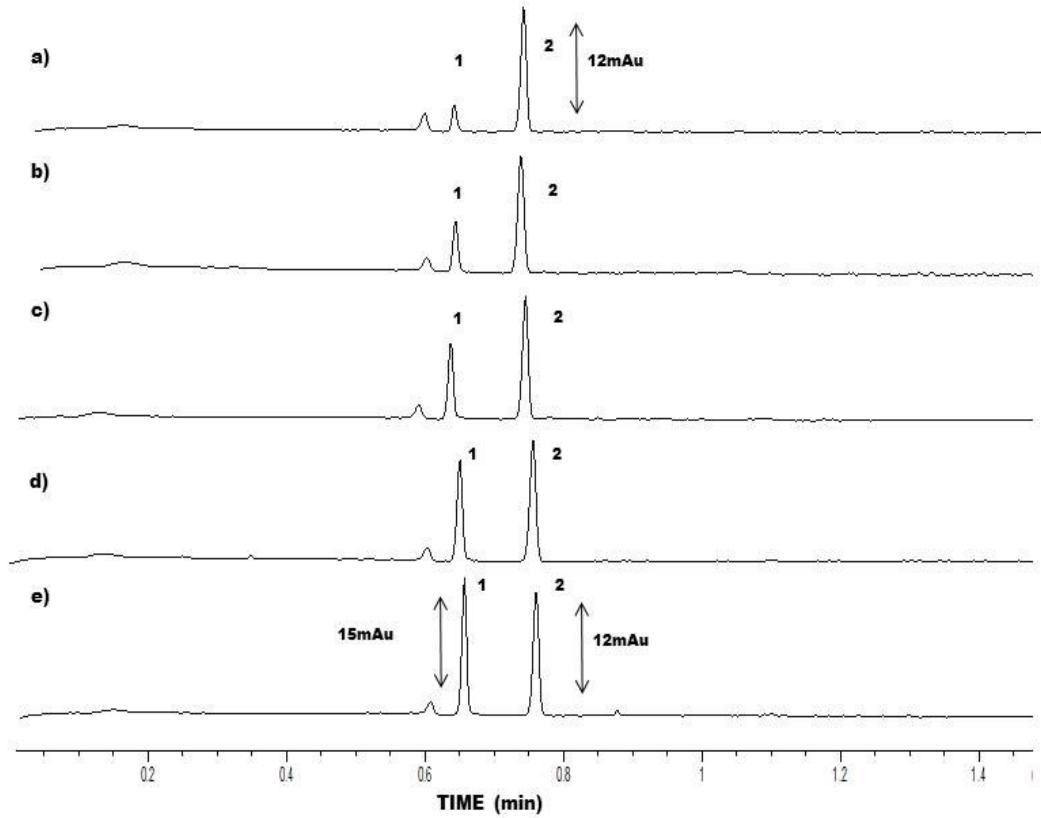
20

21

22

23

1 **Figura 18.** Eletroferogramas da curva de calibração para o método CE com IS fixado
2 em 5 mg L⁻¹:



3
4 Legenda: a) 1 mg L⁻¹, b) 2 mg L⁻¹, c) 3 mg L⁻¹, d) 4 mg L⁻¹ ee) 5 mg L⁻¹. Sistema eletrolítico
5 composto por 15 mmol L⁻¹ de TRIS e 30 mmol L⁻¹ de HIBA (pH 3,9), detecção direta em
6 214 nm. Legenda: Ácido Salicílico (1, AS) e o Padrão Interno Ácido Fitálico (2, AF).
7 Fonte: Própria autora.

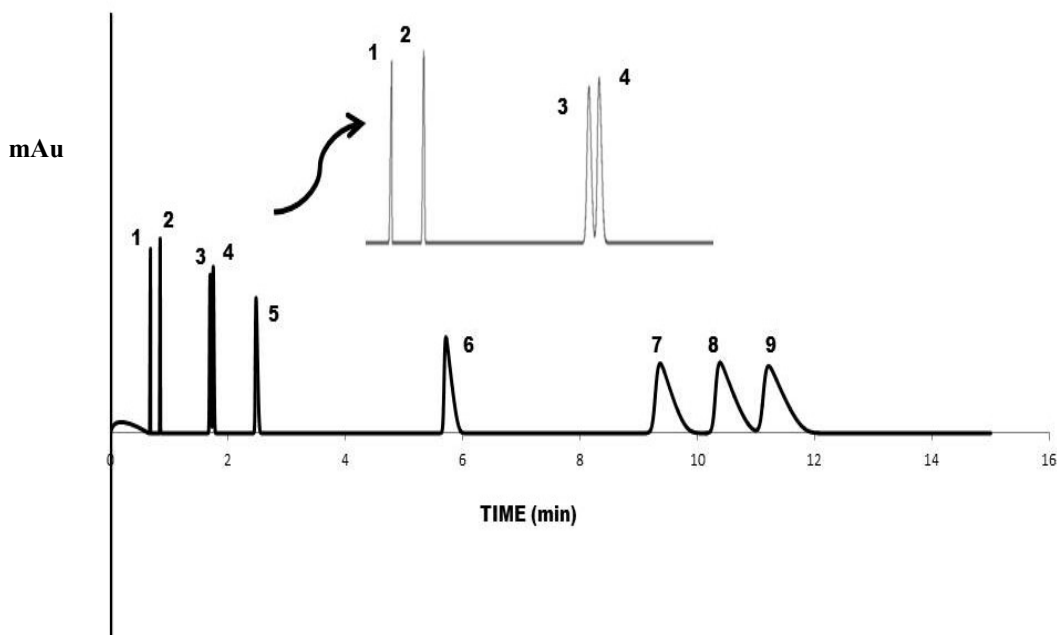
8
9

10 Uma simulação da corrida eletroforética, realizada utilizando o software peakmaster,
11 demonstrando a seletividade do método diante dos interferentes da complexa matriz vegetal
12 da amostra está representada na **Figura 19**.

13
14
15
16
17
18
19
20

1

2 **Figura 19.** Eletroferogramas simulados obtidos pelo método otimizado por CE
3 utilizando o software PeakMaster com AS e AF (IS) e todos os possíveis compostos
4 interferentes na matriz vegetal disponíveis no banco de dados software.



5

6 Legenda: ácido salicílico (1), ácido ftálico (2), 3,5-di-hidroxibenzóico (3), ácido cis-
7 cinâmico (4), ácido benzóico (5), ácido ascórbico (6), ácido p-hidroxibenzóico (7), ácido m-
8 hidroxicinâmico (8) e ácido cinâmico (9).

9 Fonte: Própria autora.

10

11

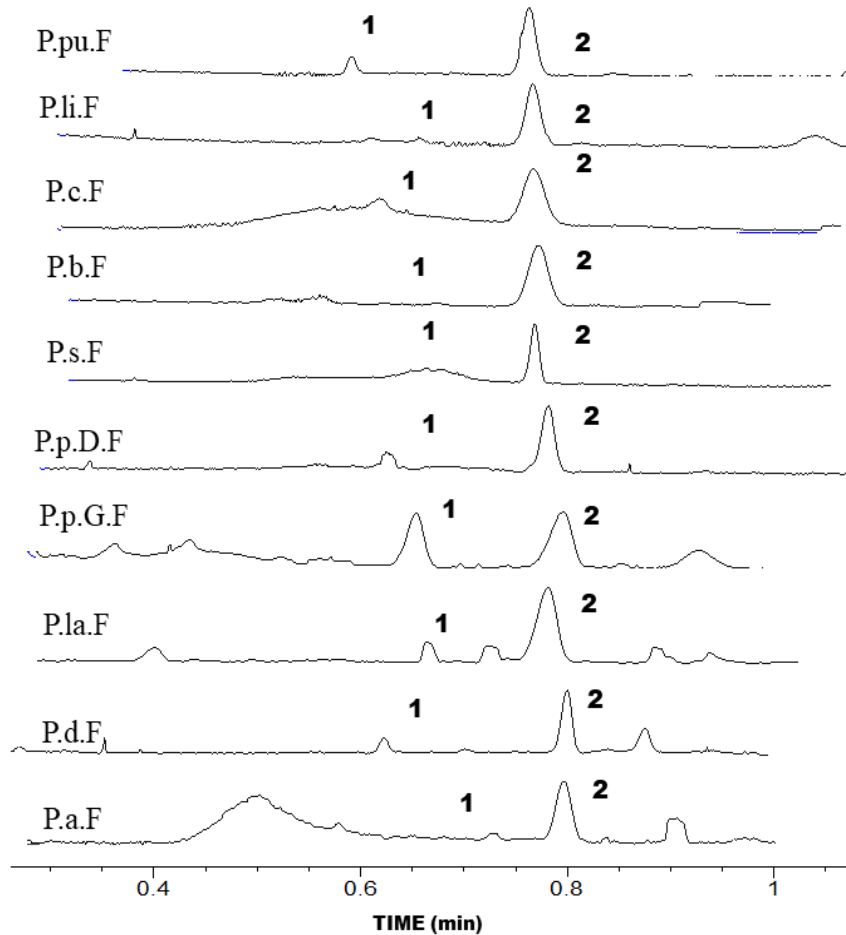
12 Uma oscilação no tempo de migração pode ser vista na **Figura 18 e 20** ao comparar a
13 mistura com o analito e I.S. Essas diferenças podem ser causadas por muitos fatores típicos
14 em CZE, e a flutuação do campo elétrico devido a uma composição do plugue de amostra é
15 frequentemente a principal fonte dessa instabilidade. A fonte dessa flutuação pode ser a
16 modificação física da superfície interna do capilar, causada mais comumente pelas interações
17 analito-parede, formação de agregados insolúveis e enxágue capilar insuficiente (GAS *et al.*,
18 2005; SCHAEPER; SEPANIAK, [S.d.]). Para melhorar a reprodutibilidade do tempo de
19 migração, foi utilizado o tempo de migração corrigido, que consistia basicamente em utilizar
20 o tempo de migração do analito dividido pelo tempo de migração do padrão interno. A
21 correção mostra valores de RSD mais aceitáveis ao comparar os valores de RSD para o tempo
22 de migração com e sem a correção, em torno de 2,0% e 6,5%, respectivamente.

23

1

2

Figura 20. Eletroferogramas obtidos pelo método otimizado por CE das amostras
3 injetadas dos extratos referentes as folhas (F).



4

5

Legenda: P.puF: *Polygala pulchella*, P.li.F: *Polygala linoides*, P.c: *Polygala*
6 *campestris*, P.b: *Polygala brasiliensis*, P.s: *Polygala sabulosa*, P.p.D: *Polygala paniculata*
7 Daniela, P.p: *Polygala paniculata* Gravatá, P.la: *Polygala lancifolia*, P.d: *Polygala*
8 *densiracemosa* e P.a: *Polygala altomontana*.

9

Fonte: Própria autora.

10

11

5.4.2. Parâmetros de mérito

12

13

Para a validação do método desenvolvido para quantificação de SA em plantas, foram
14 utilizados os parâmetros seletividade, linearidade, exatidão, limite de detecção (LOD), limite
15 de quantificação (LOQ), precisão em termos de repetibilidade (instrumental, intra-dia e inter-
16 dia precisão) foram verificados e esses resultados de figuras de mérito são apresentados na
17 Tabela 2. A curva de calibração apresentou coeficiente de regressão maior que 0,99. Os
18 resultados de precisão para a área do pico foram melhores do que 2,9% (intra-dia) e 2,8%
19 (inter-dia).

19

1 **Tabela 4.** Parâmetros que foram analisados para validação do método CE-UV
 2 desenvolvido para quantificação de AS.

PARAMETRO	SA
Calibration Curve equation ^a	$y = 0.23x$
Linearity – linear range (mg L ⁻¹) ^a	1.0 – 5.0
Linearity, slope	0
Slope Standard Deviation	0.23
Linearity – Determination coefficient (R ²)	R ² = 0.99
LOD (mg L ⁻¹)	0.2
LOQ (mg L ⁻¹)	0.6
Instrumental precision—corrected peak area (RSD, % - n = 9)	4.4
Instrumental precision—corrected migration time (RSD, % - n = 9)	2.0
Intra-day precision—corrected peak area (RSD, % - n = 9)	0.7-2.9
Intra-day precision—corrected migration time (RSD, % - n = 9)	2.9-2.5
Inter-day precision—corrected peak area (RSD, % - n = 27)	1.0- 2.7
Inter-day precision—corrected migration time (RSD, % - n = 27)	0.08-0.32
Standard addition method (accuracy) - <i>Polygala pulchella</i> Roots	108.32 ± 19.73
Standard addition method (accuracy) – <i>Polygala linoides</i> leaves	115.83 ± 7.92
Standard addition method (accuracy) - <i>Polygala linoides</i> stems	108.13 ± 5.51

3 a - Curvas de calibração com 5 níveis de concentração, onde cada ponto foi preparado em
 4 triplicata. Legenda: LOD - Limite de Detecção; LOQ - Limite de Quantificação; RSD - desvio
 5 padrão relativo.
 6 Fonte: Própria autora.

7
 8
 9 O método de adição padrão foi a metodologia usada para avaliar a precisão, onde uma
 10 amostra de extrato de planta foi testada, duas quantidades conhecidas de ácido salicílico
 11 foram adicionadas às amostras (1 mg L⁻¹ e 5 mg L⁻¹) e as amostras foram novamente testadas.
 12 A diferença entre os resultados da amostra com e sem adição do padrão foi comparada com a
 13 resposta esperada, dados valores aceitáveis em 2 amostras diferentes, variando de 108 a 115%
 14 (**Tabela 4**).

15 5.4.3. Análise de amostra

16
 17
 18 O método otimizado foi aplicado para quantificar AS nos extratos de amostras
 19 previamente preparados, cujos resultados de quantificação são apresentados na **Tabela 5**.

20
 21
 22
 23
 24

1

2

Tabela 5. Resultados da quantificação do AS para as amostras de extratos vegetais.

Espécie e parte da planta	Massa (mg Kg ⁻¹)	Desvio Padrão (DP)
<i>Polygala pulchella</i> folhas	94.814	27.027
<i>Polygala pulchella</i> caule	375.105	157.654
<i>Polygala pulchella</i> flores	< LOD	-
<i>Polygala pulchella</i> raízes	87.438	4.003
<i>Polygala linoides</i> folhas	< LOD	-
<i>Polygala linoides</i> caule	247.606	27.178
<i>Polygala linoides</i> flores	352.792	45.819
<i>Polygala linoides</i> raízes	< LOD	-
<i>Polygala campestris</i> folhas	167.080	61.325
<i>Polygala campestris</i> caule	1353.304	62.683
<i>Polygala campestris</i> flores	93.652	26.040
<i>Polygala campestris</i> raízes	64.328	11.328
<i>Polygala brasiliensis</i> folhas	< LOD	-
<i>Polygala brasiliensis</i> caule	142.245	23.632
<i>Polygala brasiliensis</i> Flores	< LOD	-
<i>Polygala brasiliensis</i> raízes	< LOD	-
<i>Polygala sabulosa</i> folhas	344.993	384.899
<i>Polygala sabulosa</i> caule	479.358	103.687
<i>Polygala sabulosa</i> flores	310.823	42.851
<i>Polygala sabulosa</i> raízes	308.980	6.624
<i>Polygala paniculata</i> D. Folhas	113.437	36.670
<i>Polygala paniculata</i> D. caule	113.684	9.096
<i>Polygala paniculata</i> D. floress	505.948	3.845
<i>Polygala paniculata</i> D. raízes	993.906	64.858
<i>Polygala paniculata</i> G. folhas	164.424	101.013
<i>Polygala paniculata</i> G. caule	299.350	17.299
<i>Polygala paniculata</i> G. flores	125.678	4.004
<i>Polygala paniculata</i> G. Raízes	148.607	29.264
<i>Polygala lancifolia</i> folhas	159.384	53.655
<i>Polygala lancifolia</i> caule	169.377	24.159
<i>Polygala lancifolia</i> Flores	107.615	52.645
<i>Polygala densiracemosa</i> folhas	158.376	9.245
<i>Polygala densiracemosa</i> caule	120.008	17.564
<i>Polygala densiracemosa</i> Flores	<LOD	-
<i>Polygala densiracemosa</i> Raízes	98.722	46.482
<i>Polygala altomontana</i> Folhas	116.930	1.715
<i>Polygala altomontana</i> caule	119.428	38.679
<i>Polygala altomontana</i> flores	115.196	57.645
<i>Polygala altomontana</i> raízes	95.305	13.469

3

Legenda: LOD - limite de detecção; LOQ – Limite de quantificação.

4

Fonte: Própria autora.

5

1 Os conteúdos de AS nas espécies de *Polygala* demonstram maior acúmulo nas
2 espécies *Polygala campestris*, *Polygala sabulosa* e *Polygala paniculata*. Uma característica
3 comum encontrada na quantificação é que o teor de SA nas partes do caule de todas as
4 espécies vegetais apresenta concentrações mais elevadas em geral, nenhuma abaixo do LOQ.
5 Essa característica possivelmente se refere a um mecanismo de defesa dessas espécies, em
6 resposta ou repelência aos ataques de herbívoros, uma vez que essas espécies possuem caules
7 longos e são pequenos arbustos (RIACH *et al.*, 2019).

8 O AS pode ser sintetizado por hidroxilação da via fenilpropanóide e é metabolizado
9 em metil-SA, um indutor de resistência a patógenos volátil que caracteriza as plantas do
10 gênero *Polygala*. Os altos teores de AS em uma espécie de planta deixam alguns
11 pressupostos, uma vez que a literatura trás que o AS influencia o acúmulo de alguns
12 metabólitos especiais como terpenos em diferentes espécies de plantas já estudadas. Um dos
13 exemplos encontrados na literatura é a espécie *Centella asiatica*, que potencializou o
14 conteúdo total de triterpenóides mediado pela superexpressão de genes-chave na via de
15 biossíntese, quando tratada com AS exógeno. Teores elevados de triterpenóides aumentam
16 sua atividade antiinflamatória e certamente outras propriedades biológicas também são
17 melhoradas (RAFI *et al.*, 2018).

18 19 5.4.4. Comparação com métodos relatados

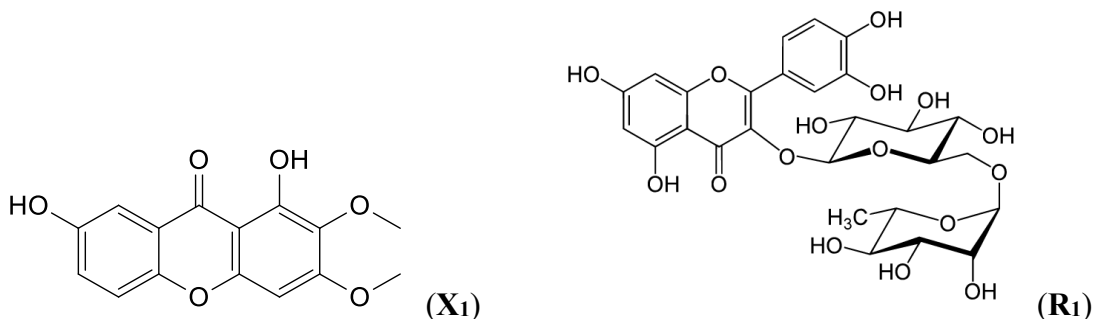
20
21 Uma breve comparação entre os métodos nos permitiu concluir que apenas este
22 método proposto determina o SA em matrizes de plantas usando CZE com o menor tempo de
23 separação. Além disso, é importante mencionar que os valores de LOD, LOQ e precisão
24 ficaram em níveis equivalentes aos métodos citados, sendo considerados adequados para a
25 aplicação proposta. A análise comparativa dos métodos citados mostra que o CZE apresenta
26 muitas vantagens em relação às outras técnicas, além do método desenvolvido não requerer a
27 necessidade de derivatização ou outras etapas críticas laboriosas.

1 **5.5. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS**
2 **METABÓLITOS BIOATIVOS 1,5 DIHIDROXI-2,3DIMETOXI-XANTONA E**
3 **RUTINA EM EXTRATOS DE *POLYGALA*.**

4
5 5.5.1 Desenvolvimento do método

6
7 Com base em trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (COSTA *et al.*, 2008;
8 SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, 2012; SPUDEIT *et al.*, 2016) algumas
9 estratégias para desenvolvimento do método foram realizadas. A principal foi a utilização do
10 software PeakMaster para simulação das condições eletroforéticas. A escolha do padrão
11 interno (PI), que é um componente importante a ser escolhido com cautela, pois o PI
12 minimiza os efeitos das oscilações experimentais, aqui relacionadas à injeção e ao fluxo
13 eletrosmótico, portanto 2-Naftol foi o PI escolhido. Para a ação pontual do PI é necessário que
14 suas propriedades físico-químicas sejam semelhantes às do analito e não estejam presentes na
15 matriz da amostra, para garantir uma análise seletiva e inequívoca.

16
17 **Figura 21.** Estrutura da X₁ e R₁.

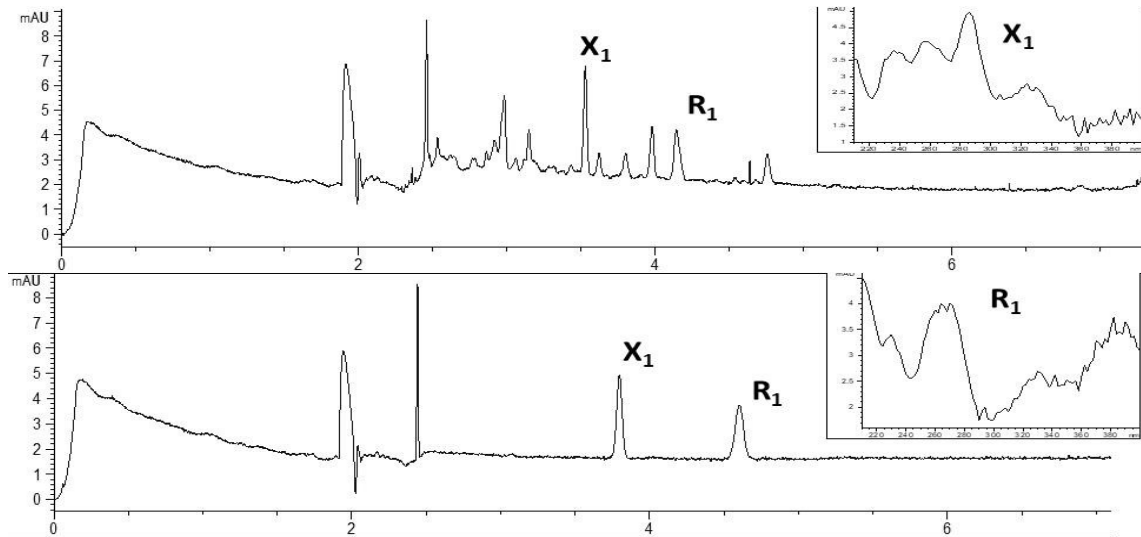


21 Com o propósito de otimização tentou-se a injeção pela extremidade mais próxima do
22 detector no capilar. Embora os analitos tenham respondido melhor a essa alteração, o extrato
23 não apresentou a melhor resolução e identidade da amostra, portanto a injeção foi feita pelo
24 lado mais próximo do detector. Os analitos de interesse para quantificação apresentaram
25 pequena diferença nos tempos de migração, esse fenômeno pode ser explicado pela
26 composição complexa da matriz amostral (**Figura 22**). A confirmação da autenticidade dos
27 picos foi realizada utilizando seus espectros de absorção de UV e adicionando os analitos
28 puros à amostra, aumentando as concentrações a fim de confirmar os picos de referência. O

1 método desenvolvido para análise em CE mostrou-se seletivo, rápido e com baixo custo de
2 análise, além de poder analisar espécies orgânicas e inorgânicas.

3

4 **Figura 22.** Eletroferogramas obtidos usando o método otimizado por CE: (a) extrato
5 (b) Solução de padrões X₁ e R₁.



6

7 Legenda: X₁: 1,5dihidroxi-2,3dimetoxixantona e R₁: Rutina.

8

9 Fonte: Própria autora.

10

11

12 5.5.2. Parâmetros de Validação

13

14 Para demonstrar a aplicabilidade da metodologia proposta, foram avaliados os
15 seguintes parâmetros de validação: linearidade e limites de detecção (LOD) e quantificação
16 (LOQ). Os dados de desempenho analítico e algumas figuras de mérito do método proposto
17 estão compilados na **Tabela 6**. As curvas analíticas compreenderam duas soluções padrão na
18 faixa de 5,0–25 mg L⁻¹ com injeção em triplicata em cada nível de concentração. Coeficientes
19 de regressão aceitáveis foram obtidos ($R_2 > 0,99$). O LOD (razão sinal-ruído de 3) para Rutina
20 (R₁) e 1,5 dihidroxi-2,3dimetoxi xantona (X₁) foram 1,62 e 1,18, respectivamente. Os valores
21 de LOQ (relação sinal / ruído de 10) determinados a partir do eletroferograma nas condições
22 otimizadas foram 4,92 e 3,59 mg L⁻¹, respectivamente.

23

24 Curva de calibração externa

1 Para a curva de calibração externa foram utilizadas soluções padrão com Rutina e
 2 Xantona (5-30 mg L⁻¹) utilizando alfa-naftol como PI na concentração de 10 mg L⁻¹. A curva
 3 é o resultado de médias obtidas a partir de uma triplicata.

4
 5 **Tabela 6.** Parâmetros analisados para validação do método CE-UV desenvolvido para
 6 quantificação dos metabólitos Rutina e Xantona.

PARÂMETRO	R ₁	X ₁
Linearidade – faixa linear (mg L ⁻¹) ^a	5,0 – 25,0 ppm	5,0 – 25,0
Equação da curva de calibração Externa	y = 0.1218x + 0.0779	y = 0.1183x + 0.0678
Desvio padrão do Coeficiente angular		
Linearidade– coeficiente de determinação (R ²)	R ² = 0.9971	R ² = 0.9985
Linearidade- intercepto	0.1218	0.1183
LOD (mg L-1)	1.62	1.18
LOQ (mg L-1)	4.92	3.59

7 ^an = 5, triplicata dos pontos da curva.

8 Fonte: Própria autora.

9
 10
 11
 12 **5.5.3. Análise da amostra**

13 Os resultados quantitativos de R₁ e X₁ na amostra do extrato de *P. paniculata* foram
 14 obtidos em duplicata. A concentração de R₁ e X₁ no extrato apresentou os valores de 8,805 mg.
 15 L⁻¹ e 11,215 mg L⁻¹. A quantificação foi feita com procedimentos simples de preparo de
 16 amostra e o método mostrou-se adequado para análise qualitativa e quantitativa dos
 17 compostos R₁ e X₁ nessas matrizes vegetais.

18 Devido ao crescente interesse farmacológico na espécie *P. paniculata*, procedimentos
 19 confiáveis para a análise quantitativa de seus ingredientes bioativos são necessários. Poucos
 20 métodos analíticos foram relatados para a padronização de extratos de plantas medicinais.
 21 Este método foi desenvolvido para fins de validação das espécies vegetais do gênero
 22 *Polygala*, proporcionando uma análise de autenticidade do perfil químico para estas plantas.
 23 Diante da literatura sobre os compostos já identificados e isolados no gênero, os compostos
 24 Rutina (R₁) e 1,5dihidroxi-2,3dimetoxixantona (X₁) são analitos tidos como marcadores
 25 químicos nesses extratos (ARRUDA-SILVA *et al.*, 2014; LAPA, FERNANDA DA ROCHA
 26 *et al.*, 2007; TIZZIANI *et al.*, 2018).

5.6. IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL DOS EXTRATOS DE *POLYGALA* POR RMN DE ¹H

O gênero *Polygala* apresenta 39 espécies reconhecidas para a região Sul do Brasil, dentre essas estão as 9 espécies que este trabalho aborda essencialmente, sendo elas, *Polygala altomontana*, *Polygala brasiliensis*, *Polygala campestris*, *Polygala densiracemosa*, *Polygala lancifolia*, *Polygala linoides*, *Polygala paniculata*, *Polygala pulchella* e *Polygala sabulosa*. O gênero é conhecido por produzir saponinas triterpênicas, cumarinas, estirilpironas, flavonóis, esteróis, xantonas, entre outros. As xantonas constituem-se nos principais metabólitos secundários encontrados neste gênero. Além disso, apresentam uma rota biossintética muito frequente em *Polygala* e, por essas razões, são tidos como marcadores quimiotaxonômicos. A fim de demonstrar o poder, a versatilidade e a importância de uma varredura analítica ampla, que possibilite a diferenciação das espécies entre si, a análise do perfil metabólico utilizando espectroscopia de RMN de ¹H foi realizada nesses extratos de diferentes espécies de *Polygala*, (**Figura 23-25**).

Para análise representativa de todo o material vegetal, a parte da planta escolhida, de acordo com análises prévias de perfil metabólico, foi o caule. Após total secagem dos extratos dos caules das espécies, os mesmos foram solubilizados em solvente deuterado para análise exploratória de RMN ¹H.

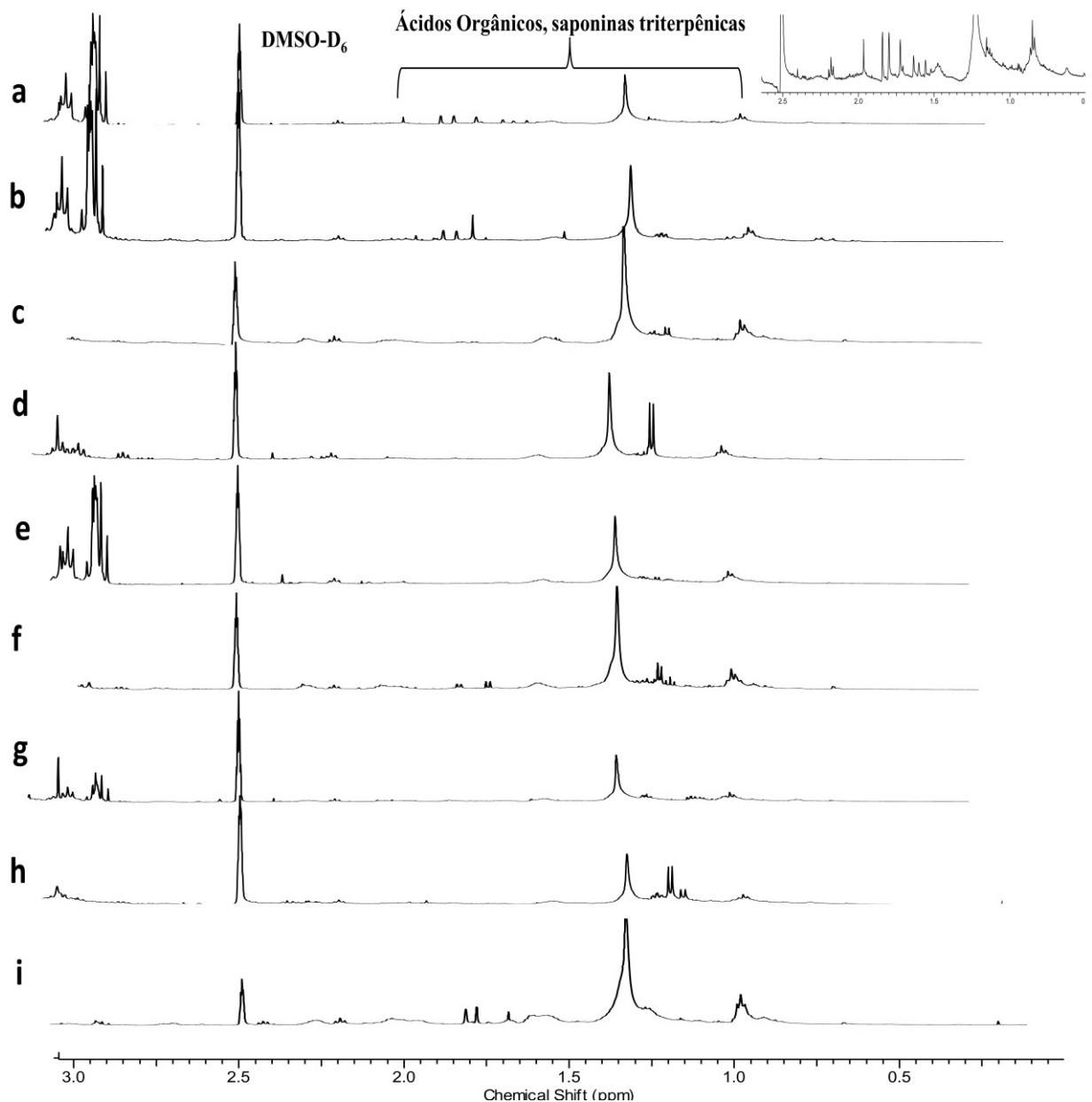
De modo geral, a região de 0 a 3 ppm apresenta sinais característicos de metabólitos com cadeias alifáticas presentes nas plantas. A **figura 23** mostra um perfil metabólico com sinais que caracterizam a presença de saponinas triterpênicas (multipletos na região de 1 a 2.5 ppm). Embora esses metabólitos sejam considerados marcadores quimiotaxonômicos no gênero *Polygala*, os mesmos nunca foram reportados ou isolados nas espécies de *Polygala* presentes no sul do Brasil, o qual este estudo tem enfoque.

Tais informações referentes à presença de saponinas triterpênicas evidenciam o alto potencial farmacológico entre outras aplicações para estas espécies, sendo elas a *Polygala altomontana*, *Polygala brasiliensis*, *Polygala linoides* e *Polygala sabulosa* as quais demonstraram o maior acúmulo de sinais referentes a essas substâncias, representadas na **figura 23a, b, f e i** respectivamente. Alguns singletos na região de 3.8 ppm são característicos de grupamentos metoxilas ligados a anéis aromáticos, que estão presentes em diversas xantonas e estirilpironas encontradas no gênero *Polygala*, como já reportado em *Polygala densiracemosa* (TIZZIANI *et al.*, 2018), porém aqui reportamos pela primeira vez um

1 compilado de sinais referentes a esses compostos para as espécies *Polygala sabulosa*,
2 *Polygala campestris* e *Polygala linoides*, que as diferenciam das outras espécies na análise
3 análise do perfil químico.

4

5 **Figura 23.** Espectro de RMN de ^1H de 500 MHz das amostras de extrato etanólico dos
6 caules dos 9 extratos de *Polygala* com massa de 10 mg de cada extrato em 500 μL de DMSO-
7 d_6 . Área expandida na faixa 0,5 – 3,00 ppm.



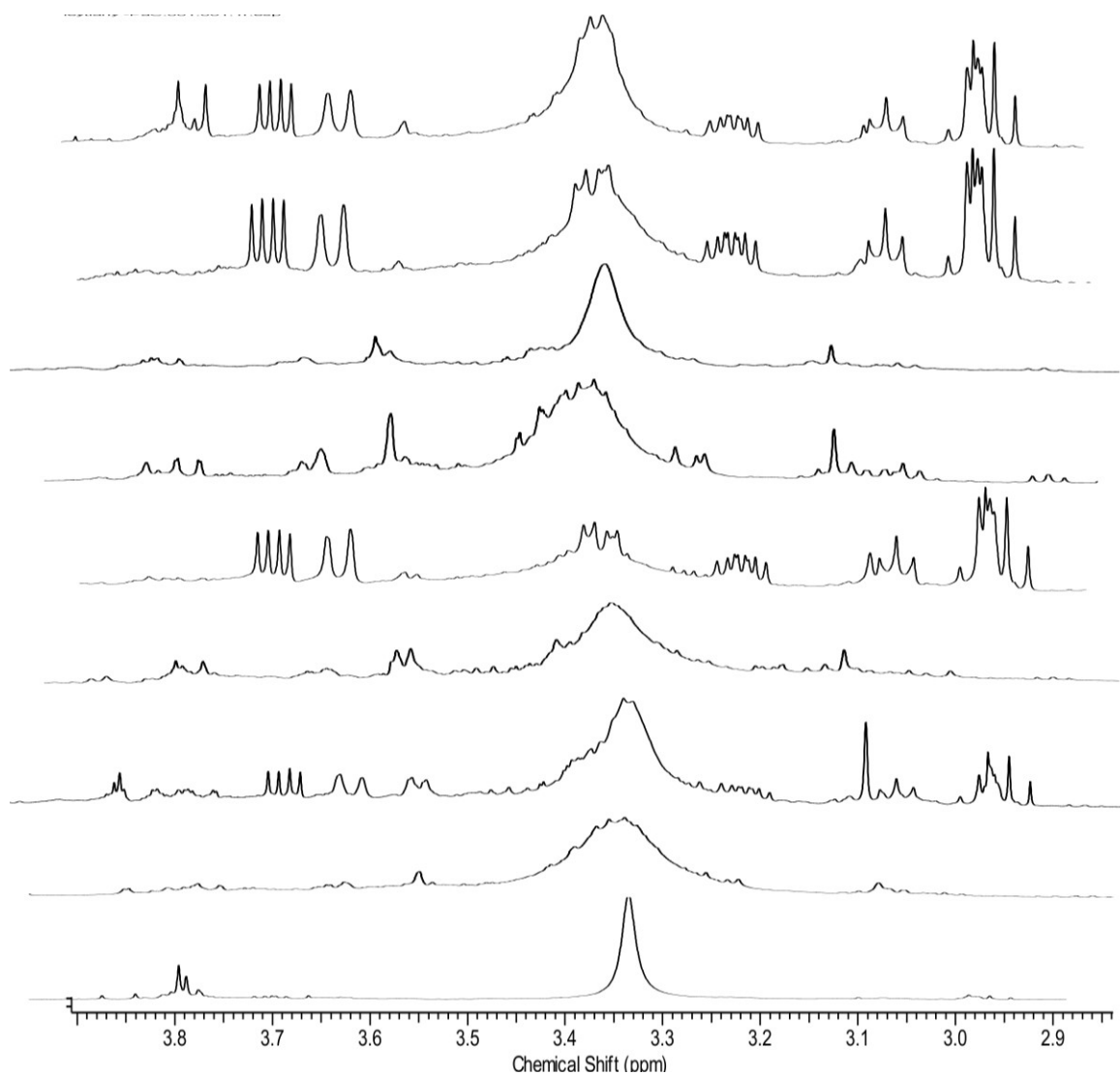
8

9 Legenda: **a** - *Polygala altomontana*; **b** - *Polygala brasiliensis*; **c** - *Polygala campestris*; **d** -
10 *Polygala densiracemos*; **e** - *Polygala lancifolia*; **f** - *Polygala linoides*; **g** - *Polygala*
11 *paniculata*; **h** - *Polygala pulchella* e **i** *Polygala sabulosa*. Fonte: Própria autora.

1
2
3
4
5
6
7
8
9

Ácidos orgânicos como succinato, malato, citrato, também podem ser observados na região entre 2,4 ppm e 3 ppm (**figura 24**). Os extratos das espécies de *Polygala* do presente estudo apresentam clássicos sinais de presença de açúcares em sua matriz vegetal, que são caracterizados pelos sinais sobrepostos e aglomerados na região entre 2.5 e 4 ppm (**Figuras 24 e 25**).

10 **Figura 24.** Espectro de RMN de ^1H de 500 MHz das amostras de extrato etanólico
11 dos caules dos 9 extratos de *Polygala* com massa de 10 mg de cada extrato em 500 μL de
12 DMSO- d_6 . Área expandida na faixa 2.9 – 4,00 ppm.



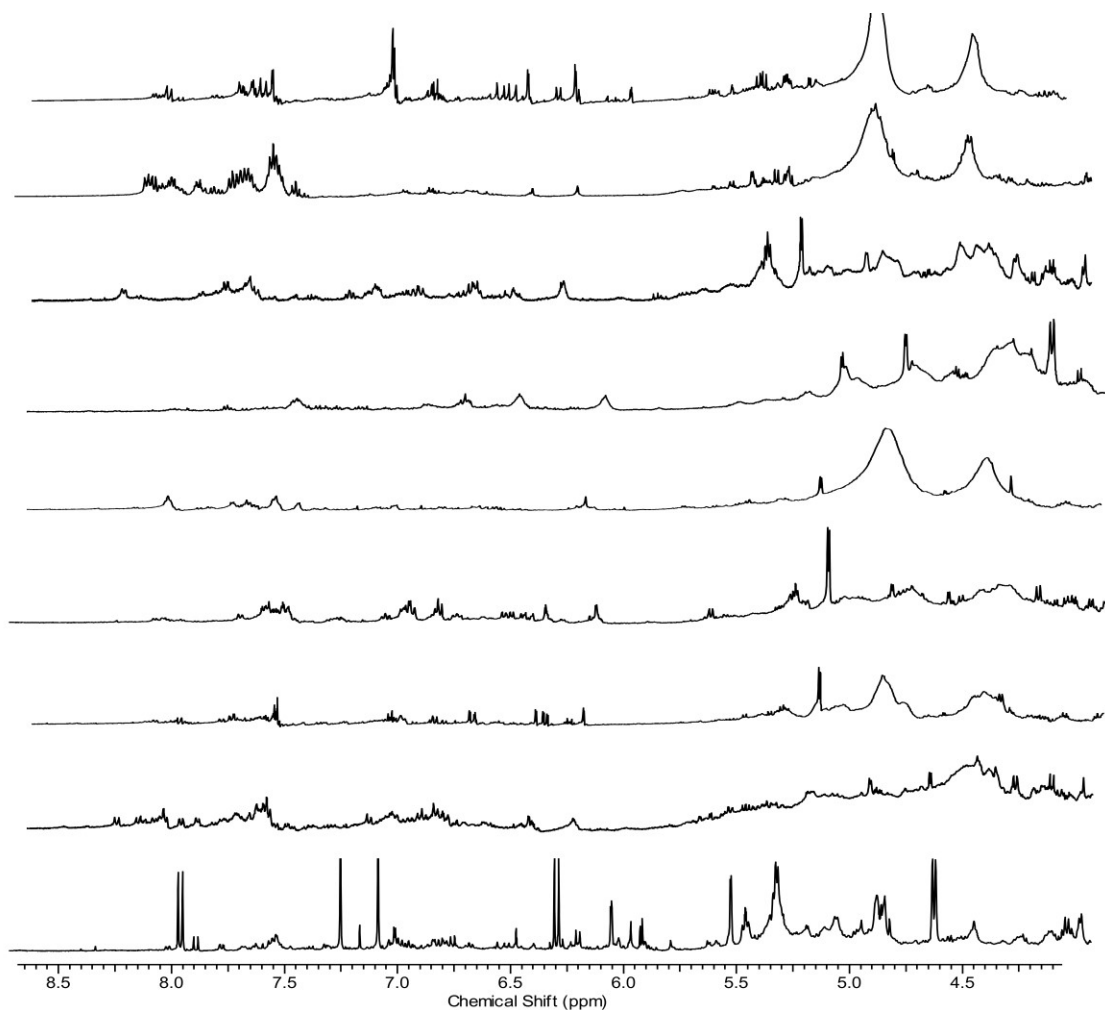
13
14
15
16

Legenda: **a** - *Polygala altomontana*; **b** - *Polygala brasiliensis*; **c** - *Polygala campestris*; **d** - *Polygala densiracemosa*; **e** - *Polygala lancifolia*; **f** - *Polygala linoides*; **g** - *Polygala paniculata*; **h** - *Polygala pulchella* e **i** *Polygala sabulosa*. Fonte: Própria autora.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

O sinais do espectro referentes a compostos fenólicos como xantonas, flavonoides, cumarinas, entre outros, podem ser observados na região de 4 a 9 ppm (**Figura 25**). Os espectros de RMN de ^1H , das espécies de *Polygala* no presente estudo, apresentam sinais característicos de hidrogênios aromáticos, com diferentes padrões de substituição referentes a compostos fenólicos como flavonoides e xantonas, além de apresentarem sinais característicos de hidroxila quelada, por volta de 12,6 e 13 ppm.

Figura 25. Espectro de RMN de ^1H de 500 MHz das amostras de extrato etanólico dos caules dos 9 extratos de *Polygala* com massa de 10 mg de cada extrato em 500 μL de DMSO- d_6 . Área expandida na faixa 4,0 – 9,00 ppm.



14
15
16
17

Legenda: **a** - *Polygala altomontana*; **b** - *Polygala brasiliensis*; **c** - *Polygala campestris*; **d** - *Polygala densiracemos*; **e** - *Polygala lancifolia*; **f** - *Polygala linoides*; **g** - *Polygala paniculata*; **h** - *Polygala pulchella* e **i** *Polygala sabulosa*. Fonte: Própria autora.

1
2
3 Os espectros de RMN de ^1H dos extratos de *Polygala* exibem a presença de numerosos
4 constituintes, como carboidratos, compostos fenólicos, triterpenos e esqueletos esteroidais.
5 Além dessas atribuições, o amplo número de sinais na região espectral entre 4,0 e 5,0 ppm
6 observada em todos os espectros está provavelmente associado à sobreposição de numerosos
7 grupos hidroxí dos compostos de *Polygala*. Embora os extratos tenham sido cuidadosamente
8 secos, o sinal H_2O foi observado como um pico alargado sobreposto aos sinais de
9 carboidratos aparecendo entre 3,3 e 3,6 ppm em diferentes graus nas amostras, o que pode
10 acontecer levando-se em consideração que o DMSO é altamente higroscópico (IMAI *et al.*,
11 2020).

12 13 **5.7. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS DE *POLYGALA* ATRAVÉS** 14 **DE METODOLOGIA *in vitro*.**

15
16 Sendo os produtos naturais uma fonte significativa para potenciais moléculas, com
17 novos mecanismos de ação pelos quais os patógenos com resistência antimicrobiana podem
18 ser erradicados, os extratos das plantas do gênero *Polygala* foram avaliados nesse sentido. A
19 literatura comprova que extratos de plantas apresentam uma vasta gama de classes de
20 substâncias químicas, como alcalóides, taninos, flavonóides e terpenóides, que possuem
21 atividades biológicas incluindo antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, etc. Além do
22 mais, existe uma lista, publicada pela Organização Mundial da Saúde, das bactérias que
23 necessitam urgentemente de novos antibióticos para combatê-las, classificadas com prioridade
24 crítica, alta e média. Dentre as bactérias listadas, três dos patógenos de prioridade alta foram
25 testadas neste trabalho, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*
26 (OMS, 2017). Portanto, durante as últimas duas décadas, tem sido dada extrema atenção à
27 descoberta e desenvolvimento de agentes antimicrobianos naturais multi-alvo com alta
28 eficácia e baixos efeitos colaterais (PAWAR SV, HO JC, YADAV GD, 2017).

29 As análises dos resultados obtidos da avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*
30 foram realizadas segundo o critério de MACHADO e colaboradores (2005), que considera
31 valores de CIM abaixo de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ como uma boa atividade antimicrobiana, CIM de 100
32 a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ como atividade antimicrobiana moderada e valores de CIM de 500 a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$
33 como uma atividade fraca. Os valores de CIM acima de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ inferem
34 inatividade antibacteriana para os extratos.

1 A análise das reações nos micropoços se dá pela utilização do reagente indicador,
 2 cloreto de trifetil tetrazolio. Quando este composto entra em contato com um microrganismo
 3 que seja capaz de degradar fontes de carbono, reage com os elétrons que são liberados e é
 4 reduzido a trifetilformazan (TPF), que, diferente do NADH, não é metabolizado e
 5 “envenena” o sistema, mas torna possível da atividade metabólica pela visualização da
 6 medição vermelha, conforme ilustrado na **figura 9** (OLGA *et al.*, 2008). Todos os resultados
 7 estão em valores de concentração inibitória mínima na **tabela 7** (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$). A tabela 7
 8 demonstra os resultados da Concentração Inibitória Mínima dos extratos brutos de *Polygala*

9
 10 **Tabela 7.** Resultado da Atividade antibacteriana dos extratos das espécies *P. sabulosa*,
 11 *P. brasiliensis*, *P. linoides*, *P. altamontana*, *P. pulchella*, *P. campestris*, *P. lancifolia*, *P.*
 12 *densinracemosa* frente às bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Amostra	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>P. sabulosa</i>	>1000	>1000	>1000
<i>P. brasiliensis</i>	>1000	>1000	>1000
<i>P. linoides</i>	>1000	>1000	>1000
<i>P. altamontana</i>	>1000	>1000	>1000
<i>P. pulchella</i>	>1000	>1000	>1000
<i>P. campestris</i>	>1000	>1000	>1000
<i>P. lanifolia</i>	>1000	>1000	>1000
<i>P. densinracemosa</i>	>1000	>1000	>1000
P. a. C.	1000	250	>1000
P. p. C. G.	>1000	>1000	>1000
P. p. C. D.	>1000	>1000	1000
P. s. c.	>1000	500	>1000
P. p. Fl. D.	>1000	1000	>1000
P. p. R. D.	>1000	>1000	>1000
P. s. R.	>1000	>1000	>1000
P. s. Fl.	500	1000	1000
Gentamicina (C +)	0.62	0.62	0.62

14 Legenda: C+: Controle positivo. C: representando os extratos dos caules, Fl das flores
 15 e R das raízes. CIM ($\mu\text{g-1}$).

16
 17 Observa-se que o extrato de *P. altomontana* caule (P.a.C) e *P. sabulosa* caule (P. s. c)
 18 foram, dentre os extratos, os mais ativos, pois apresentaram maiores valores de inibição para a
 19 bactéria *S. aureus* (Gram-positiva) em relação aos outros extratos brutos. Tal informação pode
 20 sugerir que as estilpironas presentes nesses extratos podem ser responsáveis, ou pelo menos
 21 parcialmente, pela atividade observada. Além disso, o extrato P.a.C demonstrou que em
 22 concentrações relativamente mais baixas ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentou atividade antibacteriana

1 agindo frente as bactérias. Uma atividade moderada foi observada no extrato das Flores de *P.*
2 *sabulosa* (P. s. Fl.) frente à *S. aureus*.

3 Para as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli* observou-se que dois
4 extratos, P.p.C.D. e P.s.Fl. mostraram fraca atividade antibacteriana frente a *P. aeruginosa* e
5 para a *E. coli* o extrato de *P. sabulosa* flores demonstrou atividade moderada enquanto para o
6 extrato *P. altomontana* C apresentou fraca atividade. Os demais extratos de *Polygala*
7 demonstraram atividade antibacteriana de fraca para inativos.

8 Algumas conclusões podem ser observadas com relação aos extratos testados em
9 geral, haja vista que alguns deles foram avaliados pela primeira vez quanto a atividade
10 biológica antibacteriana. Sendo assim, observa-se que os estudos que relataram atividade
11 antimicrobiana para o extrato de *Polygala paniculata* puderam ser confirmados neste
12 trabalho. Já os extratos referentes às folhas de todas as espécies apresentaram-se inativos.

13 Embora haja uma grande heterogeneidade nos resultados da concentração inibitória
14 mínima de um extrato para outro, os resultados mostraram que os extratos vegetais referentes
15 aos caules, que foram previamente selecionados devido aos resultados observados na
16 quantificação de ácido salicílico na sessão 5.2, apresentaram atividade antimicrobiana mais
17 proeminentes sobre os principais patógenos.

18 Vale ressaltar que a atividade antibacteriana do salicilato de metila isoladamente foi
19 anteriormente descrita por (ADULOVIC NS, BLAGOJEVIC PD, STOJANOVIC-RADIC
20 ZZ, 2013) apresentando moderada atividade contra diferentes bactérias, com CIMs variando
21 de 141 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 562 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Tendo em vista que as espécies de *Polygala* apresentam altas
22 concentrações de ácido salicílico e salicilato de metila, rutina, apigenina, quercetina,
23 xantonas, entre outras. Considera-se que as partes dos caules e as demais partes dessas plantas
24 são possíveis fontes de moléculas antimicrobianas para as diversas áreas de interesse.

25

26

27

28

29

30

31

32

33

6. CONCLUSÕES

- **Em relação a sessão 5.2**

Os extratos foram obtidos e analisados de forma rápida e eficientemente e possibilitaram que fossem classificados como extratos ricos em compostos fenólicos pelo *screening* apresentado no perfil cromatográfico por HPLC-UV.

- **Em relação a sessão 5.3**

Através da análise por LC-ESI-MS/MS foi possível qualificar os extratos com relação aos tipos de fenólicos presentes, e também observar quais dos metabólitos considerados marcadores químicos no gênero, sendo os mesmos quantificados nos 39 extratos. Vários compostos fenólicos relatos na literatura apresentaram-se em concentrações relativamente altas em algumas espécies, como a rutina, a escopoletina e os ácidos salicílico, ferúlico entre outros.

- **Em relação a sessão 5.4**

Um novo método rápido, desenvolvido para a quantificação de AS, um elicitor de metabólitos secundários em matrizes vegetais, por meio de eletroforese capilar com detecção de UV, permitiu assumir informações relevantes sobre essas espécies com importantes características medicinais na região Sul do Brasil. O desenvolvimento de um método subminuto que permitiu a quantificação de um elicitor como AS, em plantas, com baixos limites de detecção e quantificação, alta seletividade, baixo consumo de solventes orgânicos e curto tempo de preparo das amostras, colaboraram significativamente na triagem de compostos bioativos nas espécies *Polygala*. Foi possível identificar e destacar a alta concentração de SA nos extratos da caules de todas as espécies, e especificamente valores mais altos para *Polygala campestris* e raízes de *Polygala paniculata*. Essa característica permitiu a inferência de hipóteses muito relevantes, como por exemplo, o fato dessas plantas acumularem esse metabólito em maiores concentrações nos caules se refere a um mecanismo de defesa dessas espécies, em resposta ou repelência aos ataques de herbívoros, uma vez que essas espécies possuem caules longos e são pequenos arbustos.

1 De forma resumida, tal método para quantificação desse metabólito permitiu avaliar o
2 potencial fitoquímico e fitofarmacêutico dessas plantas.

3
4
5 • **Em relação a sessão 5.5**

6
7 Nesta sessão foi apresentado o desenvolvimento de um procedimento sistemático
8 simples, porém poderoso, para análise da qualidade dos extratos de *Polygala* visando a
9 quantificação dos metabolitos bioativos analisados. Um método rápido para a determinação
10 da Rutina e Xantona em amostras de extrato de *Polygala* foi desenvolvido e seu desempenho
11 analítico, além das características vantajosas o torna adequado para ensaios de rotina para a
12 análise da qualidade dessas matrizes vegetais.

13
14
15 • **Em relação a sessão 5.6**

16
17 Este trabalho foi o primeiro estudo que apresenta perfis químicos espectroscópicos
18 (RMN ¹H) das espécies de *Polygala* para diferenciação de suas características. Para uma
19 análise completa seria interessante associar um estudo com análise multivariada visando uma
20 perspectiva mais abrangente. Os resultados mostraram que as espécies podem ser claramente
21 diferenciadas com base em suas respectivas identidades químicas espectroscópicas de
22 composição de metabólitos via análise do perfil químico. Portanto, os resultados alcançados
23 confirmam a capacidade, aplicabilidade, confiabilidade da análise de identidade fitoquímica
24 de diferentes espécies e extratos de plantas.

25
26
27 • **Em relação a sessão 5.7**

28
29 Em relação a atividade antibacteriana em extratos de *Polygala*, os resultados obtidos
30 neste trabalho demonstram a atividade antimicrobiana das espécies *P. altomontana*, *P.*
31 *sabulosa*, *P. campestris* e *P. paniculata*. Os resultados demonstraram atividade
32 principalmente contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* CIM= 250-500 µL
33 mL⁻¹.

1 **CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS**

2
3 Os métodos de CZE aqui desenvolvidos foram consistentes para avaliação dos
4 constituintes químicos de *Polygala*, e outras espécies desse mesmo gênero vegetal podem ser
5 utilizadas para realização de triagens de metabólitos alvos nos mais diversos campos de
6 pesquisa envolvidos. Os métodos se mostraram simples, seletivos, rápidos e eficientes.
7 Demonstrando que o preparo de amostras de uma matriz tão complexa pode ser simples como
8 diluir e injetar utilizando as estratégias descritas no desenvolvimento dos métodos por CZE. A
9 determinação da composição fenólica por LC-MS/MS dos metabólitos considerados
10 marcadores químicos no gênero permitiu correlacionar os constituintes dos extratos às
11 concentrações relativamente altas de ácido salicílico, haja vista que o mesmo atua como
12 elicitador endógeno de metabólitos secundários.

13 Os dados descritos anteriormente confirmaram a análise prévia feita por análise de
14 perfil cromatográfico utilizando a técnica de HPLC-UV e a análise dos extratos permitiram
15 que os mesmos fossem classificados como extratos ricos em compostos fenólicos pelo
16 *screening* apresentado nessa análise. Em adição, a análise química dos extratos etanólicos de
17 *Polygala* por RMN ¹H permitiu a diferenciação dos constituintes e acentuou as informações
18 encontradas sobre os compostos majoritariamente presentes nessas matrizes por HPLC-UV,
19 LC-MS/MS e CZE.

20 Além da constituição química observada nas análises, foi possível ainda, constatar
21 atividade biológica antibacteriana para alguns desses extratos. Os resultados obtidos na
22 avaliação antibacteriana comprovaram a atividade antimicrobiana das espécies *P.*
23 *altomontana*, *P. sabulosa*, *P. campestris* e *P. paniculata*, e esses resultados proporcionaram
24 perspectivas de estudo para contribuição das pesquisas relacionadas a tratamentos de
25 patologias antibacterianas e antifúngicas com relação a essas espécies do gênero *Polygala*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADULOVIĆ NS, BLAGOJEVIĆ PD, STOJANOVIĆ-RADIĆ ZZ, Stojanović NM. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. **Curr Med Chem.** v. 20, n. 7, p. 932–52 , 2013.

ALAGAMMAL, M.; PAULPRIYA, K.; MOHAN, V. R. Anticancer activity of ethanol extract of Polygala javana DC whole plant against Dalton Ascites Lymphoma. **Res. J. Recent Sci.** v. 2, p. 18–22 , 2013.

ALI, Barket. Salicylic acid: An efficient elicitor of secondary metabolite production in plants. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** p. 101884 , 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101884>>.

ALKUFEIDY, Roua M. *et al.* Chemical composition of Thymus vulgaris extracts and antibacterial activity against pathogenic multidrug resistance bacteria. **Physiological and Molecular Plant Pathology** v. 117, p. 101745 , 1 jan. 2022.

AMARAL, Ricardo Guimarães *et al.* CONTRIBUIÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS PARA O DESENVOLVIMENTO DE. **Ciências Biológicas e de Saúde Unit.** v. 5, p. 119–134 , 2019.

AMAROWICZ, R. *et al.* Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry** v. 84, n. 4, p. 551–562 , 1 mar. 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814603002784>>. Acesso em: 23 jul. 2019.

ARAGÃO, NÁDIA MACHADO DE, VELOSO, MÁRCIA CRISTINA DA CUNHA E ANDRADE, Jailson Bittencourt De. Validação de métodos cromatográficos de análise: um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “Química Verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova [online].** v. 32, n. 9, p. 2476–2481 , 2009.

ARRUDA-SILVA, Fábio *et al.* Polygala molluginifolia A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation in the mouse pleurisy model by inhibiting NF-κB activation. **International Immunopharmacology** v. 19, n. 2, p. 334–341 , 1 abr. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576914000642?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 jul. 2019.

BAENAS, Nieves; GARCÍA-VIGUERA, Cristina; MORENO, Diego A. Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. **Molecules** v. 19, n. 9, p. 13541–13563 ,

1 2014.

2 BENSEMMANE, Nachida *et al.* Quantification of phenolic acids by partial least
3 squares Fourier-transform infrared (PLS-FTIR) in extracts of medicinal plants.
4 **Phytochemical Analysis** v. 32, n. 2, p. 206–221 , 2021.

5 BETTIO, Luis E B *et al.* Antidepressant-like effect of extract from *Polygala*
6 *paniculata*: Involvement of the monoaminergic systems. **Pharmaceutical Biology** v. 49, n.
7 12, p. 1277–1285 , 1 dez. 2011. Disponível em:
8 <<https://doi.org/10.3109/13880209.2011.621958>>.

9 BOLZANI, V. S. *et al.* Natural products from Brazilian biodiversity as a source of
10 new models medicinal chemistry. **Pure Application Chemistry** v. 84, n. 9, p. 1837–1846 ,
11 2012.

12 BORGES, Fabio R.M. *et al.* Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract,
13 dichloromethane fraction and steroid α -spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced
14 peritonitis in mice. **Journal of Ethnopharmacology** v. 151, n. 1, p. 144–150 , 10 jan. 2014a.
15 Disponível em:
16 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874113007162?via%3Dihub>>.
17 Acesso em: 23 jul. 2019.

18 BORGES, Fabio R M *et al.* Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract,
19 dichloromethane fraction and steroid α -spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced
20 peritonitis in mice. **Journal of Ethnopharmacology** v. 151, n. 1, p. 144–150 , 2014b.
21 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874113007162>>.

22 BRÄSE, Stefan *et al.* Xanthone dimers: a compound family which is both common
23 and privileged. v. 32, p. 1–104 , 2015. Disponível em: <www.rsc.org/npr>.

24 CANUTO, Gisele A. B. *et al.* Metabolómica: definições, estado da arte e aplicações
25 representativas. **Química Nova** v. 41, n. 1, p. 75–91 , 2018.

26 CAPRA, Juliano C. *et al.* Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated
27 from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: Evidence for the involvement of
28 monoaminergic systems. **European Journal of Pharmacology** v. 643, n. 2–3, p. 232–238 ,
29 25 set. 2010a. Disponível em:
30 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299910006345?via%3Dihub>>.
31 Acesso em: 22 jul. 2019.

32 CAPRA, Juliano C. *et al.* Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated
33 from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: Evidence for the involvement of

1 monoaminergic systems. **European Journal of Pharmacology** v. 643, n. 2–3, p. 232–238 ,
2 25 set. 2010b. Disponível em:
3 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299910006345?via%3Dihub>>.
4 Acesso em: 23 jul. 2019.

5 CERVELLATI, Rinaldo *et al.* **Polyphenols from Polygala spp. and Their**
6 **Antioxidant Activity**. [S.l: s.n.], 2004. 415–425 p. 1 v. .

7 CHAGAS-PAULA, Daniela Aparecida. Estudos metabolômicos de Astedraceae por
8 UPLC - UV - HRFTMS , avaliação do potencial anti-inflamatório in vitro e suas correlações
9 através de métodos in silico. p. 97 , 2013. Disponível em:
10 <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-28112013-092322/pt-br.php>>.

11 CHAMKHI, Imane *et al.* Plant-microbial interaction: The mechanism and the
12 application of microbial elicitor induced secondary metabolites biosynthesis in medicinal
13 plants. **Plant Physiology and Biochemistry** v. 167, p. 269–295 , 1 out. 2021.

14 CHEONG, Myung-Hee *et al.* Anti-inflammatory effects of Polygala tenuifolia root
15 through inhibition of NF- κ B activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells.
16 **Journal of ethnopharmacology** v. 137, p. 1402–1408 , 10 ago. 2011.

17 CHINGWARU, Constance *et al.* Wound healing potential of selected Southern
18 African medicinal plants: A review. **Journal of Herbal Medicine** p. 100263 , 2019.
19 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210803319300090>>.

20 CHOUDHURY, Moumita *et al.* Partial Purification and Characterization of Albain 1,
21 a Triterpene with Antimicrobial Activity, from the Wood Extract of Avicennia alba Blume.
22 **Journal of Pharmaceutical Research International** v. 32, n. 2, p. 38–48 , 2020.

23 CHUNG, In-Won *et al.* Behavioural pharmacology of polygalasaponins indicates
24 potential antipsychotic efficacy. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v. 71, n. 1–2, p.
25 191–195 , 1 jan. 2002. Disponível em:
26 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305701006487>>. Acesso em: 25 jul.
27 2019.

28 COSTA, Ana Carolina O. *et al.* Determination of sorbate and benzoate in beverage
29 samples by capillary electrophoresis-Optimization of the method with inspection of ionic
30 mobilities. **Journal of Chromatography A** v. 1204, n. 1, p. 123–127 , 2008.

31 DA-COL, José Augusto; DANTAS, Willian; POPPI, Ronei. Experimento Didático De
32 Quimiometria Para O Mapeamento De Pellets Farmacêuticos Utilizando Espectroscopia De
33 Imagem Na Região Do Infravermelho Próximo E Resolução Multivariada De Curvas Com

- 1 Mínimos Quadrados Alternantes: Um Tutorial, Parte Iv. **Química Nova** v. 41, n. 3, p. 345–
2 354 , 2017. Disponível em:
3 <[http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=6700&nomeArquivo=ED20170208.p](http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=6700&nomeArquivo=ED20170208.pdf)
4 [df](http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=6700&nomeArquivo=ED20170208.pdf)>.
- 5 DA ROCHA, J. L. C. Quantification of methyl salicylate in four genera of the
6 Polygalaceae by HPLC-DAD. **Química Nova** v. 35, p. 2263–2266 , 2012.
- 7 DA ROCHA LAPA, Fernanda *et al.* Vasorelaxant and hypotensive effects of the
8 extract and the isolated flavonoid rutin obtained from Polygala paniculata L. **Journal of**
9 **Pharmacy and Pharmacology** v. 63, n. 6, p. 875–881 , 1 jun. 2011. Disponível em:
10 <<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01240.x>>.
- 11 DALILA VENZKE. Estudo quimiosistemático de espécies do gênero Polygala
12 eavaliação das propriedades biológicas. **Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa**
13 **Catarina. Centro de Ciências Físicas e Matemática** , 2015.
- 14 DALL’ACQUA, Stefano *et al.* **Cytotoxic Compounds from Polygala vulgaris**. [S.l.:
15 s.n.], 2002. 1499–1501 p. 50 v. .
- 16 DAO, Trong Tuan *et al.* Xanthonés from Polygala karenium inhibit neuraminidases
17 from influenza A viruses. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 22, n. 11, p. 3688–
18 3692 , 1 jun. 2012. Disponível em:
19 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X12004672>>. Acesso em: 22
20 jul. 2019.
- 21 DE CAMPOS, Rafael O.P. *et al.* Antinociceptive properties of the hydroalcoholic
22 extract and preliminary study of a xanthone isolated from Polygala cyparissias
23 (Polygalaceae). **Life Sciences** v. 61, n. 16, p. 1619–1630 , 12 set. 1997. Disponível em:
24 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320597007418?via%3Dihub>>.
25 Acesso em: 23 jul. 2019.
- 26 DE SOUZA, André Marcelo; POPPI, Ronei Jesus. Experimento didático de
27 quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no
28 infravermelho médio e análise de componentes principais: UM tutorial, parte I. **Química**
29 **Nova** v. 35, n. 1, p. 223–229 , 2012.
- 30 DE SOUZA ARAÚJO, Camila *et al.* Total content of kaurene diterpenes in Annona
31 vepretorum stems via ¹H qNMR: A method for speeding the identification of bioactive
32 extracts. **Phytochemical Analysis** v. 30, n. 1, p. 83–88 , 2019.
- 33 DEWICK, Paul M. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Pathway**. [S.l.:

1 s.n.], 2009. .9780470741689.

2 DUARTE, Filipe Silveira *et al.* Participation of dihydrostyryl-2-pyrone and styryl-2-
3 pyrones in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine topical
4 anesthetic. **Pharmacology, biochemistry, and behavior** v. 86, n. 1, p. 150—161 , 2007.
5 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.12.019>>.

6 DUARTE, Filipe Silveira *et al.* **Psychopharmacological effects and safety of styryl-
7 2-pyrone and dihydrostyryl-2-pyrone-rich fraction from *Polygala sabulosa* : absence
8 of withdrawal syndrome and tolerance to anxiolytic-like and anticonvulsant effects.** [S.l.:
9 s.n.], 2018. 70 v. .

10 DUTRA, Rafael C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug
11 discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research** v. 112, p. 4–29 , 2016.
12 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>>.

13 DYER, Lee A. *et al.* Modern approaches to study plant–insect interactions in chemical
14 ecology. **Nature Reviews Chemistry** v. 2, n. 6, p. 50–64 , 2018.

15 EL-YAZBI, Amira F. *et al.* Simultaneous determination of Mometasone Furoate and
16 salicylic acid in complex matrix using green analytical method. **Microchemical Journal** v.
17 163, n. October 2020, p. 105900 , 2021. Disponível em:
18 <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105900>>.

19 ESTRADA, Alberto *et al.* Isolation and evaluation of immunological adjuvant
20 activities of saponins from *Polygala senega* L. **Comparative Immunology, Microbiology
21 and Infectious Diseases** v. 23, n. 1, p. 27–43 , 1 jan. 2000. Disponível em:
22 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014795719900020X?via%3Dihub>>.
23 Acesso em: 23 jul. 2019.

24 FANG, Chuanying; FERNIE, Alisdair R.; LUO, Jie. Exploring the Diversity of Plant
25 Metabolism. **Trends in Plant Science** v. 24, n. 1, p. 83–98 , 2019. Disponível em:
26 <<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.09.006>>.

27 FARINA, Marcelo *et al.* Protective effects of *Polygala paniculata* extract against
28 methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v.
29 57, n. 11, p. 1503–1508 , 1 nov. 2005. Disponível em:
30 <<https://doi.org/10.1211/jpp.57.11.0017>>.

31 FILGUEIRA, Joana Patrícia Pantoja Serrão; KIKUCHI, Tatiani Yuriko Souza;
32 COELHO-FERREIRA, Márlia Regina. Morphology, ontogeny and structure of the stipular
33 nectaries in *Caamembeca spectabilis* (Polygalaceae). **Acta Amazonica** v. 46, n. 2, p. 127–132

1 , 2016.

2 GALINDO-LUJÁN, Rocío *et al.* Classification of quinoa varieties based on protein
3 fingerprinting by capillary electrophoresis with ultraviolet absorption diode array detection
4 and advanced chemometrics. **Food Chemistry** v. 341, p. 128207 , 30 mar. 2021.

5 GANZERA, M. Quality control of herbal medicines by capillary electrophoresis:
6 Potential, requirements and applications. **Electrophoresis** v. 29, n. 17, p. 3489–3503 , 2008.

7 GAS, Bohuslav *et al.* PeakMaster - A freeware simulator of capillary zone
8 electrophoresis. **LC-GC Europe** v. 18, p. 282–288 , 1 maio 2005.

9 GULUMA, Tilahun *et al.* Phytochemical investigation and evaluation of antimicrobial
10 activities of Brucea antidysenterica leaves. **Chemical Data Collections** v. 28 , 2020.

11 GUO, Changrun *et al.* Neuroprotective effects of polygalacic acid on scopolamine-
12 induced memory deficits in mice. **Phytomedicine** v. 23 , 4 jan. 2016.

13 HA, Wai Yan *et al.* Involvement of protein kinase C and E2F-5 in euxanthone-induced
14 neurite differentiation of neuroblastoma. **The International Journal of Biochemistry & Cell**
15 **Biology** v. 38, n. 8, p. 1393–1401 , 1 jan. 2006. Disponível em:
16 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272506000392?via%3Dihub>>.
17 Acesso em: 23 jul. 2019.

18 HAMZA, Nawel *et al.* A review of Algerian medicinal plants used in the treatment of
19 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology** v. 238, n. April, p. 111841 , 2019. Disponível em:
20 <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111841>>.

21 HAN, Le *et al.* Simultaneous chromatographic fingerprinting and quantitative analysis
22 of flavonoids in Pollen Typhae by high-performance capillary electrophoresis. **Acta**
23 **Pharmaceutica Sinica B** v. 2, n. 6, p. 602–609 , 1 dez. 2012.

24 HANSSON, Bill; WICHER, Dieter. Chemical Ecology in Insects. **Chemosensory**
25 **Transduction: The Detection of Odors, Tastes, and Other Chemostimuli** p. 29–45 ,
26 2016.9780128017869.

27 HARBONE, J. B. Phenolic compounds derived from shrikimate. p. 40–75 ,
28 2010.9781847555779.

29 HELLER, Nicole E.; ZAVALETA, Erika S. Biodiversity management in the face of
30 climate change: A review of 22 years of recommendations. **Biological Conservation** v. 142,
31 n. 1, p. 14–32 , 1 jan. 2009. Disponível em:
32 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S000632070800387X>>. Acesso em: 8
33 jul. 2019.

- 1 HUDLICKY, Tomas. Benefits of Unconventional Methods in the Total Synthesis of
2 Natural Products. **ACS Omega** v. 3, n. 12, p. 17326–17340 , 2018.
- 3 IMAI, Ayano *et al.* Differentiation of Actaea species by NMR metabolomics analysis.
4 **Fitoterapia** v. 146, p. 104686 , 1 out. 2020.
- 5 INDRAYANTO, Gunawan. Validation of Chromatographic Methods of Analysis:
6 Application for Drugs That Derived From Herbs. **Profiles of Drug Substances, Excipients**
7 **and Related Methodology** v. 43, p. 359–392 , 1 jan. 2018. Disponível em:
8 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871512518300037>>. Acesso em: 18 jul.
9 2019.9780128151259.
- 10 JOHANN, Susana *et al.* Antifungal activity of five species of Polygala. **Brazilian**
11 **Journal of Microbiology** v. 42, p. 1065–1075 , 2011. Disponível em:
12 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822011000300027&nrm=iso)
13 [83822011000300027&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822011000300027&nrm=iso)>.
- 14 JUNIOR, ANILDO CUNHA. Constituintes Químicos Da Espécie Vegetal. , 2002.
- 15 KAKO, Mami *et al.* Hypoglycemic Activity of Some Triterpenoid Glycosides.
16 **Journal of Natural Products** v. 60, n. 6, p. 604–605 , 1 jun. 1997. Disponível em:
17 <<https://doi.org/10.1021/np9605403>>.
- 18 KLEIN-JÚNIOR, Luiz C *et al.* Antihyperalgesic Activity of the Methanol Extract and
19 Some Constituents Obtained From Polygala cyparissias (Polygalaceae). **Basic & Clinical**
20 **Pharmacology & Toxicology** v. 111, n. 3, p. 145–153 , 1 set. 2012. Disponível em:
21 <<https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2012.00876.x>>.
- 22 KLEIN-JÚNIOR, Luiz Carlos *et al.* Role of gastric mucus secretion, oxinitergic
23 system and sulfhydryl groups on the gastroprotection elicited by Polygala cyparissias
24 (Polygalaceae) in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 65, n. 5, p. 767–776 , 1
25 maio 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jphp.12038>>.
- 26 KLEIN, Luiz Carlos *et al.* Antiulcerogenic activity of extract, fractions, and some
27 compounds obtained from Polygala cyparissias St. Hillaire & Moquin (Polygalaceae).
28 **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** v. 381, n. 2, p. 121–126 , 2010.
29 Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00210-009-0485-x>>.
- 30 LALL, N.; MEYER, J. J. In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains
31 of Mycobacterium tuberculosis by ethnobotanically selected South African plants. **Journal of**
32 **Ethnopharmacology** v. 66, n. 3, p. 347–354 , 1999.
- 33 LAPA, Fernanda da R *et al.* Antinociceptive Properties of the Hydroalcoholic Extract

1 and the Flavonoid Rutin Obtained from *Polygala paniculata* L. in Mice. **Basic & Clinical**
2 **Pharmacology & Toxicology** v. 104, n. 4, p. 306–315 , 1 abr. 2009. Disponível em:
3 <<https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00365.x>>.

4 LAPA, Fernanda da Rocha *et al.* Gastroprotective activity of the hydroalcoholic
5 extract obtained from *Polygala paniculate* L. in rats. **Journal of Pharmacy and**
6 **Pharmacology** v. 59, n. 10, p. 1413–1419 , 1 out. 2007. Disponível em:
7 <<https://doi.org/10.1211/jpp.59.10.0012>>.

8 LEFEVERE, Hannes; BAUTERS, Lander; GHEYSEN, Godelieve. Salicylic Acid
9 Biosynthesis in Plants. **Frontiers in Plant Science** v. 11, n. April, p. 1–7 , 2020.

10 LI, C. et al. Three triterpenoid saponins from the roots of *Polygala japonica* Houtt.
11 **Fitoterapia** v. 83, p. 1184–1190 , 2012.

12 LI, Chuang-Jun *et al.* Glomexanthones A–C, three xanthonolignoid C-glycosides from
13 *Polygala glomerata* Lour. **Fitoterapia** v. 93, p. 175–181 , 1 mar. 2014. Disponível em:
14 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X13003183?via%3Dihub>>.
15 Acesso em: 23 jul. 2019.

16 LI, Chuangjun *et al.* Triterpenoid saponins with neuroprotective effects from the roots
17 of *Polygala tenuifolia*. **Planta Medica** v. 74, n. 2, p. 133–141 , 2008.

18 LI, Jun *et al.* Anti-neuroinflammatory constituents from *Polygala tricornis* Gagnep.
19 **Fitoterapia** v. 83, p. 896–900 , 2 abr. 2012.

20 LI, Shengnan *et al.* Cytoprotective effects of euxanthone against ox-LDL-induced
21 endothelial cell injury is mediated via Nrf2. **Life Sciences** v. 223, p. 174–184 , 15 abr. 2019.
22 Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320519301961>>.
23 Acesso em: 11 jun. 2019.

24 LIN, Li Lin *et al.* Xanthones from the roots of *Polygala caudata* and their antioxidation
25 and vasodilatation activities in vitro. **Planta Medica** v. 71, n. 4, p. 372–375 , 2005.

26 LING, Y. Analysis and detection of the chemical constituents of *Radix Polygalae* and
27 their metabolites in rats after oral administration by ultra high-performance liquid
28 chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass
29 spect. **Journal Pharma. Biomed. Anal.** v. 85, p. 1–13 , 2013.

30 LING, Yun *et al.* Analysis and detection of the chemical constituents of *Radix*
31 *Polygalae* and their metabolites in rats after oral administration by ultra high-performance
32 liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem
33 mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v. 85, p. 1–13 , 1

1 nov. 2013. Disponível em:
2 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708513002616?via%3Dihub>>.
3 Acesso em: 22 jul. 2019.

4 LIU, Diangang *et al.* HPLC Fingerprint Analysis and Content Determination of
5 Extract with Anticancer Activities of Sedi Linearis Herba. **Pharmacognosy Journal** v. 9, n.
6 2, p. 128–134 , 2017.

7 LIU JIAYUE; *et al.* *Determination of the active ingredients and biopotency in*
8 *Polygala tenuifolia Willd. and the ecological factors that influence them* .**Infection, Genetics**
9 **and Evolution**. [S.l: s.n.] , 2019

10 LIU, Jiayue *et al.* Determination of the active ingredients and biopotency in Polygala
11 tenuifolia Willd . and the ecological factors that influence them. **Industrial Crops &**
12 **Products** v. 134, n. March, p. 113–123 , 2019. Disponível em:
13 <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.074>>.

14 LIU, P *et al.* Potential antidepressant properties of Radix Polygalae (Yuan Zhi).
15 **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology** v. 17, p.
16 794–799 , 1 ago. 2010.

17 LIU, X-J. *et al.* Species classification and quality assessment of Chaihu (Radix
18 bupleuri) based on high performance liquid chromatographic fingerprint and combined
19 chemometrics methods. **Archives of Pharmacal Research** v. 34, n. 6, p. 961–969 , 2011.

20 MACHADO, Ke *et al.* Potent Antibacterial Activity of Eugenia umbelliflora.
21 **Pharmaceutical Biology** v. 43, n. 7, p. 636–639 , 2005. Disponível em:
22 <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ipbh20>>.

23 MAK, Yuk Ying *et al.* **Expression of Protein Kinase C Isoforms in Euxanthone-**
24 **Induced Differentiation of Neuroblastoma Cells**. [S.l: s.n.], 2001. 400–405 p. 67 v. .

25 MARIE-ALETH LACAILLE-DUBOIS; CLÉMENT DELAUDE, Anne-Claire
26 Mitaine-Offer. Triterpenoid Saponins: A Focus on Polygalaceae. [S.l: s.n.], 2013. p. 1–4242.
27 9783642221446.

28 MARTINS, Lucia Regina Rocha. **Chromatographic profile and multivaried**
29 **analysis to quality control of commercial samples of the Phyllanthus genus (stone**
30 **breaker)**. 2008. 154 p.

31 MARTINS, R. D. P. et al. Synergistic neurotoxicity induced by methylmercury and
32 quercetin in mice. **Food chem Toxicol** v. 47, p. 645–649 , 2009.

33 MISSAU, FABIANA CRISTINA. Polygala paniculata. , 2008.

1 MIYASE, T.; NOGUCHI, H.; CHEN, X.-M. Sucrose esters and xanthone C-
2 glycosides from the roots of *Polygala sibirica*. **J. Nat. Prod.** v. 62, n. 7, p. 993–996 , 1999.

3 MOROOLE, M. A. *et al.* Medicinal plants used for contraception in South Africa: A
4 review. **Journal of Ethnopharmacology** v. 235, n. February, p. 19–27 , 2019. Disponível
5 em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.002>>.

6 MOTSEI, M.L *et al.* Screening of traditionally used South African plants for
7 antifungal activity against *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology** v. 86, n. 2–3,
8 p. 235–241 , 1 jun. 2003. Disponível em:
9 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874103000825>>. Acesso em: 23 jul.
10 2019.

11 MURPHY, Alex M.; ZHOU, Tao; CARR, John P. An update on salicylic acid
12 biosynthesis, its induction and potential exploitation by plant viruses. **Current Opinion in**
13 **Virology** v. 42, p. 8–17 , 2020. Disponível em:
14 <<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.02.008>>.

15 NAGAJYOTHI, P.C. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory activities of zinc oxide
16 nanoparticles synthesized using *Polygala tenuifolia* root extract. **Journal of Photochemistry**
17 **and Photobiology B: Biology** v. 146, p. 10–17 , 1 maio 2015. Disponível em:
18 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134415000457>>. Acesso em: 25 jul.
19 2019.

20 NASCIMENTO, Marcus Vinicius Pereira dos Santos *et al.* *7-prenyloxi-6-*
21 *methoxycoumarin from Polygala sabulosa A.W. Bennett Regulates p38 MAPK and NF-kB*
22 *Pathways Inhibiting the Inflammation Induced by Carrageenan in the Mouse Model of*
23 *Pleurisy* .**Inflammation & Allergy - Drug Targets (Discontinued)**. [S.l: s.n.]. Disponível
24 em: <<http://www.eurekaselect.com/node/135507/article>>. , 2015

25 NUCCI-MARTINS, Catharina *et al.* Antinociceptive effect of hydroalcoholic extract
26 and isoflavone isolated from *Polygala molluginifolia* in mice: evidence for the involvement of
27 opioid receptors and TRPV1 and TRPA1 channels. **Phytomedicine** v. 23, n. 5, p. 429–440 ,
28 15 maio 2016. Disponível em:
29 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711316000349?via%3Dihub>>.
30 Acesso em: 23 jul. 2019.

31 NUNES DA SILVA, M. *et al.* Role of methyl jasmonate and salicylic acid in kiwifruit
32 plants further submitted to Psa infection: Biochemical and genetic responses. **Plant**
33 **Physiology and Biochemistry** v. 162, n. August 2020, p. 258–266 , 2021. Disponível em:

1 <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.02.045>>.

2 OLGA, Petrović *et al.* Screening method for detection of hydrocarbon-oxidizing
3 bacteria in oil-contaminated water and soil specimens. **Journal of Microbiological Methods**
4 v. 74, n. 2–3, p. 110–113 , 1 ago. 2008.

5 PARK, Jin-Hyuk *et al.* Effect of Polygala tenuifolia Root Extract on Cerebral
6 Ischemia and Reperfusion. **The American Journal of Chinese Medicine** v. 34, n. 01, p.
7 115–123 , 1 jan. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1142/S0192415X06003680>>.

8 PATEL, Heena; KRISHNAMURTHY, R. Journal of Pharmacognosy and
9 Phytochemistry Elicitors in Plant Tissue Culture. **Journal of Pharmacognosy and**
10 **Phytochemistry** v. 2, n. 2, p. 60–65 , 2013.

11 PAUL, Saili *et al.* Anticancer Potentials of Root Extract of Polygala senega and Its
12 PLGA Nanoparticles-Encapsulated Form. **Evidence-based complementary and alternative**
13 **medicine : eCAM** v. 2011, p. 517204 , 2011. Disponível em:
14 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20953431>>.

15 PAUL, Saili *et al.* In Vitro and In Vivo Studies Demonstrate Anticancer Property of
16 Root Extract of Polygala senega. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies** v. 3, n. 3,
17 p. 188–196 , 1 set. 2010. Disponível em:
18 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2005290110600350?via%3Dihub>>.
19 Acesso em: 23 jul. 2019.

20 PAWAN KAUSHIK; PAHWA, Priyanka; DHIRENDER, Kaushik. A Review on
21 medicinal plants with Anticancer activity. **Global Journal of Pharmaceutical Education**
22 **and Research** v. 3, n. 1–2, p. 1–13 , 2014.

23 PAWAR SV, HO JC, YADAV GD, Yadav VG. The Impending Renaissance in
24 Discovery & Development of Natural Products. **Curr Top Med Chem.** v. 17, n. (2), p. 251–
25 267 , 2017.

26 PÉREZ-BALIBREA, Santiago; MORENO, Diego A.; GARCÍA-VIGUERA, Cristina.
27 Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. **Food Chemistry**
28 v. 129, n. 1, p. 35–44 , 2011.

29 PINTO, Rodrigo Moreira Caetano. **Desenvolvimento e validação de um método por**
30 **cromatografia líquida para avaliação qualitativa, quantitativa equimométrica de**
31 **extratos de Ilex paraguariensis.** 2014. 1–82 p.

32 PIZZOLATTI, M. G. et Al. A new styryl-2-pyrone derivative from Polygala sabulosa.
33 **Biochem. Syst. Ecol** v. 32, p. 603–606 , 2004.

1 PIZZOLATTI, M.G. *et al.* Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic
2 Rain Forest plant species. **Phytomedicine** v. 10, n. 5, p. 422–426 , 1 jan. 2003. Disponível
3 em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711304702433>>. Acesso em:
4 23 jul. 2019.

5 PIZZOLATTI, Moacir G *et al.* Trypanocidal activity of coumarins and styryl-2-
6 pyrones from *Polygala sabulosa* A.W. Bennett (Polygalaceae). **Revista Brasileira de**
7 **Farmacognosia** v. 18, p. 177–182 , 2008. Disponível em:
8 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000200006&nrm=iso)
9 695X2008000200006&nrm=iso>.

10 POOLE, Salwa K. ESSENTIAL GUIDES TO METHOD DEVELOPMENT IN
11 CAPILLARY ELECTROPHORESIS. 2003, [S.l.: s.n.], 2003.

12 PRESTES, Osmar D. *et al.* QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra
13 para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos
14 acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova** v. 32, n. 6, p. 1620–1634 , 2009.

15 QUANG, T. H. et Al. Triterpenoid Saponins and phenylpropanoid glycosides from the
16 roots of *olygala japonica* Houtt. with anti-inflammatory activity. **phyto Letters** v. 24, p. 60–
17 66 , 2018.

18 R., LUDTKE; SOUZA-CHIES, T. T; MIOTTO, S. T. S. O gênero *Polygala* L.
19 (*Polygalaceae*) na região sul do Brasil. **HOEHNEA** v. 40, p. 1–50 , 2013.

20 RAFI, Mohamad *et al.* A combination of simultaneous quantification of four
21 triterpenes and fingerprint analysis using HPLC for rapid identification of *Centella asiatica*
22 from its related plants and classification based on cultivation ages. **Industrial Crops and**
23 **Products** v. 122, p. 93–97 , 15 out. 2018.

24 REN, Yulin *et al.* Potential Anticancer Agents Characterized from Selected Tropical
25 Plants. **Journal of Natural Products** v. 82, n. 3, p. 657–679 , 2019.

26 RIACH, A. C. *et al.* Metabolic fingerprints reveal how an insect metabolome is
27 affected by different larval host plant species. **Arthropod-Plant Interactions** v. 0, n. 0, p. 0 ,
28 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11829-019-09671-6>>.1182901909671.

29 ROCHA BAQUETA, Michel *et al.* Integrated ¹H NMR fingerprint with NIR
30 spectroscopy, sensory properties, and quality parameters in a multi-block data analysis using
31 ComDim to evaluate coffee blends. **Food Chemistry** v. 355, n. September 2020, p. 129618 ,
32 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129618>>.

33 SAKO, Alysson V.F. *et al.* Dual-opposite end multiple injection method applied to

1 sequential determination of Na⁺, K⁺, Ca⁺², Mg⁺² ions and free and total glycerol in
2 biodiesel by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A** v. 1570, p. 148–
3 154 , 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.079>>.

4 SCHAEPER. James P; SEPANIAK. Michael J. **Parameters affecting**
5 **reproducibility in capillary electrophoresis**. [S.l: s.n.], [S.d.].

6 SCRIBA, G. K. E.; BELAL, F. Advances in Capillary Electrophoresis-Based Enzyme
7 Assays. **Chromatographia** v. 78, n. 15, p. 947–970 , 2015.

8 SHARMA, ANKITA; KUMAR, INDER; RANA, KARAN. Rp-Hplc Method
9 Development and Validation for the Combination of Imiquimod and Salicylic Acid.
10 **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** n. September, p. 41–48 ,
11 2020.

12 SHARMA, Gaurav *et al.* Ethnopharmacological attributes of Polygala senega Linn.
13 **International Journal of Pharmacy & Life Sciences** Accession Number: 100762770;
14 Sharma, Gaurav 1; Email Address: gs501721@gmail.com Jhade, Alkesh 1 Malviya, Sapna 1
15 Kharia, Anil 1; Affiliation: 1: Modern Institute of Pharmaceutical Sciences, Indore, (MP) -
16 India; Source Info: Jan2015, Vol. 6 Issue 1, p4202; Subject Term:
17 ETHNOPHARMACOLOGY; Subject Term: SENEGA; Subject Term: PLANT species;
18 Subject Term: HERBAL medicine; Subject Term: ANGIOSPERMS; Subject Term:
19 POLYGALACEAE; Subject Term: INDIA; Author-Supplied Keyword: Anticancer activity;
20 Author-Supplied Keyword: Hypoglycemic; Author-Supplied Keyword: Polygala senega;
21 Number of Pages: 7p; Document Type: Article, v. 6, n. 1, p. 4202–4208 , jan. 2015.
22 Disponível em:
23 <[http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=100762770&lang=pt-](http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=100762770&lang=pt-br&site=eds-live&scope=site)
24 [br&site=eds-live&scope=site](http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=100762770&lang=pt-br&site=eds-live&scope=site)>.

25 SHI, Tianxing; JIANG, Yong. Isolation of flavonoids from the aerial parts of Polygala
26 tenuifolia Willd. and their antioxidant activities. **Journal of Chinese Pharmaceutical**
27 **Sciences** v. 22 , 15 jan. 2013.

28 SHIN, Ki Young *et al.* Genotoxicity studies on the root extract of Polygala tenuifolia
29 Willdenow. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** v. 71, n. 3, p. 365–370 , 1 abr. 2015.
30 Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230015000185>>.
31 Acesso em: 25 jul. 2019.

32 SLATER GW, TESSIER F, Kopecka K. The Electroosmotic Flow (EOF). **Methods**
33 **Mol Biol**. v. 583, p. :121-34. , 2010.

1 SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Eletroforese Capilar: uma breve
2 introdução. **Scientia Chromatographica** v. 4, n. 4, p. 287–297 , 2012.

3 SPUDEIT, Daniel A. *et al.* A systematic procedure to develop a capillary
4 electrophoresis method using a minimal experimental data. **Journal of the Brazilian**
5 **Chemical Society** v. 27, n. 11, p. 1974–1979 , 2016.

6 SUN, Yunpeng *et al.* High Performance Capillary Electrophoresis Characteristic
7 Fingerprint of Schisandra chinensis. **Current Pharmaceutical Analysis** v. 15, n. 5, p. 456–
8 464 , 2019.

9 T. HIROKAWA, Y. Kiso. Isotachophoretic determination of mobility and pKa by
10 means of computer simulation. I. Estimation of accuracy of the evaluated constants. **J. of**
11 **Chromatogr** v. 252, p. 33–48 , 1982.

12 TASIC, Ljubica. Metabolômica e metabonômica por Ressonância Magnética Nuclear
13 (RMN). , 2017.

14 TIZZIANI, Tiago *et al.* A new xanthone as a chemical marker of four Polygala species
15 (Polygalaceae). **Biochemical Systematics and Ecology** v. 78, n. April, p. 46–48 , 2018.
16 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.03.007>>.

17 TIZZIANI, Tiago *et al.* Antitumor screening of crude extracts of ten medicinal plants
18 of Polygala genus from Southern Brazil. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** v. 7,
19 n. 10, p. 79–83 , 2017.

20 TIZZIANI, Tiago. **Estudo Fitoquímico e Propriedades Biológicas de Espécies de**
21 **Polygala (Polygalaceae)**. 2019. 225 p.

22 TSUTOMU HATANO. Herbal drugs in Traditional Japanese Medicine. **Intech** v. i, p.
23 18 , 2012.

24 VAN, Q. *et al.* Anti-inflammatory effect of Inonotus obliquus, Polygala senega L., and
25 Viburnum trilobum in a cell screening assay. **Journal of Ethnopharmacology** v. 125, n. 3, p.
26 487–493 , 25 set. 2009. Disponível em:
27 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874109004036?via%3Dihub>>.
28 Acesso em: 23 jul. 2019.

29 VENZKE, Dalila *et al.* PAMPA permeability, acetylcholinesterase inhibition and
30 antioxidant activity of pyranoisoflavones from Polygala molluginifolia (polygalaceae).
31 **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 24, p. 1991–1997 , 2013. Disponível em:
32 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532013001200013&nrm=iso)
33 [50532013001200013&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532013001200013&nrm=iso)>.

1 VITALI, Luciano *et al.* New multilayer coating using quaternary ammonium chitosan
2 and κ -carrageenan in capillary electrophoresis: Application in fast analysis of betaine and
3 methionine. **Talanta** v. 123, p. 45–53 , 2014. Disponível em:
4 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.047>>.

5 WANG, Yan *et al.* Bacterial neuraminidase inhibitory effects of prenylated
6 isoflavones from roots of *Flemingia philippinensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v.
7 21, n. 21, p. 6398–6404 , 1 nov. 2013. Disponível em:
8 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089613007529>>. Acesso em: 23 jul.
9 2019.

10 WARDLE, David A. Do experiments exploring plant diversity–ecosystem functioning
11 relationships inform how biodiversity loss impacts natural ecosystems? **Journal of**
12 **Vegetation Science** v. 27, n. 3, p. 646–653 , 1 maio 2016. Disponível em:
13 <<https://doi.org/10.1111/jvs.12399>>.

14 WINDARSIH, Anjar; ROHMAN, Abdul; SWASONO, Respati Tri. Application of
15 ¹H-NMR based metabolite fingerprinting and chemometrics for authentication of *Curcuma*
16 *longa* adulterated with *C. heyneana*. **Journal of Applied Research on Medicinal and**
17 **Aromatic Plants** p. 100203 , 20 mar. 2019. Disponível em:
18 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221478611830192X>>. Acesso em: 16
19 jul. 2019.

20 WINNING, H. *et al.* Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics.
21 **Journal of Magnetic Resonance** v. 190, n. 1, p. 26–32 , 2008.

22 WORSFOLD, Paul *et al.* Electrophoresis | Capillary Electrophoresis: Principles of
23 Capillary. **Encyclopedia of Analytical Science** p. 328–333 , 1 jan. 2019. Disponível em:
24 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124095472145007>>. Acesso em: 16
25 jul. 2019.9780081019849.

26 XIN, Tao; ZHANG, Fubin; JIANG, Qiuying; CHEN, Chunhong; HUANG, Dayong;
27 LI, Yanju; *et al.* Extraction, purification and antitumor activity of a water-soluble
28 polysaccharide from the roots of *Polygala tenuifolia*. **Carbohydrate polymers** v. 90, p.
29 1127–1131 , 1 out. 2012.

30 XIN, Tao; ZHANG, Fubin; JIANG, Qiuying; CHEN, Chunhong; HUANG, Dayong;
31 LV, Yanju; *et al.* Purification and antitumor activity of two acidic polysaccharides from the
32 roots of *Polygala tenuifolia*. **Carbohydrate Polymers** v. 90, n. 4, p. 1671–1676 , 6 nov. 2012.
33 Disponível em:

1 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712007217?via%3Dihub>>.
2 Acesso em: 25 jul. 2019.

3 YAN, W. F. et Al. The molecular mechanism of polygalasaponin F-mediated
4 decreases in TNF α : Emphasizing the role of the TLR4-PI3K/AKT-NF-kB pathway. **Journal**
5 **of Asian Natural Products Research** v. 17, p. 662–670 , 2015.

6 YAO, Hua *et al.* A water-soluble polysaccharide from the roots of *Polygala tenuifolia*
7 suppresses ovarian tumor growth and angiogenesis in vivo. **International Journal of**
8 **Biological Macromolecules** v. 107, p. 713–718 , 2018. Disponível em:
9 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017324571>>.

10 ZHAN, H.-T. et al. Influence of flavonoids from *Polygala hongkongensis* on
11 neuroprotective and the contents of TGF- β and HSP70 in the rats of focal cerebral ischemia.
12 **Foshan Kexue Jishu Xueyuan Xuebao, Ziran Kexueban**, v. 31, n. 3, p. 55–59 , 2013.

13 ZHANG, D., MIYASE, T., KUROYANAGI, M., UMEHARA, K., NOGUCHI; H.
14 Polygalasaponins XLII-XLVI from roots of *Polygala glomerata*. **Phytochemistry** v. 47, n. 3,
15 p. 459–466 , 1998.

16 ZHANG, Dongming *et al.* Studies on the Constituents of *Polygala japonica* HOUTT.
17 I. Structures of Polygalasaponins I-X. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**
18 v. 43, n. 1, p. 115–120 , 1995.

19 ZHAO, Zefeng *et al.* Excavating precursors from the traditional Chinese herb *Polygala*
20 *tenuifolia* and *Gastrodia elata*: Synthesis, anticonvulsant activity evaluation of 3,4,5-
21 trimethoxycinnamic acid (TMCA)ester derivatives. **Bioorganic Chemistry** v. 88, n.
22 November 2018, p. 102832 , 2019. Disponível em:
23 <<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.006>>.

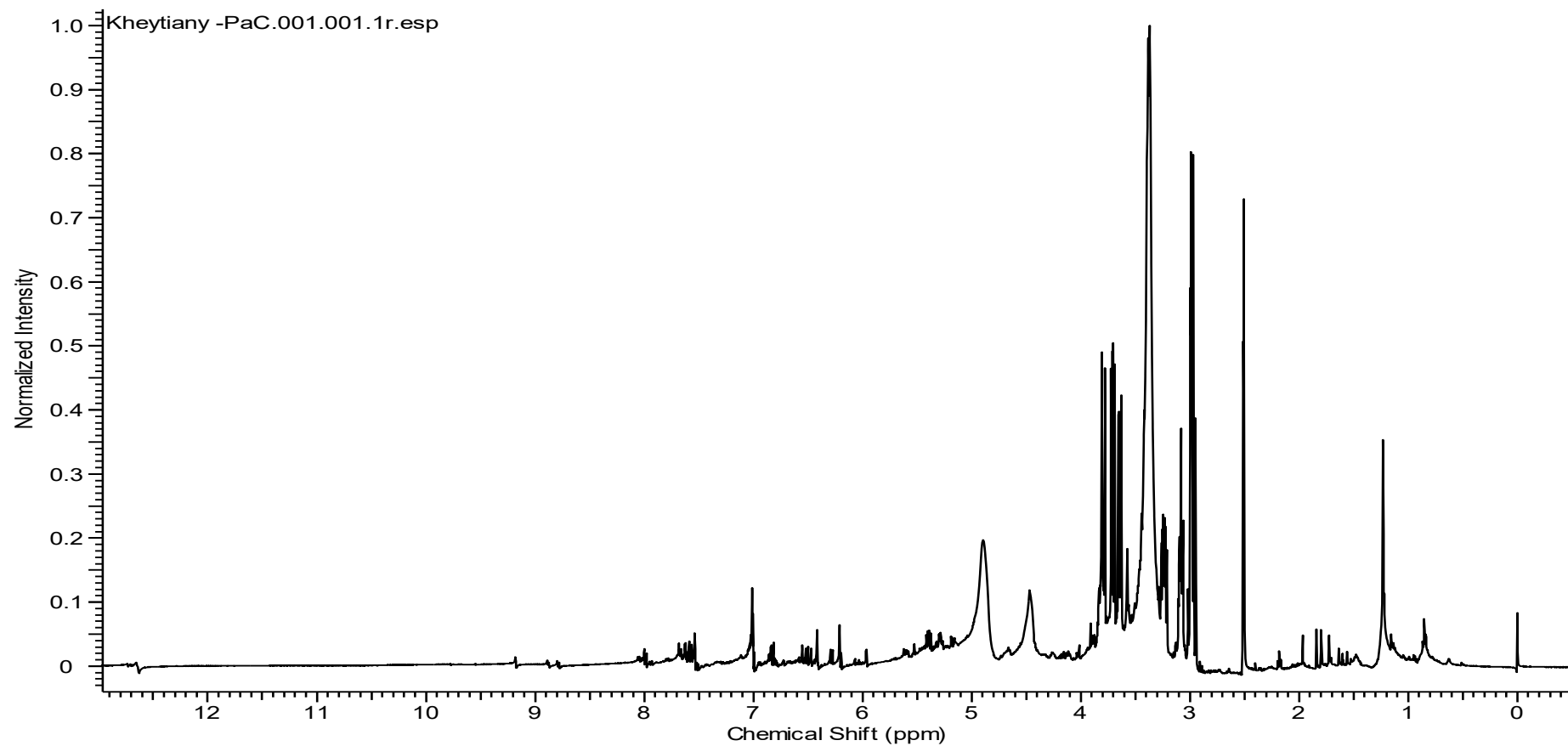
24 ZHU, Libin *et al.* Plant-based antimicrobials inactivate *Listeria monocytogenes* and
25 *Salmonella enterica* on melons grown in different regions of the United States. **Food**
26 **Microbiology** v. 101, p. 103876 , 1 fev. 2022.

27 ZHU, Mingjuan *et al.* Simultaneous qualitative and quantitative evaluation of *Toddalia*
28 *asiatica* root by using HPLC-DAD and UPLC-QTOF-MS/MS. , 2018.

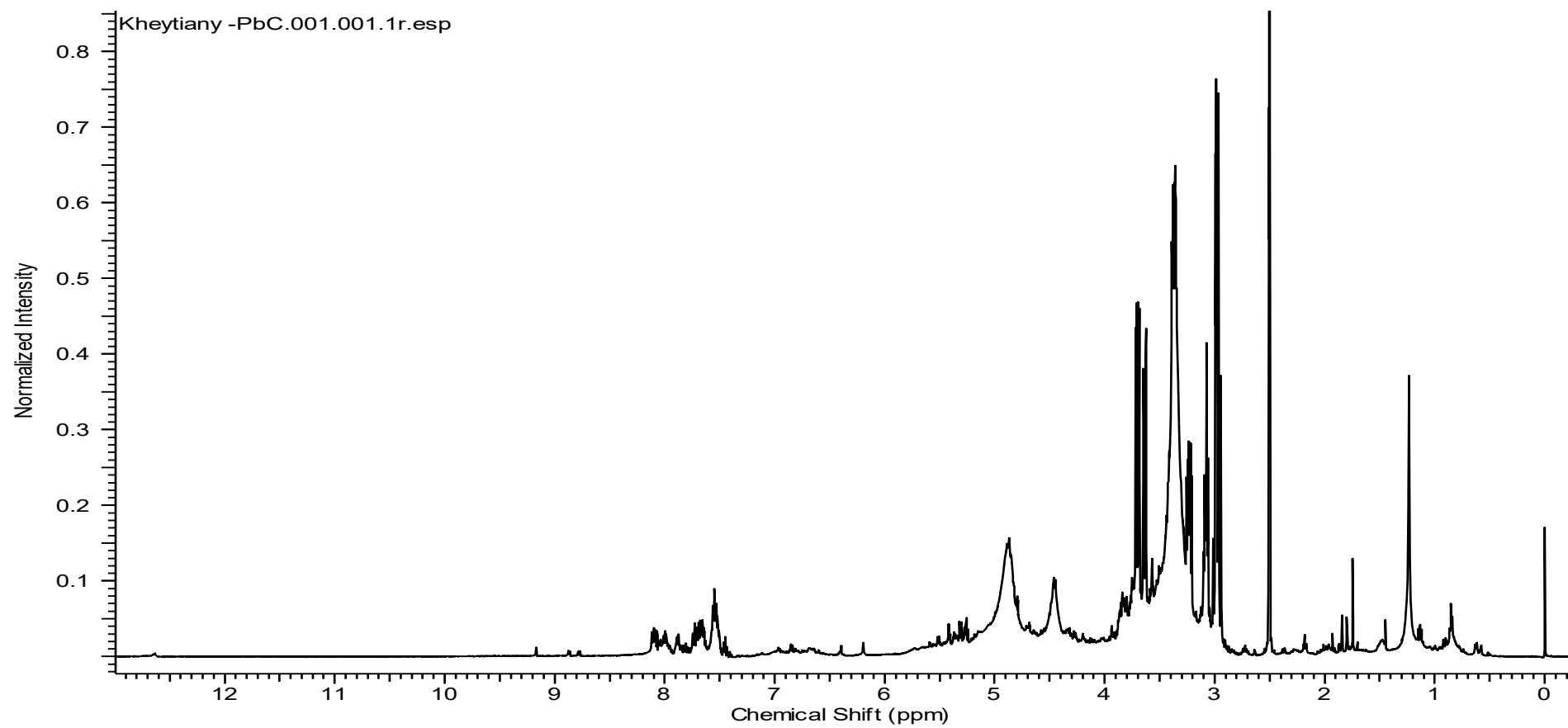
29

Apêndices

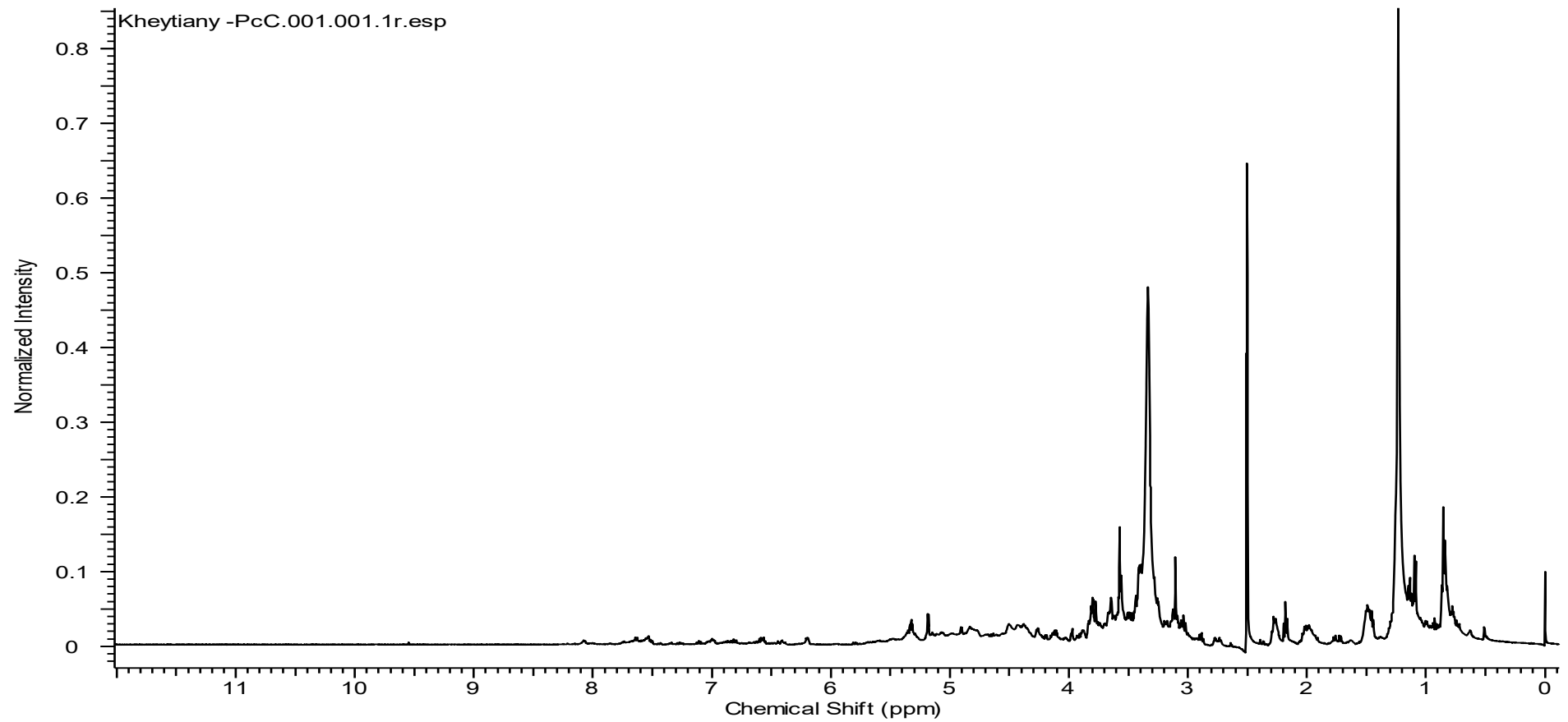
Espectro de RMN ^1H do extrato do caule de *Polygala altomontana* (500 MHz, DMSO- d_6).



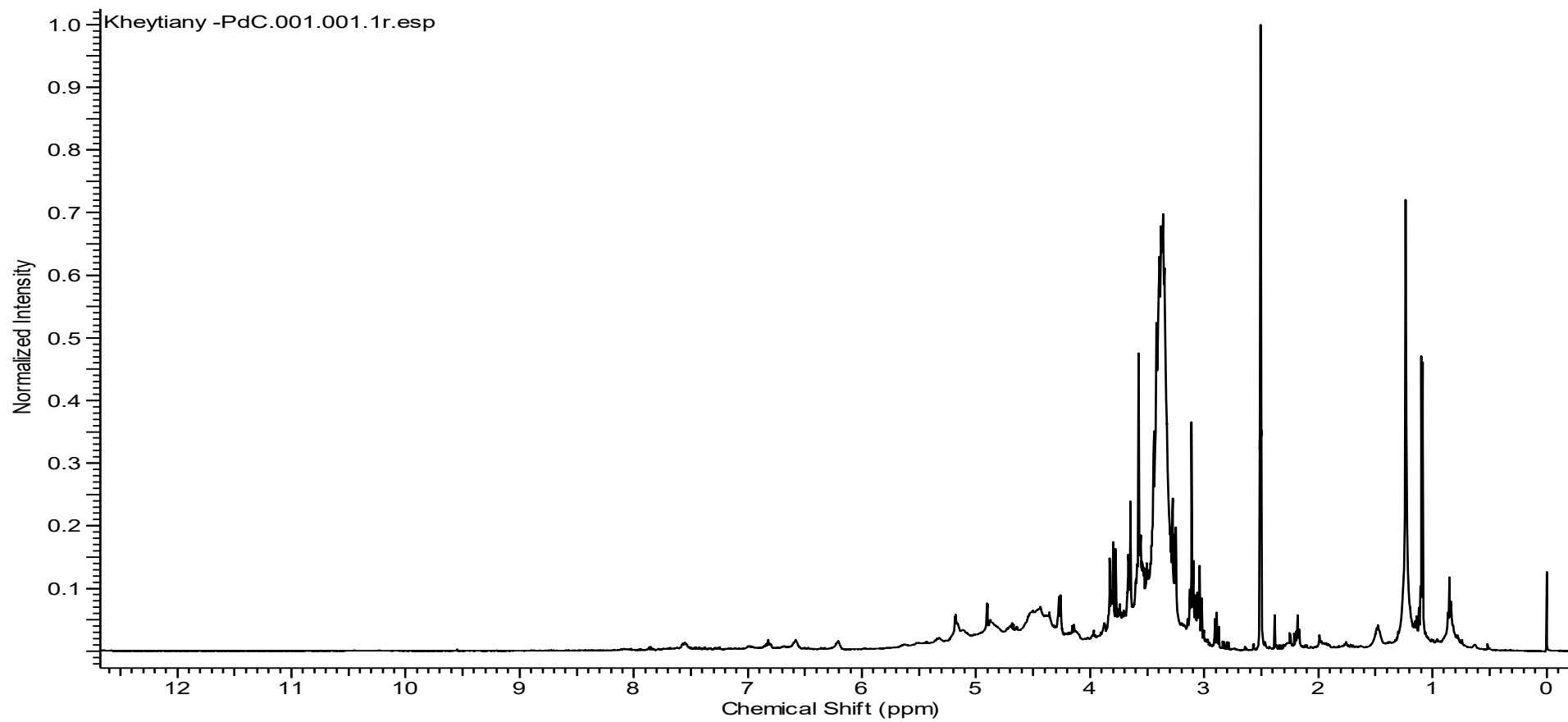
Espectro de RMN ¹H do extrato do caule de *Polygala brasiliensis* (500 MHz, DMSO-d₆).



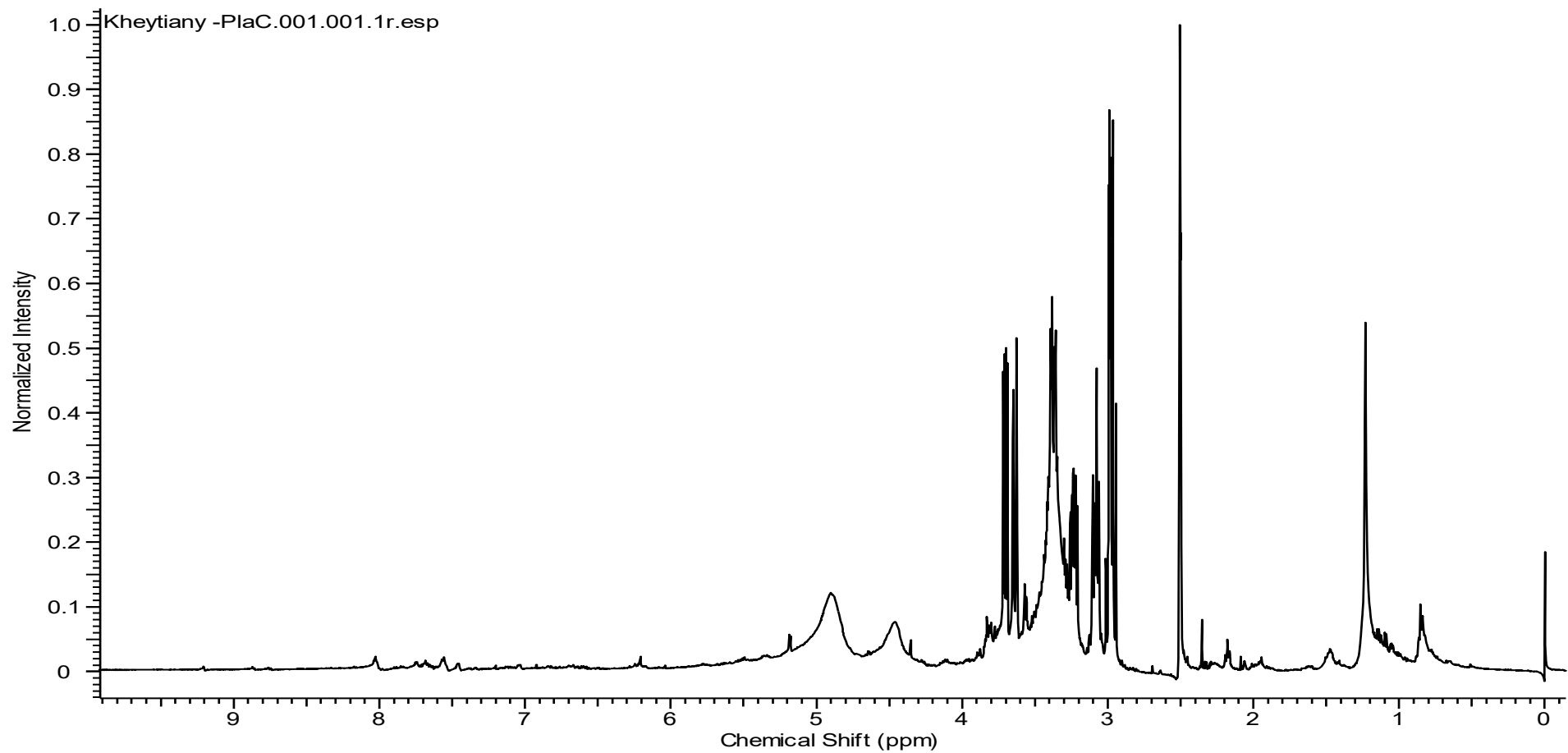
Espectro de RMN ^1H do extrato do caule de *Polygala campestris* (500 MHz, DMSO- d_6).



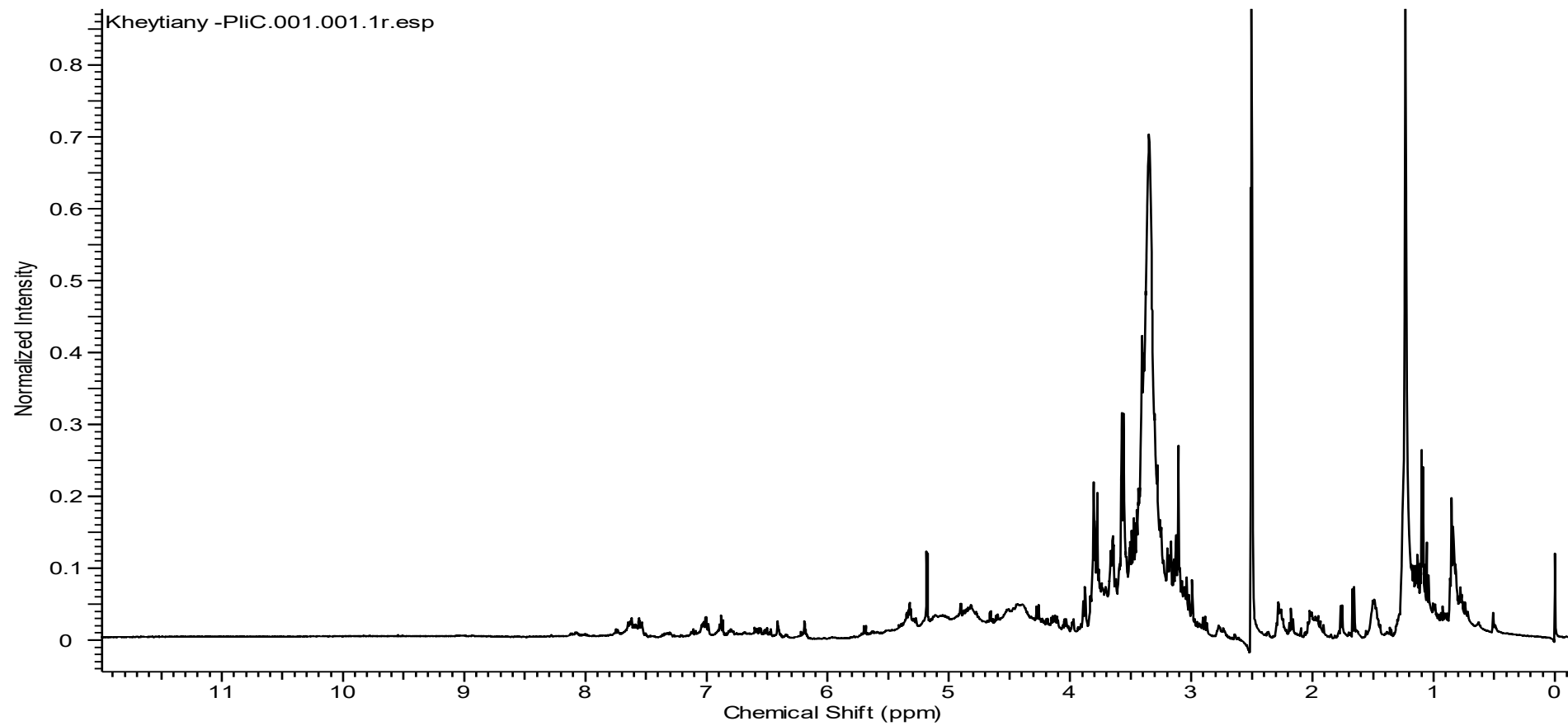
Espectro de RMN ^1H do extrato do caule de *Polygala densiracemosa* (500 MHz, DMSO- d_6).



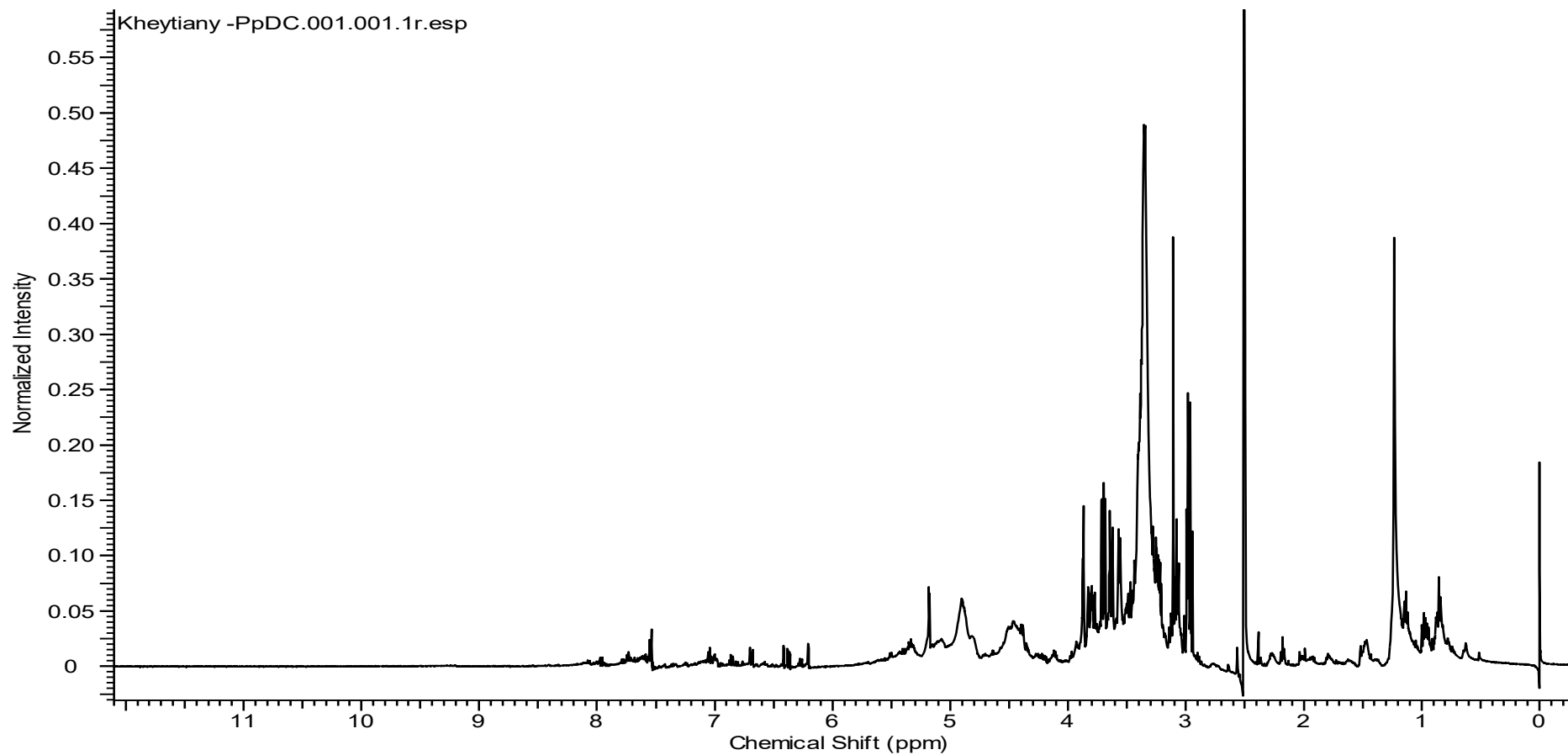
Espectro de RMN ^1H do extrato do caule de *Polygala lancifolia* (500 MHz, DMSO- d_6).



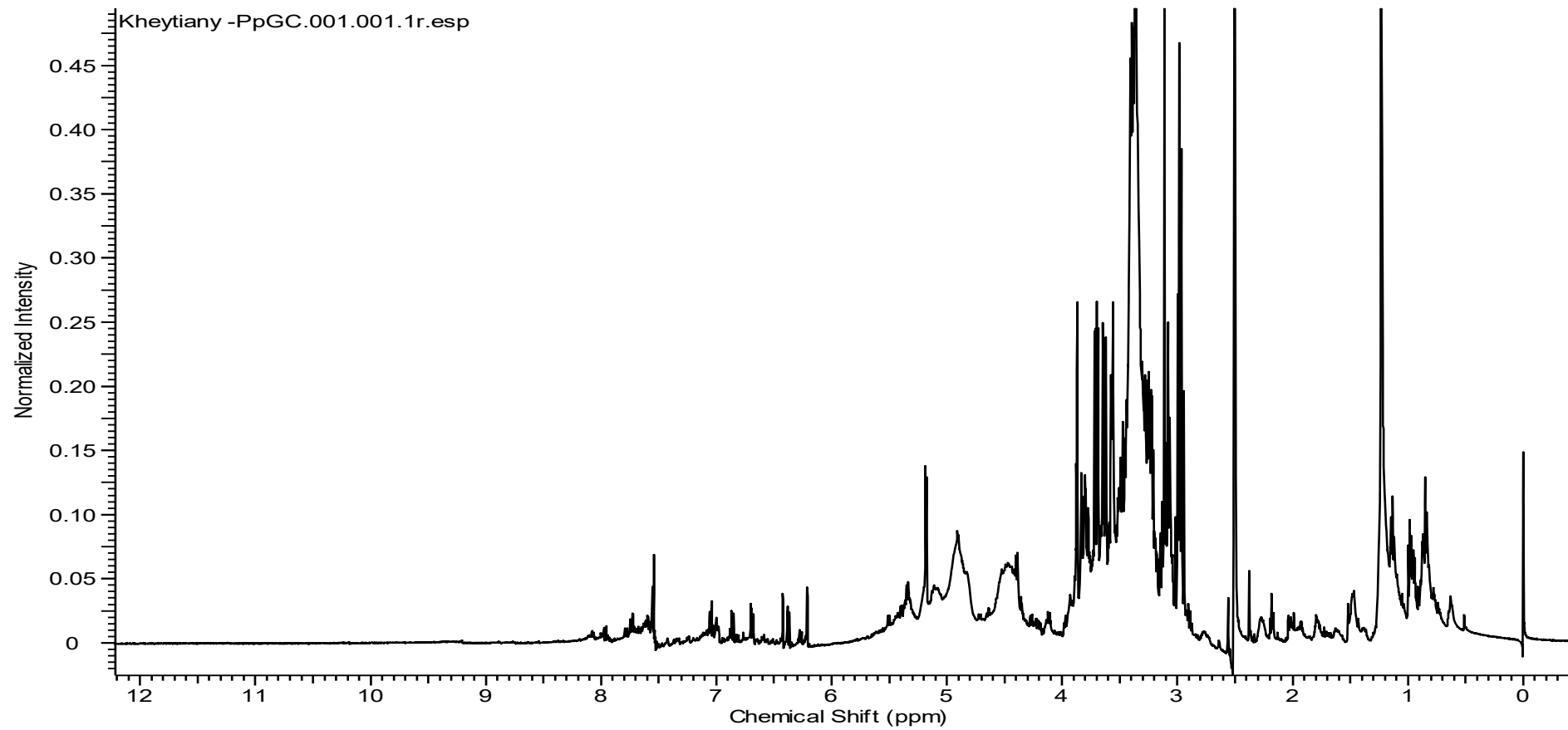
Espectro de RMN ¹H do extrato do caule de *Polygala linoides* (500 MHz, DMSO-d₆).



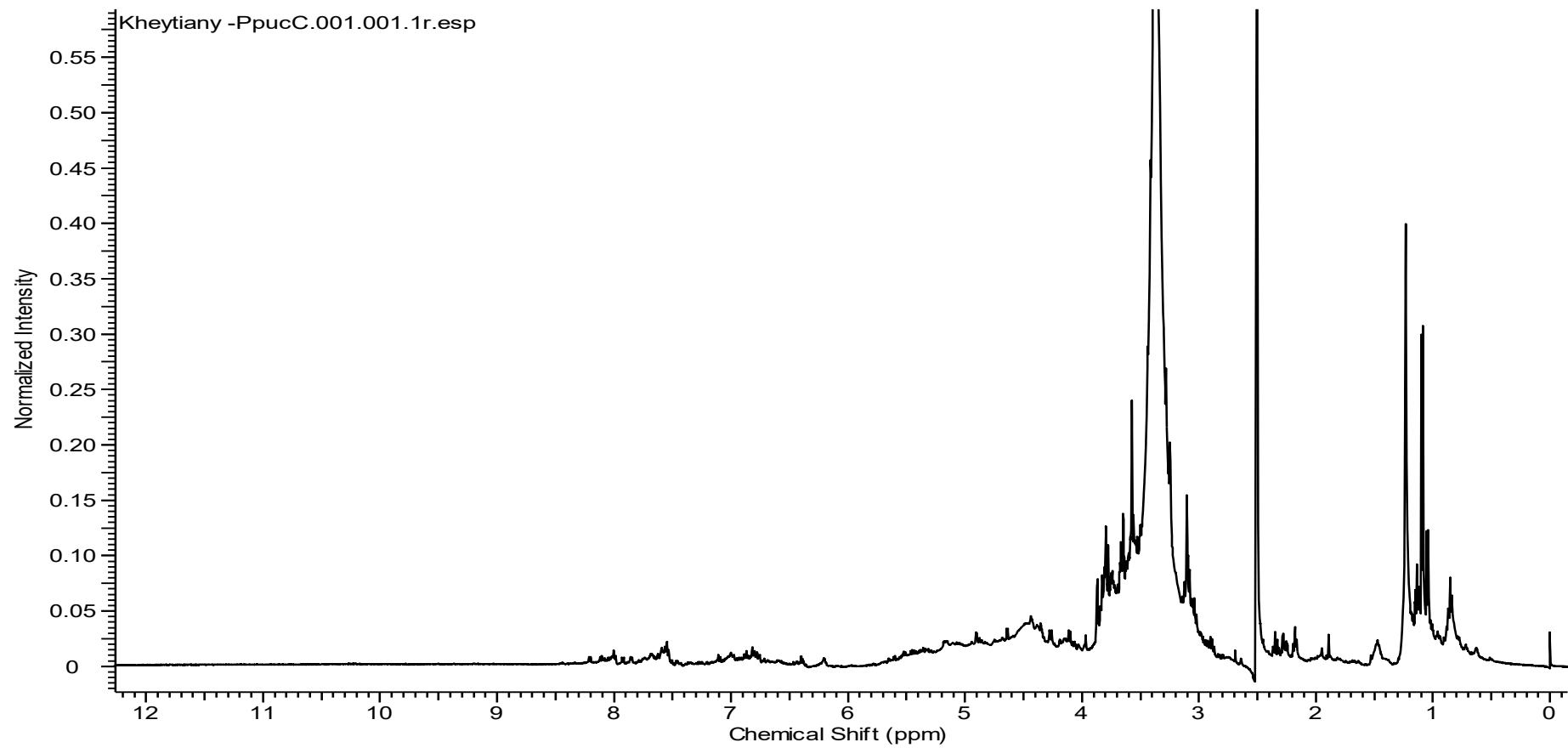
Espectro de RMN ^1H do extrato do caule de *Polygala paniculata* coletada em praia da Daniela (500 MHz, DMSO- d_6).



Espectro de RMN ^1H do extrato do caule de *Polygala paniculata* coletada em praia do Gravatá (500 MHz, DMSO- d_6).



Espectro de RMN ^1H do extrato do caule de *Polygala pulchella* (500 MHz, DMSO- d_6).



Espectro de RMN ^1H do extrato do caule de *Polygala sabulosa* (500 MHz, DMSO- d_6).

