



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

BRUNA OLIVEIRA DO NASCIMENTO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS E DOS CONSTITUINTES DE
Macrolobium latifolium (Vogel)**

Salvador

2019

BRUNA OLIVEIRA DO NASCIMENTO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS E DOS CONSTITUINTES DE
Macrolobium latifolium (Vogel)**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Jorge Mauricio David

Salvador

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Oliveira do Nascimento, Bruna
ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS E DOS CONSTITUINTES DE
Macrolobium latifolium (Vogel) / Bruna Oliveira do
Nascimento. -- Salvador, 2019.

93 f. : il

Orientador: Jorge Mauricio David.
Dissertação (Mestrado - Química) -- Universidade
Federal da Bahia, Universidade Federal da Bahia, 2019.

1. Macrolobium latifolium. 2. cumarina
glicosilada. 3. atividade anticolinesterásica. 4.
atividade antimicrobiana. 5. atividade antioxidante.
I. Mauricio David, Jorge. II. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

BRUNA OLIVEIRA DO NASCIMENTO

“ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
EXTRATOS E DOS CONSTITUINTES DE *Macrolobium rigidum* (R.S Cowan)”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química,
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Jorge Mauricio David Jorge Mauricio David
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Silvio do Desterro Cunha Silvio do Desterro Cunha
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves Clayton Queiroz Alves
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Estadual de Feira de Santana

Salvador, 18 de junho de 2019.

Dedico este trabalho a minha família,
especialmente minha vó, Eunice e minha tia, Ednice.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder muito mais do que eu pude imaginar.

À minha família, em especial minha vó, Eunice, e minha tia, Ednice, pelo apoio incondicional e orações, e a minha irmã, Geisiane, por sempre se fazer presente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Mauricio David, por todo apoio, paciência, correções, compreensão, pela confiança e principalmente na imensa contribuição na minha formação.

A todos professores pelo apoio e colaboração não somente neste trabalho, mas também pelas contribuições para minha formação.

Aos meus colegas de laboratório e grupo de pesquisa GPPN, Oscar, Marla, Maísa, Klauber, André e principalmente Patrícia por todo suporte no início dessa trajetória. Não poderia deixar de agradecer àqueles que deixam essa jornada mais leve, meus amigos Valmore, Léo, Akácia, Ícaro, Maurício, Roger e meu namorado, Arthur.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos, ao CNPq pelo apoio aos projetos.

RESUMO

Este trabalho descreve o primeiro estudo fitoquímico e biológico das partes aéreas de *Macrolobium latifolium* (Vogel). Os extratos orgânicos obtidos por partição do extrato bruto metanólico das folhas e do caule de *M. latifolium* foram submetidos a testes de atividade biológica *in vitro*, de letalidade frente ao microcrustáceo *A. salina*, avaliação da atividade antioxidante medida por meio do método de sequestro do radical DPPH, inibição da acetilcolinesterase pelo método em microplaca de avaliação da inibição da enzima, e atividade antimicrobiana frente as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* e *Escherichia coli*, por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) detectada com auxílio do revelador resazurina. Paralelamente, foi também determinado do teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu. Nenhum dos extratos apresentou toxicidade frente aos nauplios, os extratos em AcOEt apresentaram atividades em concentração de $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente ao radical DPPH, os extratos em AcOEt e em BuOH do caule apresentaram concentração mínima de $\leq 125\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ inibitória frente a *Salmonella*, frente a *P. aeruginosa* os extratos da folha apresentaram menores valores de CIM. Os teores de compostos fenólicos totais nos extratos de *M. latifolium* variaram de $46,438 \pm 0,006$ a $446,668 \pm 0,018$ mg EAG/g de Extrato. Assim, os extratos foram submetidos a técnicas cromatográficas usuais empregando-se sílica gel e/ou Sephadex LH-20 como suportes e, a partir destes procedimentos, foram isolados os triterpenos friedelina e taraxerol, a mistura de esteroides composta por β -sitosterol, campesterol e estigmasterol, flavonoides, dentre eles a apigenina e uma nova cumarina glicosilada. Todos os compostos tiveram suas estruturas elucidadas por meio da análise dos dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , HSQC e HMBC, espectros na região do IV e na região UV-Vis e Espectrometria de massas. Frações com mistura de ácidos graxos e/ou triglicéridos foram submetidas a transesterificação por hidrólise básica e posterior esterificação ácida e o produto da reação foi submetido a CG e CG/EM de modo a determinar a composição dos ésteres metílicos e esteroides presentes.

Palavras-chave: *Macrolobium latifolium*, atividade antioxidante, antimicrobiana, anticolinesterásica, cumarina c-glicosilada, flavonoides

ABSTRACT

This work describes the first phytochemical and biological study of aerial parts of *Macrolobium latifolium* (Vogel). The organic soluble fractions were obtained by partition from the crude methanolic extract from the leaves and the stem of *M. latifolium* and they were submitted to *in vitro* biological tests, cytotoxic by the Brine shrimp assay, antioxidant activity measured by DPPH method, inhibition of acetylcholinesterase employing the spectrometric assay and antimicrobial evaluation on the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* and *Escherichia coli*, through determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) detected with the aid of the resazurin based assay. In parallel, the total phenolic content was also determined by the Folin-Ciocalteu method. None of the extracts presented toxicity in the BST, the extracts in EtOAc presented activities in concentration of $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ against the DPPH radical, the extracts in EtOAc and BuOH of the stem had a minimum concentration of $\leq 125\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ inhibition against *Salmonella*, compared to *P. aeruginosa* leaves extracts had lower MIC values. Total phenolic compounds contents in *M. latifolium* extracts ranged from 46.438 ± 0.006 to 446.668 ± 0.018 mg EAG / g extract. Thus, the extracts were submitted to the usual chromatographic techniques using Silica gel and/or Sephadex LH-20 as solid supports and, from these procedures permitted to isolate the triterpenes friedelin and taraxerol, the mixture of steroids composed of β -sitosterol, campesterol and stigmasterol, flavonoids, including apigenin and a new C-glycosylated coumarin. The structures of all compounds were elucidated by the ^1H , ^{13}C , HSQC and HMBC NMR spectra, IR and UV-vis region spectra data analysis and also mass spectrometry. Fractions with mixed fatty acids and/or triglycerides were subjected to transesterification in two steps, by basic hydrolysis and subsequent acid esterification, and the reaction product was subjected to GC and GC/MS in order to determine the composition of the methyl esters and steroids present.

Keywords: *Macrolobium latifolium*, antioxidant activity, antimicrobial, anticholinesterase, glycosylated coumarin, flavonoids

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS

CHCl₃ - Clorofórmio

J - constante de acoplamento

% *I* - Percentual de Inibição

% *SRL* – Percentual de Sequestro do Radical Livre

A₀ - Absorbância na ausência de antioxidante

AA - Atividade Antioxidante

AChE - Acetilcolinesterase

AcOEt - Acetato de Etila

APCI - Ionização química a pressão atmosférica

BST - brine shrimpe test

BuOH - Butanol

CC - Cromatografia em Coluna

CCDC - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CCDP - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CD₃OD - Metanol Deuterado

CDCl₃ - Clorofórmio Deuterado

CI₅₀ CI₅₀ - Concentração inibitória 50%

CL₅₀ - Concentração Letal 50%

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

d - Dubleto

DCM - Diclorometano

dd - Duplo Dubleto

DEPT - Distortionless enhancement polarization transference

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPPH - 2,2-difenil,1-picril hidrazil

dt - dubleto de tripleto

EAG - Equivalentes de Ácido Gálico

EM - Espectrometria de massas

EQ - Equivalentes de Quercetina

EtOH - Etanol

Glc - Glicose

GPPN - Grupo de pesquisa de produtos naturais

HMBC - *Heteronuclear multi bond correlation*

HMQC HSQC - *Heteronuclear simtiple single quantum coherence*

IV - Infravermelho

J - Constante de Acoplamento

m - multipleto

m/z - relação massa/carga

MeOH - Metanol

R^2 - Coeficiente de determinação

Rf - Coeficiente Fator de retenção

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN de ^1H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s - singleto

t - tripleto

UV - Ultravioleta

δ - deslocamento químico

λ - comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de obtenção dos extratos do caule	24
Figura 2: Esquema de obtenção dos extratos das folhas	25
Figura 3: Esquema do fracionamento do extrato em DCM das folhas	28
Figura 4: Esquema do fracionamento do extrato em AcOEt do caule	31
Figura 5: Avaliação da atividade antioxidante	33
Figura 6: Determinação da atividade inibitória frente a acetilcolinesterase.....	34
Figura 7: Teste de letalidade frente a <i>A. salina</i>	35
Figura 8: Avaliação da atividade antimicrobiana	36
Figura 9: Espectro na região do infravermelho em filme da mistura de triglicerídeos e ácidos graxos obtida do extrato das folhas em DCM	37
Figura 10: Cromatograma da mistura de ácidos graxos da fração do extrato em DCM de <i>M. latifolium</i> após transesterificação	38
Figura 11: Cromatograma do padrão F.A.M.E. Mix C8-C24.....	38
Figura 12: EM obtidos da análise por CG-MS com respectivas estruturas.....	40
Figura 13: Estrutura do 3 β -Taraxerol	42
Figura 14: Espectro RMN de ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) de DFP1303.....	44
Figura 15: Espectro RMN de ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) de DFP1303.....	45
Figura 16: Espectro RMN de ¹ H de DFP1303: expansões das regiões entre 5,51 e 5,57; 3,15 e 3,22; e 1,89 e 2,06 ppm.....	46
Figura 18: Espectro RMN de ¹ H de DFP1303: expansão da região entre 0,80 e 1,10 ppm.	46
Figura 17: Espectro RMN de ¹³ C de DFP1303: expansões das regiões entre 15,0 e 56,0; 15,0 e 30,0 e 33,0 e 42,0 ppm.	46
Figura 19: CDD comparativa entre a amostra DFP1504 e a amostra identificada anteriormente por ARAÚJO NETO (2016).....	47
Figura 20: Cromatograma da mistura de esteroides DFP1504	48
Figura 21: Espectro de massas do campesterol.....	49
Figura 22: Espectro de massas do stigmasterol.....	49
Figura 23: Espectro de massas do β -sitosterol	50
Figura 24: Espectro RMN de ¹ H de DFP1504 e expansões das regiões entre 5,00 e 5,25; 5,31 e 5,42 e 3,44 e 3,64 ppm.....	51
Figura 25: Espectro na região IV de DFP1603	52
Figura 26: Espectro RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de DFP1603.....	53
Figura 27: Espectro RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da DFP1603: expansão da região entre 0,7 e 2,20 ppm.....	54
Figura 28: Espectro RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da DFP1603: expansão da região entre 2,22 e 2,44 ppm.....	54
Figura 29: Espectro de HSQC de DFP1603 [CDCl ₃ , δ (ppm)].....	55
Figura 30: Espectro de HMBC de DFP1603 [CDCl ₃ , δ (ppm)].....	56
Figura 31: Ampliação do espectro de HMBC de DFP1603 [CDCl ₃ , δ (ppm)].....	57
Figura 32: Estrutura da friedelina	57
Figura 33: Espectro de RMN de ¹ H de AF4P54 [CD ₃ OD, δ (ppm)]	59

Figura 34: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de AF4P54.....	60
Figura 35: Deslocamentos químico (em Hz) de carbonos de estruturas similares	62
Figura 36: Estruturas e deslocamentos (em Hz) das cumarinas: A- Daurosídeo D e estrutura B do similar obtido por meio de síntese	63
Figura 37: Dados espectrométricos de cumarinas C-glicosiladas obtidas por síntese	63
Figura 40: Espectro de massas de alta resolução de AF4P54	63
Figura 41: Estrutura da 3α -C-glicosil-5,7-di-hidroxycumarina	64
Figura 40: Espectro de HSQC de AF4P54 [CD_3OD , δ (ppm)]	65
Figura 41: Ampliação do espectro de HMBC de AF4P54 [CD_3OD , δ (ppm)].....	66
Figura 42: Ampliação do espectro de HMBC de AF4P54 [CD_3OD , δ (ppm)].....	67
Figura 43: Ampliação do espectro de HMBC de AF4P54 [CD_3OD , δ (ppm)].....	68
Figura 41: Estrutura da 3α -C-glicosil-5,7-di-hidroxycumarina	69
Figura 45: Espectro de RMN de ^1H de ACF7 [CD_3OD , δ (ppm)].....	70
Figura 46: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de ACF7 [CD_3OD , δ (ppm)]	71
Figura 47: Espectro de HSQC de ACF7 [CD_3OD , δ (ppm)].....	72
Figura 48: Espectro de HMBC de ACF7 [CD_3OD , δ (ppm)].....	72
Figura 49: Ampliação do espectro de HSQC de ACF7 [CD_3OD , δ (ppm)].....	73
Figura 50: Ampliação do espectro de HMBC de ACF7 [CD_3OD , δ (ppm)].....	74
Figura 51: Estrutura da apigenina	75
Figura 52: Espectros de massas de ACF7	76
Figura 53: %SRL para os extratos do caule.....	79
Figura 54: %SRL para os extratos das folhas	80
Figura 55: %SRL de AF4P54.....	81
Figura 56: Porcentagem de inibição da acetilcolinesterase versus concentração em ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) pelos extratos de <i>M. latifolium</i>	82
Figura 57: %I da acetilcolinesterase pelas substâncias isoladas	83
Figura 58: Representação do ensaio revelado com resazurina.....	84

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 Aspectos gerais sobre a Espécie.....	16
2.2 O gênero <i>Macrolobium</i>	17
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Especificação dos materiais e equipamentos utilizados	20
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	22
4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal	22
4.2.2 Preparo dos extratos	22
5. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DE <i>M. latifolium</i>	26
6. ISOLAMENTO DOS CONSTITUÍNTES QUÍMICOS DE <i>M. latifolium</i>	27
6.1 Fracionamento do extrato em DCM das folhas.....	27
6.1.1 Reação de transesterificação da mistura de triglicerídeos e esterificação dos ácidos graxos – DFP901.....	28
6.2 Fracionamento do extrato em AcOEt das folhas	29
6.3 Fracionamento do extrato em DCM do caule	30
6.4 Fracionamento do extrato em AcOEt do caule	30
7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA PARA EXTRATOS E CONSTITUÍNTES ISOLADOS	32
7.1 Avaliação da atividade antioxidante	32
7.2 Avaliação da atividade inibitória da enzima Acetilcolinesterase	33
7.3 Teste de letalidade frente à <i>Artemia salina</i>	34
7.4 Avaliação da atividade antimicrobiana	35
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
8.1 Identificação dos constituintes químicos isolados de <i>M. latifolium</i>	37
8.1.1 Identificação da composição da mistura ácidos graxos dos triglicerídeos	37
8.1.2 Identificação DFP1303.....	41
8.1.3 Identificação da mistura DFP1504.....	47
8.1.4 Identificação de DFP1603	52
8.1.5 Determinação estrutural de AF4P54	59
8.1.6 Identificação de ACF7	69

<i>8.2 Determinação do teor de fenólicos totais</i>	77
<i>8.3 Avaliação das atividades biológicas dos extratos e dos constituintes isolados</i>	79
<i>8.3.1 Determinação da atividade antioxidante</i>	79
<i>8.3.2 Determinação da inibição da Acetilcolinesterase</i>	82
<i>8.3.4 Determinação da atividade antimicrobiana</i>	84
<i>8.3.5 Letalidade frente à Artemia salina</i>	86
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
REFERÊNCIAS	88

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tanto do ponto de vista botânico, quanto do ponto de vista químico-biológico, apesar das plantas medicinais brasileiras serem altamente promissoras. Ambientes tropicais, como os biomas brasileiros, oferecem um grande potencial para compostos biologicamente ativos, contribuindo para a descoberta de novas estruturas (BOLZANI, 2012).

Embora haja uma diminuição na busca por novas estruturas obtidas de produtos naturais, estes continuam a desempenhar um papel significativo no processo de descoberta e desenvolvimento de novas drogas, além disso tem-se que estruturas básicas provenientes de produtos naturais resultaram em drogas aprovadas contra uma infinidade de doenças do homem, por ser, muitas vezes, a inspiração para muitos agentes terapêuticos (NEWMAN; CRAGG, 2016). Além disso, os produtos naturais ratificam a biodiversidade como sendo uma fonte rica de novas estruturas moleculares.

No Brasil, são reconhecidos 221 gêneros e 2.807 espécies de leguminosas, sendo a família com maior riqueza de espécies nos biomas Amazônia e Caatinga (BFG, 2015). A família, Leguminosae, é considerada importante econômica e ecologicamente, por apresentar diversas espécies ricas em proteínas, carboidratos e óleos, em sua maior parte utilizadas na alimentação humana e animal (LEWIS et al., 2005).

O gênero *Macrolobium*, descrito por Johann C.D. von Schreber em 1789, é exclusivamente neotropical e possui cerca de 80 espécies (ESTRELLA et al., 2012). No Brasil, está representado por 35 espécies dentre estas 17 são endêmicas, sendo que o bioma Amazônia concentra a maioria das espécies de *Macrolobium* (BFG, 2015).

O gênero é constituído de espécies arbóreas e arbustivas (SILVA, 2016) e algumas destas têm sido alvo de diversos estudos como a investigação da ocorrência de diversas classes de produtos naturais nas cascas de 29 espécies arbóreas, dentre elas *Macrolobium acaciifolium* e *M. angustifolium*, enquanto na primeira ocorrem antocianina, catequina e tanino condensado, na segunda ocorrem tanino condensado e tanino pirogálico, porém as estruturas dessas substâncias não foram determinadas (BARBOSA, 2006) .

Um estudo taxonômico das espécies de *Macrolobium* ocorrentes no Brasil, incluindo chave de identificação, descrições morfológicas, comentários, mapas de distribuição geográfica e material examinado foi realizado em 2016, em que foi observado que a espécie *M. rigidum* é endêmica, restrita à Bahia (Mata Atlântica) e que em relação a etimologia, o epíteto específico “*rigidum*” faz alusão aos folíolos rígido-coriáceos da espécie (SILVA, 2016). No entanto as informações encontradas sobre a espécie até então estão somente relacionadas à botânica, não existem estudos químicos.

A busca por novas estruturas que sejam mais eficazes e que apresentem menores efeitos colaterais requer várias etapas que comprovem a real atividade biológica destas substâncias assim, visando o uso de compostos ativos como protótipos para o desenvolvimento de fármacos tanto para obtenção de novos fármacos, como para servir de modelo estrutural na química de medicamentos (NEWMAN; CRAGG, 2016) os testes *in vitro* têm acelerado a descoberta de novas substâncias biologicamente ativas (Houghton et al., 2004).

Os testes *in vitro* surgiram como forma rápida e segura de se avaliar a atividade biológica de diversos compostos e são estratégias necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos ou modelos de fármacos além de auxiliar na escolha dos extratos de espécies de planta para estudos químicos e farmacológicos aprofundados e permitir comprovar e quantificar a presença de substâncias bioativas (BEDNARCZUK, 2010).

Por conta disso, sem acompanhamento de dados biológicos, a descoberta de novos medicamentos provenientes de plantas torna-se mais complexa, o que resume o trabalho apenas a fitoquímica sendo necessário retornar os estudos para avaliar as atividades biológicas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais sobre a Espécie

A família Leguminosae é dividida em três subfamílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (ou Faboideae), distinguidas morfologicamente. Porém, do ponto de vista botânico ainda há um impasse em relação a classificação pois alguns autores consideraram as três subfamílias como famílias: Caesalpinaceae, Mimosaceae e Fabaceae. Por esse motivo é encontrado em algumas bibliografias a referência à família Fabaceae. Entretanto, essa classificação não é aceita por vários outros autores em virtude dessas famílias não formarem grupos monofiléticos (SILVA, 2016).

A subfamília Caesalpinioideae inclui aproximadamente 2.250 espécies e 171 gêneros, dentre eles encontra-se o gênero *Macrolobium*, que foi descrito por Johann C.D. von Schreber (1789) e compreende cerca de 70-80 espécies, ocorrentes em vários ambientes: campina, campinarana, savana natural (lavrado), praia, restinga, floresta de várzea, floresta de igapó e floresta de terra firme (FÉLIX-DA-SILVA et al., 2013; FERREIRA & FLORES, 2013), nas localidades de Honduras, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia (DA SILVA et al., 2017). No Brasil, o bioma da Amazônia concentra a maioria das espécies de *Macrolobium*, representado por 35 espécies nas quais 17 são endêmicas. *Macrolobium* pertence à ordem Fabales, família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae, tribo Detarieae (LPWG, 2013a).

Em relação às informações sobre algumas espécies do gênero é encontrado que *M. acaciifolium* é utilizado na medicina popular, também conhecida como arapari, faveira arapari, fava de tabaqui e suas cascas apresentam propriedade antidiarreica, já *M. latifolium* (óleo-comumbá) tem papel ecológico e ornamental, indicada para reflorestamento (Souza et al., 2011). *M. latifolium* é endêmica do Brasil, ocorre na Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais em ambientes de restinga e Floresta Ombrófila Densa, e em relação a etimologia, o epíteto específico “latifolium” (latus = largo, amplo, grande + folium = folha) faz alusão à largura da lâmina foliolar (SILVA, 2016).

2.2 O gênero *Macrolobium*

Foi constatada, através de pesquisa bibliográfica, a inexistência de estudos químicos em relação a qualquer uma das espécies que compõe o gênero. A busca pela palavra “*Macrolobium*” fornece um resultado limitado de publicações em que a maior parte dos artigos trazem apenas informações sobre categorização de espécies, identificação de novas espécies, morfologia e interação destas com o ambiente ou os animais.

Algumas referências tratam da correlação entre o desenvolvimento das espécies e o ambiente no qual estão inseridas, se relacionam também ao desenvolvimento, ciclo de nutrientes, sazonalidade, tipo de floresta dentre outras características. Também foram encontradas referências que tratam sobre a conservação e condições de crescimento e do uso das plantas como fonte de alimentação para algumas espécies animais.

Foram identificadas algumas espécies do gênero *Macrolobium* no estado do Amapá, tais como *M. acaciifolium* (Benth.) Benth, *M. angustifolium* (Benth.) R.S. Cowan, *M. bifolium* (Aubl.) Pers., *M. campestre* Huber, *M. huberianum* Ducke, *M. multijugum* (DC.) Benth, *M. pendulum* Willd. ex Vogel, *M. campestre* Huber e *M. pendulum*, confirmadas a partir da análise dos espécimes depositados em 10 herbários nacionais e estrangeiros, sendo endêmicas do Brasil. Também foram identificadas novas ocorrências de espécies como *M. angustifolium* e *M. pendulum* para este estado (DA SILVA et al., 2017).

Outra referência trata da proposta para conservação do nome *M. grandiflorum* (*Gilbertiodendron grandiflorum*) contra *M. straussianum* (Leguminosae-Caesalpinioideae), com base também em estudos taxonômicos (DE LA ESTRELLA & DEVEZA, 2012). Assim como o anterior, outro trabalho desses autores também classificado nessa categoria trata da reavaliação morfológica do status taxonômico do gênero *Pellegriniodendron* (Harms) J. Léonard (Leguminosae – Caesalpinioideae – Detarieae) e sua inclusão em *Gilbertiodendron* J. Léonard (DE LA ESTRELLA; DEVEZA; WIERINGA, 2012). Applequist (2013), também concorda com a permanência do nome *M. grandiflorum*, no intitulado Relatório do Comitê de Nomenclatura de Plantas Vasculares:65.

Dentre os trabalhos publicados um refere-se ao tratamento taxonômico feito também através da análise morfológica na qual foi testado o monofiletismo do gênero no qual a espécie *M. latifolium* é citada juntamente com *M. rigidum*, sendo consideradas espécies unijugadas da restinga costeira da Bahia e do Espírito Santo no Brasil e são agrupados com *M. parvifolium*, também colocado por Cowan (1953) em um grupo estreitamente relacionado (MURPHY, 2018). Estudos taxonômicos propõem a sinonimização de *Macrobium campestre* var. *arirambense* R.S. Cowan, *M. campestre* var. *arboreum* R.S. Cowan, *M. campestre* var. *longibracteatum* R.S. Cowan e *M. campestre* var. *meio* R.S. Cowan sob *M. campestre* Huber (GURGEL, 2016).

Uma avaliação da formação de anéis de crescimento anuais de *Macrobium acaciifolium* foi desenvolvido afim de determinar a idade das árvores e comparar as taxas anuais médias de incremento em diâmetro com fatores hidrológicos e climáticos em três regiões de florestas alagáveis na Amazônia central (BATISTA et al 2012), bem como o estudo do estado de conservação de 14 espécies, com mapas de distribuição de cada uma delas (VAN DER BURGT, 2015).

Outras referências descrevem o trabalho de análise da zigomorfia floral de algumas espécies (TUCKER, 2002), sendo que dois deles trazem o registro no novas espécies: *Macrobium herrerae* Zarucchi sp (ZARUCCHI, 1990), *M. aracaense* (FARRONAY, 2018). Além desses trabalhos de registro de novas espécies há a avaliação o valor ecológico, taxonômico e filogenético e caracterização da morfologia do frutos, sementes, plântulas e mudas de *Macrobium acaciifolium*, *M. bifolium* e *M. pendulum* (FEITOZA et al., 2014).

O conjunto de dados obtidos da literatura sobre o gênero *Macrobium* ratifica a ausência de informações sobre estruturas químicas isoladas nas espécies desse gênero, mostrando a lacuna existente em relação ao estudo de espécies endêmicas com a finalidade de explorar o potencial químico-biológico dos biomas brasileiros.

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

- Contribuir para o conhecimento químico e determinação do potencial biológico da espécie *Macrolobium latifolium*;

3.2 *Objetivos específicos*

- Preparar extratos brutos em MeOH das folhas e do caule de *M. latifolium*;
- Obter fases orgânicas de diferentes polaridades (DCM, AcOEt e BuOH) a partir dos extratos brutos em MeOH das folhas e do caule de *M. latifolium*;
- Fracionar por meio de métodos cromatográficos os extratos obtidos por partição das folhas e do caule de *M. latifolium*;
- Realizar o isolamento, a purificação e a elucidção por métodos espectroscópicos e espectrométricos a estrutura química das substâncias puras, semi-puras ou em misturas obtidas no fracionamento das fases orgânicas existentes nos extratos *M. latifolium*;
- Submeter os extratos orgânicos obtidos por partição e os compostos isolados à atividade antioxidante, citotóxica frente a *Artemia salina*, anticolinesterásica e antimicrobiana frente a diferentes bactérias;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Especificação dos materiais e equipamentos utilizados

O material vegetal foi seco em estufa de secagem e esterilização com circulação mecânica, modelo 320-SE. Para moagem do material vegetal foi utilizado moinho Thomas Wiley Laboratory Mill-Model4.

Os solventes empregados no preparo dos extratos, nos processos de partição, nas eluições cromatográficas em placa e em coluna, recristalização e purificação (acetona, hexano, metanol, clorofórmio, acetato de etila, diclorometano e butanol) foram de grau analítico das marcas Merck, Êxodo científica e Tedia. Nas análises por CLAE-EM e DAD foram empregados solventes (metanol e acetonitrila) grau HPLC, procedência Tedia Brazil e Baker. Para evaporação dos solventes a pressão reduzida, foram utilizados os evaporadores rotatórios das marcas BUCHI modelo 461, e IKA LABORTECHNIK modelo HB4 basic.

Os reagentes e padrões empregados nas avaliações das atividades biológicas foram das seguintes marcas: DPPH e β -caroteno (Sigma), Ácido linolênico (Aldrich Chem. Co.), Ácido gálico (Riedel), BHT (Acrös Organics), Quercetina (Sigma), Agar e Caldo Muller Hinton (Acumedia) e os cistos de *A. salina* do fabricante Miramar, adquiridos no AQUARIUS FISHES.

Para realização dos testes antimicrobianos foram utilizadas as seguintes cepas padrão: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* ATCC 6017, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Nas separações por cromatografia em coluna (CC), os adsorventes utilizados como fase estacionária foram: gel de sílica 60 (0,063-0,200 mm) da Aldrich. Sephadex LH-20 da Pharmacia para permeação e gel de sílica Flash com diâmetro de partícula entre 0,040-0,063 mm da Merck. Para a separação CC em fase reversa foi utilizado o cromatografo de média performance Isolera One da marca Biotage.

Para as cromatografias em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de alumínio pré-fabricadas 20x20 de gel de sílica fluorescente PF 254-366 60 F254 das marcas da Macherey-Nagel e Acros. As amostras submetidas às placas de CCD foram reveladas com luz na região do ultravioleta (254 e 365 nm) e reveladores químicos: reagentes de Liebermann-

Burchard (uma solução 0,2% de ácido sulfúrico concentrado em anidrido acético), Cloreto de Alumínio (AlCl_3) e vapores de Iodo.

Nas placas de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram utilizadas placas de gel de sílica 20x20 de 1 mm de espessura da Sorbent Technologies, nas quais as amostras foram reveladas por irradiação com luz UV (254 e 366 nm).

Os espectros na região do IV foram obtidos no equipamento IRAffinity-1 da Shimadzu, as leituras na região UV-vis foram feitas no espectrofotômetro de UV-vis Varian Cary 50 quando em cubetas e no leitor de microplacas de elisa EL 800 da BioTek para os testes feitos em microplaca, disponíveis nos laboratórios do Instituto de Química da UFBA.

Os espectros de RMN e de massas foram obtidos da Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP) e também no Instituto de Química da UFG, as análises de massas foram realizadas no equipamento Amazon Speed ETD da Bruker, quando infusão direta, e as análises de RMN nos equipamentos de RMN de 300 MHz e 500 MHz também da Bruker.

As análises em CG/DAD foram realizadas no Instituto de Química da UFBA no equipamento GG-2010 Plus da Shimadzu, os cromatogramas e espectros de massa obtidos por meio do CLAE-EM, no equipamento CLAE Shimadzu acoplado ao equipamento Esquire 3000 Plus, e do CG-MS, no CG-EM QP2010 Ultra SHIMADZU com analisador quadrupolo de impacto de elétrons de baixa resolução, também foram provenientes das análises realizadas na Central analítica da USP.

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal

A espécie *Macrolobium latifolium* foi coletada no Recôncavo da Bahia, Município de Varzedo, margem do Rio Cai Camarão (12°57'35,9''S, 39°26'54,9''W). Foi identificada pela professora Maria Lenise Silva Guedes e a exsicata encontra-se registrada no Herbário “Alexandre Leal Costa” do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, sob identificação Vog. n° ALCB119122 Guedes, (coleta # M.L.23274).

4.2.2 Preparo dos extratos

As partes aéreas de *M. latifolium* foram coletadas, identificadas e suas exsicatas depositadas e registradas. As partes da planta foram estabilizadas pelo processo de secagem em estufa com circulação mecânica durante 2 dias a uma temperatura de 40°C e em seguida submetidas separadamente ao processo de moagem, sendo obtido 380,1g de caule e 380,25g de folha. Posteriormente os metabólitos da folha e do caule foram extraídos por meio de maceração feita com metanol (2,3L e 1,8L para cada parte) 3x durante o período de 48 horas. Os extratos metanólicos obtidos pela filtração do material foram secos e pesados, sendo a massa do extrato metanólico bruto das folhas 28,6526g (7,54%) e a do caule 21,1834g (5,57%). Ambos foram submetidos a partição líquido-líquido, sendo solubilizados em MeOH:H₂O 7:3 e extraídos com CH₂Cl₂, AcOEt e butanol.

Os extratos metanólicos bruto das folhas e do caule foram extraídos com CH₂Cl₂ (5x de 200ml) após a completa evaporação do CH₂Cl₂ foram pesados obtendo uma massa de 10,3998g (folhas), 3,8253g (caule) das fases solúveis em diclorometano (DCM). As fases hidroalcoólicas residuais das partições com DCM foram submetidas à evaporação sob pressão reduzida para eliminação de excesso de MeOH e em seguida foi feita a extração com AcOEt (5x de 100mL), foram então pesados após a completa evaporação do solvente obtendo 0,5016g (folhas) e 0,7685g (caule) de fases orgânicas solúveis AcOEt, para ambas extrações houve a formação de precipitado sendo 2,0099g (folhas) e 1,2211g (caule). As fases aquosas foram mais uma vez submetidas à evaporação sob pressão reduzida para retirar excesso de volume e, em seguida,

extraídas com butanol (4x 100ml) que foram pesados após a evaporação do butanol obtendo-se 0,8024g (folhas) e 0,9812g (caule), nesta etapa somente na partição das folhas foi obtido um precipitado com massa de 0,8054g.

Ao final do processo das partições, foram obtidos seis extratos de polaridades distintas (extrato em diclorometano, extrato em AcOEt e extrato em butanol) das folhas (Fig 2, p. 25) e do caule (Fig 1, p. 24), além de mais 3 precipitados, dois provenientes das etapas de partição dos extratos das folhas e o outro de uma das etapas de partição dos extratos provenientes do caule.

Os extratos foram submetidos a processos de separação em CCD a fim de determinar os melhores sistemas de solventes para futura separação cromatográfica, purificação e isolamento. As frações obtidas por colunas cromatográficas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada comparativa, utilizando reagentes reveladores.

Figura 1: Esquema de obtenção dos extratos do caule

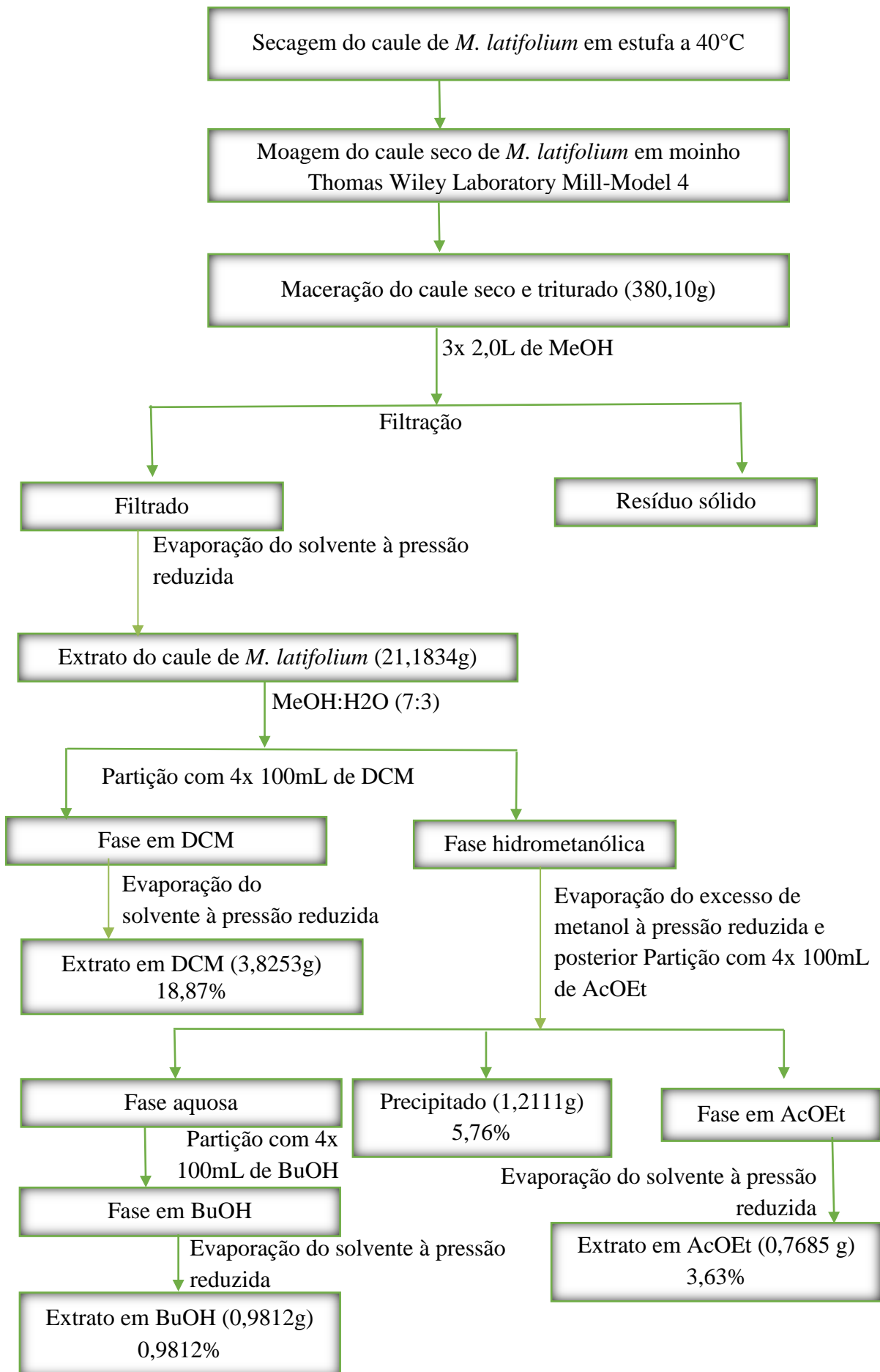
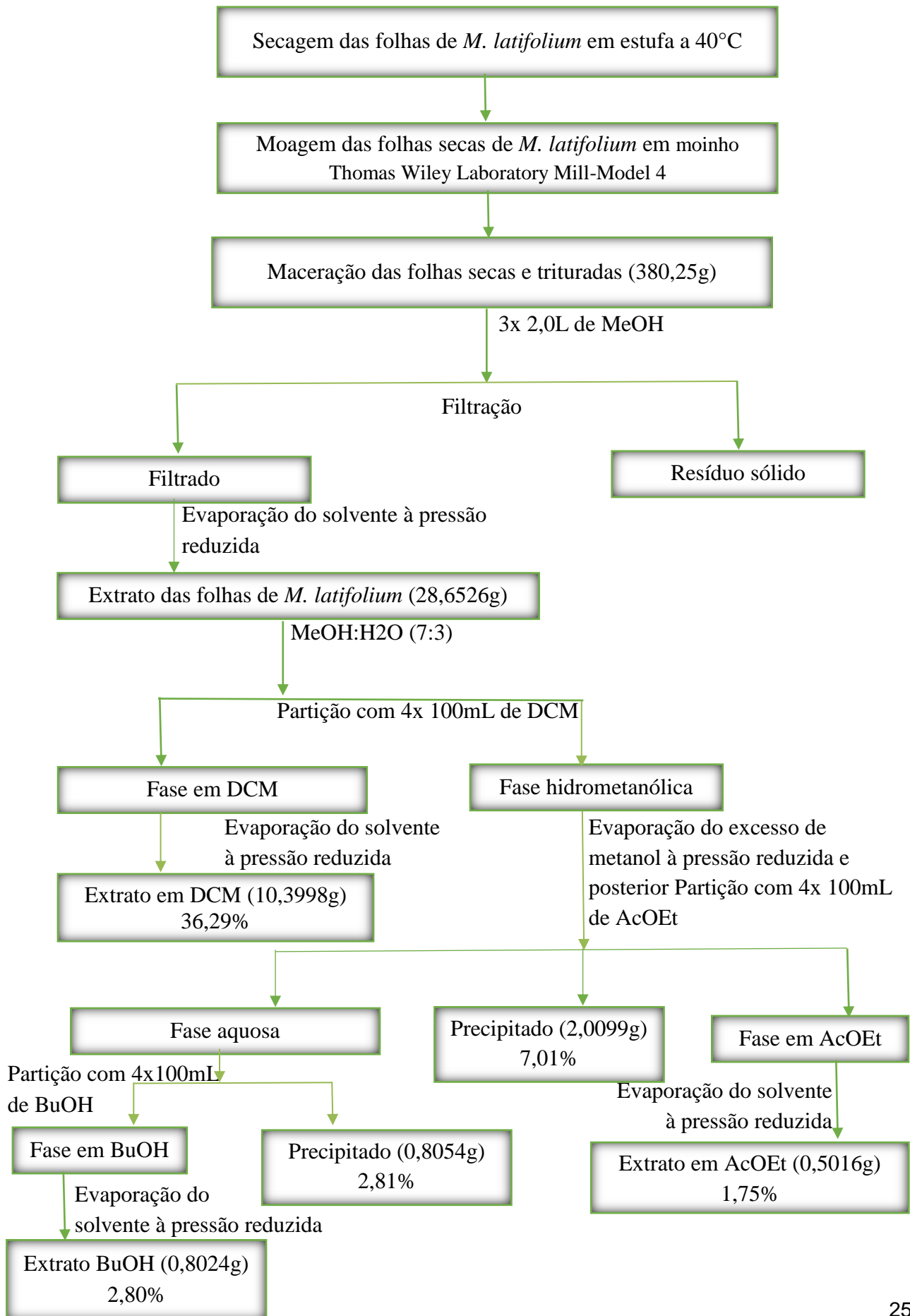


Figura 2: Esquema de obtenção dos extratos das folhas



5. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DE *M. latifolium*

A determinação do teor de fenólicos totais pode ser realizada por meio diversos métodos, sendo o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) o mais utilizado. O reagente consiste de mistura de ácidos fosfomolibídico e fosfotungústico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ , apresentando coloração amarela. Em solução alcalina, frente a agentes redutores, como os compostos fenólicos, ocorre uma reação de oxirredução com a formação de novos complexos de molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$, cuja a mudança de coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras através da utilização de espectroscopia na região do visível (SOUSA, 2007; DE OLIVEIRA, 2009).

A determinação do teor de fenólicos totais nas amostras dos extratos de *M. latifolium* foi feita utilizando o método de Folin-Ciocalteu (SLINKARD E SINGLETON, 1977), utilizando a metodologia descrita de acordo com a literatura (SOUSA, 2007). Em um tubo de ensaio foram adicionados 100 μL de solução de cada um dos extratos (1000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ em metanol), 500 μL do RFC e 5 mL de água destilada. Após a agitação da mistura por 1 minuto foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio a 15% (m/v) e a mistura foi novamente agitada por um minuto antes da adição de 2,4 mL de água destilada para completar o volume de 10 mL, o mesmo procedimento foi realizado para cada uma das concentrações do padrão ácido gálico que variaram de 10 a 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Após 2h de incubação no escuro à temperatura ambiente, foi feita a medida espectrométrica no comprimento de onda de 750 nm. O branco da reação foi preparado com todos os reagentes exceto a amostra. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado a partir da equação da curva de calibração construída por padrões de ácido gálico (10 a 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) obtida por regressão linear e expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g de Extrato). Todas as amostras foram analisadas em triplicata e os dados desta análise foram submetidos a análise de variância (ANOVA), usando teste Tukey com ($p < 0.05$). O teor de compostos fenólicos totais foi determinado a partir da equação da curva de calibração, $y = 0,0008x - 0,0169$ ($R^2 = 0,9989$) construída por padrões de ácido gálico (10 a 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) obtida por regressão linear, ao substituir o valor de absorvância obtida para cada extrato na concentração de 1000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g de Extrato).

6. ISOLAMENTO DOS CONSTITUÍNTES QUÍMICOS DE *M. latifolium*

6.1 Fracionamento do extrato em DCM das folhas

O extrato DCM obtido das folhas de *M. latifolium* foi submetido a separação por CC em gel de sílica 60 A, como eluente uma mistura de DCM e MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas dessa coluna 99 frações de 150 mL cada que foram agrupadas com base no perfil observado na CCD utilizando como reveladores o reagente de Liebermann-Burchard, vapores de I₂ e visualização com luz UV resultando em 10 frações, cujos códigos e valores de massa estão descritos na **Tabela 1**, p.26.

Tabela 1: Fracionamento do extrato em DCM das folhas

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Eluente
DFP901	1 - 5	365,0	CH ₂ Cl ₂
DFP902	6-9	664,1	CH ₂ Cl ₂
DFP903	10-23	806,8	CH ₂ Cl ₂
DFP904	24-25	118,4	CH ₂ Cl ₂
DFP905	26-30	220,2	CH ₂ Cl ₂
DFP906	31-50	421,2	CH ₂ Cl ₂
DFP907	51-63	41,0	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5)
DFP908	64-73	3340,6	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (9:1)
DFP909	74-90	2073,7	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (8:2)
DFP910	91-99	207,3	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (7:3)

Todas as frações obtidas foram submetidas a mais uma separação em CC, exceto a primeira fração, DFP901, que se apresentou em forma de óleo de coloração amarela. Devido a polaridade e não separação em CCD sugeriu-se que se tratava de uma mistura de triglicerídeos e ácidos graxos que foi submetida a transesterificação e esterificação para determinação dos constituintes. As frações de 02 a 10 apresentaram coloração verde escuro, o que pode ser atribuído a presença de clorofila e com aspecto oleoso. Da fração DFP902, foi isolada a substância DFP1603 (18,8 mg), a substância DFP1303 (35,5 mg) foi obtida do fracionamento da DFP903 e o posterior fracionamento da fração DFP1304, na qual foi isolada a substância DFP1504 (54,7 mg) e a substância DFP1503 (16,1 mg) que por meio de CCDC foi detectado

que se tratava da mesma substância obtida na coluna anterior, a DFP1503. Nos resultados é considerado o primeiro código DFP1503 referente as 2 frações da mesma substância que foi isolada. A figura 3, p. 28 mostra um esquema da obtenção dessas substâncias.

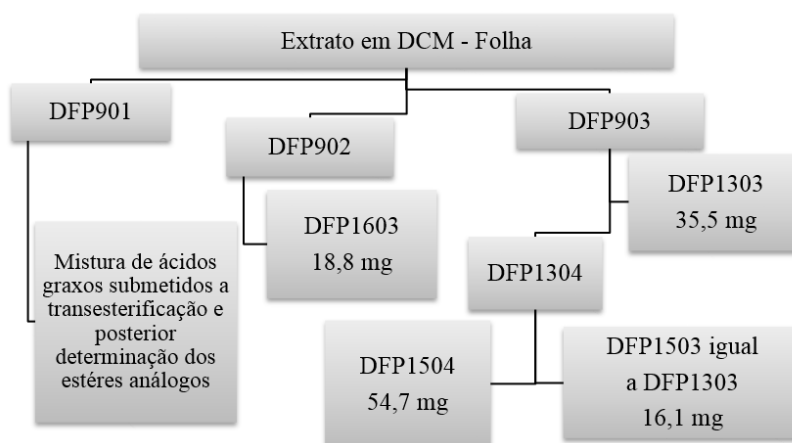


Figura 3: Esquema do fracionamento do extrato em DCM das folhas

6.1.1 Reação de transesterificação da mistura de triglicerídeos e esterificação dos ácidos graxos – DFP901

A reação de transesterificação foi feita conforme a metodologia anteriormente descrita (CORREIA et al. 2008) em duas etapas, primeiro foi feita a reação de etanolise dos triglicerídeos e posteriormente a reação de esterificação. Para reação de etanolise foram adicionados 40 mg da mistura a uma solução de EtOH(95%)/KOH (100mL/300mg) que foi submetida a refluxo por duas horas. Com o auxílio do evaporador rotativo o volume da mistura reacional foi reduzido em 80% e foram adicionados 20 mL de água para posterior extração. Foram realizadas extrações com CHCl_3 (3x 50 mL), para remoção de insaponificáveis. A fase aquosa alcalina foi tratada com 1mL de HCl_{con} afim de tornar o pH ácido para protonar os carboxilatos e permitir a obtenção dos ácidos graxos livres por extração com CHCl_3 (3x 100 mL).

O CHCl_3 foi removido e a massa total obtida na etapa anterior (32 mg) foi submetida a reação de esterificação, para isso foram adicionados 35mL de MeOH e 0,75 mL de H_2SO_4 e o balão reacional foi novamente submetido a refluxo durante duas horas. Ao término da reação, após o resfriamento, foram adicionados 20 mL de solução saturada de NaCl e a mistura reacional foi submetida a extração com CHCl_3 (3x 60 mL). A mistura extraída foi filtrado em Na_2SO_4 anidro e obtido após a retirada do solvente a baixa pressão, obtendo-se 28,2 mg de óleo.

6.2 Fracionamento do extrato em AcOEt das folhas

O extrato em acetato de etila obtido das folhas de *M. latifolium* foi submetido a separação por CC em fase reversa C18, no cromatografo de média performance (Isolera), como eluente uma mistura de água e MeOH em gradiente crescente de metanol. Foram coletadas dessa coluna 21 frações que foram agrupadas com base no perfil observado na CCDC utilizando como reveladores o Cloreto férrico, vapores de I₂ e visualização com luz UV resultando em 10 frações, que apresentavam coloração vermelha escura, em formato sólido amorfo e solúveis em metanol, cujos códigos e valores de massa estão descritos na **Tabela 2** (p. 29).

Tabela 2: Fracionamento do extrato em AcOEt das folhas

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Eluente
AFP541	1	7,3	H ₂ O
AFP542	2	5,2	H ₂ O:MeOH (95:5)
AFP543	3	47,1	H ₂ O:MeOH (95:5)
AFP544	4	62,4	H ₂ O:MeOH (9:1)
AFP545	5-6	67,7	H ₂ O:MeOH (9:1)
AFP546	7-9	40,9	H ₂ O:MeOH (85:15)
AFP547	10-11	13,9	H ₂ O:MeOH (8:2)
AFP5418	12-17	24,3	H ₂ O:MeOH (7:3)
AFP5419	18-19	28,0	H ₂ O:MeOH (7:3)
AFP5410	20-21	18,4	H ₂ O:MeOH (1:1)

A fração AFP544, foi submetida a uma nova separação em CC em gel de sílica 60 A, usando como eluente uma mistura de DCM e MeOH em gradiente crescente de polaridade (Tabela 3, p. 30), na qual foi isolada a substância AF4P54 (5,7 mg), que apresentou-se como um sólido amorfo, assim como as outras frações coletadas.

Tabela 3: Fracionamento da fração AFP544

Código	Frações reunidas	Massa (mg)	Eluente
AF4P541	1	3,7	H ₂ O
AF4P542	2	1,4	H ₂ O:MeOH (95:5)
AF4P543	3-4	9,1	H ₂ O:MeOH (95:5)
AF4P544	5	5,7	H ₂ O:MeOH (9:1)
AF4P545	6-7	20,6	H ₂ O:MeOH (9:1)

6.3 Fracionamento do extrato em DCM do caule

O extrato em DCM do caule também foi submetido a separações em CC, porém devido ao baixo rendimento dos constituintes isolados até o momento não foi possível identificá-los.

6.4 Fracionamento do extrato em AcOEt do caule

A massa de 300 mg do extrato em acetato de etila obtido do caule de *M. latifolium* foi submetido a separação por CC em gel de sílica 60 A, como eluente uma mistura de clorofórmio e MeOH em três proporções (Tabela 4, p. 30) com o objetivo de particionar o extrato em 3 partes, já que o perfil observado na CCD era de uma amostra polar. As frações 1 e 2 apresentaram-se em forma de óleo e amareladas, a fração 3 apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom escura.

Tabela 4: Fracionamento do extrato em AcOEt do caule

Código	Fração	Massa (mg)	Eluente
ACP621	1	95,6	CHCl ₃ :MeOH (85:15)
ACP622	2	27,2	CHCl ₃ :MeOH (8:2)
ACP623	3	32,0	CHCl ₃ :MeOH (7:3)

A fração ACP621 foi submetida a separação por CCDP, sendo o eluente uma mistura de CHCl₃:MeOH (95:5). Foram recolhidas 10 frações (Tabela 5, p. 31), dentre elas foram isoladas as frações ACF6 (9,2 mg) e ACF7 (5,5 mg) que se mostram puras em análises por CCD (ou CLAE) (Fig. 4, p. 31).

Tabela 5: Fracionamento da fração ACP621

Código	Massa (mg)	Código	Massa (mg)
ACF1	11,2	ACF6	9,2
ACF2	4,8	ACF7	5,5
ACF3	4,8	ACF8	11,8
ACF4	4,5	ACF9	21,2
ACF5	6,7	ACF10	21,6

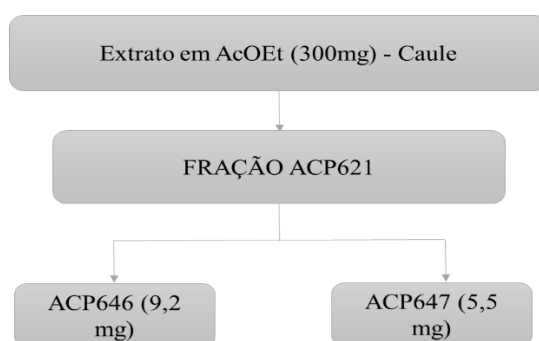


Figura 4: Esquema do fracionamento do extrato em AcOEt do caule

7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA PARA EXTRATOS E CONSTITUINTES ISOLADOS

7.1 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante determinada através do método do sequestro do radical DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995) segundo a metodologia anteriormente descrita na literatura (ALVES, 2010). O teste avalia a capacidade de a amostra reduzir o radical DPPH, de coloração púrpura, a 2,2-difenil,1-picril hidrazina, de coloração amarela, o declínio da coloração é monitorada pelo decréscimo da absorbância com o auxílio de um espectrômetro no comprimento de onda de 517 nm. Foram avaliadas diferentes concentrações (10 a 250 mg. L⁻¹) de amostra.

Foi preparada uma solução de DPPH em metanol 40 µg. mL⁻¹, da qual foram retirados 2,7 mL e adicionados a 0,3 mL da solução amostra ou padrão nas diferentes concentrações contidas em cubetas de poliestireno. A medida da absorbância foi feita em espectrofotômetro UV/Vis no comprimento de onda 517 nm, usando como controle positivo o padrão de ácido gálico nas mesmas concentrações das amostras. As leituras foram realizadas no momento do contato da solução de DPPH e a amostra (t₀) e após 30 minutos (t₃₀). O branco (controle) foi preparado somente com metanol (Fig 5, p. 33). Todas as amostras foram analisadas em triplicata e os dados submetidos a análise de variância (ANOVA), usando teste Tukey com (p < 0.05). A porcentagem do sequestro do radical livre (% SRL) foi calculada através da equação:

$$\%SRL = \frac{A_0 - A_{30}}{A_0} * 100$$

Sendo:

A₀: Absorbância inicial do controle no t₀

A₃₀: Absorbância da amostra no t₃₀

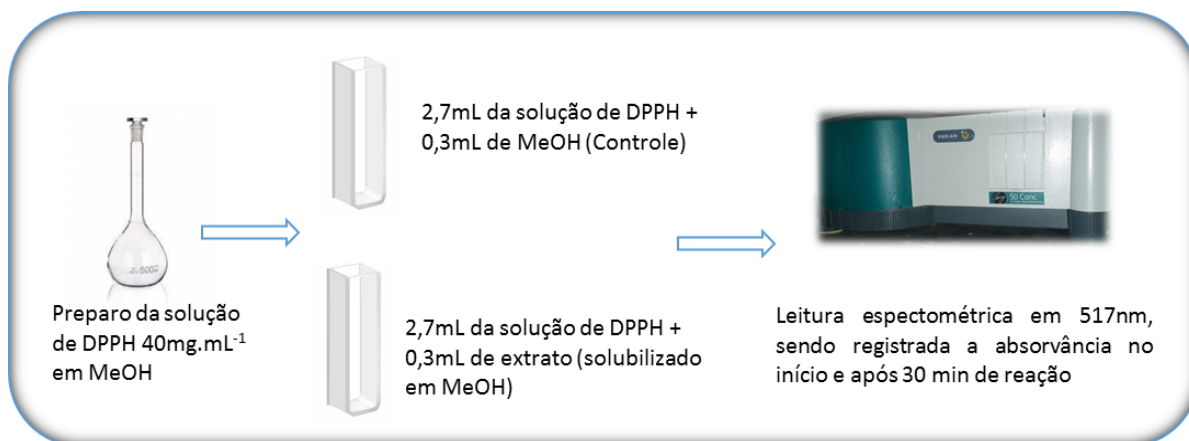


Figura 5: Avaliação da atividade antioxidante

7.2 Avaliação da atividade inibitória da enzima Acetilcolinesterase

A avaliação da atividade inibitória da enzima Acetilcolinesterase (AChE) foi feita a partir do método descrito por Ellman *et al.*, (1961), que propõe um método fotométrico de detecção da ação inibitória da enzima AChE. Utilizando-se como substrato a acetiltiocolina, um análogo do substrato natural ACh. A atividade enzimática foi avaliada através do aumento da coloração amarela decorrente da hidrólise da acetiltiocolina a tiocolina. A tiocolina reage então com íon 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoato] (reagente de Ellman), produzindo o íon colorido 5-tio-2-nitro-benzoato cuja reação pode ser acompanhada em 405 nm.

O teste foi realizado em microplaca, foram depositadas em cada uma das cavidades 13 µL de iodeto de acetiltiocolina (15 mM), 62 µL de ácido 5-5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (3 mM), 25 µL de tampão fosfato pH 8 com 0,1% de soro de albumina bovina e 20 µL da amostra a ser testada nas concentrações de 15 a 1000 mg. L⁻¹. Após 10 minutos de incubação da microplaca a 37 °C, foi realizada a leitura da placa no leitor de microplacas no comprimento de onda de 405 nm e então foram adicionados 12 µL da enzima (0,22 U/mL) foi registrada a absorvância final após mais 5 minutos de incubação na mesma temperatura anterior (Fig 6, p. 34).

A fisostigmina foi usada como padrão positivo de referência e o teste foi realizado em triplicata para cada uma das amostras e o padrão. A absorvância da amostra foi corrigida, subtraindo-se a absorvância do respectivo branco.

$$\%I = \frac{AChE - AChI}{AChE} * 100$$

Sendo:

AChE: a absorvância medida na ausência do inibidor

AChI: a absorvância medida na presença do inibidor

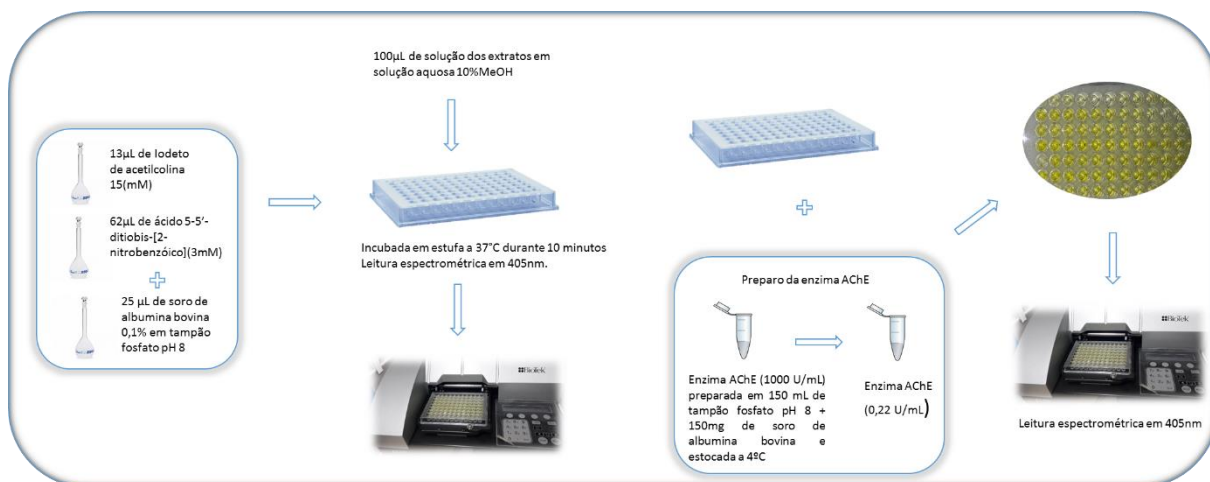


Figura 6: Determinação da atividade inibitória frente a acetilcolinesterase

7.3 Teste de letalidade frente à *Artemia salina*

A toxicidade dos extratos e das substâncias isoladas foi avaliada de conformidade com o teste de letalidade de *Artemia salina* (Meyer *et al.*, 1982). A metodologia sugeriu que os náuplios de *A. salina* fossem coletados e após o período de incubação em água do mar artificial de 48 horas, estes foram colocados em contato com as amostras durante 24 horas.

O aquário adaptado para a eclosão dos ovos de *A. salina* é dividido em dois compartimentos, os ovos foram depositados no compartimento protegido da luz, e com a eclosão, após 48h de incubação, os náuplios migraram para o compartimento iluminado. Foi feita a transferência de exatos 10 náuplios para cada tubo de ensaio contendo 5 mL das amostras dos extratos em diferentes concentrações (25 a 500 mg. L⁻¹) que também foram preparados em solução salina e acrescido de 10% de DMSO para auxiliar na solubilização das amostras. O controle negativo também foi preparado com a mesma quantidade de DMSO, porém livre da amostra. Os nauplios foram mantidos em contato com a amostra durante o período de 24 horas e foi feita a contagem dos náuplios vivos e mortos (Fig 7, p. 35). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

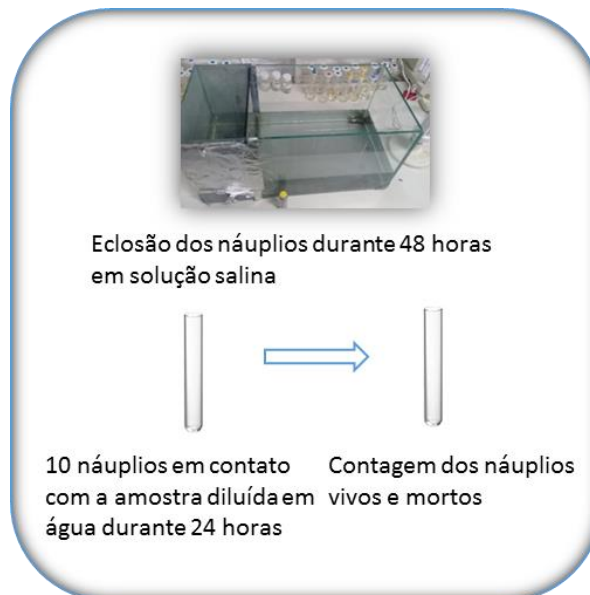


Figura 7: Teste de letalidade frente a *A. salina*

7.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir da cultura de 24 horas à 37 °C em uma mistura de CMH (Caldo Miller Hinton) (6,75 g) e ágar (2%) em 250 mL de água destilada que foi esterilizada em autoclave. Com o auxílio de alças de platina esterilizadas cada uma das culturas dos microrganismos foram transferidas para os tubos contendo 5 mL de solução salina (0,9%) também esterilizada, as padronizações das suspensões foram feitas comparando-as com o tubo 0,5 da escala McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL) por meio da leitura espectrométrica no comprimento de onda 625 nm (T% 81). Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10, em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do Manual 38 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006) para as bactérias aeróbicas, com modificações.

As amostras foram preparadas em CMH acrescido de 100 µL de DMSO nas concentrações de 30 a 1000 mg. L⁻¹. Os orifícios das microplacas foram preenchidos com 80 µL de amostra e

20 μL das suspensões dos microrganismos padronizadas após a diluição em CMH. As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

Como controle positivo foi utilizado a amoxicilina e o cloranfenicol, nas mesmas concentrações das amostras testadas. Também foi realizado o controle negativo do solvente. Os testes foram realizados em triplicata.

A determinação da CIM foi feita a partir da adição de $30\mu\text{L}$ de solução aquosa revelador resazurina ($100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e leitura após 2 horas. A presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002), a menor concentração na qual foi observada a coloração azul foi determinada como a CIM (Fig. 8, p. 36).

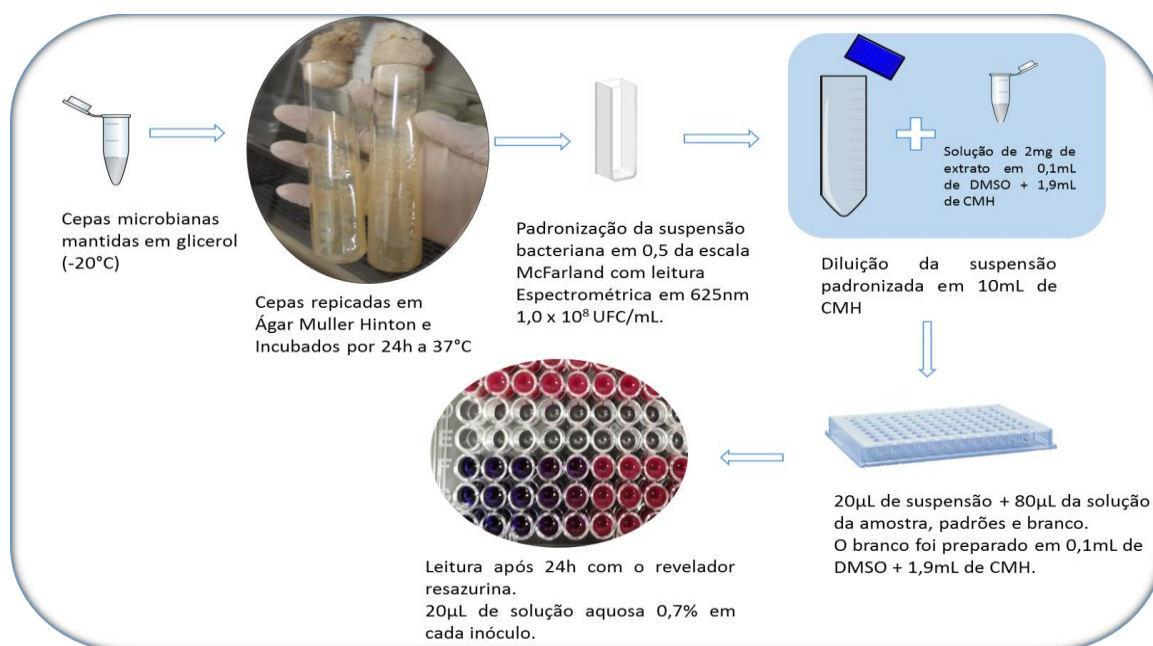


Figura 8: Avaliação da atividade antimicrobiana

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Identificação dos constituintes químicos isolados de *M. latifolium*

8.1.1 Identificação da composição da mistura ácidos graxos dos triglicerídeos

Foi obtida, do extrato em DCM das folhas, a primeira fração cromatográfica, DFP901, em forma de óleo de coloração amarela, por meio da separação deste extrato em CC utilizando como eluente o CH_2Cl_2 , que foi identificada como uma mistura de triglicerídeos e outras substâncias, cujo espectro na região do infravermelho apresentou bandas de absorção em 1734 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ do grupamento acila de ester, bandas em 2929 e 2850 cm^{-1} de estiramento da ligação $\text{Csp}^3\text{-H}$, a banda larga devido a ligação de hidrogênio intermolecular em 3450 cm^{-1} atribuída ao estiramento O-H , além da banda em 1109 cm^{-1} atribuída as vibrações do estiramento C-O de álcool secundário, o que indica a presença de hidroxilas na cadeia carbônica de metabólitos presentes ou do glicerol (Fig. 9, p. 37).

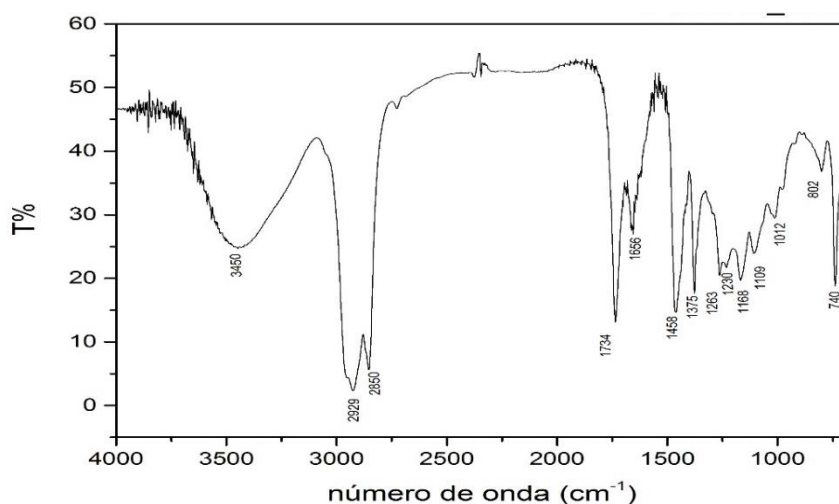


Figura 9: Espectro na região do infravermelho em filme da mistura de triglicerídeos e ácidos graxos obtida do extrato das folhas em DCM

Assim, a mistura foi submetida a uma reação de transesterificação, na qual os ésteres metílicos (28,2mg) foram obtidos (70,5% de rendimento), e separação cromatográfica por CG para que a identificação pudesse ser feita por comparação dos tempos de retenção da amostra (Fig 10, p. 38) com os tempos de retenção dos padrões de ésteres de ácidos graxos F.A.M.E. (Fig 11, p. 38) acrescido da comparação com os espectros de massa obtidos das bibliotecas NIST 14 com similaridade superior a 90%, cujas correspondências (Tabela 7, p. 39) mostraram que os ácidos graxos identificados apresentam cadeia carbônica saturada (Fig 12, p. 40).

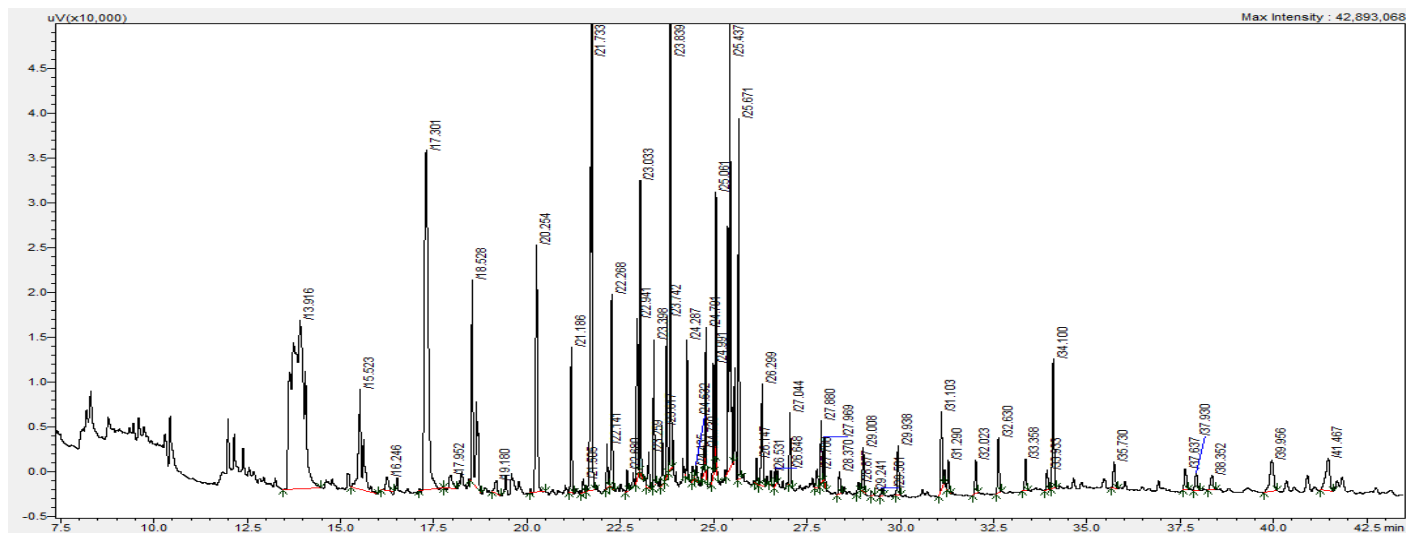


Figura 10: Cromatograma da mistura de ácidos graxos da fração do extrato em DCM de *M. latifolium* após transesterificação

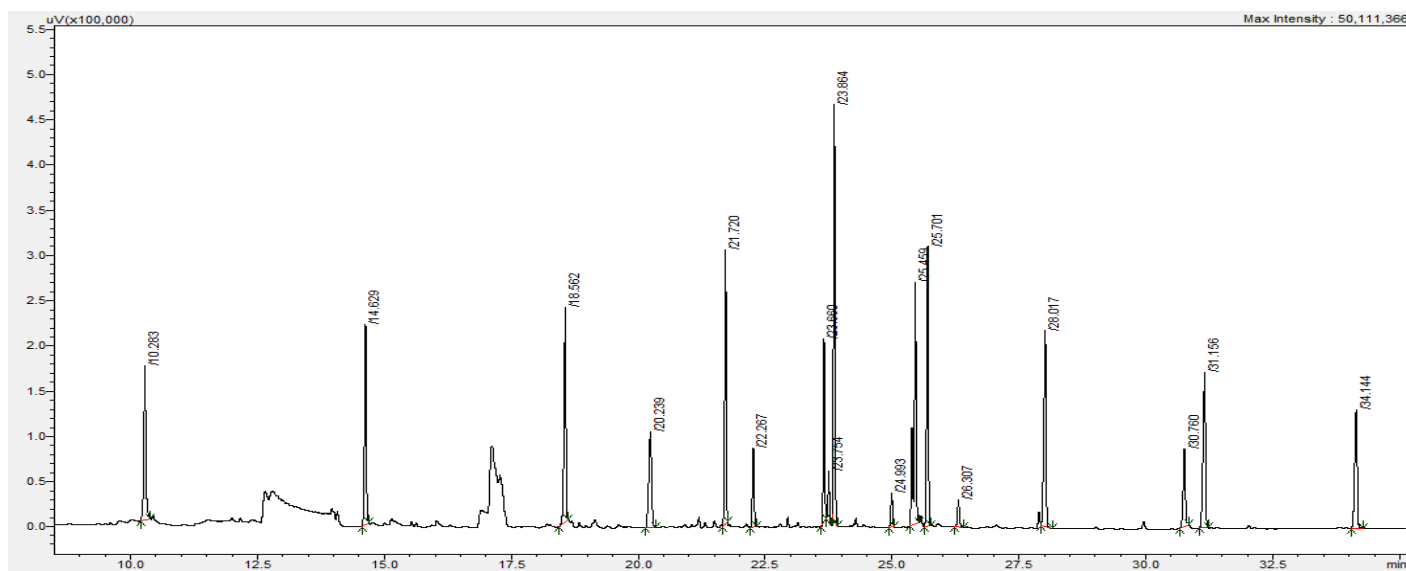


Figura 11: Cromatograma do padrão F.A.M.E. Mix C8-C24

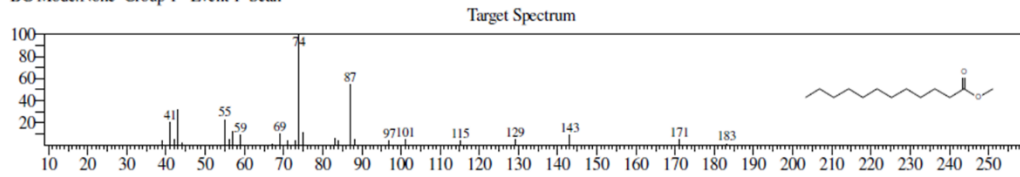
Pode-se verificar pelo cromatograma que a fração é rica em componentes. Apesar do indicativo da presença de álcool secundário a partir do espectro na região do IV, os ácidos graxos identificados além de não apresentar este grupo na sua estrutura, são saturados. A presença deste estiramento pode ser atribuída ao β -sitosterol (Rt 32,511) presente na mistura em proporção equivalente à do Octadecanoato de metila, o que está coerente pois deste extrato também foi isolada uma mistura de esteroides. Pela área relativa dos picos no cromatograma da mistura de ésteres derivados de ácidos graxos o componente majoritário da mistura é o ácido palmítico.

Tabela 6: Identificação dos éteres metílicos de ácidos graxos

Pico	Tempo de retenção	Porcentagem relativa (%)	Ésteres metílicos
1	18,552	7,52	Laurato de metila
2	22,167	43,28	Palmitato de metila
3	25,701	17,15	Octadecanoato de metila
5	28,017	5,36	Docosanoato de metila
6	31,156	11,83	Tricosanoato de metila
7	34,144	14,86	Tetracosanoato de metila

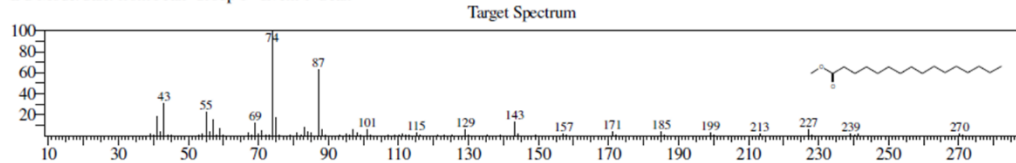
<< Target >>

Line#:2 R.Time:12.350(Scan#:1171) MassPeaks:26
RawMode:Averaged 12.342-12.358(1170-1172) BasePeak:74.00(33835)
BG Mode:None Group 1 - Event 1 Scan



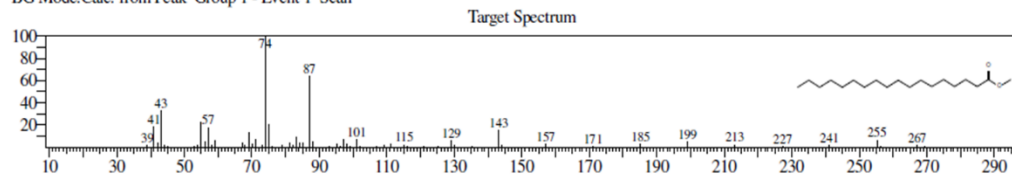
<< Target >>

Line#:5 R.Time:16.817(Scan#:1707) MassPeaks:79
RawMode:Averaged 16.808-16.825(1706-1708) BasePeak:74.00(308831)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



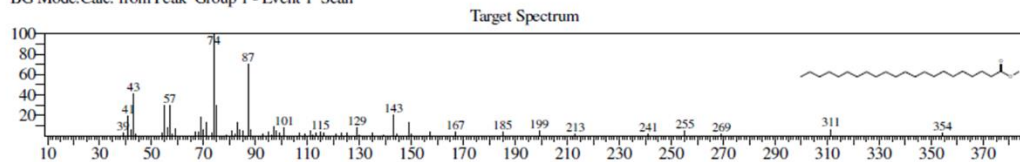
<< Target >>

Line#:11 R.Time:18.758(Scan#:1940) MassPeaks:62
RawMode:Averaged 18.750-18.767(1939-1941) BasePeak:74.00(116041)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



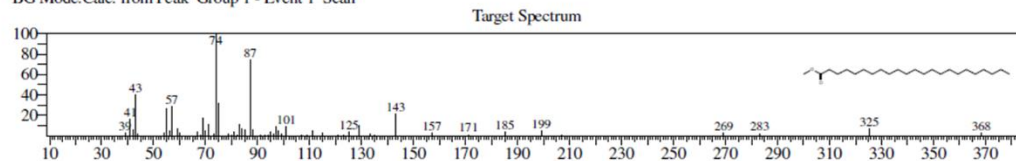
<< Target >>

Line#:16 R.Time:22.167(Scan#:2349) MassPeaks:63
RawMode:Averaged 22.158-22.175(2348-2350) BasePeak:74.00(46158)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



<< Target >>

Line#:17 R.Time:22.942(Scan#:2442) MassPeaks:57
RawMode:Averaged 22.933-22.950(2441-2443) BasePeak:74.00(30984)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



<< Target >>

Line#:18 R.Time:23.750(Scan#:2539) MassPeaks:83
RawMode:Averaged 23.742-23.758(2538-2540) BasePeak:74.00(72037)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan

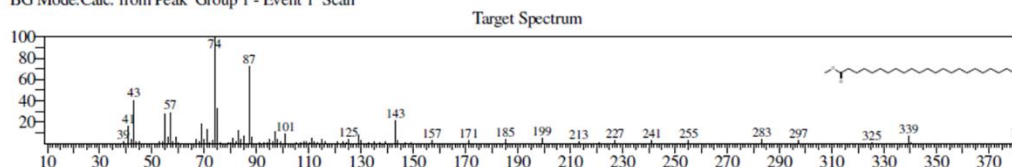


Figura 12: EM obtidos da análise por CG-MS com respectivas estruturas

8.1.2 Identificação DFP1303

Foram isoladas 51,6 mg dessa substância como um sólido branco amorfo que foi obtido por meio de duas colunas sucessivas, nas quais a terceira fração (DFP903) da primeira coluna do extrato em DCM foi submetida a uma separação cromatográfica, em que no sistema de solventes CH₂Cl₂:MeOH 99:1 foi obtida a terceira fração, DFP1303, com 35,5 mg, a quarta fração dessa mesma coluna também foi submetida a mais uma CC e foi obtida a amostra DFP1503 com 16,1 mg, que por CDD comparativa concluiu-se que se tratava da mesma amostra anterior.

Devido à baixa polaridade do solvente no qual foi obtido o extrato, foi utilizado o revelador de Liebermann-Burchard e, para essa amostra, houve reação positiva, sugerindo tratar-se de um triterpeno ou esteróide. A amostra foi submetida a análise de RMN dos núcleos de carbono 13 e hidrogênio. A análise dos dados do espectro de ¹³C RMN (Fig. 15, p. 45) permitiu comprovar a natureza triterpênica desta substância através da presença de trinta sinais de carbonos.

O espectro de RMN de ¹³C apresentou sinais em δ_C 158,1 e 116,9 que sugeriu a presença de ligação dupla na estrutura (Fig. 17, p. 46), também sugerida pelo espectro de RMN de ¹H dessa substância (Fig. 14, p. 44) que apresentou um sinal em δ_H 5,53 (*dd*, $J = 8,2$ e $3,2$ Hz) que também sugere a presença de hidrogênio olefínico, confirmando a presença de uma ligação dupla trissubstituída. Além dos sinais em δ_H 2,03 (*dt*, $J = 12,7$; $3,2$ e $3,2$ Hz) e δ_H 1,90 (*dd*, $J = 14,7$ e $3,2$ Hz) dos hidrogênios vicinais (Fig. 16, p. 46)

O sinal em δ_C 79,1 foi atribuído ao carbono oxigenado, cujas constantes de acoplamento do hidrogênio ligado a este em δ_H 3,19 (*dd*, $J = 11,3$ e $4,6$ Hz) sugere que a hidroxila se encontra na orientação beta. Além de oito sinais em δ_H 0,80; 0,82; 0,91; 0,91; 0,93; 0,95; 0,98; 1,09 (*s*) (Fig 18, p. 46) atribuídos a oito grupos metilas ligados a carbonos quaternários indicaram que a estrutura apresenta um esqueleto oleano.

Comparando-se os deslocamentos químicos obtidos por meio dos espectros de RMN de ¹³C e de ¹H, principalmente da dupla ligação e das metilas presentes nos espectros com os dados da literatura (Tabela 8, p. 41) permitiram identificar a substância como o 3 β -taraxerol.

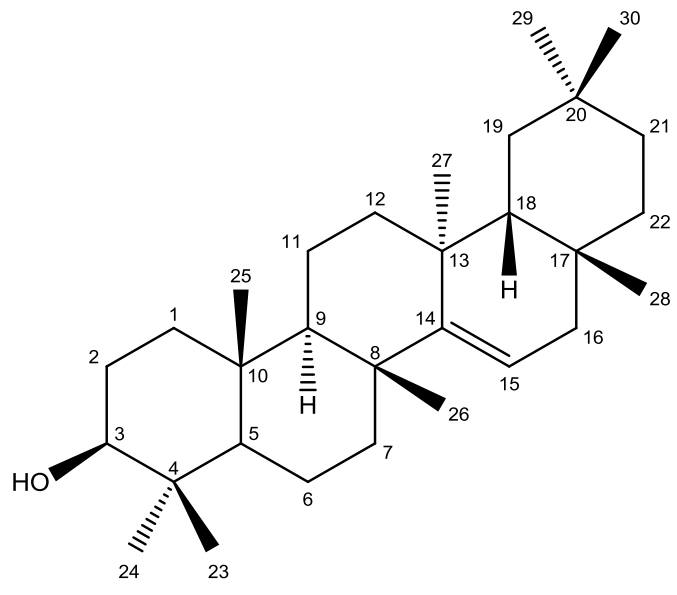


Figura 13: Estrutura do 3 β -Taraxerol

Tabela 7: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) da Substância DFP1303 e comparação com os dados da literatura

C	3β -taraxerol (SWAIN et al., 2012)	δ_{H} de DFP1303	3β -taraxerol (OLADOYE et al., 2015)	δ_{C}
1	-	-	37,7	38,0
2	-	-	27,7	27,1
3	3,20 (<i>m</i>)	3,19 (<i>dd</i> , $J=11,3$ e $4,6$ Hz)	79,1	79,1
4	-	-	39,0s	39,0
5	-	-	55,5	55,5
6	-	-	18,8	18,8
7	-	-	35,1	35,1
8	-	-	38,8	38,8
9	-	-	48,8	48,7
10	-	-	35,8	35,8
11	-	-	17,5	17,5
12	-	-	37,7	37,7
13	-	-	37,6	37,6
14	-	-	158,1	158,1
15	5,52 (<i>dd</i> , $J=8,0$ e $3,2$ Hz)	5,53 (<i>dd</i> , $J=8,2$ e $3,2$ Hz)	116,9	116,9
16	1,90 (<i>dd</i>)	1,91 (<i>dd</i> , $J=14,7$ e $3,2$ Hz) e 2,03 (<i>dt</i> , $J=12,7$; $3,2$ e $3,2$ Hz)	36,7	36,7
17	-	-	38,0	38,0
18	-	-	49,3	49,3
19	-	-	41,3	41,3
20	-	-	28,8	28,8
21	-	-	33,7	33,7
22	-	-	33,1	33,1
Me-23	0,96	0,98	28,0	28,0
Me-24	0,91	0,96	15,44	15,5
Me-25	0,96	0,95	15,4	15,4
Me-26	0,89	0,91	29,9	29,9
Me-27	1,07	1,09	25,9	25,9
Me-28	0,80	0,80	29,8	29,8
Me-29	0,93	0,93	33,3	33,4
Me-30	0,89	0,91	21,3	21,3

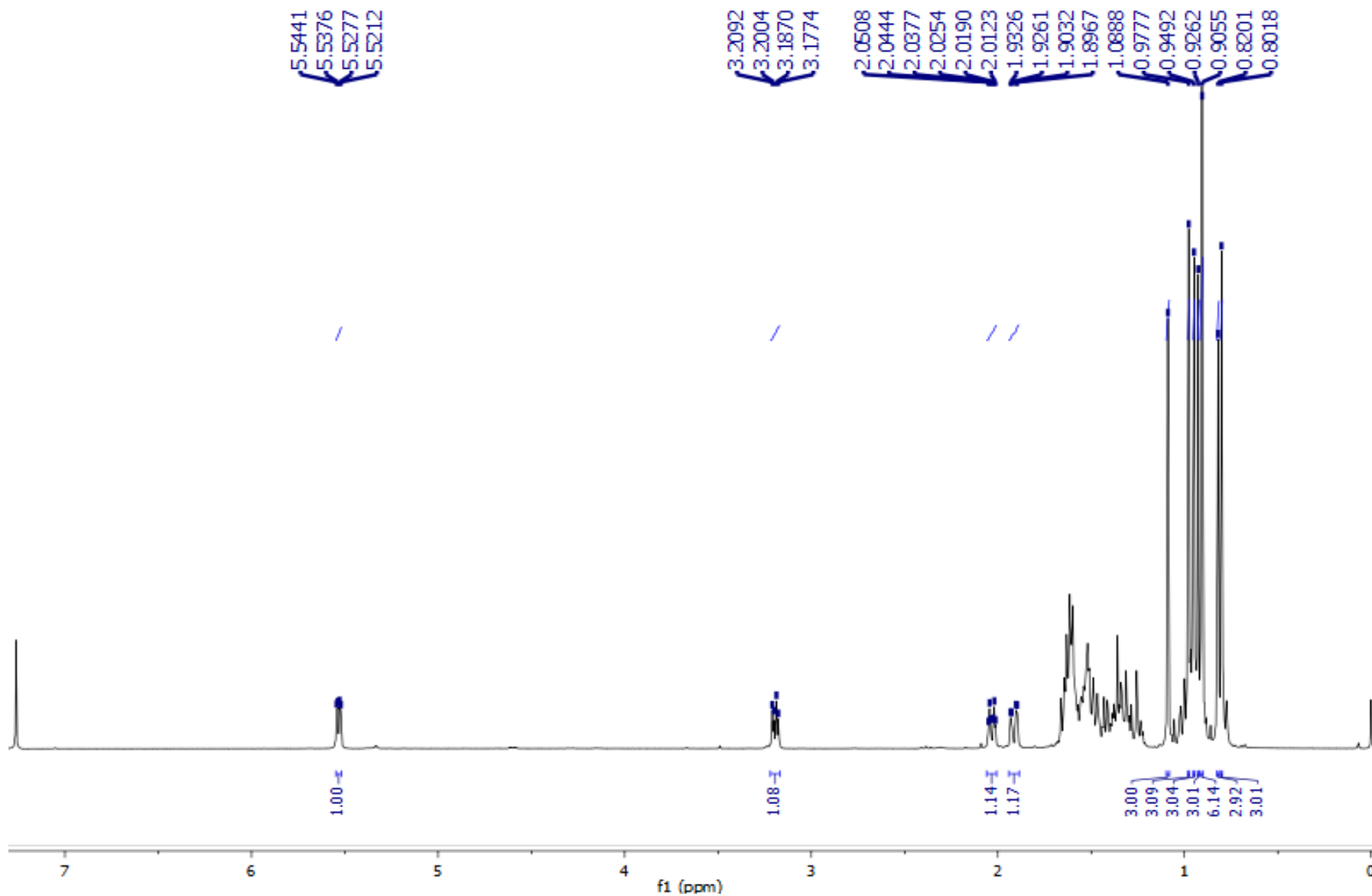


Figura 14: Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de DFP1303

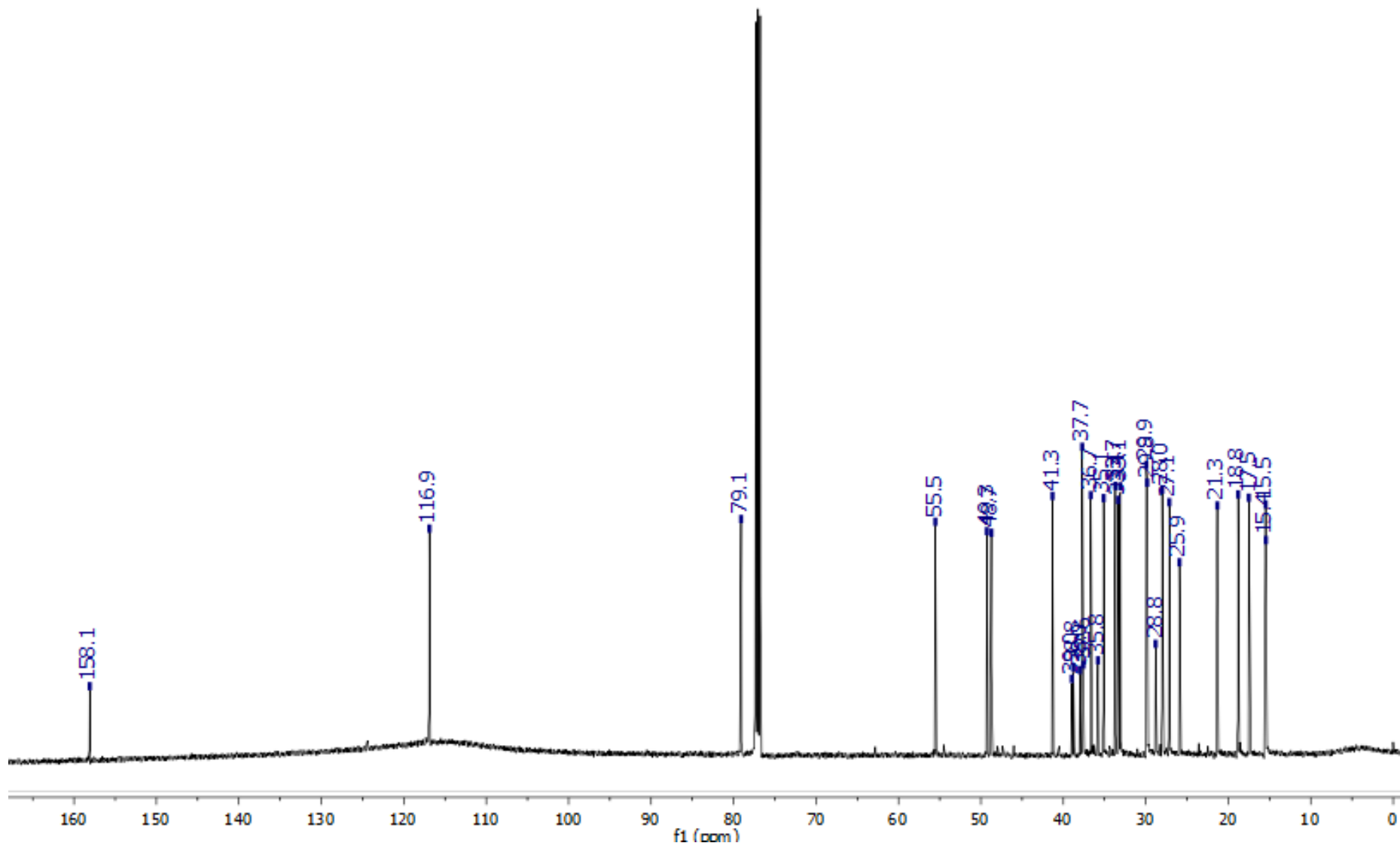


Figura 15: Espectro RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de DFP1303

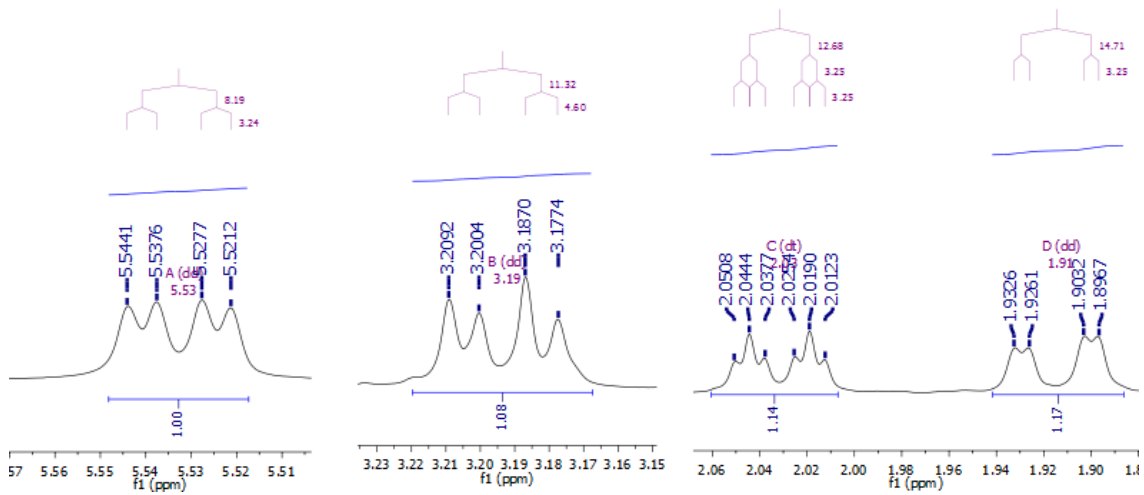


Figura 16: Espectro RMN de ^1H de DFP1303: expansões das regiões entre 5,51 e 5,57; 3,15 e 3,22; e 1,89 e 2,06 ppm.

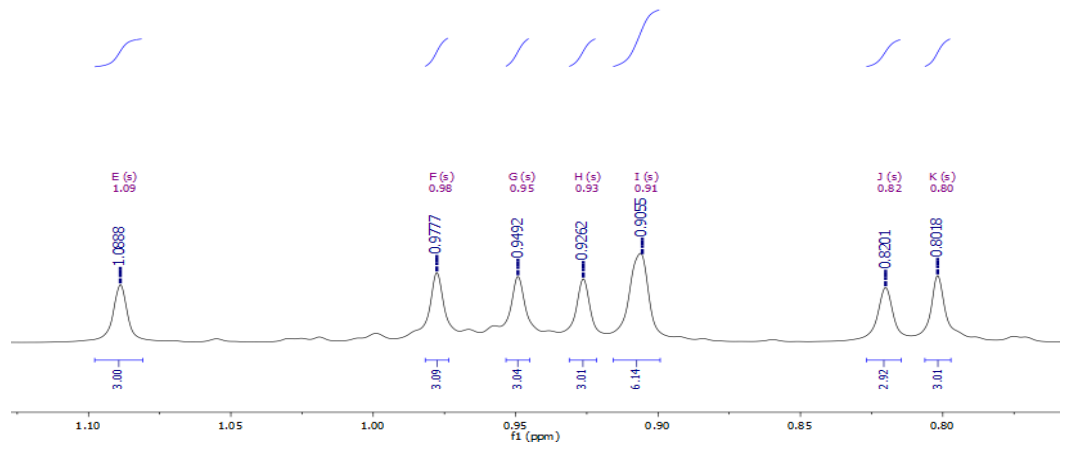


Figura 18: Espectro RMN de ^1H de DFP1303: expansão da região entre 0,80 e 1,10 ppm.

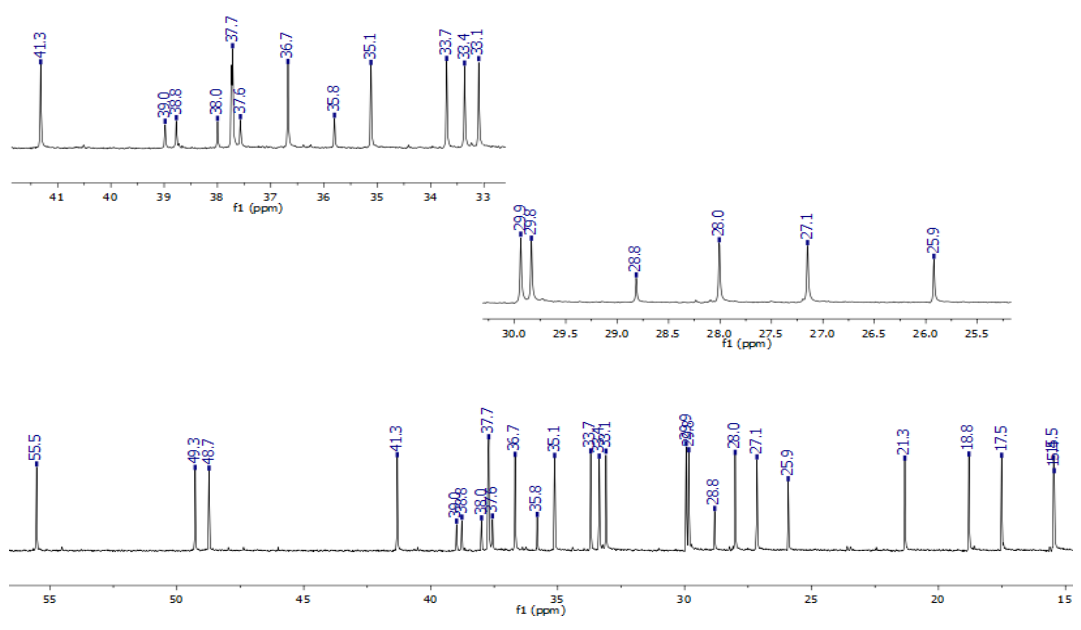


Figura 17: Espectro RMN de ^{13}C de DFP1303: expansões das regiões entre 15,0 e 56,0; 15,0 e 30,0 e 33,0 e 42,0 ppm.

8.1.3 Identificação da mistura DFP1504

Foram isolados 54,7 mg da substância DFP1504 que se apresentou como um sólido branco amorfo, esta foi obtida a partir do fracionamento da quarta fração (DFP1304) obtida da terceira fração (DFP903) do primeiro fracionamento do extrato em DCM. Devido à baixa polaridade do solvente no qual foi obtido o extrato, foi utilizado o revelador de Liebermann-Burchard havendo então reação positiva, sugerindo tratar-se de um triterpeno ou esteróide. Foi realizada uma CCD comparativa dessa amostra com substâncias já identificadas em diversas fontes (ALVES, 2012; ARAÚJO NETO, 2016) que foi eluída com mistura de Hex/AcOEt 8:2 (Fig. 19, p. 47), cujo Rf encontrado para ambas as amostras foi de 0,42 sugerindo tratar-se da mesma mistura.

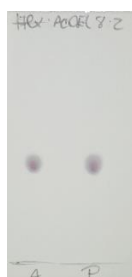


Figura 19: CDD comparativa entre a amostra DFP1504 e a amostra identificada anteriormente por ARAÚJO NETO (2016)

Foi realizada a análise de CG-EM afim de comprovar a composição da mistura. Nas análises por CG-EM foram identificados 3 picos majoritários no cromatograma obtido (Fig. 20, p. 48) identificados em comparação com os espectros de massa obtidos da biblioteca NIST 14 com similaridade superior a 90%, cujas correspondências estão mostradas na tabela 9 (p. 49). Onde foi observado que além do β -sitosterol e estigmasterol em sua composição foi também detectado o campesterol em proporção maior do que o estigmasterol, sendo o β -sitosterol o majoritário.

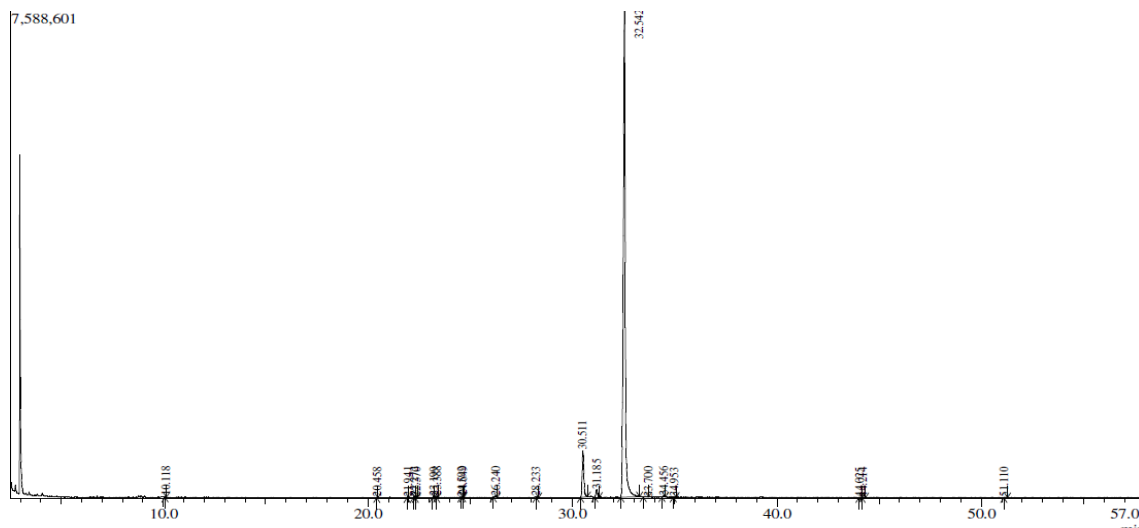
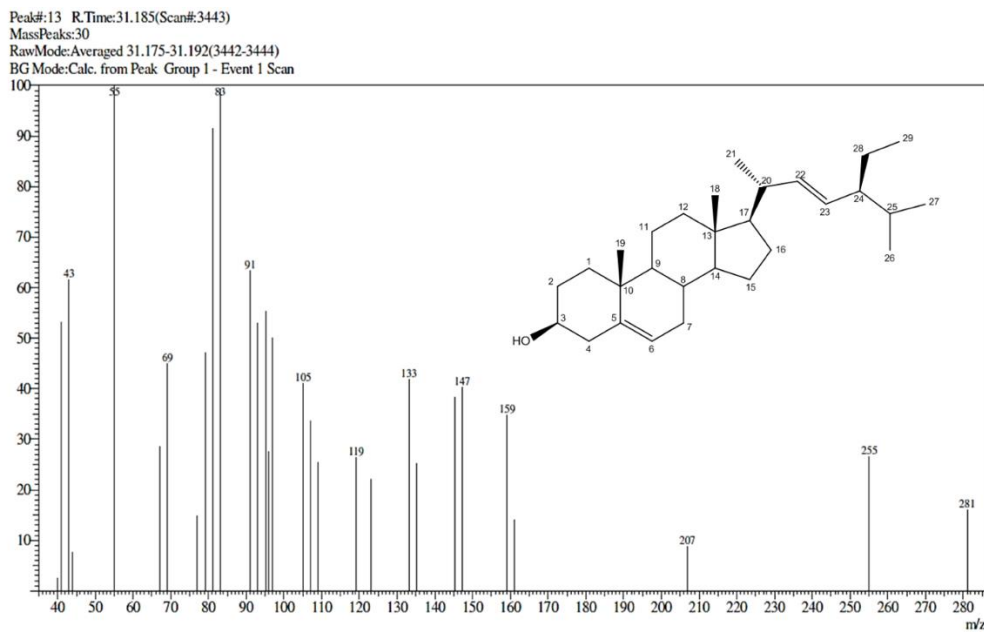
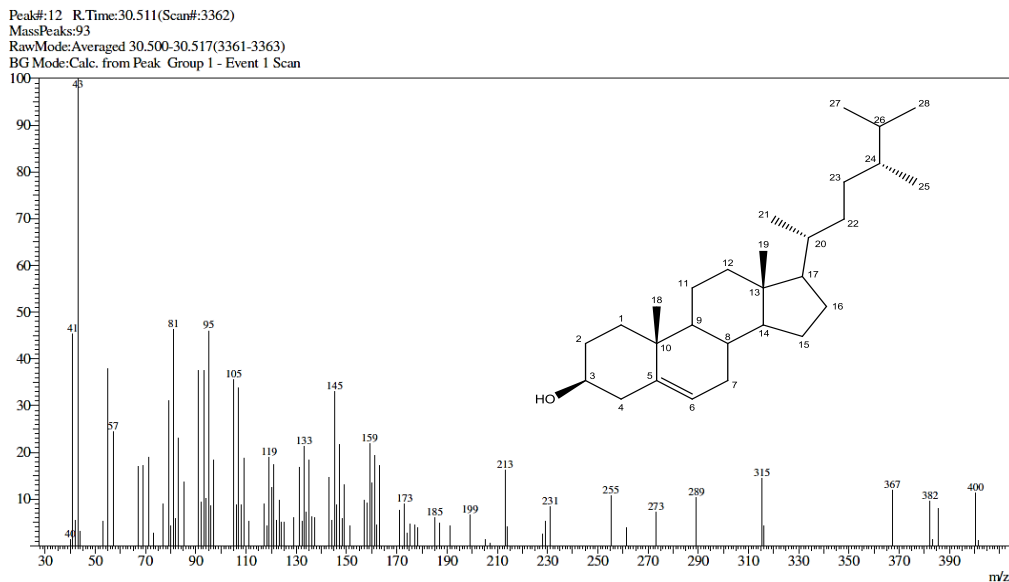


Figura 20: Cromatograma da mistura de esteroides DFP1504

Nos fitoesteroides identificados pela biblioteca como β -sitosterol e campesterol, a clivagem da ligação C17–C20 produz o fragmento ($M^+ - R = 273$), a quebra das ligações no anel D que forma o fragmento composto pelos átomos C15, C16 e C17 do anel D juntamente com a cadeia lateral R ($M^+ - R = 43$), que aparece como pico base para o β -sitosterol (DARNET & RAHIER, 2004) (Fig 23, p. 50) e também para o campesterol (Fig 21, p. 49). Para o estigmasterol (Fig 22, p. 49) não foi identificado o íon molecular em 414, no entanto o espectro de ^1H RMN apresentou sinais que foram atribuídos a esta estrutura.

Para comprovação inequívoca da composição da mistura foi registrado o espectro de RMN de ^1H (Fig. 24, p. 51), através da análise desse espectro pode-se verificar a presença do multiplete em $\delta_{\text{H}} 3,53$ (H-3) que pode ser atribuído ao átomo de hidrogênio ligado ao carbono oxigenado e pelo sinal em $\delta_{\text{H}} 5,37$ (*d*, $J = 5,16$ Hz, H-6) referente ao hidrogênio olefínico característico de fitoesteróis com dupla ligação entre os carbonos 5 e 6. Os sinais de menor intensidade $\delta_{\text{H}} 5,04$ (*dd*, $J = 8,3$ e $15,4$ Hz) e $\delta_{\text{H}} 5,17$ (*dd*, $J = 8,3$ e $15,4$ Hz) podem ser atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-22 e H-23, respectivamente, da cadeia lateral do estigmasterol.

Os singletos identificados em δ_H 0,66, 0,68, 0,78, 0,80, 0,83, 0,89, 0,91 e 0,99 foram atribuídos aos grupos metílicos das substâncias presentes na mistura. A análise dos dados de 1H RMN e a comparação com dados da literatura (GRECA et al., 1990) confirmam a composição da mistura.



Peak#:14 RTime:32.542(Scan#:3606)
 MassPeaks:227
 RawMode:Averaged 32.533-32.550(3605-3607)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan

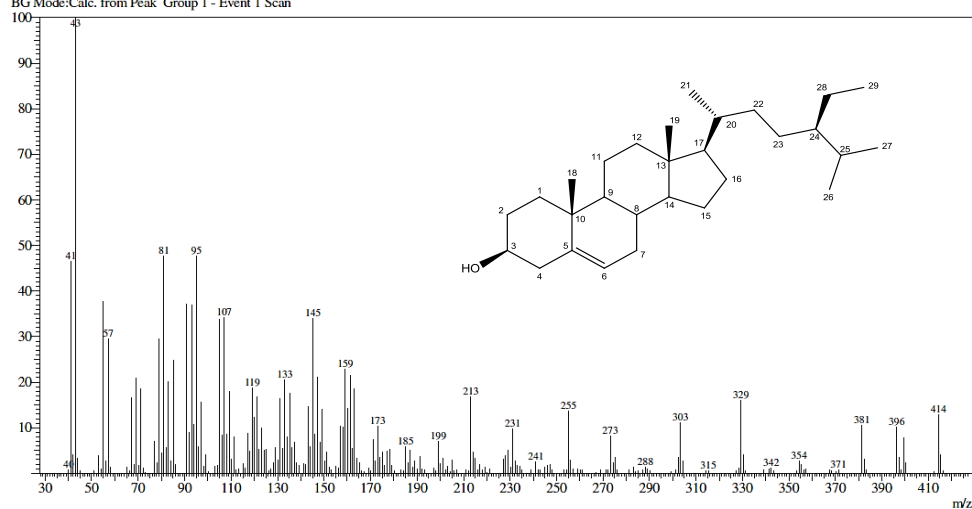


Figura 23: Espectro de massas do β -sitosterol

Tabela 8: Identificação da mistura DFP1605

Pico	Tempo de retenção	% área	Esteroides
1	30,511	7,64	Campesterol
2	31,185	1,15	Stigmasterol
3	32,542	89,77	β -sitosterol
Interferentes	-	1,44	-

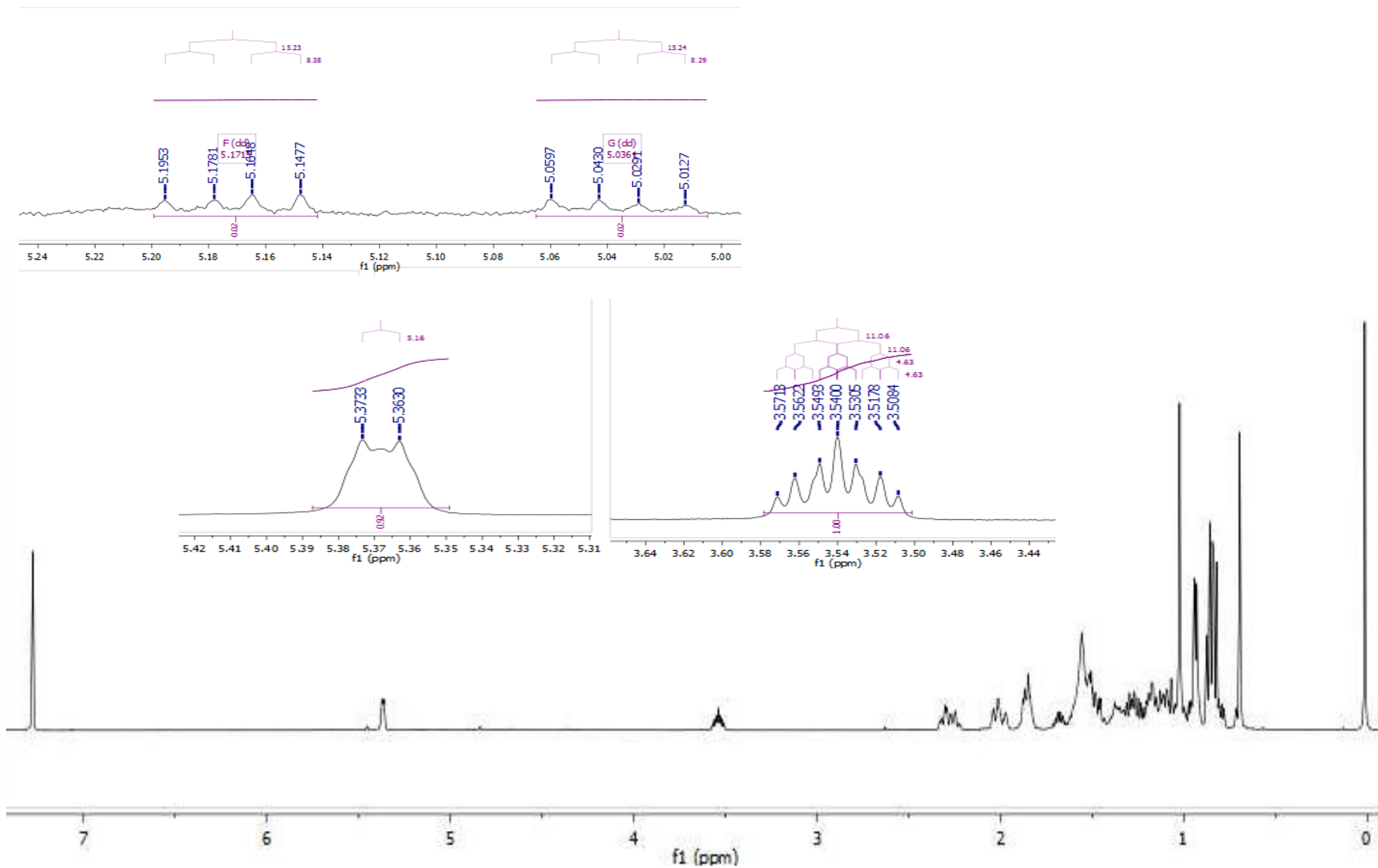


Figura 24: Espectro RMN de ^1H de DFP1504 e expansões das regiões entre 5,00 e 5,25; 5,31 e 5,42 e 3,44 e 3,64 ppm.

8.1.4 Identificação de DFP1603

Foram obtidos 18,8 mg de DFP1603 que se apresentou como um sólido cristalino branco em forma de agulhas. Essa substância foi obtida do fracionamento da segunda fração (DFP902) do extrato em DCM. Devido a polaridade do solvente no qual foi obtido o extrato, foi realizado o teste frente ao revelador de Liebermann-Burchard que apresentou resultado positivo, sugerindo tratar-se de um triterpenoide ou esteroide.

O espectro na região do IV (fig. 25, p. 52) apresentou bandas de absorção em 1712 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação C=O de grupo ceto além de estiramentos atribuídos a ligação $Csp^3\text{-H}$ em 2924 e 2870 cm^{-1} .

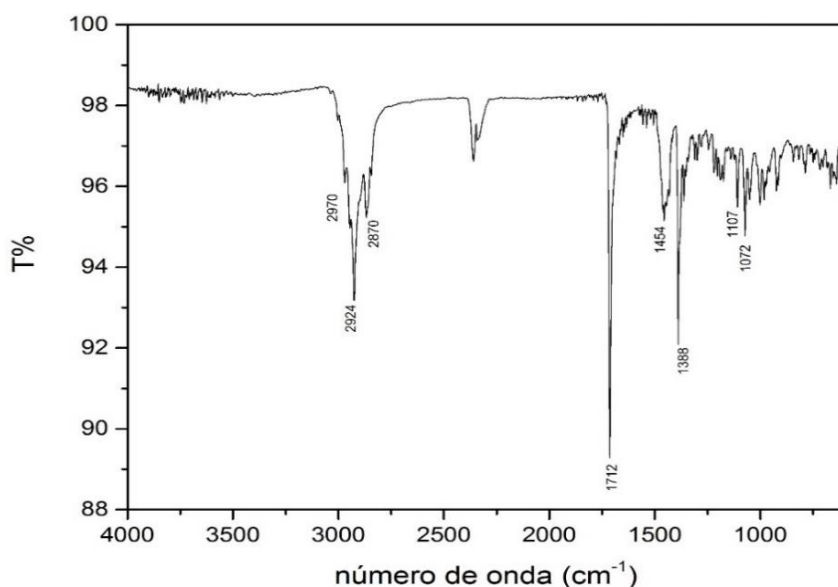


Figura 25: Espectro na região IV de DFP1603

Os sinais referentes a DFP1603 no espectro de RMN de ^1H (Fig. 26, p. 53) apresentam-se majoritariamente na região entre $\delta_{\text{H}} 0,7$ e $\delta_{\text{H}} 2,4$, característica de hidrogênios metílicos de substâncias de baixa polaridade (Fig. 27, p. 54) (Tabela 10, p. 58).

Foi identificada uma metila que se apresenta como dubleto em $\delta_{\text{H}} 0,88$ cujo espectro de HSQC permitiu verificar a correlação com o carbono em $\delta_{\text{C}} 6,8$ ppm, esse valor é indicativo de proteção causada pelo grupo ceto vicinal. A análise dos dados do espectro de HSQC e HMBC

permitiu comprovar a natureza triterpênica desta substância através da presença de trinta sinais de carbonos. Estes dados são indicativos que se trata de um triterpeno com esqueleto friedelano.

Por meio da análise dos espectros bidimensionais HSQC (Fig 29, p. 55) e HMBC (Fig 30, p. 55) foram identificadas e atribuídas as correlações entre os hidrogênios e carbonos da estrutura.

Através das correlações dos H α -carbonílicos registrados em δ_H 2,39 (*ddd*, $J= 13,7; 5,1$ e $1,9$, Hz, H-2 eq.), δ_H 2,31 (*ddd*, $J= 13,7; 7,2$ e $1,20$ Hz, H-2 ax.) e δ_H 2,25(*q*, $J= 6,73$ -Hz, H-4) (Fig. 29, p. 52) foi identificado um sinal em δ 213,4 (C-3) que indica a presença de uma carbonila, numa região característica de cetonas (Fig. 30, p. 57). As correlações obtidas através dos espectros bidimensionais permitiram atribuir corretamente os sinais e confirmar a localização dos grupos substituintes.

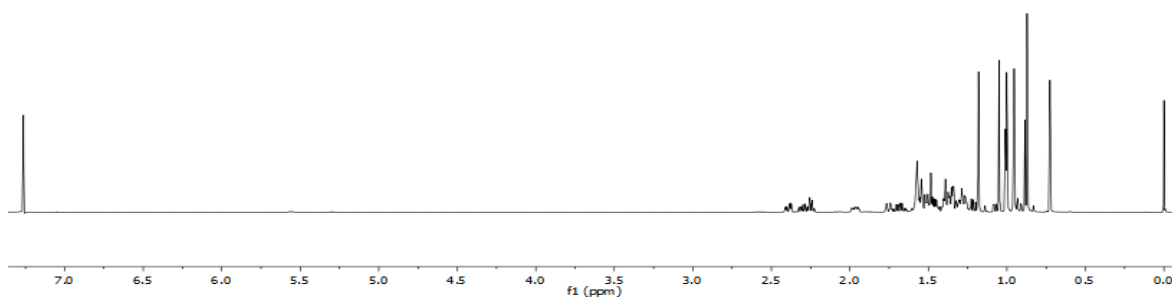


Figura 26: Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de DFP1603

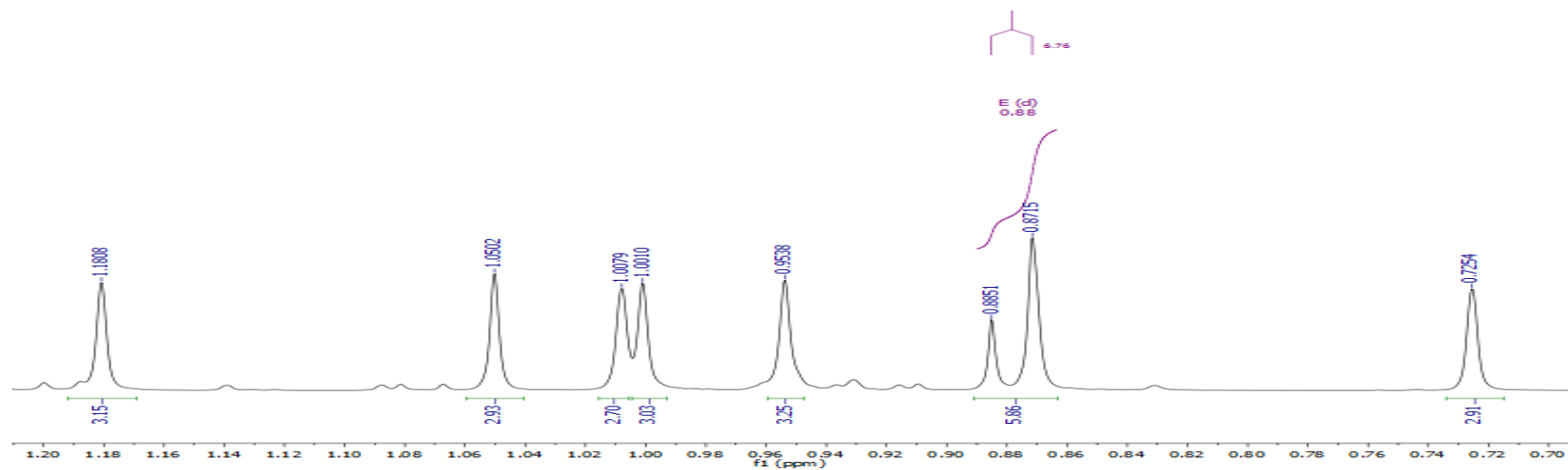


Figura 27: Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da DFP1603: expansão da região entre 0,7 e 2,20 ppm

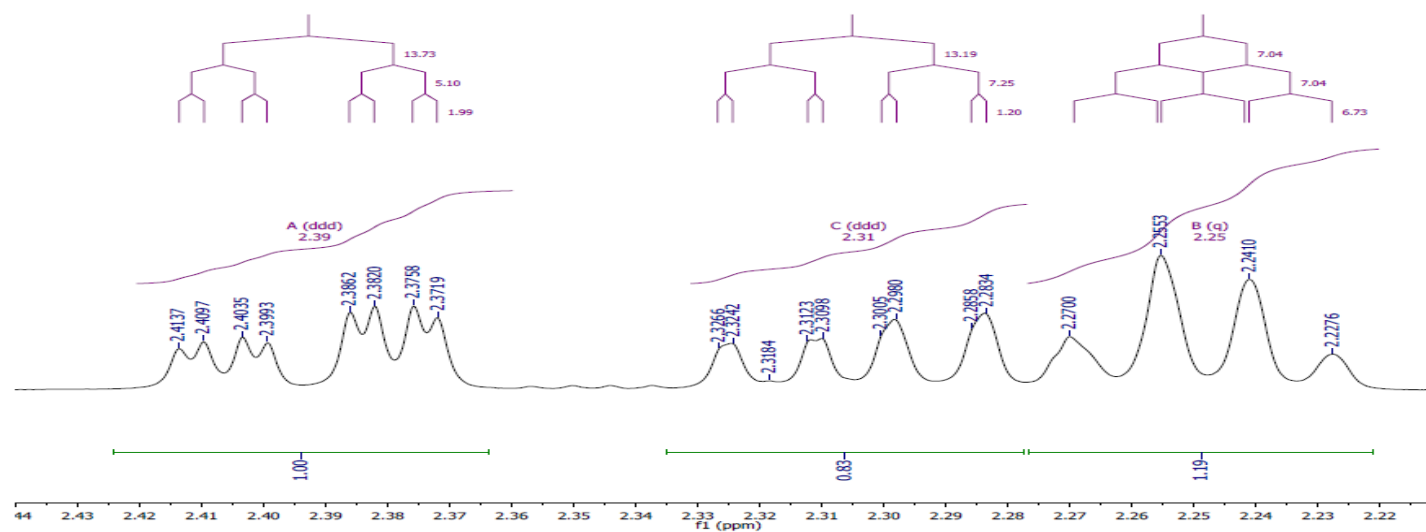


Figura 28: Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da DFP1603: expansão da região entre 2,22 e 2,44 ppm

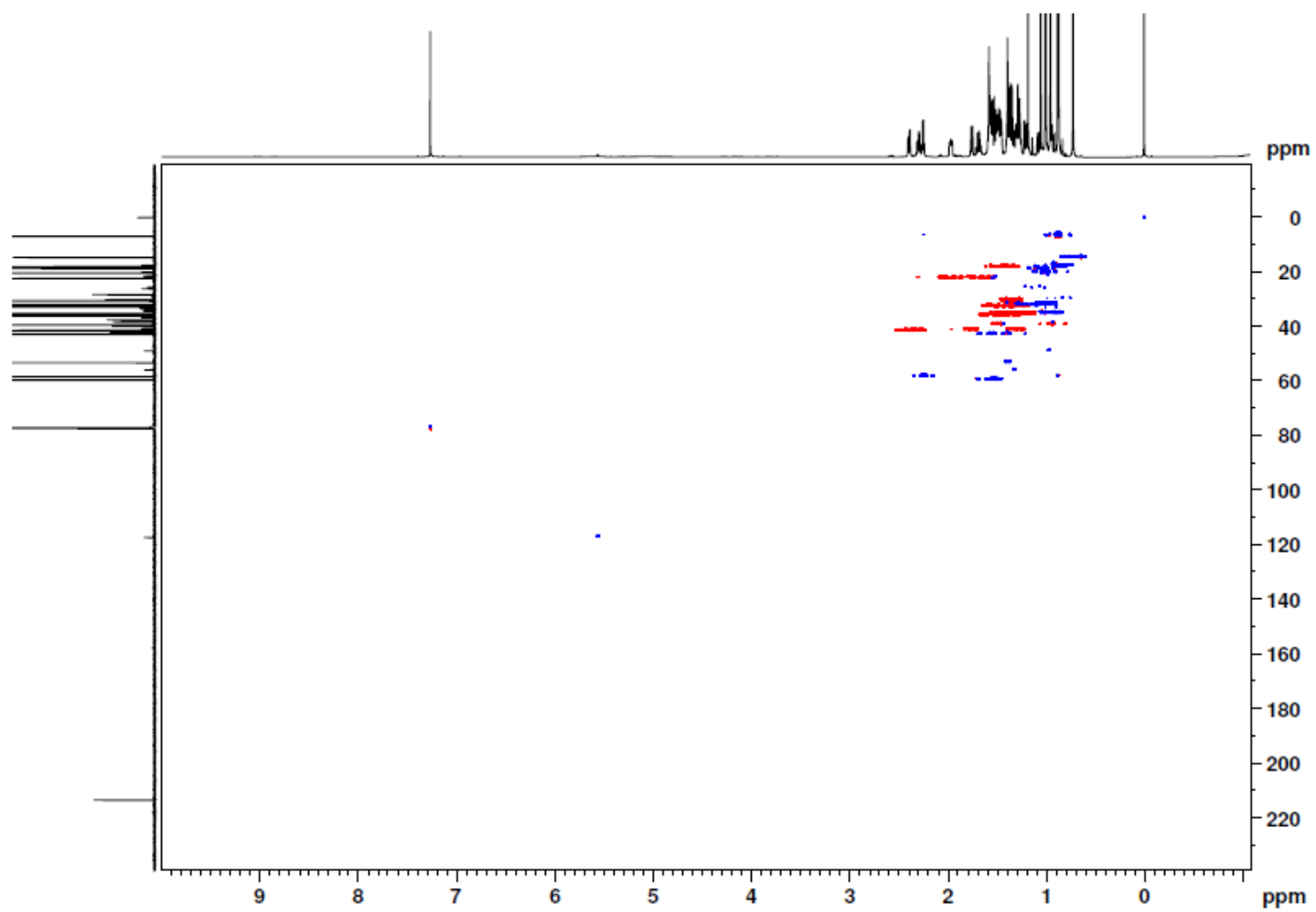


Figura 29: Espectro de HSQC de DFP1603 [CDCl_3 , δ (ppm)]

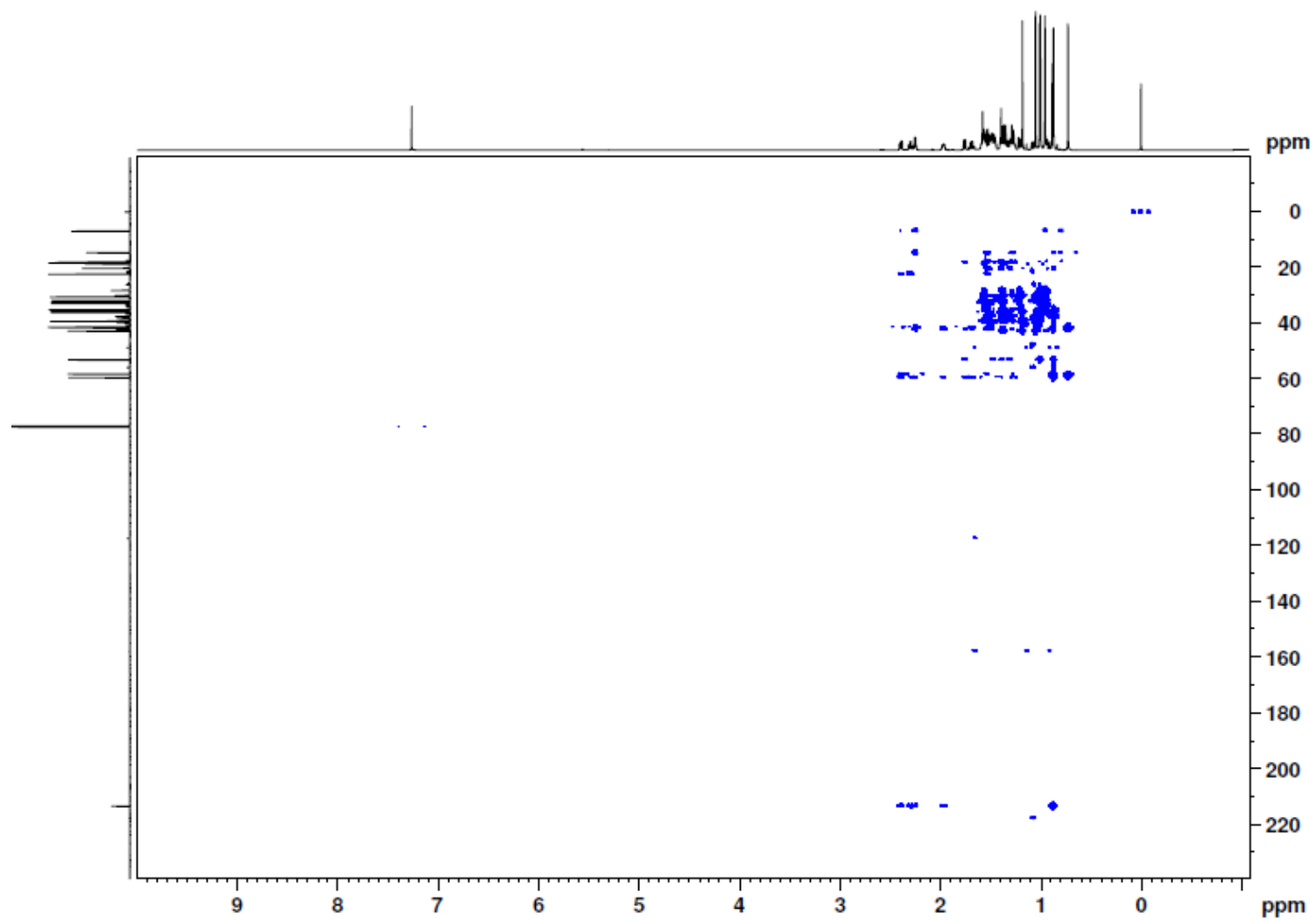


Figura 30: Espectro de HMBC de DFP1603 [CDCl_3 , δ (ppm)]

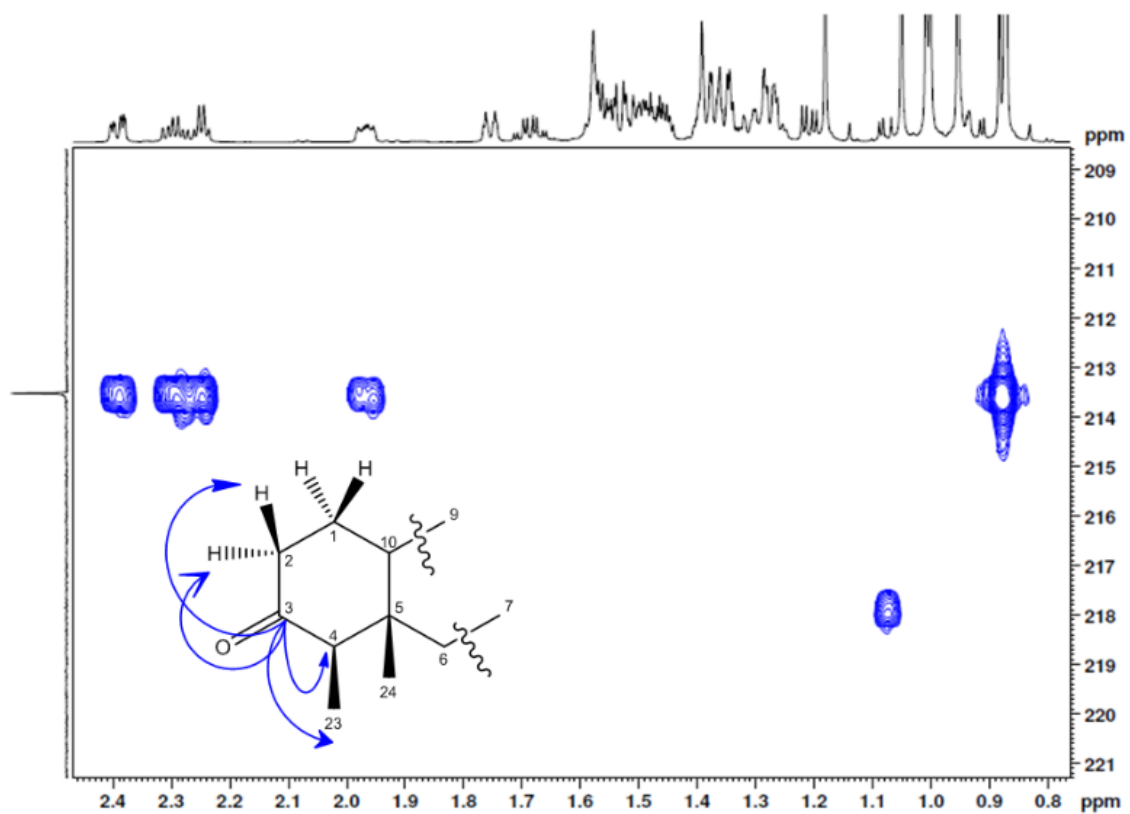


Figura 31: Ampliação do espectro de HMBC de DFP1603 [CDCl₃, δ (ppm)]

Assim, através de comparação com dados da literatura a substância DFP1603 foi identificada como friedelan-3-ona (Friedelina) (ALMEIDA et al, 2011).

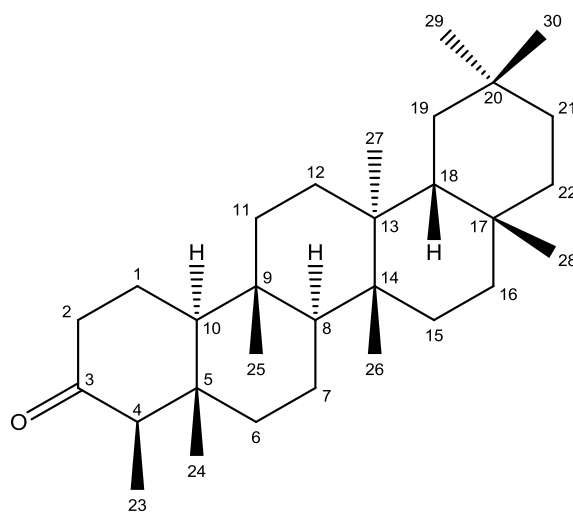


Figura 32: Estrutura da friedelina

Tabela 9: Dados de RMN de ^1H (δ_{H} , CDCl_3 , 500 MHz) de DFP1603 e comparação com os dados da literatura.

C	Friedelina (ALMEIDA et al., 2011)	δ_{H} (ppm) de DFP1603	Friedelina (ALMEIDA et al., 2011)	δ_{C} (ppm)
1	1,68 (<i>dq</i> ; $J = 13,0$; 5,1;H-1b)	1,69 (<i>dd</i> ; $J = 12,9$; 5,1;H-1eq)	22,3	22,6
2	2,39 (<i>ddd</i> ; $J = 13,7$; 5,1; 1,9; H-2a) 2,29 (<i>m</i> ; $J = 13,8$; 13,6; 6,5; H-2b)	2,39 (<i>ddd</i> , $J = 13,7$; 5,1; 1,9 Hz, H-2 eq.) 2,31 (<i>ddd</i> , $J = 13,2$; 7,2; 1,2Hz, H-2 ax.)	41,5	42,0
3	-	-	213,2	213,4
4	2,24 (<i>q</i> ; $J = 6,5$; H-4)	2,25 (<i>q</i> , $J = 6,7\text{Hz}$; H- 4)	58,2	58,3
5	-	-	42,1	
6	1,75 (<i>m</i> ; H-6a) 1,27 (<i>m</i> ; H-6b)	1,75 (<i>m</i> ; H-6ax) 1,26 (<i>m</i> ; H-6eq)	41,3	41,6
7	1,59 (<i>m</i> ; H-7a) 1,47(<i>m</i> ; H-7b)	1,57 (<i>m</i> ; H-7ax) 1,50 (<i>m</i> ; H-7eq)	18,2	18,2
8	1,44 (<i>m</i> ; H-8a) 1,39 (<i>m</i> ; H-8b)	1,40 (<i>m</i> ; H-8ax e eq)	53,3	53,3
9	-	-	37,5	
10	1,55 (<i>m</i> ; H-10)	1,55 (<i>m</i> ; H-10)	59,5	59,4
11	1,38 (<i>m</i> ; H-11)	1,38 (<i>m</i> ; H-11)	35,6	35,4
12	1,35 (<i>m</i> ; H-12)	1,35	30,5	30,7
13	-	-	39,7	
14	-	-	38,3	
15	1,47 (<i>m</i> ; H-15a) 1,27 (<i>m</i> ; H-15b)	1,47 (<i>m</i> ; H-15ax) 1,25 (<i>m</i> ; H-15eq)	32,8	32,7
16	1,54 (<i>m</i> ; H-16a) 1,36 (<i>m</i> ; H-16b)	1,55 (<i>m</i> ; H-16ax) 1,35 (<i>m</i> ; H-16eq)	36,0	35,6
17	-	-	30,0	
18	1,56 (<i>m</i> ; H-18)	1,56 (<i>m</i> ; H-18)	42,8	42,8
19	1,37 (<i>m</i> ; H-19)	1,37 (<i>m</i> ; H-19)	35,4	35,4
20	-	-	28,2	
21	1,49 (<i>m</i> ; H-21)	1,49 (<i>m</i> ; 2H-21)	32,4	32,7
22	1,48 (<i>m</i> ; H-22)	1,49 (<i>m</i> ; 2H-21)	39,3	39,6
Me-23	0,87 (<i>d</i> ; $J = 6,5\text{ Hz}$; H-23)	0,88(<i>d</i> , $J = 6,8\text{Hz}$, H- 23)	6,8	6,8
Me-24	0,73 (<i>s</i> ; H-24)	0,73(<i>s</i> ; H-24)	14,7	14,5
Me-25	0,88 (<i>s</i> ; H-25)	0,90 (<i>s</i> ; H-25)	17,9	18,0
Me-26	1,01 (<i>s</i> ; H-26)	1,01(<i>s</i> ; H-26)	20,3	20,1
Me-27	1,05 (<i>s</i> ; H-27)	1,05(<i>s</i> ; H-27)	18,7	18,7
Me-28	1,18 (<i>s</i> ; H-28)	1,18(<i>s</i> ; H-28)	32,1	31,9
Me-29	1,00 (<i>s</i> ; H-29)	1,00(<i>s</i> ; H-29)	31,8	31,7
Me-30	0,95 (<i>s</i> ; H-30)	0,95(<i>s</i> ; H-30)	35,0	35,1

8.1.5 Determinação estrutural de AF4P54

Foram isolados 5,4 mg da substância codificada como AF4P54, que se apresentou como um sólido amorfo. Esta substância foi obtida a partir do fracionamento da quarta fração (AFP544) em CC no sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 9:1 que foi obtida a partir da separação em CC em fase reversa, no sistema 7:3 $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$, do extrato em AcOEt das folhas. Devido a polaridade do solvente do qual foi obtida, a amostra foi testada frente ao cloreto férrico e apresentou resultado positivo indicando a presença de grupos fenólicos. Sua estrutura foi determinada a partir da análise de dados espectrométricos e comparação com dados da literatura.

A análise do espectro de RMN de ^1H (Fig. 33, p. 59) permitiu verificar que os sinais de AF4P54 encontram-se na região δ_{H} 3,0 a 8,2. Também permitiu observar dois dubletos (δ_{H} 6,34 e δ_{H} 6,21) na região de hidrogênios ligados a sistema aromático cuja constante de acoplamento ($J=2,0$ Hz) é indicativo de acoplamento em meta. Verificou-se também a presença de singlete em δ_{H} 8,11 (Fig. 34, p. 60) e a presença de uma unidade de açúcar pelos sinais na região entre δ_{H} 3,0 e 5,4, cujo pico em δ_{H} 5,32(d, $J=1,5$ Hz) é característico de hidrogênio anomérico de um glicosídeo.

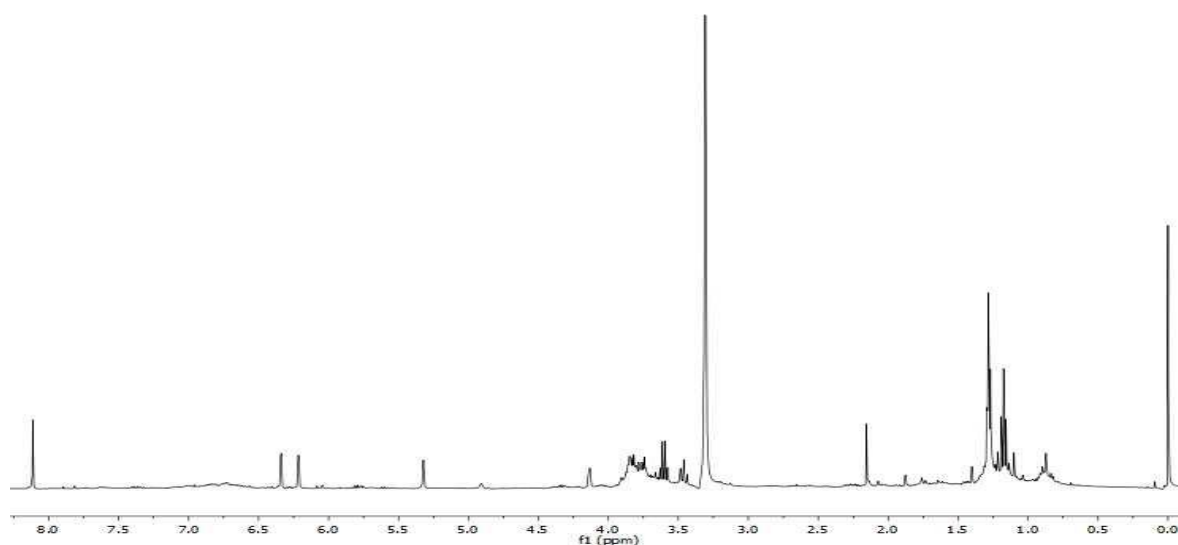


Figura 33: Espectro de RMN de ^1H de AF4P54 [CD_3OD , δ (ppm)]

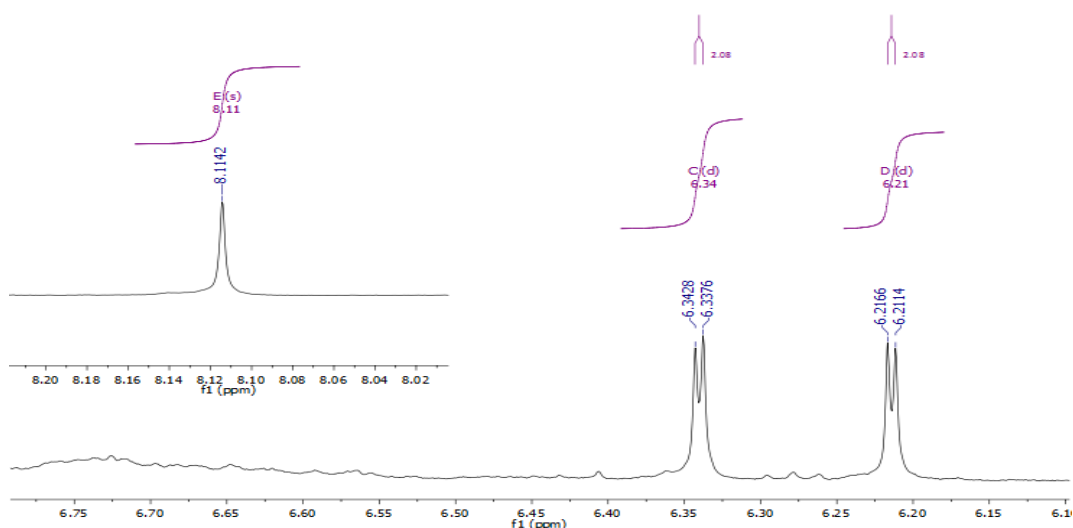


Figura 34: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de AF4P54

Uma proposta estrutural pode ser sugerida com o auxílio dos espectros de correlação. Pelo espectro de HSQC pode-se verificar as correlações entre os hidrogênios ligados diretamente aos carbonos da estrutura (Fig. 40, p. 65) (Tabela 11, p. 65). Esses dados foram importantes para determinar a multiplicidade de cada carbono e reconhecer os hidrogênios diretamente ligados a eles. O espectro de correlação bidimensional HMBC evidenciou correlações que permitiram identificar carbonos vizinhos não hidrogenados.

Os dados acima, aliados ao espectro de massas de alta resolução para esta substância (Fig 40, p. 63), cujo íon molecular foi registrado em MS (m/z): 339,0708 permitiu determinar a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_9$ (calculado para 339,0716). Considerando o sinal indicativo de glicosídeo identificado no espectro de RMN de ^1H , a fórmula estrutural resultante sugere que a estrutura se trata de uma cumarina C-glicosilada.

A presença de mais um sinal desprotegido em δ_{H} 8,11 não atribuído ao anel aromático sugeriu que o núcleo da estrutura seria uma cumarina, cujo valor de deslocamento para carbono ligado diretamente a ele observado no espectro de HSQC (δ_{C} 148,0) é indicativo de desproteção devido à localização β a carbonila desta classe de substância. No espectro bidimensional HMBC (Figura 41, p. 66) é possível identificar que este hidrogênio apresenta correlações com três carbonos. O não hidrogenado δ_{C} 159,3, identificado como o carbono oxigenado, outra correlação com o sinal em δ_{C} 178,9, que foi atribuído ao carbono do grupo acila e com o sinal em δ_{C} 140,5 atribuído ao carbono α em relação ao grupo acila. Estas correlações permitiram localizar inequivocamente o H-4 e C-4 da substância.

Os hidrogênios em δ_H 6,34 e δ_H 6,21 ($J=2,0$ Hz) apresentaram correlações que permitiram identificar determinadamente inequivocamente a posição dos substituintes na estrutura e os carbonos vizinhos não hidrogenados, que pode ser verificado no espectro HMBC ampliado (Figura 42, p. 67), sendo possível identificar que cada um dos hidrogênios se correlacionam com quatro carbonos.

Devido a correlação de ambos os hidrogênios com o sinal de carbono em δ_C 166,2, foi proposto que se trata do carbono *orto* não hidrogenado em relação a eles. Outro sinal no qual ambos apresentam correlação é o carbono não hidrogenado registrado em δ_C 106,6, que por apresentar absorção em região relativamente mais protegida, foi sugerido que ele se tratava do carbono 10, vizinho a oxigênios ligados a carbono aromático (C-5 e C-9) o que justifica o sinal registrado, que é um indicativo de proteção por efeito de ressonância que estes grupos provocam na posição *orto*. Deste modo, estes dados permitem determinar inequivocamente as posições das hidroxilas fenólicas no anel cumarínico.

Outra correlação importante observada no espectro HMBC foi do H-8 (δ_H 6,34) e o carbono vizinho C-9 (δ_C 159), indicativo de carbono sp^2 oxigenado. Esse dado permitiu atribuir o deslocamento químico do H-8 inequivocamente. Além disso, na correlação do hidrogênio em δ_H 6,21 (H-6), e C-8 (δ_C 95,3) pode-se observar que o mesmo também apresenta correlação com o sinal em δ_C 163,6 (C-5). Todos esses dados permitem concluir que se trata de um derivado de uma 5,7-di-hidroxycoumarina, com um açúcar glicosilado no anel lactônico.

A posição do glicosídeo na estrutura foi determinada a partir das correlações observadas no espectro HMBC do hidrogênio ligado ao carbono anomérico (δ_H 5,32) e os carbonos registrados em δ_C 140,5 e 72,0 que permitiram localizar o açúcar na posição C-3 do núcleo cumárico (Fig 43, p. 68).

Deste modo pode-se concluir que se trata de um derivado C-glicosilado de uma cumarina. O açúcar foi identificado como sendo a glicose através da comparação dos sinais de RMN de C-13 registrados no HSQC com dados da literatura (Tabela 11, p. 65). O anômero alfa foi determinado pela constante de acoplamento de $J = 1,5$ Hz observada para o H-1' da glicose. Assim, o conjunto dos dados espectrais permitiram concluir que a substância AF4P54 é a 3- α C-glicosil-5,7-di-hidroxycoumarina, isolada pela primeira vez.

De modo a subsidiar a estrutura proposta foram realizados os cálculos de deslocamento de carbono para estruturas similares (Fig 35, p. 61), onde foi possível ratificar a substituição do anel aromático nas posições 5 e 7, devido a presença da hidroxila na posição 8 indicar proteção *orto* no carbono C-9 além disso, os deslocamentos calculados para os carbonos C-9 e C-10 para as estruturas 2A e 2B apresentaram-se muito próximos dos valores obtidos por meio da análise dos espectros da substância isolada. Outro aspecto observado é que a presença de um oxigênio ligado diretamente ao C-3 implicaria numa proteção do C-4, o que confirma ser um C-glicosídeo.

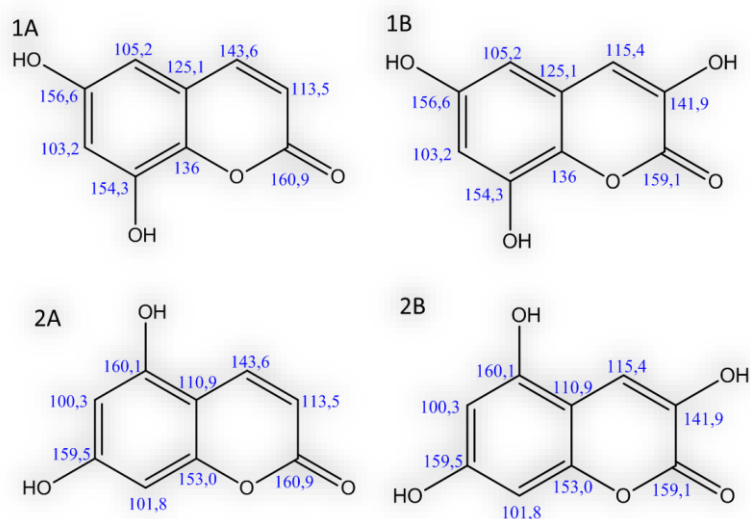


Figura 35: Deslocamentos químico (em Hz) de carbonos de estruturas similares

Algumas cumarinas C-glicosiladas já foram isoladas de plantas, a exemplo do Daurosideo D, 5,7 di-hidroxicoumarina 6-C- β -glucopiranosídeo, a primeira cumarina C-glicosilada isolada que foi obtida da *Huplophyllum dauricum* (Fig. 36 A, p 63) (VDOVIN *et. al*, 1983), cujos dados espectrométricos obtidos são similares ao da estrutura isolada neste trabalho, sendo os sinais dos carbonos C-9 e C-10 os mais próximos, ratificando a proposta de que a estrutura se trata da 5,7-di-hidroxicoumarina. Essa mesma estrutura foi posteriormente isolada da *Morus lhou Koidz* e o similar 8-C- β -glucopiranosídeo do natural 6-C- β -glucopiranosídeo foi sintetizado (Fig. 36 B, p 63) (MAHLING *et. al*, 1995). No entanto, para ambas estruturas é visto que os valores de deslocamento do hidrogênio anomérico de cada uma delas difere do obtido para a cumarina isolada em questão já que ambas são β -glicosiladas.

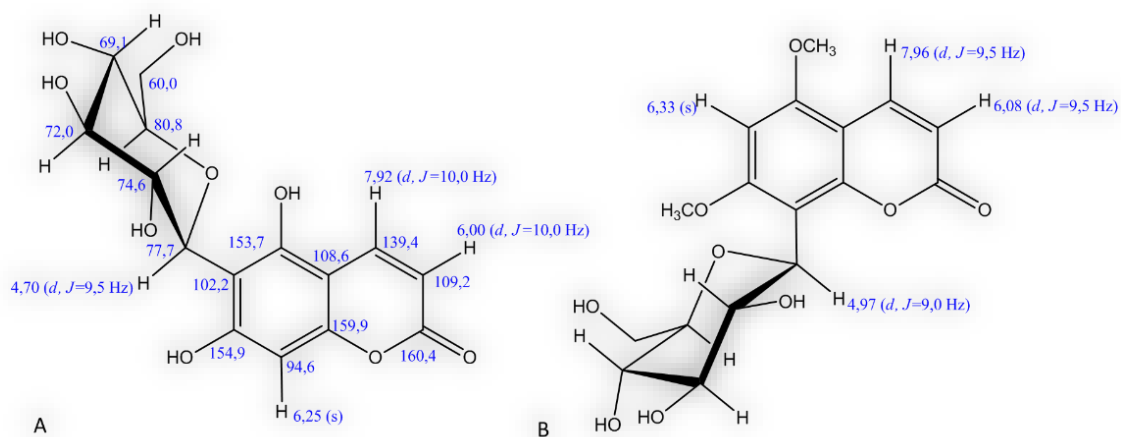
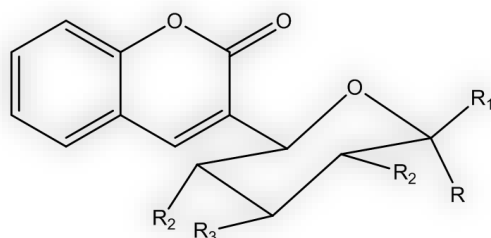


Figura 36: Estruturas e deslocamentos (em Hz) das cumarinas: A- Daurosídeo D e estrutura B do similar obtido por meio de síntese

Os dados espectrométricos foram também comparados com dados de estruturas similares e foi encontrado que valor de deslocamento químico do hidrogênio anomérico está de acordo com o de cumarinas C-glicosiladas sintéticas (Fig 37, p. 63) (SAHA *et. al*, 1999).



α - R₁=R₂=R₃=OH e R₁=H - 5,20 ppm (J= 3,6 Hz)
 β - R₁=R₂=R₃=OH e R=H - 5,01 ppm (J= 9,8 Hz)

Figura 37: Dados espectrometricos de cumarinas C-glicosiladas obtidas por síntese

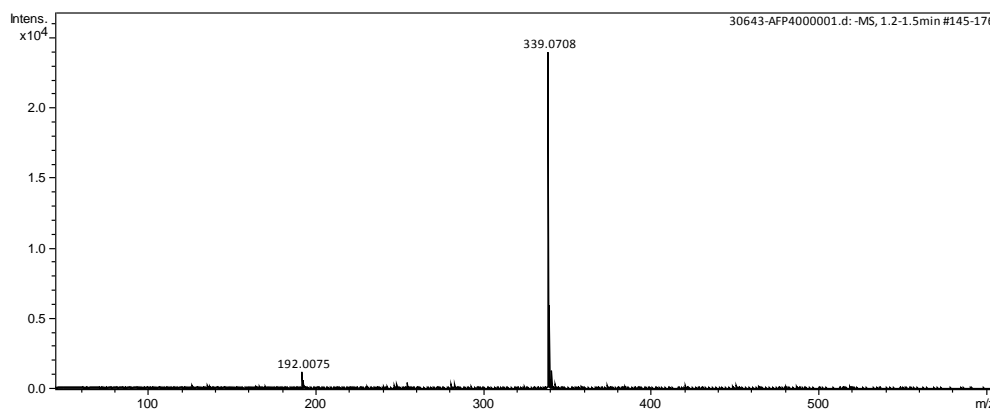


Figura 38: Espectro de massas de alta resolução de AF4P54

Tabela 10: Dados de RMN de AF4P54

C/Próton	δ_H	δ_C	HMBC (H→C)	
1	-	-		
2	-	178,9		
3	-	140,5		
4	8,11	148,0	3, 2 e 9	
5	-	163,6		
6	6,21 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,0 Hz)	100,2	10,6, 8 e 7	
7	-	166,2		
8	6,34 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,0 Hz)	95,3	9, 5, 10, 6	
9	-	159,3		
10	-	106,6		
	δ_H	δ_C		
		(PFEFFER, 1980)		
C(1')	5,31 (<i>d</i> , <i>J</i> =1,5Hz)	102,1	100,02	3 e 2'
C(2')	4,14 (<i>dd</i> , <i>J</i> =3,3 e 1,5Hz)	72,0	72,20	3'
C(3')	3,46 (<i>m</i>)	74,0	74,11	
C(4')	3,76 (<i>m</i>)	71,5	70,55	
C(5')	3,85 (<i>m</i>)	72,4	72,46	
C(6')	3,61 (<i>m</i>)	58,5	61,57	

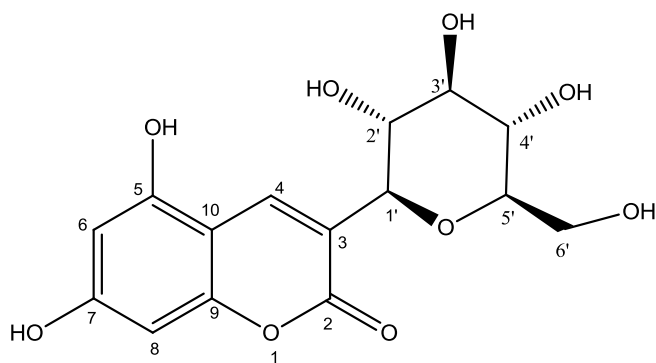


Figura 39: Estrutura da 3 α -C-glicosil-5,7-di-hidroxicumarina

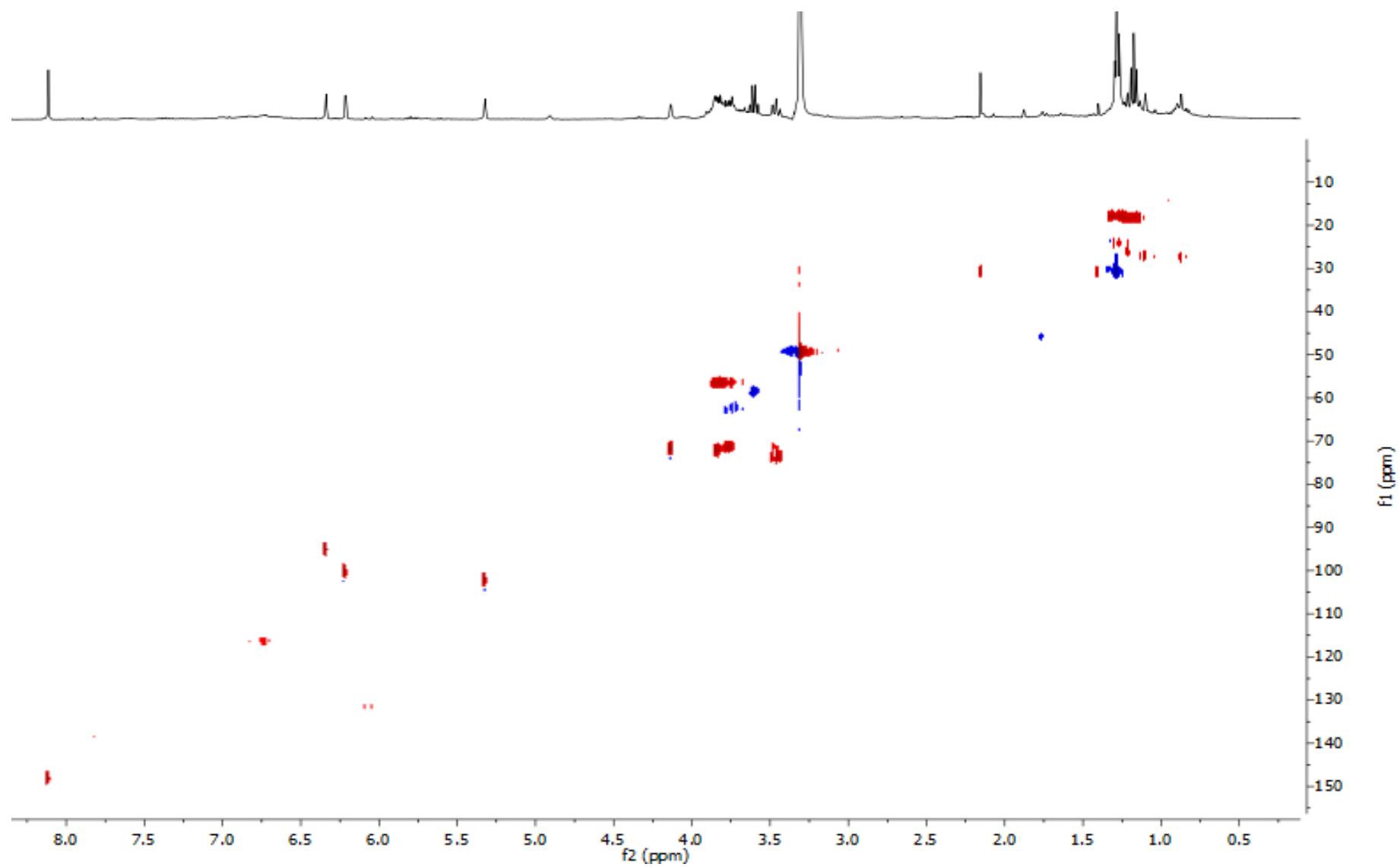


Figura 40: Espectro de HSQC de AF4P54 [CD₃OD, δ (ppm)]

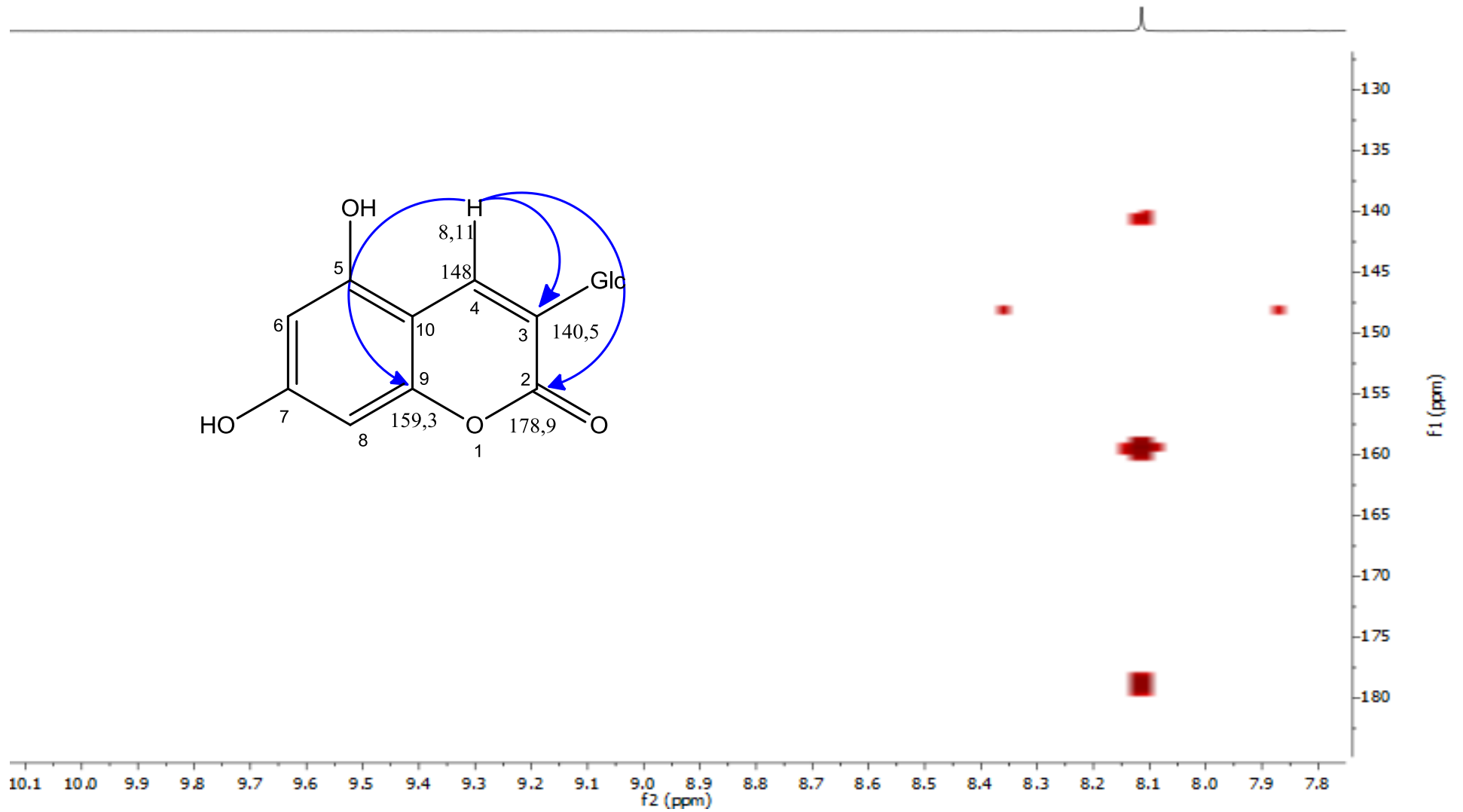


Figura 41: Ampliação do espectro de HMBC de AF4P54 [CD₃OD, δ (ppm)]

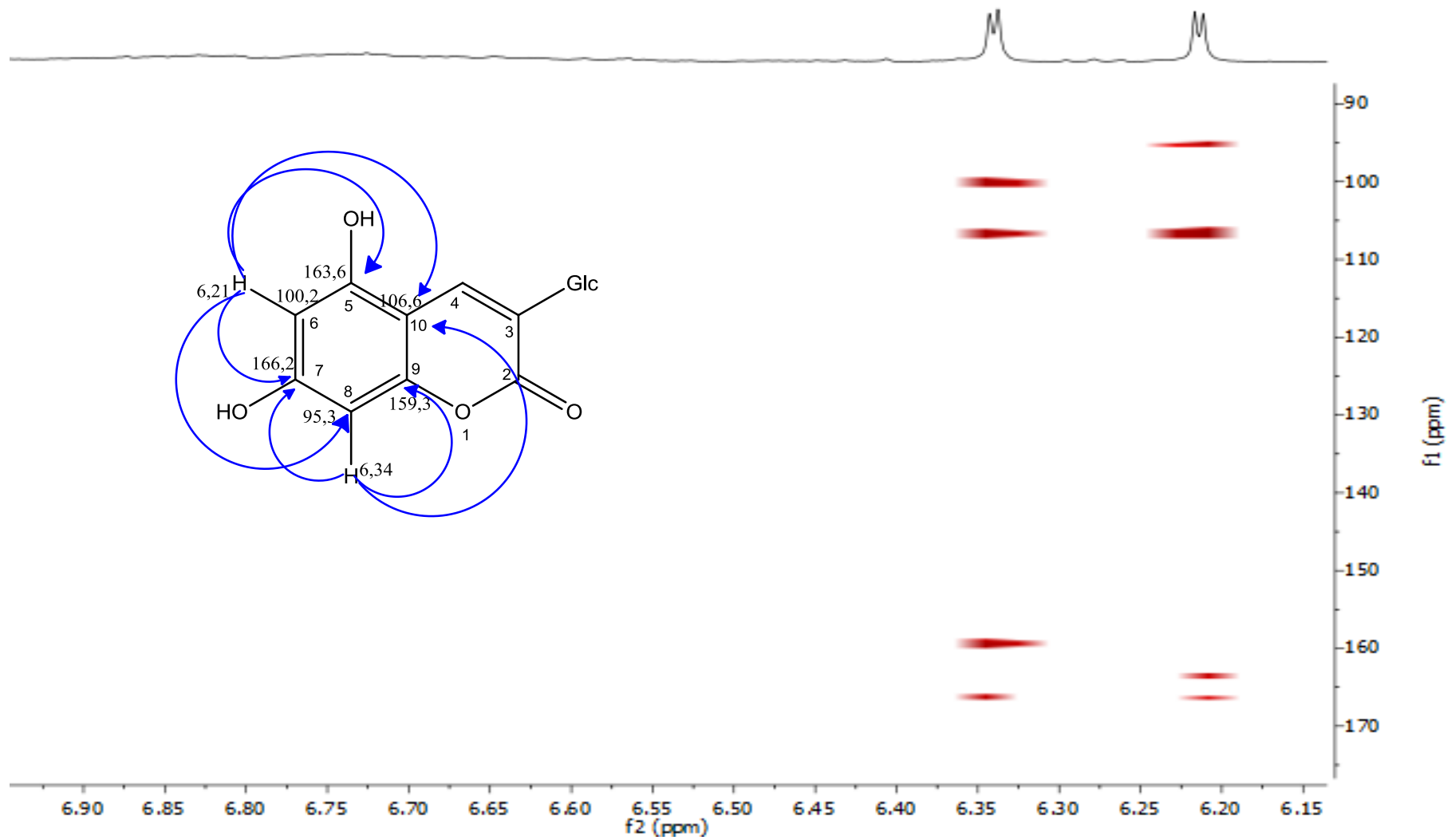


Figura 42: Ampliação do espectro de HMBC de AF4P54 [CD₃OD, δ (ppm)]

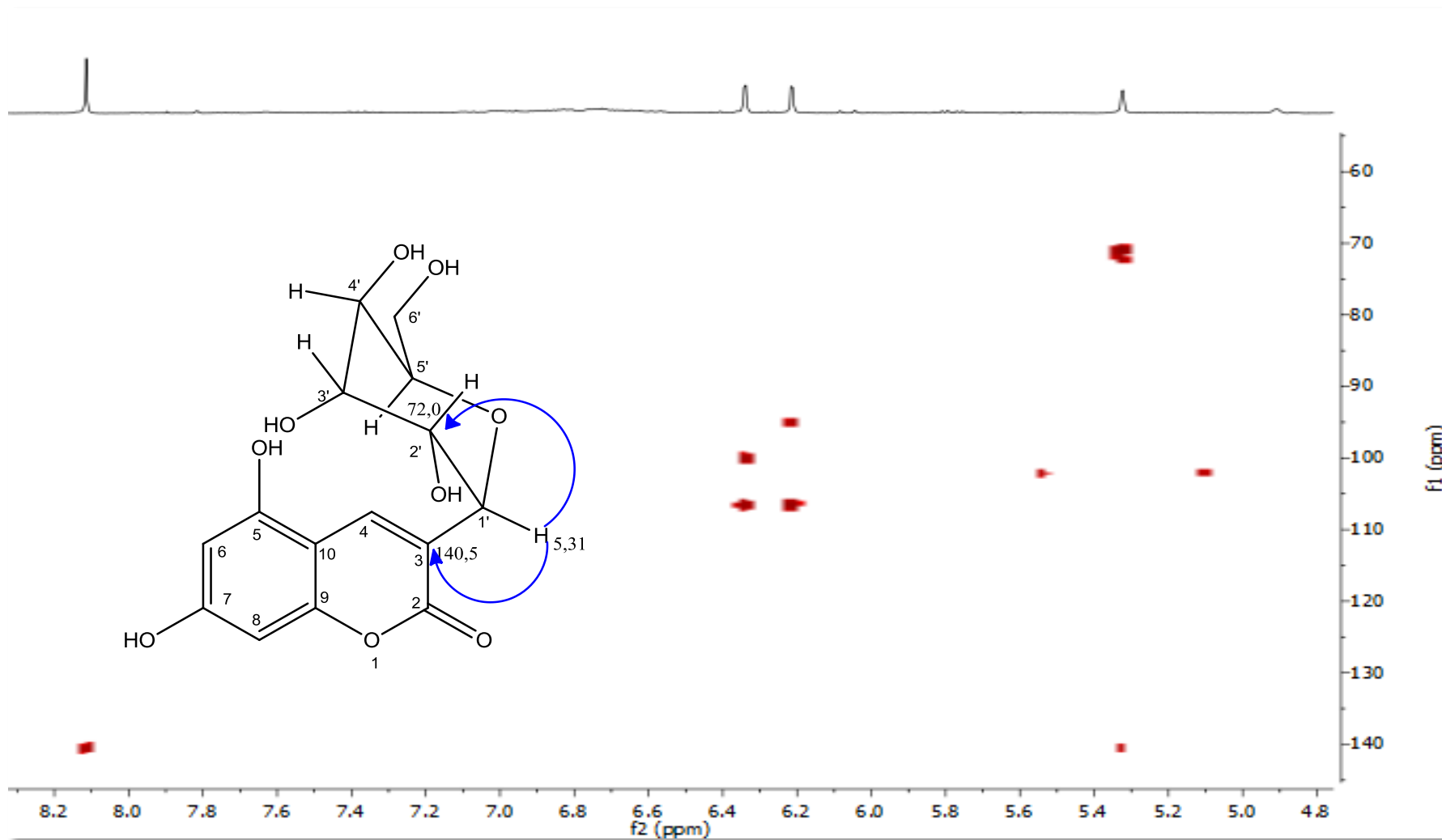


Figura 43: Ampliação do espectro de HMBC de AF4P54 [CD₃OD, δ (ppm)]

8.1.6 Identificação de ACF7

A substância ACF7 foi obtida a partir da CCDP realizada com primeira fração da partição do estrato em AcOEt do caule obtida pela eluição em sistema 8:2 CHCl₃:MeOH. Esta amostra apresentou-se como um sólido amorfo amarelo e, devido a polaridade do solvente no qual foi obtido o extrato, foi realizado o teste frente ao cloreto férrico em que a amostra reagiu positivamente, indicando a presença de grupos fenólicos.

O Espectro de Massas, ionização por eletrospray, registrado no modo negativo apresenta íon molecular em m/z 269,02 (M-H) (Fig 52, p. 76). O espectro de RMN de ¹H dessa substância (Fig. 45, p. 70) apresentou sinais na região entre δ_H 6,1 e δ_H 8,0, cujas constantes de acoplamento permitiram identificar sinais característicos de anel aromático 1,4-dissubstituído em δ_H 7,73 (2H; *d*; *J*=8,5 Hz) e δ_H 6,82 (2H; *d*; *J*=8,5 Hz), típicos do anel B de flavonoides *p*-substituídos. Os sinais em δ_H 6,29 (1H; *d*; *J*=2,1 Hz) e δ_H 6,06 (1H; *d*; *J*=2,0 Hz) caracterizaram os hidrogênios com acoplamento em posição *meta* do anel A de flavonoides, já o sinal em δ_H 6,45 (1H, *s*) foi atribuído ao H-3 α -carbonílico do anel C (fig. 46, p. 71).

Foram registrados também os espectros de correlação bidimensional HMBC (Fig. 48, p. 72) e HSQC (Fig. 47, p. 72). No espectro de correlação HSQC foram obtidos os valores de deslocamento dos carbonos por meio das correlações entre os hidrogênios ligados diretamente aos carbonos da estrutura (Fig. 49, p. 73). Já o espectro de HMBC evidenciou correlações que permitiram identificar os carbonos vizinhos não hidrogenados (Fig. 50, p. 74).

Através da comparação dos dados obtidos com os dados da literatura (OWEN et al., 2003) descritos na Tabela 11 (p. 75) a substância ACF7 foi identificada como apigenina (Fig. 51, p. 75).

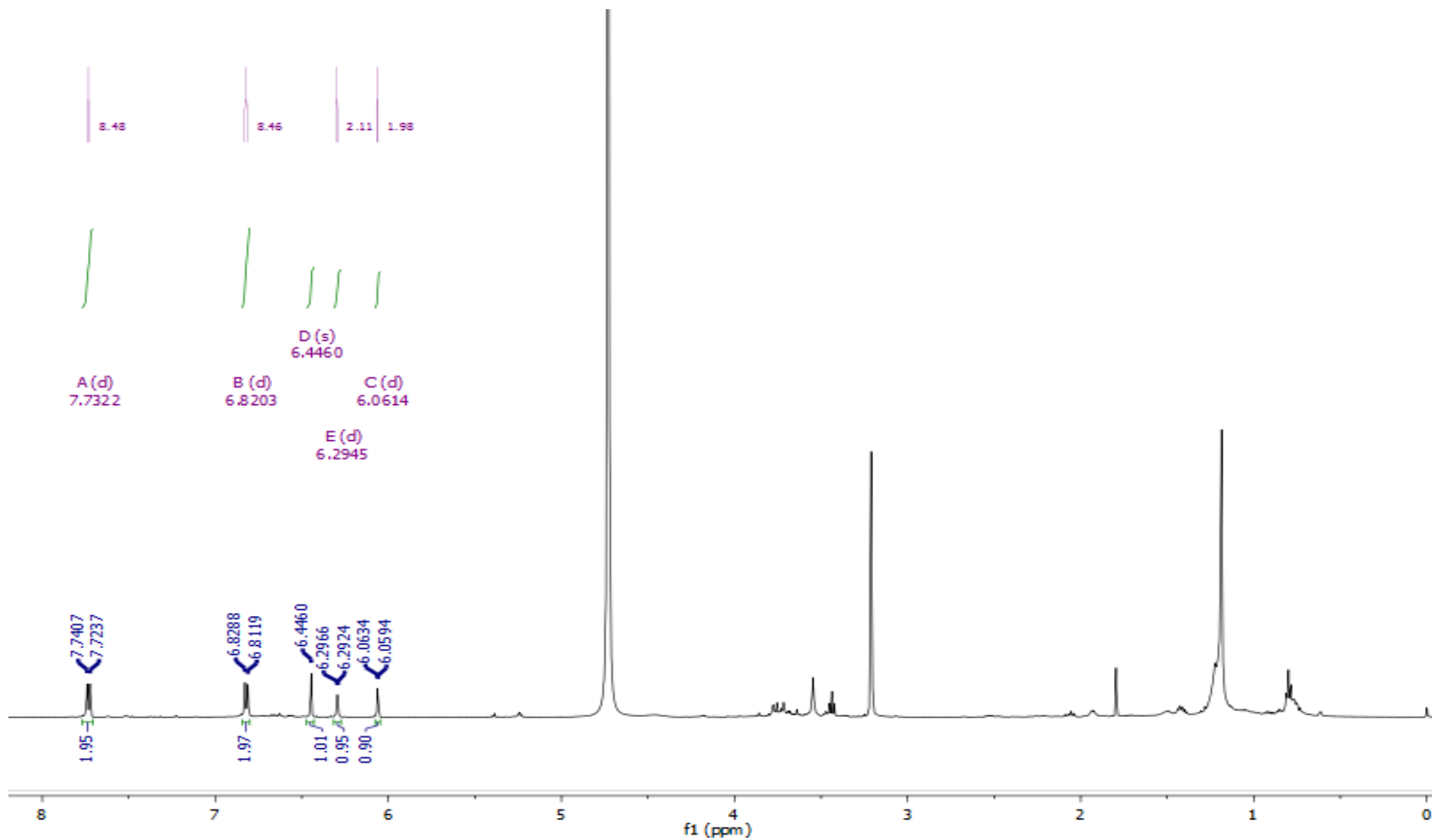


Figura 45: Espectro de RMN de ^1H de ACF7 [CD_3OD , δ (ppm)]

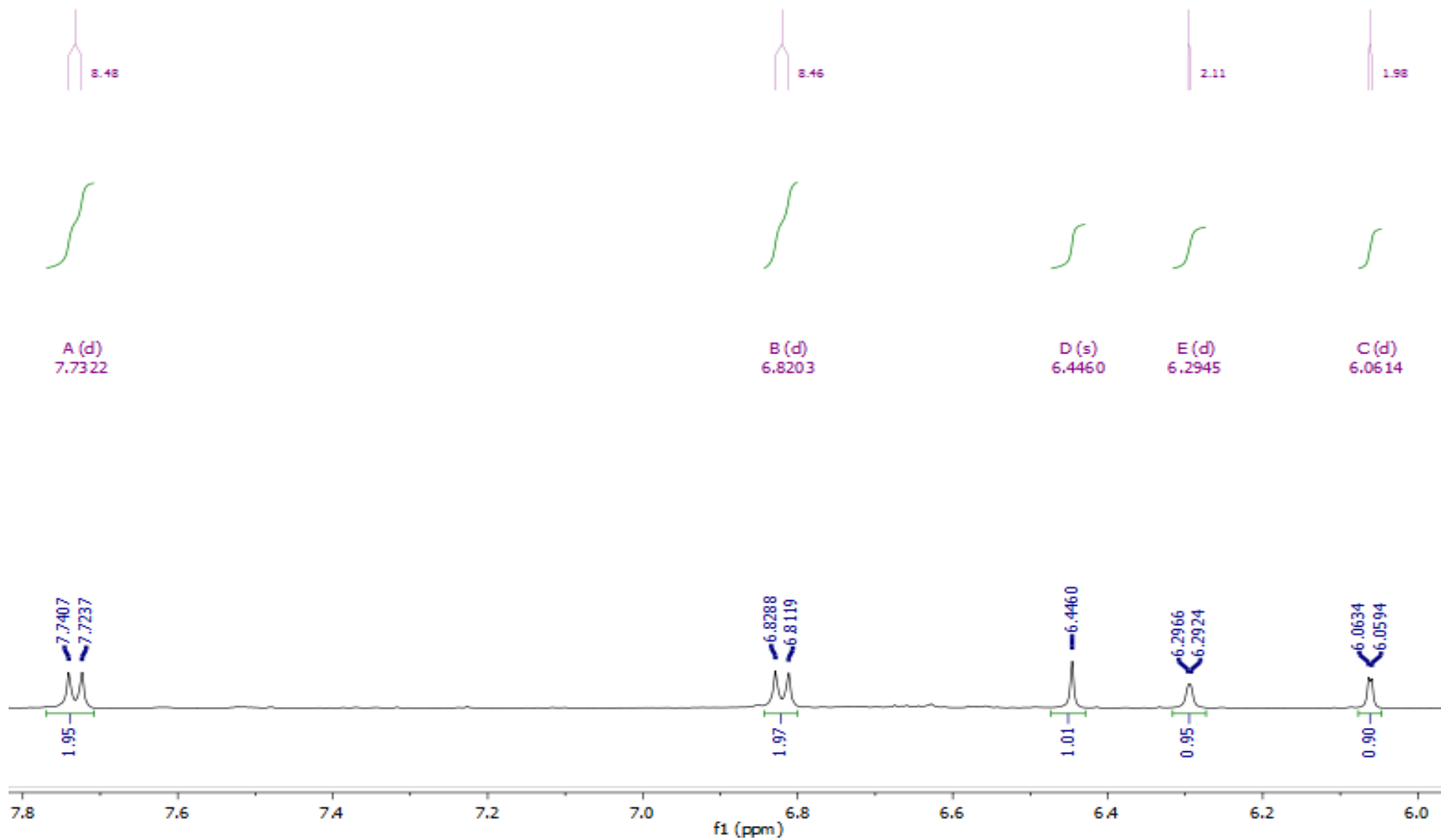


Figura 46: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de ACF7 [CD_3OD , δ (ppm)]

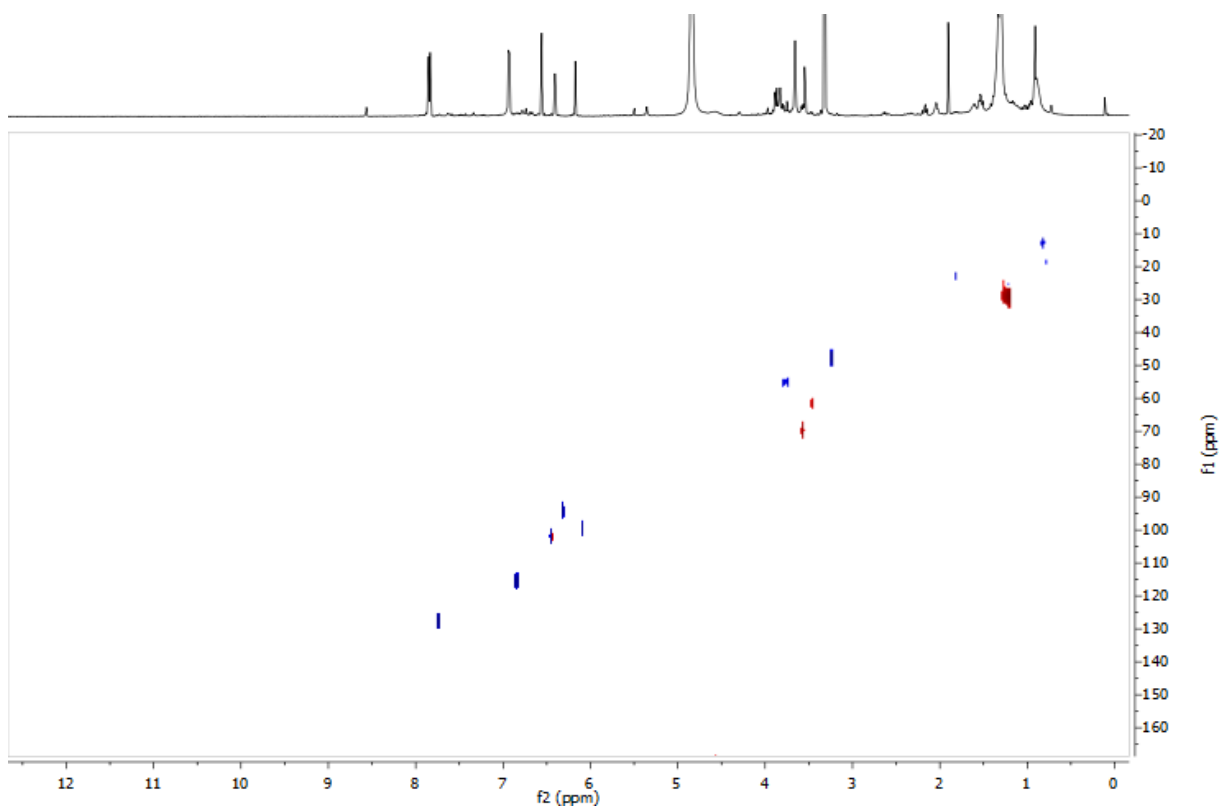


Figura 47: Espectro de HSQC de ACF7 [CD₃OD, δ (ppm)]

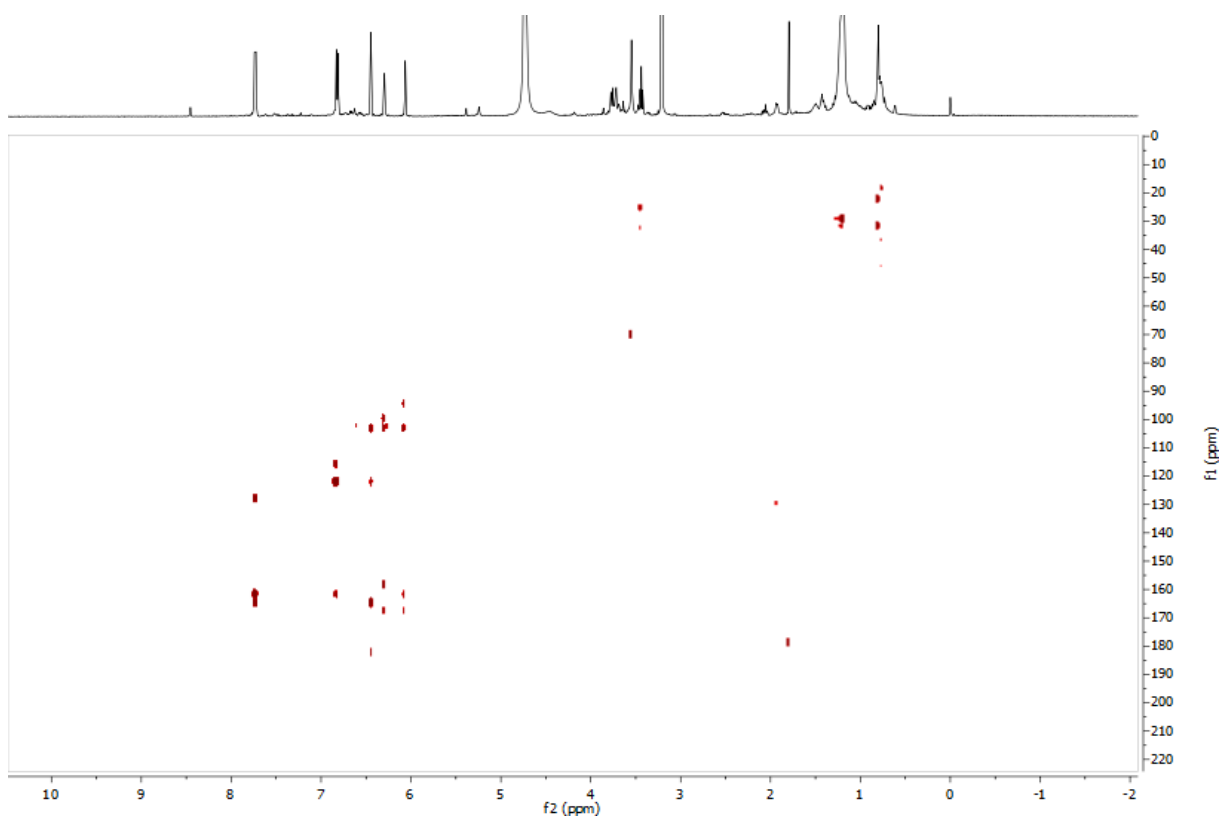


Figura 48: Espectro de HMBC de ACF7 [CD₃OD, δ (ppm)]

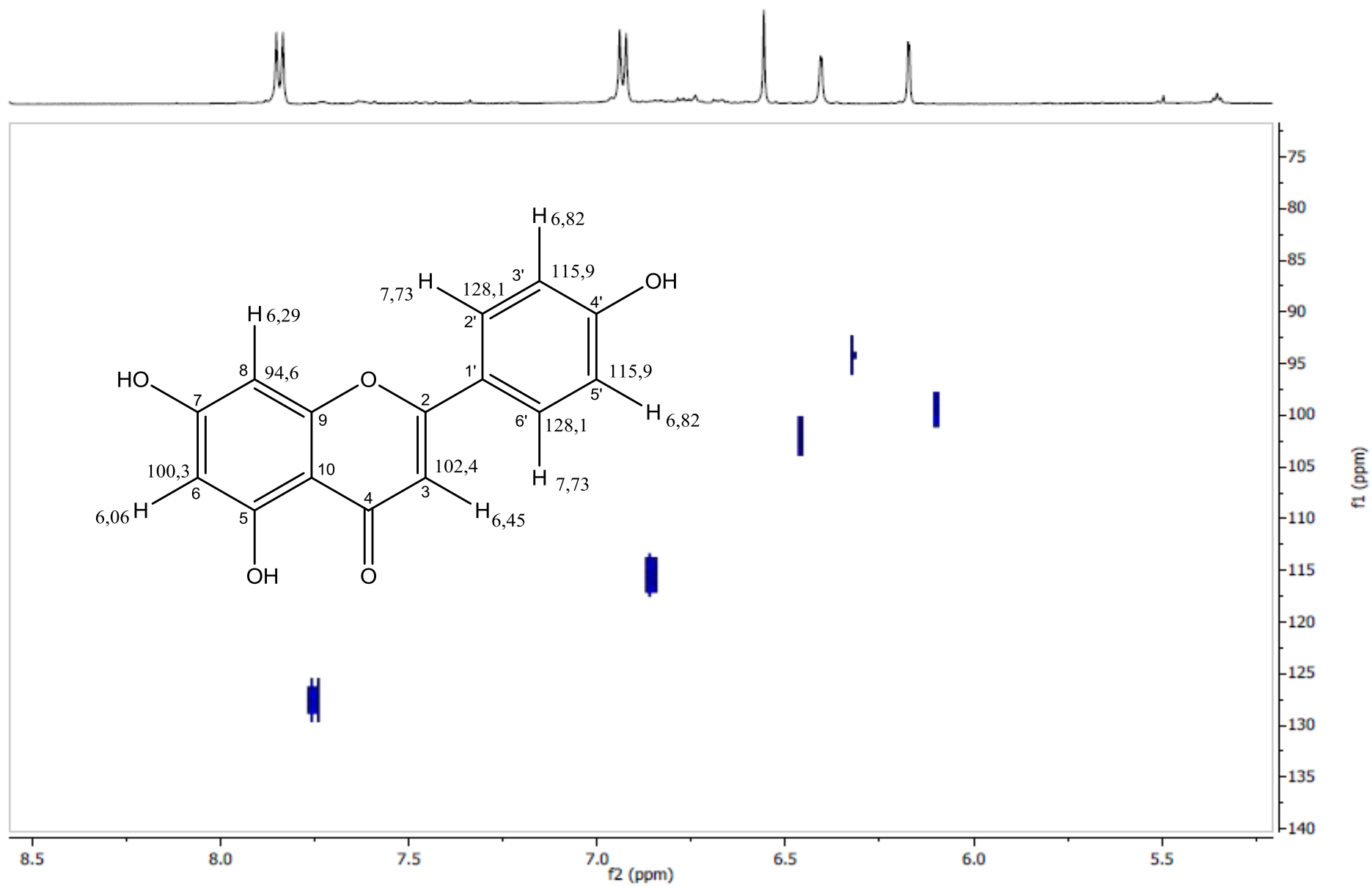


Figura 49: Ampliação do espectro de HSQC de ACF7 [CD_3OD , δ (ppm)]

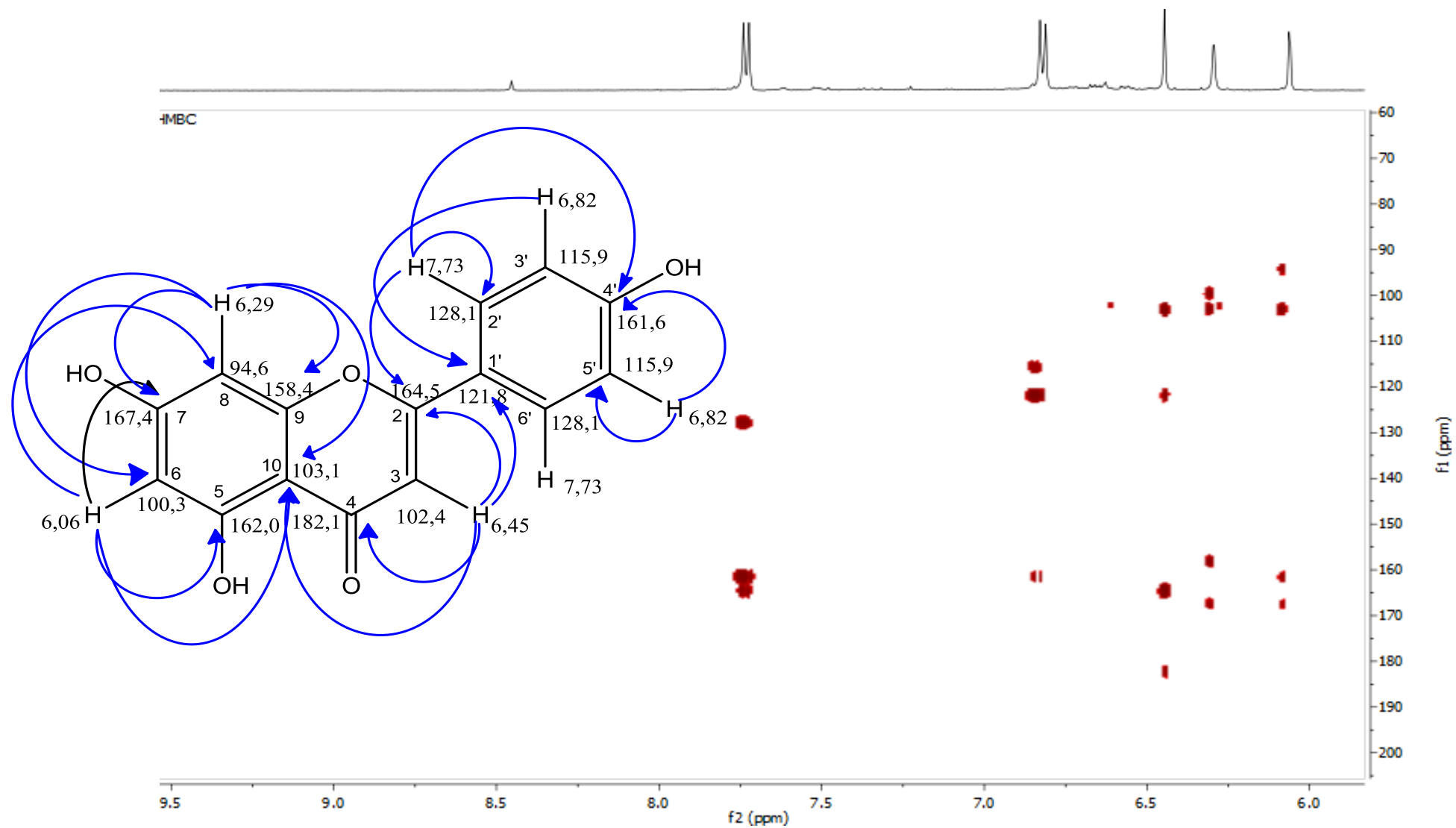


Figura 50: Ampliação do espectro de HMBC de ACF7 [CD₃OD, δ (ppm)]

Tabela 11: Dados de RMN [CD_3OD , δ (ppm), multiplicidade, J (Hz)] de ^{13}C e de ^1H da substância ACF7 e comparação com dados da literatura

Posição	Apigenina (OWEN et al., 2003) δ_{C}	δ_{C} (500 MHz, CDCl_3 , d) de ACF7	Apigenina (OWEN et al., 2003) δ_{H}	δ_{H}
1'	122,72	121,8	-	-
2'	129,19	128,1	7,88	7,73 (<i>d</i> , $J=8,48$)
3'	116,78	115,9	6,95	6,82 (<i>d</i> , $J=8,46$)
4'	162,16	161,6	-	-
5'	116,78	115,9	6,95	6,82(<i>d</i> , $J=8,46$)
6'	129,19	128,1	7,88	7,73(<i>d</i> , $J=8,48$)
2	165,30	164,5	-	-
3	103,78	102,4	6,64	6,45 (<i>s</i>)
4	183,07	182,1	-	-
5	162,64	162,0	-	-
6	99,71	100,3	6,21	6,06(<i>d</i> , $J=1,98$)
7	165,27	167,4	-	-
8	94,78	94,6	6,48	6,29(<i>d</i> , $J=2,11$)
9	158,76	158,4	-	-
10	104,91	103,1	-	-

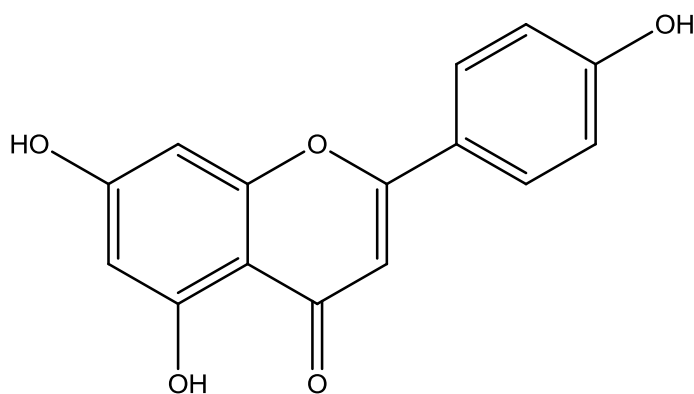


Figura 51: Estrutura da apigenina

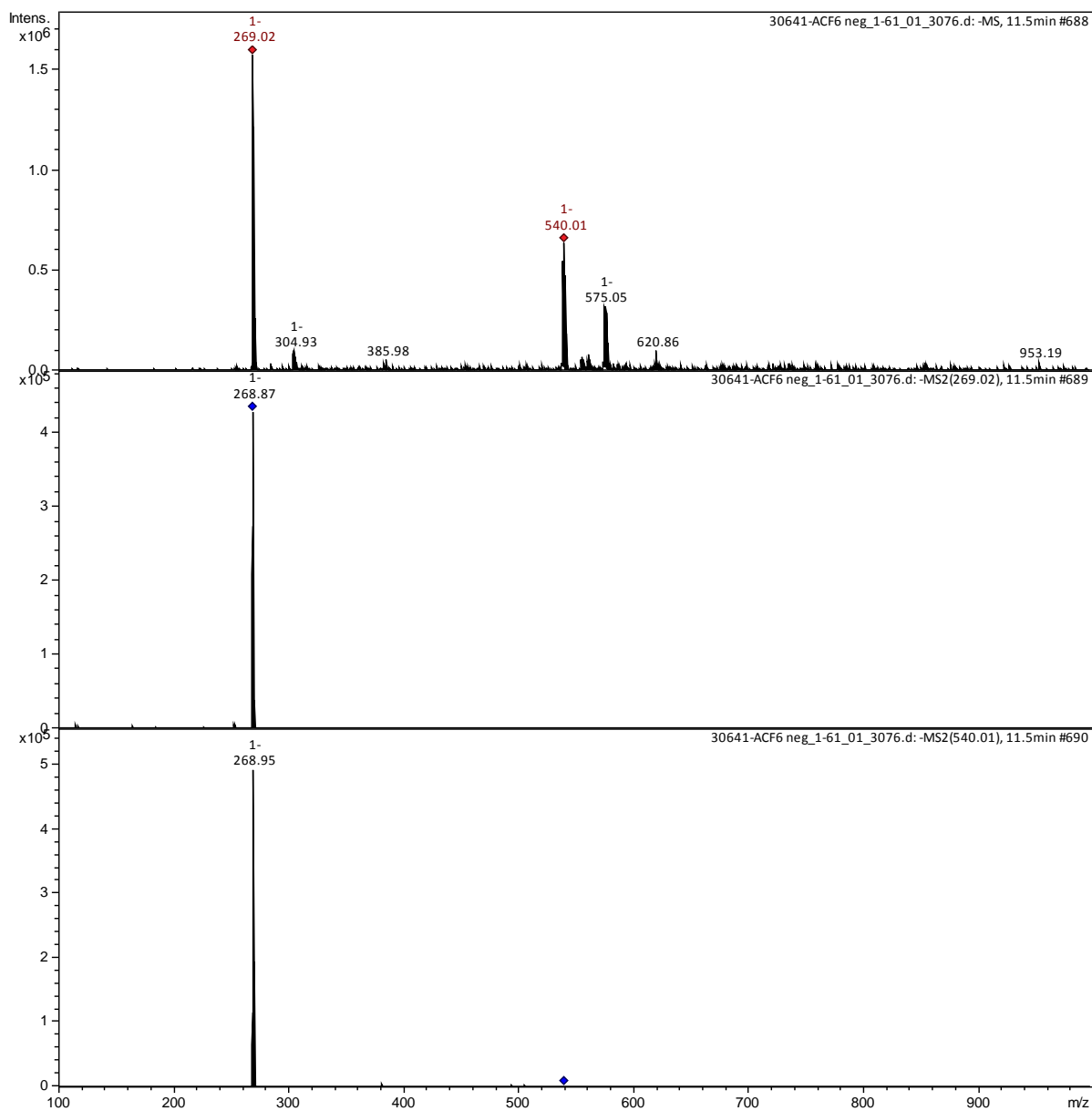


Figura 52: Espectros de massas de ACF7

8.2 Determinação do teor de fenólicos totais

A composição química de uma espécie depende, dentre outros fatores, das condições ambientais, do estágio de desenvolvimento dos órgãos da planta, mas também pode ser induzida por fatores externos. A presença de alguns metabólitos secundários, tais como os compostos fenólicos, pode surgir em defesa da planta contra a herbivoria e a quantidade de fenólicos pode estar diretamente associada a idade da planta, para as folhas jovens há uma maior quantidade de compostos fenólicos quando comparado as folhas mais maduras (MATSUKI, 1996).

O teor dos fenólicos totais nas partes aéreas de *M. latifolium* apresentou uma distribuição qualitativamente variável. Os teores de compostos fenólicos totais nos extratos de *M. latifolium* variaram de $46,438 \pm 0,006$ a $446,668 \pm 0,018$ mg EAG/g de extrato. As maiores concentrações de compostos fenólicos foram encontradas nos extratos em BuOH das folhas e do caule, sendo as menores encontradas nos extratos em AcOEt de ambas as partes da planta (Tabela 12, p. 77).

Tabela 12: Teor de fenólicos totais de *M. latifolium*

Extratos	Fenólicos Totais (mg EGA/ g de extrato) \pm intervalo de confiança	
	Folhas	Caule
AcOEt	$46,438 \pm 0,006$	$76,625 \pm 0,011$
BuOH	$102,125 \pm 0,016$	$446,688 \pm 0,018$
DCM	$90,375 \pm 0,012$	$258,375 \pm 0,002$

Como observado na Tabela 6 anterior, os teores de fenólicos nos extratos do caule foram superiores aos teores nas folhas, isso pode ser atribuído ao estágio de desenvolvimento da planta de maior maturidade ou devido a não necessidade de proteção contra a herbivoria. Além disso, a variação dos teores de fenólicos nos extratos das partes aéreas de *M. latifolium* podem ocorrer por conta de a síntese dessas substâncias pelos órgãos vegetais ser induzida por fatores ambientais como o clima, intensidade de chuvas e luminosidade, fertilidade do solo, disponibilidade de nutrientes, além de fatores biológicos como a possibilidade de diferentes tipos celulares regularem a própria síntese de fenólicos (MATSUKI, 1996; QUEIRES, 1998).

Apesar de não ser um ensaio específico, o ensaio de Folin-Ciocalteu é o método mais utilizado na determinação de compostos fenólicos. Além dos compostos fenólicos, tais como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados do ácido benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas, dentre os compostos não fenólicos que podem reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu estão os ácidos orgânicos, açúcares, carotenoides, aminoácidos e o sulfato ferroso além de algumas substâncias inorgânicas (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Para o extrato em DCM, devido a baixa polaridade do solvente de extração quando comparado com os outros não é esperado a presença de compostos polares, tais como os fenólicos, por isso resultado para o extrato DCM não pode ser caracterizado como um resultado positivo com presença de polifenóis e sim que compostos não fenólicos podem ter interferido na análise, contribuindo de maneira aditiva.

8.3 Avaliação das atividades biológicas dos extratos e dos constituintes isolados

8.3.1 Determinação da atividade antioxidante

Os radicais são produzidos naturalmente e encontram-se envolvidos em processos de produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes, no entanto, seu excesso, ocasionado por alguma disfunção biológica, apresenta efeitos prejudiciais que estão relacionados com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (BARREIROS et al., 2005).

O excesso de radicais é combatido por compostos antioxidantes que são encontrados naturalmente no organismo humano e em alimentos, sendo responsáveis pela proteção do organismo contra ação oxidativa desses radicais. São substâncias que previnem e/ou regeneram a estrutura do substrato oxidável (CHORILLI et al., 2007). Nas plantas, alguns metabólitos as protegem da ação oxidante, podem também inibir o aparecimento de células cancerígenas, além de retardar o envelhecimento celular no homem (PYRZYNSKA; PEKAL, 2013).

Os extratos em AcOEt, BuOH, e DCM dos caules e folhas de *M. latifolium* foram submetidos ao ensaio de atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical estável 2,2-difenil,1-picrilhidrazil (DPPH). A capacidade de sequestrar o radical DPPH exibida pelos extratos, expressa em percentual de sequestro do radical livre (%SRL), encontram-se nas figuras 53 (p. 79) e 54 (p. 80).

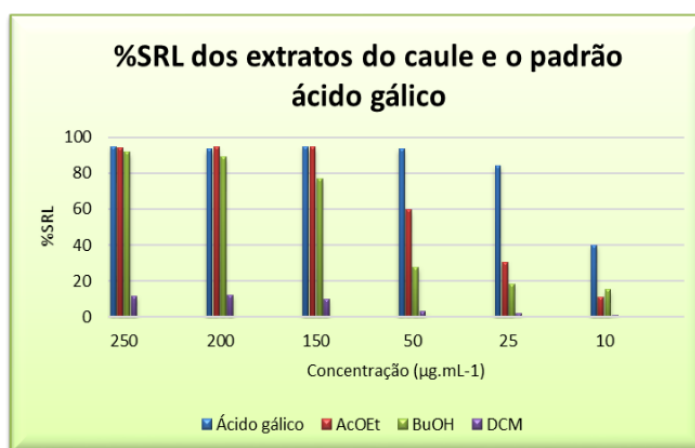


Figura 53: %SRL para os extratos do caule

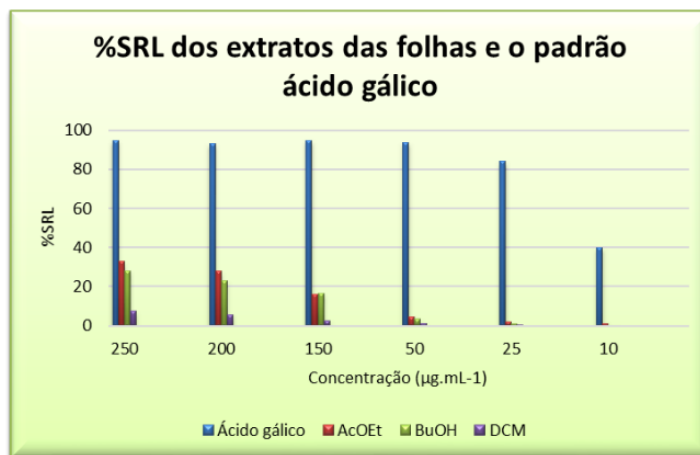


Figura 54: %SRL para os extratos das folhas

Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante, sendo o extrato em AcOEt do caule o mais ativo entre todos com %SRL comparável ao padrão ácido gálico nas concentrações de 250 a 150 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, apresentado atividade em concentração de 10 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, assim como o extrato em BuOH. Dentre os extratos das folhas o extrato em AcOEt foi o mais ativo. Os extratos em DCM do caule e das folhas foram os menos ativos em todas as concentrações testadas, enquanto os extratos em BuOH apresentaram um percentual de sequestro de radicais livre intermediário, sendo a %SRL próxima a do extrato em AcOEt do caule em todas as concentrações.

A baixa atividade do DCM diverge do resultado para fenóis totais, corroborando a hipótese de que naquele teste pode ter ocorrido reações de falso positivo. No entanto, a considerável atividade dos extratos do caule ratifica que há uma maior concentração de compostos redutores, tais como os fenólicos, nestes extratos do que nos extratos das folhas em conformidade com os resultados observados de teores de fenólicos totais para cada um detes extratos.

Foram determinados o valor de concentração inibitória (CI_{50}) para todos os extratos e o padrão por meio da equação da reta obtida por regressão linear pelo gráfico do percentual de sequestro do radical livre *versus* concentração da amostra (tabela 13, p. 81). O valor de CI_{50} é definido como a concentração da substância ou extrato requerida para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, assim quanto menor seu valor, maior o consumo de DPPH por uma amostra resultando numa maior capacidade antioxidante. (SOUSA, 2007; IHA, 2008).

Tabela 13: Valores de CI_{50} do padrão e dos extratos testados

Extratos	CI_{50} ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	
	Folhas	Caule
Ácido gálico	138,97	
AcOEt	354,54	72,22
BuOH	397,21	105,34
DCM	1693,82	997,98

O extrato em AcOEt foi o que apresentou menores valores de CI_{50} , $72,22 \mu\text{g. mL}^{-1}$ para caule e $354,54 \mu\text{g. mL}^{-1}$ para as folhas. O extrato em BuOH do caule apresentou valores de CI_{50} próximos aos dos extratos em AcOEt, $105,34$ e $397,21 \mu\text{g. mL}^{-1}$ para o caule e para as folhas respectivamente, seguido pelos valores mais altos de CI_{50} para os extratos em DCM de ambas as partes. Estes resultados evidenciam que os metabólitos presentes nesses extratos atuam como redutores do radical DPPH, indicando que esse extrato pode ser uma fonte promissora de metabólitos com ação antioxidante.

Apesar do extrato em AcOEt das folhas ter apresentado %SRL considerável, a substância isolada a partir da partição desse extrato não apresentou valores próximos (Fig 55, p. 81), o valor de CI_{50} de $456,82 \mu\text{g. mL}^{-1}$ obtido também confirmam o fato de que essa substância não apresenta atividade antioxidante significativa. Portanto, não foi isolado o(s) composto(s) responsável (is) pela atividade demonstrada no extrato ou então, a atividade se deve a mistura de compostos polifenólicos.

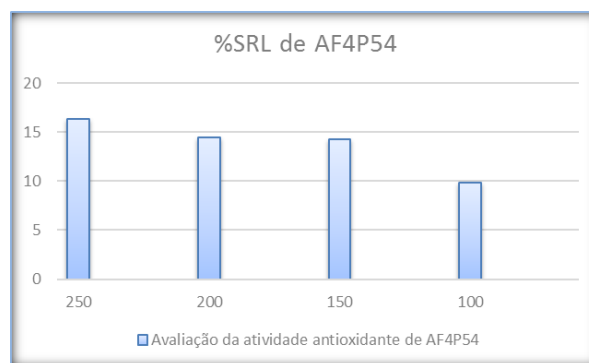


Figura 55: %SRL de AF4P54

8.3.2 Determinação da inibição da Acetilcolinesterase

As doenças neurodegenerativas estão dentre as maiores causas de incapacidade e mortalidade atualmente e dentre estas, encontra-se a Doença de Alzheimer (DA), que tem atraído grande atenção dos pesquisadores por ser progressiva e incapacitante. Está associada aos problemas de memória e distúrbios de comportamento, sendo a idade seu principal fator de risco (DIAS et al., 2015). Uma alternativa para o tratamento da DA é o aumento dos níveis de Acetilcolina (ACh) no cérebro pela inibição da acetilcolinesterase (AChE).

Um dos fármacos aprovado e disponível comercialmente para o tratamento da DA é a Galantamina (Reminyl[®], 1), que atua inibindo a AChE (DIAS et al., 2015), que foi obtida a partir de *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae) (PEARSON, 2001). Outros agentes terapêuticos são conhecidos por ocorrerem em plantas utilizadas tradicionalmente para falta de memória e outro declínio cognitivo associado com velhice (Howes et al., 2003).

O padrão positivo utilizado foi a fisostigmina, que é utilizada como medicamento para o mal de Alzheimer. No gráfico observado na Figura 56 (p. 82) nota-se que, dentre os extratos testados os extratos das folhas apresentaram maiores porcentagem de inibição quando comparadas aos extratos do caule. O extrato em BuOH das folhas foi o que apresentou maior %I dentre eles e além dele o extrato em AcOEt apresentou atividade até na menor concentração testada.

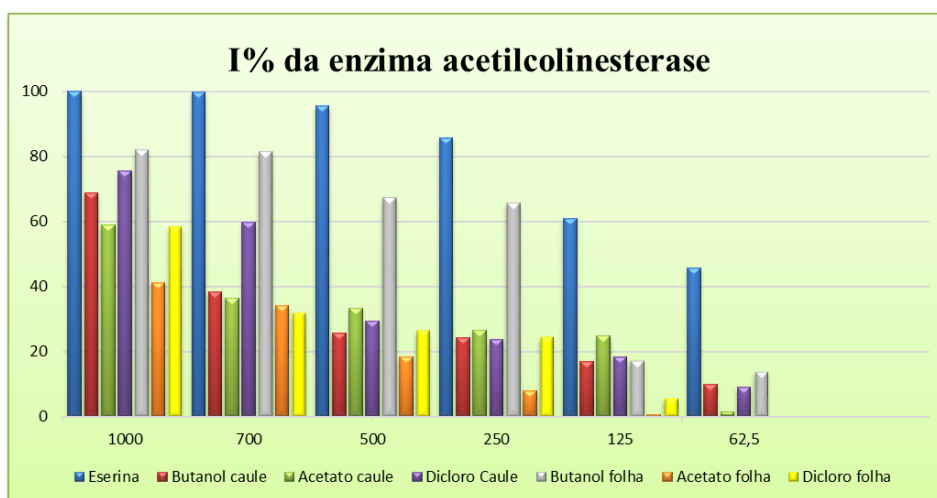


Figura 56: Porcentagem de inibição da acetilcolinesterase versus concentração em ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) pelos extratos de *M. latifolium*

Também foi determinada a porcentagem de inibição da enzima pelas substâncias isoladas AFP54 e ACF7, além da mistura de ácidos graxos. Apesar do extrato em AcOEt ter

apresentado baixa atividade frente a enzima, a substância AFP54 apresentou atividade moderada quando comparada ao padrão fisostigmina (fig. 57, p 83).

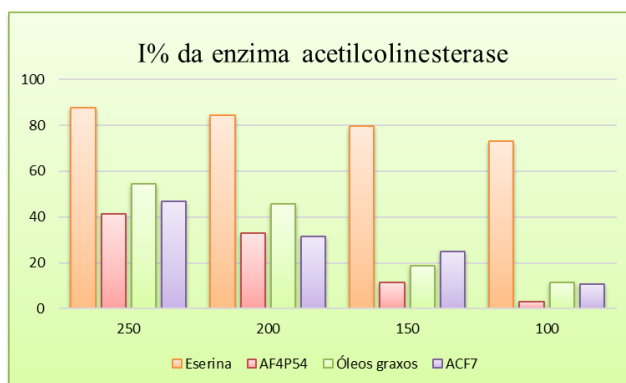


Figura 57: %I da acetilcolinesterase pelas substâncias isoladas

Os valores de CI_{50} para os extratos e para as substâncias isoladas foram calculados (Tabela 14, p. 83), apesar das porcentagens de inibição serem comparáveis ao padrão, os valores de CI_{50} obtidos foram considerados altos. Para as substâncias isoladas, todas apresentaram valores de IC_{50} acima do valor obtido para o extrato em AcOEt das folhas, que foi o maior dentre os extratos, exceto o valor de CI_{50} de $273,04 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ obtido para a substância AF4P54, o que chama atenção do potencial desta estrutura para desenvolvimento de derivados cumarinicos com atividade inibitória de AChE.

Tabela 14: Valores de IC_{50} do padrão e dos extratos

Extratos	$CI_{50} (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	
	Folhas	Caule
Eserina		201,04
AcOEt	517,05	425,27
BuOH	304,17	508,28
DCM	511,25	463,29

8.3.4 Determinação da atividade antimicrobiana

A utilização de fitoterápicos, extratos vegetais, bem como outras formas alternativas de tratamento médico como agentes antimicrobianos vem ganhando grande popularidade desde a década de 1990. Existem duas razões significativas para este quadro: a resistência dos microorganismos às substâncias antimicrobianas sintéticas e o potencial tóxico que acarretam em efeitos colaterais que elas apresentam (SILVA Jr. et al., 2009).

Então o objetivo é descobrir compostos com atividade comparada à dos fármacos tradicionalmente utilizados, porém, com menor toxicidade e mais eficazes contra a resistência de micro-organismos patogênicos. A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada por meio da determinação da concentração mínima da substância ou do extrato vegetal necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste. (Ostrosky et al., 2008).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada através do ensaio em microplaca utilizando como revelador a resazurina (Fig. 58, p. 84).

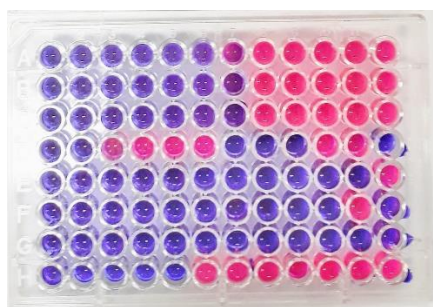


Figura 58: Representação do ensaio revelado com resazurina

Os resultados de CIM das atividades antibacteriana (Tabela 15, p. 85) mostraram que a todos os extratos das folhas apresentaram atividade frente a alguma das bactérias testadas, o extrato em BuOH não apresentou atividade frente a *Salmonella*, no entanto apresentou CIM $\leq 125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a *P. aeruginosa* e $\leq 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a *S. aureus*.

Frente a *Salmonella* os extratos do caule apresentaram as menores CIM, para os extratos em AcOEt e BuOH apresentaram CIM de $\leq 125 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Frente a *E. coli* somente o extrato em BuOH apresentou atividade na maior concentração testada.

Tabela 15: Concentração mínima inibitória dos extratos frente as diferentes bactérias testadas

Amostras	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	Micro-organismos			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Salmonela</i>
Padrão	≤ 30	≤ 30	≤ 30	≤ 30
DCM Caule	> 1000	> 1000	≤ 1000	≤ 250
AcOEt Caule	> 1000	> 1000	≤ 500	≤ 125
BuOH Caule	> 1000	> 1000	≤ 1000	≤ 125
DCM Folha	≤ 1000	> 1000	≤ 500	≤ 1000
AcOEt Folha	≤ 1000	≤ 1000	≤ 250	≤ 500
BuOH Folha	≤ 250	≤ 1000	≤ 125	> 1000

Na literatura não é encontrada uma classificação consensual relacionada aos valores de CIM, alguns autores classificam que: CIM até 0,5 mg/mL são inibidores potentes; CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL são inibidores moderados; CIM acima de 1,6 mg/mL são inibidores fracos (ALIGIANNIS et al., 2001). Por outro lado, foram encontrados dados em que valores $\leq 1000\mu\text{g/mL}$ de CIM são satisfatórios (WEBSTER et al., 2008). Assim, dos extratos testados 9 são considerados inibidores potentes, sendo que as concentrações acima de $1000\mu\text{g/mL}$ não foram testadas.

As substâncias isoladas também foram submetidas a avaliação da atividade antimicrobiana frente as mesmas bactérias testadas para os extratos (Tabela 16, p. 85), no entanto em concentrações de 30 a $250\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foi observado que a mistura de ácidos graxos apresentou atividade antimicrobiana frente a todas as bactérias nas maiores concentrações, a substância AFP54 apresentou atividade frente a *P. aeruginosa* e a *Salmonela* com concentrações ≤ 250 e $\leq 150\mu\text{g.mL}^{-1}$. A substância ACF7 não apresentou atividade frente a nenhuma das bactérias.

Tabela 16: Concentração mínima inibitória das substâncias isoladas frente as diferentes bactérias testadas

Amostras	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	Micro-organismos			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Salmonela</i>
Padrão	≤ 30	≤ 30	≤ 30	≤ 30
AFP54	> 250	> 250	≤ 250	≤ 150
ACF7	> 250	> 250	> 250	> 250
A. graxos	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250

8.3.5 Letalidade frente à *Artemia salina*

No uso popular, muitas plantas são utilizadas sem que haja um conhecimento sobre a toxicidade destas, o que representa um risco à saúde humana pelo fato de que já é sabido que muitas espécies apresentam riscos de intoxicação, tais como Bico de Papagaio (*Euphorbia pulcherrima* Willd), Espirradeira (*Nerium oleander* L.), dentre outras. Além disso os testes de toxicidade complementam os ensaios biológicos (Bednarczuk et al., 2010).

Este ensaio é utilizado na rotina dos laboratórios de pesquisa em produtos naturais devido a sua aplicação como uma técnica de triagem biológica inicial com o objetivo de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na busca por substâncias bioativas. Existe uma significativa correlação entre o ensaio de letalidade da *A. salina* e a inibição do crescimento de linhagens celulares de tumores humanos sólidos, por exemplo, o que ratifica o valor deste bioensaio como uma ferramenta de triagem na pesquisa de novas drogas antitumorais (SIQUEIRA et al., 1998).

Nenhum dos extratos testados, até mesmo na maior concentração ($1000\mu\text{g.mL}^{-1}$), apresentou atividade citotóxica. Todos os náuplios se mantiveram vivos após as 24h de teste. Desta maneira, os extratos de *M. latifolium* foram considerados atóxicos.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho é o primeiro relato de estudo químico realizado no gênero *Macrolobium* através da espécie *Macrolobium latifolium*, o qual contribuiu para o conhecimento químico e determinação do potencial biológico da espécie e apresentou resultados promissores devido ao isolamento de uma nova estrutura que apresenta diversas atividades biológicas. Este trabalho ratifica a possibilidade de se encontrar novas cumarinas com potencial biológico, fato que chama atenção para o retorno aos estudos fitoquímicos de espécies endêmicas, mesmo utilizando ferramentas clássicas, tendo em vista que no gênero o qual a espécie pertence não existem relatos de estudos químicos.

REFERÊNCIAS

- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. **Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 40, p. 4168-4170, 2001.
- ALVES, C. Q. **Estudo químico e avaliação biológica de duas espécies de Leguminosae: *Diocleia virgata* e *Cenostigma macrophyllum*.** 2012. 227f. Tese (Doutorado). Instituto de química. Universidade Federal da Bahia. 2012.
- ALVES, C. Q., DAVID, J. M., DAVID, J. P. D. L., BAHIA, M. V., AGUIAR, R. M. **Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos.** Química Nova, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- APPLEQUIST, WENDY L. **Report of the nomenclature committee for vascular plants: 65.** Taxon, v. 62, n. 6, p. 1315-1326, 2013.
- ARAÚJO NETO, J. F. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas de *Erythroxylum loefgrenii* (Erythroxylaceae).** 2016. 121f. Dissertação (Mestrado). Instituto de química. Universidade Federal da Bahia. 2016.
- BARBOSA, A.P.; PALMEIRA, R.C.F.; NASCIMENTO, C.S.; FEITOZA, D.S.; CUNHA, M.S.C. **Leguminosas Florestais da Amazônia Central. I. Prospecção das classes de compostos presentes na casca de espécies arbóreas.** Revista Fitos 1(3): 47-57. 2006.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.L. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Química nova, v.29, n. 1, p. 111-123, 2006.
- BATISTA, E. S.; SCHÖNGART, J. **Dendroecology of *Macrolobium acaciifolium* (Fabaceae) in Central Amazonian floodplain forests.** Acta Amazonica, v. 48, n. 4, p. 311-320, 2018.
- BEDNARCZUK, V. O., VERDAM, M. C. S., MIGUEL, M. D., MIGUEL, O. G. **Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais.** Visão Acadêmica, v. 11, n. 2, 2010.
- BFG (2015) The Brazil Flora Group. Rodriguésia 66(4): 1085–1113, **Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil.** Disponível em: <http://rodriguesia.jbrj.gov.br/FASCICULOS/rodrig66-4/12-0043.pdf> (acesso 07.02.2019).
- BOLZANI, V. S., VALLI, M., PIVATTO, M., VIEGAS, C. **Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry.** Pure and Applied Chemistry, v. 84, n. 9, p. 1837-1846, 2012.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. **Use of free radical method to evaluate antioxidant activity.** Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie, 28, 25-30, 1995.
- BRETELER, F. J. **Revision of the African genus *Isomacrolobium* (Leguminosae, Caesalpinioideae).** Plant Ecology and Evolution, v. 144, n. 1, p. 64-81, 2011.

CHANG, C. C., YANG, M. H., WEN, H. M., CHERN, J. C. **Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods.** Journal of food and drug analysis, v. 10, n. 3, 2002.

CHORILLI, M; LEONARDI, G. R.; SALGADO, H. R. N.. **Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas.** Revista Brasileira de Farmácia, v. 88, n. 3, p. 113-118, 2007.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standards- 8th ed. Document M2-A8 performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** Clinical and Laboratory Standards Institute., Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA., 2005.

CORREIA, S. D. J., DAVID, J. M., SILVA, E. P. D., DAVID, J. P., LOPES, L. M., GUEDES, M. L. S. **Flavonoids, norisoprenoids and other terpenes from leaves of Tapirira guianensis.** Química Nova, v. 31, n. 8, p. 2056-2059, 2008.

DA SILVA, M. M. F.; DO CARMO BASTOS, M. N.; GURGEL, E. S. C. **O gênero Macrobium Schreb.(Leguminosae) no estado do Amapá, Brasil. Iheringia.** Série Botânica., v. 72, n. 2, p. 267-275, 2017.

DARNET, S.& RAHIER, A. **Plant sterol biosynthesis: identification of two distinct families of sterol 4 α -methyl oxidases.** Biochem. J., 378, 889–898, 2004.

DE LA ESTRELLA, M.; DEVESA, J. A.; WIERINGA, J. J. **A morphological re-evaluation of the taxonomic status of the genus Pellegriniodendron (Harms) J. Léonard (Leguminosae–Caesalpinioideae–Detarieae) and its inclusion in Gilbertiodendron J. Léonard.** South African Journal of Botany, v. 78, p. 257-265, 2012.

DE LA ESTRELLA, Manuel; DEVESA, Juan A. (2060) **Proposal to conserve the name Macrobium grandiflorum (Gilbertiodendron grandiflorum) against M. straussianum (Leguminosae Caesalpinioideae).** Taxon, v. 61, n. 2, p. 472-473, 2012.

DE OLIVEIRA, A. C., VALENTIM, I. B., GOULART, M. O. F., SILVA, C. A., BECHARA, E. J. H., TREVISAN, M. T. S. **Fontes vegetais naturais de antioxidantes Vegetals as natural sources of antioxidants.** Química Nova, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

DE SOUZA¹, N. M.; DE SOUZA, L. A. G. **Levantamento do Potencial de Aproveitamento das Leguminosas no Distrito da Barreira do Andirá, Barreirinha, AM.** 2011.

DEWANTO, V., DEWANTO, V., WU, X., ADOM, K. K., LIU, R. H.. **Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 50, n. 10, p. 3010-3014, 2002.

DIAS, K. S. T., DE PAULA, C. T., RIQUEL, M. M., DO LAGO, S. T., COSTA, K. C. M., VAZ, S. M., VIEGAS JR, C. **Aplicações Recentes da Abordagem de Fármacos Multialvo para o Tratamento da Doença de Alzheimer.** Revista Virtual de Química, v. 7, n. 2, p. 609-648, 2015.

ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V. J., FEATHERSTONNE, R. M. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity**, *Biochemical Pharmacology*, 7, 88, 1961

ESTRELLA, M.; DEVESA, J.A. & WIERINGA, J.J. **A morphological re-evaluation of the taxonomic status of the genus *Pellegriniodendron* (Harms) J. Léonard (Leguminosae – Caesalpinioideae – Detarieae) and its inclusion in *Gilbertiodendron* J. Léonard**. *South African Journal of Botany*. 78: 257–265, 2012.

FARRONAY, F., ADRIANZEN, M. U., PERDIZ, R. D. O., & VICENTINI, A. **A new species of *Macrolobium* (Fabaceae, Detarioideae) endemic on a Tepui of the Guyana Shield in Brazil**. *Phytotaxa*, v. 361, n. 1, p. 97-105, 2018.

FEITOZA, G. V., SANTOS, J. U. M. D., GURGEL, E. S. C., & OLIVEIRA, D. M. T. **Morphology of fruits, seeds, seedlings and saplings of three species of *Macrolobium* Schreb. (Leguminosae, Caesalpinioideae) in the Brazilian Amazon floodplain**. *Acta botanica brasiliica*, v. 28, n. 3, p. 422-433, 2014.

FÉLIX-DA-SILVA, M. M.; DO CARMO BASTOS, M. N.; GURGEL, E. S. C. **OCORRÊNCIA DE *Macrolobium longipes* (LEGUMINOSAE) NO BRASIL**. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, v. 6, n. 3, p. 22-25, 2016.
GRECA, M. D., MONACO, P., PREVITERA, L., **Stigmasterols from *Typha latifolia***, *Journal of Natural Products*, 53(6), 1430-1435, 1990

GURGEL, C. **Taxonomic studies in the *Macrolobium campestre* complex (Leguminosae)**. *Phytotaxa*, v. 272, n. 4, p. 257-266, 2016.

HOUGHTON, P. J., AGBEDAHUNSI, J. M., AGBEDAHUNSI, A. **Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species.**, *Phytochemistry*, 65, 2893, 2004.

HOWES, M.-J.R., PERRY, N.S.L., HOUGHTON, P.J. **Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimers disease and other cognitive disorders**. *Phytother. Res.* 17, 1–18, 2003.

HUANG, T. C., CHEN, C. P., WEFLER, V., & RAFTERY, A. **A stable reagent for the Liebermann-Burchard reaction. Application to rapid serum cholesterol determination**. *Analytical chemistry*, 33(10), 1405-1407, 1961.

IHA, S. M., MIGLIATO, K. F., VELLOSA, J. C., SACRAMENTO, L. V. S., PIETRO, R. C., ISAAC, V. L. B., SALGADO, H. R. N. **Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, p. 387-393, 2008.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B. & LOCK, M. **Legumes of the world**. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, pp. 1–577, 2005.

- MAGALHÃES, L. M.; SANTOS, F.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. **Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity.** *Talanta*, v. 83, p. 441–447, 2010.
- MAHLING, J.A.; SCHMIDT, R. R. **Glycosyl imidates, 70. Synthesis of a coumarin C-glucoside.** *Liebigs Annalen*, v. 1995, n. 3, p. 467-469, 1995.
- MARSTON, A., KISSLING, J., HOSTETTMANN, K. **A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants.** *Phytochemical Analysis*, 13,51, 2002.
- MATSUKI, M. **Regulation of plant phenolic synthesis: from biochemistry to ecology and evolution.** *Australian Journal of Botany*, v. 44, n. 6, p. 613-634, 1996.
- MEYER B. N, FERRIGNI N. R, PUTNAM J. E, JACOBSEN L. B, NICHOLS D. E, MCLAUGHLIN J. L. **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active-plant constituents.** *Planta Med* 45:31-34, 1982.
- MURPHY, B., DE LA ESTRELLA, M., SCHLEY, R., FOREST, F., & KLITGÅRD, B. **On the monophyly of *Macrolobium* Schreb., an ecologically diverse neotropical tree genus (Fabaceae-Detarioideae).** *International Journal of Plant Sciences*, v. 179, n. 1, p. 75-86, 2018.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014.** *Journal of natural products*, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.
- OLADOYE, S. O.; AYODELE, E. T.; ABDUL-HAMMED, M.; IDOWU, O. T. **Characterisation and Identification of Taraxerol and Taraxer-14-en-3-one from *Jatropha tanjorensis* (Ellis and Saroja) Leaves.** *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 58, p. 46-54, 2015.
- OSTROSKY, E. A., MIZUMOTO, M. K., LIMA, M. E., KANEKO, T. M., NISHIKAWA, S. O., & FREITAS, B. R. **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 301-307, 2008.
- OWEN, R. W., HAUBNER, R., MIER, W., GIACOSA, A., HULL, W. E., SPIEGELHALDER, B., & BARTSCH, H. **Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 41, n. 5, p. 703-717, 2003.
- PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. **Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.
- PEARSON, V. E. **Galantamine: a new Alzheimer drug with a past life.** *Annals of Pharmacotherapy*, v. 35, n. 11, p. 1406-1413, 2001.

PFEFFER, P. E.; PARRISH, F. W.; UNRUH, J. **Effects of carbohydrate-structure changes on induced shifts in differential isotope-shift ¹³C-NMR.** Carbohydrate Research, v. 84, n. 1, p. 13-23, 1980.

PRIETO, M. A.; RODRÍGUEZ-AMADO, I.; VÁZQUEZ, J. A.; MURADO, M. A. **β - Carotene Assay Revisited. Application To Characterize and Quantify Antioxidant and Prooxidant Activities in a Microplate.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 60, p. 8983-8993, 2012.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. **Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

QUEIRES, L. C. S.; RODRIGUES, L. E. A. **Quantificação das substâncias fenólicas totais em órgãos da aroeira *Schinus Terebenthifolius* (RADDI).** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 41, n. 2, p. 0-0, 1998.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda*.** Dissertação (Mestrado). Instituto de Química. UNESP 2012.

SAHA, NABENDU N.; DESAI, VIJAYA N.; DHAVALE, DILIP D. **A Synthesis of New Coumarin C-Glycosyl Derivatives.** The Journal of Organic Chemistry, v. 64, n. 5, p. 1715-1719, 1999.

SILVA JR, I. E., CECHINEL FILHO, V., ZACCHINO, S. A., LIMA, J. C. D. S., MARTINS, D. T. D. O. **Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 19, n. 1B, p. 242-248, 2009.

SILVA, M. M. F. ***Macrolobium* SCHREB. (LEGUMINOSAE) NO BRASIL (2016)** 253f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE. Universidade Federal do Pará. 2016.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. **A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia.** Revista brasileira de farmacognosia, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. **Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach.** Química Nova, v. 21, p. 557-559, 1998.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. **Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods.** American journal of enology and viticulture, v. 28, n. 1, p. 49-55, 1977.

SOUSA, C. D. M., SILVA, H. R., VIEIRA-JR, G. M., AYRES, M. C. C., COSTA, C. D., ARAÚJO, D. S., CHAVES, M. H. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.** Química nova, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SWAIN, SWASTI S.; ROUT, KEDAR K.; CHAND, PRADEEP K. **Production of triterpenoid anti-cancer compound taraxerol in *Agrobacterium*-transformed root cultures**

of butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.). Applied biochemistry and biotechnology, v. 168, n. 3, p. 487-503, 2012.

TUCKER, S. C. **Comparative floral ontogeny in Detarieae (Leguminosae: Caesalpinioideae). 2. Zygomorphic taxa with petal and stamen suppression.** American journal of botany, v. 89, n. 6, p. 888-907, 2002.

VAN DER BURGT, X. M., MACKINDER, B. A., WIERINGA, J. J., DE LA ESTRELLA, M. **The Gilbertiodendron ogoouense species complex (Leguminosae: Caesalpinioideae), Central Africa.** Kew bulletin, v. 70, n. 2, p. 29, 2015.

VDOVIN, A. D. BATSURÉN, D., BATIROV, É. K., YAGUDAEV, M. R., MALIKOV, V. M.. **¹H and ¹³C NMR spectra and the structure of a new coumarin, C-glycoside dauroside D, from *Haplophyllum dauricum*.** Chemistry of Natural Compounds, v. 19, n. 4, p. 413-416, 1983.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R.J.; SAND, C.; RENNIE, R.P. **Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies.** Journal of Ethnopharmacology, v. 115, p. 140–146, 2008.

ZARUCCHI, J. L. **A new species of *Macrolobium* (Fabaceae: Caesalpinioideae) from Mesoamerica.** Annals of the Missouri Botanical Garden, v. 77, n. 1, p. 209-211, 1990.