



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

NILMA SANTOS DA SILVA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE *Erythroxylum nummularium* PEYR ESPÉCIE
VEGETAL ENDÊMICA DO BRASIL**

Vitória da Conquista, BA

2024

NILMA SANTOS DA SILVA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE *Erythroxylum nummularium* Peyr ESPÉCIE
VEGETAL ENDÊMICA DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Oliveira Moreira

Coorientadora: Prof. Dr. Regiane Yatsuda

Universidade Federal da Bahia-UFBA

Vitória da Conquista
2024

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – SIBI/UFBA

S586

Silva, Nilma Santos da.

Estudo químico e avaliação das atividades biológicas de *Erythroxylum nummularium* Peyr espécie vegetal endêmica do Brasil / Nilma Santos da Silva. -- Vitória da Conquista, BA: UFBA, 2024.

84 f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Oliveira Moreira.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Regiane Yatsuda.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biociências) - Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2024.

1. Atividades biológicas. 2. Espécie vegetal. 3. Espécie brasileira. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Moreira, Bruno Oliveira. III. Yatsuda, Regiane. IV. Título


CDU: 574.1(043.3)

NILMA SANTOS DA SILVA


**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE *Erythroxylum nummularium* PEYR ESPÉCIE VEGETAL
ENDÊMICA DO BRASIL**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em
Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.


Vitória da Conquista – BA, 18/12/2024

Documento assinado digitalmente
 **BRUNO OLIVEIRA MOREIRA**
Data: 11/02/2025 14:54:09-0900
verifique em <http://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Bruno Oliveira Moreira (Orientador)
(Universidade Federal da Bahia)

Documento assinado digitalmente
 **MARILUZE PEIXOTO CRUZ**
Data: 18/12/2024 15:01:10-0900
verifique em <http://validar.it.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Mariluze Peixoto Cruz (Examinadora)
(Universidade Federal da Bahia)

Documento assinado digitalmente
 **CLAYTON QUEIROZ ALVES**
Data: 18/12/2024 15:14:03-0900
verifique em <http://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves (Examinador)
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

AGRADECIMENTOS

“Deus cuida de tudo com amor, e não cai uma folha da árvore sem a sua vontade.”
Agradeço a **Deus**, por me acalmar nos momentos de medo e desespero.

Aos meus pais, **Jorge e Noeme**, por me apoiarem emocionalmente sempre. Gratidão por me ensinarem os mais preciosos valores da vida, e sempre me impulsionar a lutar com garra e fé.

Ao meu orientador **Bruno Moreira**, a sua disposição em abraçar essa pesquisa desde o primeiro momento. Gratidão por estar sempre presente no laboratório, em todas as etapas que consistiram este estudo, além de sua paciência e serenidade para corrigir as minhas falhas. Obrigada por me ensinar a fazer sempre o melhor e olhar para todas as possibilidades que o universo da pesquisa oferece.

À minha professora da graduação **Ana Carolina Rodrigues**, responsável em fazer a ponte com o meu atual orientador. Obrigada pelo incentivo no ingresso ao mestrado.

Ao técnico **Flávio Mendes**, por contribuir com esta pesquisa na parte de bancada.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa **Biomachem**, a quem merecem todo o meu respeito e admiração.

Ao meu amigo **Carlos Daniel**, por estar presente desde o início do mestrado me apoiando e me ajudando também.

Aos meninos da iniciação científica **Rafael, Ícaro, Gabriel e Jully**, por terem contribuído com esta pesquisa. Obrigada pela dedicação de vocês, por estarem comigo de forma disciplinada e com tanto cuidado.

A **Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES)** pela concessão de bolsa.

A todos os professores, coordenadores e técnicos do programa de Pós-graduação em Biociências.

À **UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**, pelo acolhimento. Obrigada a todos que contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

SILVA, Nilma Santos. Estudo químico e avaliação das atividades biológicas de *E.nummularium* Peyr espécie vegetal endêmica do Brasil. Dissertação (Mestrado)- Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2024.

Erythroxyllum nummularium Peyr é uma espécie vegetal encontrada exclusivamente no Brasil que apresenta substâncias bioativas como epicatequina, quercetina, β -amirina, lupeol, palmitato de eritrodíol e β -sitosterol. Essas substâncias possuem ação anti-inflamatória, antioxidante, analgésica, antidiabética, anticâncer, antimicrobiana, anti-toxoplasmose e hepatoprotetora. Este estudo objetivou ampliar o conhecimento sobre a composição química e as atividades biológicas dos diferentes órgãos da planta, incluindo folhas, galhos, casca do caule e caule, a partir de extratos metanólicos e frações orgânicas obtidas por partição em solventes de polaridades crescentes (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol). Os extratos e frações foram analisados quanto ao teor de fenólicos, flavonoides e alcaloides totais, bem como avaliados em ensaios de atividade antioxidante (DPPH, β -caroteno/ácido linolênico e fosfomolibdato), antimicrobiana (contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*), antinociceptiva (*in vivo*) e toxicidade (utilizando *Artemia salina* e um modelo animal com camundongos). A triagem fitoquímica foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) e a composição química caracterizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG - EM). No ensaio antinociceptivo, a fração acetato de etila das folhas (ELEN) foi administrada oralmente em camundongos *Balb-C* machos, nas doses de 6,25, 12,5, 25 e 50 mg/kg. Após 60 minutos, os animais receberam ácido acético 0,6% por via intraperitoneal, e o número de contorções abdominais foi registrado. Os resultados indicaram teores significativos de fenólicos e flavonoides totais, além de menores concentrações de alcaloides. A CCD revelou a presença de saponinas, taninos e esteroides, enquanto a análise por CG - EM identificou glicerol, ácido hexadecanóico, hexadecanoato de metila e acetato de lupeol como as principais substâncias. Entre os ensaios antioxidantes, as frações acetato de etila das folhas, galhos e casca do caule destacaram-se pelos resultados mais expressivos. No teste antimicrobiano, as frações acetato de etila e diclorometano das folhas mostraram eficácia contra *S. aureus*, enquanto as frações hexânica e butanólica exibiram atividade contra *S. mutans*. Nenhuma amostra foi ativa contra *S. sobrinus*. O ensaio de toxicidade em *A. salina* revelou toxicidade moderada a alta para os extratos brutos e frações orgânicas, exceto para fração ELEN, considerada atóxica. A atividade antinociceptiva dessa fração foi mais pronunciada na dose de 6,25 mg/kg, reduzindo significativamente as contorções abdominais, sem sinais de toxicidade em camundongos após 15 dias de análise com doses de até 2000 mg/kg. Esses resultados indicam que *E. nummularium* é uma fonte promissora de substâncias bioativas, com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: Atividade antinociceptiva, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, análise fitoquímica e toxicidade.

ABSTRACT

SILVA, Nilma Santos. Chemical study and evaluation of biological activities of *Erythroxylum nummularium* Peyr, a plant species endemic to Brazil. Dissertação (Mestrado)- Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2024.

Erythroxylum nummularium Peyr is a plant species found exclusively in Brazil that has bioactive substances such as epicatechin, quercetin, β -amyrin, lupeol, erythrodiol palmitate and β -sitosterol. These substances have anti-inflammatory, antioxidant, analgesic, antidiabetic, anticancer, antimicrobial, anti-toxoplasmosis and hepatoprotective action. This study aimed to expand the knowledge about the chemical composition and biological activities of different plant organs, including leaves, branches, stem bark and stem, from methanol extracts and organic fractions obtained by partitioning in solvents of increasing polarities (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol). The extracts and fractions were analyzed for phenolics, flavonoids and total alkaloid content, as well as evaluated in antioxidant activity assays (DPPH, β -carotene/linolenic acid and phosphomolybdate), antimicrobial activity (against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*), antinociceptive (in vivo) and toxicity (using *Artemia salina* and an animal model with mice). The phytochemical screening was performed by thin layer chromatography (CCD) and the chemical composition was characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). In the antinociceptive assay, the ethyl acetate fraction of the leaves (ELEN) was administered orally to male Balb-C mice at doses of 6.25, 12.5, 25 and 50 mg/kg. After 60 minutes, the animals received 0.6% acetic acid intraperitoneally, and the number of abdominal contortions was recorded. The results indicated significant levels of phenolics and total flavonoids, as well as lower concentrations of alkaloids. CCD revealed the presence of saponins, tannins, and steroids, while GC-EM analysis identified glycerol, hexadecanoic acid, methyl hexadecanoate, and lupeol acetate as the main substances. Among the antioxidant assays, the ethyl acetate fractions of the leaves, twigs and bark of the stem stood out for the most expressive results. In the antimicrobial test, the ethyl acetate and dichloromethane fractions of the leaves showed efficacy against *S.aureus*, while the hexane and butanolic fractions exhibited activity against *S.mutans*. No specimens were active against *S.sobrinus*. The toxicity test on *A.salina* revealed moderate to high toxicity for crude extracts and organic fractions, except for the ELEN fraction, which was considered non-toxic. The antinociceptive activity of this fraction was more pronounced at a dose of 6.25 mg/kg, significantly reducing abdominal contortions, with no signs of toxicity in mice after 15 days of analysis with doses up to 2000 mg/kg. These results indicate that *E.nummularium* is a promising source of bioactive substances, with potential for the development of new drugs.

Keywords: Antinociceptive activity, antioxidant activity, antimicrobial activity, phytochemical analysis, and toxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** *Erythroxylum nummularium* Peyr
Figura 2 Indivíduos da *Artemia salina* Leach
Figura 3 Coleta e secagem de *Erythroxylum nummularium*
Figura 4 Procedimento para obtenção dos extratos metanólicos e orgânicos
Figura 5 Representação da Cromatografia em camada delgada (CCD)

ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACEOH-** Acetato de etila
- BEEN-** Fração butanólica dos galhos *E.nummularium*
- BLEN-** Fração butanólica da folha *E.nummularium*
- BSBEN-** Fração butanólica da casca do caule *E.nummularium*
- BSEN-** Fração butanólica do caule *E.nummularium*
- CAT/TAC-** Capacidade antioxidante total
- CCD-** Cromatografia em camada delgada
- CE₅₀/EC₅₀-** Concentração eficiente em 50 %
- CG/EM-** Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de massas
- CLAE-** Cromatografia líquida de alta eficiência
- DBEN-** Fração diclorometano dos galhos *E.nummularium*
- DL₅₀/LD₅₀-** Dose letal para 50% da população testada
- DLEN-** Fração diclorometano da folha *E.nummularium*
- DP-** Desvio padrão
- DPPH-** 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- DSBEN-** Fração diclorometano da casca do caule *E.nummularium*
- DSEN-** Fração diclorometano do caule *E.nummularium*
- EBEN-** Fração acetato de etila dos galhos *E.nummularium*
- ELEN –** Fração acetato de etila da folha *E.nummularium*
- ESBEN-** Fração acetato de etila da casca do caule *E.nummularium*
- ESEN-** Fração acetato de etila do caule *E.nummularium*
- HBEN-** Fração hexânica dos galhos *E.nummularium*
- HLEN-** Fração hexânica da folha de *E.nummularium*
- HSBEN-** Fração hexânica da casca do caule *E.nummularium*
- IBGE-** Instituto brasileiro de geografia e estatística
- IC-** Intervalo de confiança
- ICMBio-** Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
- MBEN-** Extrato metanólico dos galhos
- MEOH-** Metanol
- MLEN-** Extrato metanólico da folha
- MSBEN-** Extrato metanólico da casca do caule
- MSEN-** Extrato metanólico do caule
- RMN-** Ressonância magnética nuclear
- ROS-** Espécies reativas de oxigênio
- SiBBR-** Sistema de informação sobre a Biodiversidade Brasileira
- SNC-** Sistema nervoso central
- TFC-** Teor de flavonoides totais
- TPC-** Teor de fenólicos totais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Contextualização do uso de plantas medicinais pelo homem: Uma relação milenar.....	12
2.2. O território brasileiro e sua flora.....	13
2.3. Angiospermas e a classificação do gênero <i>Erythroxylum</i>	15
2.4. A espécie <i>Erythroxylum nummularium</i> Peyr.....	16
2.4. <i>Artemia salina</i> Leach.....	19
3 OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo geral.....	22
3.1. Objetivos específicos.....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Obtenção dos extratos metanólicos por maceração a partir das folhas, galhos, casca do caule e caule de <i>Erythroxylum nummularium</i>	23
4.1.1. Material vegetal.....	23
4.1.2. Produção dos extratos metanólicos de <i>E.nummularium</i>	23
4.2. Estudo fitoquímico dos extratos metanólicos e fases orgânicas.....	25
4.2.1. Triagem qualitativa.....	25
4.2.2. Determinação da presença de alcaloides por Cromatografia em camada delgada (CCD).....	25
4.2.3. Determinação da presença de alcaloides pelo método de precipitação.....	26
4.2.4. Teste para flavonoides e fenólicos.....	26
4.2.5. Teste para esteroides.....	26
4.2.6. Teste para saponinas.....	26
4.2.7. Teste para taninos.....	26
4.3. Determinação do teor de alcaloides totais (TAT).....	26
4.4. Determinação do teor de flavonoides totais (TFT).....	27
4.5. Determinação do teor de fenólicos totais (TPT).....	27
4.6. Atividade antioxidante.....	28
4.6. 1. Teste do radical livre DPPH.....	28
4.6. 2. Sistema β -caroteno/ácido linolênico.....	28
4.6. 3. Capacidade antioxidante total.....	29
4.6.4. Mapa de calor.....	30
4.7. Análise da composição química por CG/EM.....	30
4.8. Ensaio biológicos.....	30
4.8.1. Atividade antimicrobiana.....	30
4.8.1.1. Micro-organismos e cultivo.....	31
4.8.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	31
4.8.4. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM).....	31
4.9.1. Ensaio de toxicidade da <i>Artemia salina</i> Leach.....	32
4.9.2. Atividade antinociceptiva.....	32
4.9.2.1. Animais.....	32
4.9.2.2. Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	32
4.9.3. Ensaio de toxicidade em camundongos.....	33

5.0. Análise estatística.....	33
REFERÊNCIAS.....	35
CAPÍTULO 1.....	42
CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS.....	78
CONSIDERAÇÕES FINAIS.	84

1 INTRODUÇÃO

Os primórdios da relação do homem com as plantas aduzem, sobretudo, à busca por sobrevivência. Esse vínculo deu origem à Etnobotânica, ciência responsável em compreender as interações entre a espécie humana e os vegetais (ALI & QAISER, 2009). Precedente a esse conceito, a palavra etnobotânica foi apresentada pelo Dr. John Willian Hershberger, em 1895, definindo-a como parte da cultura de um povo (RAHMAN, *et al.*, 2018). Essa associação exprime a dependência do ser humano ao reino vegetal, em razão do seu incessante emprego na alimentação, nos cultos religiosos, ferramentas agrícolas, e essencialmente na medicina popular. Tais usos de plantas com finalidades terapêuticas acompanharam a história humana dos tempos primitivos à contemporaneidade. Esse potencial curativo está relacionado aos metabólitos secundários.

Esses metabólitos são um conjunto de compostos químicos, com uma estrutura complexa, massa molecular reduzida, e por vezes são específicos nas espécies vegetais (HARTMANN, 2007). A liberação dessas moléculas decorre por vezes, das adversidades locais como temperaturas extremas, ataques por herbívoros, restrição hídrica e nutricional. Tais circunstâncias são denominadas de pressões evolutivas (BEGON *et al.*, 2008). Nesse cenário, o ambiente estabelece forças de seleção natural, podendo modificar os aspectos gênicos dos organismos (TOWNSEND *et al.*, 2010). Essa mudança pode ocasionar na produção de moléculas próprias para a perpetuação das espécies. Nesse aspecto, os vegetais apresentam uma alta sensibilidade às condições ambientais, e por isso detém de um reservatório de produtos naturais, capazes de se tornarem a base para medicamentos farmacêuticos comerciais, assim como fitoterápicos (LI *et al.*, 2020). Tais constituintes são explorados pelo homem desde os tempos mais remotos, na tentativa de obterem-se aplicações terapêuticas inéditas.

Essa relação do homem com os vegetais possibilitou a descoberta de inúmeras substâncias com respostas farmacológicas. Tal relação floresceu também a partir do isolamento dos primeiros compostos químicos no final do século XVIII (ALMEIDA, 2011; PINTO *et al.*, 2002) e avançou com a purificação de outras substâncias. Ainda nessa época foram isoladas substâncias importantes como a atropina, a quinina, a salicina, a emetina e a cocaína (FERREIRA *et al.*, 2019). Dentre esses, houve destaque para a cocaína, cuja popularidade transcorreu-se pelo seu efeito estimulante no Sistema Nervoso Central (SNC). A princípio, utilizavam-se as folhas de *Erythroxylum coca* Lam no preparo de chás ou mascadas para abrandar as consequências da altitude. Contudo, o emprego na produção de drogas ilegais, como a cocaína, também contribuiu para expandir o conhecimento mundial, acerca desse alcaloide tropânico (SOUZA & LORENZI, 2012).

De acordo com Bacchi (2007), os alcaloides tropânicos apresentam uma esterificação do grupo hidroxila com ácidos aromáticos, relevantes para derivar os alcaloides mais importantes para a indústria farmacêutica. Estes alcaloides são a atropina e a cocaína, encontrados em Solanaceae e Erythroxylaceae (*Erythroxylum coca* Lam e *Erythroxylum novogranatense* (D. Morris) Hieron), respectivamente. A cocaína, em particular, atua como estimulante no Sistema Nervoso Central, inibindo, por exemplo, o transporte de dopamina, neurotransmissor ativo na coordenação motora (NASSAR & OUANOUNOU, 2020). A princípio, a descoberta desse alcaloide por Nieman em 1860, foi caracterizada por provocar dormência na língua. Isso revelou a propriedade anestésica local da cocaína. Mas essa revelação não foi bem aceita no início. Por conseguinte, a aprovação do uso da cocaína como anestésico específico, ocorreu apenas em 1884, quando a utilizaram pela primeira vez para bloqueio do sistema nervoso. Esse potencial farmacológico despertou o interesse para realizarem estudos em outras espécies do gênero *Erythroxylum*.

No tocante à existência de estudos sobre o potencial medicinal do gênero *Erythroxylum*, pode ser considerado baixo, considerando a diversidade da família, estimada em 250 espécies e 4 gêneros. Quanto aos registros no Brasil, “ocorre apenas *Erythroxylum*, com cerca de 100 espécies” (SOUZA, LORENZI, 2012.p.352). Apesar desse cenário, alguns trabalhos relataram os efeitos terapêuticos para determinadas espécies, como: 1) *Erythroxylum vaciifolium* Mart é afrodisíaco e tônico; 2) *Erythroxylum ovalifolium* Peyer possui atividade contra veneno de serpentes, edemas, hemorragias e contém propriedades antifúngicas; 3) *Erythroxylum pervillei* Baill inibe o desenvolvimento de tumores e apresenta ação citotóxica; 4) *Erythroxylum macrocarpum* Schulz contém princípios ativos antimicrobianos e ação diurética; 5) *Erythroxylum caatingae* Plowman tem ação antifúngica e antimicrobiana; 6) *Erythroxylum suberosum* A.ST.-Hil contém substâncias antidiarreicas, adstringentes, antireumatoides e anestésicas; 7) *Erythroxylum laurifolium* Lam é responsável pela hidrólise da enzima amilase e α -glicosidase (RESTREPO, *et al.*, 2019). Embora esses estudos mostraram o potencial nutricional e curativo dessas plantas, ainda há muitos vegetais desse gênero inexplorados.

Uma das espécies é a *Erythroxylum nummularium* Peyr, que não possui registro do seu nome popular na literatura. Esta planta pertence à família Erythroxylaceae, e é endêmica do Brasil. Sua distribuição restringe-se às regiões Nordeste e Sudeste do país, nas áreas fitogeográficas da Caatinga e da Mata Atlântica (FLORA DO BRASIL, 2020). Além disso, trata-se de um arbusto e possui 2,5 metros de altura (CONSERVA *et al.*, 2006), apresentando folhas membranáceas a coriáceas, ovais ou elípticas, e flores isoladas ou em inflorescência. Devido aos componentes com potencial farmacológico validado para diversas espécies do gênero *Erythroxylum*, uma investigação aprofundada sobre *E. nummularium* pode ser promissora. Por exemplo, os componentes majoritários reconhecidos até o momento para o

gênero são os alcaloides tropiânicos e flavonoides (YULIAN, L *et al.*, 2022).

Em relação à composição química da espécie *E.nummularium*, metabólitos nas folhas como epicatequina, quercetina, β -amirina, lupeol, palmitato de eritrodiol e β sitosterol foram identificados por Barreiros, A (2003) e Barreiros, M (2005). No primeiro trabalho, além do isolamento e purificação, as substâncias quercetina e epicatequina foram avaliadas quanto à atividade antioxidante. Inclusive, o potencial dos compostos puros foi comparado com antioxidantes já reconhecidos, como o galato de n-propila, BHT e alfa tocoferol, utilizando-se dois métodos: autooxidação do sistema β - caroteno/ácido linolênico e sequestro do radical livre DPPH. Neste contexto, ambos os flavonoides apresentaram atividades antioxidantes consideráveis. Em complemento ao primeiro estudo, Barreiros, M *et al* reconheceram novas substâncias, tais como β -amirina, lupeol, palmitato de eritrodiol e β sitosterol.

Logo, em virtude da riqueza de compostos existentes no gênero *Erythroxylum*, e a composição orgânica de *E. nummularium*, objetiva-se realizar neste trabalho, o estudo químico e avaliação das atividades biológicas da espécie. Através da partição do extrato metanólico da planta, obteve-se as fases orgânicas que foram submetidas à avaliação do teor de fenólicos e flavonoides totais, além da atividade antioxidante, antimicrobiana (inclusive com bactérias resistentes a antibióticos, como *Staphylococcus aureus*), ação antinociceptiva e teste de letalidade frente à *Artemia salina* Leach.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Contextualização do uso de plantas medicinais pelo homem: uma relação milenar

No aspecto curativo, a utilização das plantas nos decursos arcaicos possui registro nas sagradas escrituras e no Papiro de Ebers (PINTO *et al.*, 2002). Nesse último, datado de 1550, encontram-se informações em torno da ação terapêutica dos vegetais defronte às inúmeras enfermidades. Tantos conhecimentos estabelecidos em solo egípcio engendraram a origem da percepção organizada da saúde, porém em um nível rudimentar. No entanto, essa compreensão apesar de simples, expôs a relevância desse documento para fomentar as novas descobertas nos séculos posteriores.

Ao avançar o conhecimento acerca da eficácia terapêutica dos vegetais, essa compreensão foi difundida para as civilizações da Europa, África Setentrional, Ásia ocidental e a População Egípcia. Ao expandir a aplicação para terapia a partir de novos vegetais descobertos, se inicializou o interesse pelo estudo dos princípios bioativos. Esse advento é atribuído ao físico suíço Paracelso, que realizou as primeiras extrações de substâncias químicas de origem vegetal, surgindo as primeiras noções sobre os princípios bioativos ¹ (ALMEIDA, 2011).

Por outro lado, no território brasileiro, a gênese do uso de plantas curativas tem como referência os povos indígenas, africanos e europeus (ALMEIDA, 2011). Na perspectiva da população indígena, os nativos introduziram os vegetais no cotidiano, empregando-os em especial, no tratamento de doenças, na cicatrização de feridas e lesões causadas por animais peçonhentos. Tais práticas foram difundidas para as novas gerações indígenas, e inspiraram os portugueses no Período colonial. Segundo Fernandes (2004), os saberes medicinais dos povos originários associados às condutas jesuíticas, propagaram diversos conhecimentos na cura de doenças.

A origem para o uso de plantas de origem africana no território brasileiro está relacionada, sobretudo as práticas religiosas (SILVA *et al.*, 2016). Os africanos, trazidos à força ao Brasil sob o processo de escravidão, trouxeram e propagaram o seu conhecimento acerca de espécies vegetais com potencial terapêutico. Muitas plantas passaram a ser consumidas através da religião afro-brasileira, onde os Babalorixás ou Yalorixás² portadores do conhecimento etnomédico prescrevem o uso de folhas, raízes, sementes e cascas para fins medicinais, banhos e rituais [...] (ALMEIDA, 2011).

Outras culturas também contribuíram para a expansão do conhecimento das plantas medicinais no Brasil, tais como a europeia e oriental. A presença de europeus foi mais

¹ Produzido pelas plantas e conferem atividade terapêutica no organismo humano. Os bioativos incluem carotenoides, fitoesteróis, fosfolípidos e polifenóis (ALMEIDA, 2011).

² Sacerdote das religiões afro-brasileiras, como Candomblé e Umbanda (SCORSOLINI-COMIN *et al.*, 2020).

acentuada nas regiões Sul e Sudeste do país, por isso as espécies vegetais como a erva-cidreira, alecrim, erva-doce e o manjerição adaptaram-se e difundiram na medicina e culinária regionais (ALMEIDA, 2011). No entanto, essas espécies logo se expandiram para o restante do país. A influência asiática também contribuiu para a introdução de culturas vegetais, como o gengibre, raiz forte, canela e cravinho-da-índia. Portanto, diversas culturas influenciaram a chegada de vegetais com potencial medicinal e a sua difusão entre as comunidades no território brasileiro.

2.2 O território brasileiro e sua flora

O Brasil, localizado na América do Sul, se apresenta como um país megadiverso, segundo dados do Ministério do meio ambiente (2023). Com 8.510.417,771 Km² de área e um total de 203.080.756 de habitantes, conforme o Censo indicado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2022), possui uma Biodiversidade estimada em 116.839 espécies de animais e 46.355 espécies de plantas. Esta diversidade biológica está distribuída em seis biomas. Essas unidades biológicas compreendem a Amazônia, a Caatinga, o Cerrado, o Pantanal, a Mata Atlântica e o Pampa.

Segundo Townsend *et al.*, (2010, p.143), os biomas são classificados como “ áreas de terra dominadas por vegetais com aspectos, formas e processos fisiológicos característicos [...]”. Estes fatores implicam numa diversidade de plantas, com distribuição singularizada no território brasileiro. Por exemplo, na Amazônia tem ocorrência de 13.056 espécies vegetais, na Caatinga 4.963, o Cerrado com 12.829, Pantanal com 1.682 espécies da flora, Mata Atlântica com 20.000 e os Pampas com 2.817, de acordo com o Sistema de informação sobre a Biodiversidade brasileira (SiBBr, 2023). Tais ecossistemas se configuram com uma vegetação predominante em diferentes regiões climáticas.

Situada na Região Norte do país, a Amazônia perpassa cerca de nove nações, dentre as quais além do Brasil, incluem a Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Venezuela, Suriname e Guiana Francesa. Ademais, sua extensão territorial em solo brasileiro é estimada em 4,2 milhões de Km², segundo dados estimados pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO, 2021), e percorre nove estados. Mas toda essa vasta área não teria a mesma importância, não fosse a abundante flora presente, determinante em especial do clima Equatorial úmido neste ambiente (MAGNUSSON *et al.*, 2016). Essa configuração climática caracteriza-se por temperaturas elevadas e chuvas abundantes durante a maior parte do ano. Com essas características e detentora de vastas florestas, este bioma exerce uma influência relevante sobre o clima das regiões brasileiras e do mundo (MARENGO & ESPINOZA, 2016). Com esses saberes, é crucial mencionar outros ecossistemas, tal eminente a sua magnitude.

O Cerrado brasileiro, reconhecido como o segundo maior Bioma da América do Sul (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2023), dispõe de uma área de 1.983.017 Km². Tal

extensão atravessa dez estados brasileiros. Assim, como o bioma amazônico, o Cerrado abriga uma diversidade de plantas, com reconhecimento de 6.000 espécies nativas (ICMBIO, 2021). Dentre essa abundância vegetal, há destaque para o seu emprego na medicina tradicional, arborização de centros urbanos, proteção do solo, alimentação da fauna local, fabricação de cosméticos e produção de alimentos (FONTES *et al.*, 2016). Além da evidente importância florística, o Cerrado é banhado pelas três maiores bacias hidrográficas do continente Sul-Americano (LIMA & SILVA, 2005), que sustenta um potencial aquífero e favorece a sua biodiversidade.

Outro biosistema de relevância para o Brasil é a Caatinga. A Caatinga é um ecossistema que abrange todos os estados da Região Nordeste e Norte de Minas Gerais. Toda a sua extensão totaliza 862.818 Km², correspondendo a 10% do território brasileiro (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2023). Mas apesar da sua dimensão, a Caatinga é um bioma estigmatizado, onde sua biodiversidade é considerada com frequência como exígua (MAGALHÃES *et al.*, 2020). Entretanto, essa biogenocenose dispõe de uma flora diversa, que apesar das restrições hídricas, abriga 6.000 espécies de plantas (GUSMÃO *et al.*, 2016). Nesse sentido, a flora deste bioma possui importância econômica, em especial para agricultura familiar, e também para a indústria, abrangendo os setores farmacêuticos, cosméticos e químicos (ALBUQUERQUE, 2010). Vinculado ao aspecto medicinal e à sabedoria tradicional, ainda em concordância com Magalhães (2020), as plantas dessa região constituem uma autêntica drogaria natural. São desses organismos fotossintetizantes que se originam vários remédios caseiros, muito utilizados pela população local.

Uma vez apontada a relevância da Caatinga, cabe mencionar também o ecossistema natural Pampa. De ocorrência restrita ao estado do Rio Grande do Sul, o Bioma Pampa ocupa 2% do território brasileiro (INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTAS, 2020) e caracteriza-se pela formação campestre, que envolve paisagens naturais diversas como serras e planícies, morros e coxilhas. Além disso, esta unidade possui uma vegetação vasta em gramíneas, herbáceas e árvores. Por essa razão, o Bioma é reconhecido como Patrimônio cultural associado à biodiversidade. Por exemplo, dentre as espécies florísticas intrínsecas nesse ecossistema, há proeminência para Algaborro (*Prosopis algorobilla*), e Nhandavai (*Acacia farnesiana*). Entretanto, apesar de abrigar uma variabilidade de organismos tanto da flora, quanto da fauna, o Pampa é classificado como simples, quando contrastado aos demais biomas. Entretanto, tal aspecto comum não diminui a sua importância.

O ecossistema seguinte, reconhecido como Pantanal, também contribui para a megadiversidade brasileira. O Pantanal representa um dos biomas mais distintos do território brasileiro. Esse diferencial ocorre pela prevalência de planícies com maior inundação permanente já reconhecida no Planeta Terra (ALHO & SABINO, 2011). Mas apesar desse

principal fator, o Pantanal abrange apenas 1,8% de área no Brasil (SOS PANTANAL, 2021), com ocorrência em particular nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Embora este ecossistema delimita-se às entidades federativas descritas, foi revelado tratar-se de uma unidade biológica mais preservada do país, estabelecendo assim uma profusão de habitats, importante para o abrigo de espécies da fauna e flora brasileira (ALHO & SABINO, 2011). Portanto, esta área geográfica constitui uma das mais valiosas em biodiversidade, seguida por outra de igual valor, a Mata Atlântica.

A Mata Atlântica caracteriza-se como o bioma mais heterogêneo do Brasil (Marques *et al.*, 2016). Isso inclui uma diversidade de vegetação, muito influenciada pelo clima. Segundo dados da Fundação SOS Mata Atlântica 2024, quatro tipos principais de cobertura vegetal são reconhecidos neste espaço geográfico, sendo eles: Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional e Florestas de Araucárias. Entretanto, esse bioma é o mais destruído da nação (Fundação SOS Mata Atlântica, 2024). Ainda com respaldo nesta Instituição, nessa Floresta restam apenas 24% de vegetação nativa.

2.3. Angiospermas e a classificação do gênero *Erythroxylum*

As angiospermas são conhecidas popularmente como plantas com flores e equivale a maior parte dos vegetais do mundo (RAVEN *et al.*, 2011). Raven atribui essa diversidade a evolução das peças florais, sendo esse aprimoramento importante para a atração de insetos, comprovados como principais agentes polinizadores (DUTRA *et al.*, 2015). Por conseguinte, estudos recentes, realizados por Folk *et al.*, 2020 estimam a existência de ao menos 235.000 espécies reconhecidas como angiospermas.

Em complemento a Raven, Folk *et al.*, 2020 relataram que essa abundância também está associada a condições, tais como mudanças climáticas extremas nos habitats das angiospermas (incluindo biomas frios e secos), resultando assim em adaptações morfológicas e fisiológicas, necessárias para a sobrevivência do grupo ao longo do tempo.

Com relação às modificações nas angiospermas, Erikson 2014 atribuiu algumas razões associadas à variedade das espermatófitas. Por exemplo, o aumento das sementes e frutos carnosos há 80 milhões de anos, resultou na atração de animais frugívoros, onde a refeição caracteriza-se pelo consumo principal de frutos carnosos, e na sequência dejetam ou regurgitam o alimento, favorecendo assim a propagação de sementes numa variedade de ambientes (VANDER WALL & BECK, 2012). Esse conjunto de características constituem as angiospermas como o grupo mais diverso em famílias do Reino Plantae. Dentre essas famílias há destaque para a Erythroxylaceae.

De acordo com Souza & Lorenzi (2012), os vegetais agrupados em Erythroxylaceae apresentam-se como árvores ou arbustos. Além disso, as folhas são dispostas de maneira alterna ou espiralada, com estípulas intrapeciolares, formando ramentas específicas do gênero *Erythroxylum*. Quanto aos órgãos reprodutivos, possuem inflorescência cimosa e reduzida a uma única flor. Normalmente esse órgão na família Erythroxylaceae é pouco atraente, assim como os seus frutos, do tipo drupa. Considerando a heterogeneidade peculiar desta linhagem, a presente família abriga quatro gêneros, sendo *Aneulophus* Benth, *Nectaropetalum* Engl, *Pinacopodium* Exell & Mendona e *Erythroxylum* Plowman Browne. No entanto, entre estes gêneros, apenas *Erythroxylum* tem registro em solo brasileiro e abrange também as demais regiões tropicais do planeta (PLOWMAN & HENSOLD, 2004).

Além disso, são conhecidas cerca de 250 espécies do gênero *Erythroxylum*, dentre as quais 100 ocorrem no Brasil. Inclusive, *Erythroxylum* tornou-se uma unidade taxonômica importante, em decorrência da espécie *Erythroxylum coca* Lam (RESTREPO *et al.*, 2019). Esta planta é originária dos países andinos, sendo as folhas consumidas na forma de chás ou são mascadas para aliviar os efeitos da altitude (REDMAN, 2011). A princípio, esta prática promoveu o interesse em outras espécies do gênero *Erythroxylum*, com enfoque terapêutico.

2.4. A espécie *Erythroxylum nummularium* Peyr

Erythroxylum nummularium Peyr (figura 1) é uma espécie vegetal endêmica do Brasil, e pertence à família Erythroxylaceae (SOUZA, LORENZI, 2012.p.352). No território brasileiro é encontrada nas regiões Nordeste e Sudeste, nas áreas fitogeográficas da Caatinga e Mata Atlântica. Além disso, apresenta-se como arbusto, alcançando até 2,5m de altura (CONSERVA *et al.*, 2006). Sobre o nome popular da espécie, não há registro na literatura. Ainda com respaldo na designação de *E. nummularium*, ressalta-se a mudança nominal do epíteto específico *nummularia* para *nummularium*, onde *E. nummularia* foi publicado pela primeira vez em 1878 (Reflora do Brasil, 2020). Na atualidade, a denominação taxonômica aceita é *E. nummularium* Peyr. Neste contexto, segundo o Código Internacional de Nomenclatura Botânica- Código de Shenzhen (2018), trata-se de uma combinação nova, onde: “A combinação é um nome novo baseado em um nome legítimo previamente publicado e provê o epíteto final [...]”.

Quanto ao uso na medicina popular de *E. nummularium*, não há relatos. Entretanto, deve-se considerar a utilização de outros vegetais do gênero pela população. A espécie *E. coca*, por exemplo, tem uso na medicina tradicional (RESTREPO *et al.*, 2019). Inclusive, é reconhecido o emprego dessa planta pelo homem há quase oito mil anos (DILLEHAY *et al.*, 2010). É comum ser usada como remédio pelas comunidades tradicionais ao buscarem efeitos

gastrointestinais, cansaço físico, tonturas e cefaleia (WEIL, 1981). Outra espécie de interesse curativo é a *E.vacciniifolium*, conhecida popularmente como catuaba. Ainda de acordo com Restrepo *et al.*, 2019, esta planta é utilizada sob a forma de chás, por apresentarem propriedades tônicas e afrodisíacas. Em adição, diversas aplicações na medicina popular têm sido reconhecidas para espécies de *Erythroxylum*, como diurético, doenças venéreas, reumatismo, infecções respiratórias, amenorreia e hemorragia (OLIVEIRA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2001).

Figura 1- *Erythroxylum nummularium* Peyr



Fonte: Nilma Santos (2021)

Com respaldo nas substâncias químicas presentes em *E. nummularium*, a investigação fitoquímica das folhas indicaram a presença dos compostos como quercetina, epicatequina, β -amirina, lupeol, palmitato de eritrodíol e β -sitosterol (BARREIROS *et al.*, 2003; BARREIROS *et al.*, 2005). Esses constituintes químicos são encontrados em abundância nas angiospermas, sendo a estrutura complexa dessas substâncias responsáveis por ações biológicas importantes (YULIAN *et al.*, 2022). A estrutura heterocíclica dos flavonoides originam várias classes, como os flavonóis, onde se encontram, por exemplo, a epicatequina e a quercetina.

A epicatequina é um flavonoide natural, e sua estrutura constitui um monômero simples, substituído na posição C-3 por uma hidroxila (CROZIER *et al.*, 2009). É comum a identificação desse composto em chás e frutos, como banana, pêssego e maçãs (FARZAEI *et al.*, 2019). Sabe-se que essa substância apresenta diversas ações farmacológicas. Entre elas pode reduzir doenças cardíacas (YANG, 2009) e diminuir processos inflamatórios (AL-KHAYRI *et al.*, 2022). Estudos reconheceram ainda, a ação da epicatequina contra o vírus SARS-CoV-2 (LISKOVA *et al.*, 2021). Em virtude do seu potencial biológico, a epicatequina é eficaz principalmente como anti-inflamatório. Nesse aspecto, esse metabólito age sequestrando os radicais livres, regulando as atividades celulares ligadas à inflamação e também inibe o mecanismo do ácido araquidônico, responsável pela produção de substâncias inflamatórias (GARCÍA-LAFUENTE *et al.*, 2009).

Outro composto importante é a quercetina. A quercetina constitui um dos compostos mais encontrados nos vegetais (AGHABABAEI & HADID, 2023; ZUANAZZI e MONTANHA, 2007). São comuns em maçãs, açafrão, alface, uva, tomate, cebola, couve e vinho tinto. A abundância desse metabólito no reino vegetal engendrou diversos estudos associados ao seu potencial curativo, incluindo atividade anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, antidiabético- tipo 2, neuroproteção e doenças pulmonares obstrutivas (CHOI *et al.*, 2019). Dentre as propriedades medicinais da quercetina, há destaque para o efeito anti-inflamatório. Estudos mostraram a diminuição da inflamação em pacientes portadores de doença coronariana arterial, com melhora significativa na saúde cardíaca (CHEKALINA *et al.*, 2018). Nesse aspecto, a quercetina reduziu os níveis de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 β e interleucina 10. As citocinas são proteínas, liberadas em resposta a ação imune do organismo, necessárias para a eliminação de agentes infecciosos e também de reparo (JARCZAC & NIERHAUS, 2022).

Outro metabólito com ações biológicas reconhecidas é a β -amirina. A β -amirina é um “triterpenoide pentacíclico, com substituição na posição 3beta por um grupo hidroxila [...]”. (NATIONAL CENTER, 2024). Além disso, tal como a quercetina, β -amirina é um dos compostos mais encontrados nas angiospermas e também apresenta propriedades farmacológicas. Os efeitos comprovados incluem atividade anti-toxoplasmose, (TRUJILLO *et al.*, 2024) e anti-leishmanicida (UKIL *et al.*, 2005). Em adição, outro metabólito reconhecido na literatura pelas suas propriedades medicinais é o Lupeol.

Classificado como um triterpenoide pentacíclico natural, o Lupeol é um metabólito secundário encontrado em plantas como repolho branco, pimenta, pepino, tomate, azeitona e manga (PUB CHEM, 2004). Reconhecido por suas propriedades curativas, esse metabólito

tornou-se mundialmente conhecido, a saber: Agente anti-inflamatório, atividade contra câncer, diabetes, artrite, doenças cardíacas, renais e hepáticas (SALLEM, 2009). Dentre esses efeitos, o potencial em processos de inflamação tem sido o mais estudado. Estudos abrangentes mostraram esses efeitos inibitórios tanto em modelo *in vitro*, quanto *in vivo*. Por exemplo, Fernández *et al.*, 2001 investigou a atividade anti-inflamatória do Lupeol em aplicação tópica sobre um edema em orelha de camundongo. Este estudo mostrou que a aplicação tópica de Lupeol (0.5 ou 1 mg/ orelha) diminuiu o edema formado em 36,2% e 52%, respectivamente. Além disso, há diversos registros na literatura sobre o mecanismo de ação do Lupeol nos processos inflamatórios, e como modula as moléculas nos processos da inflamação (LIMA *et al.*, 2007; NGUEMFO *et al.*, 2009; SUDHAHAR *et al.*, 2008).

Outro composto de importância medicinal é o Palmitato de eritrodíol, um tipo de triterpenoide, com dois grupos hidroxila (SÁNCHEZ-QUESADA *et al.*, 2013). É encontrado em abundância em azeitonas e também nas espécies do gênero *Erythroxylum*, como *E.leal-costae* Plowman, *E.rimosum* O.E.Schulz e *E.passerinum* Mart (YULIAN *et al.*, 2022). Ademais, no contexto terapêutico, esse metabólito destaca-se pela quantidade de estudos sobre a sua bioatividade. Sánchez-Quesada *et al.*, 2013 revisaram as diversas ações deste composto contra diferentes doenças. Entre elas, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetiva, cardioprotetiva e antimicrobiana.

β -sitosterol é um composto de origem vegetal, e sua estrutura assemelha-se ao colesterol (BOUIC *et al.*, 1999). Tal como a β -amirina, esse metabólito está presente em abundância nas angiospermas, em especial no gênero *Erythroxylum*. β -amirina foi identificada, por exemplo, nas raízes e caule de *E. barbatum* (SANTOS *et al.*, 2006), e nas folhas das espécies *E. daphinites*, *E. rimosum*, *E. nummularia* e *E. passerinum* (YULLIAN *et al.*, 2022). Adicionalmente algumas características medicinais foram comprovadas para β -amirina. Dentre elas, antioxidante, antimicrobiana, angiogênico e antidiabético (SAYEED *et al.*, 2016).

2.5. *Artemia salina* Leach

Artemia salina Leach (figura 2) é um microcrustáceo primitivo inserido na classe dos artrópodes (Família Artemiidae, gênero *Artemia*), e é conhecido como camarão (DUMITRASCU, 2011). Estes animais se apresentam em três estágios básicos durante a vida: Cistos, náuplios e adultos. A fase de cisto inclui ovos, que podem sobreviver por um longo tempo. Os náuplios, por sua vez, compreendem o período larval, etapa posterior à fertilização dos ovos (ONO *et al.*, 2016). Portanto, dependendo das condições ambientais, incluindo a disponibilidade de alimentos, por exemplo, os náuplios se tornarão adultos dentro de três semanas (CHEMLAL *et al.*, 2017). Além disso, cada fase apresenta características

morfológicas próprias.

Figura 2- Indivíduos da *Artemia salina*



Fonte: Obtida de DUMITRASCU, 2011.

Conforme as descrições feitas por Dumitrascu, 2011, a estrutura corporal da *Artemia salina* é constituída por cabeça, tórax e abdômen. Ademais, o dimorfismo sexual configura-se em dessemelhanças físicas entre machos e fêmeas. Observam-se também algumas diferenças corpóreas entre náuplios e os organismos adultos. Os náuplios possuem apenas um órgão da visão, desenvolvendo mais um par de olhos quando adulto (NTUNGWE *et al.*, 2020). Com relação ao modo reprodutivo, a espécie alterna o ciclo de reprodução entre ovíparo e ovovivíparo. Essa forma intercalada de reprodução está submetida às condições ambientais, ou seja, em situações favoráveis a geração é ovovípara, sendo a fêmea capaz de conter até 200 ovos no próprio corpo. Entretanto, em estados desfavoráveis, a proliferação é ovípara (ONO *et al.*, 2016). Assim, quando as condições ambientais são melhores, os cistos eclodem em náuplios. Por conseguinte, as circunstâncias ecossistêmicas influenciam tanto na procriação desses organismos, quanto no seu modo de vida.

Artemia salina vive apenas em lagos e lagoas com alta salinidade, que varia entre 60 a 300 ppt, e podem ainda sobreviver também em ambientes com deficiência de oxigênio (SAHNOUNI *et al.*, 2017). Esse déficit inclui uma concentração mínima de oxigênio para um adulto cerca de 0,5 mg/L, e para náuplios 0,3 mg/L. Para complementar, estes animais no estágio de cisto, conseguem sobreviver a vários períodos de seca, aguardando as condições do ambiente tornarem-se aptas ao desenvolvimento e reprodução. Mas, alguns fatores podem ser letais, sobretudo na fase de cisto, e isso inclui temperaturas inferiores a 0°C e superiores a 40°C. Mesmo assim, a *Artemia salina* é uma espécie capaz de resistir quando em contato com agentes

agressivos e seca extrema. Portanto, esses Crustáceos caracterizam-se como organismos sensíveis a quaisquer alterações no seu habitat (DUMITRASCU, 2011).

Com ênfase na elevada adaptabilidade da *Artemia salina*, esses organismos são adequados para as pesquisas sobre toxicidade. Aspectos como confiabilidade, ampla distribuição geográfica, manutenção simples em laboratório, ciclo de vida curto e número abundante de descendentes também revelam a sua adoção nos experimentos (NUNES *et al.*, 2006). Entretanto, alguns estudos não relatam uma boa correlação entre os ensaios de toxicidade com Artemias e linhagens celulares (NTUNGWE *et al.*, 2020; NUNES *et al.*, 2006). Esses autores explicam que os invertebrados por apresentarem um sistema orgânico primitivo limita o uso em estudos sobre citotoxicidade em células de mamíferos. Mesmo assim, a *Artemia salina* é uma espécie necessária para fechar a lacuna entre os ensaios tradicionais *in vitro* e pré-clínicos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar o teor de fenólicos, alcaloides e flavonoides totais, as atividades antioxidante, antimicrobiana, antinociceptiva e letalidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos metanólicos e fases orgânicas de *E. nummularium*.

3.2 Objetivos específicos

- Obter os extratos metanólicos e frações orgânicas a partir das folhas, galhos, casca do caule e caule de *E. nummularium*.
- Determinar a presença de metabólitos secundários por Cromatografia em camada delgada (CCD).
- Quantificar o teor de fenólicos (TPC), flavonoides totais (TFC) e alcaloides.
- Correlacionar os teores de TPC e TFC e as atividades antioxidantes.
- Identificar os compostos das frações hexânicas e diclorometano por Cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG-EM).
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos metanólicos e orgânicos através do sequestro de radicais livres DPPH, sistema β -caroteno/ácido linolênico e capacidade antioxidante total.
- Testar a atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos e orgânicos contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*.
- Verificar a toxicidade dos extratos metanólicos e fases orgânicas através do número de náuplios sobreviventes de *Artemia salina*.
- Avaliar o potencial antinociceptivo da fração acetato de etila das folhas (ELEN) em camundongos Balb C machos.

4. Materiais e métodos

4.1. Obtenção dos extratos metanólicos por maceração a partir das folhas, galhos, casca do caule e caule de *E.nummularium*.

4.1.1. Material vegetal

A espécie botânica foi coletada na área rural de Brejo Novo (13°55'28.50" S 40°6'33 40") em Jequié-Bahia. A coleta ocorreu sob a coordenação da curadora do Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-HUESB. Para realizar a colheita, a espécie vegetal foi cadastrada no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado), sob o código de registro A8C8EDD. Após coleta, o espécime foi encaminhado ao Herbário Prisco Bezerra (Fortaleza- Ceará) para confirmar a identificação taxonômica. A espécie *Erythroxylum nummularium* foi comprovada pela botânica Guadalupe Macedo. Após identificação, uma exsicata foi depositada no HUESB sob o número 14665.

4.1.2. Produção dos extratos metanólicos de *E.nummularium*

O material vegetal, depois de seco à temperatura ambiente, foi submetido à moagem até a pulverização. Desse material triturado (815,8 g de folhas, 2,0 kg de galhos, 1,0 kg da casca do caule e 920,0 g do caule) foram macerados em MeOH separadamente, por 10 extrações consecutivas, por cerca de 48 h cada. O filtrado obtido foi reunido e concentrado sob pressão reduzida, gerando os extratos metanólicos das folhas (119,224 g), galhos (132,029 g), casca do caule (212,408 g) e caule (70,812 g) (Figura 2).

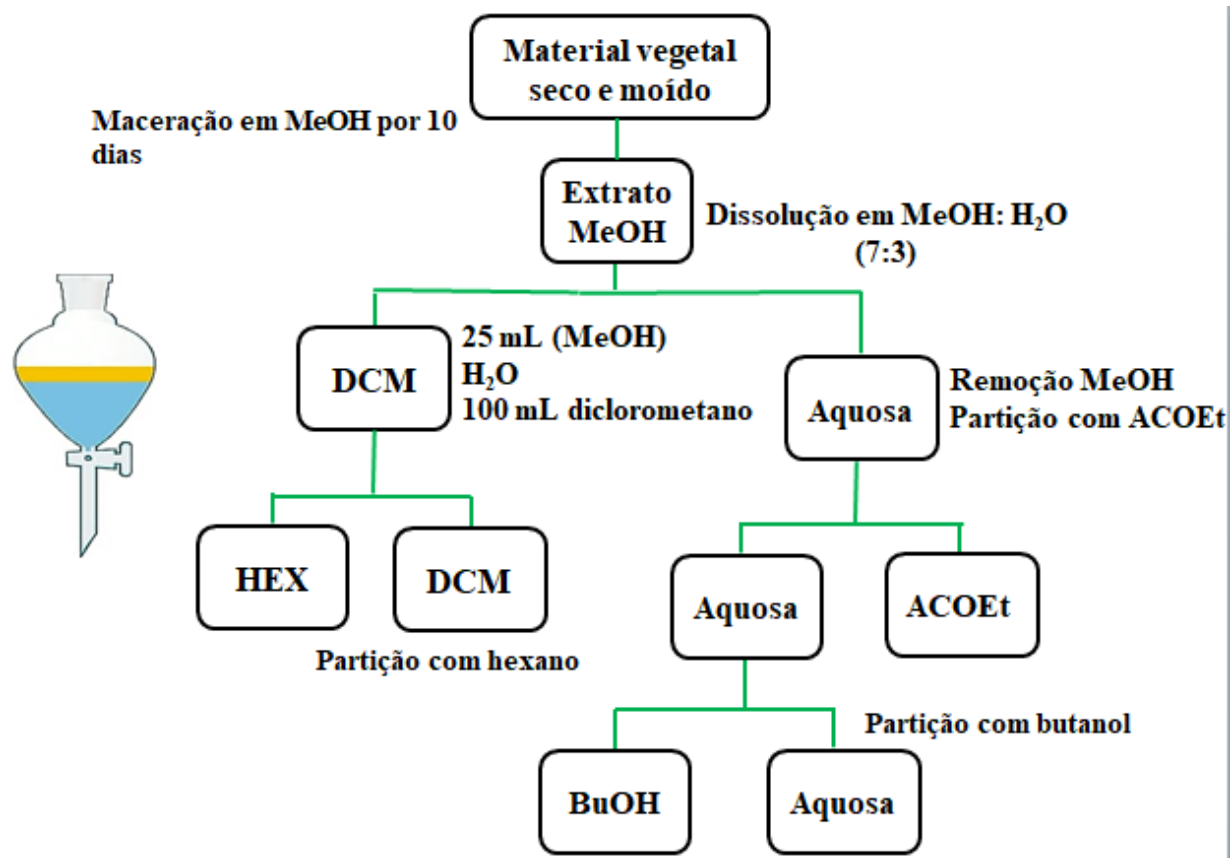
Figura 3- Coleta e secagem de *E.nummularium* (A); Órgãos vegetais pulverizados (B); Maceração em MeOH (C); Filtração (D); Filtrado concentrado sob pressão reduzida (E); Extratos metanólicos vegetais (F)



Fonte: Adaptada de (Biorender; Obrian Victor, 2024).

Os extratos metanólicos foram dissolvidos em MeOH/H₂O (7/3) e particionado entre hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol (Figura 3). Dando origem às frações orgânicas: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol de cada órgão (Tabela 1).

Figura 4- Fracionamento para obtenção das frações orgânicas das folhas, galhos, casca do caule e caule de *E.nummularium*. ACOEt: Fração acetato de etila; BuOH: Fração butanólica; DCM: Fração diclorometânica; HEX: Fração hexânica



Fonte: Nilma Santos (2024)

Tabela 1- Massas das fases orgânicas obtidas pela partição do extrato MeOH bruto das folhas, galhos, casca do caule e caule de *E.nummularium*.

Órgãos vegetais	Hexano (g)	Diclorometano (g)	Acetato de etila (g)	Butanol (g)
Folhas	HLEN 0,893 g	DLEN 1,453 g	ELEN 15,241 g	BLEN 17,494 g
Galhos	HBEN 2,783 g	DBEN 2,556 g	EBEN 27,968 g	BBEN 2,316 g
Casca do caule	HSBEN 2,013 g	DSBEN 0,968 g	ESBEN 51,205 g	BSBEN 26,942 g
Caule	*	DSEN 1,102 g	ESEN 9,543 g	BSEN 52,000 g

* Fração não obtida

4.2. Estudo fitoquímico dos extratos metanólicos e fases orgânicas

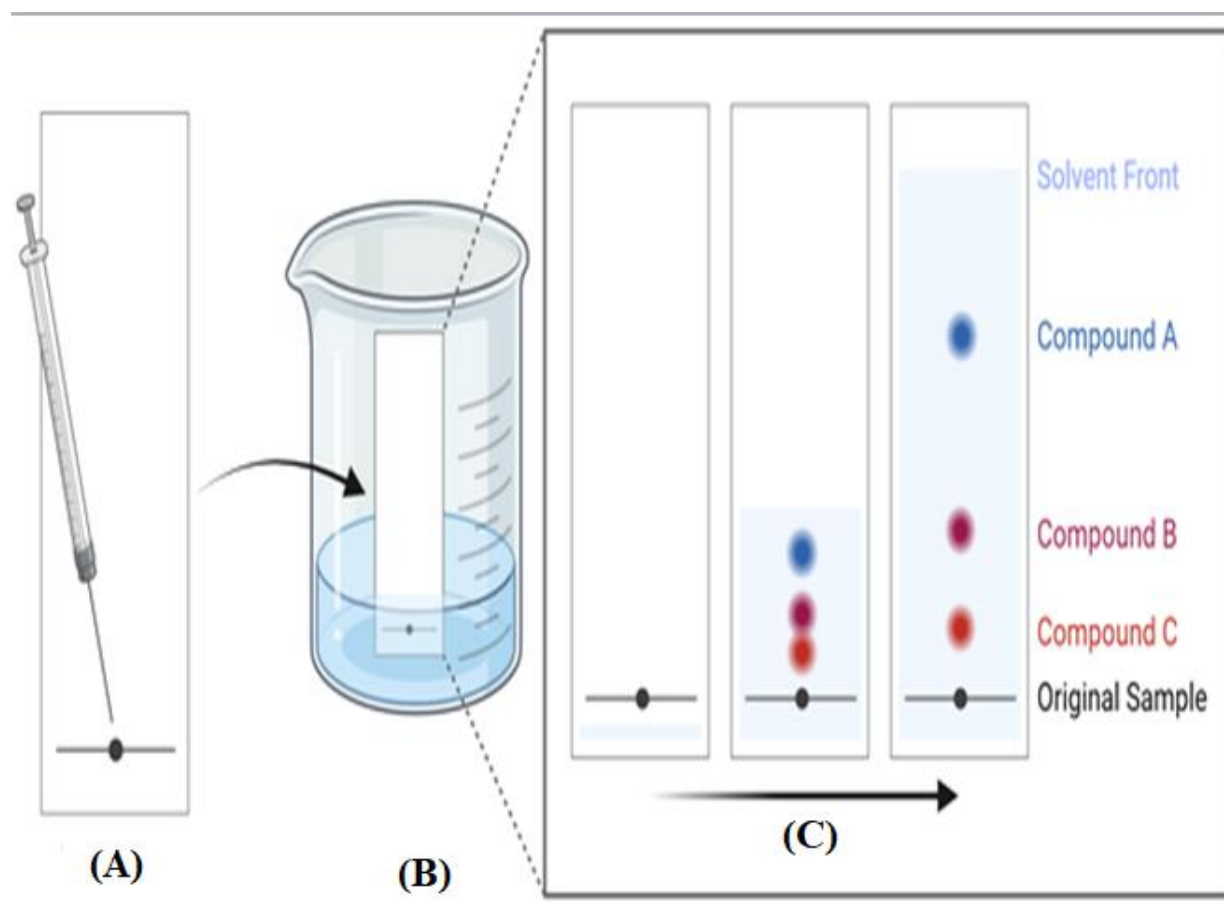
4.2.1. Triagem qualitativa

Os testes de prospecção fitoquímica das fases orgânicas obtidas a partir do extrato MeOH das folhas, galhos, casca do caule e caule de *E. nummularium* foram realizados de acordo com as metodologias descritas a seguir (4.2.2 – 4.2.6). Esses testes foram baseados na visualização colorimétrica e/ou formação de precipitados após adição de reagentes específicos para identificar as seguintes classes de metabólitos secundários: alcaloides, flavonoides, fenólicos, esteroides, saponinas e taninos. Os resultados qualitativos foram expressos como presença/reação positiva (+) e ausência/reação negativa (-) das classes de fitoquímicos.

4.2.2. Determinação da presença de alcaloides por Cromatografia em camada delgada (CCD)

As fases orgânicas foram dissolvidas em diclorometano separadamente, aplicadas na placa de sílica gel e eluídos com uma mistura apropriada de solventes (Figura 5).

Figura 5- Representação da cromatografia em camada delgada. Aplicação da amostra na placa (A); Amostra em contato com a fase móvel (B); Separação de compostos pela sua polaridade (C)



Fonte: Adaptada de (Biorender; Darcy Knaack, 2013)

Após a eluição da placa cromatográfica, para a observação dos alcaloides, foi borrifado o reagente de Wagner (1 g de iodo e 10 g de iodeto de potássio em 100 mL de água destilada)

sobre a placa de sílica gel. O aparecimento de manchas de coloração castanho-avermelhadas na placa indicou a presença de alcaloides (Farooq *et al.*, 2022; Hussien e Endalew, 2023).

4.2.3. Determinação de alcaloides pelo método de precipitação

Cerca de 100 mg de cada fase orgânica foram dissolvidos em 5mL de álcool etílico, seguida da adição de 2 mL do reagente de Wagner. A formação de um precipitado de cor marrom-avermelhado foi indicativa da presença de alcaloides (Uddinet *et al.*, 2021).

4.2.4. Teste para flavonoides e fenólicos

Para a detecção de flavonoides e substâncias fenólicas, foi utilizado cloreto de alumínio (1% em etanol). Após a eluição da placa cromatográfica com as fases orgânicas, o reagente foi aplicado sobre a CCD. Em seguida, a placa foi observada em uma câmara escura sob luz ultravioleta. A formação de manchas fluorescentes de cor verde indicou a presença de flavonoides, enquanto a coloração azul fluorescente revelou a existência de substâncias fenólicas (Ahmad *et al.*, 2023).

4.2.5. Teste para esteroides e triterpenos

Após a eluição da placa cromatográfica com as fases orgânicas a detecção de esteroides e triterpenos foi realizada pulverizando o reagente de Lieberman-Burchard (5 mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico dissolvidos em 50 mL de etanol) sobre a placa de CCD. Após a aplicação do reagente, a placa foi aquecida em uma chapa aquecedora. O aparecimento de manchas roxas indicou a presença de esteroides (Almeida *et al.*, 2019).

4.2.6. Teste para saponinas

O método colorimétrico com ácido sulfúrico foi empregado para a detecção de saponinas, conforme descrito por Prabhavati *et al.*, (2016). Nesse método, uma alíquota de 5 mL de H₂SO₄ foi adicionada à 50 mL de etanol e o volume final foi ajustado para 100 mL. Após a eluição da placa cromatográfica com as fases orgânicas a detecção de saponinas foi realizada borrifando o reagente sobre a placa de CCD. A presença de saponinas foi indicada pela formação de uma coloração roxa berinjala após aquecimento.

4.2.6. Teste para taninos e fenólicos

O reagente utilizado foi uma solução metanólica de FeCl₃ a 2% (Prabhavati *et al.*, 2016). A formação das manchas azuis ou verdes na placa de CCD indicou a presença de taninos e fenólicos.

4.3. Determinação do teor de alcaloides totais (TAT)

Para quantificar o TAT nas fases orgânicas, 10 mg das amostras foram pesadas e diluídas em 1 mL de HCl 2 mol L⁻¹, seguido de filtração conforme descrito por Shamsa *et al.*,

(2008). O filtrado foi transferido para um funil de separação e lavado com 10 mL de clorofórmio (3 vezes). O pH da fase aquosa foi ajustado para neutro com NaOH 0,1 mol L⁻¹. Em seguida, 5 mL de solução tampão fosfato (pH 4,7) e 5 mL de solução verde de bromocresol (VBC - 0,025 mol L⁻¹) foram adicionadas. A mistura foi agitada e o complexo formado foi extraído com 2,5 mL de clorofórmio sob agitação vigorosa. A fase clorofórmica foi coletada em um balão volumétrico de 10 mL e completada com clorofórmio até o volume final. A absorbância desse complexo foi medida a 470 nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Uma curva de calibração foi construída usando uma solução de sulfato de atropina a 0,25 mg mL⁻¹. Cada concentração utilizada na construção da curva foi tratada conforme descrito para as amostras. Os resultados foram expressos como mg de equivalente de atropina por grama do extrato (mg EA g⁻¹). Este ensaio foi realizado apenas nas fases orgânicas que apresentaram resultado positivo no teste qualitativo para alcaloides.

4.4. Determinação do teor de flavonoides totais (TFT)

O TFT foi quantificado por um ensaio colorimétrico usando o método do cloreto de alumínio (Ghasemzadeh *et al.*, 2015), com adaptações. Inicialmente, 4 mg de cada extrato ou das fases orgânicas foram diluídos em metanol, para fornecer soluções de concentração entre 0,4 e 0,6 mg mL⁻¹. Em seguida, 1 mL das amostras foram transferidas, separadamente, para tubos Falcon contendo 4 mL de água destilada, seguidos de adição de 300 µl de NaNO₂. As amostras foram agitadas em vórtex por 30 segundos. Posteriormente, foram adicionados 300 µl de AlCl₃, com nova agitação vigorosa por mais 30 segundos. Após esse tempo, 2 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ foram adicionados, e as amostras foram deixadas em repouso por 15 minutos antes da leitura. As absorbâncias das amostras foram medidas a 510 nm. Uma curva de calibração foi preparada utilizando quercetina nas concentrações de 150, 300, 450, 600 e 750 µg mL⁻¹, seguindo a mesma metodologia empregada para as amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O TFT foi calculado a partir da curva de calibração utilizando a quercetina como padrão. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de quercetina por grama de extrato (mg EQ·g⁻¹).

4.5. Determinação do teor de fenólicos totais (TPT)

O TPC nos extratos MeOH e nas fases orgânicas foi quantificado pelo método do Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Moreira *et al.*, (2020) com adaptações. Para isso, uma alíquota dos extratos/fases foi dissolvida em etanol 80% e transferida para um balão volumétrico de 10 mL para fornecer soluções de concentração entre 150 e 250 µg mL⁻¹. O meio reacional foi preparado utilizando-se 0,1 mL da solução dos extratos/fases, 0,5 mL do reagente

de Folin- Ciocalteou (10%) e 2,0 mL de carbonato de sódio (15%). Posteriormente, essa mistura foi completada até o volume final de 10 mL com água destilada. Após uma hora de reação, protegidas da luz, as absorvâncias das amostras foram medidas a 760 nm, tendo como branco o etanol e todos os reagentes, exceto o extrato/fase. Uma curva de calibração foi preparada utilizando ácido gálico nas concentrações de 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, seguindo a mesma metodologia das amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A concentração de TPC foi calculada a partir de uma curva de calibração usando ácido gálico puro como padrão. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato ($\text{mg EGA}\cdot\text{g}^{-1}$).

4.6. Atividade antioxidante

4.6.1. Teste do radical livre DPPH

Os extratos brutos e as fases orgânicas de *Erythroxyllum nummularium* foram submetidos ao teste do sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Moreira *et al.*, 2019; Oriakhiet *et al.*, 2014), com adaptações. Os extratos metanólicos foram preparados nas concentrações de 50, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto a solução de DPPH foi preparada na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para cada concentração dos extratos, foi preparado um meio reacional, em triplicata, contendo 200 μL de extrato bruto ou das fases orgânicas, ou metanol para o controle, mais 1800 μL da solução de DPPH. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente, protegidas da luz, por 30 minutos. Em seguida, as absorvâncias foram medidas a 515 nm em um espectrofotômetro. A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo método do DPPH, seguindo a classificação de Brand-Williams *et al.* (1994), que considera o CE_{50} em três categorias: boa atividade quando o valor do CE_{50} do extrato for até três vezes maior que o padrão utilizado, média atividade se estiver entre três e sete vezes acima do CE_{50} do padrão, e baixa atividade caso o CE_{50} seja sete vezes maior que o padrão utilizado.

4.6.2. Sistema β -caroteno/ácido linolênico

O ensaio da atividade antioxidante usando o sistema β -caroteno/ácido linolênico foi realizado de acordo com o método descrito por Moreira *et al.*, (2019), com adaptações. Inicialmente, 2,6 mg de β -caroteno foram dissolvidos em 2 mL de clorofórmio. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico contendo 403 mg do emulsificador Tween 80 e 42,8 mg de ácido linolênico. O clorofórmio foi removido por evaporação rotativa, e em seguida foram adicionados 200 mL de água destilada, com agitação vigorosa por 2 minutos para formar uma emulsão, que constitui o meio oxidante. Uma alíquota de 2,7 mL do meio oxidante foi adicionada a uma cubeta contendo 300 μL das amostras, em triplicata. Os extratos e as fases foram preparados nas concentrações de 50, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando metanol

como solvente. As absorvâncias foram medidas a 470 nm imediatamente após a mistura e, posteriormente, as amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C durante 1 hora para a segunda leitura. O controle foi preparado com 2,7 mL do meio oxidante e 300 µL de metanol. Para a curva de calibração, foi utilizado ácido ascórbico nas mesmas concentrações dos extratos. A atividade antioxidante (AA) foi calculada usando a seguinte equação:

$$AA = (DR_C - DR_A)/DR_C \times 100.$$

Onde, DRC é a taxa de degradação do controle ($DRC = \ln(a/b)/60$), e DRA é a taxa de degradação na presença da amostra ($DRA = \ln(a/b)/60$). Na equação, "a" representa a absorvância inicial no tempo 0, e "b" a absorvância após 60 minutos. A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para reduzir a porcentagem de inibição de oxidação em 50% (CE_{50}), foi calculada por regressão linear, onde o eixo das abcissas representava a concentração das amostras ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ou as concentrações do controle positivo (ácido ascórbico) e o eixo das ordenadas representava a AA.

4.6.3. Capacidade antioxidante total (CAT)

A análise da CAT foi realizada pelo método do ácido fosfomolibdato (Jan, *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2013), com modificações. Os extratos, as fases orgânicas, e os padrões de quercetina e ácido gálico foram preparados nas concentrações de 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL, utilizando metanol como solvente. Para cada concentração preparada, transferiu-se uma alíquota de 0,25 mL para um tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 2,5 mL da solução reagente. A solução reagente era composta por ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônia 4 mM. Os tubos de ensaio foram então tampados e incubados em banho-maria a 90°C por 90 minutos. Após a incubação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente. A absorvância das amostras foi medida a 765 nm utilizando um espectrofotômetro. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Inicialmente, foi calculado o percentual de CAT das amostras, comparando-as ao ácido ascórbico na concentração de 200 µg mL⁻¹, que foi considerado como 100 % (controle). A seguinte equação foi utilizada para calcular a porcentagem de CAT:

$$\% \text{ CAT} = [(Abs_{\text{Amostra}} - Abs_{\text{Branco}}) / (Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{Branco}})] \times 100.$$

Onde: Abs_{Amostra} é a absorvância da amostra, Abs_{Branco} é a absorvância do branco, Abs_{controle} é a absorvância do ácido ascórbico 200 µg mL⁻¹ (controle).

Os resultados da avaliação da CAT foram expressos como concentração eficiente (CE_{50}), que é a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a porcentagem de inibição

de oxidação em 50%. A CE_{50} foi calculada por regressão linear, onde o eixo das abcissas representava a concentração das amostras ($\mu\text{g/mL}$) ou as concentrações dos padrões (quercetina e ácido gálico), e o eixo das ordenadas representava a % CAT.

4.6.4. Mapa de calor: Correlação do teor de fenólicos e flavonóides totais com ensaios antioxidantes

O mapa de calor foi gerado usando o software GraphPad 8.0.1 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, EUA). As correlações entre os teores de TPC e TFC e as atividades antioxidantes (DPPH, β -caroteno e CAT) foram avaliadas por meio do coeficiente de Pearson (r). Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4.7. Análise da composição química por CG-EM

As fases hexânica e diclorometânicas das folhas, galhos, casca do caule e caule de *E. nummularium* foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Antes de serem analisadas por CG-EM, as amostras foram submetidas à derivatização por sililação (Aragon *et al.*, 2017) com algumas adaptações. Para a derivatização, 3 mg de cada fase orgânica foi pesada e acrescentou-se 60 μL de piridina. A esta solução, foi adicionado 100 μL de uma mistura reacional de N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1 % de trimetilclorosilano (TMCS). Essa mistura foi aquecida a 70° C por 30 minutos, permitindo a derivatização completa das substâncias presentes. Em seguida, 1 μL da mistura derivatizada foi injetado no sistema CG-EM. As análises por CG-EM foram realizadas utilizando coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25 μm) com hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi mantida a 290 °C. A programação de temperatura do forno iniciou-se a 80 °C por 5 min, seguida de um aumento para 285°C a uma taxa de 4°C/min, permanecendo em 285°C por 40 minutos. A temperatura do detector foi ajustada para 200°C e a temperatura na interface do sistema CG-EM foi mantida a 290°C. A varredura de massas foi realizada no intervalo de 35 a 600 m/z , com a fonte de íons operando a 70 eV. A identificação dos compostos presentes nos extratos foi realizada por comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles disponíveis nos bancos de dados do equipamento NIST 08, FFNSC1.3 e WILEY8.

4.8. Ensaio biológicos

4.8.1. Atividade antimicrobiana

4.8.1.1. Micro-organismos e cultivo

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram a cepa padrão resistente a oxacilina *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 INCQS 00306 e isolados clínicos de *S. aureus* 16A, 112, 92 e 29, coletados de dois hospitais públicos da cidade de Vitória da Conquista-Bahia (Campos *et al.*, 2012). As cepas foram descongeladas (-80°C), incubadas durante 24 horas, a 37°C em caldo BHI. As cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 700610 e *Streptococcus sobrinus* foram provenientes do Departamento de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia, UNICAMP (Universidade de Campinas, Piracicaba, São Paulo). As cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) - Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Essas cepas foram descongeladas (-80°C), incubadas durante 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂ em caldo BHI com 1% glicose. Depois que as bactérias foram desenvolvidas, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM).

4.8.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços. Os inóculos das cepas estudadas foram preparados com uma concentração bacteriana final em torno de $1-2 \times 10^8$ CFU/mL (escala de 0,5 McFarland). Esses inóculos foram diluídos em meio caldo de infusão de coração- cérebro (BHI) (Kasvi[®]) na proporção de 1:1000. Nas microplacas, foram adicionados 190 µL do meio contendo o inóculo (concentração final $1-2 \times 10^5$ CFU/mL) em cada poço, juntamente com 10 µL das fases orgânicas de todos os órgãos vegetais estudados de *E. nummularium*. As concentrações finais das fases orgânicas variaram de 1000 a 31,25 µg/mL, obtidas por diluição seriada em razão de 2. As placas foram incubadas durante 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂ (Rodrigues *et al.*, 2020). Após a incubação, foi realizada a leitura visual para avaliação do crescimento, por meio da observação de turvação do meio e/ou presença de colônias no fundo dos poços. Nos poços onde não houve crescimento visual foram adicionados 20 µL do corante resazurina (Sigma[®]). Após 20 minutos de incubação com resazurina, a ausência de micro-organismos foi indicada pela cor azul, enquanto a cor rosa revelou crescimento bacteriano (Palomino *et al.*, 2002). A CIM foi definida como a menor concentração que não apresentou crescimento bacteriano visível, confirmado pela coloração azul após a adição de resazurina.

4.8.4. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

A determinação da CBM foi realizada a partir dos poços que não apresentaram crescimento bacteriano visível no ensaio de CIM para as cepas avaliadas. Uma alíquota de 8 μL de cada poço foi inoculada em placas com BHI ágar. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a leitura visual das placas. A CBM foi definida como a menor concentração dos extratos que causou a morte de 99,9% das células bacterianas, sendo identificada pela ausência de crescimento bacteriano visível na superfície do ágar (Yatsuda *et al.*, 2005).

4.9.1. Teste de letalidade de *Artemia salina* Leach

Um ensaio de letalidade de *A. salina* foi realizado para verificar a toxicidade de extratos metanólicos e frações orgânicas de *E. nummularium*. O teste foi conduzido conforme metodologia descrita por Malfa *et al.*, 2023, com algumas adaptações. Os ovos de *A. salina* foram incubados em água do mar artificial (3,2 g/L) sob iluminação contínua de uma lâmpada incandescente, mantendo a temperatura entre 24-26°C. Após 24 horas, os cistos eclodiram, liberando náuplios. Para o ensaio, dez larvas de *A. salina* recém-eclodidas foram transferidas para tubos contendo água do mar artificial e DMSO (1%), aos quais foram adicionadas diferentes concentrações do extrato, variando de 12,5 a 200 $\mu\text{g/mL}$. Cada concentração foi avaliada em triplicata. Após 24 horas de exposição, foi realizada a contagem dos náuplios sobreviventes. Os resultados obtidos foram processados para calcular a DL_{50} (dose letal para 50% da população testada) com um intervalo de confiança de 95%. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A toxicidade das amostras foi classificada como: $\text{DL}_{50} > 1000$ $\mu\text{g/mL}$ é atóxico, DL_{50} entre 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ é fracamente tóxico, DL_{50} entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ é moderadamente tóxico, $\text{DL}_{50} < 100$ $\mu\text{g/mL}$ é fortemente tóxico (David *et al.*, 2001; Hamimed *et al.*, 2018).

4.9.2. Atividade antinociceptiva

4.9.2.1. Animais

Camundongos *Balb-C* machos, pesando entre 25 e 30 g, foram mantidos no biotério da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Os animais foram alojados em caixas de polipropileno e mantidos sob condições controladas de luz (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura média de $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Eles tiveram acesso a água e ração. No dia do experimento, os camundongos foram transferidos para o laboratório 30 minutos antes do início dos testes para adaptação ao novo ambiente. Este experimento foi avaliado e aprovado pelo Comitê de ética em uso de animais (CEUA-IMS/CAT-UFBA) sob o número de protocolo 107/2022.

4.9.2.2. Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

A fase orgânica ELEN foi avaliada no teste das contorções. Os camundongos foram distribuídos em cinco grupos de seis animais cada. Os grupos em tratamento receberam doses orais de 6,25, 12,5, 25 e 50 mg/kg de ELEN. O grupo controle recebeu apenas água. Sessenta minutos após a administração das doses, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%). O número de contorções abdominais, seguidas de torções do tronco e extensão dos membros posteriores, foi registrado durante um período de 20 minutos (Moreira *et al.*, 2019).

4.9.3. Estudos de toxicidade aguda da fração ELEN

Para avaliar a toxicidade aguda da fração ELEN, o método DL₅₀ foi empregado após administração oral de 2000 mg/kg. Seis animais foram utilizados no experimento: três foram tratados com a fração ELEN e três serviram como grupo controle. Os animais foram observados por 24 horas imediatamente após o tratamento, seguido de monitoramento diário por 15 dias para avaliar seu comportamento e condição física. As observações se concentraram na detecção de sintomas como agressão, tremores, paralisia e lesões cutâneas. No dia 15, eles foram eutanasiados após a anestesia. Amostras de sangue foram coletadas para análise hematológica. Os parâmetros avaliados incluíram contagem total de leucócitos, contagem absoluta e relativa de linfócitos, contagem absoluta e relativa de eosinófilos, basófilos, neutrófilos absolutos, concentração de hemoglobina, níveis de hematócrito, contagem total de hemácias, largura de distribuição plaquetária, largura de distribuição de hemácias. Este estudo seguiu a metodologia descrita por Simeonova *et al.*, 2021, com adaptações.

5. Análise estatística

Nos testes realizados com camundongos, os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (D.P.) (n = 6 por grupo). As comparações estatísticas entre grupos foram realizadas inicialmente utilizando análise de variância one-way (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas, empregando o software GraphPad Prism (PRISM 5.0; GraphPAD Software Inc., La Jolla, CA, USA). As diferenças estatísticas foram consideradas significativas se $p < 0,05$. Para os ensaios de TAT, TFT, TPC e atividades antioxidantes, os resultados foram expressos como a média de três repetições (n = 3) \pm D.P. As análises estatísticas desses dados também seguiram a análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, utilizando o software Statistica 13 (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, EUA). Consideraram-se estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$. Nos testes de toxicidade com *A. salina*, os valores de DL50 com

intervalo de confiança de 95% foram calculados utilizando o método probit de análise por meio do software Microcal Origin 5.0 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, EUA).

REFERÊNCIAS

AGHABABAEI, f.; HADID, M. Recent advances in potential health benefits of quercetin. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 1020, p.1-31, 2023.

AHMAD, I *et al.* Neuroprotection against aluminum chloride- induced hippocampus damage in albino wistar rats by *Leucophyllum frutescens* (Berl.) I.M John st. Leaf extracts: A detailed insight into phytochemical analysis and antioxidant and enzyme inhibition assays. **Frontier in Bioscience Landmark**, v.28, p. 1-14, 2023.

ALI, H.; QAISER, M. The Ethnobotany of Chitral Valley, Pakistan with particular reference to medicinal plants. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, p.1-34, 2009.

ALBURQUEQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Uso de recursos vegetais da caatinga: O caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Revista de ciência e tecnologia da América**, Caracas, v.27, n.7, p.336-346, 2002.

ALBUQUERQUE, U.P. Implications of Ethnobotanical studies on Bioprospecting strategies of new drugs in Semi-arid regions. **Medicine Journal**, v. 2, p. 20-23, 2010.

AL-KHAYRI *et al.* Flavonoids as Potential Anti-inflammatory molecules: A review. **Molecules**, v.27, p.2-24, 2022.

ALHO, CJR.; SABINO, J. A conservation agenda for the Pantanal's biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, 71, p.1-9, 2011.

ALMEIDA, K.P.C *et al.* Prospecção fitoquímica do extrato vegetal de *Piper mollicomum* Kunth (Piperaceae) e seu potencial antimicrobiano. **Revista Gestão e Sustentabilidade ambiental**, v. 8, p.550-565, 2019.

ALMEIDA, M.Z. Plantas medicinais: abordagem histórico-contemporânea. In: ALMEIDA, M.Z. **Plantas medicinais**. 3. ed. Salvador: EDUFBA, 2011. p. 51-53.

ARAGON, A *et al.* Determination of monoamine neurotransmitters in Zebrafish (*Danio rerio*) by gas chromatography coupled to mass spectrometry with a two-step derivatization. **Analytical and Bioanalytical chemistry**, v. 409, p.2931-2939. 2017.

ATTA-UR-RAHMAN *et al.* Acetyl and butyryl cholinesterase-inhibiting triterpenoid alkaloids from *Buxus papillosa*. **Phytochemistry**. v. 58, n. 6, p. 963-968, 2001.

BACCHI, E.M. Alcalóides tropânicos. In: SIMÕES *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Rio Grande do Sul/Santa Catarina: UFRG/UFSC, 2007. p. 793- 814.

BARREIROS, A.L.B.S *et al.* Atividade antioxidante de substâncias presentes em *Diocleaviolaceae Erythroxylum nummularia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.2, p.8-11, 2003.

BARREIROS, M.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; DAVI, J.P. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia*. **Biochemical systematics and ecology**, v.33, n.5, p.1-4, 2005.

BEGON, M.; HARPER, J.L.; TOWNSEND, C.R. **Ecologia de Indivíduos e populações**. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2008.

BOUIC, P.J.D *et al.* The effects of B-sitosterol (BSS) and B-sitosterol glucoside (BSSG) Mixture on selected immune parameters of Marathon runners: Inhibition of post Marathon

immune suppression and inflammation. **Immunology**, v.20, p.258-262. 1999.

CAMPOS, G.B *et al.* Isolation, molecular characteristics and desinfection of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* from ICU units in Brazil. **New Microbiologica**, v. 35, p.1-8. 2012.

CHEKALINA, N *et al.* Quercetin reduces the transcriptional activity of NF-KB in stable coronary artery disease. **Indian Heart Journal**, v.70, p.593-597, 2018.

CHEMLAL, D *et al.* Determination of biological characteristics of *Artemia salina* (Crustacea: Anostraca) population from saline Bethioua (Oran, Algeria). **International Journal of Biosciences**, v.10, n.1, p.1-10, 2017.

CHINA. [Nomenclatura botânica (2018)]. **Código Internacional de Nomenclatura para Algas, fungos e plantas (Código de Shenzhen)**. Shenzhen: Congresso Internacional de Botânica, 2018.

CHOI, K.W *et al.* Flavonoids as natural anti-inflammatory agents targeting nuclear factor-kappa B (NFκB) signaling in Cardiovascular diseases: A mini review. **Frontier in Pharmacology**, v.10, n. 1295, p.1-8, 2019.

CONSERVA, Lúcia M *et al.* *Erythroxylum nummularium* Peyr. In: GIULIETE, Ana Maria; QUEIROZ, Luciano Paganucci. **Plantas da Caatinga: Perfil botânico, fitoquímica e atividades biológicas**. Volume IV. 2006.p. 497.

CROZIER, A.; JAGANATH, B.; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural products reports**, v.26, n. 8, p.1001-1043, 2009.

DAVID, J. P *et al.* Lignan e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriopeblanchetii* (Benth). **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 730-733, 2001.

DILLEHAY, T.D *et al.* Early Holocene coca chewing in northern Peru. **Antiquity**, v.84, n326, p. 939-953, 2010.

DUMITRASCU, Mioara. *Artemia salina*. **Balneo- Research Journal**, v.2, n.4, p. 119-122, 2011.

DUTRA *et al.* Flor. In: DUTRA *et al.* **Botânica 2: Biologia das plantas vasculares**. Vitória, 2015, p.72. ISBN 978-8563765338

FAROOQ *et al.* Preliminary phytochemical analysis: In vitro comparative evaluation on anti-arthritic and anti-inflammatory potential of some traditionally used medicinal plants. **Dose-response**, v.20, n. 1, p.1-8, 2022.

FARZAEI *et al.* Targeting inflammation by Flavonoids: Novel therapeutic strategy for metabolic disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n.4957, p. 1-39, 2019.

FERNANDES, Tania Maria. Boticas, indústrias farmacêuticas e grupos de pesquisa em Plantas medicinais: origens no Brasil. In: FERNANDES, Tania Maria. **Plantas medicinais: Memória da ciência no Brasil**. 1.ed. Rio de Janeiro: Manguinhos, 2004. p. 27-76.

FERNÁNDEZ, M.A *et al.* New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene Lupeol. **Journal of Pharmacy and pharmacology**, v.53, p. 1533-1539. 2001.

FERREIRA *et al.* Introdução e breve histórico. *In:* CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Plantas medicinais e fitoterápicos**. 4. ed. São Paulo: CRF SP, 2019. p. 9-12.

FLORA DO BRASIL. **Reflora**. Lista de Espécies da Flora do Brasil. 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB17426>. Acesso em: 03 de junho de 2021.

FOLK, R.A.; SINISCALCHI, C.M.; SOLTIS, D.E. Angiosperm sat the edge: Extremity, diversity and phylogeny. **Plant, cell & environment**, v. 43. p. 2871-2893.

FONTES, R.V.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste**. Brasília, DF: Ministério do Meio ambiente (Série Biodiversidade), 2016. E-book.

FUNDAÇÃO SOS PRO-MATA ATLÂNTICA. **SOS Mata Atlântica**. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/>. Acesso em: 07 de Março de 2024.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M.A.; MARTÍNEZ, J.A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: Implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation research**, v. 58, n.9, p.537-552. 2009.

GHASEMZADEH, A., JAAFAR, H.Z.E., RAHMAT, A., ASHKANI, S. Secondary metabolites constituents and antioxidant, anticancer and antibacterial activities of *Etlingera elatior* (Jack) R.M.Sm Grown in different locations of Malaysia. **BMC Complementary medicine and therapies**, v. 15, p. 1-10. 2015

GUSMÃO, L.F.P.; QUEIROZ, L.P.; QUIJANO, F.R.B.; JUNCÁ, F.A.; OLIVEIRA, R.P.; BASEIA, I.G. Caatinga: Diversidade na adversidade do Semiárido brasileiro. *In:* Peixoto, A.L.; LUZ, J.R.P.; BRITO, M.A. **Conhecendo a Biodiversidade**. Brasília, 2016. p. 102. Disponível em: https://ppbio.inpa.gov.br/sites/default/files/conhecendo_a_biodiversidade_livro.pdf. Acesso em: 09 de março de 2024.

HAMIMED, S., BOULEBDA, N., LAOUER, H., BELKHIRI, A. Bioactivity-guided isolation of alkaloids from a cytotoxic fraction of the ethyl acetate extract of *Anacyclus pyrethrum* (L.) DC. roots. **Scienco Current Issues in Pharmacy and medical sciences**, v.31, p.180-185. 2018.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, p.2832-2846, 2007.

HIDALGO, M. E *et al.* Antioxidant activity of depsides and depsidones. **Phytochemistry**, v. 37, n.6, p. 1585-1587, 1994.

HUSSEN, E.M.; ENDALEW, S.A. In vitro antioxidant and free-radical scavenging activities of polar leaf extracts of *Vernonia amygdalina*. **BMC Complementary Medicine and therapies**, v. 23, n.146, p.1-12. 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTAS. **Bioma Pampa**. Disponível em: <https://www.ibflorestas.org.br/bioma-pampa>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Biomás**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 26 de Dezembro de 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **População**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 26 de Dezembro de 2023.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Biodiversidade Amazônica**. Disponível em: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/biodiversidade-amazonica>. Acesso em: 28 de Dezembro de 2023.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Cerrado**. Disponível em: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/cerrado>

JAN, S *et al.* Assessment of antioxidant potential, total phenolics and flavonoids of different solvent fractions of *Monothecha buxifolia* Fruit. **Osong public Health and research perspectives**, v.4, n.5, p.246-254. 2013.

JARCZAK, D.; NIERHAUS, A. Cytokine storm-definition, causes, and implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, p.1-30.

LIMA, J.E.FW.; SILVA, E.M. Estimativa da produção superficial do Cerrado brasileiro. *In*: SCARLOT, A.; SILVA, J.C.S.; FELFILI, J.M. **Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e conservação**. Brasília, 2005. p. 64. Disponível em: https://biblioteca.cl.df.gov.br/dspace/bitstream/123456789/630/1/Cerrado_Parte1.pdf. Acesso em: 09 de março de 2024.

LIMA, L.M *et al.* Anti-inflammatory and analgesic activities of the ethanolic extracts from *Zanthoxylum riedelianum* (Rutaceae) leaves and stem bark. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 59, p.1151-1158. 2007.

LISKOVA *et al.* Flavonoids against the SARS-CoV-2 induced inflammatory storm. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.138, p.1-13.

MAGALHÃES, K.N.; BANDEIRA, M.A.M.; MONTEIRO, M.P. **Plantas medicinais da Caatinga do Nordeste brasileiro**. Fortaleza: Imprensa universitária, 2020. 30p.

MAGNUSSON, W.E *et al.* Amazônia: Biodiversidade incontável. *In*: PEIXOTO, A.L.; LUZ, J.R.P.; BRITO, M.A. **Conhecendo a biodiversidade**. Brasília, 2016. p. 114.

MALFA, G.A *et al.* Chemical, Antioxidant and Biological studies of *Brassica incana* subsp. *raimondoi* (Brassicaceae) leaf extract. **Molecules**, v. 28, p. 2-17. 2023.

MARENCO, J.A.; ESPINOZA, J.C. Extreme seasonal droughts and floods in Amazonia: causes, trends and impacts. **Royal Meteorological Society**, v.36, p.1033-1050, 2016.

MARQUES, M.C.M *et al.* Mata Atlântica: O desafio de transformar um passado de devastação em um futuro de conhecimento e conservação. *In*: PEIXOTO *et al.* **Conhecendo a Biodiversidade**. Brasília: Instituto de Pesquisas Jardim botânico do Rio de Janeiro, 2016, p.51-66. ISBN: 978-85-63100-08-5

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade**. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/biodiversidade.html>. Acesso em: 05 de Junho de 2022.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biomas**. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/ecossistemas-1/biomas>. Acesso em: 26 de Dezembro de 2023.

MOREIRA, B.O *et al.* Application of response surface methodology for optimization of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from *Cenostigma macrophyllum*. **Journal of Chemometrics**, v. 34, p.1-12. 2020.

NASSAR, P & OUANOUNOU, A. Cocaine and methamphetamine: Pharmacology and dental implications. **Canadian Journal of dental hygiene**, v.54, n.2, p.1-8, 2020.

NATIONAL Center for Biotechnology information. 2024. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Amyrin>. Acesso em: 29 abril.2024.

NGUEMFO, E.L *et al.* Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of some isolated constituents from the stem bark of *Allanblackia monticola* Staner L.C (Guttiferae). **Inflammopharmacology**, v. 17, p.37-41. 2009.

NTUNGWE, E *et al.* *Artemia* species: An important tool to screen general toxicity samples. **Bentham Science**, v. 26, p.2892-2908. 2020.

NUNES, BRENO *et al.* Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 379, p. 609-616, 2009.

NUNES, BRUNO. S *et al.* Use of genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v.144, n. 2, p.453-462, 2006.

OLIVEIRA *et al.* Protective effect of the Plant extracts of *Erythroxylum* sp. against toxic effects induced by the venom *Lachesis muta* Snake. **Molecules**, v.21, p. 2-14, 2016.

OLIVEIRA *et al.* Tropane alkaloids from *Erythroxylum* Genus: Distribution and compilation of 13C-NMR spectral data. **Chemistry & biodiversity**, v.7, p. 302-326, 2010.

ONO *et al.* Effect of ultra-high pressure on small animals, tardigrades and *Artemia*. **Cogent Physics**, v.3, n. 1, p. 1-8, 2016.

ORIAKHI, K *et al.* Comparative antioxidant activities of extracts of *Vernonia amygdalina* and *Ocimum gratissimum* Leaves. **Journal of Agricultural Science**, v.6, p.13-20. 2014.

Palomino, J.C *et al.* Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 46, p. 2720–2722. 2002.

PINTO *et al.* Produtos Naturais: Atualidades, desafios e perspectivas. **Química nova**, v.25, p.45-61, 2002.

PLOWMAN, T & HENSOLD, N. Names, types, and distribution of Neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). **Brittonia**, Bronx- NY, v.56, n.1, p. 1-53, 2004.

PRABHAVATI, R.M., PRASAD, M.P., JAYARAMU, M. Studies on qualitative and quantitative phitochemical analysis of *Cissus quadrangularis*. **Pelagia research library**, v. 7, p. 11-17. 2016.

PUB CHEM [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National center for biotechnology information; 2004. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/259846#section=LOTUS-Tree>

RAHMAN,I.U *et al.* Historical perspectives of Ethnobotany. **Clinics in Dermatology**, v. 37, n. 4, p.1-14. 2019.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2011.p.452.

- REDMAN, M. Cocaine: What is the crack? A brief history of the use of cocaine as an anesthetic. **Anesthesiology pain medicine**, v. 1, n. 2, p.1-3, 2011.
- REFLORA DO BRASIL. *Erythroxylum nummularium* Peyr. Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/288980#names>. Acesso em 01 de Abril de 2024.
- RESTREPO *et al.* *Erythroxylum* in focus: An Interdisciplinary Review of an Overlooked genus. **Molecules**, Bogotá- Colômbia, v. 3788, n.24, p. 1-27. 2019.
- Rodrigues, J. Z *et al.* Antimicrobial activity of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 against *Streptococcus mutans* UA159. **Microbial Pathogenesis**, p.1-31. 2020.
- RUFINO, M. S. M *et al.* Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema β -caroteno/ácido linoléico. Embrapa - Comunicado Técnico online 126, Fortaleza, CE, 2006.
- SALLEM, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **School of Medicine and public health**, v.285, n. 2, p.1-14. 2009.
- SÁNCHEZ-QUESADA, C *et al.*, 2013. Bioactive properties of the main triterpenes found in olives, virgin olive oil, and leaves of *Olea europea*. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v.61, n.50, p.12173-12172. 2013.
- SAHNOUNI, F *et al.* Determination of biological characteristics of *Artemia salina* (Crustacea: Anostraca) population from saline Bethioua (Oran, Algeria). **International Journal of Biosciences**, v. 10, n. 1, p.117-125. 2017.
- SANTOS, C.C *et al.* Diterpenes from *Erythroxylum barbatum*. **Journal of the Brazilian chemical society**, v.17, n.7, p. 1304-1308. 2006.
- SCORSOLINI-COMIN, F.; RIBEIRO, A.C.S.; GAIA, R.S.P. Tradição e socialização nos terreiros de Candomblé de Uberaba-MG: Análise Bioecológica dos percursos religiosos. **Psicologia e Sociedade**, v.32, p. 1-18. 2020.
- Shah, N.A *et al.* Investigation on flavonoid composition and anti-free radical potential of *Sida cordata*. **BMC Complementary & Alternative medicine**, v.13, p.1-12. 2013.
- SHAMSA, F *et al.* Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. **The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, p.17-20. 2008.
- SiBBR. **Sistema brasileiro de informação sobre a biodiversidade brasileira**. Ocorrências por região. 2023. Disponível em: <https://www.sibbr.gov.br/>. Acesso em 27 de Dezembro de 2023.
- SILVA, G.L *et al.* Modulation of the Multi drug resistance phenotype by new tropane Alkaloid Aromatic Esters from *Erythroxylum pervillei* .**Journal of Natural products**, v.64, n.12, p. 1514-1520, 2001.
- SILVA, J *et al.* Plantas medicinais trazidas da África para o Brasil: Africanizando o Brasil. **Rede brasileira de informações biológicas**, Bahia, v. 6, p.58-65, 2016.
- SOS PANTANAL. **Cobertura do solo e uso de terra no Pantanal**. Disponível: <https://www.sospantanal.org.br/cobertura-do-solo-e-uso-de-terra>. Acesso em: 08 de Maio de 2024.
- SOUSA, J.P. B *et al.* Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG).**Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.17, n.1, p. 85-93, 2007.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. 3. ed. São Paulo: Instituto Plantarum de

Estudos da Flora LTDA, 2012.

SUDHARAR, V *et al.* Protective effect of Lupeol and Lupeol linoleate in hypercholesterolemia associated renal damage. **Molecular and cellular Biochemistry**, v. 317, p.11-20. 2008.

TOWNSEND, C.R.; BEGON, M.; HARPER, J.L. **Fundamentos em Ecologia**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.p.143.

TRUJILLO *et al.* In vitro Anti-*Toxoplasma* activity of extracts obtained from *Tabebuia rosea* and *Tabebuia chrysantha*: The role of β -Amyrin. **Molecules**, v. 29, n. 920, p. 2-18.

UDDIN *et al.* Ethnomedicinal survey and determination of total alkaloids and phenolics in selected edible plants of Tripura, Índia. **Plants Journal international Journal**, v. 9, n. 2, p. 123-131, 2021.

UKIL, A *et al.* 18 β - Glycyrrhetic Acid triggers curative Th1 response and Nitric oxide Up-regulation in Experimental visceral Leishmaniasis associated with the activation of NF-KB. **The Journal of immunology**, v.175,n.2, p.1-10, 2005.

VANDER WALL, S.B.; BECK, M.J. A comparison of frugivory and scatter-hoarding seed-dispersal syndromes. **The botanical review**, v.78. p.10-31, 2012.

WAGNER, Hildebert; BLADT, Sabine. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2.ed. New York: Journal of Natural products, 2001.

WEIL, A.T. The therapeutic value of coca in contemporary medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.3, n.5, p.367-376, 1981.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT- Food Science and Technology**, v.42, n.10, p.1573-1580, 2009.

Yatsuda, R *et al.* Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 183–189. 2005.

YULIAN *et al.* Advances in chemistry and bioactivity of the genus *Erythroxylum*. **Natural products and Bioprospecting**, v.12, n. 15, p. 1-20, 2022.

ZIELINSKI, A.C.F *et al.* A comparative study of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Elsevier**, Ponta grossa-PR, v.60, p. 1-9, 2014.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonoides. *In*: SIMÕES, *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6. ed. Rio Grande do Sul/Santa Catarina: UFRG/UFSC, 2007. p. 577-583.

CAPÍTULO 1

Chemical Composition and Bioactive Potential of *Erythroxylum nummularium* Peyr:
Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial, and Antinociceptive Properties

ABSTRACT

Erythroxylum nummularium Peyr is a plant species found exclusively in Brazil, containing bioactive compounds such as epicatechin, quercetin, β -amyirin, lupeol, erythrodiol palmitate, and β -sitosterol. These compounds exhibit anti-inflammatory, antioxidant, analgesic, antidiabetic, anticancer, antimicrobial, anti-toxoplasmic, and hepatoprotective activities. This study aimed to expand knowledge on the chemical composition and biological activities of different plant organs, including leaves, branches, stem bark, and stem, from methanolic extracts and organic fractions obtained through partitioning with solvents of increasing polarity (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and butanol). The extracts and fractions were analyzed for total phenolic, flavonoid, and alkaloid content, as well as assessed in antioxidant (DPPH, β -carotene/linoleic acid, and phosphomolybdate), antimicrobial (against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, and *Streptococcus sobrinus*), antinociceptive (*in vivo*), and toxicity (using *Artemia salina* and a mouse model) assays. Phytochemical screening was performed by thin-layer chromatography (TLC), and chemical composition was characterized by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). In the antinociceptive assay, the ethyl acetate fraction of the leaves (ELEN) was orally administered to male *Balb-C* mice at doses of 6.25, 12.5, 25, and 50 mg/kg. After 60 minutes, animals were administered 0.6% acetic acid intraperitoneally, and abdominal writhing was recorded. The results showed significant levels of total phenolics and flavonoids and lower concentrations of alkaloids. TLC revealed the presence of saponins, tannins, and steroids, while GC-MS analysis identified glycerol, hexadecanoic acid, methyl hexadecanoate, and lupeol acetate as the main compounds. Among the antioxidant assays, the ethyl acetate fractions of the leaves, branches, and stem bark showed the most significant results. In the antimicrobial test, the leaves' ethyl acetate and dichloromethane fractions exhibited effectiveness against *S. aureus*, while the hexane and butanol fractions showed activity against *S. mutans*. No sample was active against *S. sobrinus*. The toxicity assay on *A. salina* showed moderate to high toxicity for the crude extracts and organic fractions, except for the ELEN fraction, which was considered non-toxic. The antinociceptive activity of this fraction was most pronounced at 6.25 mg/kg, significantly reducing abdominal writhing without signs of toxicity in mice after 15 days of analysis at doses up to 2000 mg/kg. These results indicate that *E. nummularium* is a promising source of bioactive compounds with the potential for developing new drugs.

Keywords: Toxicity, phytochemical profiling, bioactivity screening, phenolic, flavonoids, *Artemia salina*, and GC-MS.

1. Introduction

The predominance of metabolic diseases in the world is centuries old. These physiological disorders are characterized by changes in mitochondria, organelles responsible in particular for the production of ATP in cells (Bhatti et al., 2017). Such conditions can decrease oxidative capacity and inhibit antioxidant activity (ROS) (Berra e Menck, 2005).

The exacerbated increase in ROS can lead to pathophysiological states resulting from oxidative stress. The central dysfunctions associated with this phenomenon include high

blood pressure, hyperglycemia, abdominal obesity, dyslipidemia, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, cancer, and inflammation (Bhatti et al., 2017; Mancini et al., 2016; Pugazhenti et al., 2017; Reddy et al., 2012; Roy et al., 2015; Subramaniam e Chesselet, 2013).

Given the significant increase in the number of affected patients and the increasing costs associated with healthcare, especially considering the growing pressure on the public healthcare system, identifying new bioactives with minimal side effects becomes essential (Guan et al., 2023). In this context, recent studies have highlighted the efficacy of species of the genus *Erythroxylum* (Morais et al., 2022; Oliveira et al., 2016; Restrepo et al., 2019; Yulian et al., 2022).

Among the various species with therapeutic properties, *Erythroxylum nummularium* Peyr stands out. This plant belongs to a widely recognized genus for its medicinal properties. The popularity of the genus *Erythroxylum* is due, in large part, to the millennial use of the leaves of *Erythroxylum coca* Lam by the natives of South America. In this context, they used this plant as a stimulant and source of well-being (Watson, 1983). The genus *Erythroxylum*, the most significant of the Erythroxylaceae family, is distinguished by its phytoconstituents (Yulian, et al., 2022). The main chemical compounds in this genus include flavonoids, diterpenes, alkaloids, norisoprenoids, phenolics derivatives, steroids, triterpenoids, and tannins (Oliveira et al., 2010; Yulian, et al., 2022). The diversity of secondary metabolites in this genus encompasses substances important for agriculture (Nathanson et al., 1993), industry, and medicine.

Phytochemical investigations of some species of the genus *Erythroxylum* have revealed their pharmacological properties. For example, *E. vacciniifolium* Mart has tonic and aphrodisiac characteristics (Zanolari et al., 2003), it is also helpful in cases of erectile dysfunction and is active against the Human immunodeficiency virus (HIV). In addition, this species has antimicrobial and cytotoxic action (Aguiar et al., 2012; Restrepo et al., 2019). Several species of this genus showed multiple actions, including *E. ovalifolium* Peyr, which neutralizes snake venom (Oliveira et al., 2016), reduces edema, controls hemorrhages, and has antifungal action (Restrepo et al., 2019). Other plants, such as *E. suberosum* A.St. Hill and *E. laurifolium* Lam, contain substances with anesthetic, antioxidant, cytotoxic, antidiabetic, antihypertensive, antiviral, and antimicrobial properties (Barros et al., 2017; Macedo et al., 2016; Oliveira et al., 2015; Restrepo et al., 2019). The pharmacological actions of the species *E. pervillei* Baill. *E. macrocarpum* O.E Schulz and *E. caatingae* Plowman were investigated. Studies have shown its effectiveness in treating various conditions, including diabetes, neoplasms, tumors, and abdominal pain (Aguiar et al., 2012; Silva et al., 2001). In addition, antimicrobial, antifungal, and antibiotic activities

were found in *E. macrocarpum* and *E. caatingae* (Mahomoodally, et al., 2008).

Polyphenols are secondary metabolites with several well-established biological activities (Panzella, 2023), they have been the subject of widespread interest due to their antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, and anticancer potential (Martiniakova et al., 2023). Specific studies, such as the one by Hirata et al. (2009), highlight the ability of naringin, a type of polyphenol, to fight osteoporosis, showing an increase in the number and size of osteoclasts in mice, in addition to increased bone mass.

In the context of oxidative stress, polyphenols have been recognized for their ability to neutralize free radicals, which play a central role in the development of some pathophysiology (Naoi et al., 2019). The elevation of the activity of antioxidant enzymes and the suppression of ROS production are essential mechanisms by which polyphenols exert their antioxidant effect, contributing to the prevention of cell damage. In addition, evidence suggests that flavonoids, one of the main classes of polyphenols, may be effective in preventing and treating neuroinflammatory disorders, as well as contributing to the reduction of apoptosis and combating motor impairments (Kumar e Pandey, 2013). Therefore, the recognition of new classes of flavonoids in plant species may be essential to suppress other diseases and stimulate preclinical trials. Thus, the discovery of new classes of flavonoids in plant species may represent a breakthrough in the development of innovative therapies for various health conditions.

Thus, even with the Ethnopharmacological importance of the genus *Erythroxylum* already established, there are no studies on the medicinal potential of *E. nummularium*. Therefore, the present study proposes to investigate the chemical composition and biological activities of this species' leaves, twigs, stem bark, and stem. The methanolic extracts and organic phases were submitted to preliminary phytochemical analyses. Chromatographic techniques such as thin-layer and gas chromatography coupled to mass spectrometry were employed. In addition, antioxidant capacity assays, quantification of phenolics and total flavonoids, evaluation of toxicity against *Artemia salina* Leach, and investigation of antimicrobial and antinociceptive activities in animal models were performed. This approach aims to fill the knowledge gap about this plant species and provide perspectives on its therapeutic potential, thus contributing to developing new drugs based on natural products.

2. Materials and methods

2.1. General experimental procedures

The CG/EM-QP2010SE mass spectrometer (Shimadzu, Japan) was used for gas chromatography analyses. All weighing operations were performed using the ATY224 analytical balance (Shimadzu, Japan). The reading of absorbances in the experiments was conducted with the UV-vis spectrophotometer (Bel Photonics), and exposure to ultraviolet light was performed in a dark room with an ultraviolet light source (Biotech). The sterilization drying oven (Vulcan) was used for sterilization and drying processes, and centrifugation was performed in the 32A Centrifuge (Rotofix). The homogenization of the samples was performed with the vortex shaker (Kine), and the pH measurements were performed using the pH meter (MS). Methanol, ethanol, dichloromethane, chloroform, ethyl acetate, hexane, and other reagents were of analytical grade purchased from ACS Scientific, Exodus, and Synth (Brazil). The analytical grade reagents DPPH, Folin-Ciocalteu, β -carotene, Tween 80, and pyridine used in the tests performed were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Aluminum chloride was acquired from Neon (Brazil), while o bromocresol green, ascorbic acid, and acetic acid were obtained from Dinâmica (Brazil). Linolenic acid was purchased from C.L.A, Nature Essential (Spain), and BHI Agar (Brain Heart Infusion Agar) was purchased from Kasvi (Brazil). The reagents used in derivatization by silylation were pyridine acquired from Dinâmica (Brazil), N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamine (BSTFA), trimethylchlorosilane (TMCS) (Sigma-Aldrich ®). The extracts and organic phases were monitored by thin-layer chromatography (TLC) (silica gel 60, F₂₅₄, Merck produced in Brazil) and visualized as described in item 2.3. The eggs of *Artemia salina* were donated by the State University of Southwest Bahia (UESB).

2.1.2. Collection and taxonomic identification of plant material

The botanical species was collected in the rural area of Brejo Novo (13°55'28.50" S 40°6'33 40" W) in Jequié-Bahia. The collection took place under the coordination of the curator of the Herbarium of the State University of Southwest Bahia - HUESB. The plant species was registered in SisGen (National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge) to carry out the harvest under the registration code A8C8EDD. A voucher specimen (14665) was deposited at the Herbarium HUESB.

2.1.3. Preparation of extracts

After drying at room temperature, the plant material was grinded until pulverization. The crushed material (815.836 g of leaves, 2.000 g of branches, 1.000g of Stem bark, and 920 g of stem) was macerated in MeOH separately for ten consecutive extractions for about 48 h each. The filtrate obtained was gathered and concentrated under reduced pressure, generating the methanolic extracts of the leaves (119.224 g; MLEN), branches (132.029 g; MBEN), stem bark (212.408 g; MSBEN) e stem (70.812 g; MSEN). The methanolic extracts were dissolved in MeOH/H₂O (7:3) and partitioned between hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and butanol. They were giving rise to the organic phases of each organ (Table 1). Both the methanolic extracts and the fractions were subjected to various tests.

Table 1.

Masses and codes of organic phases obtained by partitioning the crude MeOH extract of leaves, branches, stem bark, and stem of *E. nummularium*

Plant organs	Hexane (g)	Dichloromethane (g)	Ethyl acetate (g)	Butanol (g)
Leaves	HLEN 0.893 g	DLEN 1.453 g	ELEN 15.241 g	BLEN 17.494 g
Branches	HBEN 2.783 g	DBEN 2.556 g	EBEN 27.968 g	BBEN 2.316 g
Stem bark	HSBEN 2.013 g	DSBEN 0.968 g	ESBEN 51.205 g	BSBEN 26.942 g
Stem	*	DSEN 1.102 g	ESEN 9.543 g	BSEN 52.000 g

* Fraction not obtained

2.2. Qualitative phytochemical screening

The phytochemical prospecting tests of the organic phases obtained from the methanol extract of the leaves, branches, stem bark, and stem of *E. nummularium* were carried out according to the methodologies described below. These tests were based on colorimetric visualization and/or precipitate formation after adding specific reagents to identify the following classes of secondary metabolites: alkaloids, flavonoids, phenolics, steroids, saponins, and tannins. The qualitative results were expressed as presence/positive (+) and absence/negative reaction (-) of the phytochemical classes.

2.2.1. Testing for alkaloids

2.2.2. Thin layer Chromatography analysis (TLC)

The organic phases were dissolved in dichloromethane separately, applied to the silica gel plate, and eluted with an appropriate mixture of solvents. After the elution of the chromatographic plate, for the observation of alkaloids, the Wagner reagent (1 g of iodine and 10 g of potassium iodide in 100 mL of distilled water) was sprayed on the silica gel plate. The appearance of reddish-brown spots on the plaque indicated the presence of alkaloids (Farooq et al., 2022; Hussien e Endalew, 2023).

2.2.3. Determination of alkaloids by precipitation method

About 100 mg of each organic phase was dissolved in 5 mL of ethyl alcohol, and 2 mL of Wagner's reagent was added. The formation of a reddish-brown precipitate indicated the presence of alkaloids (Uddin et al., 2021).

2.2.4. Testing for flavonoids and phenolics

Aluminum chloride (1% in ethanol) was used to detect flavonoids and phenolic substances. After eluting the chromatographic plate with the organic phases, the reagent was applied to the TLC. After that, the plaque was observed in the darkroom under ultraviolet light. The formation of green fluorescent spots indicated the presence of flavonoids, while the fluorescent blue stain revealed the existence of phenolic substances (Ahmad et al., 2023).

2.2.5. Testing for steroids and triterpenes

After the elution of the chromatographic plate with the organic phases, the detection of steroids and triterpenes was performed by spraying the Lieberman-Burchard reagent (5 mL of acetic anhydride and 5 mL of sulfuric acid dissolved in 50 mL of ethanol) on the TLC plate. After applying the reagent, the plate was heated on a heating plate. The appearance of purple spots indicated the presence of steroids (Almeida et al., 2019).

2.2.6. Testing for saponins

The colorimetric method with sulfuric acid was employed to detect saponins, as Prabhavati et al., (2016) described. In this method, an aliquot of 5 mL of H₂SO₄ was added to 50 mL of ethanol, and the final volume was adjusted to 100 mL. After eluting the chromatographic plate with the organic phases, saponins were detected by spraying the reagent on the TLC plate. The presence of saponins was indicated by the formation of a purple eggplant coloration after heating.

2.2.7. Test for tannins and phenolics

The reagent used was a 2% methanolic solution of FeCl_3 (Prabhavati et al., 2016). The formation of the blue or green spots on the TLC plate indicated the presence of tannins.

2.3. Determination of Total Alkaloid content (TAT)

To quantify TAT in the organic phases, 10 mg of samples were weighed and diluted in 1 mL of HCl 2 mol L^{-1} , followed by filtration as described by Shamsa et al., (2008). The filtrate was transferred to a separation funnel and washed with 10 mL of chloroform (3 times). The pH of the aqueous phase was adjusted to neutral with 0.1 mol L^{-1} NaOH . Then, 5 mL of phosphate buffer solution (pH 4.7) and 5 mL of bromocresol green solution (VBC – 0.025 mol L^{-1}) were added. The mixture was stirred, and the complex formed was extracted with 2.5 mL of chloroform under vigorous stirring. The chloroform phase was collected in a 10 mL volumetric flask and supplemented with chloroform until the final volume. The absorbance of this complex was measured at 470 nm. All samples were analyzed in triplicate. A calibration curve was constructed using a 0.25 mg mL^{-1} atropine sulfate solution. Each concentration used in the construction of the curve was treated as described for the samples. The results were expressed as mg of atropine equivalent per gram of the extract (mg EA g^{-1}). This assay was performed only in the organic phases, presenting a positive result in the qualitative alkaloid test.

2.3.1. Total flavonoid content (TFC)

TFC was quantified by a colorimetric assay using the aluminum chloride method (Ghasemzadeh et al., 2015) with adaptations. Initially, 4 mg of each extract or organic phases were diluted in methanol to provide solutions with a concentration between 0.4 and 0.6 mg mL^{-1} . Then, 1 mL of the samples were transferred separately to Falcon tubes containing 4 mL of distilled water, followed by the addition of 300 μL of NaNO_2 . The samples were vortexed for 30 seconds. Subsequently, 300 μL of AlCl_3 were added, with vigorous stirring for another 30 seconds. After this time, 2 mL of NaOH 1 mol L^{-1} was added, and the samples were left to rest for 15 minutes before reading. Samples absorbances were measured at 510 nm. A calibration curve was prepared using quercetin at 200, 400, 600, 800, and $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, following the same methodology used for the samples. All analyses were performed in triplicate. The TFC was calculated from the calibration curve using quercetin as standard. The results were expressed in milligrams of quercetin equivalent per gram of extract ($\text{mg EQ}\cdot\text{g}^{-1}$).

2.3.2. Total phenolic content (TPC)

The TPC in the MeOH extracts and organic phases was quantified by the Folin-Ciocalteu method, as described by Moreira et al., (2020) with adaptations. An aliquot of the extracts/phases was dissolved in 80% ethanol and transferred to a 10 mL volumetric flask to provide concentration solutions between 150 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The reaction medium was prepared using 0.1 mL of the extracts/phases solution, 0.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent (10%), and 2.0 mL of sodium carbonate (15%). Subsequently, this mixture was completed to the final volume of 10 mL with distilled water. After one hour of reaction, protected from light, the absorbances of the samples were measured at 760 nm, with ethanol and all reagents except the extract/phase as white. A calibration curve was prepared using gallic acid at concentrations of 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, following the same methodology as the samples. All analyses were performed in triplicate. The TPC concentration was calculated using pure gallic acid as a standard from a calibration curve. Results were expressed as milligram gallic acid equivalents per gram of extract ($\text{mg EGA}\cdot\text{g}^{-1}$).

2.4. Antioxidant activity

2.4.1. DPPH free radical sequestration test

The crude extracts and organic phases of *Erythroxylum nummularium* were submitted to the DPPH (2, 2-difenil-1-picrilhidrazil) free radical scavenging test (Moreira et al., 2019; Oriakhiet et al., 2014), with adaptations. The methanolic extracts were prepared at concentrations of 50, 100, 150, 200, and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, while the DPPH solution was prepared at 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. For each concentration of the extracts, a reaction medium was prepared, in triplicate, containing 200 μL of crude extract or organics phases, or methanol for control, plus 1800 μL of DPPH solution. The samples were incubated at room temperature, protected from light, for 30 minutes. Next, absorbances were measured at 515 nm in a spectrophotometer. The antioxidant capacity of the extracts was evaluated by the DPPH method, following the classification of Brand-Williams et al. (1994), which considers EC_{50} in three categories: good activity when the EC_{50} value of the extract is up to three times higher than the standard used, medium activity if it between three and seven times above the EC_{50} of the standard, and low activity if the EC_{50} is seven times higher than the standard used.

2.4.2. β -carotene/linolenic acid system

The antioxidant activity assay using the β -carotene/ linolenic acid system was

performed according to the method described by Moreira et al., (2019), with adaptations. Initially, 2.6 mg of β -carotene was dissolved in 2 mL of chloroform. This solution was transferred to a volumetric flask containing 403 mg of Tween 80 emulsifier and 42.8 mg of linolenic acid. The chloroform was removed by rotary evaporation, and then 200 mL of distilled water was added, with vigorous stirring for 2 minutes, to form an emulsion, which constitutes the oxidizing medium. An aliquot of 2.7 mL of the oxidizing medium was added to a cuvette containing 300 μ L of the samples in triplicate. The extracts and phases were prepared at 50, 100, 150, 200, and 250 μ g mL⁻¹ concentrations using methanol as solvent. Absorbances were measured at 470 nm immediately after mixing, and subsequently, the samples were incubated in a water bath at 50°C for 1 hour for the second reading. The control was prepared with 2.7 mL of oxidizing medium and 300 μ L of methanol. For the calibration curve, ascorbic acid was used in the same concentrations as the extracts. Antioxidant activity (AA) was calculated using the following equation:

$$AA = (DR_C - DR_A)/DR_C \times 100.$$

Where DRC is the rate of degradation of the control ($DRC = \ln(a/b)/60$), and DRA is the rate of degradation in the presence of the sample ($DRA = \ln(a/b)/60$). In the equation, "a" represents the initial absorbances at time 0, and "b" is the absorbance after 60 minutes. The efficient concentration, the amount of antioxidant needed to reduce the percentage of oxidation inhibition by 50% (EC_{50}), was calculated by linear regression, where the abscissa axis represented the sample concentration (μ g mL⁻¹) or the concentrations of the positive control (ascorbic acid) and the ordinate axis represented the AA.

2.4.3. Total antioxidant capacity (TAC)

TAC analysis with modifications was performed using the phosphomolybdate method (Jan et al., 2013; Shah et al., 2013). The extracts, phases organics, and quercetin and gallic acid patterns were prepared at concentrations of 50, 100, 150, 200 e 250 μ g/mL, using methanol as solvent. For each concentration prepared, an aliquot of 0.25 mL was transferred to a test tube, to which 2.5 mL of the reagent solution was added. The reagent solution consisted of 0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, and four mM ammonium molybdate. The test tubes were then capped and incubated in a water bath at 90°C for 90 minutes. After incubation, the samples were cooled to room temperature. The absorbance of the samples was measured at 765 nm using a spectrophotometer. All analyses were performed in triplicate. Initially, the samples' CAT percentage was calculated by comparing them to ascorbic acid at a concentration of 200 μ g mL⁻¹, considered 100 % (control). The following equation was used to calculate the

percentage of TAC:

$$\% \text{ CAT} = [(\text{Abs}_{\text{Sample}} - \text{Abs}_{\text{White}}) / (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{White}})] \times 100.$$

Where: $\text{Abs}_{\text{sample}}$ is the absorbance of the sample, $\text{Abs}_{\text{White}}$ is the absorbance of the white, $\text{Abs}_{\text{control}}$ is the absorbance as ascorbic acid $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ (control).

The results of the TAC evaluation were expressed as efficient concentration (EC_{50}), which is the amount of antioxidants needed to reduce the percentage of oxidation inhibition by 50%. EC_{50} was calculated by linear regression, where the abscissa axis represented the concentration of the samples ($\mu\text{g/mL}$) or the concentration of the standards (quercetin and gallic acid), and the ordinate axis represented the % TAC.

2.4.4. Heat map: Correlation of total phenolic and flavonoid content with antioxidant assays

The heat map was generated using GraphPad 8.0.1 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The correlations between TPC and TFC contents and antioxidant activities (DPPH, β -carotene, and TAC) were evaluated using Pearson's correlation coefficient (r). P values lower than 0.05 were considered statistically significant.

2.5. Chemical composition analysis by GC/MS

The hexane and dichloromethane phases of the leaves, branches, stem bark, and stem of *E. nummularium* were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Before being analyzed by GC-MS, the samples were subjected to derivatization by silylation (Aragon et al., 2017) with some adaptations. For derivatization, 3 mg of each organic phase was weighed, and 60 μL of pyridine was added. To this solution, 100 μL of a reactive mixture of N,O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) containing 1% trimethylchlorosilane (TMCS) was added. This mixture was heated to 70°C for 30 minutes, allowing complete derivatization of the substances present. Then, one μL of the derivatized mix was injected into the GC-MS system. GC-MS analyses were performed using an Rtx-5MS fused silica capillary column (30 m; 0.25 mm internal diameter; 0.25 μm film) with helium as carrier gas. The injector temperature was maintained at 290°C . The oven temperature setting started at 80°C for 5 min, followed by an increase to 285°C at a rate of $4^\circ \text{C}/\text{min}$, remaining at 285°C for 40 minutes. The detector temperature was set to 200°C , and the temperature at the GC-MS system interface was maintained at 290°C . Mass scanning was performed in the 35 to 600 m/z range, with the ion source operating at 70 eV. The compounds were identified in the

extracts by comparing the mass spectra obtained with those available in the NIST 08, FFNSC1.3 and WILEY8 databases.

2.6. Biological assays

2.6.1. Antimicrobial activity

2.6.2. Microorganisms and cultivation

The microorganisms used in this study were the standard resistant strain *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 INCQS 00306 (resistant to oxacillin) and clinical isolates of *S. aureus* 16A, 112, 92, and 29, collected from two public hospitals in the city of Vitória da Conquista-Bahia (Campos *et al.*, 2012). The strains were thawed (-80°C) and incubated for 24 hours at 37°C in BHI broth. The strains of *Streptococcus mutans* ATCC 700610 and *Streptococcus sobrinus* were obtained from the Department of Pharmacology, Anesthesiology and Therapeutics of the School of Dentistry, UNICAMP (University of Campinas, Piracicaba, São Paulo). The strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 used were kindly provided by the National Institute for Quality Control in Health (INCQS) - Oswaldo Cruz Foundation- Fiocruz (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). These strains were thawed (-80°C), incubated for 24 hours at 37°C and 5% of CO₂ in BHI broth with 1% glucose. After the bacteria were developed, the minimum inhibitory concentration (CIM) and the minimum bactericidal concentration (CBM) were determined.

2.6.3. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC)

The microdilution technique in 96-well microplates determined the MIC. The inoculum of the studied strains was prepared with a final bacterial concentration of around 1-2 x 10⁸ CFU/mL (0.5 McFarland scale). These inoculums were diluted in heart-brain infusion broth (BHI) medium (Kasvi[®]) at a ratio of 1:1000. In the microplates, 190 µL of the inoculum-containing medium (final concentration 1-2 x 10⁵ CFU/mL) were added to each well, along with ten µL of the organic phases of all the plant organs of *E. nummularium* studied. The final concentration of the organic phases ranged from 1000 to 31.25 µg/mL, obtained by serial dilution in a ratio of 2. The plates were incubated for 24 hours at 37°C and 5% of CO₂ (Rodrigues *et al.*, 2020). After incubation, visual reading was performed to evaluate growth by observing the turbidity of the medium and/or the presence of colonies at the bottom of the wells. In wells without visual growth, 20 µL of the resazurina dye (Sigma[®]) was added. After

20 minutes of incubation with resazurin, the absence of microorganisms was indicated by the blue color, while the pink color revealed bacterial growth (Palomino et al., 2002). The MIC was defined as the lowest concentration that did not show visible bacterial growth, confirmed by the blue stain after adding resazurin.

2.6.4. Determination of the minimum bactericidal concentration (MBC)

MBC was determined from the wells that did not show visible bacterial growth in the MIC assay for the strains evaluated. An eight μL aliquot from each well was inoculated into plates with BHI agar. Then, the plates were incubated at 37°C and 5% CO_2 for 24 hours. After the incubation period, the plates were visually read. MBC was defined as the lowest concentration of extracts that caused the death of 99.9% of bacterial cells and was identified by the absence of visible bacterial growth on the agar surface (Yatsuda et al., 2005).

2.7. *Artemia salina* Leach lethality test

A lethality assay of *A. salina* was performed to verify the toxicity of methanolic extracts and organic fractions of *E. nummularium*. The test was conducted according to the methodology described by Malfa et al., 2023, with some adaptations. The eggs of *A. salina* were incubated in artificial seawater (3.2 g/L) under continuous illumination of an incandescent lamp, keeping the temperature between 24-26°C. After 24 hours, the cysts hatched. For the assay, ten newly hatched *A. salina* larvae were transferred to tubes containing artificial seawater and DMSO (1%), to which different concentrations of the extract were added, ranging from 12.5 to 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Each concentration was evaluated in triplicate. After 24 hours of exposure, the surviving nauplii were counted. The results were processed to calculate LD_{50} (lethal dose for 50% of the tested population) with a 95% confidence interval. All experiments were performed in triplicate. The toxicity of the samples was classified as follows: $\text{LD}_{50} > 1000$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ is nontoxic, LD_{50} between 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ is weakly toxic, LD_{50} between 100 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ is moderately toxic, $\text{LD}_{50} < 100$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ is strongly toxic (David et al., 2001; Hamimed et al., 2018).

2.8. Antinociceptive activity

2.8.1. Animals

Male *Balb-C* mice weighing 25 and 30 g were kept in the Federal University of Bahia (UFBA) vivarium. The animals were housed in polypropylene boxes and kept under controlled light conditions (12-hour light/dark cycle) and an average temperature of $22 \pm 3^\circ\text{C}$. They had

access to water and feed. On the day of the experiment, the mice were transferred to the laboratory 30 minutes before the start of the tests to adapt to the new environment. The Animal Use Ethics Committee (CEUA-IMS/CAT-UFBA) evaluated and approved this experiment under protocol 107/2022.

2.8.2. Acetic acid-induced abdominal contortions test

The ELEN phase was evaluated in the contortions. The mice were divided into five groups of six animals each. The treatment groups received oral doses of 6.25, 12.5, 25, and 50 mg/kg of ELEN. The control group received only water. Sixty minutes after the doses were administered, the animals received an intraperitoneal acetic acid injection (0.6%). The number of abdominal contortions, followed by torso twists and hind limb extension, was recorded over 20 minutes (Moreira et al., 2019).

2.8.3. Acute toxicity studies of the ELEN fraction

To assess the acute toxicity of the ELEN fraction, the LD₅₀ method was employed after oral administration of 2000 mg/ kg. Six animals were used in the experiment: three were treated with the ELEN fraction, and three served as the control group. The animals were observed for 24 hours immediately after treatment, followed by daily monitoring for 15 days to evaluate their behavior and physical condition. Observations focused on detecting symptoms such as aggression, tremors, paralysis, and skin lesions. On day 15, they were euthanized after anesthesia. Blood samples were collected for hematological analysis. Parameters evaluated included total leukocyte count, absolute and relative lymphocyte count, absolute and relative monocyte count, eosinophils, basophils, absolute neutrophils, hemoglobin concentration, hematocrit levels, total red blood cell count, platelet distribution width, red blood cell distribution width. This study followed the methodology described by Simeonova et al., 2021, with adaptations.

2.9. Statistical analysis

In the tests performed with mice, the results were presented as mean \pm standard deviation (S.D.) (n = 6 for group). Statistical comparisons between groups were initially performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's test for multiple comparisons, using the GraphPad Prism software (PRISM 5.0; GraphPAD Software Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical differences were considered significant if $p < 0.05$. In the toxicity experiment in mice (LD₅₀), the results were expressed as mean \pm SD for six animals.

Complete blood count data were treated using the GraphPad Prism software, using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. For the TAT, TFT, TPC, and antioxidant activities assays, the results were expressed as the mean of three replicates ($n = 3$) \pm S.D. Statistical analyses of these data also followed unidirectional analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test for multiple comparisons, using the Statistica 13 software (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA). Results with $p < 0, 05$ were considered statistically significant. In the toxicity tests with *A. salina*, the LD₅₀ values with a confidence interval of 95% were calculated using the probit analysis method using the Microcal Origin 5.0 software (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA).

3. Results

3.1. Phytochemical analysis

3.1.1. Qualitative screening

The preliminary phytochemical investigation was performed to recognize the presence or absence of secondary metabolites in the fractions of leaves, branches, stem bark, and stem. The screening revealed the presence of various substances, such as phenolics, flavonoids, saponins, and tannins. However, there are some exceptions between the fractions (Table 1). The presence of alkaloids in the fractions HLEN, DLEN, HBEN, HSBEN, DSBN, and DSEN was revealed by precipitation analysis. However, the analysis of TLC did not show the existence of alkaloids.

Table 1
Qualitative phytochemical analysis of *E. nummularium* fractions

Fractions	Alkaloids	Flavonoids	Phenolics	Saponins	Steroids	Tannins
HLEN	+	-	+	+	+	+
DLEN	+	+	+	-	-	+
ELEN	-	+	+	-	+	+
BLEN	-	+	+	-	+	-
HBEN	+	+	+	+	+	+
DBEN	-	+	+	-	-	+
EBEN	-	+	+	-	+	+
BBEN	-	+	+	+	+	-
HSBEN	+	+	+	+	+	+

DSBEN	+	+	+	-	-	+
ESBEN	-	+	+	-	-	+
BSBEN	-	+	+	+	+	-
DSEN	+	+	+	+	+	-
ESEN	-	+	+	-	-	+
BSEN	-	-	+	-	+	-

Abbreviations of fractions: HLEN, leaves hexane; DLEN, dichloromethane of leaves; ELEN, ethyl acetate from leaves; BLEN, butanolic leaves; HBEN, branches hexane; DBEN, dichloromethane from branches; EBEN, ethyl acetate from branches; BBEN, butanolic branches; HSBEN, stem bark hexane; DSBEN, dichloromethane from the bark of the stem; ESBEN, ethyl acetate from stem bark; BSBEN, butanolic bark stem; DSEN, stem dichloromethane; ESEN, ethyl acetate stem; BSEN, butanolic stem.

3.1.2. Quantitative screening

3.1.2.1. Determination of total alkaloid content (TAT)

Table 2 shows the amount of alkaloids in the *phases of E.nummularium*. The highest levels of this metabolite were found in the HBEN, HSBEN, and DLEN fractions. The alkaloid rates were 24.03 ± 0.80 , 23.12 ± 0.90 , and 22.67 ± 0.88 , respectively.

Table 2

Total alkaloid content (TAT) expressed in mg EA g⁻¹ of the various organs of *E. nummularium*

Extract, phases, and pattern /Plant organ	Leaves mg EA g ⁻¹ ± DP*	Branches mg EA g ⁻¹ ± DP*	Stem bark mg EA g ⁻¹ ± DP*	Stem mg EA g ⁻¹ ± DP*
Hexane	18.78 ± 0.42^c	24.03 ± 0.80^b	$23.12 \pm 0.90^{a,b}$	#
Dichloromethane	$22.67 \pm 0.88^{a,b}$	#	$21.24 \pm 0.63^{a,d}$	$20.03 \pm 0.22^{c,d}$
Ethyl acetate	#	#	#	#
Butanol	#	#	#	#

* The results are expressed as mean ± Standard Deviation (n=3). Values followed by the same letter showed no significant difference when comparing the values of the phases, $p < 0.05$ (One-way analysis of variance, followed by Tukey's post-test). # It was not performed because the extract presented a negative result in the qualitative test. mg EA g⁻¹ = atropine equivalent per gram of the extract.

3.1.2.2. Determination of total phenolic content (TPC)

The results for indicating total phenolics in plant extracts using the Folin-Ciocalteu method are explicit in mg EAG g⁻¹ of gallic acid per gram of crude extract and organic phases and are presented in Table 3.

Table 2

Total phenolic content (TPC) expressed in mg EAG g⁻¹ of the various organs of *E. nummularium*

Extract, phases, and pattern /Plant organ	Leaves mg EAG g ⁻¹ ± DP*	Branches mg EAG g ⁻¹ ± DP*	Stem bark mg EAG g ⁻¹ ± DP*	Stem mg EAG g ⁻¹ ± DP*
Crude	449.1 ± 13.7 ^f	796.9 ± 26.2 ^{ij}	831.0 ± 26.2 ^{jl}	87.1 ± 3.2 ^b
Hexane	13.3 ± 0.07 ^a	0.0	0.0	#
Dichloromethane	35.2 ± 1.5 ^a	22.6 ± 0.8 ^a	183.9 ± 6.3 ^c	6.8 ± 0.3 ^a
Ethyl acetate	854.3 ± 29.9 ^l	758.9 ± 24.1 ⁱ	958.9 ± 23.9 ^m	273.8 ± 11.2 ^e
Butanol	591.0 ± 18.2 ^g	217.3 ± 7.2 ^{cd}	658.9 ± 21.4 ^h	247.6 ± 8.7 ^{de}

* The results are expressed as mean ± standard deviation (n=3). Values followed by the same letter showed no significant difference when comparing the values of the crude extract and the phases, p<0.05 (One-way analysis of variance followed by Tukey's post-test). For ANOVA evaluation, extracts that did not present PCT were excluded. # Not performed EAG g⁻¹ = mg gallic acid equivalent per gram of extract.

The extracts and organic fractions of *E. nummularium* have a high content of total phenolics, except for some portions. For example, all organs of the hexane phase did not present phenolics in their composition, except for the leaf (13.3 ± 0.07). The low concentration of phenolics was also observed for the crude stem extract (87.1 ± 3.2) and all plant structures of the dichloromethane fraction, except for the stem bark (183.9 ± 6.3). On the other hand, the most abundant fraction of total phenolics was ethyl acetate from the bark of the stem (958.9 ± 23.9). Finally, the butanol fraction showed phenolic content for all organs, being more abundant in the bark of the stem (658.9 ± 21.4).

3.1.2.3. Determination of total flavonoid content (TFC)

The data obtained (Table 4) showed that the bark of the stem is the organ with the highest flavonoid content, while the stem is the organ with the lowest content. All crude extracts showed a high TFC except for the stem extract. In the results of the organic phases, the ethyl acetate fraction presented the best results for all organs except for the stem, where the

dichloromethane fraction obtained the best result. In the general evaluation of the results, the best TFCs were obtained for ESBEN > MSBEN > MBEN > BSBEN.

Table 3

Total flavonoid content (TFR) expressed in EQ g⁻¹ mg of the extracts of the various organs of *Erythroxylum nummularium*

Extract, phases, and pattern /Plant organ	Leaves mg EQ g ⁻¹ ± DP*	Branches mg EQ g ⁻¹ ± DP*	Stem bark mg EQ g ⁻¹ ± DP*	Stem mg EQ g ⁻¹ ± DP*
Crude	402.1 ± 5.6 ^g	557.1 ± 13.4 ⁱ	632.9 ± 13.9 ^j	55.4 ± 1.7 ^{b, c}
Hexane	43.1 ± 1.6 ^b	34.8 ± 1.0 ^{a, b}	37.9 ± 1.8 ^b	#
Dichloromethane	85.8 ± 3.1 ^{d, e}	43.8 ± 1.4 ^b	110.7 ± 4.3 ^c	74.5 ± 1.8 ^{c, d}
Ethyl acetate	512.9 ± 18.0 ^h	398.4 ± 4.4 ^g	764.4 ± 18.6 ^L	8.9 ± 0.5 ^a
Butanol	179.3 ± 4.4 ^f	197.7 ± 0.7 ^f	542.3 ± 15.8 ⁱ	0.0

* The results are expressed as mean ± Standard Deviation (n=3). Values followed by the same letter showed no significant difference when comparing the values, p < 0.05 (One-way analysis of variance, followed by Tukey's post-test). For ANOVA evaluation, the extract that did not present TFR was excluded. # It was not carried out. EQ g⁻¹ = mg quercetin equivalent per gram of the extract.

3.2. Antioxidant activity assays by DPPH, β-carotene/linolenic acid system, and total antioxidant capacity (CAT)

3.2.1. DPPH

The results of the evaluation of the DPPH radical scavenging activity of the crude extracts and the organic phases of the leaves, branches, stem bark, and stem of *E. nummularium* are presented in Table 5. The values given represent the amount of the tested sample required to reduce the initial concentration of the DPPH radical by 50%, known as EC₅₀. In this test, ascorbic acid was used as the standard. No plant organ stood out as the most effective in all phases obtained. However, in general, the stem bark showed the best results.

Table 5

Results of antioxidant activity by DPPH test with the various organs of *E. nummularium*.

Extract, phases, and pattern /Plant organ	Leaves EC ₅₀ μg/mL ± DP*	Branches EC ₅₀ μg/mL ± DP*	Stem bark EC ₅₀ μg/mL ± DP*	Stem EC ₅₀ μg/mL ± DP*
Crude	82.5 ± 3.5 ^c	57.9 ± 2.4 ^b	38.6 ± 0.9 ^a	> 1000
Hexane	> 1000	> 1000	> 1000	#

Dichloromethane	867.3 ± 16.1 ⁱ	335.3 ± 7.8 ^h	128.4 ± 2.5 ^e	> 1000
Ethyl acetate	64.4 ± 2.5 ^b	23.0 ± 0.9 ^a	69.4 ± 1.8 ^{b,c}	170.3 ± 6.3 ^f
Butanol	101.6 ± 2.6 ^d	213.5 ± 5.2 ^g	66.3 ± 1.2 ^{b,c}	185.4 ± 7.3 ^f
Ascorbic acid		33.2 ± 0.2 ^a		

* Results are expressed as mean ± Standard Deviation (n=3). Values followed by the same letter showed no significant difference when comparing the values of the pattern and phases, $p < 0.05$ (One-way analysis of variance, followed by Tukey's post-test). Inactive extracts were excluded from ANOVA evaluation. #Not carried out.

As shown in Table 5, all the organs studied showed antioxidant activity, but with some exceptions among the fractions. For example, the hexane fraction was inactive for all organs. All methanol extracts demonstrated an excellent ability to sequester DPPH, except the stem extract. Among the organic phases, the ethyl acetate fraction showed the best results for all organs, while the hexane fraction did not show antioxidant activity in the DPPH test. The best EC₅₀ results were obtained for EBEN and MSBEN, which did not present a statistically significant difference between them and the standard used in this trial. Subsequently, MBEN presented an EC₅₀ value that differed statistically from the two samples mentioned and from the following samples: ELEN, BSBEN, and ESBEN, which did not differ statistically from each other.

3.2.2. *β-carotene/linolenic acid*

The results of evaluating the extracts and organic phases of the *E. nummularium* organs regarding the inhibition of oxidation in the β -carotene bleaching assay are presented in Table 6. In this trial, ascorbic acid was also used as standard. In comparing the plant organs, the leaves showed promising results, with the DLEN fraction standing out as the most effective, indicating vigorous antioxidant activity. The BLEN and ELEN fractions also showed significant activity. The branches exhibited an intermediate antioxidant activity, with more significant variations than the leaves. The stem showed the lowest antioxidant activity among the organs analyzed. Comparing the different fractions, the hexane fraction showed the highest EC₅₀ values in all the organs tested, indicating low antioxidant activity. On the other hand, the ethyl acetate fraction showed consistently good antioxidant activity in almost all organs except the stem, standing out as one of the most promising fractions. The fractions DLEN, BLEN, ESBEN, ELEN, MBEN, BSBEN, and EBEN exhibited the best EC₅₀ values, with no

statistically significant differences observed. This finding suggests that all these fractions possess a comparable ability to inhibit β -carotene oxidation, demonstrating efficiency superior to the standard used in this assay.

Table 6

Results of antioxidant activity by β -carotene test with the various organs of *E. nummularium*.

Extract, phases, and pattern /Plant organ	Leaves EC ₅₀ μg/mL ± DP*	Branches EC ₅₀ μg/mL ± DP*	Stem bark EC ₅₀ μg/mL ± DP*	Stem EC ₅₀ μg/mL ± DP*
Crude	108.8 ± 6.3 ^{b, c, d, e}	68.3 ± 4.0 ^{a, b, c, d}	113.7 ± 6.0 ^{c, d, e}	223.3 ± 12.8 ^{g, h}
Hexane	266.6 ± 10.2 ^h	370.5 ± 18.5 ⁱ	961.1 ± 63.3 ^L	#
Dichloromethane	42.2 ± 2.3 ^a	129.9 ± 1.3 ^{d, e}	145.9 ± 2.3 ^{e, f}	143.4 ± 2.6 ^{e, f}
Ethyl acetate	65.4 ± 4.5 ^{a, b, c}	90.2 ± 6.4 ^{a, b, c, d, e}	57.4 ± 3.1 ^{a, b, c}	442.4 ± 21.9 ^j
Butanol	48.6 ± 2.4 ^{a, b}	243.4 ± 6.1 ^{g, h}	68.8 ± 3.9 ^{a, b, c, d}	195.9 ± 2.3 ^{f, g}
Ascorbic acid		201.5 ± 11.7 ^{f, g}		

* Results are expressed as mean ± standard deviation (n=3). Values followed by the same letter showed no significant difference when comparing the values of the pattern and phases, $p < 0.05$ (One-way analysis of variance, followed by Tukey's post-test). # It was not carried out.

3.2.3. Total antioxidant capacity (TAC)

The results of the evaluation of antioxidant activity by the TAC method are presented in Table 7. Gallic acid and quercetin were used as standards in this trial. When we evaluated the results about the plant organs, we noticed that for the more polar extracts, such as ethyl acetate and butanol, the bark of the stem presented better results, and for the extracts of medium polarity to low polarity, such as dichloromethane and hexane, the branches showed better antioxidant capacity. Regarding crude extracts, MBEN had the best TAC. When we analyze the results of the different fractions, we can see that the ethyl acetate fraction had superior antioxidant capacity and that the hexane fraction had the worst TAC. The extract that presented the best antioxidant capacity was BSBEN, with no statistical difference in the gallic acid standard and a higher TAC than the other standard used quercetin. The extracts EBEN and BSBEN showed antioxidant capacity similar to the quercetin standard at the confidence level evaluated.

Table 7

Result of antioxidant activity by the test of total antioxidant capacity (TAC) - complexation of phosphomolybdenum with the various organs of *E. nummularium*

Extract, phases, and pattern /Plant organ	Leaves	Branches	Stem bark	Stem
	EC ₅₀ µg/mL ± DP*	EC ₅₀ µg/mL ± DP*	EC ₅₀ µg/mL ± DP*	EC ₅₀ µg/mL ± DP*
Crude	159.8 ± 4.3 ^{c,d}	154.8 ± 7.0 ^{c,d}	181.9 ± 0.7 ^{d,e,f}	462.8 ± 14.7 ^j
Hexane	469.9 ± 24.5 ^j	250.7 ± 6.8 ^{g,h}	379.5 ± 2.7 ⁱ	#
Dichloromethane	198.5 ± 1.9 ^{e,f}	170.3 ± 8.0 ^{d,e}	213.8 ± 3.0 ^{f,g}	385.2 ± 18.3 ⁱ
Ethyl acetate	199.6 ± 7.7 ^{e,f}	128.3 ± 1.2 ^{b,c}	61.8 ± 2.7 ^a	393.6 ± 17.7 ⁱ
Butanol	263.4 ± 8.3 ^h	261.7 ± 5.4 ^h	126.9 ± 3.0 ^{b,c}	398.8 ± 19.9 ⁱ
Gallic acid			37.8 ± 0.2 ^a	
Quercetin			110.3 ± 3.4 ^b	

* Results are expressed as mean ± standard deviation (n=3). Values followed by the same letter showed no significant difference when comparing the values of the pattern and phases, $p < 0.05$ (One-way analysis of variance, followed by Tukey's post-test). # It was not carried out.

3.3. Heat map: Correlation of total phenolic and flavonoid content with antioxidant assays

A Pearson correlation analysis was performed to understand the relationship between the contents of total phenols (TPC) and total flavonoids (TFC) and their effects on antioxidant activity, evaluated by the DPPH, β -carotene, and TAC assays. The results of this analysis are presented through a heat map (Figure 1). The positive and negative correlations are indicated by the colors red and blue, respectively, and the intensity of the colors is proportional to the correlation coefficients. The analysis revealed strong or very strong and positive correlations between TPC and TFC for all samples analyzed, except the correlation with the TFC of the stem.

The most significant correlations were observed between stem bark TPC and stem bark TFC ($r = 0.9957$, $p \leq 0.0001$); TPC of branches and TFC of branches ($r = 0.9739$, $p \leq 0.05$); TPC of the branches and TFC of the leaves ($r = 0.9726$, $p \leq 0.05$). Regarding the correlations between DPPH versus TPC/TFC, moderate, strong, very strong, and negative correlations were observed, except for the correlation with the TFC of the plant stem. The most significant correlations were observed between stem and stem TPC ($r = 0.963$, $p \leq 0.05$); DPPH of leaves and TFC of stem bark ($r = 0.9573$, $p \leq 0.05$); DPPH of leaves and TPC of stem bark ($r = 0.9453$, $p \leq 0.05$).

Weak, moderate, and strong correlations were observed, predominantly negative, except the correlations with stem β -carotene when we related the correlations between β -carotene versus TPC/TFC. The most relevant correlations were observed between β -carotene from the stem bark and TPC from the stem bark; β -carotene of the branches and TFC of the leaves and β -carotene of the branches and TPC of the branches with r of -0.7547, -0.7416 and -0.7370, respectively.

Regarding the correlations between TAC versus TPC/TFC, weak, moderate, and strong correlations were observed, all negative. The most significant correlations were observed between the stem bark's content (TAC) and the leaves' TPC. The TAC of the stem bark, its TPC, and the TFC showed correlation coefficients of -0.8803, -0.8778, and -0.8622, respectively.

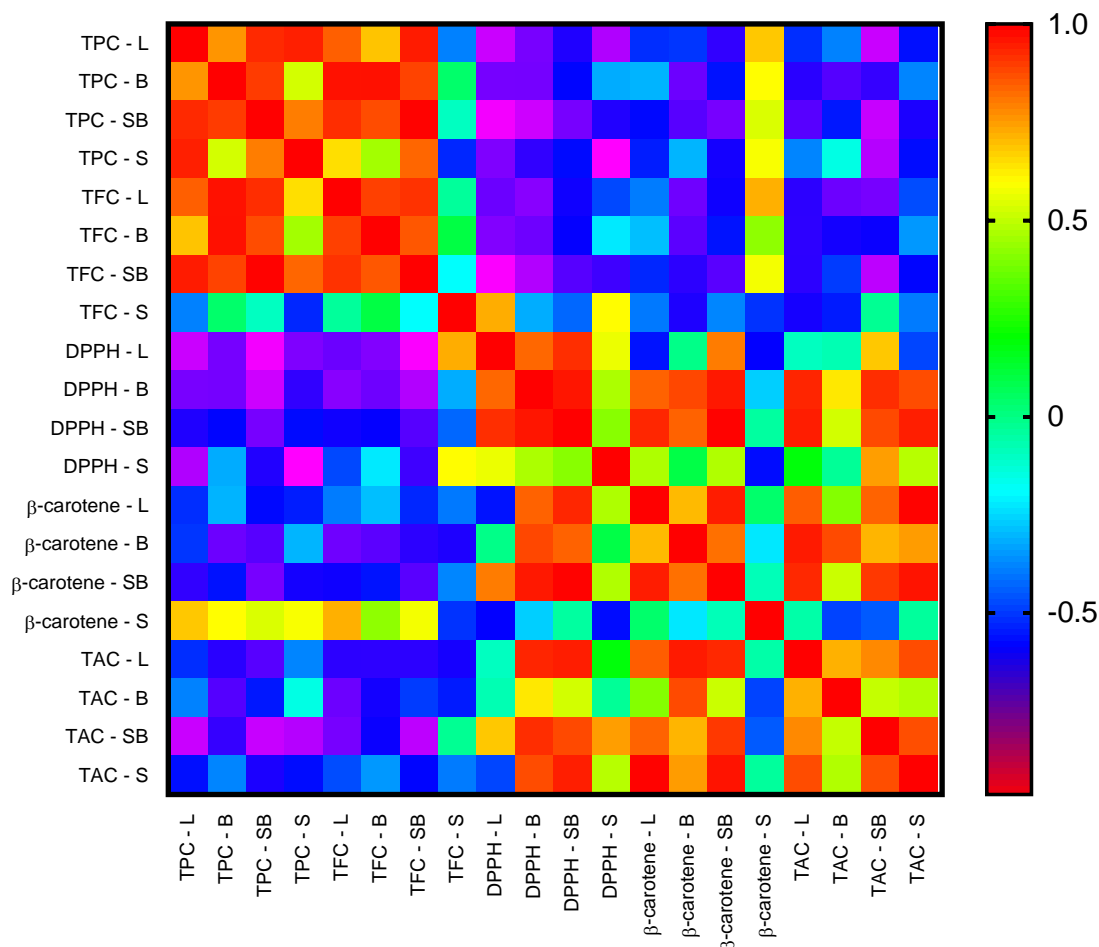


Fig.1. Relationship between TPC and TFC and their effects on antioxidant activity by DPPH, β -carotene, and TAC assays. Correlation coefficient: $\pm 0.01 \leq r < \pm 0.10$ Very weak, $\pm 0.10 \leq r < \pm 0.40$ Weak, $0.40 \leq r < \pm 0.70$ Moderate, $0.70 \leq r < \pm 0.90$ Strong, $0.90 \leq r < \pm 1.0$ Very strong and $r = \pm 1.0$ perfect.

3.4. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC - MS)

The GC/MS Postrun analysis Program was used to process the raw data for spectral analysis. The compounds identified by GC/MS are listed in Table 9.

Table 9

Substances identified (% relative area) in the dichloromethane and hexane fractions.

Fractions	Identified substances	% Area	M ⁺	Formula	Rt
DLEN	Glycerol	13.35	308	C ₃ H ₈ O ₃	14.055
	Palmitic acid	8.51	328	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	35.931
	2,3-Dihydroxypropyl hexadecanoate	7.18	330	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	47.356
	Linalool oxide	6.35	170	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	17.981
	Protocatechuic acid	1.25	370	C ₇ H ₆ O ₄	30.703
	Azelaic acid	0.94	332	C ₉ H ₁₆ O ₄	30.022
	Glycerol-3-phosphate	0.90	460	C ₃ H ₉ O ₆ P	29.665
	Stearic acid	0.50	356	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	40.309
HLEN	Palmitic acid	23.67	328	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	35.931
	Methyl octadecanoate	10	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	37.763
	Elaidic acid	8.52	354	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	39.784
	Methyl oleate	6.84	296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	37.177
	Methyl linoleate	6.36	294	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	37.022
	Beta sitosterol	4.18	414	C ₂₉ H ₅₀ O	60.531
	Beta amyirin	3.12	498	C ₃₀ H ₅₀ O	60.724
	Lupeol acetate	1.81	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	61.846
	Tetratriacontane	0.73	478	C ₃₄ H ₇₀	47.241
	Tetracosane	0.73	338	C ₂₄ H ₅₀	45.363
	2,3-Dihydroxypropyl hexadecanoate	0.64	330	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	47.356
	Tetradecanoic acid	0.62	300	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	31.166
	Methyl heptadecanoate	0.61	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	35.455
	Neophytadiene	0.51	278	C ₂₀ H ₃₈	30.819
	Docosane	0.45	296	C ₂₂ H ₄₆	43.401
	Butyl hexadecanoate	0.43	312	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	39.035
(6R)-6,10,14-trimethylpentadecan-2-one	0.22	268	C ₁₈ H ₃₆ O	31.045	
DBEN	Glycerol	5.31	308	C ₃ H ₈ O ₃	14.055
	Protocatechuic acid	2.75	370	C ₇ H ₆ O ₄	30.703
	Malic acid	2.63	134	C ₄ H ₆ O ₅	21.63
	Glyceric acid	1.64	106	C ₃ H ₆ O ₄	16.488
	Oxalic acid	1.47	90	C ₂ H ₂ O ₄	17.726
	Succinic acid	0.99	118	C ₄ H ₆ O ₄	15.681
	Propane-1,3-diol	0.98	76	C ₃ H ₈ O ₂	14.112
	4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid	0.56	168	C ₈ H ₈ O ₄	9.646
	3-Hydroxypropanoic acid	0.43	90	C ₃ H ₆ O ₃	29.22
	Palmitic acid	0.41	328	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	35.931
HBEN	Methyl hexadecanoate	16.59	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	33.117
	Lupeol acetate	11.41	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	61.846
	Palmitic acid	9.99	328	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	35.931
	Elaidic acid	8.36	354	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	39.784
	Methyl linoleate	8.25	294	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	37.022
	Beta sitosterol	6.22	414	C ₂₉ H ₅₀ O	60.531
	Methyl octadecanoate	5.81	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	37.763
	Germanicol	3.69	426	C ₃₀ H ₅₀ O	60.259
	Stigmasterol	1.67	484	C ₂₉ H ₄₈ O	59.286
	Campesterol	1.33	400	C ₂₈ H ₄₈ O	58.665
	2,3-Dihydroxypropyl hexadecanoate	1.16	330	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	47.356
	Beta-amyirin	1.12	498	C ₃₀ H ₅₀ O	60.724
	Glyceryl monooleate	1.08	356	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	50.39

	Methyl heptadecanoate	0.99	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	35.455
	Lupenone	0.65	424	C ₃₀ H ₄₈ O	61.021
	Methyl tetracosanoate	0.86	382	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	49.719
	Methyl docosanoate	0.33	354	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	46.035
DSBEN	Methyl octadecanoate	19.93	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	14.131
	Methyl hexadecanoate	16.14	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	33.117
	Butane-1,3-diol	10.31	90	C ₄ H ₁₀ O ₂	37.763
	Ácid (9Z)-Octadeca-9-enoico	9.27	354	C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si	39.75
	Lupeol acetate	9.14	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	61.846
	Palmitic acid	7.60	328	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	35.931
	4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid	7.57	168	C ₈ H ₈ O ₄	29.22
	Beta-sitosterol	6.21	414	C ₂₉ H ₅₀ O	60.531
	Methyl oleate	3.12	296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	37.177
	Methyl tetracosanoate	2.23	382	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	49.719
	Stigmasterol	1.98	484	C ₂₉ H ₄₈ O	59.286
	Glycerol	1.93	308	C ₃ H ₈ O ₃	14.055
	Protocatechuic acid	1.61	370	C ₇ H ₆ O ₄	30.703
	Gorgosterol	1.43	426	C ₃₀ H ₅₀ O	60.924
	Glyceryl monooleate	1.37	356	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	50.39
	Methyl docosanoate	1.32	354	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	46.035
	Campesterol	1.25	400	C ₂₈ H ₄₈ O	58.665
	Malic acid	1.06	134	C ₄ H ₆ O ₅	21.63
	Ácid (11Z)-Octadeca-11-enoico	1.05	354	C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si	39.876
	Lupenone	0.98	424	C ₃₀ H ₄₈ O	61.021
	Beta-amyrin	0.95	498	C ₃₀ H ₅₀ O	60.724
	Methyl heptadecanoate	0.95	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	35.455
	2,3-Dihydroxypropyl hexadecanoate	0.56	330	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	47.356
	p-Hydroxybenzoic acid	0.56	138	C ₇ H ₆ O ₃	25.365
	Butane-1, 2, 3,4-Tetrol	0.42	122	C ₄ H ₁₀ O ₄	22.405
HSBEN	Methyl (E)-Octadec-11-enoate	20.98	296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	37.213
	Methyl hexadecanoate	16.14	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	33.117
	Glyceryl monooleate	10.54	356	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	50.39
	Lupeol acetate	9.14	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	61.846
	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)	8.69	294	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	37.038
	Palmitic acid	7.60	328	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	35.931
	Beta-Sitosterol	6.21	414	C ₂₉ H ₅₀ O	60.531
	9-Octadecenoic acid	3.12	296	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	37.297
	Methyl octadecanoate	3.06	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	37.763
	Methyl tetracosanoate	2.23	382	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	49.719
	Stigmasterol	1.98	484	C ₂₉ H ₄₈ O	59.286
	Methyl docosanoate	1.32	354	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	46.035
	Campesterol	1.25	400	C ₂₈ H ₄₈ O	58.665

	Lupenone	0.98	424	C ₃₀ H ₄₈ O	61.021
	Beta-amyrin	0.95	498	C ₃₀ H ₅₀ O	60.007
	Methyl heptadecanoate	0.95	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	35.455
	7,10-Hexadecadienoic acid	0.92	266	C ₁₆ H ₂₈ O ₂	32.003
	Propyl hexadecanoate	0.79	474	C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si ₂	47.357
DSEN	Elaidic acid	15.93	354	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	39.784
	Methyl (E)-Octadec-11-enoate	9.25	296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	37.213
	Beta-Sitosterol	7.59	414	C ₂₉ H ₅₀ O	60.531
	Methyl linoleate	7.51	294	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	37.022
	Palmitic acid	5.42	328	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	35.931
	Methyl hexadecanoate	5.42	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	33.117
	Glyceryl monooleate	2.01	356	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	50.39
	Lupeol acetate	1.79	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	61.846
	Campesterol	1.70	400	C ₂₈ H ₄₈ O	58.665
	Methyl heptadecanoate	1.05	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	35.455
	4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid	0.62	168	C ₈ H ₈ O ₄	29.22

The compounds in the derivatized extracts were identified based on their fragmentation patterns observed in the mass spectra. They were compared to a database integrated into the instrument (with over 90% similarity) and corroborated with literature data. Quantification was performed by calculating the relative percentage of each peak area. Major compounds were defined as those with the highest area percentages. The results revealed that palmitic acid, glycerol, beta-sitosterol, methyl linoleate, methyl hexadecanoate, linoleic acid and lupeol acetate were found in the leaves, branches, stem bark and stem.

The results revealed that the predominant compounds in the DLEN fraction were glycerol (13.35%), palmitic acid (8.51%), and glyceryl palmitate (7.18%). In the HLEN fraction, Palmitic acid (23.67%) and methyl hexadecanoate (16.58%) were the major components. In the DBEN fraction, the predominant compounds were glycerol (5.31%), methyl 3,4-dihydroxybenzoate (2.75%) and malic acid (2.63%), while the HBEN fraction presented Methyl hexadecanoate (16.59%), Lupeol acetate (11.41%), Palmitic acid (9.99%), as predominant compounds. In the DSBEN fraction, Methyl octadecanoate (19.93%), Methyl hexadecanoate (16.14%), and Acid (9Z)-octadeca-9-enoic (9.27%) were identified as major components. The HSBEN fraction presented as major components Methyl (E)-Octadec-11-enoate (19.93%), Methyl hexadecanoate (16.14%) and Trimethylsilyl (9E)-9-Octadecenoate (9.27%). In the DSEN fraction, the compounds that occupied the largest area were Elaidic acid (15.93%), (11E)-Octadec-11-Methyl enoate (7.72%) and Beta-sitosterol (7.59%).

3.5. Antimicrobial activity

The antimicrobial activity assays performed with different extracts and fractions of *E. nummularium* (Tables 10 and 11) were evaluated against *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, and *Staphylococcus aureus* (ATCC strains and clinical isolates). The results revealed that while some fractions exhibited significant antimicrobial activity, others were inactive at the tested concentrations.

For *S. mutans*, the MSBEN, DSBEN, and ESBEN fractions demonstrated notable activity. The MSBEN fraction exhibited a 1000 µg/mL MIC against ATCC 700610 and ATCC 25175. Meanwhile, the DSBEN and ESBEN fractions showed MIC values of 500 µg/mL against ATCC 700610 and 1000 µg/mL against ATCC 25175. However, none of the fractions exhibited significant activity against *S. sobrinus* at the tested concentrations.

The results for *S. aureus* were more promising, particularly against clinical isolates. The DLEN fraction displayed the highest efficacy, with an MIC of 62.5 µg/mL for isolates 29 and 92. Similarly, the ELEN and BLEN fractions showed comparable MIC values, reinforcing their potential. The DBEN fraction also demonstrated a MIC of 62.5 µg/mL, albeit against isolate 16A. Other fractions, such as MLEN and HLEN, showed MIC values of 125 or 250 µg/mL against isolates 29 and 92, indicating relevant antimicrobial potential. Fractions such as MBEN (isolate 16A), DSBEN (ATCC, isolates 112 and 92), ESBEN (isolate 92), and BSBEN (isolate 112) also displayed promising antimicrobial activity, with MIC values of 500 µg/mL. Overall, the crude methanolic extracts exhibited low antimicrobial activity. In contrast, fractions obtained through partitioning with polar and non-polar solvents demonstrated higher efficacy, particularly against *S. aureus*.

Table 10

Antimicrobial activity of methanolic extracts and fractions of *E. nummularium*.

	<i>S. mutans</i> ATCC 700610		<i>S. mutans</i> ATCC 25175		<i>S. sobrinus</i> 6715	
	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
MLEN	#	#	1000	#	#	#
DLEN	#	#	#	#	#	#
HLEN	#	#	1000	#	#	#
ELEN	#	#	#	#	#	#
BLEN	500	#	#	#	#	#
MBEN	#	#	#	#	#	#
DBEN	#	#	#	#	#	#
HBEN	#	#	#	#	#	#
EBEN	#	#	#	#	#	#
BBEN	#	#	#	#	#	#
MSBEN	1000	#	1000	#	#	#
DSBEN	500	#	1000	#	#	#
HSBEN	#	#	#	#	#	#
ESBEN	500	#	1000	#	#	#
BSBEN	#	#	#	#	#	#

MSEN	#	#	#	#	#	#	#
DSEN	#	#	#	#	#	#	#
ESEN	#	#	#	#	#	#	#
BSEN	#	#	#	#	#	#	#

There was no antimicrobial activity at the concentrations tested (31.25 to 1000 µg/mL)

Table 11

Antimicrobial activity of methanolic extracts and fractions of *E. nummularium*

	<i>S. aureus</i> ATCC		Isolated 16A		Isolated 112		Isolated 29		Isolated 92	
	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
MLEN	#	#	#	#	#	#	125	1000	125	1000
DLEN	#	#	#	#	#	#	62.5	1000	62.5	500
HLEN	#	#	1000	#	#	#	125	#	250	1000
ELEN	#	#	#	#	#	#	62.5	1000	62.5	500
BLEN	#	#	#	#	#	#	62.5	#	62.5	#
MBEN	#	#	500	#	#	#	#	#	#	#
DBEN	#	#	62.5	1000	#	#	#	#	#	#
HBEN	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
EBEN	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
BBEN	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
MSBEN	1000	#	#	#	1000	#	#	#	1000	#
DSBEN	500	#	#	#	500	#	#	#	500	#
HSBEN	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
ESBEN	1000	#	#	#	1000	#	#	#	500	#
BSBEN	#	#	#	#	500	#	#	#	#	#
MSEN	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
DSEN	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
ESEN	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
BSEN	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#

There was no antimicrobial activity at the concentrations tested (31.25 to 1000 µg/mL).

3.6. Lethality for *Artemia salina*

The lethality evaluation against *Artemia salina* allowed for determining the LD₅₀ (median lethal dose) of methanolic extracts and fractions obtained from various organs of *E. nummularium*. LD₅₀ values (Table 12) were classified as highly active (LD₅₀ < 100 µg/mL), moderately active (LD₅₀ between 100 and 500 µg/mL), weakly active (LD₅₀ between 501 and 1000 µg/mL), and inactive (LD₅₀ > 1000 µg/mL), based on established literature criteria (David et al., 2001; Hamimed et al., 2018).

The methanolic extracts exhibited moderate toxicity for branches (LD₅₀ = 91.24 µg/mL) and weak toxicity for the stem bark, stems, and leaves, with LD₅₀ values ranging from 227.3 to 466.2 µg/mL.

Hexane fractions demonstrated the highest toxicity among all tested fractions. They were classified as highly active for branches and stem bark and moderately active for leaves,

suggesting the presence of potent bioactive compounds in the nonpolar extracts. Similarly, dichloromethane fractions displayed high activity for branches ($LD_{50} = 94.77 \mu\text{g/mL}$) and stem bark ($LD_{50} = 81.31 \mu\text{g/mL}$). These fractions were moderately active for leaves and stems, with LD_{50} values of $178.8 \mu\text{g/mL}$ and $373 \mu\text{g/mL}$, respectively.

Ethyl acetate fractions were classified as inactive for leaves but showed moderate activity for other organs, with LD_{50} values ranging from $211.5 \mu\text{g/mL}$ (stem bark) to $355 \mu\text{g/mL}$ (stems). Butanolic fractions demonstrated moderate activity for the stem bark, branches, and stems, with LD_{50} values ranging from $100.6 \mu\text{g/mL}$ to $479.3 \mu\text{g/mL}$. This fraction exhibited weak activity for leaves, with an LD_{50} of $832.4 \mu\text{g/mL}$.

These findings highlight the higher toxicity of nonpolar fractions than more polar ones, particularly in the stem bark, indicating the significant role of lipophilic bioactive compounds in the observed effects.

Table 12

Toxicity of methanolic extracts and fractions of *E.nummularium*.

Extract, phases and pattern /Plant organ	Leaves $LD_{50} \mu\text{g/mL}$	Branches $LD_{50} \mu\text{g/mL}$	Stem bark $LD_{50} \mu\text{g/mL}$	Stem $LD_{50} \mu\text{g/mL}$
Methanolic extracts	466.2	91.24	227.3	254.8
Hexane	124.1	19.08	14.29	#
Dichloromethane	178.8	94.77	81.31	373
Ethyl acetate	Inactive	306.2	211.5	355
Butanol	832.4	300.7	100.6	479.3

Not carried.

3.7. Effects of ELEN extract on acetic acid induced abdominal writhes

The evaluation of the ELEN fraction's effects on the number of abdominal writhes induced by 0.6% acetic acid is presented in Figure 2. The doses of 6.25 , 12.5 , and $25.0 \mu\text{g/mL}$ of the ELEN fraction significantly reduced the number of writhes ($p < 0.05$) compared to the control group, demonstrating notable antinociceptive efficacy at these concentrations. In contrast, the $50 \mu\text{g/mL}$ dose, although showing a tendency toward reduction, did not exhibit a statistically significant difference relative to the control. These findings suggest that the ELEN fraction possesses antinociceptive activity at specific doses, with greater effectiveness observed at lower tested concentrations.

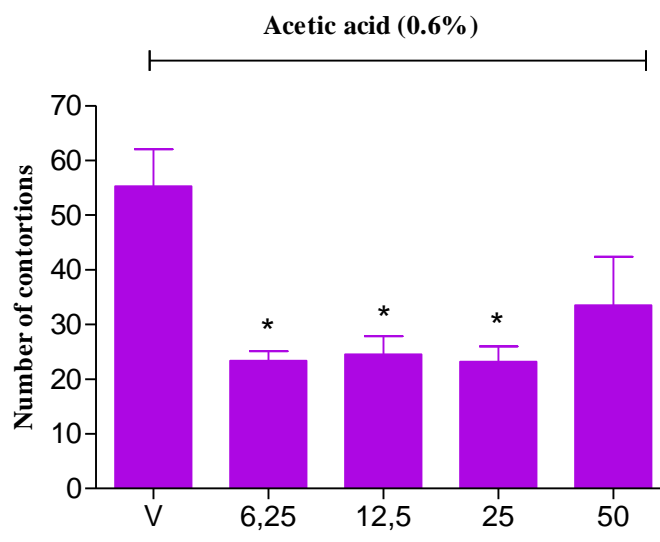


Fig.2. Effect of ELEN fraction treatment on acetic acid-induced nociceptive response. Animals were treated with doses of 6.25, 12.5, 25, and 50 mg/kg. V: Vehicle (control group). * Indicates a significant difference.

3.8. Acute Toxicity

No mortality was observed in any mouse treated with the ELEN fraction at a dose of 2000 mg/kg. Additionally, none of the animals exhibited clinical signs of toxicity, such as tremors, paralysis, or skin lesions, during the 15-day observation period. At the end of the study, all animals were euthanized, and blood samples were collected for a complete blood count (CBC) analysis.

Table 13 presents the hematological parameters after 15 days of treatment, including mean values, standard deviations, and reference ranges. No significant abnormalities were observed in the white blood cell (WBC) count, red blood cell (RBC) count, or hemoglobin (HGB) levels when compared to the control group. However, certain variations were noted within the reference range. For example, lymphocyte percentage (LYM%) in the treated group was slightly elevated, while hematocrit (HCT%) and mean platelet volume (MPV) showed mild deviations from the control group values.

No macroscopic alterations were observed in the organs during necropsy, further supporting the non-toxic profile of the ELEN fraction at the tested dose.

Table 13

Hematological parameters after 15 days of treatment with the ELEN fraction. Values are expressed as mean \pm standard deviation (n = 6). Reference ranges are provided for comparison. Data were obtained using an automated hematological analyzer.

Complete blood count	Control	ELEN	Reference values
WBC $\times 10^3/L$	4.8 \pm 0.62	2.8 \pm 1.77	2.9-15.3
LYM $\times 10^3/L$	3.4 \pm 0.56	2.8 \pm 1.58	2.6-13.5
MID $\times 10^3/L$	0.7 \pm 0.04	0.2 \pm 0,08	up to 0.8
GRA $\times 10^3/L$	0.6 \pm 0.03	0.37 \pm 0,12	0.4-3.2
LYM %	71.6 \pm 2.3	76.13 \pm 6.67	63.7-90.1
MID %	15.5 \pm 1.2	9.8 \pm 3.77	10-20
GRA %	12.9 \pm 1.6	12.13 \pm 2.15	7.3-30.1
RBC	7.79 \pm 0.3	7.23 \pm 2.56	5.6-7.89
HGB	14.4 \pm 7.8	11.6 \pm 3.96	14.5-16.9
HCT %	40.4 \pm 1.8	35.47 \pm 12.52	36-46
MCV fl	46.9 \pm 1.2	49.2 \pm 0.14	47.1-47.8
MCH pg	19.5 \pm 1.3	16.1 \pm 0.37	16.0-23.1
MCHC g/L	32.5 \pm 5.4	32.9 \pm 0.70	32.4-32.8
RDW %	14.7 \pm 1.1	16.93 \pm 0.25	11.0-15.5
PLT $\times 10^3/$	736 \pm 159	669.33 \pm 178.17	100-1610
MPV fl	6.2 \pm 1.2	7.23 \pm 0.31	3.8-6.2
PDW fl	7.7 \pm 1.5	15.1 \pm 0.24	7-23

Abbreviations: WBC, White blood cell count; LYM, lymphocytes; MID, cells include less frequently occurring and rare cells correlating to monocytes; GRA, granulocytes; RBC, red blood cell count; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular or cell volume; MCH, mean corpuscular or cell hemoglobin; MCHC, mean corpuscular or cell hemoglobin concentration; RDW, red cell distribution width; PLT, platelet count; MPV, mean platelet volume; PDW, platelet distribution width.

4. Discussion

In the present study, the antioxidant activity of plant extracts was evaluated by correlating TPC/TFC to the DPPH, β -carotene/linolenic acid and total antioxidant capacity (TAC) assays. In this analysis, the results of the antioxidant assays differed between the fractions. For all organic phases analyzed, the hexane fraction, for example, showed the highest EC_{50} in all the organs tested, indicating low antioxidant activity. The low antioxidant activity in the hexane fractions indicates that the active compounds are likely to be polar, such as phenolics and flavonoids, which are known for their antioxidant properties. This suggests that the antioxidant compounds present in *E.nummularium* are more polar. This condition can be attributed to the polarity of the elements, which is important in attracting free radicals (Carey et al., 2011; Cordeiro et al., 2018; Floegel et al., 2011; Samec et al., 2021). In these

circumstances, it is probable that the nonpolar character of hexane did not favour the extraction of these components. However, the other fractions showed satisfactory action, but with some differences between the organs. The dichloromethane fraction, for example, showed good results in leaves and branches, but the activity was less pronounced in the bark of the stem and stem. The ethyl acetate phase, in turn, consistently showed good antioxidant activity in all organs, standing out as one of the most promising fractions. The butanolic fraction also showed good results, especially in the leaves and bark of the stem, indicating the presence of significant antioxidant compounds. These results demonstrate that while there is no single plant organ with superior antioxidant activity in all fractions, the leaves and stem bark, in particular, exhibit promising antioxidant potential. In addition, ascorbic acid showed an EC_{50} of 201.5 ± 11.7 $\mu\text{g/mL}$, serving as a reference to evaluate the efficacy of extracts and fractions. Comparatively, several fractions of leaves, branches and stem bark proved to be standard, especially the dichloromethane and ethyl acetate fractions. The lower EC_{50} values in the leaves and stem bark, for example, suggest that these organs are rich in antioxidant compounds. Therefore, these results indicate that *E.nummularium* has a significant antioxidant potential, with variations depending on the organ and fraction tested. The ethyl acetate and dichloromethane fractions, in particular, have shown promise and deserve further investigation for the identification and isolation of the active compounds.

Regarding the correlation between TPC and TFC with antioxidant activities, the results indicate a significant relationship between the contents of total phenols and total flavonoids and the antioxidant activity of the different parts of the plants analyzed. These results showed a strong negative interdependence for all plants structures, except for the stem where the coefficient was positive in the correlations between DPPH and TFC, β -carotene and TPC, and TAC and TPC. The results of the correlation between TAC and TPC/TFC suggest that ethyl acetate fractions have a significant antioxidant potential, especially compared to the standards used, reinforcing the viability of *E.nummularium* as a source of natural antioxidant compounds. The correlation between the DPPH assay and the content of phenolics and total flavonoids was negative for leaves, branches and bark stem. The negative correlation between DPPH and TPC/TFC was expected, because the higher the phenolic content, the lower the EC_{50} . The high correlation between TPC and TFC can be attributed to the fact that both groups of phenolic compounds share common biosynthetic pathways and often coexist in correlated proportions in plant tissues. These correlations reinforce the importance of both types of compounds in determining the antioxidant capacity of the samples. In addition, these data allowed us to analyze a higher prevalence of phenolics than flavonoids in the leaves, branches, stem bark and stem of the species *Erythroxylum nummularium*. However, this fact contrasted with the study conducted by Barreiros et al., 2002, where the presence of flavonoids in the leaves was higher. Both flavonoids and phenolics have antidiabetic, anticancer, anti-inflammatory, antimicrobial, and protective effects against cardiovascular disease (Cianciosi et al., 2018; Lewandowska et al., 2014; Perea e Teissedre, 2017). In relation to the present study, the presence of other chemical constituents was also verified by means of gas chromatography coupled to GC/MS mass spectrometry.

The extracts dichloromethane (leaves and stem) and hexane (leaves and stem) of *E.nummularium* frequently showed palmitic acid and beta-sitosterol. Other constituents identified by GC-MS were gallic acid with 6.62% in the DSBEN fraction and protocatechuic

acid with 1.25% in the DLEN portion. These substances have proven anti-cancer, anti-inflammatory, analgesic, and antioxidant effects (Bai et al., 2021; Semaming et al., 2015; Zhang et al., 2021), its distribution in the aforementioned organs may have influenced the differences observed in the DPPH, β -carotene, and CAT assays, especially in the fraction, with values of EC_{50} of 42.2 $\mu\text{g/mL}$ in the second, and EC_{50} 198.5 in the third. These dissimilarities may be caused by the way the extract is dissolved, an important step for the solubility of phytoconstituents, especially antioxidants (Mohapatra et al., 2021). In this context, DLEN metabolites in the β -carotene and TAC test were better dissolved. In addition, the composition in each fraction interfered with the efficacy of the antioxidant experiments.

In addition to the chemical constitution of the fractions, the DPPH assay resulted in a more significant antioxidant potential when compared to the other tests. This fact was observed by the lower absorbance values in the spectrophotometer. It was also found that all extracts in the DPPH assay have lower antioxidant activity in relation to the ascorbic acid standard, with EC_{50} of 33.2 $\mu\text{g/mL}$, except for the EBEN fraction with EC_{50} of 23 $\mu\text{g/mL}$. Regarding the ELEN fraction of the present study, with EC_{50} = 64.4 $\mu\text{g/mL}$, a similar result was found in the study by Barreiros et al., 2003, where the ethyl acetate portion of *E.nummularium* leaves also showed considerable antioxidant activity (EC_{50} =171.68). This potential is due to the number of phenolic hydroxyls present in the extracts and available to donate hydrogen radical to the radical (Barreiros et al., 2003). On the other hand, it was observed in the beta-carotene assay that the hexane, methanolic extract fractions of the stem and butanolic portions of the stem and branches showed lower action compared to the standard AA. In the total antioxidant capacity (CAT), only the ESBEN fraction exhibited lower action in parallel to quercetin. Therefore, despite these observations, the DPPH assay remains the most efficient. The ranking orders in relation to the highest activity by the assays were: DPPH > β -carotene > CAT. In addition, the highest efficiency for this experiment was also due to the use of lower concentrations of extract, especially for EBEN with 25 $\mu\text{g/mL}$, stem bark methanol with 50 $\mu\text{g/mL}$ and ELEN with 75 $\mu\text{g/mL}$, required to sequester 50% DPPH. Among the amounts of extracts tested, the ethyl acetate fraction of the Branches was the lowest to retain half of the free species, where it was possible to reduce molecules with only 25 $\mu\text{g/mL}$ of sample. In the other assays, a pattern of concentrations varying between 50, 100, 150, 200 and 250 $\mu\text{g/mL}$ was followed. On the other hand, the phosphomolybdate (CAT) method showed the lowest elimination activity in all fractions examined, compared to the DPPH and β -carotene assays. Thus, in view of the promising effects of the four plant structures, the antimicrobial action for each fraction was investigated.

The antimicrobial activity of fractions from *E. nummularium* is likely associated with bioactive compounds such as flavonoids, alkaloids, and fatty acids identified in the phytochemical analyses. The notable effectiveness of the DLEN, ELEN, and BLEN fractions against *S. aureus* suggests that polar compounds may be primarily responsible for the antimicrobial activity observed against this pathogen. This finding is particularly significant as *S. aureus* is a known agent of multidrug-resistant infections (Tang et al., 2019).

The absence of activity against *S. sobrinus* could be attributed to structural or metabolic differences between the tested strains. In contrast, the moderate activity observed against *S. mutans* indicates that specific fractions might be preventive agents in controlling dental caries. This aligns with reports of antimicrobial activity from other *Erythroxylum* species, although

variability across studies emphasizes the influence of chemical composition and extraction methods (Wet, 2011; Loyola et al., 2020).

Interestingly, while the DLEN, ELEN, and BLEN fractions demonstrated a higher abundance of phenolic compounds, flavonoids, tannins, and steroids, the hexane extract of leaves (HLEN) exhibited activity despite a lower phenolic and flavonoid content. The tannins present in this fraction may have influenced its efficacy, particularly against specific *S. aureus* isolates, such as strains 29 and 92. Tannins are well-documented for their antibacterial properties, including growth inhibition, biofilm prevention, and modulation of host cell membranes to resist bacterial toxins (Nguyen et al., 2022; Pauter et al., 2020).

In the study by Loyola et al. (2020), the ethanolic extract of *E. coca* leaves demonstrated antibacterial activity against *S. mutans* ATCC 25175. Similarly, our study observed antibacterial activity against the same strain of *S. mutans*, corroborating the findings of Loyola et al. (2020). However, when comparing our study with other species of the genus *Erythroxylum*, it becomes evident that antibacterial activity is not always consistent. For instance, Aguiar et al. (2012) reported no antimicrobial action in most fractions of *E. caatingae* Plowman tested against *S. aureus*. In our study, it was *S. sobrinus* that showed resistance, with its growth not affected by the extracts and fractions evaluated.

The relatively good results for some fractions' minimum inhibitory and bactericidal concentrations indicate the need for further studies focused on purifying active compounds and evaluating potential synergistic effects between the constituents. Furthermore, evaluations in more complex biological models, such as biofilms, may provide valuable information on the clinical potential of these extracts and fractions. The findings of this work highlight the possibility of *E. nummularium* as a source of antimicrobial compounds, particularly for clinically relevant pathogens such as *S. aureus*.

Another biological action investigated in this study involved the determination of the harmful profile of *E. nummularium*, using the species *Artemia salina* as an *in vitro* model. The toxic potential of the phases of *E. nummularium* was evaluated by the number of surviving nauplii. In this bioassay, it is customary to handle crustaceans due to their increased sensitivity, even in contact with mild levels of harmful substances and contaminants (Ntungwe et al., 2020). Moreover, these organisms adapt well to laboratory conditions, which supports their suitability for such studies.

In this work, hexane fractions exhibited the highest toxicity among the extracts and fractions tested. These fractions were classified as highly or moderately toxic, with LD₅₀ values ranging from 14.29 to 124.1 µg/mL, according to toxicity classifications by David et al., 2001 and Hamimed et al., 2018. Low LD₅₀ values often indicate the presence of compounds with antineoplastic properties, as there is a strong correlation between potent cytotoxic action and low LD₅₀ values (Spinelli et al., 2024; Rahamouz-Haghighi et al., 2024).

Rajabi et al., (2015) compared the *A. salina* bioassay with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay in various cell lines to evaluate cytotoxicity. They observed no statistically significant differences ($P > 0.05$) between the results of the two methods. This suggests that the *A. salina* assay is a viable alternative to *in vitro* cell culture assays, offering reduced cost advantages and faster toxicity screening. Our findings indicate that the methanolic extracts and fractions of *E. nummularium* exhibited toxicity, except ELEN. A previous study by Barreiros et al. (2007) demonstrated that the methanolic extract of the

leaves and the diterpene 6 α ,11 α -epoxy-14 α -methoxy-ryanodane-1 α ,5 β ,7 β ,11 β ,13 β -pentaol isolated from *E. nummularium* leaves showed no activity for the extract but significant activity for the isolated diterpene (LD₅₀ = 21.8 μ g/mL).

Additionally, species of the *Erythroxylum* genus are known for their antiproliferative and pro-apoptotic effects on cancer cells. For instance, Elias et al. (2016) reported that the hexane extract of *Erythroxylum daphnites* inhibited the proliferation of oral squamous cell carcinoma by 30%. Similarly, Filho et al. (2014) demonstrated that the diterpene 14-O-methyl-ryanodanol isolated from *Erythroxylum passerinum* exhibited cytotoxic effects on astrocytes and induced apoptosis, highlighting its potential as an anticancer agent. Other studies have reported that *Erythroxylum macrocalyx* produced tropane alkaloids capable of inhibiting cell proliferation in various cancer cell lines, including hepatocellular carcinoma and leukemia strains (Júnior et al., 2021). Notably, only one alkaloid was cytotoxic to all tested cell types.

Tropane alkaloids isolated from *Erythroxylum* species also demonstrated cytotoxicity (Aguiar et al., 2012). For example, Catuabin B, a tropane alkaloid isolated from *E. caatingae*, exhibited cytotoxicity against K562 (chronic myeloid leukemia) cells and induced apoptosis, as observed through fluorescence microscopy (Brito et al., 2020). Similarly, erythrobezerrine C, another alkaloid isolated from *Erythroxylum bezerrae*, showed moderate cytotoxicity against HCT-116 (colon adenocarcinoma) and NCI-H460 (lung cancer) cell lines.

This evidence suggests that *E. nummularium* is a promising candidate for further investigations of cytotoxic activity, given its potential to produce alkaloids and other bioactive substances, such as flavonoids, which are known for their anticancer properties (Al-Khayri et al., 2022; O'Neil et al., 2021; Shafabakhsh & Asemi, 2019). Isolation and structural elucidation of the compounds present in *E. nummularium* are necessary to better understand its toxicity. Furthermore, the LD₅₀ of ELEN being greater than 1000 μ g/mL indicates the potential safety of this fraction for *in vivo* biological assays.

Regarding the analgesic effect of ELEN, this study represents the first *in vivo* evaluation of the antinociceptive activity of an *E. nummularium* fraction using the acetic acid-induced abdominal writhing test in mice. The writhing test induced by acetic acid is a widely used method for assessing peripheral nociception and the potential antinociceptive properties of compounds (Dai et al., 2021). The mechanism of action of acetic acid involves the stimulation of nociceptors, sensory neurons that detect harmful chemical stimuli, triggering the release of pro-inflammatory mediators such as prostaglandins and nitric oxide (Tracey et al., 2017). These mediators activate pain perception, leading to protective behavioral responses.

The ELEN fraction exhibited significant antinociceptive activity, as demonstrated by a substantial reduction in abdominal writhing in the acetic acid-induced test. Notably, the lowest dose tested (6.25 mg/kg) achieved the most pronounced effect, reducing writhing by 63%, compared to the intermediate doses of 12.5 mg/kg (56%) and 25 mg/kg (57%). In contrast, the highest dose (50 mg/kg) did not exhibit a statistically significant difference compared to the vehicle control. This inverse dose-response relationship might suggest the involvement of receptor saturation or reduced bioavailability at higher doses, which warrants further pharmacokinetic and mechanistic investigations.

Phytochemical analyses of *E. nummularium* leaves by Barreiros et al. (2003) identified flavonoids such as epicatechin and quercetin, known for their well-established antinociceptive and anti-inflammatory properties. Quiñonez-Bastidas et al. (2017) further support these

findings, showing that epicatechin's antinociceptive effects are mediated through the activation of the NO-cyclic GMP-K⁺ channel pathway, as well as serotonergic (5-HT_{1A/1B/1D/5A}) and opioid ($\mu/\kappa/\delta$) receptors. Quercetin, on the other hand, alleviates pain by modulating neuronal excitability via mechanoreceptors and voltage-gated ion channels, inhibiting the Cox-2 pathway, and exerting both local anesthetic and anti-inflammatory effects, as demonstrated by Takeda et al. (2024). These mechanisms are likely responsible for the observed antinociceptive effects of the ELEN fraction, which align with reports of bioactive compounds inhibiting inflammatory and nociceptive mediators (Itou et al., 2022; Lim et al., 2022).

Previous studies have also highlighted the role of phenolic compounds commonly found in the genus *Erythroxylum* in modulating inflammatory responses (Restrepo et al., 2019). The antinociceptive properties observed in this study align with these findings and further support the potential of ELEN as a source of analgesic agents.

Moreover, the absence of statistical significance at the highest dose of 50 mg/kg could reflect the activation of compensatory mechanisms or receptor desensitization, phenomena described in pharmacological responses to high concentrations of bioactive compounds lead to downregulation or saturation of their target receptors (Takeda et al., 2024).

In summary, the ELEN fraction demonstrates significant potential as a source of antinociceptive agents, particularly due to the bioactivity of flavonoids such as epicatechin and quercetin. These findings justify additional studies to explore its pharmacological applications and contribute to developing novel analgesic therapies.

The acute toxicity assessment of the ELEN fraction, performed at a dose of 2000 mg/kg, revealed no mortality or overt clinical signs of toxicity in the treated mice. Throughout the 15-day observation period, all animals maintained normal physical and behavioral conditions, with no occurrences of tremors, paralysis, aggression, or skin lesions. These results suggest that the ELEN fraction has a favorable safety profile at the tested dose.

Hematological analyses further substantiated these findings, as most parameters, including white blood cell (WBC) count, red blood cell (RBC) count, and hemoglobin (HGB) levels, were within or close to the reference ranges. However, slight deviations were observed in some indices, such as a marginally elevated lymphocyte percentage (LYM%) and variations in hematocrit (HCT%) and mean platelet volume (MPV). While these changes were statistically insignificant, they highlight the importance of long-term studies to evaluate potential cumulative or subtle systemic effects.

The absence of macroscopic organ alterations during necropsy corroborates the low acute toxicity of the ELEN fraction. These findings align with prior studies on plant-derived bioactive fractions, which often demonstrate low toxicity at moderate doses due to their natural origin and selective bioactivity (Gupta et al., 2024). Despite the overall safety indicated by this study, certain hematological parameters, such as reductions in granulocyte (GRA) counts and alterations in red cell distribution width (RDW), warrant further investigation. These observations may reflect transient physiological adjustments rather than direct toxic effects, but their clinical relevance should be explored in chronic toxicity and mechanistic studies.

In conclusion, the ELEN fraction demonstrated no acute toxicity at a 2000 mg/kg dose, supporting its potential as a safe candidate for therapeutic applications. Future studies should focus on long-term toxicity evaluations and detailed pharmacological assessments to

substantiate these findings and facilitate the development of the ELEN fraction as a promising bioactive extract.

5. Conclusion

The chemical profile of the methanolic extracts and fractions derived from the leaves, branches, stem bark, and stem of *E. nummularium* exhibited significant variation in phenolic and flavonoid contents. These plant organs displayed diverse biological activities, including antioxidant, antimicrobial, and toxicological effects. Among the fractions, ELEN exhibited the highest total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC), contributing to its enhanced antioxidant capacity, antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* strains, and lower toxicity against *Artemia salina*. Furthermore, ELEN demonstrated antinociceptive properties by reducing the number of contortions in mice, indicating its potential as an analgesic agent. Toxicity assessment through the LD₅₀ test indicated that the ELEN fraction exhibited a favorable safety profile, with a lethal dose estimated above 2000 mg/kg. This suggests that ELEN may be safe for therapeutic applications at moderate doses, though further fractionation and purification are necessary to identify additional bioactive constituents and to clarify their specific mechanisms of action. In addition to ELEN, the EBEN and ESBEN fractions showed promising antioxidant activity, which correlates strongly with their respective phenolic and flavonoid content. Pearson's correlation analysis further reinforced the significant relationship between TPC and TFC with the antioxidant activities measured by DPPH, β -carotene, and total antioxidant capacity (TAC) assays. Notably, plant samples with elevated phenolic and flavonoid levels exhibited superior antioxidant performance, particularly the stem bark and branches, suggesting that these parts are key sources of bioactive compounds. These results highlight the potential of plant extracts rich in phenolic compounds and flavonoids as valuable sources of natural antioxidants, with implications for their application in the food and pharmaceutical industries. However, further research is required to explore these fractions' full chemical diversity and deepen our understanding of their mechanisms of action.

REFERENCES

- Aguiar, J.S et al., 2012. Antimicrobial, antiproliferative and proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from the stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 4124-4140, <https://doi.org/10.3390/ijms13044124>
- Ahmad, I et al., 2023. Neuroprotection against aluminum chloride-induced hippocampus damage in albino wistar rats by *Leucophyllum frutescens* (Berl.) I.M Johnst. Leaf extracts: A detailed insight into phytochemical analysis and antioxidant and enzyme inhibition assays. *Frontier in Bioscience Landmark* 28, 1-14, <https://doi.org/10.31083/j.fbl2808184>
- Al-Khayri, J.M et al., 2022. Flavonoids as potential anti-inflammatory molecules: A review. *Molecules* 27, 1-24, <https://doi.org/10.3390/molecules27092901>
- Almeida, K.P et al., 2019. Prospecção fitoquímica do extrato vegetal de *Piper mollicomum* Kunth (Piperaceae) e seu potencial antimicrobiano. *Revista Gestão e Sustentabilidade ambiental* 8, 550-565, <https://doi.org/10.19177/rgsa.v8e32019550-565>
- Amorim, A.F.V., 2019. Métodos cromatográficos.1. ed. Fortaleza: Editora da Universidade Estadual do Ceará.
- Aragon, A et al., 2017. Determination of monoamine neurotransmitters in Zebrafish (*Danio rerio*) by gas chromatography coupled to mass spectrometry with a two-step derivatization. *Analytical and Bioanalytical chemistry* 409, 2931-2939, <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0239-4>
- Bai, J et al., 2021. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 133, 1-14, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110985>
- Barreiros, A.L.B.S et al., 2003. Atividade antioxidante de substâncias presentes em *Dioclea violacea* e *Erythroxylum nummularia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 13, 8-11, <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2003000400004>
- Barreiros M.L et al., 2002. Fatty acid Esters of Triterpenes from *Erythroxylum passerinum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 13, 669-673, <https://doi.org/10.1590/S0103-50532002000500021>
- Barreiros, M.L et al., 2007. Ryanodane diterpenes from two *Erythroxylum* species. *Science direct* 68, 1735-1739, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.05.007>
- Barros, I.M.C et al., 2017. Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Erythroxylum suberosum* A.St. Hil. leaves. *Journal of applied pharmaceutical Science* 7, 88-94, [10.7324/JAPS.2017.70314](https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70314)
- Berra, C.M., Menck, C.F.M., 2006. Oxidative stress, genome lesions, and signaling processes in cell cycle control. *Química nova* 29, 1340-1344, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600032>
- Bhatti, J.S., Bhatti, G.K., Reddy, P.H., 2017. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders- A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys* 5, 1-32, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1994. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 28, 25-30, [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brito, L.S.O et al., 2020. Tropane alkaloids from the stem bark of *Erythroxylum bezerrae* Plowman. *Phytochemistry* 178, 1-9, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112458>
- Campos, G.B et al., 2012. Isolation, molecular characteristics and desinfection of methicillin-

- resistance *Staphylococcus aureus* from ICU units in Brazil. *New Microbiologica* 35, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.11.003>
- Carey, F.A., 2011. Organic chemistry, in: Carey, F.A, The structure determines the properties. Virginia, pp. 36-85.
- Ciansiosi, D et al., 2018. Phenolic compounds in Honey and their associated Health benefits: A review. *Molecules*, 1-20, <https://doi.org/10.3390/molecules23092322>
- Clarkson, C et al., 2004. In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *Journal of ethnopharmacology* 92, 177-191, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.011>
- Cordeiro, B.M.P.C et al., 2018. Hexane extract from *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves has antioxidant activity and is an anti *-Candida* agent by causing mitochondrial and lysosomal damages. *BMC Complementary and alternative medicine* 284, 1-10, [10.1186/s12906-018-2350-2](https://doi.org/10.1186/s12906-018-2350-2)
- Dai, G et al., 2021. Synergistic interaction between matrine and paracetamol in the acetic acid writhing test in mice. *European Journal of Pharmacology* 895, 1-9, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173869>
- David, JP et al., 2001. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico *Eriope blanchetii*. *Química Nova* 24, 730-733, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000600004>
- Dong, G et al., 2018. Antimicrobial and anti-biofilm activity of tannic acid against *Staphylococcus aureus* 32, 2225-2228, <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1366485>
- Elias, S.T et al., 2016. Cytotoxic effect of *Erythroxylum daphnites* extract is associated with G1 cell cycle arrest and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *Cell cycle* 15, 948-956, <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1151583>
- Farooq, S et al., 2022. Preliminary phytochemical analysis: In vitro comparative evaluation on anti-arthritic and anti-inflammatory potential of some traditionally used medicinal plants. *Dose- response* 20, 1-8, <https://doi.org/10.1177/15593258211069>
- Filho, N.J.M et al., 2014. Cytotoxicity of the Diterpene 14-O- Methyl-ryanodanol from *Erythroxylum passerinum* in an Astrocytic Cells Model. *Natural product communications* 9, 1245-1248. [10.1177/1934578X1400900906](https://doi.org/10.1177/1934578X1400900906)
- Floegel, A et al., 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods 24, 1-16. [10.1186/s12906-018-2350-2](https://doi.org/10.1186/s12906-018-2350-2)
- Fu, Y et al., 2019. Screening techniques for the identification of bioactive compounds in natural products. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 168, 189-200, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.02.027>
- Ghasemzadeh, A et al., 2015. Secondary metabolites constituents and antioxidant, anticancer and antibacterial activities of *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Sm grown in different locations of Malaysia. *BMC Complementary medicine and therapies* 15, 1-10, <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0838-6>
- Gupta, M et al., 2024. Lead toxicity in plants: mechanistic insights into toxicity, physiological responses of plants and mitigation strategies. *Plant signaling & Behavior* 19, 1-21, <https://doi.org/10.1080/15592324.2024.2365576>
- Guan, R et al., 2023. Ethanol extract of propolis regulates type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 310, 1-14, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116385>
- Hamimed, S et al., 2018. Bioactivity-guided isolation of alkamides from a cytotoxic fraction of the ethyl acetate extract of *Anacyclus pyrethrum* (L.) DC. roots. *Scienco Current Issues in Pharmacy and medical sciences* 31, 180-185, <https://doi.org/10.1515/cipms-2018-0033>
- Hirata, M et al., 2009. Naringin suppresses osteoclast formation and enhances bone mass in mice. *Journal of Health Science* 55, 463-467, <https://doi.org/10.1248/jhs.55.463>

- Hussen, E.M., Endalew, S.A., 2023. In vitro antioxidant and free-radical scavenging activities of polar leaf extracts of *Vernonia amygdalina*. BMC Complementary medicine and therapies 23, 1-12, <https://doi.org/10.1186/s12906-023-03923-y>
- Itou, H., Toyota R., Takeda M., 2022. Phytochemical quercetin alleviates hyperexcitability of trigeminal nociceptive neurons associated with inflammatory hyperalgesia comparable to NSAIDs. Molecular Pain 18, 1-11, [10.1177/17448069221108971](https://doi.org/10.1177/17448069221108971)
- Jan, S et al., 2013. Assessment of antioxidant potential, total phenolics and flavonoids of different solvent fractions of *Monotheca buxifolia* Fruit. Osong public Health and research perspectives, <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2013.09.003>
- Júnior, L.J.S et al., 2021. A new tropane alkaloid and other metabolites from *Erythroxylum macrocalyx* (Erythroxylaceae) and their antiproliferative activities. Phytochemistry letters 41, 168-174, <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.11.019>
- Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. The Scientific World Journal, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Lewandowska, U et al., 2014. Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. Index Copernicus international 68, 528-540, <https://doi.org/10.5604/17322693.1102278>
- Lim, E.Y., Lee, C., Kim, Y.T., 2022. The antinociceptive Potential of *Camellia japonica* Leaf extract, (-) - Epicatechin, and rutin against chronic constriction injury-induced neuropathic Pain in Rats. Antioxidants 11, 1-20, [10.3390/antiox11020410](https://doi.org/10.3390/antiox11020410)
- Loyola, D et al., 2020. Ethanol extract of *Schinus molle* L. (*Molle*) and *Erythroxylum coca* Lam (*coca*): Antibacterial properties at different concentrations against *Streptococcus mutans*: An *in vitro* study. Journal of international society of preventive & community dentistry 10, 579-584, [10.4103/jispcd.JISPCD_237_20](https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD_237_20)
- Macedo, T.B.C et al., 2020. Cytotoxic effect of *Erythroxylum suberosum* combined with radiotherapy in head and neck cancer cell lines. Brazilian Dental Journal 27, 108-112. [10.1590/0103-6440201600014](https://doi.org/10.1590/0103-6440201600014)
- Mahomoodally, M.F et al., 2008. Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of Mauritius. Pharmaceutical biology 43, 237-242, <https://doi.org/10.1080/13880200590928825>
- Malfa, G.A et al., 2023. Chemical, Antioxidant and Biological studies of *Brassica incana* subsp. *raimondoi* (Brassicaceae) leaf extract. Molecules 28, 2-17, <https://doi.org/10.3390/molecules28031254>
- Mancini, A et al., 2016. Thyroid hormones, oxidative stress, and inflammation. Mediators of inflammation 16, 1-12, <https://doi.org/10.1155/2016/6757154>
- Martiniakova, M et al., 2022. The role of macronutrients, micronutrients and flavonoid polyphenols in the prevention and treatment of osteoporosis. Nutrients 14, 2-30. <https://doi.org/10.3390/nu14030523>
- Mohapatra, D et al., 2021. Exploring the potential of solid dispersion for improving solubility, dissolution & bioavailability of Herbal extracts, Enriched fractions, and Bioactive. Journal of Microencapsulation, 1-44, <https://doi.org/10.1080/02652048.2021.1963342>
- Morais, N.A et al., 2022. Seasonal monitoring of the antioxidant activity of *Erythroxylum suberosum* A. ST. Hil. leaves: Correlation with hyperoside and isoquercitrin contents. Indian Journal of Traditional knowledge (IJTK) 21, 373-382, [10.56042/ijtk.v21i2.31719](https://doi.org/10.56042/ijtk.v21i2.31719)
- Moreira, B.O et al., 2019. Evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive and biological activities of *Cinostigma macrophyllum* standardized extracts and determination and quantification of the main metabolites. Royal society of chemistry, 41256-41268, <https://doi.org/10.1039/C9RA05985G>

- Moreira, B.O et al., 2020. Application of response surface methodology for optimization of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from *Cenostigma macrophyllum*. Journal of Chemometrics 34, 1-12, <https://doi.org/10.1002/cem.3290>
- Naoui, M et al., 2019. Mitochondria in neuroprotection by phytochemicals: Bioactive polyphenols modulate mitochondrial apoptosis system, function and structure. International Journal of molecular sciences 2451, 1-31, <https://doi.org/10.3390/ijms20102451>
- Nathanson, J.A et al., 1993. Cocaine as a naturally occurring insecticide. Neurobiology 90, 9645-9648, <https://doi.org/10.1073/pnas.90.20.9645>
- Nguyen, N.T.T et al., 2022. Formation, antimicrobial activity, and biomedical performance of plant-based nanoparticles: a review. Springer nature 20, 2531-2571, <https://doi.org/10.1007/s10311-022-01425-w>
- Ntungwe, E et al., 2020. *Artemia* species: An important tool to screen general toxicity samples. Bentham Science 26, 2892-2908, [10.2174/1381612826666200406083035](https://doi.org/10.2174/1381612826666200406083035)
- Oliveira, E.C et al., 2016. Protective effect of the plant extracts of *Erythroxylum* sp. against toxic effects induced by the venom of *Lachesis muta* Snake. Molecules 21, 1-14, <https://doi.org/10.3390/molecules21101350>
- Oliveira F.F.S et al., 2015. Antioxidant activity phytochemical screening of extracts of *Erythroxylum subersoum* A. St. Hil (Erythroxylaceae). Research Journal of Phytochemistry 9, 67-78, <https://scialert.net/abstract/?doi=rjphyto.2015.68.78>
- Oliveira, S.L et al., 2010. Tropane alkaloids from *Erythroxylum* genus: Distribution and compilation of ¹³C-NMR spectral data. Chemistry & Biodiversity 7, 302-326, <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800290>
- O'Neil, E.J et al., 2021. Anti-cancer properties of Theaflavins. Molecules 26, 1-25, <https://doi.org/10.3390/molecules26040987>
- Oriakhi, K et al., 2014. Comparative antioxidant activities of extracts of *Vernonia amygdalina* and *Ocimum gratissimum* Leaves. Journal of Agricultural Science 6, 13-20 [10.5539/jas.v6n1p13](https://doi.org/10.5539/jas.v6n1p13)
- Palomino, J.C et al., 2002. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemotherapy 46, 2720–2722, <https://doi.org/10.1128/aac.46.8.2720-2722.2002>
- Panzella, L., 2023. Polyphenols and their impact on human health. International Journal of molecular sciences 24, 1-3, <https://doi.org/10.3390/ijms242316683>
- Pauter, K et al., 2020. Determination and identification of antibiotic drugs and bacterial strains in biological samples. Molecules 25, 1-42, <https://doi.org/10.3390/molecules25112556>
- Pavia, D.L.; Lampman, G.M.; Kriz, G.S.; Vyvyan, J.R., 2010. Introdução à espectroscopia, 4.ed. Editora Norte-americana.
- Perea, Z.R., Teissedre, P.L., 2016. Grape polyphenols effects in human cardiovascular diseases and diabetes. Molecules 68, 1-19, <https://doi.org/10.3390/molecules22010068>
- Prabhavati, R.M et al., 2016. Studies on qualitative and quantitative phitochemical analysis of *Cissus quadrangularis*. Pelagia research library 7, 11-17, <https://www.primescholars.com/articles/studies-on-qualitative-and-quantitative-phytochemical-analysis-of-cissus-quadrangularis.pdf>
- Pugazhenthii, S et al., 2017. Common, Neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. Biochim biophys 5, 1-23, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.04.017>
- Quiñonez-Bastidas et al., 2018. Antinociceptive effect of (-) –epicatechin in inflammatory and neuropathic pain rats. Behavioural pharmacology 29, 1-10. [10.1097/FBP.0000000000000320](https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000320)
- Rahamouz-Haghighi, S et al., 2022. Phytochemical screening and cytotoxicity assessment of *Plantago lanceolate* L. root extracts on Colorectal cancer cell lines and Brine shrimp larvae and determination of the median lethal dose in mice. South African Journal of Botany 149,

740-747, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.06.058>

Rajabi, S et al., 2015. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. DARU Journal of pharmaceutical sciences 23, 1-6. [10.1186/s40199-015-0105-x](https://doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x)

Ratha, M et al., 2012. Screening of phytochemical and antibacterial activity of *Hemidesmus indicus* (L) and *Vetiveria zizanoides* (L). European Journal of Experimental Biology, Tamilnadu- Índia 2, 363-368.

Reddy, P.H et al., 2012. Abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration as Early events in Alzheimer's disease: Implications to mitochondria- targeted antioxidant therapeutics. Biochim biophys 5, 1-24, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.011>

Restrepo, D.A et al., 2019. *Erythroxyllum* in focus: An interdisciplinary review of an overlooked genus. Molecules 24, 1-27, <https://doi.org/10.3390/molecules24203788>

Roy, M et al., 2015. Mitochondrial division and fusion in metabolism. Current Opinion Cell Biology 33, 1-13, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.001>

Samec, D et al., 2021. The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure 10, 1-20, <https://doi.org/10.3390/plants10010118>

Semaming, Y et al., 2015. Pharmacological properties of Protocatechuic Acid and its potential roles as complementary medicine. Evidence based complementary and alternative medicine 2015, 1-11, <https://doi.org/10.1155/2015/593902>

Shafabakhsh, R., Asemi, Z., 2019. Quercetin: a natural compound for ovarian cancer treatment. Journal of Ovarian Research 12, 1-9. [10.1186/s13048-019-0530-4](https://doi.org/10.1186/s13048-019-0530-4)

Shah, N.A et al., 2013. Investigation on flavonoid composition and anti-free radical potential of *Sida cordata*. BMC Complementary & Alternative medicine 13, 1-12, <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-276>

Shamsa, F et al., 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences 32, 17-20, <https://digital.car.chula.ac.th/tjps/vol32/iss1/4>

Silva, G.L et al., 2001. Modulation of the multidrug resistance phenotype by new tropane alkaloid aromatic esters from *Erythroxyllum pervillei*. Journal of Natural products 64, 1514-1520, <https://doi.org/10.1021/np010295+>

Simeonova, R et al., 2021. A novel Galantamine-curcumin hybrid as a potential Multi-target agent against neurodegenerative disorders. Molecules 26, 1-16, [10.3390/molecules26071865](https://doi.org/10.3390/molecules26071865)

Sousa, C.M.M et al., 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química nova 30, 351-355, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>

Spinelli, R et al., 2024. Toxicity evaluation of anti-cholinesterasic amphibian extracts by MTT and an optimized *Artemia salina* test. Chemistry & Biodiversity 21(2), 1-7, [10.1002/cbdv.202301367](https://doi.org/10.1002/cbdv.202301367)

Subramaniam, S.R., Chesselet, M.F., 2013. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. Progress in neurobiology 33, 1-35, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.004>

Tang, F et al., 2019. Inhibition of alpha-hemolysin expression by resveratrol attenuates *Staphylococcus aureus* virulence. Microbial pathogenesis 127, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.027>

Takeda, M et al., 2024. The phytochemical, quercetin, attenuates nociceptive and Pathological pain: Neurophysiological mechanisms and therapeutic potential. Molecules 29, 1-12, [10.3390/molecules29163957](https://doi.org/10.3390/molecules29163957)

Tracey, W.D., 2017. Nociception. Current Biology 27, 1-5, [10.1016/j.cub.2017.01.037](https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.037)

Uddin, M.J et al., 2021. Ethnomedicinal survey and determination of total alkaloids and phenolics in selected edible plants of Tripura, Índia. Journal of Medicinal Plants Studies 9, 123-131, <https://doi.org/10.22271/plants.2021.v9.i2b.1263>

- Watson, E.S et al., 1983. Effects of the administration of coca alkaloids on the primary immune responses of mice: interaction with tetrahydrocannabinol and ethanol. *Toxicology and applied pharmacology* 71, 1-13, [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(83\)90040-6](https://doi.org/10.1016/0041-008X(83)90040-6)
- Wishart, D. S et al., 2022. NP-MRD: The natural products magnetic resonance database. *Nucleic Acids Research* 50, 665-667, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1052>
- Yatsuda, R et al., 2005. Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 183–189, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.042>
- Yulian, L.V et al., 2022. Advances in chemistry and bioactivity of the genus *Erythroxylum*. *Natural products and bioprospecting* 12, 1-20, [10.1007/s13659-022-00338-z](https://doi.org/10.1007/s13659-022-00338-z)
- Zanolari, B et al., 2003. Tropane alkaloids from the Bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. *Journal of natural products* 66, 497-502, <https://doi.org/10.1021/np020512m>
- Zhang, S et al., 2021. Antioxidant effects of protocatechuic acid and protocatechuic aldehyde: old wine in a new bottle. *Evidence- Based complementary and alternative medicine*, 1-19, <https://doi.org/10.1155/2021/6139308>

6. Considerações finais

Os extratos metanólicos e fases orgânicas das folhas, galhos, casca do caule e caule foram obtidos seguindo as técnicas de fracionamento.

Os metabólitos secundários das frações diclorometano e hexano das folhas, galhos, casca do caule e caule foram identificados por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Todos os órgãos vegetais se mostraram ricos em fenólicos e flavonoides, porém os teores variaram entre os extratos e frações. Quanto ao teor de alcaloides, a quantidade é menor, quando comparado à proporção de fenólicos e flavonoides.

A investigação dos extratos e frações de *E.nummularium* revelou algumas atividades antioxidantes, com destaque para as frações acetato de etila e diclorometano das folhas e da casca do caule. Esses resultados são valiosos para futuras pesquisas sobre o potencial antioxidante de *E.nummularium* e a possível aplicação desses extratos em produtos farmacêuticos e nutracêuticos.

Algumas frações exibiram atividade antimicrobiana significativa. Para *S.mutans*, as frações MSBEN, DSBEN e ESBEN demonstraram atividade notável. Para *S.aureus* a atividade dos extratos foi mais promissora. Nenhuma das frações exibiu atividade significativa contra *S.sobrinus*.

Os extratos e frações demonstraram moderada a alta toxicidade contra *Artemia salina*. As frações hexânicas demonstraram a maior toxicidade, sobretudo para os galhos e casca do caule, e toxicidade moderada para as folhas. A fração acetato de etila foi considerada não tóxica para as folhas e moderada toxicidade para os demais órgãos.

A fração ELEN possui atividade antinociceptiva em doses específicas, com maior eficácia observada nas concentrações testadas mais baixas.

A fração ELEN foi testada para avaliar a toxicidade na dose de 2000 mg/kg. A fração ELEN é segura na dose testada.