
Triterpenes, steroids and phenolic isolated from *Minquartia guianensis* Aubl. (Coulaceae) and antibacterial activity

Triterpenos, esteroides e fenólico isolados de *Minquartia guianensis* Aubl. (Coulaceae) e atividade antibacteriana

Received: 2023-01-11 | Accepted: 2023-02-12 | Published: 2023-03-04

Andrei da Silva Alexandre

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7789-3714>
Universidade Federal do Amazonas – doutorando PPGBiotech-UFAM, Brasil
E-mail: dreialexandre@gmail.com

Maria Teresa Fachin-Espinar

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5414-0509>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: matefa5@hotmail.com

Cecilia Veronica Nunez

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3400-9508>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: cecilia@inpa.gov.br

ABSTRACT

This work aimed to carry out a chemical study of *Minquartia guianensis* branches and leaves extracts (Coulaceae) and to evaluate their antibacterial potential. The collection of plant material was carried out at Reserva Ducke, Manaus, Amazonas. The plant material was dried, ground, and extracted with hexane (Hex) and methanol (MeOH). The extracts obtained were submitted to chromatographic analysis and showed characteristics mainly of terpenes and phenolics. The chemical fractionation of branches methanol extract allowed the isolation of the triterpenes: lupen-3-one, β -amyrone, lupeol, β -amyrin; the steroids: β -sitosterol and stigmasterol, and a phenolic derivative: methyl gallate. From the leaf's methanol extract, the triterpene: taraxerol was identified. These same methanol extracts were active against gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* and gram-negative bacteria: *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*, with an inhibition percentage of 63 to 70%. Based on the results, this work contributed to the chemical and biological knowledge of the species *M. guianensis*, this being the first report of the substances: β -amyrin, β -amyrone and methyl gallate for the Coulaceae family.

Keywords: NMR; β -amyrin; β -amyrone; Methyl gallate; Phytochemistry.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico dos extratos dos galhos e folhas de *Minquartia guianensis* (Coulaceae) e avaliar o seu potencial antibacteriano. A coleta do material vegetal foi realizada na Reserva Ducke, Manaus, Amazonas. O material vegetal foi seco, moído e extraído com hexano (Hex) e metanol (MeOH). Os extratos obtidos foram submetidos a análises cromatográficas e apresentaram características principalmente de terpenos e fenólicos. Do fracionamento do extrato MeOH dos galhos foram isolados os triterpenos: lupen-3-ona, β -amirina-3-ona, lupeol, β -amirina; os esteroides: β -sitosterol e estigmasterol, e um derivado fenólico: galato de metila. Do extrato MeOH das folhas foi isolado o triterpeno: taraxerol. Esses mesmos extratos metanólicos foram ativos frente a bactéria gram-positiva: *Staphylococcus aureus* e gram-negativas: *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas fluorescens*, com porcentagem de inibição de 63 a 70%. Com base nos resultados este trabalho contribuiu para o

conhecimento químico e biológico da espécie *M. guianensis*, sendo este o primeiro relato das substâncias: β -amirina, β -amirin-3-ona e galato de metila para a família Coulaceae.

Palavras-chave: RMN; β -amirina; β -amirin-3-ona; Galato de metila; Fitoquímica.

INTRODUÇÃO

O interesse por pesquisas que buscam substâncias bioativas de origem natural tem crescido atualmente. Isso deve-se principalmente ao aumento do número de microrganismos resistentes aos diversos medicamentos empregados no tratamento de doenças patogênicas. A obtenção de moléculas bioativas de origem natural é uma alternativa para o combate aos patógenos resistentes. Entretanto, o uso de plantas com essa finalidade ainda constitui uma linha de pesquisa carente de investigação mesmo com o crescente número de estudos desenvolvidos na área (BARBIERI, 2017; ATANASOV et al., 2021).

A resistência dos microrganismos aos antibióticos é um fenômeno mundial. Novos mecanismos de resistência continuam a surgir, aumentando o risco de disseminação de cepas resistentes. Bactérias como *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e *Escherichia coli* produtora de β -lactamase são dois exemplos de microrganismos resistentes a alguns tratamentos antimicrobianos e que já estão se espalhando fora dos hospitais (GHONIEM, HENDAWY e MOTELEB, 2014; CHUKWUNONSO, VERONICA e TOYO, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que até 2050, mais de 10 milhões de pessoas morrerão anualmente por causa de microrganismos resistentes se nada for feito para impedir a propagação da resistência aos antibióticos. Pesquisadores e profissionais médicos alertam que o uso generalizado de antibióticos para evitar coinfeções podem piorar muito a situação de bactérias super-resistentes (YAGUI, 2018; MARTINEZ, GAMBIN e SIERECKI, 2019), situação muito agravada durante a pandemia do COVID-19, onde o uso de antibióticos teve uma elevação intensa.

Novos compostos químicos sintéticos com propriedades antibióticas têm aumentado a importância de fitoquímicos bioativos (MANDAL, 2014). Os resultados de investigações mostram que os fitoquímicos modulam ou modificam os mecanismos de resistência em bactérias, sugerindo que podem ser usados em combinação com antibióticos para aumentar a atividade e diminuir as doses de antibióticos (TOUANI et al., 2014; SANTIAGO et al., 2015).

A espécie *Minquartia guianensis* Aubl. pertencente à família Coulaceae está dispersa na América Central e na Bacia Amazônica. No Brasil, esta espécie é encontrada nos Estados do Acre, Amazonas, Roraima, Pará e Amapá. Popularmente é conhecida como acariquara, acariquara-roxa, acari (FLORA DO BRASIL, 2023). Estudos com essa espécie já relataram o isolamento de um poliacetileno denominado ácido minquartinoico com atividades antimalárica e leishmanicida,

além de triterpenos isolados pelo nosso grupo de pesquisa (RASMUSSEN, et al., 2000; CURSINO et al., 2009).

Os triterpenos exibem diversas atividades biológicas, entre as quais destacam-se: antitumoral (CHO et al., 2016), anti-inflamatória (BI et al., 2017), antibacteriana (DOGAN et al., 2017), antiviral (BREZÁNI et al., 2018), prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (WANG et al., 2016), antimalárica (LISEWSKI et al., 2014), hipoglicêmica (JEPPESEN et al., 2006), entre outras.

Tendo em vista a necessidade de novos agentes antibacterianos de origem natural, o presente estudo visou prospectar química e biologicamente os extratos de *M. guianensis*, visando metabólitos bioativos contra microrganismos patogênicos. Este trabalho descreve o isolamento e identificação de uma substância fenólica, triterpenos e esteroides, bem como apresenta os resultados da atividade antibacteriana dos extratos dos galhos e folhas de *M. guianensis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos

Os galhos e folhas de *Minquartia guianensis* foram coletados na Reserva Florestal A. Ducke, INPA, localizada no município de Manaus, Amazonas, no dia 19 de dezembro de 2018, GPS: S 02°56.005' W 059°57.960'. Uma exsicata foi preparada e identificada por meio da comparação com outra exsicata previamente depositada no Herbário do INPA sob o número 179.806. O estudo foi registrado SISGEN sob o número ACCD2F4.

O material vegetal foi seco em estufa de ar circulante a 40 °C e moído em moinho de facas. A extração dos galhos (1,3 kg) e das folhas (1,2 kg) de *M. guianensis* foi realizada com solventes orgânicos de polaridade crescente, iniciando por hexano (hex) para remoção de substâncias alifáticas (“graxas”) e clorofilas, seguido de metanol (MeOH). Cada extração foi realizada três vezes em banho de ultrassom (Unique, 40 kHz) por 20 minutos. Após filtração, os extratos hexânicos e metanólicos foram concentrados em evaporador rotatório (Fitasom).

Análise por cromatografia em camada delgada (CCDC)

Os extratos de *M. guianensis* foram analisados por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC, Sigma-Aldrich, TLC Silica gel 60 F₂₅₄). Os extratos hexânicos e metanólicos foram revelados com alguns reveladores químicos e físicos para detecção das classes dos constituintes químicos presentes em cada extrato. Após eluição as cromatoplacas foram reveladas sob luz UV, nos comprimentos de onda (λ) de 254 e 365 nm, e também com alguns reagentes químicos para detectar a presença de algumas de substâncias, tais como: sulfato cérico [Ce(SO₄)₂] para detecção de terpenos, anisaldeído sulfúrico para detecção de terpenos e outras classes, cloreto férrico (FeCl₃, solução etanólica 10%) para detecção de substâncias fenólicas, e

NP/PEG (solução metanólica 1% de difenilboriloxietilamina/solução etanólica 5% de polietilenoglicol 4000) para confirmar a presença de flavonoides. Assim, conseqüentemente, foi possível estabelecer uma estratégia para a separação e purificação de suas substâncias.

Fracionamento dos extratos metanólicos e isolamento das substâncias

O extrato metanólico dos galhos foi submetido a uma partição líquido-líquido com acetato de etila (AcOEt). A fase AcOEt (5 g) foi fracionada em coluna aberta de Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich) com MeOH 100% em modo isocrático. A fração 4-7 (1,2 g) foi refracionada em coluna aberta de sílica gel (*Machery-Negal*, 0,04-0,063 mm/230-400 *mesh* ASTM) e eluída com gradiente de DCM, DCM/AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH 100%. A fração 2-3 foi refracionada em coluna de sílica com DCM/AcOEt (95:5) modo isocrático. A fração 0-1 apresentou uma mancha roxa em $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, Rf de 0,55 na análise por CCDC no sistema de eluição hexano/AcOEt (95:5), e após análise de RMN de ^1H foi denominada como substâncias **1** e **2** (5 mg).

A fração 5-7 (7 mg), resultante do fracionamento da F4-7, foi refracionada em coluna aberta de sílica e eluída com DCM 100%, a fração 5 coletada foi recristalizada com MeOH. Na análise por CCDC o cristal branco separado apresentou uma mancha lilás em sulfato cérico, Rf de 0,38; após análise de RMN de ^1H foi denominada como a mistura de substâncias **3** e **4** (2,5 mg).

A fração 8-10, também resultante do fracionamento da F4-7, foi reunida (20 mg) e refracionada em coluna de sílica, na análise por CCDC a fração 4-5 (5,6 mg) apresentou uma banda de coloração roxa em $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, Rf de 0,48, resultando na mistura de substâncias **5** e **6** (5 mg), após análise de RMN de ^1H .

A fração 12-13, oriunda do fracionamento da fase AcOEt em coluna de Sephadex LH-20, foi refracionada em coluna aberta de sílica e eluída com gradiente de DCM, DCM/AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH 100%. Na análise por CCDC, com o sistema de eluição DCM/MeOH (9:1), a fração 20-21 apresentou uma mancha escura quando revelada com FeCl_3 e fluorescência intensa em NP/PEG (Rf de 0,51). Essa fração foi purificada por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) em coluna semipreparativa (250 x 10,0 mm) Luna 5 μ C18(2) 100A (Phenomenex), com fluxo analítico de 4,7 mL/min., MeOH 70% e pH 5, sendo a fração P2 denominada como substância **7** (1,5 mg, t = 3,5 min.).

O extrato metanólico das folhas foi submetido a uma partição líquido-líquido com AcOEt. A fase AcOEt foi fracionada em uma coluna filtrante com sílica e como fase móvel gradientes de DCM 100%, DCM/AcOEt, AcOEt 100%, AcOEt/MeOH e MeOH 100%. A fração 1-2 (1 g) foi refracionada em coluna de Sephadex LH-20 com MeOH em modo isocrático, dessa coluna a fração 7-10 foi refracionada em coluna de sílica. A fração 11 após revelar uma banda de coloração roxa em $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ na CCDC e Rf de 0,35, resultou na substância **8** (2 mg).

Identificação estrutural das substâncias

As substâncias foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3 , Cambridge Isotope Laboratories) e metanol deuterado ($\text{MeOH-}d_4$, Cambridge Isotope Laboratories). Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em equipamento Fourier 300 (Bruker) na Central analítica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), operando a 300 MHz para ^1H uni e bidimensionais como COSY (Correlated Spectroscopy) e HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation), e 75 MHz para ^{13}C [Broad Band Decoupling (BBD) e Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT) 135°]. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em unidades de partilha por milhão (ppm), e as constantes de acoplamentos (J) foram expressas em Hz para se referir às multiplicidades dos picos, usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. As análises por espectrometria de massas foram realizadas no modo positivo e negativo de ionização e com fonte ESI (Eletron Spray Ionization). As análises em LC-DAD-MS (Cromatografia Líquida Ultra Rápida Acoplada a Detector por Arranjo de Diodos e a Espectrômetro de Massas) foram obtidas pelo cromatógrafo Prominense UFCL (Shimadzu), equipado com bomba binária LC-20AT, detector de arranjo de diodos SPDM-20A e injetor automático SIL-20A assim como espectrômetro de massas MicroTOF-Q II (Bruker).

Ensaio biológico

Cepas bacterianas

Os extratos foram testados frente a bactérias gram-negativas: *Aeromonas hydrophila* (CBAM 0162), *Citrobacter freundii* (CBAM 0702), *Edwardsiella tarda* (CBAM 15947), *Escherichia coli* (CBAM 0006), *Klebsiella pneumoniae* (CBAM 0051), *Pseudomonas aeruginosa* (CBAM 0519), *Pseudomonas fluorescens* (CBAM 13525), *Serratia marcescens* (CBAM 0069) e *Salmonella enteridis* e gram-positiva: *Staphylococcus aureus* (CBAM 0026).

Preparação do inóculo

Os microrganismos testes foram repicados em 10 mL de caldo *Müller-Hinton* (MH), posteriormente a suspensão foi incubada durante um período de 16 a 24 h, para a reativação. Após turvação do caldo MH, foram preparadas as suspensões bacterianas ajustando-se a turbidez da cultura em caldo em crescimento ativo com solução salina estéril ou caldo, a concentração do inóculo foi padronizada comparando a turbidez com a solução padrão 0,5 da escala de McFarland em espectrofotômetro no λ 625 nm (FENTOM – Cirrus 80ST), obtendo-se uma absorbância entre 0,08 e 0,10 equivalente a uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos pelo método de microdiluição em caldo

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços seguindo a metodologia adaptada da CLSI (2015). Após a padronização do inóculo, diluiu-se a suspensão em caldo na proporção de 1:20, para que após a inoculação cada poço contivesse aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. Foi efetuada a diluição das amostras em DMSO a 2,5% na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, em seguida 100 μL de cada diluição dos extratos foram adicionados nos poços da placa em triplicata, cada poço foi inoculado com 10 μL da suspensão bacteriana previamente preparada. Foi utilizado como controle positivo oxitetraciclina a 125 $\mu\text{g/mL}$ (antibiótico + microrganismo), como controle negativo (DMSO 2,5% + microrganismo) e como controle de esterilidade do caldo (três poços contendo apenas o caldo).

Após a inoculação das placas, foi feita uma primeira leitura de absorbância no λ de 625 nm em espectrofotômetro tipo ELISA (*Thermo scientific*, modelo *Multiskan GO*). Posteriormente as placas foram incubadas por 24 h a 35 ± 2 °C em estufa de crescimento microbiano. Após o período de incubação foi feita uma segunda leitura no espectrofotômetro sob as mesmas condições da primeira. A atividade inibitória foi avaliada pela diferença das densidades ópticas entre as duas leituras. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) simples, seguido da comparação de média pelo teste Dunnet, considerando um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Também foi adicionado junto aos poços 40 μL de revelador (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazóleo) e aguardando 30 minutos em temperatura ambiente. Onde houvesse crescimento bacteriano, os poços seriam revelados em vermelho, e onde não houvesse crescimento, os poços permaneceriam incolores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Substâncias identificadas do extrato metanólico dos galhos

Lupen-3-ona (1) e **β -amirin-3-ona** (2). Triterpenos isolados na fração 0-1. Para o triterpeno **1**, no espectro de RMN de ^1H pode-se destacar os sinais em δ 4,69 e 4,57 referentes aos 2 hidrogênios da ligação dupla terminal (H-29). Nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135°, verificou-se o sinal em δ 150,9 referente ao carbono quaternário e em δ 109,4 sinal de CH_2 da ligação dupla, e em δ 218,3 foi observado a presença da carbonila (CURSINO et al., 2012). Para o triterpeno **2**, no espectro de RMN de ^1H pode-se destacar sinais dos hidrogênios no C-2 próximos ao grupo carbonila na região de δ 2,25 – 2,60, além do sinal em δ 5,21 (*t*, 1H, $J = 3,6$ Hz), indicando a presença do triterpeno com esqueleto oleanano. Nos espectros de ^{13}C e DEPT 135° foi possível observar os sinais em δ 145,2 (C) e 121,4 (CH) referentes aos carbonos olefínicos, e em δ 218,3 foi observado a presença de carbonila. A comparação dos demais sinais com os da literatura confirmam as estruturas propostas (SHAN et al., 2014).

Lupeol (3) e **β -amirina** (4). Triterpenos isolados na fração 5-7. Para o triterpeno **3**, no espectro de RMN de ^1H , pode ser observado sinais em δ 4,69 e 4,57 referentes aos 2 hidrogênios

da ligação dupla terminal (H-29) e outro sinal característico em δ 3,19 referente ao H-3. No espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° apresentou sinais em δ 79,0 referente ao carbono metínico oxigenado, sinais em δ 151,0 e 109,3 característicos do grupo olefínicos (C-20 e C-29) dos lupanos (CURSINO et al., 2012). O triterpeno **4** apresentou um sinal em δ 5,18 (*t*, 1H, $J = 3,6$ Hz) referente ao hidrogênio olefínico (H-12) enquanto outro sinal em δ 3,16 (*dd*, $J = 11,0, 5,0$ Hz) foi atribuído a H-3. Os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° apresentaram sinais em δ 79,0 de C-3 e na região dos olefínicos foram observados dois sinais em δ 145,2 (C) e 121,7 (CH), característicos da β -amirina. A comparação dos demais sinais com os da literatura confirmaram a estrutura proposta (SHAN et al., 2014).

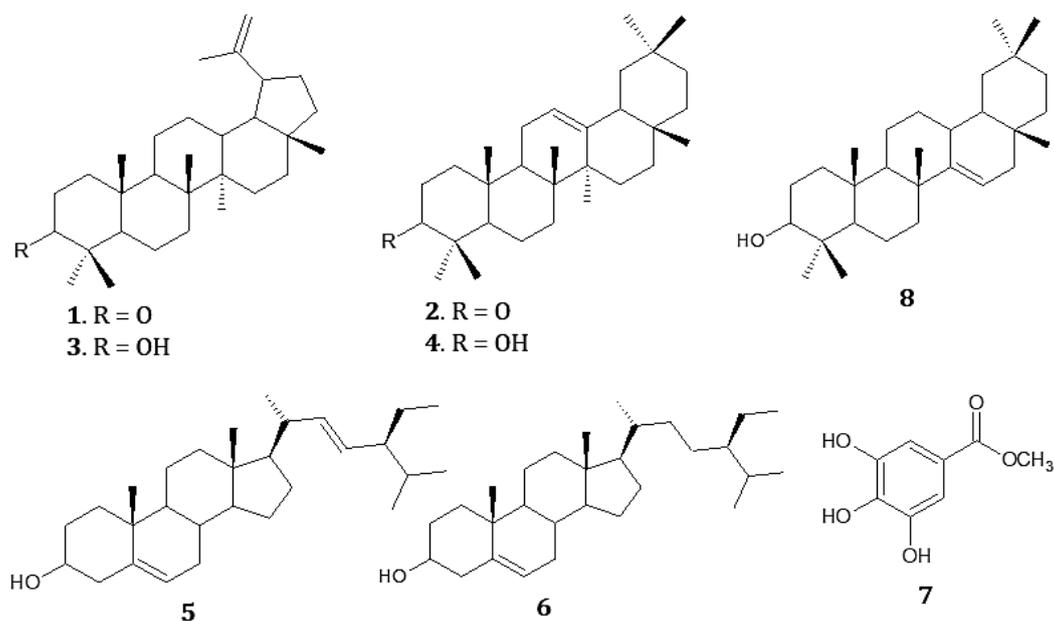
β -sitosterol (5) e estigmasterol (6). Esteroides isolados na fração 8-10. O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais nas regiões entre δ 0,69 a 2,33, referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, característicos de triterpenos e esteroides, com a presença do sinal em δ 0,69 (3H, *sl*), característico dos esteroides estigmasterol e β -sitosterol. Apresentou também um multiplete em δ 3,52 atribuído a um hidrogênio (H-3) ligado a carbono carbinólico, de ambos os esteroides. Em δ 5,35 (*dl*, 2H, $J = 5,12$ Hz), atribuído ao hidrogênio olefínico na posição H-6 de ambos os esteroides, e ainda dois duplos dupletos em δ 5,15 (1H, $J = 15,18$ e 8,38 Hz) e em δ 5,01 (*dd*, 1H, $J = 15,18$ e 8,57 Hz) referentes aos hidrogênios H-22 e H-23 do esteroide estigmasterol, diferenciando-se assim o β -sitosterol. As percentagens aproximadas dos dois constituintes na mistura foram calculadas com base na integração dos sinais correspondentes a H-6 e H-22 e H-23, e permitiram deduzir que a mistura de β -sitosterol e estigmasterol está na proporção (1,5:1) (PEDROZA et al., 2020).

Galato de metila (7). Isolado da fração 20-21, um éster metílico do ácido gálico. A presença de apenas um sinal aromático 2H no espectro de RMN de ^1H indicou que a substância fenólica deveria ser simétrica e possuir quatro grupos constituintes. Além disso, a substância deveria ser uma molécula relativamente pequena porque tinha apenas seis sinais de carbono. O galato de metila com peso molecular de 183 u e fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$ possui três grupos hidroxila (-OH) ligado aos carbonos 3, 4 e 5. Os grupos -OH, orientados na mesma direção em torno do anel benzênico, funcionam como doadores e aceitadores de pontes de hidrogênio. Um ácido metil carboxílico está ligado ao C-1. ESI-MS $[\text{M-H}]^-$ m/z 183 (TAN, CHAN e LIM, 2015).

Substância identificada do extrato metanólico das folhas

Taraxerol (8). Triterpeno isolado na fração 11. No espectro de RMN de ^1H , pode-se destacar a ligação dupla pela presença de um sinal em δ 5,51 (*dd*, $J = 8,5$ e 3,5 Hz) e nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° sinais correspondentes ao carbono quaternário em δ 158,0 e CH em δ 116,87 que confirmam ser o **taraxerol**, os demais sinais foram compatíveis com a estrutura proposta (CURSINO et al., 2012).

Figura 1 – Estrutura química das substâncias identificadas dos extratos metanólicos dos galhos e folhas de *M. guianensis*



Dados de RMN obtidos para a identificação das substâncias

1 – Lupen-3-ona: Cristais brancos. RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3): δ 39,9 (C-1); 34,1 (C-2); 218,3 (C-3); 47,2 (C-4); 54,8 (C-5); 19,6 (C-6); 33,5 (C-7); 40,7 (C-8); 49,7 (C-9); 36,8 (C-10); 21,4 (C-11); 25,1 (C-12); 38,1 (C-13); 42,8 (C-14); 27,4 (C-15); 35,4 (C-16); 42,9 (C-17); 48,2 (C-18); 47,9 (C-19); 150,9 (C-20); 29,7 (C-21); 39,9 (C-22); 26,6 (C-23); 21,0 (C-24); 15,9 (C-25); 15,7 (C-26); 14,4 (C-27); 18,0 (C-28); 109,4 (C-29); 19,3 (C-30).

2 – β -amirin-3-ona: Cristais brancos. RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3): δ 38,1 (C-1); 27,4 (C-2); 2018,3 (C-3); 38,1 (C-4); 55,2 (C-5); 18,3 (C-6); 32,5 (C-7); 38,1 (C-8); 47,3 (C-9); 37,0 (C-10); 23,6 (C-11); 121,4 (C-12); 145,2 (C-13); 41,8 (C-14); 26,1 (C-15); 26,8 (C-16); 32,5 (C-17); 47,2 (C-18); 46,8 (C-19); 31,0 (C-20); 34,6 (C-21); 37,0 (C-22); 28,4 (C-23); 15,7 (C-24); 15,9 (C-25); 16,7 (C-26); 25,8 (C-27); 28,4 (C-28); 33,3 (C-29); 23,6 (C-30).

3 – Lupeol: Cristais brancos. RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3): δ 38,7 (C-1); 27,4 (C-2); 79,0 (C-3); 38,8 (C-4); 55,2 (C-5); 18,3 (C-6); 34,2 (C-7); 40,8 (C-8); 50,4 (C-9); 37,1 (C-10); 20,9 (C-11); 25,1 (C-12); 38,0 (C-13); 42,8 (C-14); 27,4 (C-15); 35,5 (C-16); 42,8 (C-17); 48,2 (C-18); 47,9 (C-19); 151,0 (C-20); 29,8 (C-21); 39,9 (C-22); 27,9 (C-23); 15,3 (C-24); 16,1 (C-25); 15,9 (C-26); 14,5 (C-27); 18,0 (C-28); 109,3 (C-29); 19,3 (C-30).

4 – β -amirina: Cristais brancos. RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3): δ 38,7 (C-1); 27,4 (C-2); 79,0 (C-3); 38,5 (C-4); 55,2 (C-5); 18,3 (C-6); 32,6 (C-7); 38,8 (C-8); 47,6 (C-9); 37,1 (C-10); 23,6 (C-11); 121,7 (C-12); 145,2 (C-13); 41,7 (C-14); 26,1 (C-15); 26,9 (C-16); 32,4 (C-17); 47,2 (C-18); 46,8 (C-19); 31,0 (C-20); 34,7 (C-21); 37,1 (C-22); 28,4 (C-23); 15,5 (C-24); 15,6 (C-25); 16,7 (C-26); 26,0 (C-27); 28,4 (C-28); 33,3 (C-29); 23,6 (C-30).

5 – β -sitosterol: Cristais brancos. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 0,69 (H-19); 3,5 (H-13); 5,35 (H-6).

6 – Estigmasterol: Cristais brancos. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 0,69 (H-19); 3,52 (H-13); 5,35 (H-6); 5,15 (H-22); 5,01 (H-23).

7 – Galato de metila: Sólido amorfo. RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD): δ 7,03 (H-2, H-6, *s*, 2H); 3,81 (OCH_3 , *s*, 3H); RMN de ^{13}C (125,7 MHz, CD_3OD): δ 168,7 (C=O); 146,2 (C-3, C-5), 139,4 (C-4), 121,4 (C-1), 109,7 (C-2, C-6), 52,1 (OCH_3).

8 – Taraxerol: Amorfo branco. RMN de ^{13}C (300MHz, CDCl_3): δ 37,7 (C-1); 27,4 (C-2); 79,0 (C-3); 39,9 (C-4); 55,5 (C-5); 18,7 (C-6); 35,1 (C-7); 38,7 (C-8); 48,7 (C-9); 37,7 (C-10); 17,4 (C-11); 35,5 (C-12); 37,7 (C-13); 158,0 (C-14); 116,8 (C-15); 36,6 (C-16); 36,6 (C-17); 49,2 (C-18); 41,2 (C-19); 29,8 (C-20); 33,6 (C-21); 28,8 (C-22); 15,4 (C-23); 15,4 (C-24); 29,8 (C-25); 25,9 (C-26); 29,8 (C-27); 33,6 (C-28); 21,3 (C-29); 27,4 (C-30).

Avaliação da atividade antibacteriana

Os dados obtidos do ensaio antibacteriano pelo método de microdiluição em caldo foram expressos em porcentagem inibição comparado ao padrão antibiótico (oxitetraciclina 125 μmL). As amostras foram avaliadas de acordo com a leitura espectrofotométrica, do qual foi calculada a inibição no crescimento do microrganismo. Como resultado, os extratos mais polares apresentaram maior porcentagem de inibição frente a duas bactérias gram-negativas: *A. hydrophyla* e *P. fluorescens*, e uma bactéria gram-positiva: *S. aureus*, com inibição de 63 a 70%, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultado do ensaio antibacteriano dos extratos de *M. guianensis* frente a bactérias patogênicas testados na concentração de 1000 µg/mL.

Extratos testados	Porcentagem de inibição (%)									
	Microorganismos testados									
	AH	CF	ET	EC	PA	PF	KP	SM	SE	SA
Ext.Fo.Hex	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Ext.Fo.MeOH	65	25	0	0	3	67	40	6	30	63
Ext.Ga.Hex	15	0	0	0	3	3	6	16	9	0
Ext.Ga.MeOH	66	6	0	0	10	70	0	3	16	66
oxitetraciclina	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6

AH: *Aeromonas hydrophila*, CF: *Citrobacter freundii*, ET: *Edwardsiella tarda*, EC: *Escherichia coli*, PA: *Pseudomonas aeruginosa*, PF: *Pseudomonas fluorescens*, KP: *Klebsiella pneumoniae*, SM: *Serratia marcescens*, SE: *Salmonella enteridis*, SA: *Staphylococcus aureus*.

A atividade inibitória dos extratos brutos e a inatividade de outros poderia ser justificada através de duas possibilidades. A primeira é o sinergismo, onde a interação de duas ou mais substâncias resultam na atividade agonista ou antagonista frente um organismo teste. Outra possibilidade refere-se à ação de uma única substância sendo responsável pela bioatividade (PANDE e KOST, 2017). Além disso, algumas espécies bacterianas são inatamente resistentes a uma ou mais classes de agentes antimicrobianos. Nesses casos, todas as cepas daquela espécie bacteriana apresentam resistência a todos os membros daquelas classes antibacterianas (TENOVER, 2006).

A atividade frente a bactérias gram-negativas mostra que mesmo com as diferenças estruturais presentes na parede celular desses microrganismos, como a camada de lipopolissacarídeos, os extratos metanólicos tiveram ação inibitória na concentração de 1000 µg/mL, demonstrando um potencial no combate a essas cepas bacterianas (KHAMENEH et al., 2019).

O estudo fitoquímico dos extratos metanólicos de galhos e folhas de *M. guianensis* resultou no isolamento e identificação de substâncias que apresentam atividades antibacterianas, tais como: lupeol (PATIL et al., 2018), β -amirina (ABDEL-RAOUF et al., 2015), galato de metila (KANG et al., 2008) e taraxerol (KOAY et al., 2013). Dessa forma, podemos inferir que nos extratos metanólicos há a presença de substâncias que possuem um espectro de ação capaz de penetrar nas múltiplas camadas das bactérias que foram testadas e inibidas nesse ensaio biológico.

CONCLUSÃO

Neste trabalho os extratos metanólicos de galhos e folhas de *M. guianensis* demonstraram potencial antibacteriano frente a bactérias gram-negativas e gram-positiva. Desses mesmos extratos foram isolados e identificados cinco triterpenos, dois esteroides e um derivado fenólico, dentre os quais a β -amirina, β -amirin-3-ona e galato de metila estão sendo relatados pela primeira vez na família Coulaceae, de acordo com a literatura consultada. Este resultado reforça a pesquisa de produtos naturais, demonstrando que podem ser fontes alternativas viáveis para a produção de substâncias estratégicas para a indústria.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-ENAZI, N. M.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M.; AL-OTHMAN, M. R.; HATAMLEH, A. A. Antibacterial β -amyrin isolated from *Laurencia microcladia*. **Arabian J. Chem.**, v. 8, p. 32–37, 2015. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.09.033
- ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; SUPURAN, C. T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nat. Rev. Drug Disc.**, v. 20, p. 200–216, 2021. DOI: 10.1038/s41573-020-00114-z
- BARBIERI, R.; COPPO, E.; MARCHESE, A.; DAGLIA, M.; SOBARZO-SÁNCHEZ, E.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiol. Res.**, v. 196, p. 44–68, 2017. DOI: 10.1016/j.micres.2016.12.003
- BI, X.; HAN, L.; QU T; MU, Y.; GUAN, P.; QU, X.; WANG, Z.; HUANG, X. Anti-Inflammatory effects, SAR, and action mechanism of monoterpenoids from *Radix Paeoniae alba* on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 715, 2017. DOI: 10.3390/molecules22050715
- BREZÁNI, V.; LELÁKOVÁ, V.; HASSAN, S. et al. Anti-infectivity against herpes simplex virus and selected microbes and anti-Inflammatory activities of compounds isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. **Viruses**, v. 10, n. 7, p. 360, 2018. DOI: 10.3390/v10070360.
- CHO, M.; SO, I.; CHUN, J. N.; JEON, J-H. The antitumor effects of geraniol: modulation of cancer hallmark pathways review. **Int. J. Oncol.**, v. 48, n. 5, p. 1772-1782, 2016. DOI: 10.3892/ijo.2016.3427
- CHUKWUNONSO, E.; VERONICA, B.; TOYO, P. Methicillinresistant *Staphylococcus aureus*: a mini review. **Int. J. Med. Res. Hea. Sci.**, vol. 7, no. 1, p. 122–127, 2018.
- CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-Tenth Edition. M07 A10. v. 35, p. 1-87, 2015.

CURSINO, L. M. C.; MESQUITA, A. S. S.; MESQUITA, D. W. O.; FERNANDES, C. C.; NUNEZ, C. V. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 181–186, 2009.

CURSINO, L. M. C.; NUNEZ, C. V.; DE PAULA, R. C.; NASCIMENTO, M. F. A.; DOS SANTOS, P. A. Triterpenes from *Minquartia guianensis* (Olacaceae) and *in vitro* antimalarial activity. **Quimica Nova**, v. 35, n. 11, p. 2165–2168, 2012.

DOGAN, G.; KARA, N.; BAGCI, E.; GUR, S. Chemical composition and biological activities of leaf and fruit essential oils from *Eucalyptus camaldulensis*. **Zeitschrift für Naturforschung C**; v. 72, n. 11, p. 483–489, 2017. DOI:10.1515/znc-2016-0033

FLORA DO BRASIL. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB19958>, acessado em Fev 2023.

GHONIEM, E. M.; HENDAWY, G. R.; MOTELEB, T. M. A. Caracterização de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina no National Liver Institute. **Menoufia Med. J.**, vol. 27, p. 825–832, 2014.

JEPPESEN, P. B.; YRSKOG, S. E.; AGGER, A.; GREGERSEN, S.; COLOMBO, M.; XIAO, J.; HERMANSEN, K. Can stevioside in combination with a soy-based dietary supplement be a new useful treatment of type 2 diabetes? an *in vivo* study in the diabetic Goto-Kakizaki rat. **Rev Diabet Stud.**, v. 3, n. 4, p. 189–199, 2006. DOI: 10.1900/RDS.2006.3.189

KHAMENEH, B.; IRANSHAHY, M.; SOHEILI, V.; FAZLY BAZZAZ, B. S. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. **Antimicrob. Resist. Infect. Control**. v. 8, p. 118, 2019 DOI: 10.1186/s13756-019-0559-6

KANG, M. S.; OH, J. S.; KANG, I. C.; HONG, S. J.; CHOI, C. H. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. **The J. Microb.**, v. 46, n. 6, p. 744–750, 2008. DOI 10.1007/s112275-008-0235-7

KOAY, Y. C.; WONG, K. C.; OSMAN, H; ELDEEN, I. M. S; ASMAWI, M. Z. Chemical Constituents and Biological Activities of *Strobilanthes crispus* L. **Rec. Nat. Prod.**, v. 7, n. 1, p. 59–64, 2013. EISSN:1307-6167

LISEWSKI A. M.; QUIROS J. P.; NG, C. L, ADIKESAVAN, A. K.; MIURA, K.; PUTLURI, N.; EASTMAN, R. T. et al. Supergenomic network compression and the discovery of EXP1 as a glutathione transferase inhibited by artesunate. **Cell.**, v. 158, n. 4, p. 916–928. DOI: 10.1016/j.cell.2014.07.011

MANDAL, S. M.; ROY, A.; GHOSH, A.K.; HAZRA, T.K.; BASAK, A.; FRANCO, O. L. Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from peptides to phage utilization. **Front. Pharmacol.**, v. 5, n. 5, p. 1–12, 2014. DOI: 10.3389/fphar.2014.00105

MARTINEZ, A. M.; GAMBIN, Y.; SIERECKI, Y. Thinking outside the bug: molecular targets and strategies to overcome antibiotic resistance. **Inter. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 6, p. 1255–1277, 2019. DOI: 10.3390/ijms20061255.

PANDE, S.; KOST, C. Bacterial unculturability and the formation of Intercellular metabolic networks. **Trends Microbiol.**, v. 25, n. 5, p. 1–13, 2017. ISSN 0966-842X.

PATIL, P.; SOUJANYA, B.; KIRAN, K. A. A review on lupeol: superficial triterpenoid from horticulture crops. **Internat. J. Chem. Stud.**, v. 6, n. 3, p. 3301-3305, 2018. ISSN: 2349-8528

PEDROZA, L. S.; SALAZAR, M. G. M.; OSORIO, M. I. C.; FACHIN-ESPINAR, M. T.; PAULA, R. C.; NASCIMENTO, M. F. A.; OLIVEIRA, A. B.; NUNEZ, C. V. Estudo químico e avaliação da atividade antimalárica dos galhos de *Piranhea trifoliata*. **Rev. Fitos**, v. 14, n. 4, p. 476-491, 2020. DOI 10.32712/2446-4775.2020.905

RASMUSSEN, H. B.; CHRISTENSEN, S. B.; KVIST, L. P.; KHARAZMI, A.; HUANSI, A. G. Absolute configuration and antiprotozoal activity of Minquartynoic acid. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 9, p. 1295-1296, 2000. DOI: 10.1021/np990604k

SANTIAGO, C., PANG, E. L., LIM, K. H., LOH, H. S., TING, K. N. Inhibition of penicillin-binding protein 2a (PBP2a) in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by combination of ampicillin and a bioactive fraction from *Duabanga grandiflora*. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 15, n. 1, p. 1, 2015. DOI: 10.1186/s12906-015-0699-z

SHAN, L. Y.; THING, T. C.; PING, T. S.; AWANG, K.; HASHIM N. M.; NAFIAH, M. A.; AHMAD, K. Cytotoxic, antibacterial and antioxidant activity of triterpenoids from *Kopsia singaporensis* Ridl. **J. Chem. and Pharm. Res.**, v. 6, n. 5, p. 815-822, 2014. ISSN: 0975-7384

TAN, Y. P.; CHAN, E. W. C.; LIM, C. S. Y. Potent quorum sensing inhibition by methyl gallate isolated from leaves of *Anacardium occidentale* L. (cashew). **Chiang Mai J. Sci.** v. 42, n. 3, p. 650-656, 2015.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am. J. Infect. Control.**, v. 34 p. 3-10, 2006. DOI: 10.1016/j.ajic.2006.05.219.

TOUANI, F. K.; SEUKEP, A. J.; DJEUSSI, D. E.; FANKAM, A. G.; NOUMEDEM, J. A.; KUETE, V. Antibiotic-potential activities of four *Cameroonian dietary* plants against multidrug-resistant Gram-negative bacteria expressing efflux pumps. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 14, n. 258, 2014.

WANG, W.; GY, S.; WQ, H.; ZHAO, Y. Q. Advances in pharmacological effects of ginsenosides on cardiovascular diseases in the past 10 years. **Chinese Herb. Medic.**, v. 47, p. 3736-3741, 2016.

YAGUI, M. Resistencia antimicrobiana: nuevo enfoque y oportunidad. **Rev. Peru. Med. Exp. Sal. Púb.**, vol. 35, n. 1, p. 7-8, 2018. DOI: 10.17843/rpmesp.2018.351.3594