

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL
EM BIOTECNOLOGIA

TAÍS XAVIER GUIMARÃES

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICAS DE *Diploptropis*
purpurea (Rich.) Amshoff (FABACEAE)**

MANAUS
2019

TAÍS XAVIER GUIMARÃES

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICAS DE *Diplotropis
purpurea* (Rich.) Amshoff (FABACEAE)**

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Multi-Institucional
em Biotecnologia da UFAM, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor(a) em Biotecnologia,
com área de concentração em Saúde.**

Orientadora: Dra Cecilia Veronica Nunez

**MANAUS
2019**

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

-
- G963c Guimarães, Tais Xavier
Caracterização química e biológicas de *Diploptropis purpurea* (rich.)
Amshoff (Fabaceae) / Tais Xavier Guimarães. - 2019.
134 f. : il., color. : 31 cm.
- Orientador(a): Cecilia Veronica Nunez.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2019.
1. *Diploptropis purpurea*. 2. Fabaceae. 3. Estudo fitoquímico. 4. Atividade
biológica. I. Nunez, Cecilia Veronica. II. Universidade Federal do
Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título
-

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICAS DE *Diplotropis
purpurea* (Rich.) Amshoff (FABACEAE)**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez
Orientador/Presidente (PPGBiotec - UFAM)

Dra. Priscila Ferreira de Aquino
Membro Externo

Dr. Jorge Luiz López-Lozano
Membro Externo

Dr. Geone Maia Correa
Membro Externo

Dr. Nádia Cristina Falcão Bucker
Membro Externo

APROVADA EM: 30 /07 /2019

DEDICATÓRIA

- *Aos meus pais, Francisco e Esmerinda, e à minha irmã e meu cunhado, Regiane e Wagner, pois vocês me permitiram ir mais longe. Sou grata.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à Mãe Santíssima, por toda força, amor e consolo que a Espiritualidade amiga me proporcionou;

Aos meus irmãos Valdenor, Suelen, Marcelo, Karina, Camila e Amanda, pela alegria que eles me dão. E aos meus sobrinhos Duda, Malu, Miguel e Maísa, que são meus tesouros;

À minha orientadora, Dra Cecília, a quem eu muito admiro, por ser uma profissional ética, justa e empoderada. Sou grata por todas as oportunidades de aprendizado, pelos momentos de descontração, e principalmente pela liberdade e confiança para o desenvolvimento deste trabalho e de outros;

Às grandes amigas que esse doutorado me proporcionou, as Dras Maria Tereza e Maria Carolina, sou grata por todo o apoio, carinho e amizade. E também pela realização dos ensaios biológicos;

À princesa mestre Izabel, por ser um exemplo de mulher batalhadora, corajosa, e uma grande amiga, que nos recepciona e ajuda a todos indistintamente;

Ao Willian Pinheiro, pela companhia no terceiro turno e por toda criatividade para resolver os meus problemas, um verdadeiro presente de Deus nessa jornada;

Ao meu amigo Rannier Medonça, por toda ajuda dada para a execução deste trabalho;

Aos amigos que muito fizeram por mim durante estes anos no laboratório e que seguiram outros caminhos: Perla, Laura, Hugo, Lorena, Juliana, Jéssica, Jaci, Fran, Orley, Vanessa e Yuri;

Aos demais amigos do laboratório: David, Fabiele, Wendell, Daniel, Kat, Laila, Gabriel, Amanda, Luana, Julio, Rúlio, Cris, Weisson, André, Luciane, Fabiane, Allana, Lana, Priscila e Laísley;

Aos amigos do O Bom Samaritano e minha família espiritual: Angela, André, Edy, Marcone, Isabelle, Vitor, Anderson, Jande, Sergio, Deo, Maísa, Marina, Roni, Kevelin, Calil e Rodrigo, verdadeiros anjos de luz e resgate;

Aos queridos amigos Eric e Maria dos Anjos Branden, que me proporcionaram muitos momentos felizes nesses últimos anos;

Ao Dr Nerilson Lima pela amizade, motivação e ajuda com os experimentos de desreplicação;

Aos técnicos Magno, Sabrina e Zelina pelos experimentos de RMN e EM;

À Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de aprimoramento;

E ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

Diploptropis purpurea (Fabaceae), é muito pela resistência de sua madeira. O presente estudo realizou o estudo fitoquímico das folhas e galhos de *D. purpurea* e avaliou as atividades de toxicidade, antibacteriana e antiangiogênica. A coleta das amostras foi realizada na cachoeira da onça, Presidente Figueiredo, AM. O material foi seco, moído e extraído com metanol (MeOH). O estudo fitoquímico das folhas forneceu os esteroides estigmasterol e β -sitosterol, o triterpeno lupeol e os flavonoides catequina, quercetina, isoorientina e a proantocianidina B1, kaempferol e da catequina. Dos galhos foram isolados os esteroides estigmasterol e β -sitosterol, o triterpeno lupeol e a flavona 7,4'-dimetoxi-3-hidroxi-flavona, a apigenina, 3,5,6,4'-tetrahidroxiestilbeno e a procianidina C1, kaempferol e da catequina. Quanto à atividade de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, os extratos metanólicos e aquosos apresentaram taxa de mortalidade acima de 50% na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, considerado um ótimo resultado, contudo, não apresentaram o mesmo resultado quando diluídos em concentrações menores, apresentando resultados abaixo do esperado. Quanto à atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, o extrato MeOH e as fases DCM de folhas e galhos apresentaram elevada atividade frente as bactérias *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescens*, com halos de inibição de 11 a 19 mm e de 9 a 17 mm respectivamente. No ensaio de microdiluição a amostra galho MeOH na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi ativa frente a *M. morganii*, e a amostra galho fase AcOEt na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ frente a *A. baumani* e 500 $\mu\text{g/mL}$ foram ativos frente a *M. morganii*. Os extratos e fases de folhas e galhos apresentaram de média a alta atividade antiangiogênica, e das três substâncias testadas (estigmasterol, lupeol e quercetina) o estigmasterol 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi altamente tóxico, levando o embrião a morte. O presente estudo destaca-se por contribuir para o enriquecimento do conhecimento científico, uma vez que foram relatadas atividades biológicas e substâncias ainda não identificadas tanto para a espécie *D. purpurea* bem como para o seu gênero.

Palavras-chave: *Diploptropis purpurea*, Fabaceae, Estudo fitoquímico, Atividade biológica.

ABSTRACT

Diploptropis purpurea (Fabaceae), is much used for the resistance of its wood. The present study performed the phytochemical study of the leaves and branches of *D. purpurea* and evaluated the activities of toxicity, antibacterial and antiangiogenic. The collection of the samples was performed at the "cachoeira da onça", Presidente Figueiredo, AM. The material was dried, ground and extracted with methanol (MeOH). The phytochemical study of the leaves provided the steroids stigmasterol and β -sitosterol, the triterpene lupeol and the flavonoids catechin, quercetin, isoorientin and the proanthocyanidin B1, kaempferol and catechin. From the branches were isolated the steroids stigmasterol and β -sitosterol, the triterpene lupeol and the flavone 7,4'-dimethoxy-3-hydroxyflavone, apigenin, 3,5,6,4'-tetrahydroxystilbene and the procyanidin C1, kaempferol and catechin. Regarding the toxicity activity against the microcrustacean *Artemia salina*, the methanolic and aqueous extracts presented mortality rate above 50% in the concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$, considered a great result, however, they did not present the same result when diluted in lower concentrations, presenting results below the expected. Regarding the antimicrobial activity by the agar diffusion method, the MeOH extract and the DCM phases of leaves and branches presented high activity against the bacteria *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*, with inhibition zones of 11 to 19 mm and 9 to 17 mm respectively. In the microdilution assay the branch MeOH sample in the concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$ was active against *M. morganii*, and the branch AcOEt phase sample in the concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$ against *A. baumannii* and 500 $\mu\text{g/mL}$ were active against *M. morganii*. The extracts and phases of leaves and branches presented from medium to high antiangiogenic activity, and of the three substances tested (stigmasterol, lupeol and quercetin) the stigmasterol 1000 $\mu\text{g/mL}$ was highly toxic, leading the embryo to death. The present study stands out for contributing to the enrichment of scientific knowledge, since biological activities and substances not yet identified were reported both for the species *D. purpurea* as well as for its genus.

Key-Words: *Diploptropis purpurea*, Fabaceae, Phytochemistry, biological activities

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estratégia para identificação de novos princípios ativos utilizando a combinação da triagem química (I) com a triagem biológica (II)	3
Figura 2. Visão simplificada das principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário.	7
Figura 3. (A) Estrutura do fitoesterol. (B) Fitoesteróis mais comuns no reino vegetal	9
Figura 4: Estrutura básica do flavonoide	10
Figura 5. Estruturas químicas dos principais flavonoides	11
Figura 6. Estrutura geral do estilbeno e sua respectiva numeração	12
Figura 7: Distribuição de espécies de <i>Diplotropis</i> pelo mundo	14
Figura 8: Alcaloides quinolizídicos de <i>D. martiusii</i>	15
Figura 9: Furanoflavona de <i>D. ferruginea</i>	15
Figura 10: Substâncias isoladas de <i>D. ferruginea</i>	16
Figura 11: Flavonas de <i>D. ferruginea</i>	16
Figura 12: Aspecto geral do ramo florido de <i>Diplotropis purpurea</i>	17
Figura 13: Flavonoides, esteroides e triterpeno isolados do tronco da <i>D. purpúrea</i> (BRAZ-FILHO et al. 1973).	18
Figura 14: Substâncias isoladas dos galhos da <i>D. purpurea</i> (CURSINO, 2015)	18
Figura 15: Fluxograma da obtenção dos extratos.	20
Figura 16: Primeiro fracionamento da fase AcOEt das folhas de <i>D. purpurea</i>	24
Figura 17: . Segundo fracionamento da fase AcOEt das folhas de <i>D. purpurea</i>	26
Figura 18: Terceiro fracionamento da fase AcOEt das folhas de <i>D. purpurea</i>	28
Figura 19: . Fluxograma do fracionamento geral da fase DCM dos galhos de <i>D. purpurea</i>	31
Figura 20: Fluxograma do fracionamento geral da fração 3-4	33
Figura 21: Fluxograma do fracionamento ds fase AcOEt dos galhos de <i>D. purpurea</i>	35
Figura 22: Esquema do ensaio de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	38
Figura 23: Estrutura do triterpeno lupeol	42
Figura 24: Espectro de RMN de ¹ H do lupeol em CDCl ₃ , 300 MHz	44
Figura 25: Estruturas do estigmasterol e β-sitosterol	45
Figura 26: Espectro de RMN de ¹ H da mistura de estigmasterol e β-sitosterol em CDCl ₃ , 300 MHz	47
Figura 27: Cromatograma da fração 2.38-41 em coluna Luna C18 preparativa 250 mm x 10 mm, método isocrático 25% MeOH com TFA 0.01%, volume de injeção: 50 µL, fluxo de 4,6 mL/min	48
Figura 28: Espectro de RMN de ¹ H da substância 4 em DMSO- <i>d</i> (300 MHz)	50
Figura 29: Expansão dos sinais de ¹ H da substância 4 na região dos aromáticos da substância 4 em DMSO- <i>d</i> (300 MHz)	51
Figura 30: Expansão dos sinais de ¹ H do anel C da substância 4 em DMSO- <i>d</i> (300 MHz)	51
Figura 31: Estrutura da catequina	52
Figura 32: Expansão entre 2 e 5 ppm do mapa de correlação HSQC da substância 5 (DMSO- <i>d</i> , 100 MHz)	53
Figura 33: Expansão entre 5 e 8 ppm do mapa de correlação HSQC da substância 4 (DMSO- <i>d</i> , 100 MHz)	53
Figura 34: Mapa de contorno HMBC da substância 4.	54

Figura 35: Expansão do mapa de contorno HMBC da substância 4.....	55
Figura 36: Mapa de contorno COSY da substância 4, em DMSO-d.....	56
Figura 37: Cromatograma da fração 3.4-5 do 3º fracionamento da fase acetato das folhas em 280 nm. Coluna Phenomenex® Luna (2) FR C-18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), CLAE-DAD (Shimadzu®), fluxo 1,0 mL min ⁻¹ , volume de injeção: 10 µm. (Para condições de eluição veja gradiente exploratório no item 3.3.3, Tabela 5)	58
Figura 38: O espectro ESI-MS, no modo negativo, para o composto majoritário presente na fração 3.4-5.	59
Figura 39: (A) Cromatograma do tipo base peak mostrando o pico majoritário da fração 3.4-5. (B) Cromatograma UV em 280 nm.	59
Figura 40: Estrutura do flavonoide quercetina	60
Figura 41: Espectro de CL-EM/EM no modo positivo da fração 3.17 da fase acetato das folhas de <i>D. purpurea</i> , para o íon 449	61
Figura 42: Espectro de ESI-EM/EM no modo positivo da fração 3.17 da fase acetato das folhas de <i>D. purpurea</i> , para o íon 329	61
Figura 43: Estrutura da isoorientina	62
Figura 44: Espectro de CL-EM/EM no modo negativo da fração 3.17 da fase acetato das folhas de <i>D. purpurea</i>	62
Figura 45: Proposta de fragmentação da isoorientina	63
Figura 46: Espectro de ESI-EM/EM no modo negativo da fração 3.18-32 da fase acetato das folhas de <i>D. purpurea</i>	64
Figura 47: Representação da fragmentação da procianidina B3	66
Figura 48: Perfil cromatográfico da fração MeOH/H ₂ O 2:8 v/v proveniente da fase hidrometanólica das folhas <i>D. purpurea</i> , submetida a limpeza com SPE em Strata FR18. Coluna Phenomenex® Luna (2) FR18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC-PAD (Shimadzu®), fluxo 1,0 mL min ⁻¹ , λ = 220, 254 e 280 nm	67
Figura 49: Espectros na região do UV para os principais picos eluídos no cromatograma da fase hidrometanólica das folhas <i>D. purpurea</i>	69
Figura 50: Espectro de massas da substância 8	70
Figura 51: Sinais de RMN de ¹ H da substância 8 em CDCl ₃ (300 MHz)	71
Figura 52: Estrutura da 7,4' -dimetoxi-3-hidroxiavona	72
Figura 53: Cromatograma e espectro de UV da substância 9. Coluna Phenomenex® Luna (2) FR C-18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), CLAE-DAD (Shimadzu®), fluxo 1,0 mL min ⁻¹ , volume de injeção: 10 µm. (Para condições de eluição veja gradiente exploratório no item 3.3.3, Tabela 5)	73
Figura 54: Estrutura da apigenina	73
Figura 55: Espectro de ESI-EM/EM da amostra 21.28-34	74
Figura 56: Espectro de RMN de ¹ H da substância 9 em DMSO-d ₆ 300 MHz	76
Figura 57: Expansão dos sinais de de RMN de ¹ H da substância 9 em DMSO-d 300 MHz	77
Figura 58: Mapa de contorno HMBC substância 9 em DMSO-d ₆ 300 MHz	78
Figura 59: Expansão do mapa de contorno HMBC substância 9 em DMSO-d ₆ 300 MHz	79
Figura 60: Expansão do mapa de contorno HSQC substância 9 em DMSO-d ₆ 300 MHz	80
Figura 61: Cromatograma da fração 3.4-5 do 3º fracionamento da fase acetato das folhas em 280 nm. Coluna Phenomenex® Luna (2) FR C-18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), CLAE-DAD (Shimadzu®), fluxo 1,0 mL min ⁻¹ , volume de injeção: 10 µm.	81
Figura 62: Estrutura da substância 11, kaempferol-3-O-rutinosídeo	82

Figura 63: Espectro de ESI-EM/EM no modo negativo da fração 16.11-13.10 da fase acetato	82
Figura 64: Mecanismo de fragmentação Clivagem heterocíclica (HRF)	84
Figura 65: Mecanismo de fragmentação Retro Diels Alder (RDA)	85
Figura 66: Mecanismo de fragmentação quiona-metídeo (QM)	86
Figura 67: Perfil cromatográfico da fração MeOH/H ₂ O 2:8 v/v proveniente da fase hidrometanólica dos galhos de <i>D. purpurea</i> , submetida a limpeza com SPE em Strata FR18. Coluna Phenomenex® Luna (2) FR18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC-PAD (Shimadzu®), fluxo 1,0 mL min	87
Figura 68: Espectros na região do UV para os principais picos eluídos no cromatograma da fase hidrometanólica dos galhos.	88
Figura 69: kampferol-3-O-rutinosídeo.	89
Figura 70: Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato metanólico das folhas de <i>D. purpurea</i>	96
Figura 71: Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pela fase diclorometânica das folhas de <i>D. purpurea</i>	97
Figura 72 Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pela fase hidrometanólica das folhas de <i>D. purpurea</i>	97
Figura 73. Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato Galho MeOH de <i>D. purpurea</i>	98
Figura 74 Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo pela fase DCM dos galhos de <i>D. purpurea</i>	99
Figura 75 . Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pela Fase Acetato de Etila dos Galhos de <i>D. purpurea</i>	99
Figura 76 Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato Galho H ₂ O de <i>D. purpurea</i>	100
Figura 77 Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo lupeol.	101
Figura 78 Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo estigmasterol. ...	101
Figura 79 Avaliação da atividade antiangiogênica da quercetina.	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condensação de unidades de isopreno ativo na formação de terpenoides (SIMÕES, 2000).....	8
Tabela 2. Sistemas de eluição do fracionamento das substâncias 1, 2 e 3	23
Tabela 3. Sistemas de eluição da purificação da substância 4.....	25
Tabela 4. Sistemas de eluição do fracionamento das substâncias 5, 6, 7 e 8	27
Tabela 5. Gradiente de eluição cromatográfica otimizado para análise das frações do terceiro fracionamento da fase AcOEt das folhas de <i>D. purpurea</i> 27	
Tabela 6. Sistemas de purificação da fração 3-5	29
Tabela 7. Sistemas de purificação da fração 8.....	30
Tabela 8: Sistemas de eluição em SPE C-18.....	36
Tabela 9: . Condições de análise dos extratos por CLAE-DAD	37
Tabela 10: Padrões e seus respectivos tempos de retenção e massa molecular utilizados nas análises em CLAE-DAD.....	37
Tabela 11: Rendimentos dos extratos de <i>D. purpurea</i>	41
Tabela 12: Sinais de RMN de ¹ H da substância 1	43
Tabela 13: Sinais de RMN de ¹ H das substâncias 2 e 3	45
Tabela 14: . Sinais de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 4 da substância 4 em DMSO- <i>d</i> (300 MHz)	57
Tabela 15: Sistema de eluição da fase hidrometanólica das folhas <i>D. purpurea</i> , ...	69
Tabela 16: Sinais de ¹ H da substância 8	72
Tabela 17: Sinais de RMN da substância 9 em DMSO- <i>d</i>	75
Tabela 18: Resultado do ensaio de toxicidade dos extratos de <i>D. purpurea</i> expressos em percentagem de mortalidade de <i>A. salina</i>	90
Tabela 19: . Resultado da atividade antibacteriana dos extratos e fases de <i>D. purpurea</i> pelo método de difusão em ágar.	92
Tabela 20. Resultado da atividade antibacteriana dos extratos e fases de <i>D.purpurea</i> pelo método de microdiluição.	94

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL ₅₀	Concentração Letal Média
CSLI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de Massas
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
FN	Fase normal
Hex	Hexano
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
IV	Infravermelho
KHz	Quilo Hertz
MeOH	Metanol
m/z	Relação massa/carga
Nm	Nanômetro
NP/Peg	Difenilboriloxietilamina / Polietilenoglicol
®	Marca registrada
Rt	Tempo de retenção
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Florestal
RMN	Ressonância Magnética Nuclea
SARM TEAC	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a metilicina 3-ethylbenzotiazolina-6-sulfônico
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Potencial biotecnológico de extratos vegetais	3
2.1.1	Toxicidade de produtos naturais	4
2.1.2	Atividade antibacteriana	5
2.1.3	Angiogênese	5
2.2	Metabólitos secundários de plantas	6
2.2.1	Classe dos terpenoides	7
2.2.1.1	Fitoesteróis	9
2.2.2	Classe dos fenólicos	10
2.2.2.1	Flavonoides	10
2.2.2.2	Estilbenos	11
2.3	Identificação de metabólitos secundários em extratos vegetais	12
2.4	A família Fabaceae Lindl	13
2.4.1	<i>Diploptropis benth</i>	14
2.4.2	<i>Diploptropis purpurea</i>	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Materiais e equipamentos utilizados	19
3.1.1	Softwares e banco de dados utilizados	19
3.2	Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos	19
3.2.1	Preparação dos extratos vegetais	20
3.2.1	Preparação dos extratos vegetais	20
3.2.2	Cromatografia em camada delgada	21
3.3	Estudo químico das folhas de <i>Diploptropis purpurea</i>	22
3.3.1	Primeiro fracionamento de uma alíquota da fase Acoet das folhas de <i>D. purpurea</i>	22
3.3.2	Segundo fracionamento com o restante da fase Acoet das folhas de <i>D. purpurea</i>	24
3.3.3	Terceiro fracionamento da fase Acoet das folhas	26
3.4	Estudo químico do extrato metanólico dos galhos de <i>Diploptropis purpurea</i>	28
3.4.1	Fracionamento da fase DCM dos galhos de <i>Diploptropis purpurea</i>	28
3.4.2	Fracionamento da fase acoet dos galhos de <i>Diploptropis purpurea</i>	32
3.5	Estudo das fases hidrometanólicas de folhas e galhos de <i>Diploptropis purpurea</i>	36
3.5.1	Procedimentos cromatográficos gerais	36
3.6	Ensaio biológicos e químicos	38
3.6.1	Toxicidade frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	38
3.6.2	Ensaio antibacteriano	38
3.6.3	Atividade antiangiogênica: método da membrana corioalantóica embrionária (CAM)	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Rendimento dos extratos de <i>Diploptropis purpurea</i>	41

4.2 Estudo químico das folhas de <i>Diplotropis purpurea</i> .	41
4.2.1 Substância 1:	42
4.2.2 Substâncias 2 e 3.	45
4.2.3 Substância 4.	48
4.2.4 Substância 5.	58
4.2.5 Substância 6.	60
4.2.6 Substância 7.	64
4.3 Análises por CLAE-UV-DAD dos extratos hidrometanólicos das folhas de <i>Diplotropis purpurea</i>	70
4.4.1 Substância 8	70
4.4.2 Substância 9.	72
4.4.3 Substância 10.	74
4.4.4 Substância 11.	81
4.4.5 Substância 12.	82
4.5 Análises por CLAE-UV-DAD dos extratos hidrometanólicos das folhas de <i>Diplotropis purpurea</i> .	87
5 Ensaio biológico.	89
5.1 Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> .	89
5.2 Avaliação da atividade antibacteriana.	90
5.2.1 Método de difusão em ágar.	91
5.2.2 Método de microdiluição.	93
5.3 Atividade angiogênica de <i>Diplotropis purpurea</i> .	95
5.3.1 Atividade angiogênica das folhas de <i>Diplotropis purpurea</i> .	96
5.3.2 Atividade antiangiogênica dos galhos de <i>Diplotropis purpurea</i> .	98
5.3.3 Atividade angiogênica das substâncias isoladas.	100
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.	103
7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.	104

1. INTRODUÇÃO

A bioprospecção tem como objetivos conhecer os constituintes químicos de extratos de produtos naturais, podendo ser estes de plantas, microrganismos ou animais, e avaliar sua presença nos mesmos. Essa investigação pode ser feita em extratos de plantas e envolvem aspectos de caráter inter e multidisciplinar, havendo a necessidade de interação entre as mais diversas áreas, tais como a química, a biotecnologia, farmácia entre outras (BARREIRO & BOLZANI, 2009; FACUNDO et al., 2015).

A Floresta Amazônica, com sua ampla e complexa biodiversidade, consagra-se como um vultuoso centro de produção de moléculas de grande interesse biológico e ecológico. Das muitas famílias de espécies vegetais que compõe esse bioma, destaca-se a família Fabaceae, conhecida por ser uma grande produtora de flavonoides (HEGNAUE & GRAYER-BARKMEIJER, 1993; GRAYER & KOKUBUM, 2001). Estes, que são conhecidos pelo seu papel como pigmentos de flores e frutos, e vêm despertando especialmente o interesse da indústria de alimentos, uma vez que além de possuírem alto potencial biotecnológico também podem atuar como corantes e conservantes de alimentos (BRAVO, 1998).

Ao relacionar o caráter protetor de flavonoides contra o ataque de patógenos, com as mais diversas formas de vegetais na natureza, destacam-se a um gênero de lenhosas da família Fabaceae, o *Diploptropis* Benth, que até agora permanece pouco estudado. Em um estudo iniciado por Cursino (2015), foram estudados quimicamente os extratos apolares de folhas e galhos de *D. purpurea*, dos quais foram possíveis isolar triterpenos até então inéditos para o gênero. O início do estudo da fase AcOEt das folhas deu a indicação da presença de catequinas oligoméricas que não puderam ser caracterizadas pela pouca quantidade de massa obtida.

Neste trabalho, o interesse para novas técnicas com melhor desempenho para a identificação de substâncias em extratos polares, levou à identificação de flavonoides ainda não descritos para o gênero. Portanto, este trabalho teve como objetivo geral realizar o estudo químico e biológico dos extratos das folhas e galhos metanólicos de *Diploptropis purpurea* (Rich.) Amshoff var *leptophylla* (Kleinh.) Amshoff.

E como objetivos específicos:

- Avaliar os ensaios de atividade antibacteriana, antioxidante e antiangiogênico dos extratos e fases de *D. purpurea*;
- Promover técnicas de purificação de substâncias das fases diclorometânicas e acetato de etila dos extratos metanólicos das folhas e galhos de *D. purpurea*;

- Identificar a estrutura química das substâncias isoladas;
- Desreplicar as substâncias isoladas nas fases hidrometanólicas das folhas e galhos de *D. purpurea*.
- Avaliar ensaios do potencial antiangiogênico das substâncias isoladas;

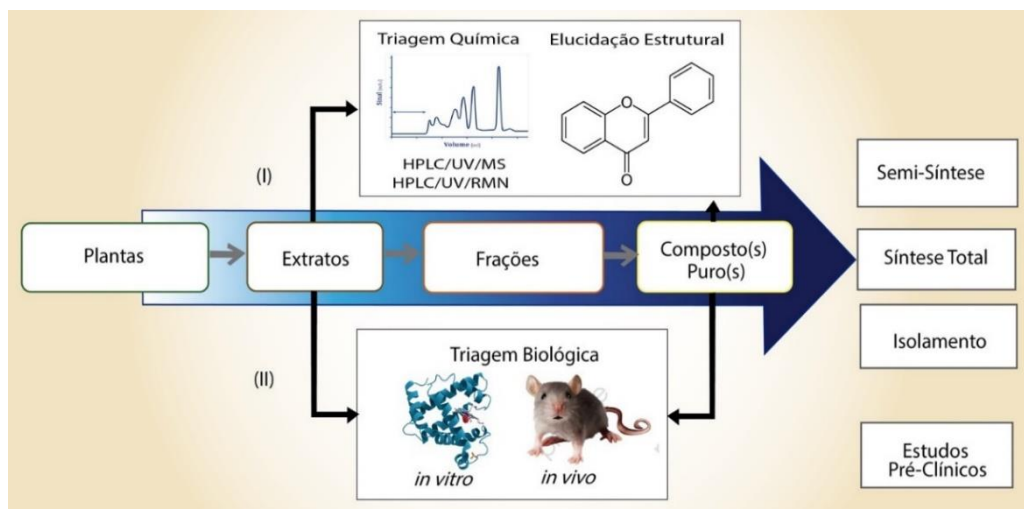
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE EXTRATOS VEGETAIS

Os extratos vegetais são usados como agentes terapêuticos e muitos fármacos de uso clássico foram extraídos destes. Atualmente, na era da biotecnologia e química medicinal, a busca por moléculas bioativas em produtos naturais é feita de forma racional e planejada, e as ferramentas biotecnológicas disponíveis ganham um papel de destaque neste cenário, disponibilizando diversos tipos de ensaios *in vitro*, *in vivo* e *in silico* para este fim (DUGGER, PLATT, GOLDSTEIN, 2017; GUIDO, ANDRICOPULO, OLIVA, 2010; MARQUES, 2005) ,

A triagem inicial dos extratos é chamada de pesquisa básica e envolve várias etapas e tipos de ensaios para avaliação da atividade biológica, como descrito na Figura 1. Nesta fase, estes ensaios precisam ter baixo custo, rapidez na entrega de resultados, que sejam tecnologicamente simples e que possam ser aplicados a uma grande quantidade de amostras. As vantagens da utilização dos bioensaios são variadas, entre as mais importantes, pode-se citar o monitoramento do processo de fracionamento das amostras, agilizando o isolamento das substâncias bioativas em estudos guiados, a padronização dos extratos, uma vez que os mesmos estão suscetíveis à variações em sua composição química, além de servir como ferramenta para o controle de qualidade. (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; MCLAUGHLIN, ROGERS, ANDERSON, 1998) ,

Figura 1: Estratégia para identificação de novos princípios ativos utilizando a combinação da triagem química (I) com a triagem biológica (II)



Fonte: Queiroz et al (2009)

2.1.1 Toxicidade de Produtos Naturais

Popularmente, há uma falsa ideia de que produtos naturais não causam males, corroborada pela propaganda naturalista, de uma vida mais saudável aliada ao consumo de chás, infusões e garrafadas. Levando em consideração que no Brasil há uma vasta variedade de espécies de plantas que ainda não foram estudadas, e ainda contando a inserção de espécies usadas na medicina chinesa e *Ayurveda*, e das quais pouco se sabe sobre a toxicologia, temos um grave caso de saúde pública, que pode levar pessoas a morte. Tudo isto reforça a necessidade avaliar quais mudanças estes preparos causam no metabolismo humano e animal (BEDNARCZUK, et al. 2010; DORATO e BUCLEY 2006; VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL 2005).

Algumas espécies podem causar processos alérgicos, dermatite de contágio, desconforto estomacal, aborto, taquicardia, levando ao coma e a morte. Há exemplos de diversas classes metabólicas que causam toxicidade presente em plantas medicinais, tais como: alcaloides pizorrilizídínicos do confrei (*Symphytum officinale* L.) que são hepatotóxicos e carcinogênicos (VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL 2005). A ricina de mamona (*Ricinus communis* L.) que causa desconforto abdominal, taquicardia, coma e até o óbito (FENNER, et al. 2006). Furanocumarinas de angélica (*Angelica archangelica*) que causam fotodermatite, e de frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina que causam queimaduras solares (REIS 2010).

Um dos organismos mais usados em pesquisas de produtos naturais, é o de letalidade sobre *Artemia salina* (MCLAUGHLIN e ROGERS 1998). Este ensaio apresenta as vantagens de ser realizado em um organismo vivo que não necessita de autorização de um comitê de ética, além de apresentar uma ótima relação custo benefício. Este ensaio passou a ser usado em química de produtos naturais após o estudo de Meyer e colaboradores (1982), criar a relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL50, onde os extratos de plantas que concentração acima de 1000 µg/mL não alcançam 50% de letalidade são considerados atóxicos. Além disso, neste trabalho, também observou-se que extratos que apresentavam letalidade sobre *A. salina*, tem boas chances de apresentar letalidade para as linhagens tumorais 9KB e 9PS, além de diversos outros estudados buscarem relação entre a atividade tóxica sobre *A. salina* e as atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida. (BEDNARCZUK, et al. 2010; LIANG 2010; MCLAUGHLIN e ROGERS 1998; MEYER, et al. 1982).

2.1.2 Atividade antibacteriana

As bactérias são organismos unicelulares essenciais para o desenvolvimento da vida na Terra. No entanto, sua grande capacidade de adaptação levou ao desenvolvimento de cepas patogênicas capazes de matar homens e animais, bem como de dizimar plantações. Como é o caso das bactérias causadoras da tuberculose, hanseníase, difteria, coqueluche, tétano, disenteria e outras tantas que levaram centenas de milhares a morte. Existem vários modelos de ensaios descritos na literatura para avaliar a atividade antibacteriana, sendo que estes podem indicar se o ativo é bacteriostático ou bactericida, ou seja, se ele inibe o crescimento ou se mata a bactéria (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010) . (CARDONA, et al. 2013)

Dentre estes microrganismos estão *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Edwardsella tarda*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Nocardia brasiliensis*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, que são bactérias comuns e muitas vezes fazem parte da nossa microbiota, no entanto, baixa imunidade e uso descontrolado de antibióticos tornaram essas bactérias resistentes à drogas. Nesse contexto, os fitoquímicos tem demonstrado seu potencial como antibacteriano, sejam usados sozinhos, ou em sinergia, potencializando o produtos antibacterianos menos efetivos (SHARIFI-RAD, SHARIFI-RAD, SHARIFI-RAD, 2016; SIMÕES et al., 2008)

A medida do potencial bacteriostática dos extratos vegetais é avaliada através do valor da CIM (Concentração Inibitória Mínima), que é a quantidade de **extratos** ou substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste. Vários fatores interferem no resultado da CIM, como a origem da planta, época de coleta, se o extrato foi preparado de plantas frescas ou seca, entre outros (OSTROSKY et al., 2008).

2.1.3 Angiogênese

O processo de angiogênese é definido como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de células endoteliais, e está envolvido em diversos processos naturais como desenvolvimento de órgãos, cicatrização, processos inflamatórios, menstruação, ovulação, formação do corpo lúteo, nidação, morfogênese (CHAVES et al, 2015; SILVA et al, 2007) e envolve uma série de etapas.

O processo tem início com as células endoteliais do vaso-mãe sendo estimuladas pelas citocinas angiogênicas. A lâmina basal é degradada pela ação de proteases da matriz

extracelular e liberadas pelo endotélio. As células endoteliais migram para o estroma perivascular, proliferam e iniciam o brotamento capilar. A direção da migração é apontada para a fonte dos estímulos angiogênicos. O broto formado expande e assume a forma tubular e uma nova lâmina basal se desenvolve. A proliferação endotelial permite a extensão dos túbulos microvasculares que se unem por anastomose e dão origem à cadeia circulatória funcional (SILVA et al, 2007). A angiogênese é um passo crucial no crescimento, progressão e metástase de tumores, pois os vasos sanguíneos mantêm os tumores oxigenados e alimentados. Logo, a inibição da angiogênese é percebido como uma das mais promissoras estratégias no tratamento de câncer (HORTA et al., 2007; PRATHEESHKUMAR et al., 2012) .

O ensaio em membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM), é um modelo *in vivo*, simples e de baixo custo, que possibilita o estudo do processo complexo da proliferação e migração tumoral. A presença de colágeno do tipo I e integrina $\alpha_v\beta_3$, faz com que o ambiente fisiológico se assemelhe ao tumoral (LOKMAN et al., 2012). Outra vantagem do ensaio com a CAM é a gama de materiais que podem ser utilizados como veículos, como por exemplo discos de papel filtro, agarose, metilcelulose, policrilamida ou colágeno, um polímero natural onde o tecido vascular pode crescer facilmente (EGOSHI et al., 2015; FOLKMAN; COTRAN, 1976).

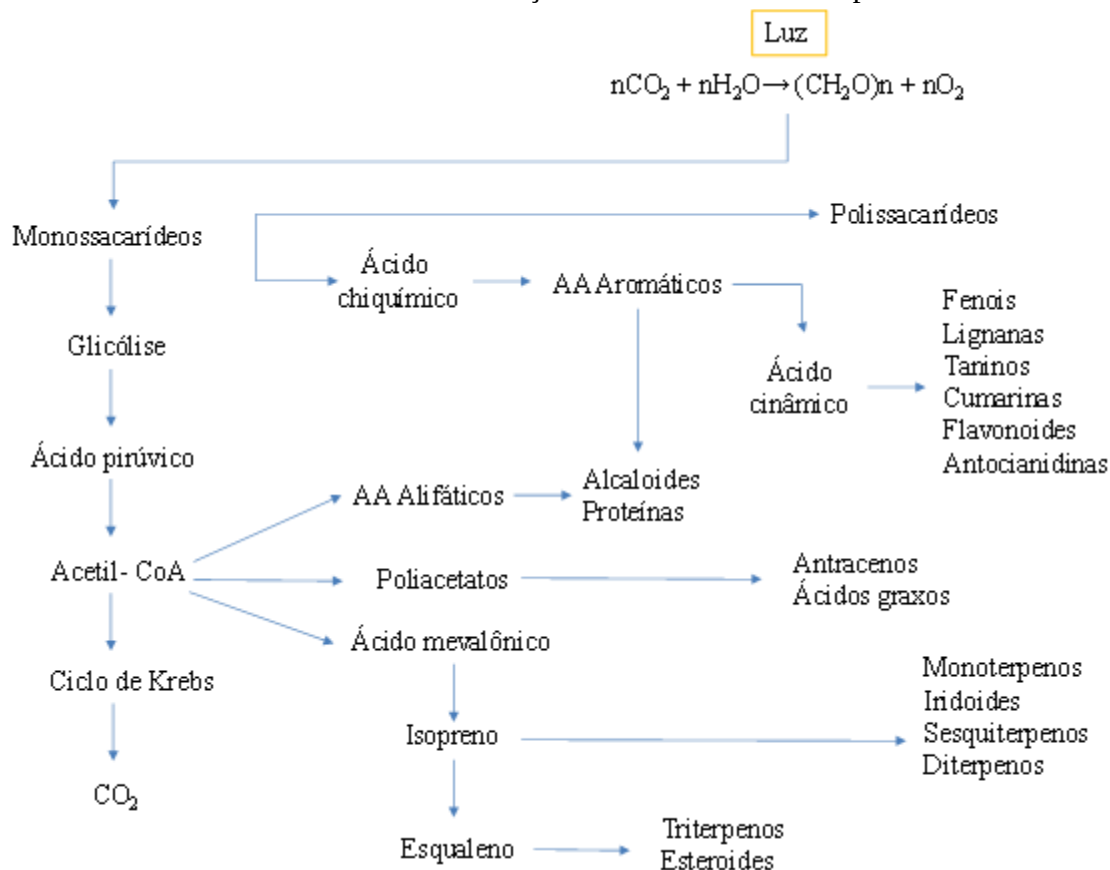
A atividade angiogênica de diversas plantas medicinais, conhecidas por suas atividades cicatrizantes, foram avaliadas pelo método CAM. Constatou-se que os extratos das flores de calêndula (*Calendula officinalis*), são pró-angiogênicos. Patrick et al (2003) confirmou a atividade do extrato aquoso, enquanto que Parente et al (2011), avaliou o extrato etanólico das flores e suas respectivas frações hexânicas e diclorometânicas e constatou que também são pró-angiogênicas. o extrato aquoso de bartimão (*Stryphnodendron adstringens*) também teve sua atividade angiogênica confirmada pelo método CAM (CHAVES et al 2016).

2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS

Os metabólitos secundários, são produtos da degradação do metabolismo primário. Por muito tempo, ignorou-se a verdadeira função desses metabólitos (HUFSKY E BOCKER, 2015). Atualmente, os metabólitos secundários foram renomeados para metabólitos específicos, em virtude do fato de que estas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adaptação da planta ao seu meio. A produção dos metabólitos específicos (Figura

2) é determinada por necessidades ecológicas, logo, uma planta exposta ao sol produzirá substâncias com potencial antioxidante, visando neutralizar os efeitos dos raios solares. Outra planta que sofra ataque de fungos ou bactérias produzirá antimicrobianos (SIMÕES,2015).

Figura 2 Visão simplificada das principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário



2.2.1 Classe dos terpenoides

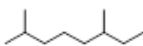
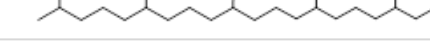
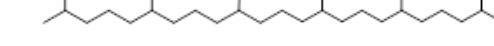
Os terpenoides são produtos da via do mevalonato, que após uma série de reações origina o isopreno ativo, a unidade básica de formação de terpenos e esteróides. Os terpenos são alcenos naturais, produzidos por plantas, fungos e animais e são os principais constituintes dos óleos essenciais (MAHATO E KUNKU, 1994; FELIPE E BICAS, 2016). Formam a maior classe de metabólitos secundários, com mais de 55 mil substâncias conhecidas, e são derivados do isopreno (C5), contem esqueleto carbônico representado por (C5)_n, onde as unidades de isopreno unem-se por ligações cabeça-cauda (FELIPE E BICAS, 2016; OLIVEIRA et al., 2014).

Quimicamente, os terpenos, apresentam uma dupla ligação, e quando possuem oxigênio em sua estrutura são chamados de terpenoides, e podem apresentar diferentes funções químicas,

entre as quais: ácidos, alcoois, aldeídos, cetonas, éteres, fenois e epóxidos terpênicos (FELIPE E BICAS, 2016).

Existem várias formas de classificar os terpenos, que podem ser: pelo tipo de ligação ou pela quantidade de unidades de isopreno (Tabela 1). Além disso, podem ser subclassificados em termos de grau de ciclização, como acíclico, monocíclicos e bicíclicos (DEWICK, 2010; FELIPE E BICAS, 2016)

Tabela 1. Condensação de unidades de isopreno ativo na formação de terpenoides (SIMÕES, 2000)

Nº de unidades	Fórmula estrutural	No de átomos de carbono	Nome ou classe
1		5	isopreno
2		10	monoterpenos
3		15	sesquiterpenos
4		20	diterpenos
5		25	sesterpenos
6		30	triterpenos
8		40	tetraterpenos

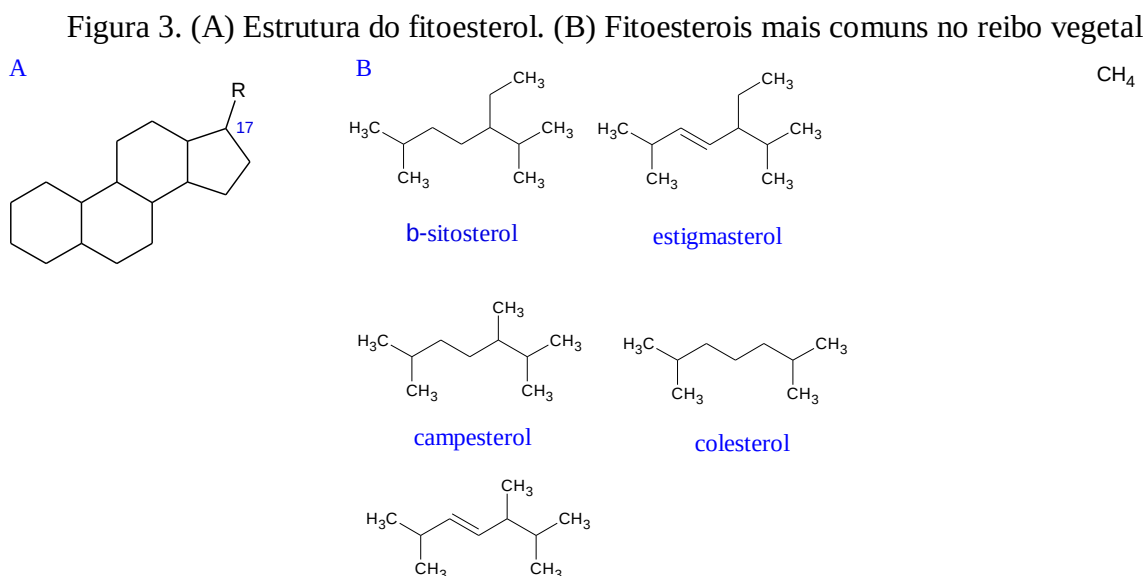
Os terpenos tem reconhecido efeito antitumoral (SILVA, FELINTO E FERREIRA, 2018), antifúngico, antiviral e antimicrobiano (AKTHAR, DEGAGA, AZAM, 2014), antihiperglicêmico (CHEN, BALAN, POPOVICH, 2019), analgésico (OLIVEIRA et al., 2014), anti-inflamatório (DAVINELLI, NIELSEN, SCAPAGNINI, 2018), anti-parasitário (SARTO E ZANUSSO JUNIOR, 2014).

Os terpenos são usados na indústria, pois contribuem para a melhora do sensorial de diversos produtos, especialmente na nos setores de cosmética, higiene e perfumaria, podendo ser usados também na indústria alimentícia. Na indústria farmacêutica, podem ser usados como excipientes para melhorar a penetração na pele e como princípio ativo em medicamentos (FELIPE E BICAS, 2016; OLIVEIRA et al., 2014).

t2.2.1.1 Fitoesteróis

Os fitoesteróis são uma classe de lipídios que estão presentes em todo o reino vegetal, encontrando-se em maiores concentrações nos alimentos ricos em gordura, tais como castanhas, sementes e vegetais que podem ser divididos em esteróis vegetais e estanois vegetais (CABRAL & KLEIN, 2017). Os fitoesteróis (Figura 3) são assim chamados, pois possuem a sua estrutura química, semelhante ao colesterol dos mamíferos, contendo um núcleo tetracíclico com 3 anéis C-6 e 1 anel C-5, com grupos metilo ligados em C-10 e C-13, e grupo acil no C-17 (VANMIERLO, et al., 2015) (MARINELI, et al., 2015). A maioria dos fitoesteróis apresenta na sua estrutura química 28 ou 29 carbonos, com uma ou duas ligações duplas típicas do núcleo esterol (VANMIERLO, et al., 2015). Os fitoestanois (estanois vegetais) formam um subgrupo saturado de fitoesteróis, diferenciam-se pelo seu elevado grau de saturação (CABRAL & KLEIN, 2017).

Os fitoesteróis são componentes chave das membranas celulares vegetais. Estudos recentes indicam que a presença de fitoesteróis e de fitoestanois apresentam benefícios promotores da saúde, pois sua ação antioxidante potenciam a diminuição do colesterol LDL e previnem doenças cardiovasculares (CABRAL & KLEIN, 2017), e do CNS (VANMIERLO, et al., 2015), atribuem-se também propriedades anticancerígenas, antioxidantes, hepatoprotetoras, entre outras (MARINELI, et al., 2015). A capacidade que os fitoesteróis apresentam em baixar os níveis séricos de colesterol é atribuída similaridade na estrutura com o colesterol. Os fitoesteróis mais abundantes são o β -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol, os estanois mais comuns são o β -sitostanol e o campestanol **Figura 3** (CABRAL & KLEIN, 2017).



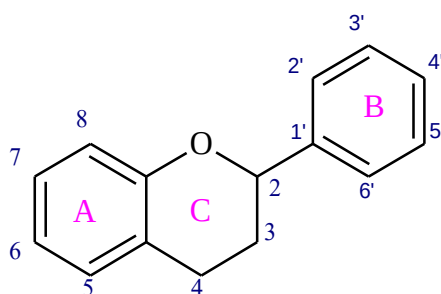
2.2.2 Classe dos fenólicos

Uma das maiores classes de metabólitos secundários são os fenólicos, que vão desde moléculas simples a substâncias poliméricas com alta massa molecular (BRAVO, 1998). De acordo com Haborne (1989), os fenólicos classificam-se em 10 grupos, de acordo de com o seu esqueleto básico.

2.2.2.1 Flavonoides

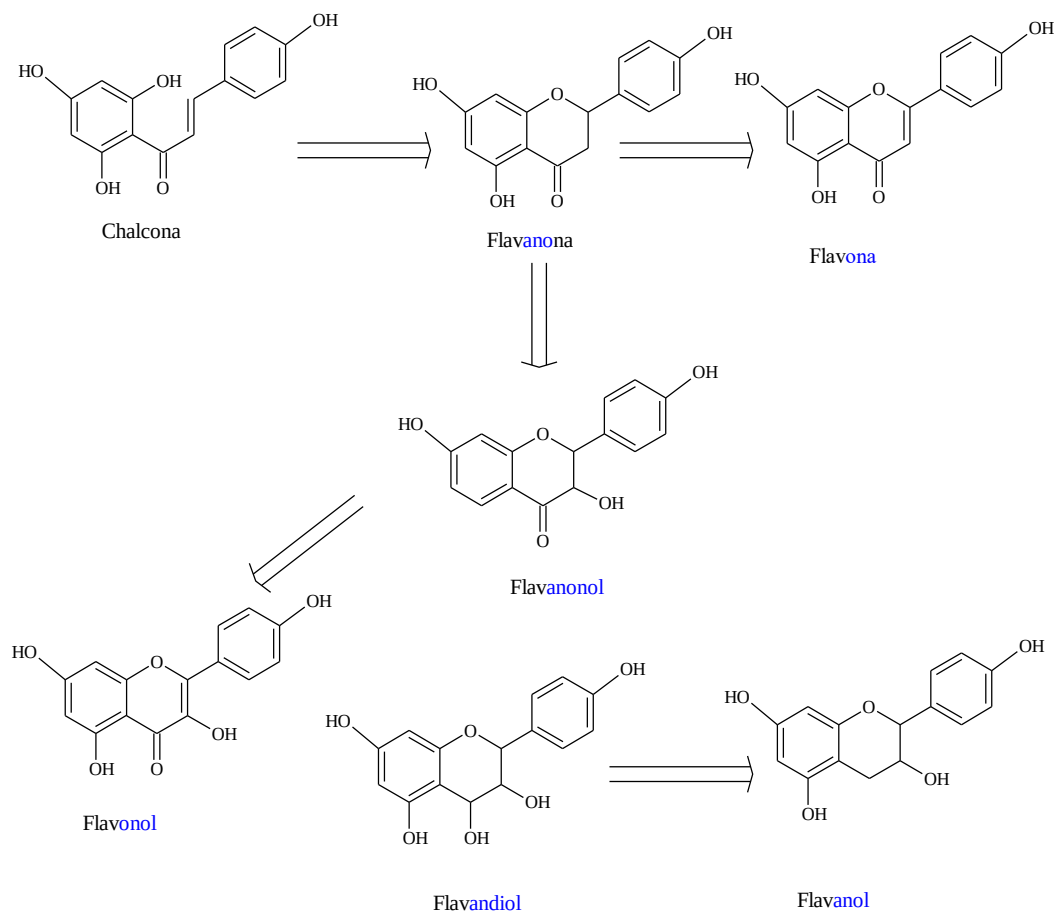
Dentre as classes fenólicas de plantas, a mais comum e abundante é a dos flavonoides. Eles possuem o esqueleto base do difenilpropano(C6-C3-C6), que consiste de dois anéis aromáticos ligados através de três carbonos que usualmente formam um anel heterocíclico oxigenado (**Figura 4**). Biogeneticamente, o anel A vem de uma molécula de resorcinol ou floroglucinol sintetizado na rota acetato, enquanto que o anel B é derivado da rota chiquimato (BRAVO, 1998).

Figura 4: Estrutura básica do flavonoide



Os flavonoides são divididos em classes dependendo do estado de oxidação do anel central de pirano (anel C). A Figura 5 apresenta a estrutura química dos principais tipos de flavonoides (PINHEIRO E JUSTINO, 2012).

Figura 5. Estruturas químicas dos principais flavonoides



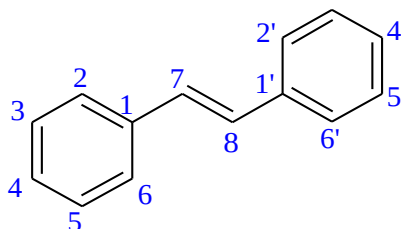
2.2.2.2 Estilbenos

Os estilbenos (Figura 6) são fenilpropanoides pequenos, com esqueleto básico C6-C2-C6 e massa variando entre 210 e 270 g/mol (CHONG et al, 2009), e algumas vezes são chamados de fitoalexinas (JEANDET et al, 2002).

Os estilbenos ocorrem em várias famílias de plantas, mas especialmente em Vitaceae, a família das uvas, a principal fonte destas substâncias, sendo o resveratrol o representante mais conhecido e estudado. A síntese dos estilbenos é estimulada por estresse causado luz ultravioleta e infecções antifúngicas, o que lhes confere o seu alto potencial antioxidante (RYU et al, 2002), que por conseguinte também lhes confere alto potencial quimiopreventivo (VALAVANIDIS E VLACHOGIANNI, 2013), e também de inibição de enzimas tais como a tirosinase, que converte tirosina em L-dopa para formar dopaquinona, que mantém um papel

importante na biossíntese de melanina, que está envolvido em processos de pigmentação da pele e de hiperpigmentação, tais como melasma, efelide e lentigo (SHIN, et al. 1998).

Figura 6. Estrutura geral do estilbeno e sua respectiva numeração



2.3 IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM EXTRATOS VEGETAIS

A desreplicação é um processo de triagem química, que visa identificar substâncias bioativas já conhecidas em extratos brutos, e que pode ser feita por meio de co-injeção de padrões autênticos, ou por comparação dos dados espectrais experimentais com dados disponíveis em banco de dados, facilitando a identificação de moléculas já conhecidas e o isolamento de moléculas ainda não conhecidas (NG et al., 2009; ALLARD et al, 2016). Este processo vem tornando-se rotineiro nos laboratórios de pesquisa, uma vez que permite a replicação de trabalhos com a utilização de quantidades mínimas de amostra e solvente, acelerando o processo de descoberta de novas substâncias (LANG et al., 2008), e permite a comparação com extratos de espécies dentro de um mesmo gênero, bem como a diferenciação de extratos de diferentes partes vegetais de uma mesma planta (QUEIROZ E HOSTETTMANN, 2006).

Os estudos de desreplicação envolvem o uso de técnicas analíticas hifenadas, que alia uma técnica de separação com técnicas que forneçam dados espectroscópicos ou espectrométricos, tais como CLAE-UV-DAD (Cromatografia Líquida de Alto Eficiência com Detecção de Ultravioleta), CLAE-EM (Cromatografia Líquida de Alto Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas), CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplado à Espectrometria de Massas) e CLAE-RMN (Cromatografia Líquida de Alto Eficiência acoplado à Ressonância Magnética Nuclear) (OLIVEIRA, et al, 2016; QUEIROZ E HOSTETTMANN, 2006, WOLFENDER et al., 2015).

Dentre as técnicas de separação, destaca-se a CLAE, como uma técnica versátil e que tornou-se a mais utilizada para o isolamento de substâncias a partir de matrizes complexas como

os extratos de plantas, sendo que as informações estruturais são limitadas ao tipo de detector acoplado ao cromatógrafo (QUEIROZ E HOSTETTMANN, 2006).

Dentre os detectores, o uso de detectores do tipo UV-DAD permite que a substância eluída seja analisada por UV-Vis, obtendo o espectro que poderá ser armazenado e posteriormente comparado com uma biblioteca de padrões de substâncias, permitindo assim a identificação do pico. Isto fornece informações valiosas sobre as subclasses das substâncias, como por exemplo o padrão de oxigenação de polifenóis. Outra grande vantagem, é que os cromatogramas podem ser analisados em diferentes comprimentos de onda ($\lambda_{\max}$), permitindo que a detecção seja feita no $\lambda_{\max}$ da substância. Tudo isto, torna o cromatograma uma espécie de “impressão digital da amostra” (ANDERSEN E MARKHAM, 2006; DUCREY et al., 1995; QUEIROZ E HOSTETTMANN, 2006).

O uso de detectores como o espectrômetro de massas fornece grandes vantagens para a determinação estrutural, uma vez que fornece informações valiosas, como a massa exata das substâncias e as fragmentações das mesmas. Estes dados, podem ser comparados com padrões disponíveis em bibliotecas como: *Chapman & Hall's Dictionary of Natural Products*, *METLIN metabolite database*, *MoNA-DataBank*, *NORMAN-MassBank*, *Pubchem*, *Science Direct*, *Scifinder* e *Spectrabase* (ALLARD et al, 2016; OLIVEIRA, et al, 2016; WOLFENDER et al., 2015).

Várias metodologias de desreplicação foram elaboradas para diferentes frentes de estudo, como por exemplo, é possível identificar classes específicas de produtos naturais, como flavonoides glicoconjugados de *Adenocalymma imperatoris-maximilianii* (OLIVEIRA, et al, 2016) e flavonoides glicosídicos de treze espécies de *Epilobium* (DUCREY et al., 1995), ou mesmo triterpenos glicosilados de espécies de *Potamogeton* (WARIDEL et al., 2004) e pentacíclicos de *Vochysia pacifica* (WENIGER et al., 2005).

2.4 A FAMÍLIA FABACEAE LINDL

Fabaceae ou Leguminosae, é uma família que pertence à ordem das Fabales, e é conhecida por produzir frutos do tipo legume, dentre dos quais vagens, ervilha e feijão. Apresenta grande importância econômica, sendo usada em forrageamento, marcenaria, pesticida, corante, gomas e óleos, além do uso ornamental (FERNANDES E GARCIA, 2008; GOMES et al. 2017).

É a terceira maior família das Angiospermas no planeta, com 946 gêneros e 24505 espécies (THEPLANTLIST, 2019), e a maior família botânica do Brasil, que abriga 2845

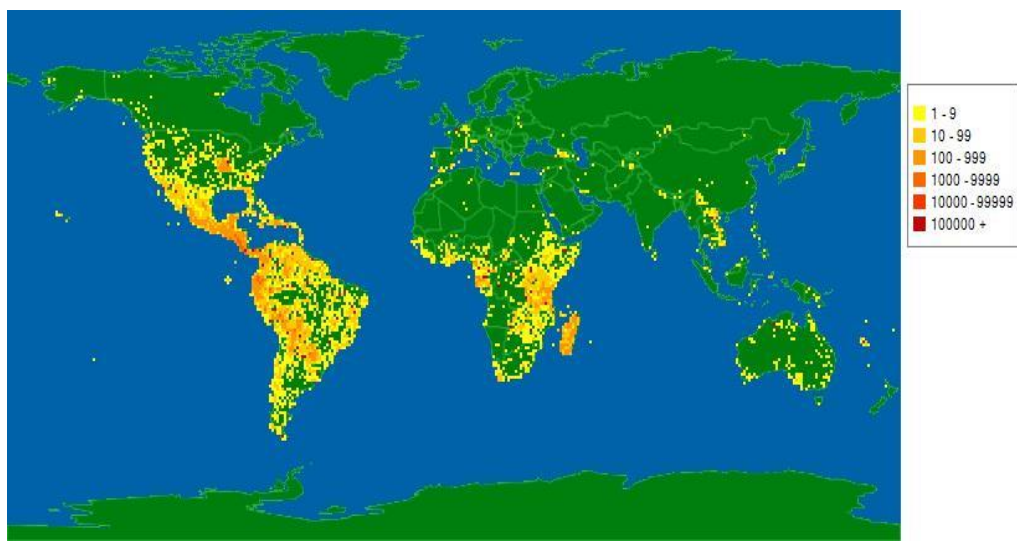
espécies agrupadas em 222 gêneros. Apresenta-se de forma variada, podendo ser arbusto, árvore, erva, liana/volúvel/trepadeira, subarbusto. Tem ocorrência nos seguintes domínios fitogeográficos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal (FLORADOBRASIL, 2019). O estudo fitoquímico da Fabaceae tem se tornado essencial para contribuir com a identificação das classes químicas destas espécies, uma vez que esta família é reconhecida pelo número de ocorrências de flavonoides e isoflavonoides em suas espécies. Além de serem responsáveis pela produção de aproximadamente 28% dos flavonoides conhecidos no reino vegetal. (HEGNAUE & GRAYER-BARKMEIJER, 1993; GRAYER & KOKUBUM, 2001)

Esta família está dividida em 3 subfamília: Caesalpinioideae com cerca de 2.250 espécies, Mimosoideae com 3.270 espécies e a Papilionoideae com 13.800 (DI STASI E HIRUMI-LIMA, 2002).

2.4.1 *Diplotropis* Benth

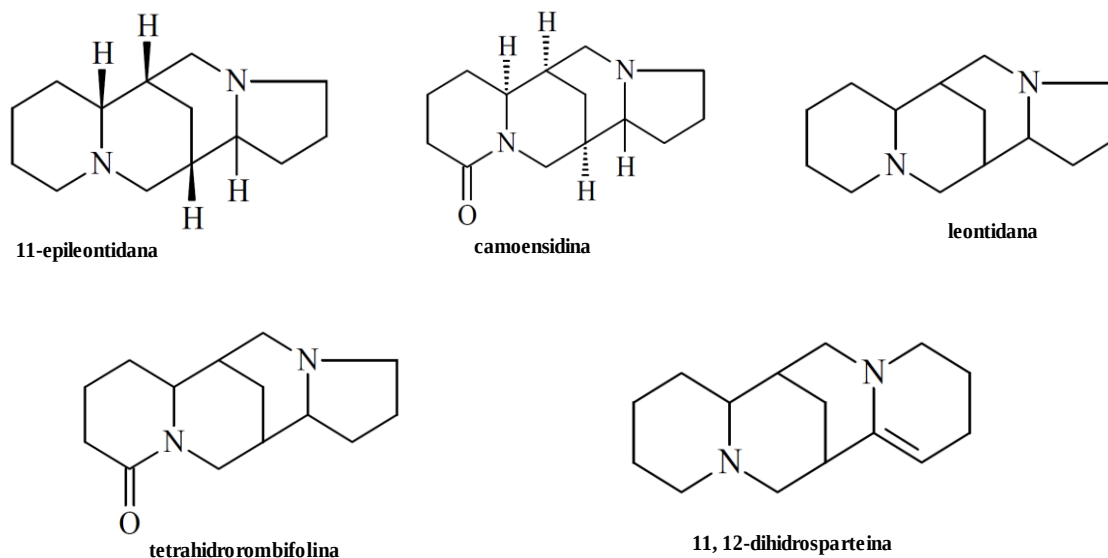
Diplotropis Benth é um gênero da família Fabaceae, que possui 13 espécies, de acordo com o banco de dados The Plant List (2018). Suas árvores são nativas, produtoras de excelente madeira e com distribuição exclusivamente Neotropical. No Brasil está presente em todos os estados da região Norte, Sudeste e em alguns estados do Nordeste (**Figura 7**). (LIMA, 1985; REFLOORA, 2018; THEPLANTLIST, 2018).

Figura 7: Distribuição de espécies de *Diplotropis* pelo mundo



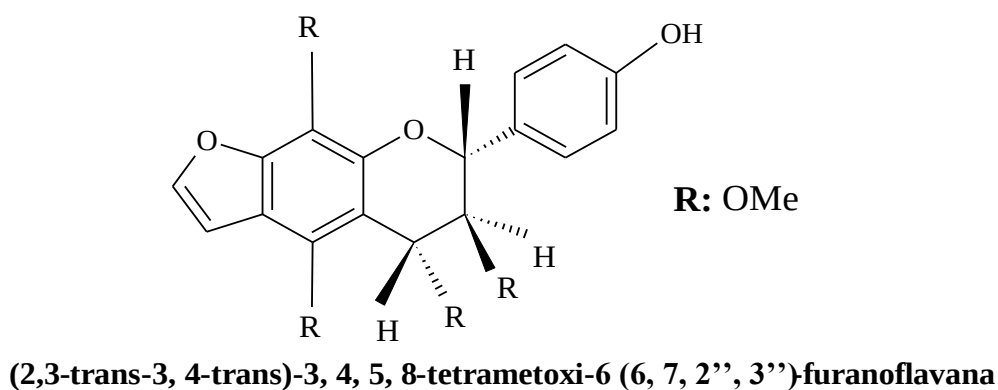
As espécies de *Diploptropis* foram pouco estudadas do ponto de vista químico, existindo apenas 5 relatos de estudos fitoquímico na literatura. De *D. martiusii* (KINGHORN et. al 1982), foram isolados de alcaloides quinolizídicos (**Figura 8**).

Figura 8: Alcaloides quinolizídicos de *D. martiusii*



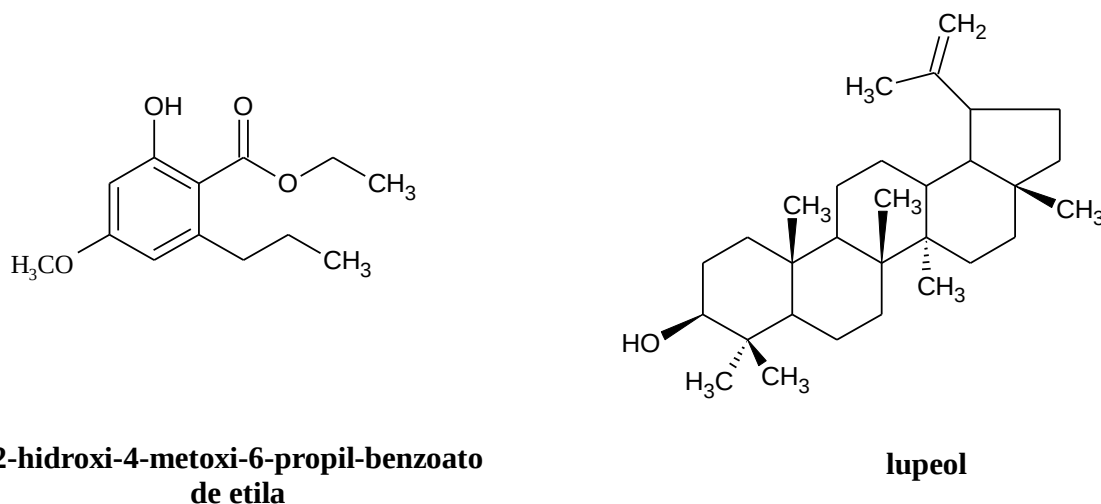
Do extrato etanólico das cascas do caule de *D. ferrugínea* (LIMA et al., 2005), foi isolado uma furanoflavona, (2,3-trans-3, 4-trans)-3, 4, 5, 8-tetrametoxi-6 (6, 7, 2'', 3'')-furanoflavana, com ação espasmolítica (**Figura 9**).

Figura 9: Furanoflavona de *D. ferruginea* FONTE: (KINGHORN et. al 1982)



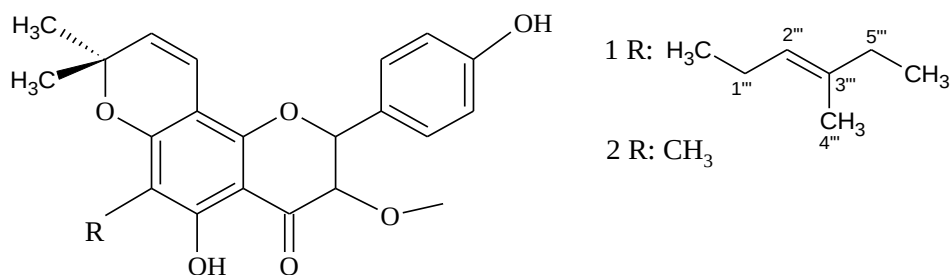
E também do extrato etanólico das cascas do caule de *D. ferrugínea* (ALMEIDA et. al 2005), foram isolados o derivado fenólico 2-hidroxi-4-metoxi-6-propil-benzoato de etila e o triterpeno lupeol (**Figura 10**).

Figura 10: Substâncias isoladas de *D. ferrugínea*



Do extrato etanólico das cascas do caule de *D. ferrugínea* (ALMEIDA et. al 2005), foram isolados duas novas flavonas: 3-metoxiflavona (trivialmente conhecida como diploflavona) e 3-metoxi-6-*O*-prenil-6'',6''-dimetilcromeno-(7,8,2'',3'')-flavona (**Figura 11**).

Figura 11: Flavonas de *D. ferrugínea*



1 R: 3-metoxiflavona

2 R: 3-metoxi-6-*O*-prenil-6'',6''-dimetilcromeno-(7,8,2'',3'')-flavona

2.4.2 *Diploptropis purpurea*

Conhecida popularmente como fava, sucupira, sucupira-preta, sebipira entre outros. Na medicina popular, é usada na forma de uma pasta feita da mistura das sementes raladas com enxofre para o tratamento de impigem (STASI, HIRUMA-LIMA, 2002), *D. purpurea* (**Figura 12**) é uma árvore de grande porte, amplamente distribuída na Amazônia, característica de Terra Firme, podendo ser encontrada no Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Venezuela (FLORA DO BRASIL, 2018; SANTA, OKINO, 2007).

Sua madeira é forte e resistente ao ataque de fungos, é muito usada na construção. Há apenas um relato na literatura onde foi realizado um estudo dos constituintes químicos das cascas do tronco (**Figura 13**), com o isolamento dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol, o triterpeno lupeol, o pterocarpano (-)-maackiain [(6aR, 11aR)-3-hidroxi-8,9-metilenodioxipterocarpano], formononetina, liquiritigenina, isoliquiritigenina (4,2', 4'-trixidroxiflavona) (BRAZ-FILHO, 1972). E dos galhos (**Figura 14**) foram isolados os triterpenos lupeol, taraxerol e β -amirina (CURSINO, 2015).

Figura 12: Aspecto geral do ramo florido de *Diploptropis purpurea*.



Fonte: (STASI, HIRUMA-LIMA, 2002)

Figura 13: Flavonoides, esteroides e triterpeno isolados do tronco da *D. purpurea* (BRAZ-FILHO et al. 1973).

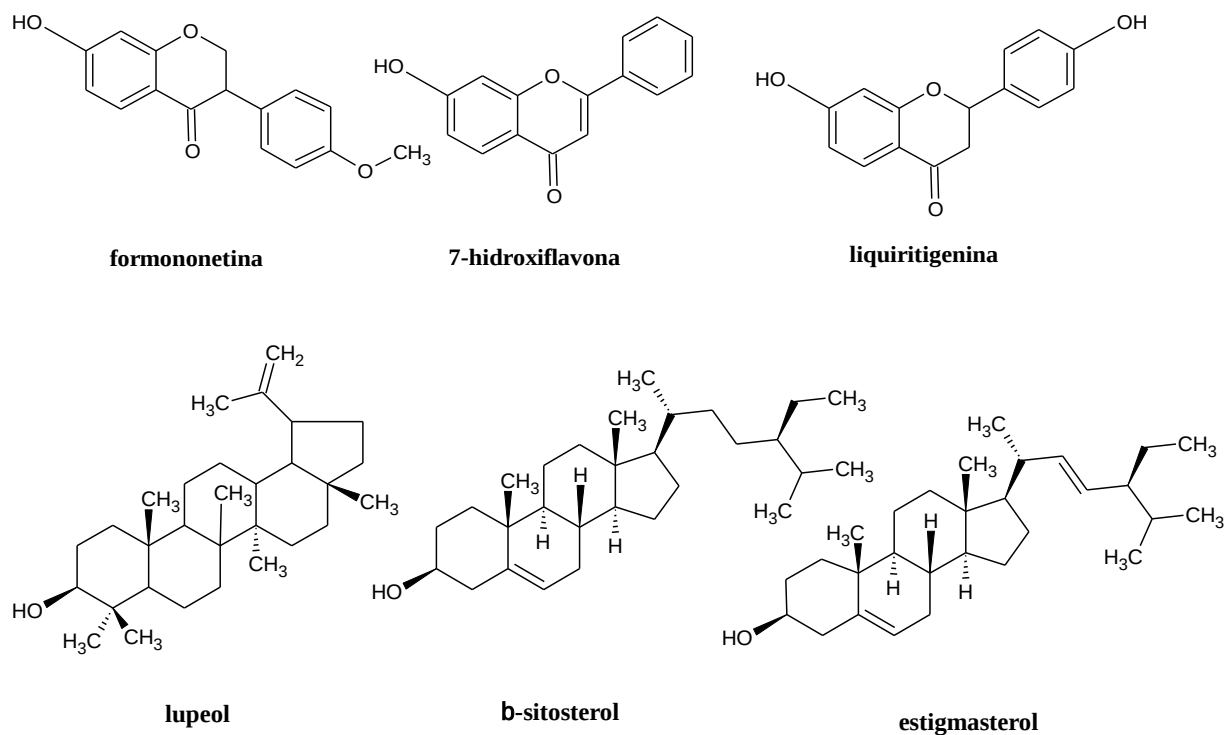
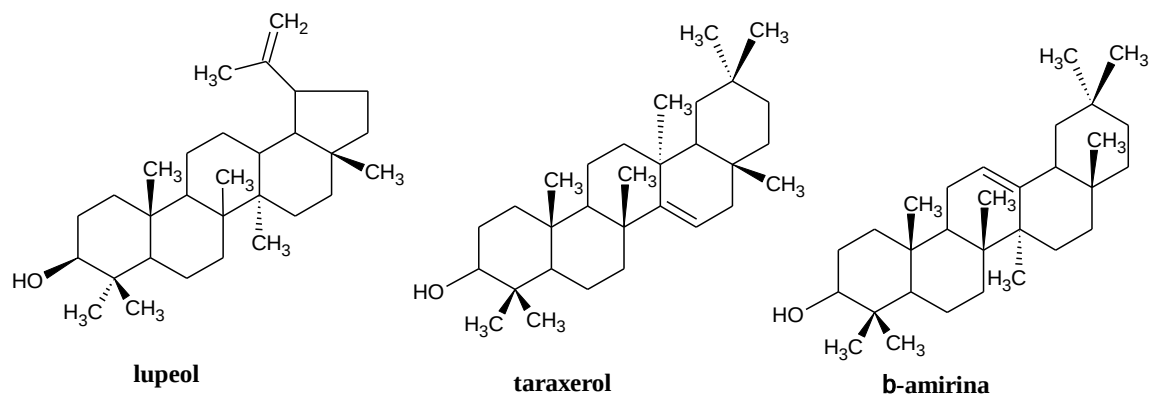


Figura 14: Substâncias isoladas dos galhos da *D. purpurea* (CURSINO, 2015)

CH₄



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Preparação de extratos vegetais e fases: Moinho de facas, banho Maria, banho de ultrassom e estufas da marca Tecnal ®, rota-evaporador (Fisatom ®), destilador de água (Elga ®), concentrador de amostra e liofilizador da marca Christ ®;

Fracionamento e caracterização dos extratos: colunas e demais vidrarias, placas cromatográficas e reagentes foram adquiridos de diferentes marcas;

Equipamentos: Cromatografo líquido de alta eficiência –Shimadzu ®; equipamento de Ressonância Magnética Nuclear –RMN, da marca Bruker Biospin Fourier 300, Espectrômetro de Massas, da marca Bruker Daltonics.

Ensaio biológicos: pipetas automáticas, vidrarias e reagentes de diversas marcas, leitor de Elisa (Thermo ®), espectrofotômetro (Femto ®), lupa (Olympus ®), estufa para ovos (Chocmaster ®), fluxo laminar (Pachane ®), BOD e *shakers* (Tecnal ®).

3.1.1 Softwares e banco de dados utilizados

Softwares: ACD *Labs*, *Chemdraw*, *Class-VP* e *Top Spin*;

Banco de dados: MoNA-DataBank, NORMAN-MassBank, *Pubchem*, *Science Direct*, *Scifinder* e *Spectrabase*.

3.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

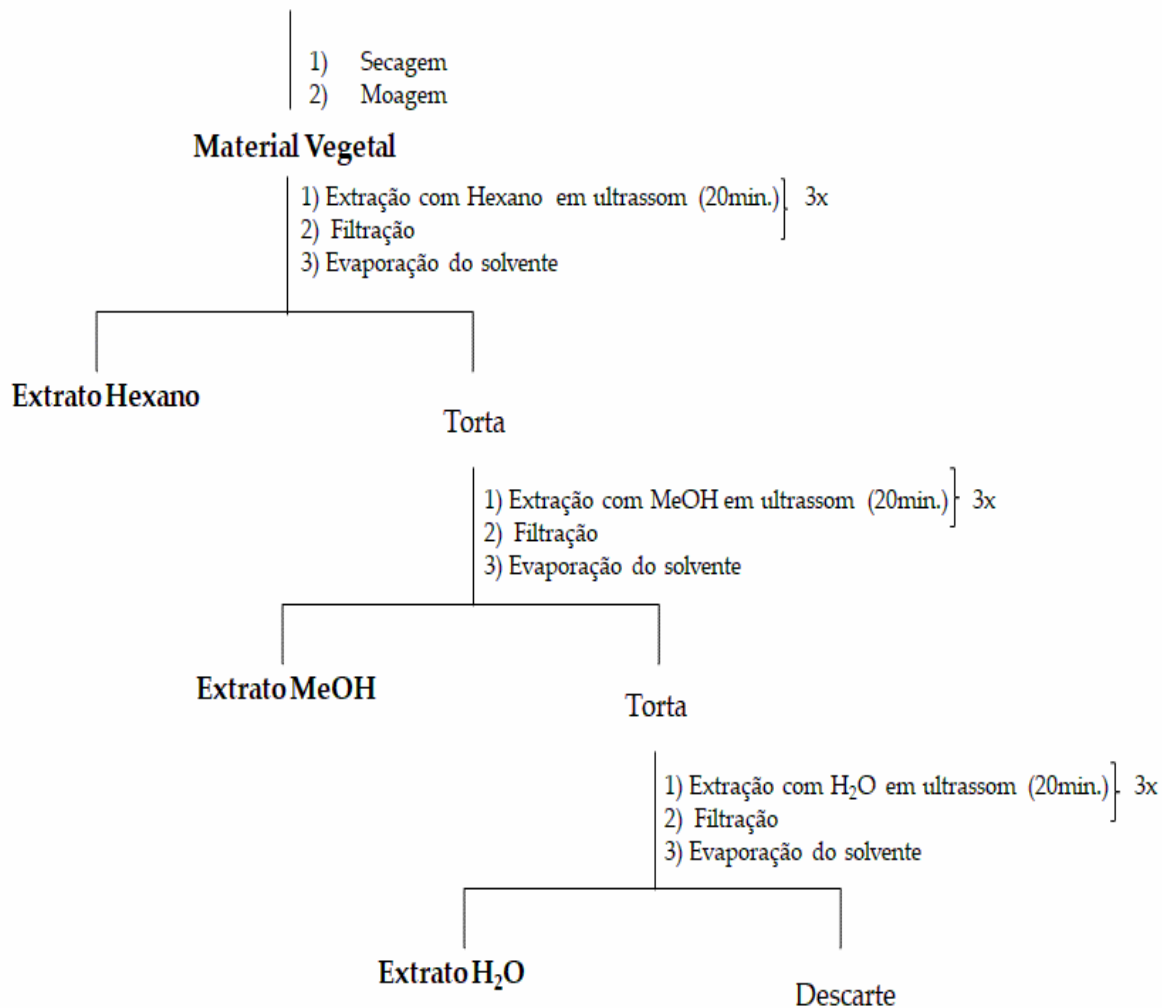
Folhas e galhos de *D. purpurea* foram coletados na Reserva Particular do Patrimônio Florestal (RPPN) Cachoeira da Onça, Presidente Figueiredo, AM em junho de 2009. A exsicata foi identificada pelo Prof. Dr. Valdely Kinupp e depositada no Herbário do Instituto Federal do Amazonas –IFAM, sob o número: 11230.

3.2.1 Preparação dos extratos vegetais

Folhas e galhos foram secos à temperatura ambiente durante 7 (sete) dias, e moídos em moinho de facas. Estes foram extraídos com Hexano, metanol (MeOH) e água (H₂O) em banho de ultrassom por 20 minutos, esse procedimento foi repetido por 3 (três) vezes para cada solvente, como sumariados no fluxograma da **figura 15**. Os extratos feitos em solvente orgânico foram concentrados em evaporador rotativo, e o aquoso foi seco em liofilizador.

Figura 15: Fluxograma da obtenção dos extratos

Coleta e identificação do material vegetal



3.2.2 Cromatografia em camada delgada

Os extratos obtidos foram analisados em cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando-se placas de sílica gel (fase normal e fase reversa) com indicador de fluorescência em matriz de lâmina de alumínio (Marcherey-Nagel e Merck®, Alemanha), para avaliar o potencial de separação dos eluentes empregados bem como indicador das classes dos constituintes químicos presentes em cada extrato. As amostras foram solubilizadas em solventes selecionados de acordo com a polaridade de cada extrato e aplicadas nas placas. A eluição ocorreu em cubas cromatográficas utilizando como fase móvel os sistemas de polaridades mais adequados para cada extrato.

Após eluição, as placas foram reveladas em uma Câmara da marca VILBER LOURMAT, modelo B.P. 66 TORCY – ZI. SUD equipada com luz UV (λ 254 nm e λ 365 nm), que é um método físico de revelação. Reveladores químicos também foram utilizados, tais como: iodo, soluções de sulfato cérico [$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$], anisaldeído sulfúrico, Cloreto férrico (FeCl_3), Cloreto de alumínio (AlCl_3) e NP/Peg para identificação das respectivas classes de substâncias. Os procedimentos para a preparação destas soluções seguem os procedimentos padrões do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia – LABB/INPA e são demonstrados a seguir:

- **Iodo:** as placas foram colocadas em uma cuba de vidro contendo iodo ressublimado. O aparecimento de manchas amarelas indica a presença de ligações duplas.
- **Solução de anisaldeído sulfúrico:** Misturou-se 0,5 mL de anisaldeído + 10 mL de ácido acético glacial + 85 mL de MeOH + 5 mL de H_2SO_4 concentrado. Este é um revelador universal, cores lilás e rosa indicam a presença de terpenos, e uma coloração avermelhada indica a presença de flavonoides.
- **Solução de cloreto férrico (FeCl_3):** Foram solubilizados 3g de cloreto férrico em 100 mL de álcool etílico. Esta solução revelará indícios da presença de compostos fenólicos.
- **Solução de cloreto de alumínio (AlCl_3):** Dissolveu-se 1 g de cloreto de alumínio em 100 mL de álcool etílico. Quando a placa foi borrifada, observou-se no UV 365 nm a intensificação da fluorescência, o que indica a possível presença de flavonoides.
- **Solução de difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol (NP/Peg):** Para o NP foram solubilizados 0,5 g de difenilboriloxietilamina a 1,0%, em 50 mL de MeOH, e para o

Peg solubilizou-se 2,5g de polietilenoglicol 4000 em 50 mL de MeOH. Após borrifar a placa, a mesma é irradiada com luz UV λ 365 nm, o aparecimento de fluorescência nas cores verde, azul, amarela e rosa atestam a presença de flavonoides de subclasses diferentes.

3.3 ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS DE *Diploptropis purpurea*

O extrato metanólico das folhas (8 g) foi submetido à partição com solventes em ordem crescente de polaridade, resultando em três fases: CH₂Cl₂ (300 mg), AcOEt (3 g) e MeOH/H₂O 1:1 (4,49 g). A fase AcOEt foi analisada em CCDC em vários sistemas de eluição e revelada com anisaldeído sulfúrico a qual apresentou manchas de cor marrom avermelhada e amarelo, característicos das proantocianidinas e flavonoides. Esta fase foi fracionada de três formas diferentes, e cada caminho forneceu substâncias diferentes, como descritos nos próximos itens (3.3.1, 3.3.2 e 3.3.3).

3.3.1 Primeiro fracionamento de uma alíquota da fase AcOEt das folhas de *D. purpurea*

Cerca de 3,5 g da fase AcOEt foi preparada para o fracionamento em coluna aberta, amostra foi solubilizada no primeiro sistema da coluna DCM/AcOEt 9:1, no entanto, ao se aplicar a amostra notou-se que a mesma ficaria com uma altura muito grande o que poderia afetar os pratos teóricos, optou-se por não aplicar toda a amostra, e esta primeira parte, cerca de 2,0 g de fase AcOEt foi fracionada em uma coluna aberta recheada com 106 g de Florisil ® (4,5 x 32 cm) da qual foram recolhidas 56 frações que foram avaliadas por CCDC, onde observou-se principalmente o indício de substâncias apolares, com bandasroxas em Anisaldeído sulfúrico nas frações iniciais.

As frações de 1-18 foram reunidas e fracionadas em coluna aberta de sílica, porém as frações oriundas desta coluna apresentavam grande quantidade de clorofila em CCDC, que se sobrepujava a outras substâncias de interesse. Numa tentativa de eliminar este interferente, as frações foram reunidas e refracionadas, desta vez em coluna aberta recheada com Poliamida (h x Ø= 28 x 1 cm) e eluída com misturas de MeOH/AcOEt/Hexano, foram recolhidas 40 frações desta coluna. A análise das frações por CCDC mostrou frações livres de clorofila, mas ainda em mistura muito grande, sendo assim, as frações de 3-11 (32 mg), foram reunidas e

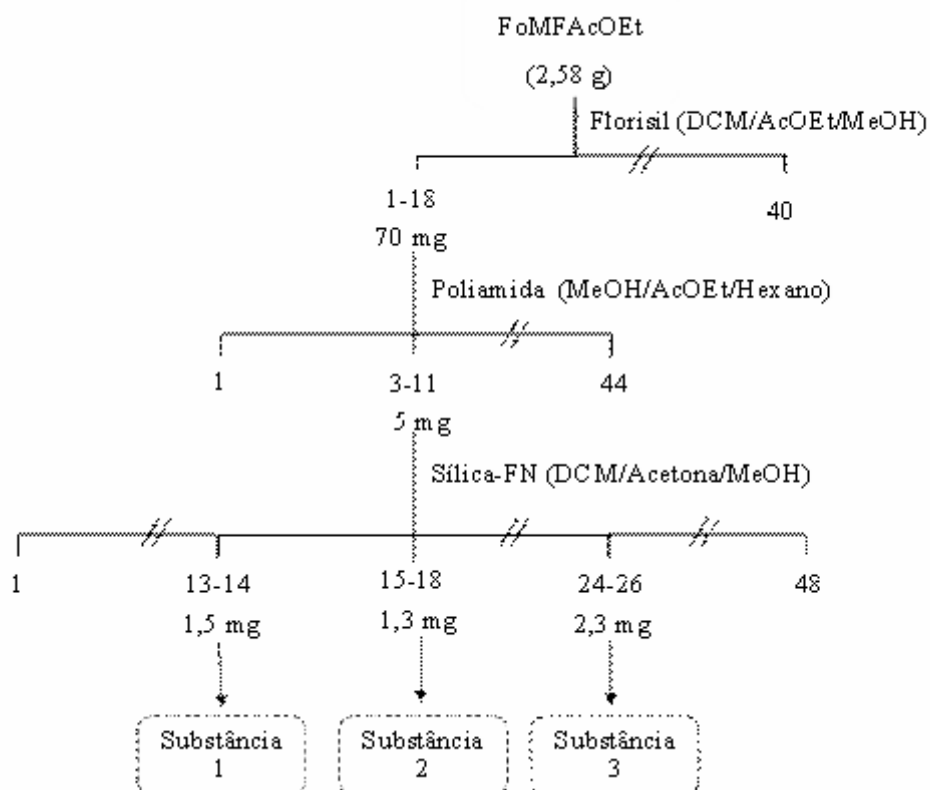
fracionadas em coluna aberta recheada com 3,5 g de sílica 230-400 mesh (h x Ø= 20 x 0,8 cm) e eluidas com misturas de Hexano/DCM/MeOH (Tabela 2).

Tabela 2. Sistemas de eluição do fracionamento das substâncias 1, 2 e 3

Sistemas	V(mL)	Frações
Hexano 100%	15	1-4
Hexano/DCM 9:1	15	5-10
Hexano/DCM 8:2	15	11-15
Hexano/DCM 7:3	15	16-20
Hexano/DCM 1:1	15	21-25
DCM 100%	15	26-30
DCM/MeOH 9:1	25	31-38
DCM/MeOH 1:1	15	39-42
MeOH 100%	15	43-48

Análises das frações por CCDC usando o sistema Hexano/DCM 7:3 evidenciaram a presença de frações com alto grau de pureza e foram comparadas com padrões de terpenoides presentes na extratoteca, algumas foram reunidas e enviadas para RMN de ^1H para confirmação das mesmas. Dessa coluna foram obtidas as substâncias 1, 2, 3, como descrito no fluxograma a seguir (Figura 16).

Figura 16: Primeiro fracionamento da fase AcOEt das folhas de *D. purpurea*



3.3.2 Segundo fracionamento com o restante da fase AcOEt das folhas de *D. purpurea*

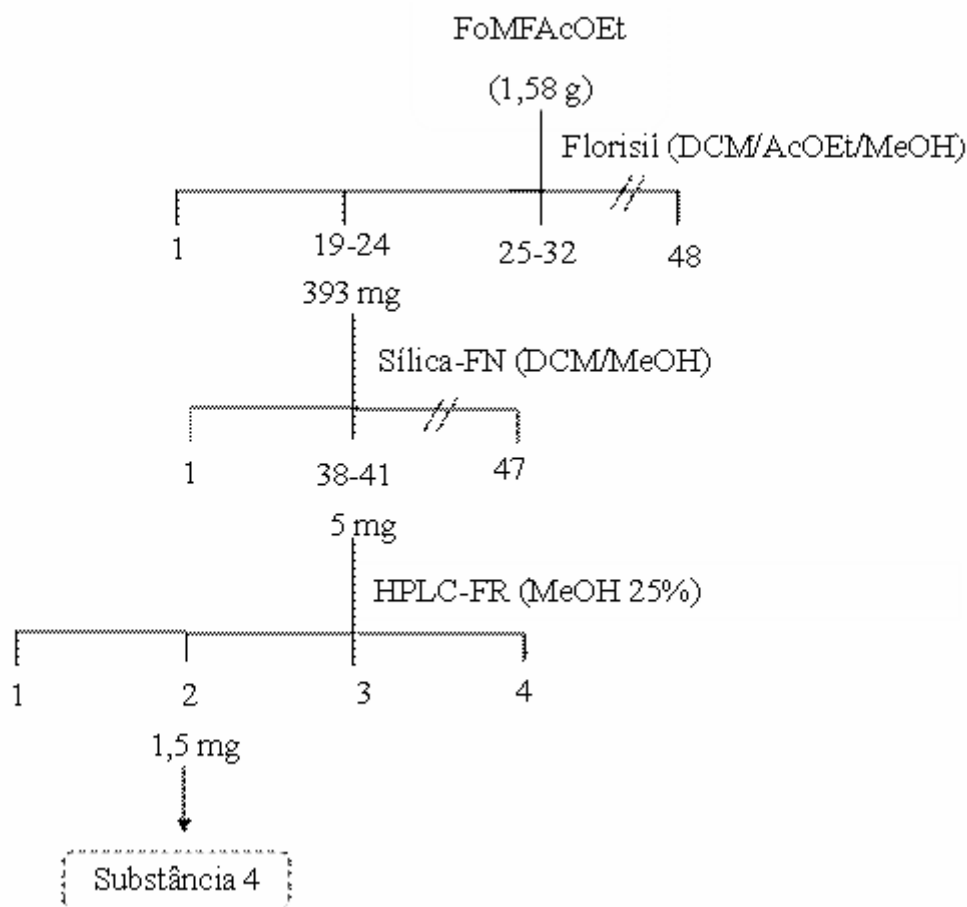
A parte restante que não foi usada no primeiro fracionamento foi aplicada em uma nova coluna sob as mesmas condições da coluna anterior. No entanto, essa segunda parte apresentou frações livres dos interferentes apolares, e quando revelas com NP/PEG, apresentaram colorações variando entre amarelo, azul, verde e rosa, características de flavonoides. As frações de 19-24 (393 mg) foram reunidas e fracionada em coluna aberta recheada com 39,3 g de sílica 230-400 mesh (h x d = 25 x 1,5 cm) e eluídas com misturas de DCM/MeOH até MeOH 100%, com um volume de 100 mL para cada eluente (Tabela 3)

Tabela 3. Sistemas de eluição da purificação da substância 4

Sistemas	Frações
DCM 100%	0 a 9
DCM/MeOH 98:2	10 a 18
DCM/MeOH 97:3	19 a 22
DCM/MeOH 95:5	23-30
DCM/MeOH 8:2	31-33
DCM/MeOH 7:3	33.2-36
DCM/MeOH 1:1	37-44
MeOH 100%	45-47

Foram coletadas 47 frações e dentre estas, as frações 38-41 apresentaram coloração marrom avermelhada quando reveladas com Anisaldeído. Essa fração foi analisada por CLAE-DAD e o perfil do cromatograma apresentou 4 frações principais. Essa fração foi purificada em CLAE sob fase reversa (Tabela 3), com coluna Luna-C18, utilizando-se um método isocrático de MeOH 25%, do qual foi possível isolar a substância 4 (**Figura 17**).

Figura 17: Segundo fracionamento da fase AcOEt das folhas de *D. purpurea*



3.3 Terceiro fracionamento da fase AcOEt das folhas

A partir da observação das duas primeiras colunas, optou-se por realizar uma limpeza na amostra, submetendo a mesma a uma nova partição, solubilizando a fase AcOEt em solução de MeOH/H₂O 1:1 e submetendo à partição com DCM 100%, gerando duas novas fases, que foram codificadas como 1, correspondente à fração apolar e 2 fração polar. A análise por CCDC-FN com revelador NP/PEG mostrou que a fração 2 possuía muitas substâncias fenólicas e livre dos interferentes apolares. A fração 2, foi fracionada em uma coluna aberta (h x d = 32 x 0,7 cm) utilizando sílica gel 230-400 Mesh (4 g) como fase estacionária na proporção de 1:100 para que o fracionamento fosse mais efetivo e eluída em diferentes em misturas de AcOEt e MeOH (Tabela 5) em um volume variando de 5 a 25 mL para cada mistura de gradiente, obtendo-se 32 frações.

Tabela 4. Sistemas de eluição do fracionamento das substâncias 5, 6, 7 e 8

Frações	Volume (mL)	Eluentes
1-6	15	AcOEt 100%
7-19	25	AcOEt/MeOH 9:1
24	10	AcOEt/MeOH 8:2
25	5	AcOEt/MeOH 1:1
26-32	20	MeOH 100%

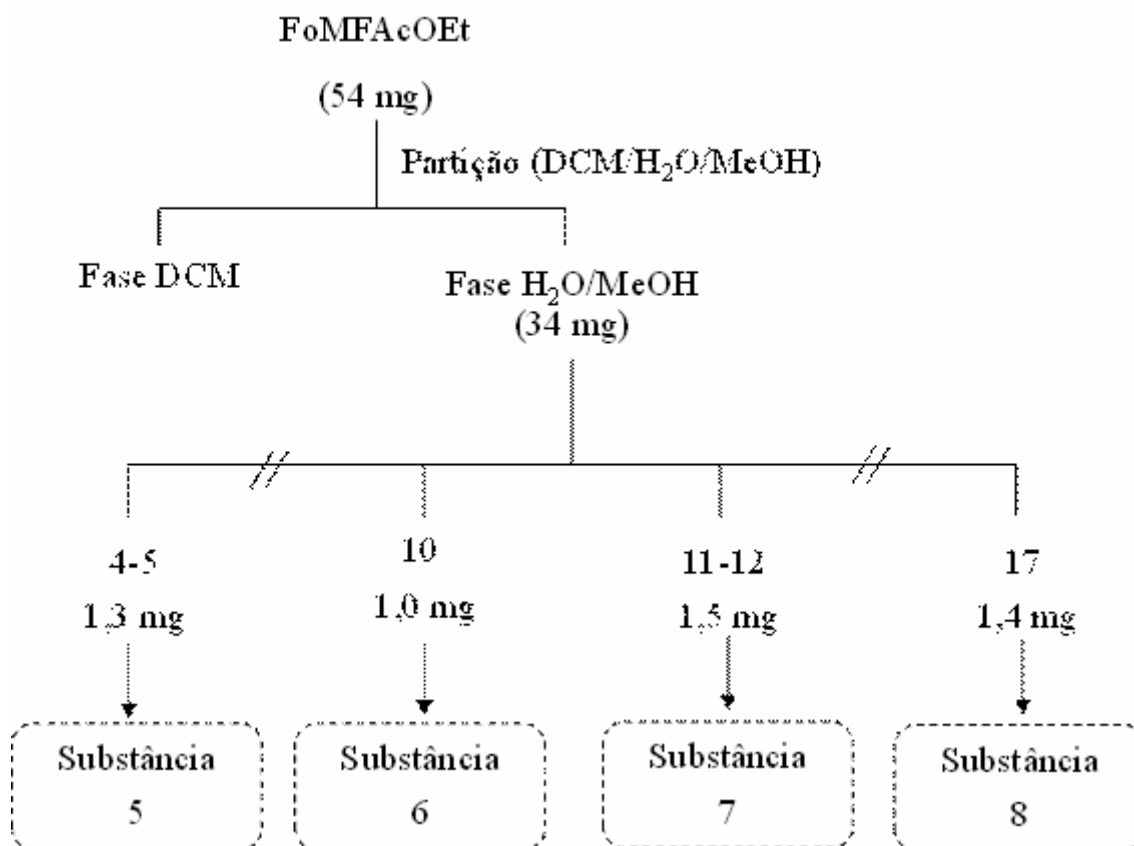
Com o objetivo de conhecer o perfil cromatográfico para a detecção de outras substâncias, as frações obtidas desta coluna foram submetidas à análise por CLAE-DAD monitorando em 254, 280 e 365 nm. Injetou-se 20 µL de cada fração (concentração de 1 mg/mL) em coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18 (250 mm x 4,60 mm e 5 micra), eluída sob as condições descritas na Tabela 6 com fluxo de 1 mL/min.

Tabela 5. Gradiente de eluição cromatográfica otimizado para análise das frações do terceiro fracionamento da fase AcOEt das folhas de *D. purpurea*

SOLVENTE A	SOLVENTE B	GRADIENTE	
H₂O + TFA 0.01%	ACN	Tempo (min)	%B
		0	50
		15	100
		30	100
		35	50

As frações 4-5, 10, 11-12 e 17 apresentaram um bom grau de pureza quando analisados por CCDC-FR e foram analisadas por HPLC e EM, puderam ser identificadas as substâncias 5, 6, 7 e 8 (**Figura 18**).

Figura 18: Terceiro fracionamento da fase AcOEt das folhas de *D. purpurea*



3.4 ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO METANÓLICO DOS GALHOS DE *DIPLLOTROPIS PURPUREA*

Cerca de 3 g do extrato metanólico dos galhos de *Diplotropis purpurea* foram submetidas à partição resultando em três fases: CH₂Cl₂ (300 mg), AcOEt (1,31 g) e MeOH/H₂O (1,49 g). Todas as frações oriundas deste fracionamento, bem como as frações oriundas de subseqüentes refracionamentos, foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) e reveladas com vapor de iodo, anisaldeído sulfúrico e sulfato cérico [Ce(SO₄)].

3.4.1 Fracionamento da fase DCM dos galhos de *Diplotropis purpurea*

A fase diclorometânica (300 mg) foi fracionada em coluna aberta (25,5 x 1 cm) de sílica gel (partículas de 230-400 mesh – ASTM, MERCK) sob sistema de eluição adequado. O volume de eluição foi de 100 mL do volume das frações recolhidas variando de 15 a 25

mL, resultando em 39 frações que foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCDC) e reunidas de acordo com as suas semelhanças químicas, sendo consideradas as manchas de coloração roxa e lilás em anisaldeído e marrons em $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ como indicativas de substâncias terpênicas.

As frações com mesmo R_f e apresentaram indícios de terpenos por CCDC foram escolhidas para continuar o fracionamento. Foram escolhidas as frações: fração 3-5 (33 mg), 8 (32 mg), 9 (10 mg), 10-11 (35 mg) e 12 (42 mg). Desta fase foram obtidas novamente as substâncias 1, 2 e 3. O processo de purificação destas substâncias está descrito abaixo (**Figura 19**).

A fração 3-5 (20 mg) foi fracionada em coluna aberta recheada com Sílica gel 230-400 mesh (h x Ø= 20 x 1 cm) e eluída com misturas de DCM/AcOEt/MeOH (Tabela 7), foram recolhidas 25 frações, da qual foi possível obter a substância 2.

Tabela 6. Sistemas de purificação da fração 3-5

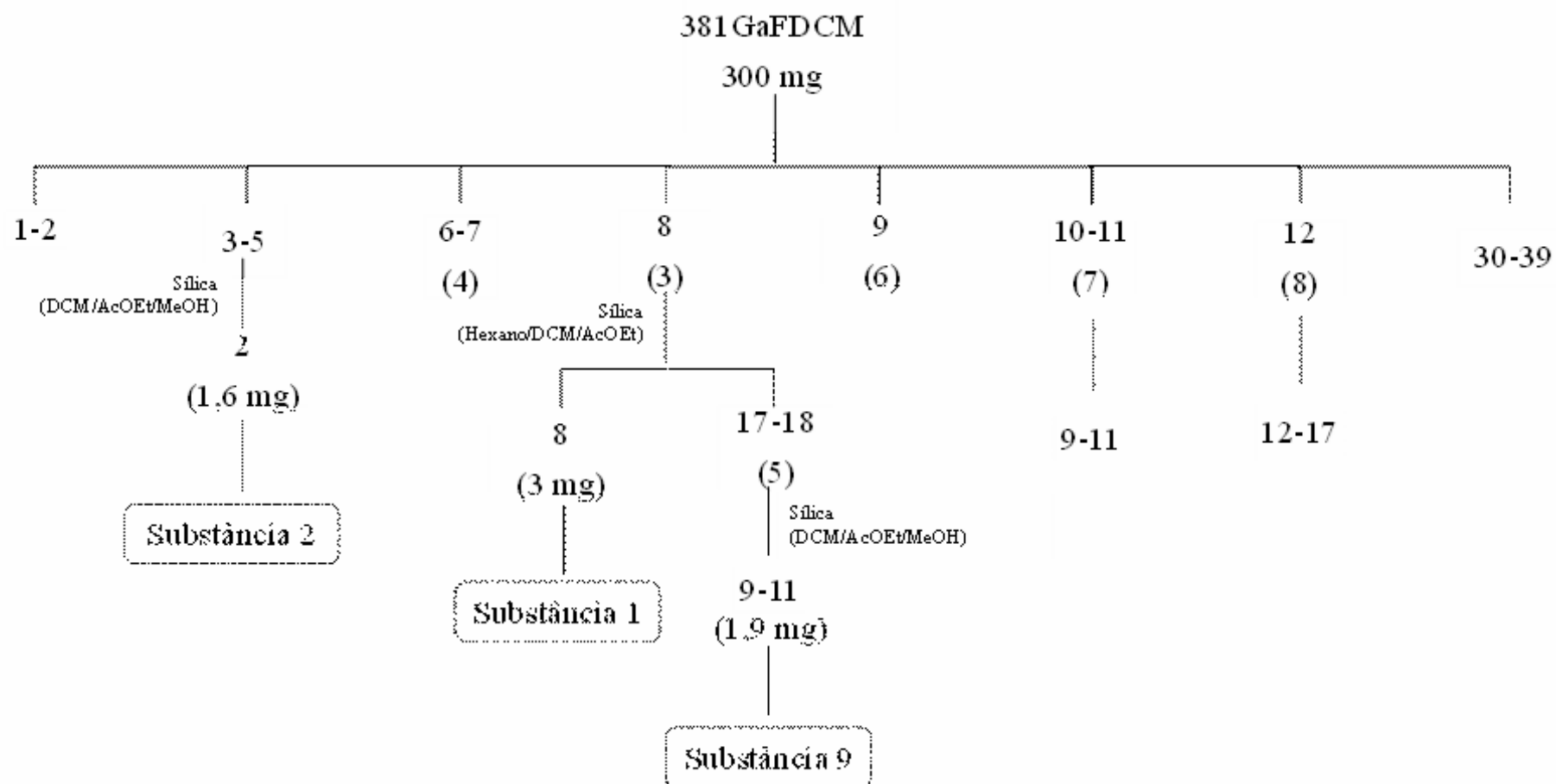
Sistemas	Frações
Hexano/DCM 3:7	01 a 2
DCM 100%	3
DCM/AcOEt 9:1	4
DCM/AcOEt 8:2	5 a 10
DCM/AcOEt 7:3	12 a 14
DCM/AcOEt 6:4	15 a 18
DCM/AcOEt 1:1	19 a 21
AcOEt 100%	22
AcOEt/MeOH 1:1	23
MeOH 100%	24

A fração 8 (50 mg) foi refracionada em coluna aberta recheada com Sílica gel 230-400 mesh (h x Ø= 30 x 1 cm) e eluída com misturas de DCM/AcOEt/MeOH, foram recolhidas 46 frações, a fração 3 foi identificada como a substância 1. A fração 17-18 foi submetida à Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) eluída com DCM/AcOEt 9:1, da qual foi possível obter a substância 8.

Tabela 7. Sistemas de purificação da fração 8

Sistemas	Frações
DCM 100%	1 -8
DCM/AcOEt 9:1	9-14
DCM/AcOEt 8:2	15-20
DCM/AcOEt 7:3	21-25
DCM/AcOEt 6:4	26-30
DCM/AcOEt 1:1	31-35
AcOEt 100%	36-40
AcOEt/MeOH 1:1	41-45
MeOH 100%	46

Figura 19: Fluxograma do fracionamento geral da fase DCM dos galhos de *D. purpurea*

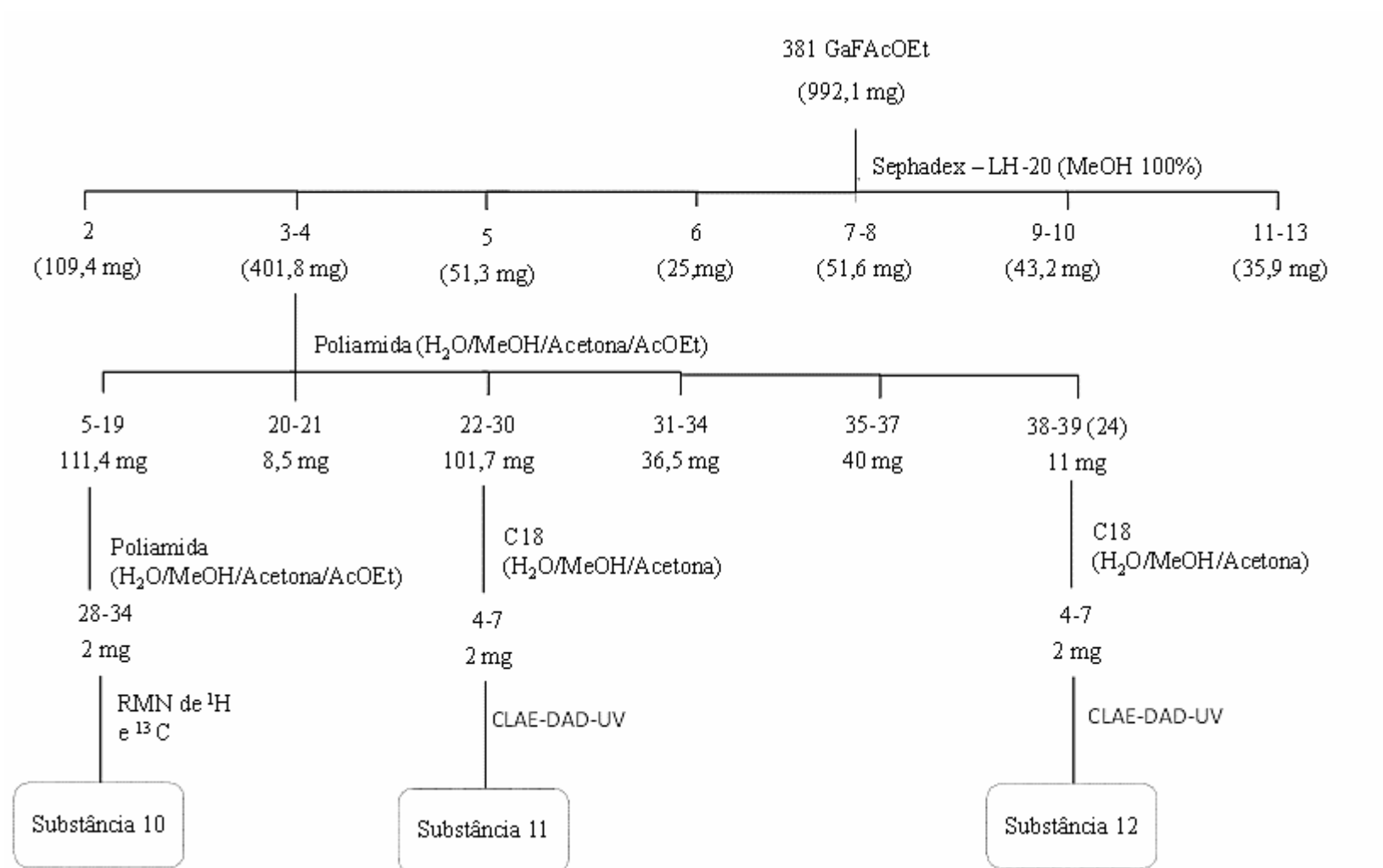


3.4.2 Fracionamento da fase AcOEt dos galhos

A fase AcOEt dos galhos (992,1 mg) foi fracionada em uma coluna aberta recheada com 70 g de Sephadex LH-20 ® (2,5 x 50 cm) e foi nomeada Dp 16. Foram recolhidas 14 frações desta coluna, estas foram avaliadas por CCDC e observou-se principalmente o indício de substâncias de alta polaridade (manchas vermelhas no anisaldeído e amarelo, verde e azul em NP/PEG), que em cromatoplasas de sílica de fase normal apresentavam rastros e grande quantidade de material retido na origem. As frações foram reunidas em 7 grupos para serem fracionadas: 2 (109,4 mg), 3-4 (401,8 mg), 5 (51,3 mg), 6 (25,4 mg), 7-8 (51,6 mg), 9-10 (43,2 mg) e 11-13 (35,9 mg).

A fração 3-4 (401,8 mg) foi fracionada em coluna aberta recheada com Poliamida (h x Ø = 30 x 1,5 cm) e eluída com misturas de MeOH/Acetona/AcOEt, foram recolhidas 57 frações desta coluna. As frações foram reunidas em 7 grupos a serem refracionados: 5-19 (111,4 mg), 20-21 (16,4 mg), 22-30 (101 mg), 31-34 (36,5 mg), 35-37 (40 mg), 38-39 (11,2 mg) e 41 (7 mg), como descrito no fluxograma da Figura 20.

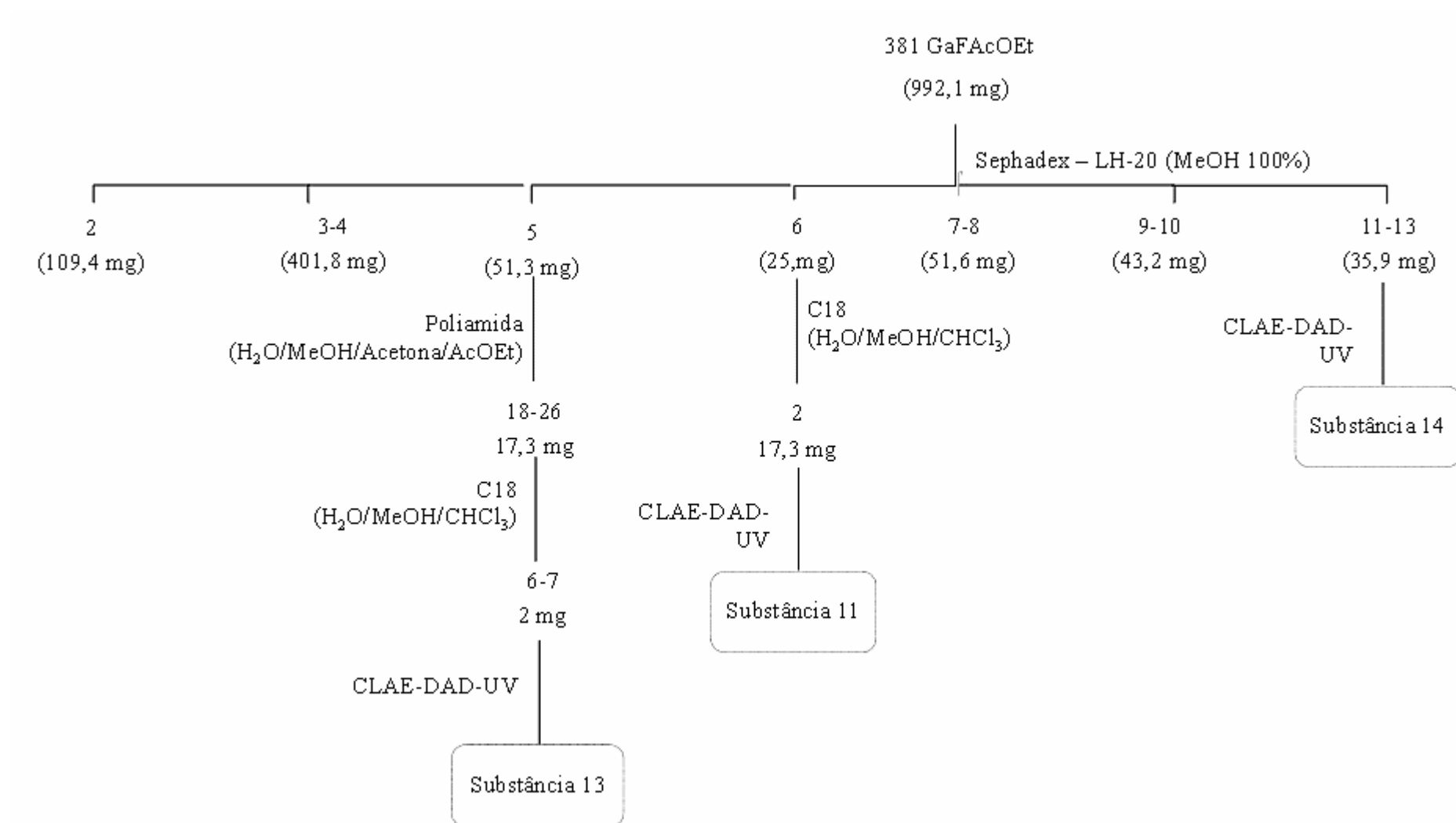
Figura 20: Fluxograma do fracionamento geral da fração 3-4



A fração 5 (51,3 mg) foi fracionada em coluna aberta recheada com Poliamida (h x Ø = 20 x 1,5 cm) e eluída com misturas de H₂O/MeOH/Acetona/AcOEt, foram recolhidas 57 frações desta coluna. As frações foram reunidas em 15 grupos a serem fracionados como descrito no fluxograma da Figura 21. A fração 18-26 (17,3 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico em CC utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C18) eluída em gradiente de H₂O/MeOH 95:5 até MeOH 100% fornecendo 10 sub-frações. A subfração 6-7 foi purificada em CLAE com coluna preparativa “Luna” Phenomenex fenilhexil (250 mm x 10 mm e 5 micra), em método isocrático com 80% de ACN, em fluxo de 4.6 mL/min, gerando a substância 13.

A fração 6 (25,3 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico em CC utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C18) eluída em gradiente de H₂O/MeOH 95:5 até MeOH 100% fornecendo 10 sub-frações. A subfração 2 caracterizada como a substância 11. A fração 11-13 mostrou-se como um sólido vermelho e quebradiço. O cromatograma mostrou um pico majoritário que foi caracterizado por LC/MS e caracterizado como a substância 14.

Figura 21: Fluxograma do fracionamento ds fase AcOEt dos galhos de *D. purpurea*



3.5 ESTUDO DAS FASES HIDROMETANÓLICAS DE FOLHAS E GALHOS DE *D. purpurea*

3.5.1 Procedimentos Cromatográficos Gerais

As fases hidrometanólicas de folhas e galhos foram submetidos foram analisadas por CCDC em vários sistemas eluentes, sendo empregando nesta análise comparativa, padrões fenólicos como substâncias de referência. As cromatoplasmas foram reveladas com NP/PEG e Anisaldeído, no entanto apresentaram rastros e grande quantidade de material retido no ponto de aplicação, mesmo testando vários sistemas de eluição. Assim, uma alternativa encontrada consistiu em realizar a extração em fase sólida (SPE). Nesta etapa, uma pequena massa (1 mg da amostra para cada 10 mg da fase de RP18) foi aplicada nos cartuchos SPE C-18.

O cartucho foi previamente ativado com MeOH (4 mL) e depois ambientado com H₂O (5 mL). O material a ser aplicado no suporte de SPE foi previamente solubilizado em aproximadamente 0,5 mL de MeOH com auxílio de ultra-som, sendo posteriormente adicionados 2 mL da solução H₂O/MeOH 8:2. A eluição nos suportes de C-18 obedeceu à seguinte ordem geral MeOH/H₂O 2:8 v/v, MeOH/H₂O 1:1 v/v e MeOH 100% (**Tabela 8**).

Tabela 8: Sistemas de eluição em SPE C-18

Sistemas	Frações
H ₂ O/MeOH 8:2	1
H ₂ O/MeOH 1:1	2
MeOH	3

A análise por CCDC mostrou melhor resolução ao longo das eluições com a presença de manchas de R_f's semelhantes aos das substâncias de referência, sugerindo maior concentração na fração eluída com H₂O/MeOH 8:2 v/v. Cada eluato foi solubilizado em H₂O/MeOH 8:2, na concentração de 1 mg/mL e filtrado em filtros PTFE 0,45 µm. Em seguida, alíquotas de 20 µL foram injetados em CLAE analítico. As análises cromatográficas foram feitas com a utilização de uma coluna de C18 e a fase móvel utilizada foi gradiente de ACN/H₂O, pois demonstrou maior aptidão de separação em CCDC-FR.

Durante a eluição dos componentes químicos presentes em cada extrato, o gradiente exploratório de 5-100% de ACN (**Tabela 9**) foi empregado na obtenção dos perfis cromatográficos dos extratos.

Tabela 9: . Condições de análise dos extratos por CLAE-DAD

SOLVENTE A	SOLVENTE B	GRADIENTE	
H₂O + TFA 0.01%	ACN	Tempo (min)	%B
		0	5
		50	100
		70	100
		75	5

As substâncias fenólicas foram identificadas através dos tempos de retenção e espectros de UV obtidos pela análise em CLAE-DAD, e pela comparação com o tempo de retenção de padrões autênticos (**Tabela 10**). A presença de substâncias como flavonoides, catequinas, taninos e derivados de ácido gálico pôde ser detectada com o auxílio do detector DAD realizando varredura na faixa espectral de 200-600 nm. Os flavonóides, fenólicos majoritários das frações analisadas, apresentam tipicamente duas bandas no espectro de UV, referentes aos anéis cinamoíla e benzoíla. O ácido gálico e seus derivados apresentam uma única banda intensa em 270 nm. As catequinas exibem no espectro de UV uma banda fraca em torno de 280 nm, um ombro próximo de 220 nm e máximo entre 205-210 nm.

Tabela 10: Padrões e seus respectivos tempos de retenção e massa molecular utilizados nas análises em CLAE-DAD

Substância padrão	Tempo de retenção (min)	MM
Quercetina	29,42	302
ácido clorogênico	16,55	354
Kaempferol	17,52	286
luteolina-4'- <i>O</i> -ramnosídeo	13,39	432
luteolina-3'- <i>O</i> -ramnosídeo	13,92	432
Apigenina	14,14	270
kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo	10,74	594
Catequina	12,52	290
Derricidina	10,4	308
3,5,4' trimetoxiestilbeno	6,2	270
4- metoxilonchocarpina.	8,6	336

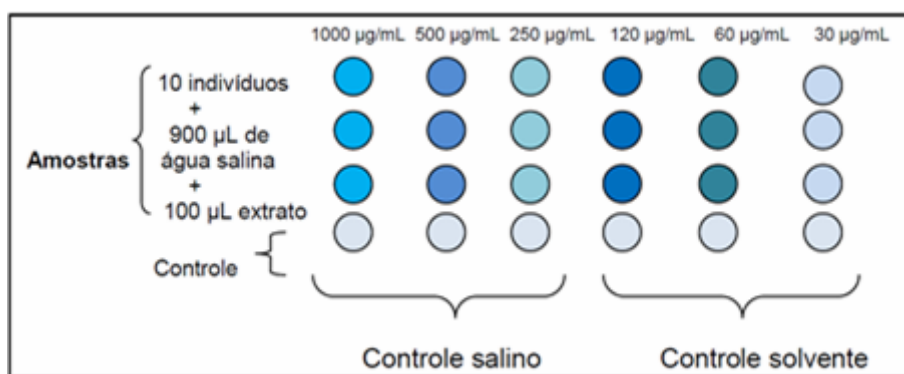
3.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS E QUÍMICOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia – LABB do INPA. Foram utilizadas amostras dos extratos, fases e substâncias isoladas de *Diploptropis purpurea*.

3.6.1 Toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

Para a realização deste ensaio, foi utilizado uma solução marinha de 3,8%, como meio de eclosão e crescimento, onde foram adicionados 10 mg dos cistos de *Artemia salina* nas seguintes condições de crescimento: temperatura entre 27 e 30 °C sob iluminação artificial durante 48 horas. Após o período de eclosão, 10 larvas foram transferidas para cada poço de uma placa de 24 poços. As amostras foram adicionadas nos poços em triplicata, nas concentrações de 1000, 500, 250, 125, 60 e 30 µg/mL. Também foram realizados os controles do meio salino (larvas de *A. salina* em meio salino) e do solvente (larvas de *A. salina*, solução salina e DMSO) (Figura 22). As placas com larvas de *A. salina* foram mantidas por 24 horas sob iluminação artificial. Após este período, foi avaliado o número de larvas sobreviventes nos poços de controle e nos poços de teste.

Figura 22: Esquema do ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina*



3.6.2 Ensaio antibacteriano

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima, foram usadas duas técnicas: difusão em ágar (CLSI, 2003) e microdiluição (CLSI, 2012).

Cepas: Foram utilizadas tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, de interesse clínico ou do agronegócio, tais como: *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606-143), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Edwardsella tarda* (ATCC 15947), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Morganella morganii* (ATCC 00082), *Nocardia brasiliensis* (ATCC 19296), *Salmonella enteritidis* (ATCC 6051), *Serratia marcescens* (ATCC 13880), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525).

Preparação do inóculo: Os microrganismos testes foram repicados em 10 mL de caldo Müeller-Hinton ou solução salina, posteriormente a suspensão foi incubada durante um período de 16 a 24 horas, para a reativação. Após turvação do caldo Müeller-Hinton (MH), foram preparadas as suspensões bacterianas, ajustando-se a turbidez da cultura com solução salina estéril ou caldo, a concentração do inóculo foi padronizada comparando a turbidez com a solução padrão 0,5 da escala de McFarland, em espectrofotômetro (625 nm) obtendo-se uma absorbância entre 0,08 e 0,10, o que equivale a uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL.

Método de difusão em ágar: Os testes de atividade antimicrobiana dos extratos e frações foram realizados segundo as metodologias de cavidade-placa e microdiluição (CLSI, 2003). Os microrganismos testados foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura adequado através da técnica de *spread-plate*, onde são feitas cavidades circulares na placa. Em seguida, foram adicionados nas cavidades alíquotas dos extratos e fases nas concentrações de 1 mg/mL estabelecidas para cada bactéria. Utilizou-se como controle negativo dimetilsulfóxido (DMSO). Ao fim do período de incubação, procedeu-se a verificação da formação de halos de inibição de crescimento e em caso de atividade positiva, foi realizada a verificação do diâmetro do halo com auxílio de uma régua. Para análise do controle positivo, utilizou-se uma solução de oxitetraciclina (20 µg/mL). Para a mensuração da intensidade de atividade dos extratos, é utilizada a tabela 2 como base de relação ao tamanho do halo de inibição (em mm) correspondente:

Método de diluição em caldo: Para esta análise, o método utilizado foi o de microdiluição segundo orientações propostas por CLSI (2012). Os extratos foram primeiramente solubilizados em DMSO a 5%. Inicialmente foram adicionados em cada um dos poços (microplaca de 96 poços) 100 µL do meio de cultura e na primeira fila 100 µL da concentração inicial do extrato (2000 µg/mL) e posteriormente foram realizadas diluições seriadas sucessivas (microdiluição 1:2) obtendo-se concentrações variando entre 1000 a 15,6 µg/mL do extrato e em seguida foram adicionados 10 µL do inóculo (escala 0,5 de Mc

Farland), contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) diluída 20 vezes. Para o controle negativo foi utilizado 100 μ L de caldo mais DMSO (concentração final de 5%) e 10 μ L inóculo. Para o controle positivo foi utilizado o antibiótico Oxitetraciclina nas concentrações de 125 a 0,97 μ g/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata. Em seguida e antes da placa ser incubada à temperatura e tempo adequados para cada microrganismo, foi realizada uma leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm. Após o período de incubação foi realizada uma segunda leitura no espectrofotômetro (sob as mesmas condições iniciais) para determinação ou não do crescimento bacteriano.

3.6.3 Atividade antiangiogênica: método da membrana corioalantóica embrionária (CAM)

A avaliação da atividade antiangiogênica foi realizada conforme (Falcão-Bücker 2012), baseada na metodologia descrita por (NGUYEN et al. 1994). Para a realização destes experimentos foram utilizados ovos de galinha fertilizados (FC Cabocla III) adquiridos na Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Ovos fertilizados foram postos em uma incubadora automática e digital (Chocmaster®), na posição horizontal, à temperatura de 37,5 °C e sob umidade relativa do ar de 33%. Após 48 h de incubação, uma pequena janela de 5 mm de diâmetro foi aberta na casca, na região onde se localiza a câmara de ar do ovo para que uma quantidade de aproximadamente 3 mL de claras seja retirada para inibição da aderência dos embriões nas membranas ovulares. A quantidade de ovos é sempre em triplicata para cada tratamento e controles. Outra janela de 15 mm de diâmetro também foi aberta na região do ovo posicionada acima da região da membrana corioalantóica dos embriões, sendo após fechadas com fita isolante de cor preta para minimizar a perda de umidade. Os embriões permaneceram assim, sob incubação, por mais 72 h até a idade embrionária de 6 dias, quando um disco de metilcelulose (1,5%) embebido com 10 μ L de extratos nas concentrações de 1000 mg/mL, 500 mg/mL e 100 mg/mL diluídos com álcool etílico foram implantados sobre os vasos sanguíneos no terço externo da membrana corioalantóica. O orifício foi novamente fechado com a mesma fita. A incubação prosseguiu por mais 48 h, até a idade embrionária de 8 dias. Para a análise da atividade antiangiogênica a fita foi retirada e os dados referentes ao desenvolvimento embrionário e vascular na região de implantação do disco foram registrados com uma câmera fotográfica para posterior contagem de vasos sanguíneos que interceptam o disco e vasos presentes na vizinhança em uma área de 0,9 cm². Os resultados foram expressos como percentual de vasos $\pm$ desvio-padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS DE *D. PURPUREA*

Nesta etapa foram avaliados os rendimentos de cada extrato de folhas e galhos de *D. purpurea*. Para a otimização do processo de extração, foi utilizado o método de cavitação por ultrassom, e a escolha dos solventes extratores foi feita considerando a afinidade das substâncias de interesse com os solventes selecionados. Após obter-se o extrato seco, calculou-se o rendimento total dos extratos, de acordo com a fórmula: $Re = (P_{ext} / P_{MV}) \times 100$, onde: Re = Rendimento total do extrato (%); P_{ext} = Peso do extrato seco (g); P_{MV} = Peso do material vegetal seco e moído (g). Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 11:

Tabela 11: Rendimentos dos extratos de *D. purpurea*

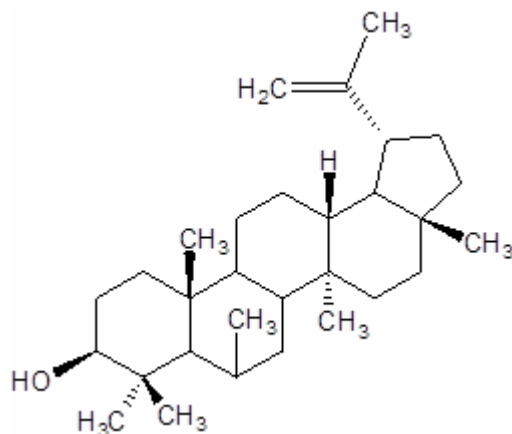
Parte vegetal	Solvente Extrator	Massa do Material Vegetal (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento %
Folha	Hexano	806,9	1,4	0,17
	MeOH	789,1	9,5	1,2
Galho	Hexano	500,1	2,2	0,43
	MeOH	494,3	36,2	7,32

4.2 ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS DE *Diploptropis purpurea*

Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram promissora atividade antibacteriana de *D. purpurea* frente às bactérias *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus* e *Providencia rettgeri*. Na análise inicial realizada por CURSINO (2015), apenas os extratos DCM de folhas e galhos foram investigados com êxito, do qual foi possível isolar os triterpenos lupeol, taraxerol e β -amirina. Portanto, neste trabalho optou-se por investigar as fases AcOEt e hidrometanólicas de folhas e galhos. O estudo químico do extrato metanólico das folhas de *D. purpurea* permitiu a caracterização de fenólicos e terpenoides já descritos na família Fabaceae, e de outros que estão sendo descritos pela primeira vez no gênero. Estas substâncias foram caracterizadas com base na comparação dos tempos de retenção (T_R) por CCDC, CLAE-DAD e pelos espectros de EM e RMN de ^1H e ^{13}C com a literatura e/ou banco de dados.

4.2.1 Substância 1

Figura 23: Estrutura do triterpeno lupeol



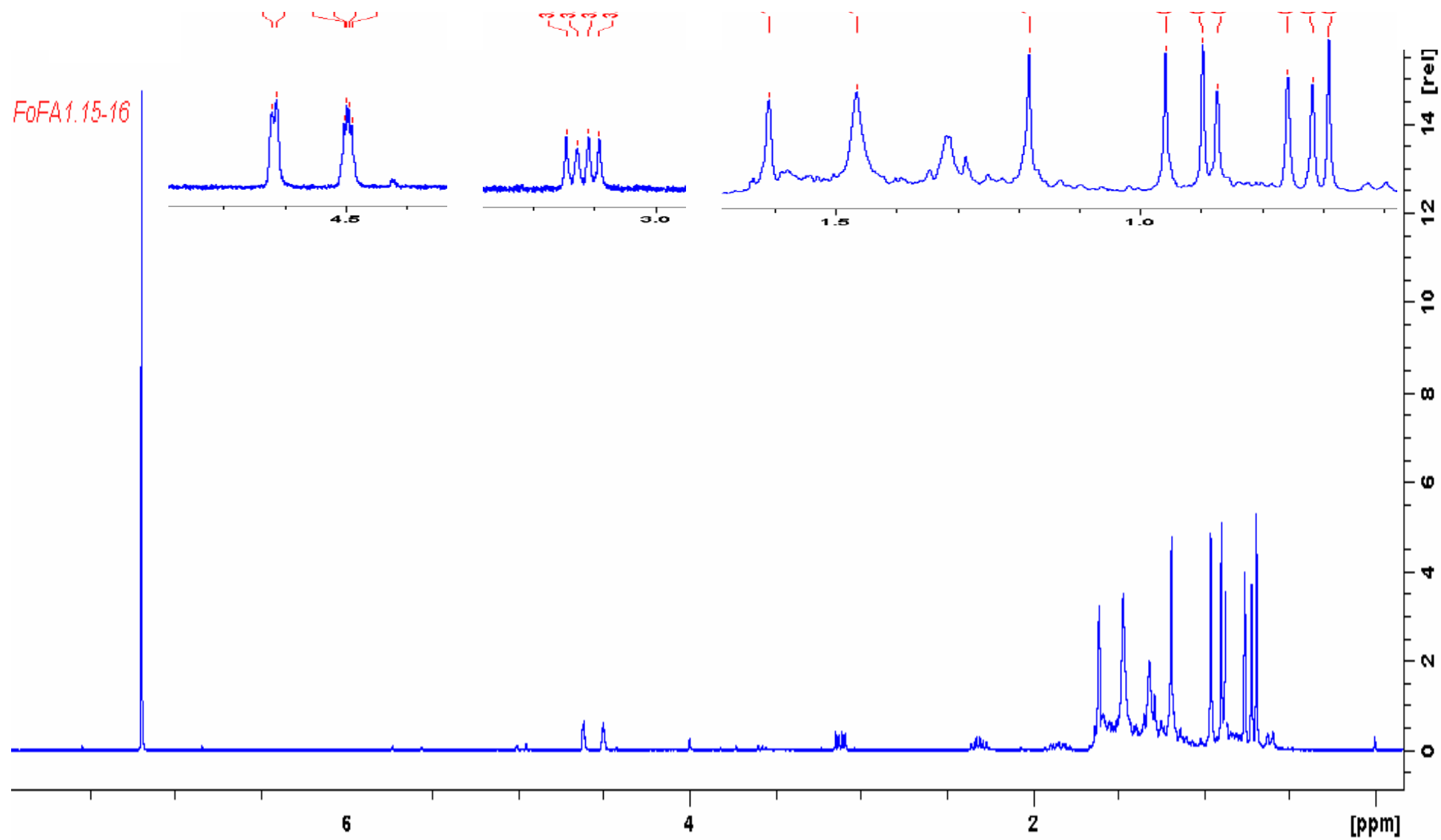
O triterpeno lupeol (**Figura 23**) mostrou-se bastante abundante em *D. purpurea*, sendo isolado em outros fracionamentos, como nas frações 8.8 (1,5 mg) da fase diclorometânica 2 22-30.48-52 (3 mg) da fase acetato de etila dos galhos. O lupeol é um fitoesteroide considerado como agente de múltiplos alvos, que exerce diversas atividades farmacológicas em diversas condições de doenças, tais como: inflamação, artrite, diabetes, desordens renais, hepáticas e cardiovasculares e baixa toxicidade (BEZERRA et al, 2018; SIDDIQUE E SALEEM, 2011).

A fração 1.15-16 da fase AcOEt das folhas, apresentou-se como um sólido amorfo branco, apresentou mancha roxa quando revelado com anisaldeído e R_f de 0,15 cm quando eluído com DCM 100%, quando comparado com os padrões disponíveis atestou a presença do triterpeno lupeol. Para a confirmação da substância, o mesmo foi analisado por RMN de ^1H (**Figura 24**), apresentando os seguintes sinais: 6 sinais de metilas entre δ_H 0,7 e 1,6 ppm, e também de um duplo duplete em δ_H 3,19 ppm (dd , $J=5,6$ e $5,4$ Hz), característico de hidrogênio carbinólico (H-3) de triterpeno. Sinais de hidrogênios mais desprotegidos em δ_H 4,49 ppm (dd , $J=2,4$ e $1,4$ Hz) e δ_H 4,61 ppm (d , $J=2,4$ Hz), os sinais e a comparação com a literatura estão disponíveis na **Tabela 12**.

Tabela 12: Sinais de RMN de ^1H da substância 1

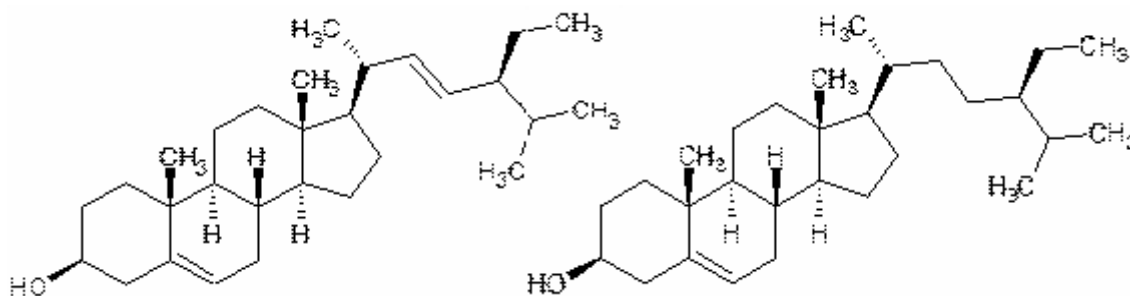
Posição	δ_{H} Observado	δ_{H} Literatura
H-29	4,61 (<i>d</i> , $J=2,4$ Hz)	4,69 (1H, <i>d</i> , $J = 2,4$)
H-29	4,49 (<i>dd</i> , $J=2,4$ e $1,4$ Hz)	4,56 (1H, <i>m</i>)
H-3	3,11 (<i>dd</i> , $J=5,6$ e $5,4$ Hz)	3,19 (1H, <i>dd</i> , $J = 10,8$ e $5,4$)
H-22	1,61 (<i>s</i> ; 1 H)	1,20 (1H, <i>m</i>)
H-12	1,46 (<i>s</i> ; 1 H)	1,07 (1H)
H-26	1,18 (<i>s</i> ; 1 H)	1,03 (1H, <i>s</i>)
H-15	0,95 (<i>s</i> ; 1 H)	0,99 (1H, <i>d</i> , $J = 2,1$)
H-25	0,89 (<i>s</i> ; 1 H)	0,83 (3H, <i>s</i>)
H-28	0,87 (<i>s</i> ; 1 H)	0,79 (3H, <i>s</i>)
H-24	0,75 (<i>s</i> ; 1 H)	0,76 (3H, <i>s</i>)
H-5	0,71 (<i>s</i> ; 1 H)	0,70 (1H, <i>s</i>)

Figura 24: Espectro de RMN de ^1H do lupeol em CDCl_3 , 300 MHz



4.2.2. Substâncias 2 e 3: estigmasterol e β -sitosterol

Figura 25: Estruturas do estigmasterol e β -sitosterol



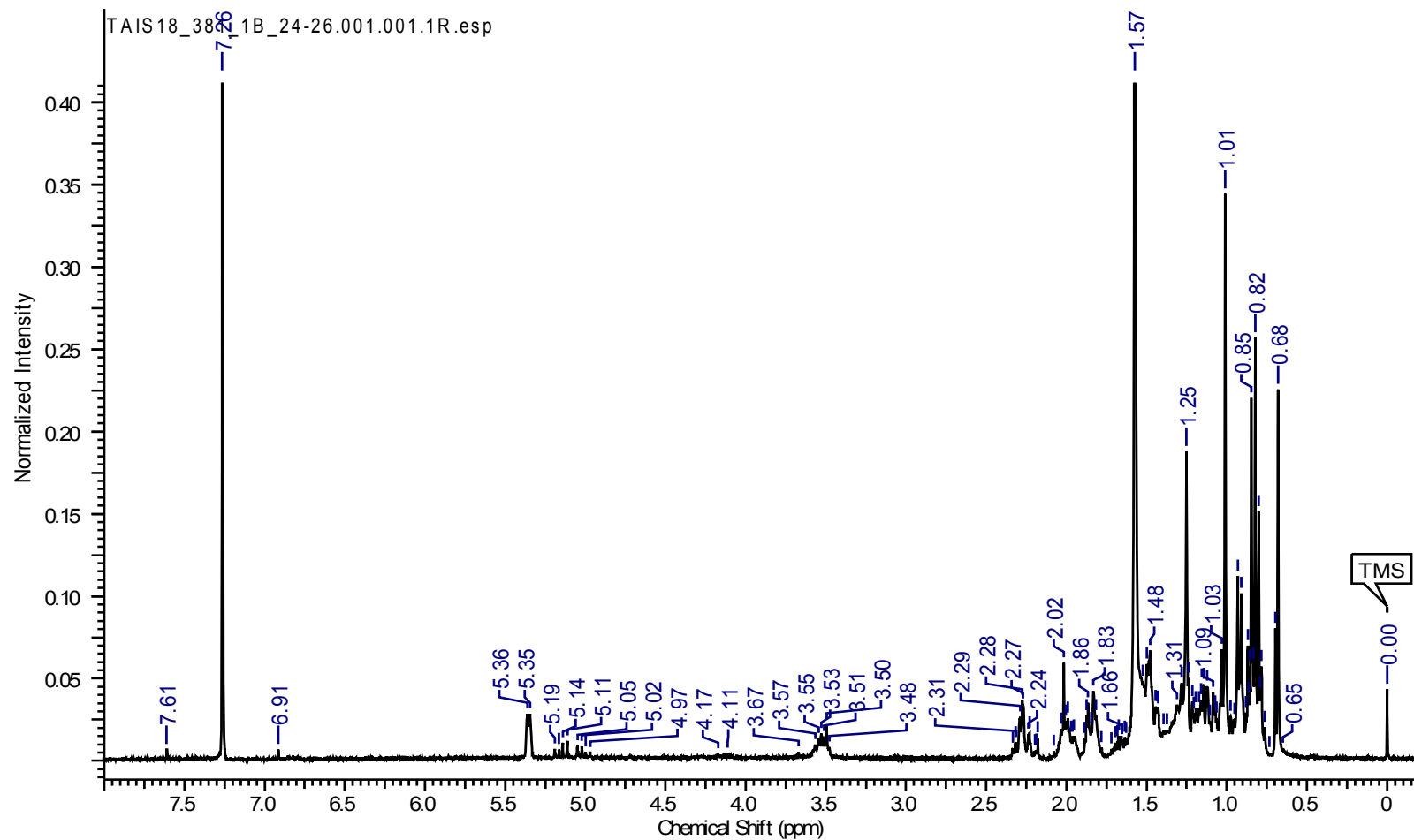
A fração 1.24-26 da fase AcOEt das folhas, apresentou-se como um sólido amorfo branco, foi identificado como a mistura das substâncias 2 e 3, respectivamente estigmasterol e β -sitosterol (**Figura 25**). Os mesmos foram identificados por comparação dos seus Rf's em CCDC com o Rf de padrões previamente isolados de outras espécies, e também pelos sinais de RMN de ^1H , que foram comparados com a literatura (JEFFREYS, 2015). Estes dois esteroides apresentam grande semelhança estrutural, diferindo apenas pela presença de uma ligação dupla entre os carbonos 22 e 23 do estigmasterol, e nos espectros de RMN de ^1H (**Figura 26**) essa pequena diferença é reconhecida pela presença de um duplo duplete em δ_{H} 5,08 ppm (H, *dd*, $J = 16,0$ e $8,3$ Hz) e outro em δ_{H} 5,01 ppm (H, *dd*, $J = 15,0$ e $9,0$ Hz) referentes aos hidrogênios H-22 e H-23 do estigmasterol. Além destes sinais, observa-se ainda no espectro de RMN de ^1H um duplete em δ_{H} 5,35 ppm (2H, *d*, $J = 5,2$ Hz) referente aos hidrogênios H-6 dos dois esteroides juntamente com o simpleto em δ_{H} 0,69 ppm, e ainda um multiplete em δ_{H} 3,53 ppm (2H, *m*, $J = 3,0$ Hz) referente aos hidrogênios H-3 de ambos os esteroides (Tabela 13).

Tabela 13: Sinais de RMN de ^1H das substâncias 2 e 3

Posição	δ_{H} Observado	δ_{H} Literatura
H-6	5,35 (2H, <i>d</i> , $J = 5,2$ Hz)	5,37 (2H, <i>d</i> , $J = 3,0$ Hz)
H-22	5,08 (H, <i>dd</i> , $J = 16,0$ e $8,3$ Hz)	5,16 (H, <i>dd</i> , $J = 15,0$ e $9,0$ Hz)
H-23	5,01 (H, <i>dd</i> , $J = 15,0$ e $9,0$ Hz)	5,01 (H, <i>dd</i> , $J = 15,0$ e $9,0$ Hz)
H-3	3,53 (2H, <i>d</i> , $J = 3,0$ Hz)	3,54 (2H, <i>m</i> , $J = 3,5$ Hz)
		0,69 (1H, <i>s</i>)

Estigmasterol e β -sitosterol são encontrados rotineiramente em pesquisas fitoquímicas, e tem sido investigado acerca do seu potencial citotóxico (O'CALLAGHAN et al., 2010), antiosteoartrítico (GABAY et al., 2010), antihipercolestrêmico (CHANDLER, HOOPER, ISMAIL, 1978), antitumoral, hipoglicêmico (JAMALUDDIN, MOHAMED, LAJIS, 1994), antimutagênico (RAVIKUMAR et al. 2010), antioxidante (AGATONOVIC-KUSTRIN, MORTON, ZAKARIA, 2018), antiinflamatório (GARCÍA et al. 1999) e efeitos sobre o SNC (VANMIERLO et al. 2015).

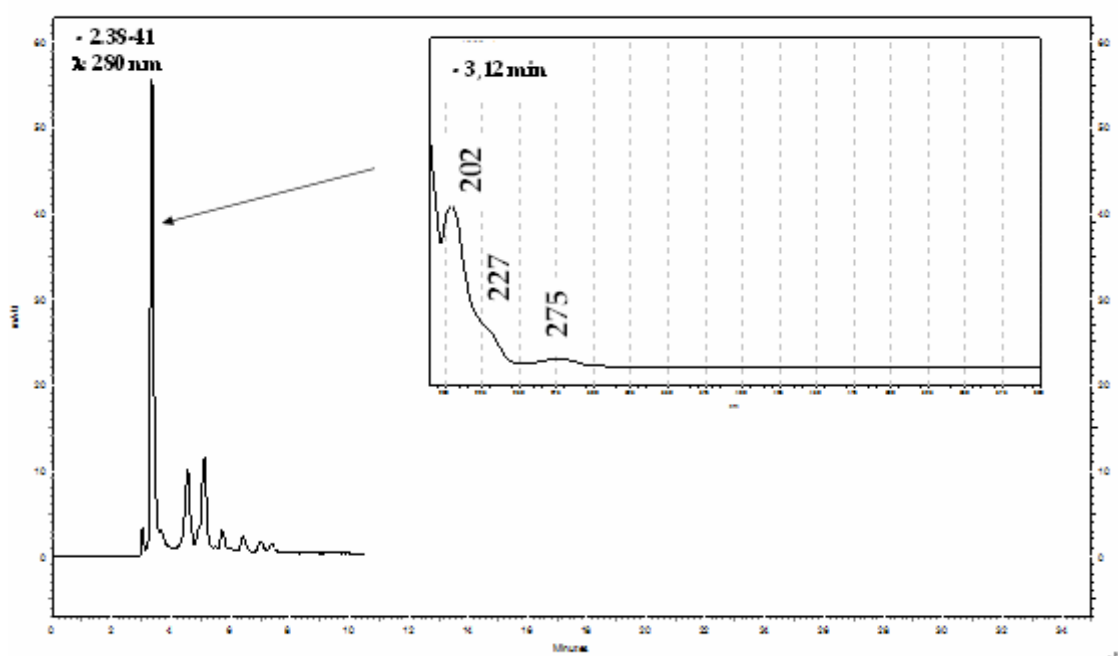
Figura 26: Espectro de RMN de ^1H da mistura de estigmasterol e β -sitosterol em CDCl_3 , 300 MHz



4.2.3 Substância 4

A fração 2.38-41 (10 mg), proveniente do segundo fracionamento da fase acetato das folhas, foi purificada por CLAE e forneceu uma fração (2.38-41.2, 2 mg) com aparência de um sólido vermelho e quebradiço, com $T_r=3,12$ min. O espectro de UV mostrou os $\lambda_{\max}$ 202, 227 e 275, característicos de catequinas monoméricas (**Figura 27**).

Figura 27: Cromatograma da fração 2.38-41 em coluna Luna C18 preparativa 250 mm x 10 mm, método isocrático 25% MeOH com TFA 0.01%, volume de injeção: 50 μ L, fluxo de 4,6 mL/min



No espectro de RMN de ^1H (**Figuras 28**), pode-se observar os seguintes sinais: Um simpleto em δ_{H} 9,20 ppm (1H), um simpleto largo em δ_{H} 8,96 ppm (1H), e um duplete em δ_{H} 8,86 ppm (1H), característicos de OH. Na região dos aromáticos, dois dupletos em δ_{H} 6,71 ppm (1H, $J=8,20$; H-5') e em δ_{H} 6,58 ppm (1H, $J=8,20$; H-6') que indicam o padrão de substituição *orto* do anel B pelo valor de $J=8,20$ Hz (**Figura 29**). Além destes, é possível observar um duplete em δ_{H} 5,68 ppm (1H, $J=2,20$; H-6) e outro duplete em δ_{H} 5,88 ppm (1H, $J=2,20$; H-8), que atestam o padrão de substituição *meta* do anel A (**Figura 30**). Os sinais de H-4_{anti, sin} são duplo dupletos com $J=16,20$ Hz (geminal) e 8,20 Hz (vicinais). Indicando a presença da (-)-catequina (**Figura 31**), a

confirmação da estrutura proposta, pode ser ratificada pelos mapas de contorno COSY, HSQC e HMBC.

Figura 28: Espectro de RMN de ^1H da substância 4 em $\text{DMSO-}d$ (300 MHz)

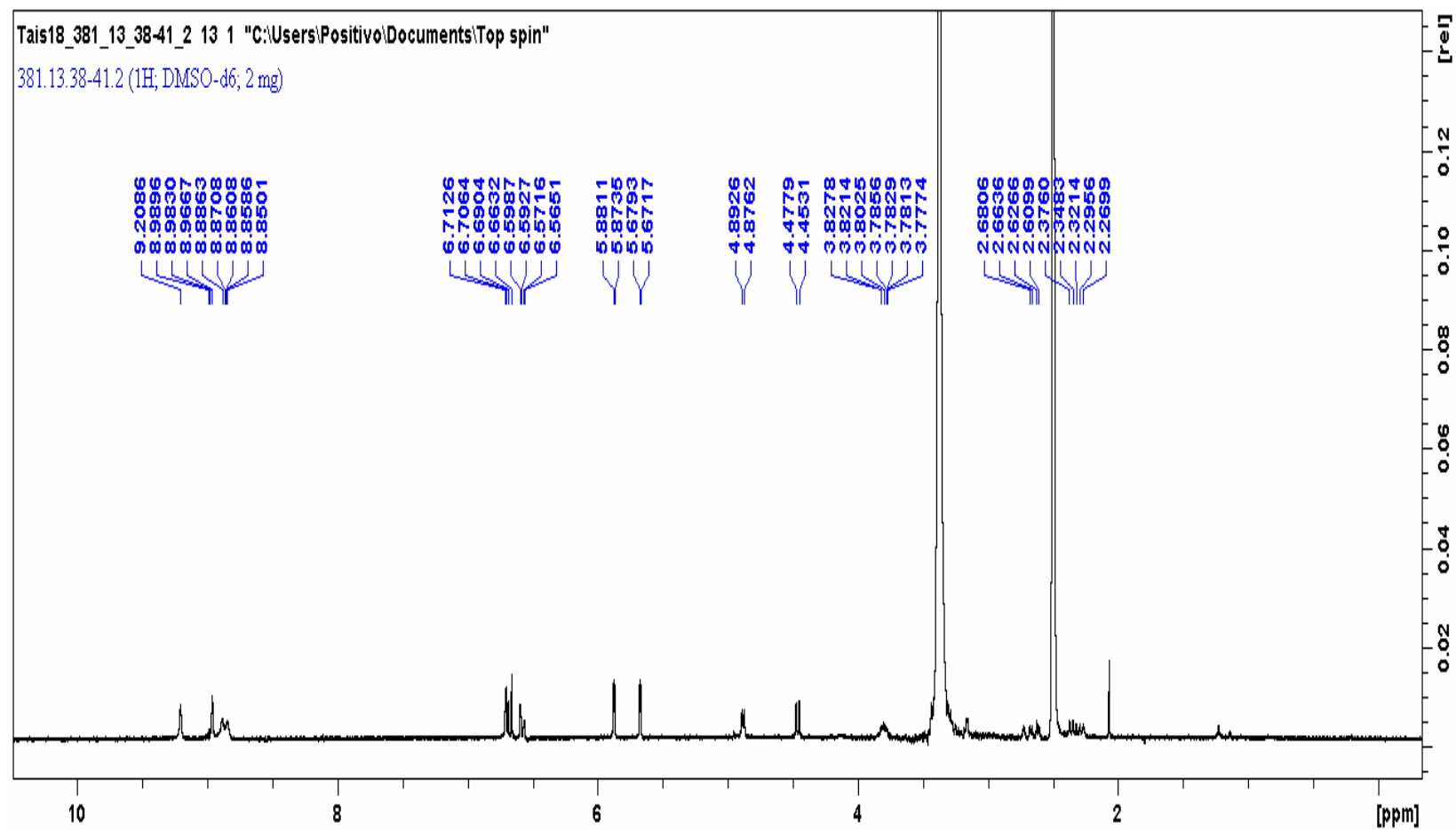


Figura 29: Expansão dos sinais de ^1H da substância 4 na região dos aromáticos da substância 4 em $\text{DMSO-}d$ (300 MHz)

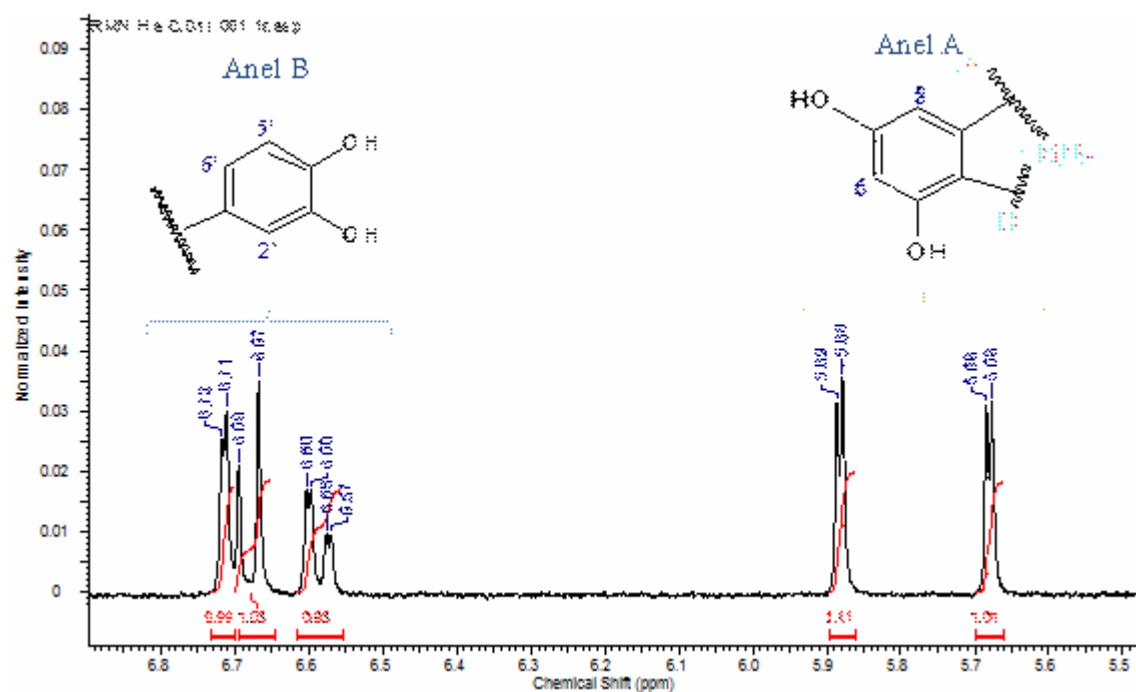


Figura 30: Expansão dos sinais de ^1H do anel C da substância 4 em $\text{DMSO-}d$ (300 MHz)

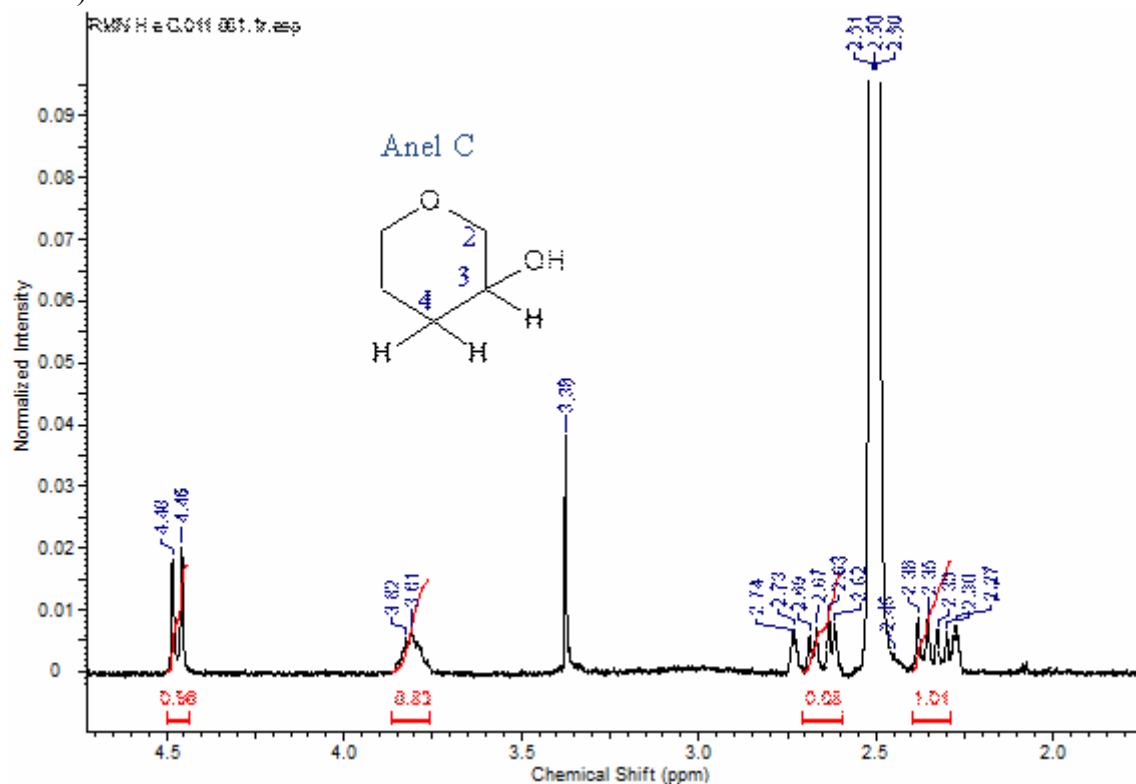
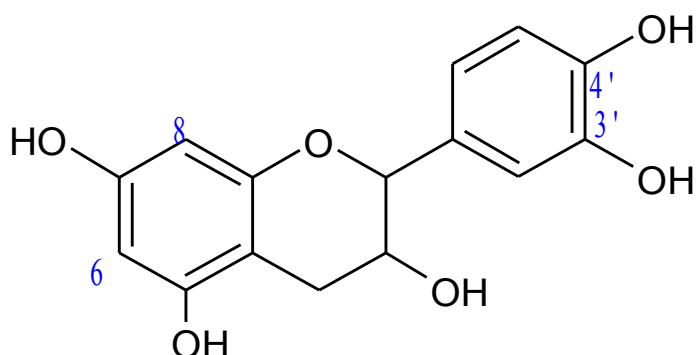


Figura 31: Estrutura da catequina



Os mapas de correlação de HSQC (**Figuras 32 e 33**) e HMBC (**Figura 34 e 35**), mostraram as relações entre hidrogênios e carbonos. Para a caracterização do anel A, foi observada a correlação *J1* do hidrogênio em δ_H 5,68 ppm (H-6) com o carbono em δ_C 93,51, e à longa distância com δ_C 99,39. Para o hidrogênio em δ_H 5,88 ppm (H-8), foi observada a correlação *J1* com o carbono 94,93, e à longa distância com δ_C 156,87, 99,39, 93,51. Para o anel B, foi observada a correlação *J1* do hidrogênio em δ_H 6,71 ppm (H-2') com o carbono em δ_C 114,24, e à longa distância com δ_C 145,36, 118,81 e 81,54. Para o hidrogênio em δ_H 6,68 ppm (H-5'), foi observada a correlação *J1* com o carbono 114,30, e à longa distância com δ_C 145, 24 e 130,9. O hidrogênio em δ_H 6,58 ppm (H-6') mostrou correlação *J1* com o carbono em δ_C e à longa distância com δ_C 145, 24 e 114,95 ppm (Figura 35). Para o anel C foi observada a correlação do hidrogênio 4,88 (H-2) com o carbono em δ_C 93,51. Os hidrogênios em δ_H 2,32 e 2,62 correlacionaram em *J1* com o carbono em δ_C 27,35.

Através do mapa de correlação ^1H - ^1H COSY (**Figura 36**), foi possível observar a correlação entre o hidrogênio em δ_H 3,80 (H-3) com os hidrogênios em 4,88, 4,48, 2,32 e 2,62. Outra correlação que também pode ser vista nesse mapa, foi a do hidrogênio em 5,88 com 5,67. Todas as correlações estão detalhadas na tabela 14.

Figura 32: Expansão entre 2 e 5 ppm do mapa de correlação HSQC da substância 4 (DMSO-d, 100 MHz)

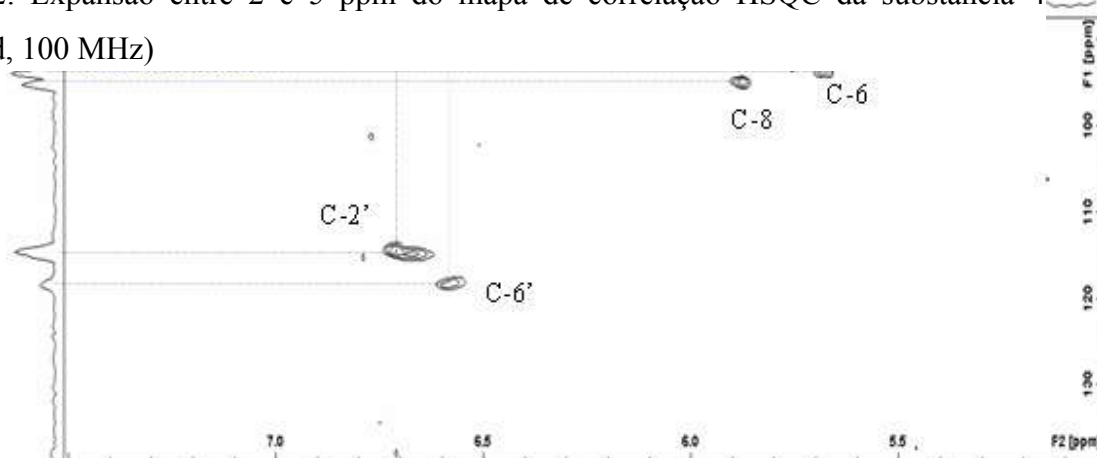


Figura 33: Expansão entre 5 e 8 ppm do mapa de correlação HSQC da substância 4 (DMSO-d, 100 MHz)

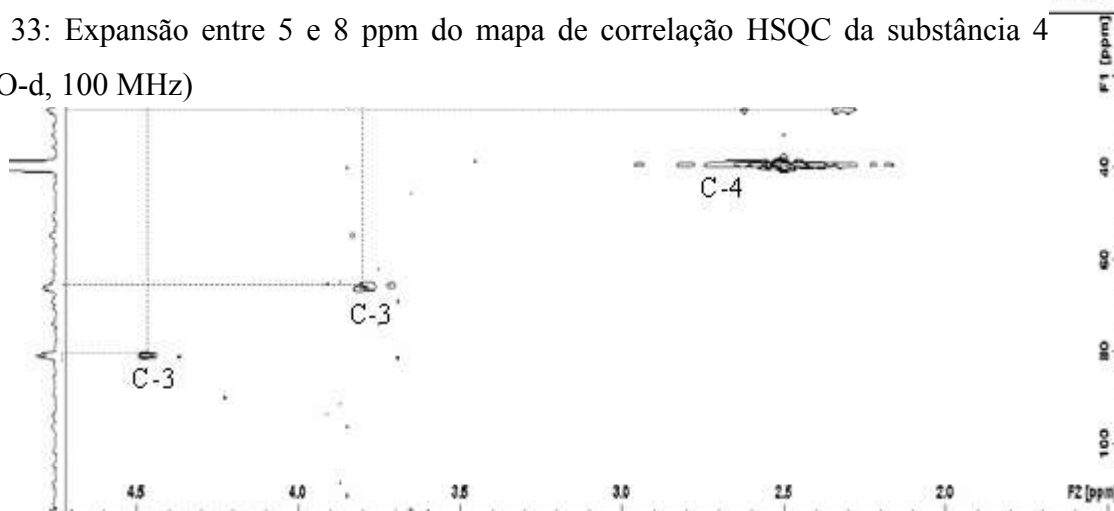


Figura 34: Mapa de contorno HMBC da substância 4

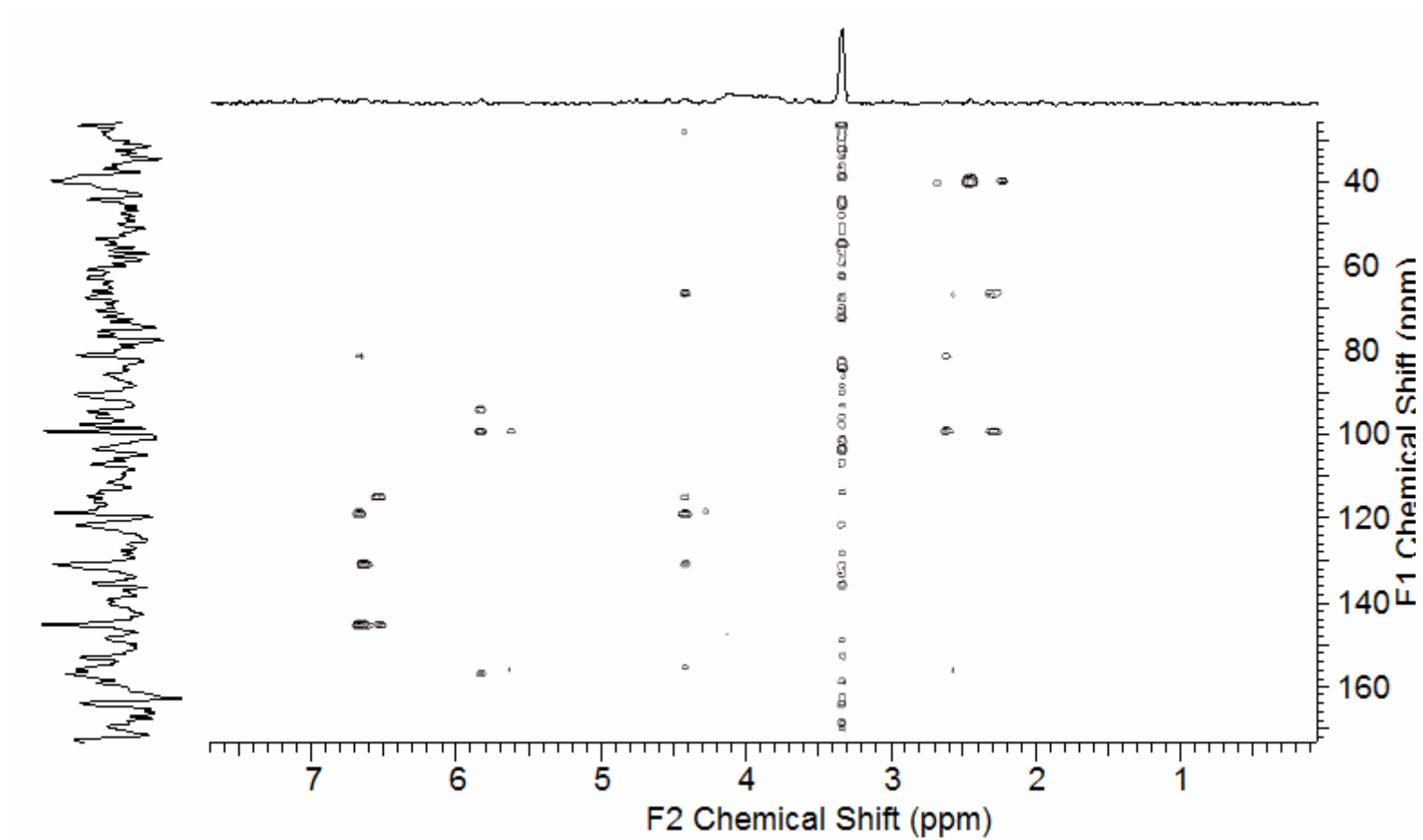


Figura 35: Expansão do mapa de contorno HMBC da substância 4

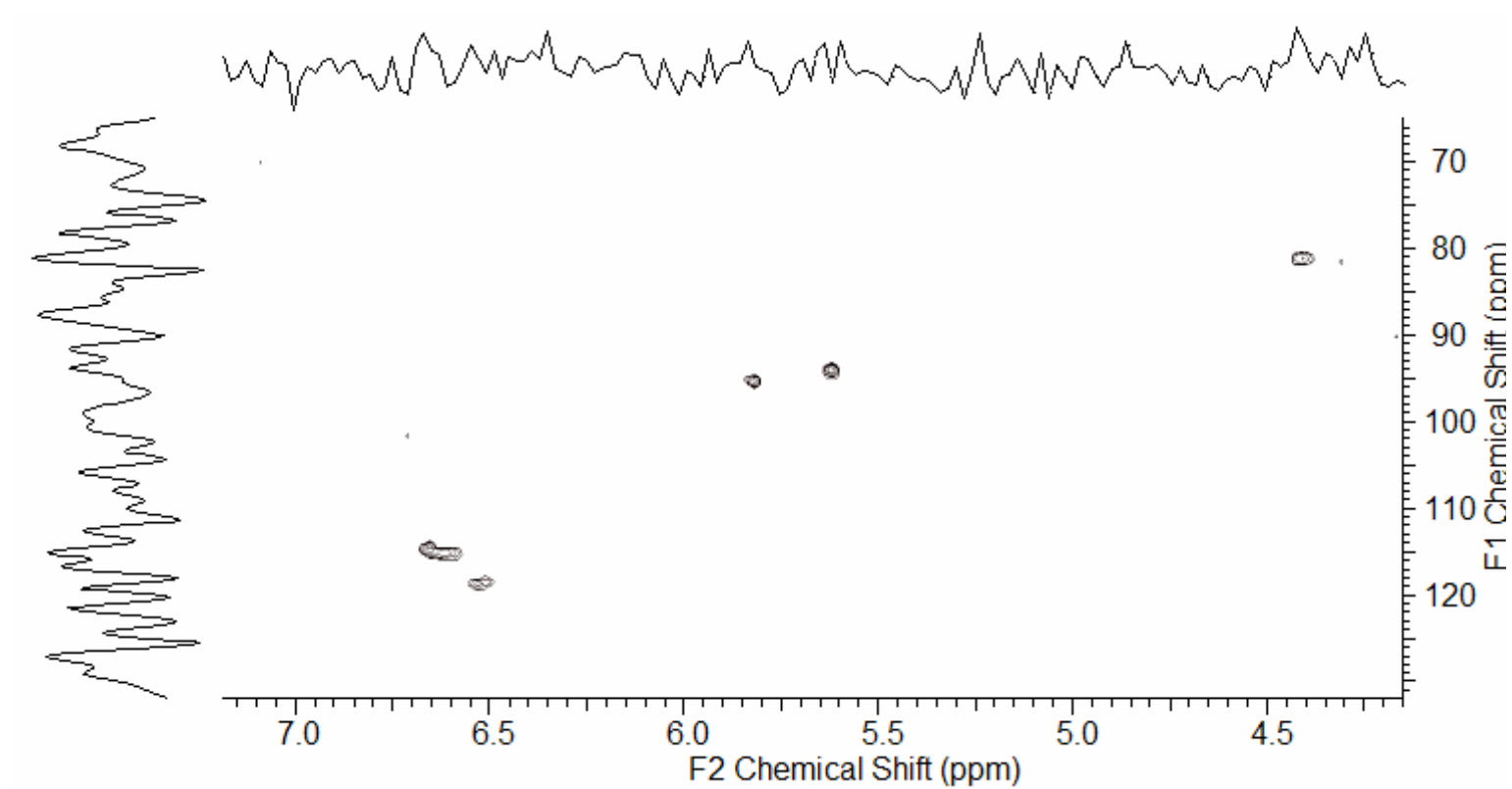


Figura 36: Mapa de contorno COSY da substância 4, em DMSO-d

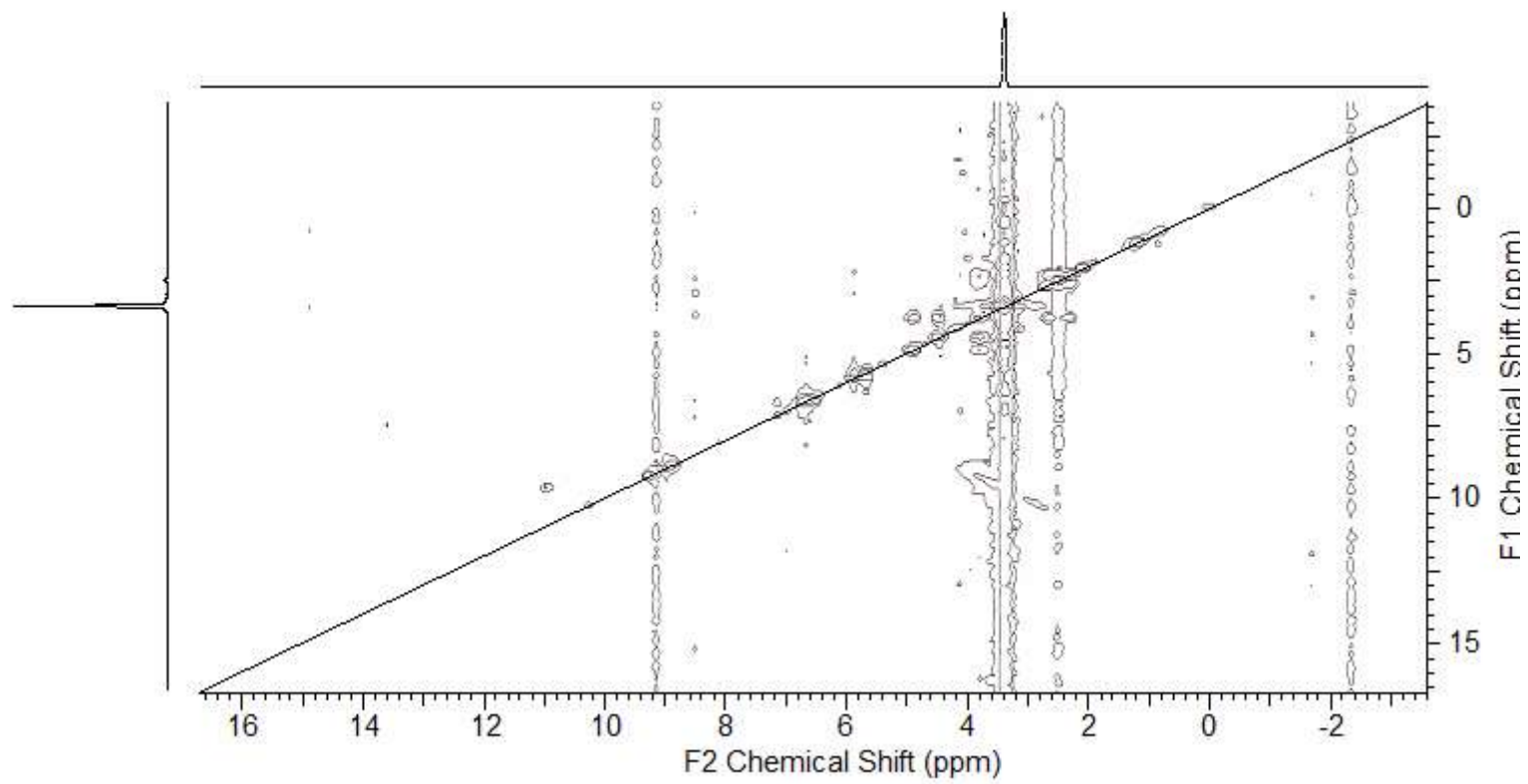


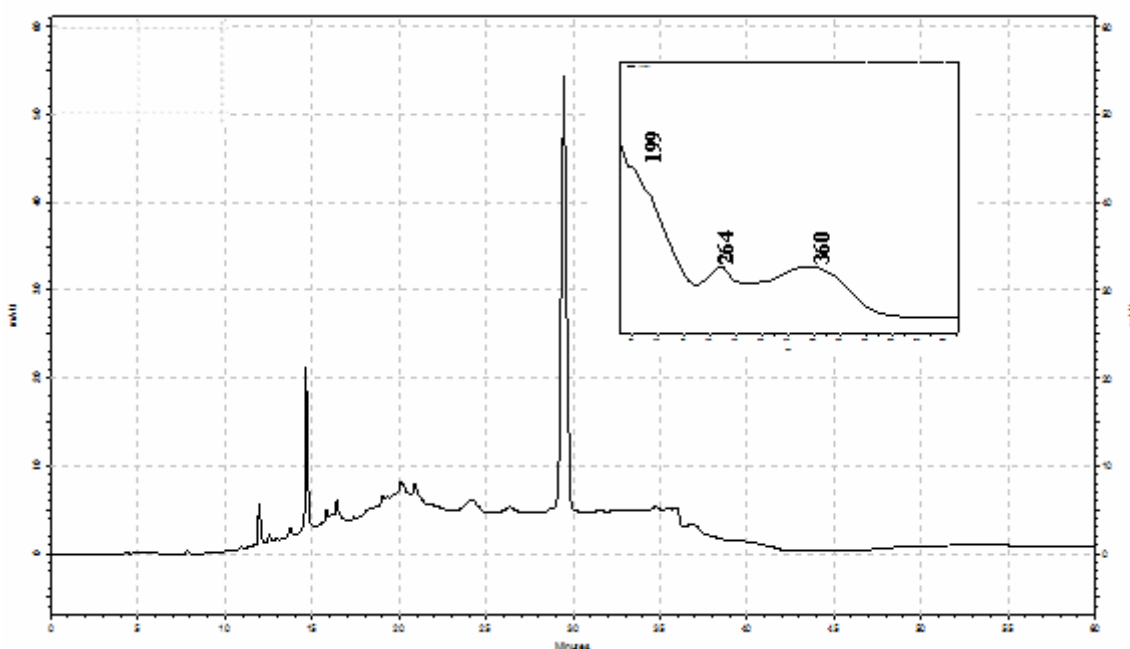
Tabela 14: . Sinais de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 4 da substância 4 em $\text{DMSO-}d$ (300 MHz)

	H	δ_{H} (ppm), multiplicidade e J (Hz) Observado	HSQC	COSY	HMBC	δ_{H} (ppm), multiplicidade e J (Hz) Literatura*
C	2	4,88 (<i>d</i> , 1H, $J=5,04$)	4,88 x 81,54			4,59 (<i>d</i> , $J=7,4$ Hz)
	3	3,80 (<i>m</i> , 1 H)	66,65	3,80 x 4,88 x 4,45	3,80 x 26,26	4,01 (<i>ddd</i> , $J=8,0$; 7,4 e 5,4 Hz)
	3-OH				4,47 x 130,84 x 114,95 x 66,65 x 28	
	4 _{anti}	2,32 (<i>dd</i> , $J=16,2$ e 8,2 Hz)	2,32 x 27,35	3,80 x 2,33	2,32 x 99,39 x 66,65	2,52 (<i>dd</i> , $J=16,0$ e 8,0 Hz)
	4 _{sin}	2,62 (<i>dd</i> , $J=16,2$ e 5,4 Hz)	2,62 x 27,35	3,80 x 2,64	2,62 x 99,39 81,54 66,65	2,84 (<i>dd</i> , $J=16,0$ e 5,4 Hz)
A	6	5,68 (<i>d</i> , 1H, $J=2,20$)	5,67 x 93,51		5,67 x 99,39	5,96 (<i>d</i> , $J=2,2$ Hz)
	8	5,88 (<i>d</i> , 1H, $J=2,20$)	5,88 x 94,93	5,88 x 5,67	5,88 x 156,87 x 99,39 x 93,51	5,89 (<i>d</i> , $J=2,2$ Hz)
B	2'	6,71 (<i>d</i> , 1H, $J=1,89$)	6,71 x 114,2		6,71 x 145,36 x 118,81 x 81,54	6,85 (<i>d</i> , $J=1,8$ Hz)
	5'	6,68 (<i>d</i> , 1H, $J=8,20$)	6,67 x 114,66		6,67 x 145,24 6,67 x 130,9	6,79 (<i>d</i> , $J=8,1$ Hz)
	6'	6,58 (<i>dd</i> , 1H, $J=1,89$; 8,20)			6,59 x 145,24 x 114,95	6,72 (<i>dd</i> , $J=1,8$ e 8,1 Hz)

4.2.4 Substância 5

A fração 3.4-5 (5,3 mg), apresentou-se como um sólido amarelo e com alto grau de pureza quando analisada por por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de Fase Reversa (CCDC-FR) e revelada com NP/PEG. Foi então analisada por CLAE e com o auxílio do detector DAD foi verificado que o espectro na região UV para o pico eluído em $t_r = 29,47$ min em 280 nm, era compatível com o de flavonoide, revelando valores $\lambda_{\max}$ de 199, 264 e 360 nm (**Figura 37**), característico de flavonoides, que apresentam a Banda II com os máximos na faixa espectral de 240 –280, atribuída ao anel A e da Banda I, com os máximos na faixa espectral de 350 –385 (intensa) atribuída ao anel B (MERKEN E BEECHER, 2000; RODRIGUES, 2010).

Figura 37: Cromatograma da fração 3.4-5 do 3º fracionamento da fase acetato das folhas em 280 nm. Coluna Phenomenex® Luna (2) FR C-18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 μm), CLAE-DAD (Shimadzu®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μm . (Para condições de eluição veja gradiente exploratório no item 3.3.3, Tabela 5)



O espectro ESI-EM de alta resolução, no modo negativo, para o composto majoritário presente na fração 3.4-5, revelou um valor de m/z 301,0345 na forma $[M-H]^-$ (**Figura 38 e 39**). A fração foi comparada com padrão e foi possível confirmar a presença da quercetina, com MM 302, 03 g/mol e fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7$, compatível com o sugerido pelo EM de alta resolução.

Figura 38: O espectro ESI-MS, no modo negativo, para o composto majoritário presente na fração 3.4-5

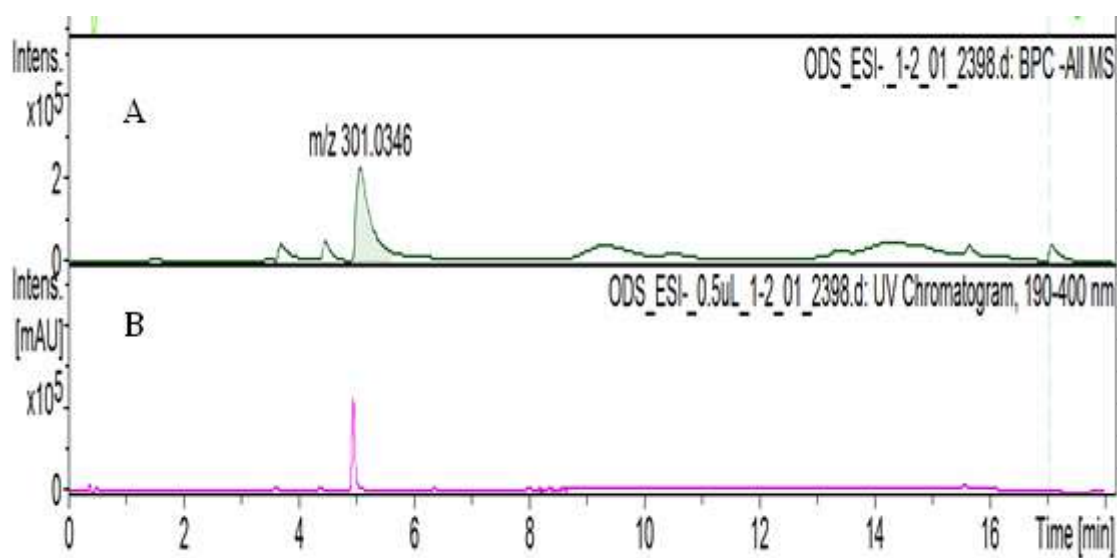


Figura 39: (A) Cromatograma do tipo base peak mostrando o pico majoritário da fração 3.4-5. (B) Cromatograma UV em 280 nm.

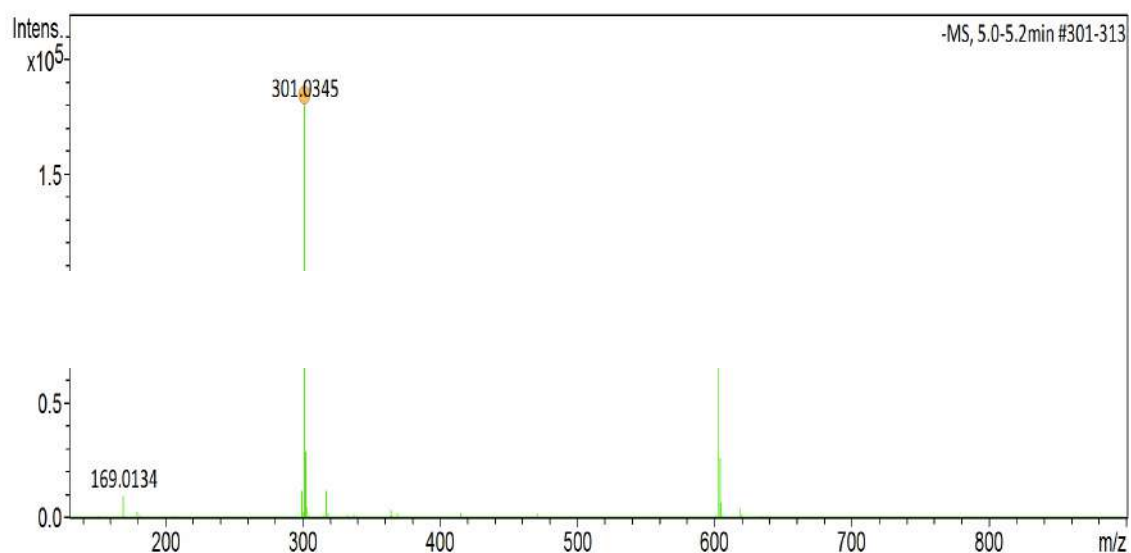
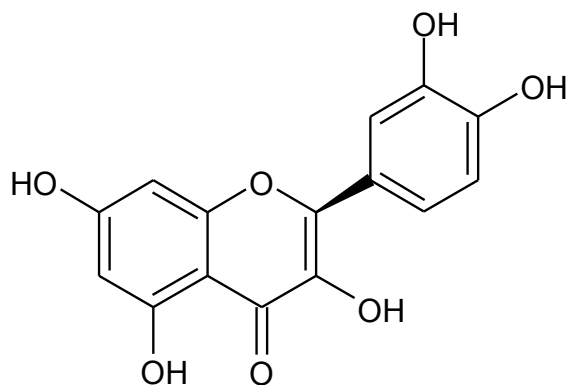


Figura 40: Estrutura do flavonoide quercetina

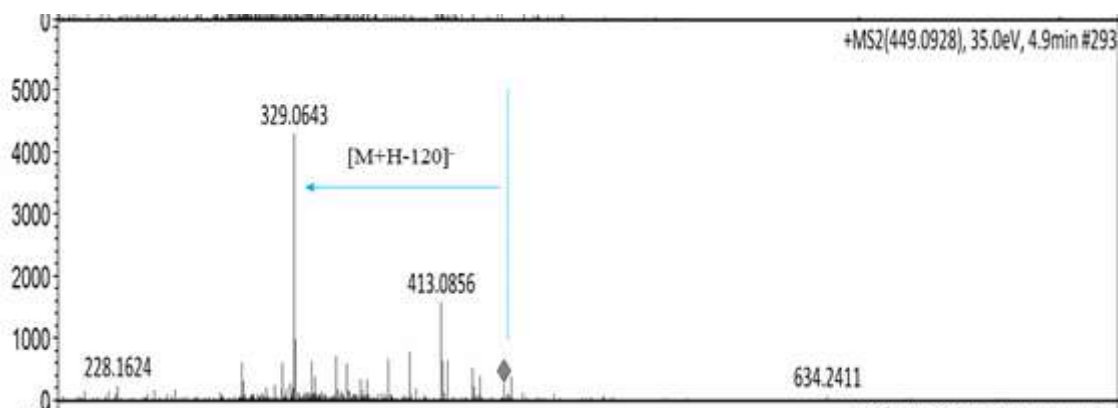


A quercetina (**Figura 40**) é uma pentahidroxiavona ou 7-hidroxiavonol, sendo um dos flavonoides mais abundantes no reino vegetal (RAUF, et al, 2018). É conhecido por sua potente atividade antioxidante (DAS et al, 2016), e também como inibidor da proteína quinase (RUSSO, et al, 2014) e agente antineoplástico (LEI, et al, 2017).

4.2.5 Substância 6

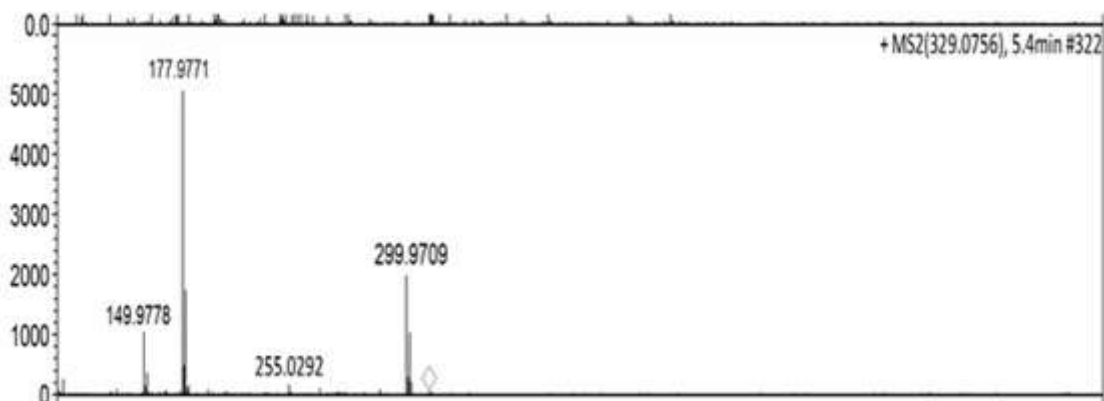
Por CCDC, a fração 3.17 (0,5 mg) com R_f de 0,71 mostrou características de flavonoides por mostrar fluorescência no UV 254 e 365 nm. Por ter pouca massa e alto grau de pureza esta fração foi analisada apenas por CL-EM. No espectro de CL-EM de alta resolução, modo positivo (**Figura 41**), foi identificado a presença do íon precursor *m/z* 449,1092 com *tr*=4,9 min para a fórmula C₂₁H₁₉O₁₁. Buscas em bancos de dados revelaram que esta massa é atribuída ao par de isômeros isoorientina/orientina (MONADATABANK, 2018). Através da técnica de ESI-EM/EM revelou os íons-fragmentos de *m/z*: 413,0856; 329,0643 e 228,1624 (figura 41), sendo o íon *m/z* 329 ((C₁₇H₁₃O₇, correspondente a [M+H-120]⁺- pico base), é considerado como diagnóstico para atestar a presença de flavonas C-glucosiladas.

Figura 41: Espectro de CL-EM/EM no modo positivo da fração 3.17 da fase acetato das folhas de *D. purpurea*, para o íon 449



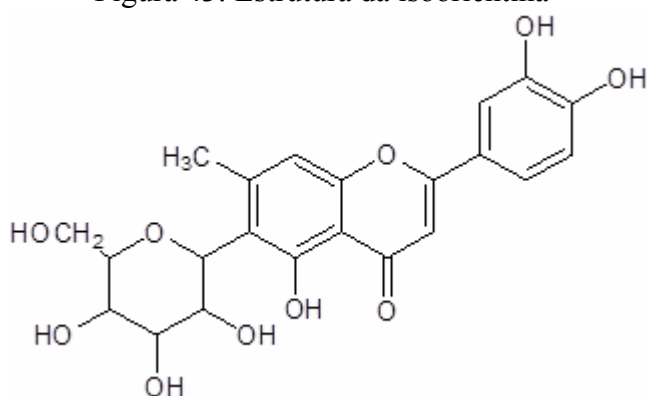
Estas duas flavonas diferenciam-se apenas pela posição de ligação do açúcar, sendo que a isoorientina possui o açúcar na posição C-6 e a orientina na posição C-8. Normalmente, através de EM e CLAE não é possível diferenciar isômeros, no entanto, apenas flavonas C-6 produzem os fragmentos m/z 177 ($(C_9H_5O_4)^+$, correspondente a $[M+H-152]^+$) e 149 ($(C_8H_5O_3)^+$, correspondente a $[M+H-180]^+$), após a fragmentação retro-*Diels-Alder* do íon m/z 329 (ANDERSEN E MARKHAN, 2005; RATH et al., 1995). O espectro ESI-EM/EM (**Figura 42**) deste íon apresenta a presença destes fragmentos, além disso, Pereira et al. (2005), estudando formas de diferenciar estes isômeros através ESI-EM/EM, observou que estes fragmentos são produzidos em intensidades diferentes para cada isômero, sendo que o isoorientina produz em maior intensidade o íon 299, enquanto que a orientina produz com maior intensidade o íon 300.

Figura 42: Espectro de ESI-EM/EM no modo positivo da fração 3.17 da fase acetato das folhas de *D. purpurea*, para o íon 329



Com base na interpretação destes resultados, conclui-se que a substância isolada é a isoorientina (**Figura 43**).

Figura 43: Estrutura da isoorientina



O espectro de massas MS/MS no modo negativo (**Figura 44**), apresenta como fragmentos mais abundantes [M-H-90]- com m/z 357 e [M-H-120]- com m/z 327, ambos originados da fragmentação da glucose.

Figura 44: Espectro de CL-EM/EM no modo negativo da fração 3.17 da fase acetato das folhas de *D. purpurea*

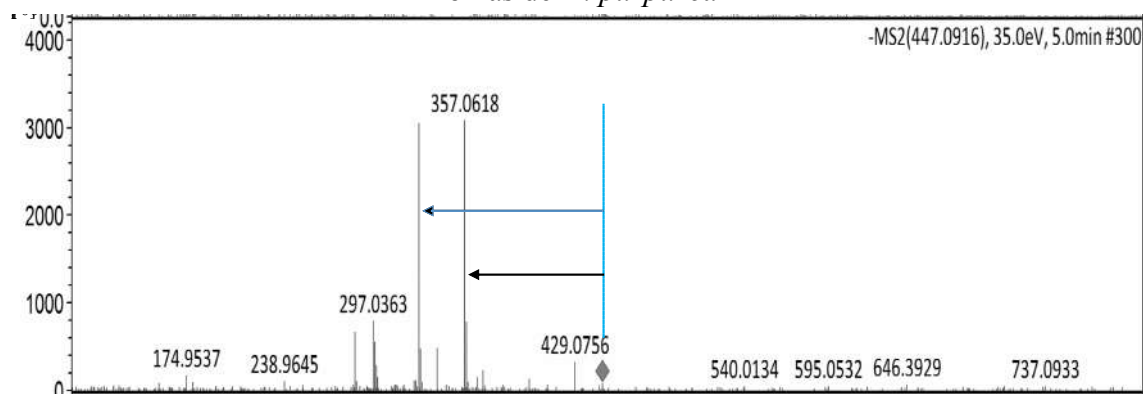
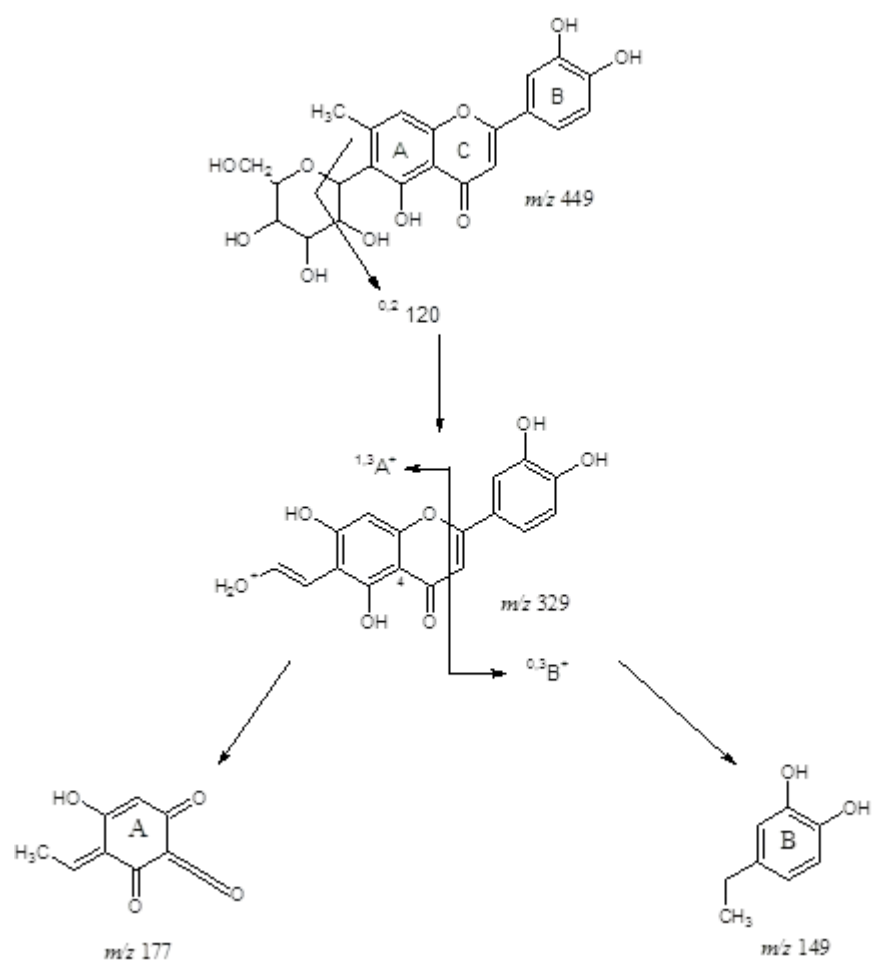


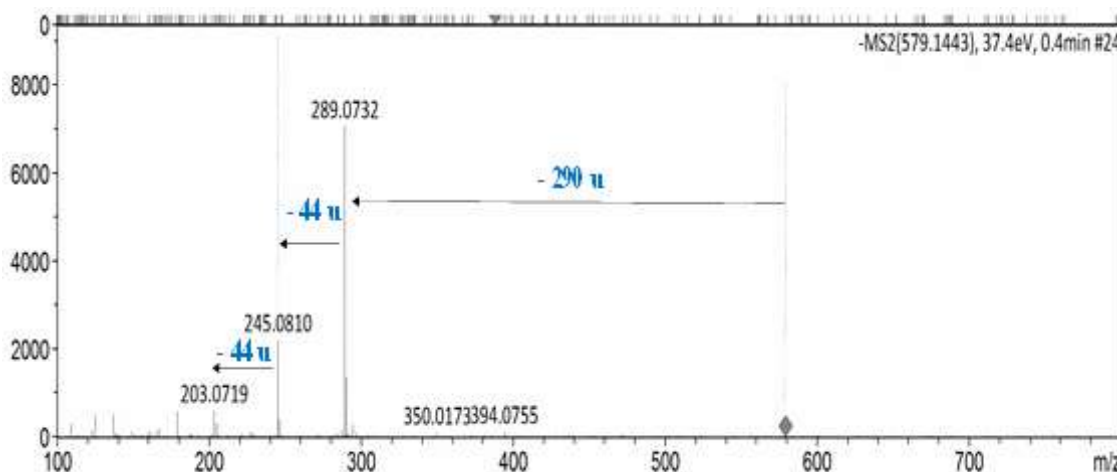
Figura 45: Proposta de fragmentação da isoorientina



4.2.6 Substância 7

A fração 3.18-32 (0,7 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de cor marrom, em CCDC-FR apresentou uma mancha de cor castanho-avermelhada quando revelada com Anisaldeído sulfúrico. No espectro de massas ESI-EM/EM no modo negativo (**Figura 46**) foi observado um pico base de m/z 579,1443 [M-H]⁻. Quando submetido à fragmentação este íon apresentou perda inicial de 290 u, além de perdas sequenciais de 44 u.

Figura 46: Espectro de ESI-EM/EM no modo negativo da fração 3.18-32 da fase acetato das folhas de *D. purpurea*



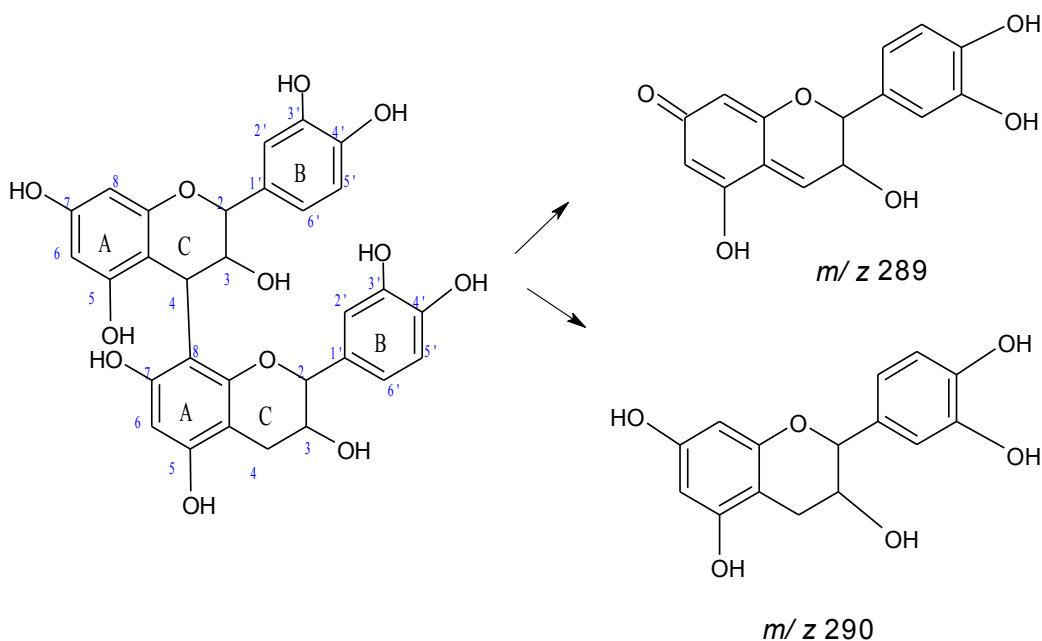
A presença do íon de m/z 579, está relacionado a presença de catequinas oligoméricas. A fragmentação EM/EM do íon precursor 579 possivelmente através da clivagem quinona metídeo (QM) da ligação interflavonoídica, levou à formação do íon produto de m/z 289 [M - 290 - H]⁺, gerando o par de isômeros catequina/epicatequina, identificados pela presença dos fragmentos 245 e 203 (GU et al., 2003; LU et al., 2009). Como a estereoquímica dos carbonos C-2 e C-3 de catequinas monoméricas e oligoméricas não são diferenciadas em experimentos de EM, para efeito de simplicidade, os fragmentos de m/z 289 serão referidos como a (+) -catequina, já obtida neste trabalho no segundo fracionamento da fase acetato das folhas (item 4.2.3). Sendo assim, podemos inferir que trata-se de um dímero de catequinas, chamado de procianidinas,

As procianidinas pertencem ao grupo dos flavan-3-óis e são polímeros constituídos por duas ou mais unidades monoméricas de catequina e/ou epicatequina, e são classificadas do tipo B se apresentam a ligação interflavonoidica entre o carbono C-4 da unidade superior e o carbono C-8 ou C-6 da unidade inferior (C4-C6 ou C4-C8). A interpretação dos espectros de massas, conclui-se que a substância isolada é a procianidina B3. No esquema abaixo (**Figura 47**), apresenta-se alguns fragmentos nas análises de ESI-MS/MS desta fração, que corroboram com a interpretação da estrutura proposta.

4.3 Análises por CLAE-UV-DAD dos extratos hidrometanólicos das folhas de *D.*

purpurea

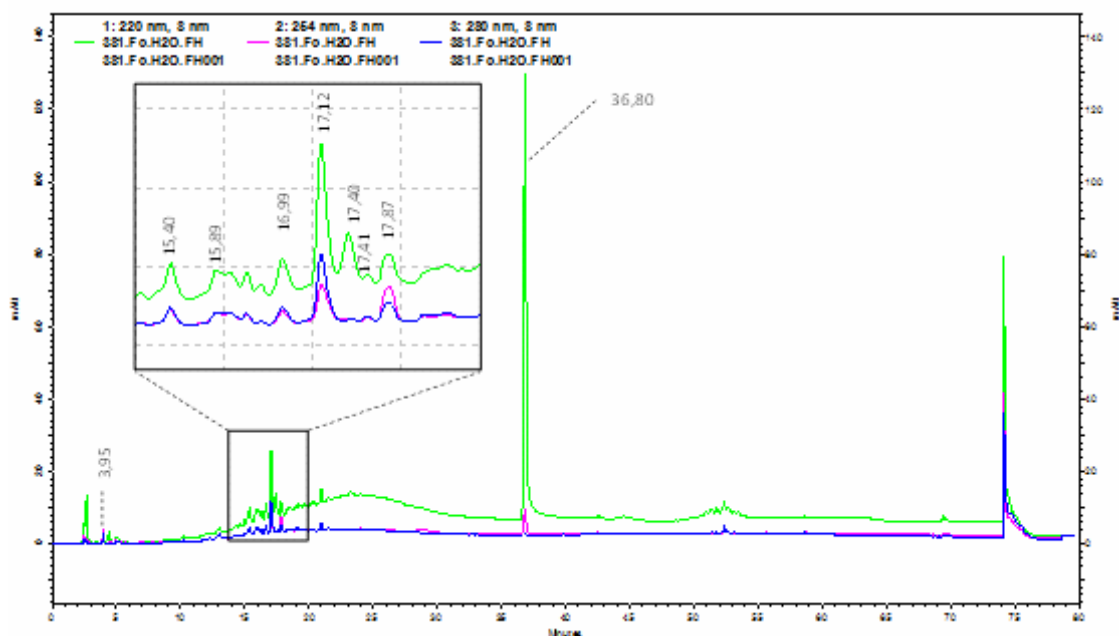
Figura 47: Representação da fragmentação da procianidina B3



A fase hidrometanólica das folhas apresentou alta atividade antiangiogênica e despertou interesse, tentativas de fracionamento em coluna aberta foram realizadas, no entanto, mostraram-se extremamente difíceis de se efetuar. Portanto, a investigação dos constituintes químicos desta fase foi feita por desreplicação, utilizando a técnica CLAE-UV-DAD. A amostra foi tratada em cartucho *StrataFR18* para a eliminação dos interferentes apolares, gerando 3 eluatos que foram analisados por CLAE-UV-DAD.

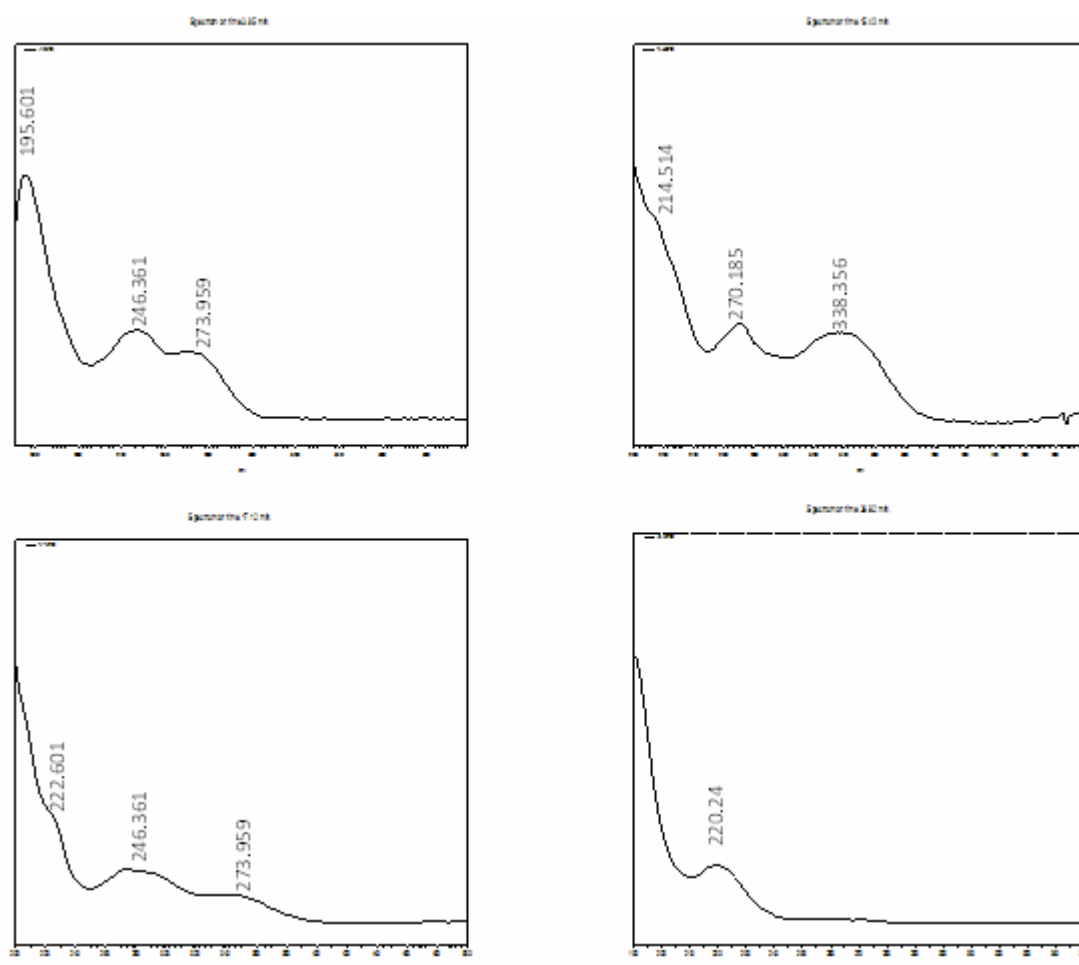
Embora a análise por CCDC tenha indicado a presença de substâncias nos três eluentes da SPE C18, a avaliação dos cromatogramas (**Figura 48**) para os três eluatos permitiu verificar que os constituintes químicos de *D. purpureas* e encontravam quase que totalmente no eluato **A** (MeOH/H₂O 2:8 v/v). Processamento em diversos comprimentos de onda, usando o detector DAD, evidenciou que nos eluatos **B** (MeOH/H₂O 1:1 v/v) e **C** (MeOH) foram registrados apenas ruídos

Figura 48: Perfil cromatográfico da fração MeOH/H₂O 2:8 v/v proveniente da fase hidrometanólica das folhas *D. purpurea*, submetida a limpeza com SPE em *Strata* FR18. Coluna Phenomenex® Luna (2) FR18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC-PAD (*Shimadzu*®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 220, 254 e 280 nm



Com o auxílio do detector PAD (**figura 49**), foi realizada varredura na faixa espectral de 200-600 nm, duas classes de substâncias foram identificadas na fase hidrometanólica das folhas *D. purpurea*. As catequinas monoméricas e oligoméricas (procianidinas), que exibem uma banda fraca em torno de 280 nm, um ombro próximo de 220 nm e máximo entre 205-210 nm (ROHR et al., 2000; WANG et al., 2000). As flavonas, que apresentam a Banda II com os máximos na faixa espectral de 240–280 e a Banda I, com os máximos na faixa espectral de 350–385 (intensa) atribuída ao anel B (MERKEN E BEECHER, 2000; RODRIGUES, 2010).

Figura 49: Espectros na região do UV para os principais picos eluídos no cromatograma da fase hidrometanólica das folhas *D. purpurea*.

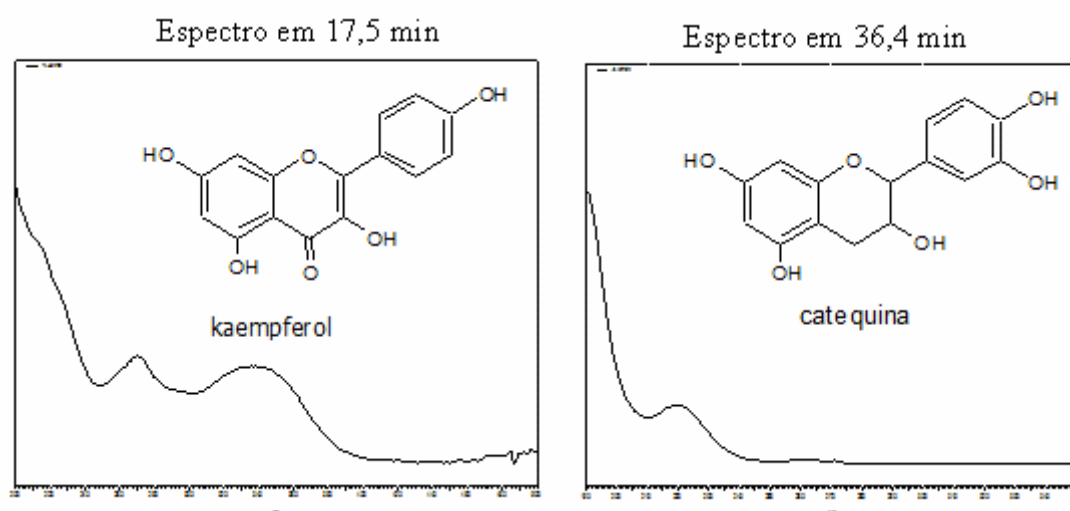


A identificação de alguns dos metabólitos secundários neste eluatos pôde ser feita de forma inequívoca pela realização de experimentos de co-injeção, em que alíquotas da matriz e padrão (Tabela 10, item 3.5.1) foram misturadas e diluídas para um volume conhecido, sendo posteriormente analisadas por CLAE EM um método de eluição gradiente (Tabela 15). Assim, os picos em $tr = 17,5$ min e $tr = 36,4$ min foram identificados como sendo kaempferol e catequina (Figura 49), respectivamente.

Tabela 15: Sistema de eluição da fase hidrometanólica das folhas *D. purpurea*,

SISTEMA			
Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	Tempo (min)
H2O + TFA 0,01%	ACN + TFA 0,01%	0	20
		50	50
		60	100
		70	100
		75	20

Figura 49. Espectro UV de kaempferol e catequina

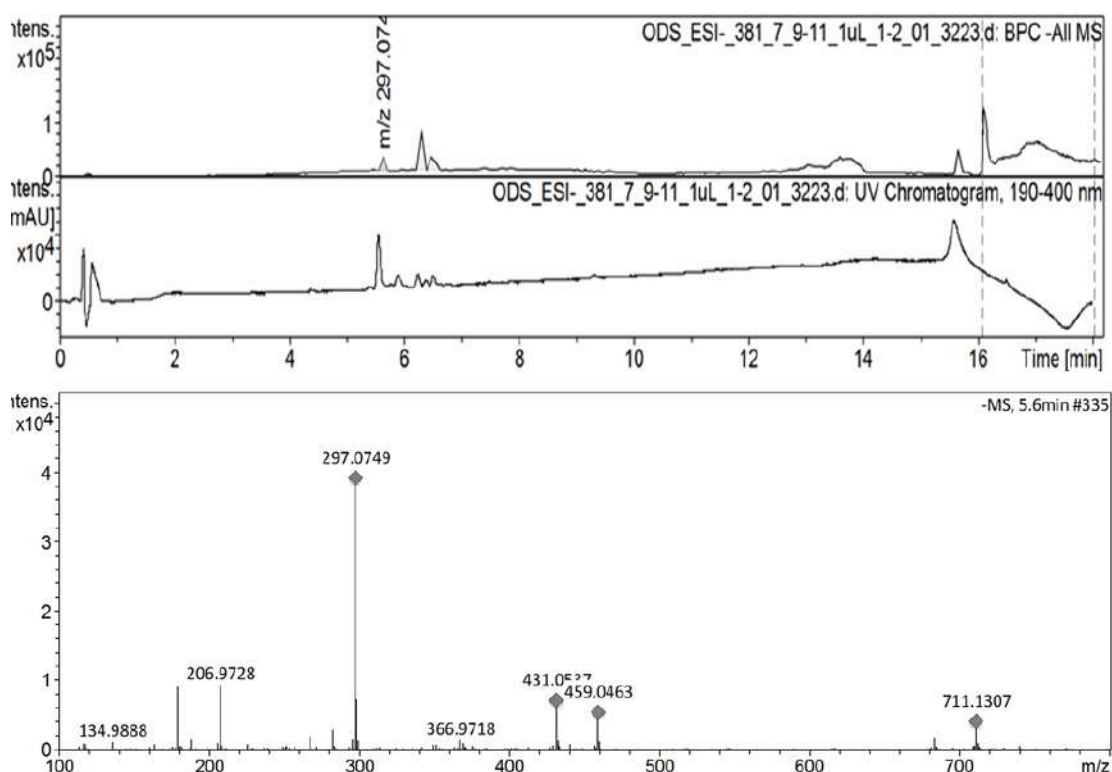


4.3 ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO METANÓLICO DOS GALHOS DE *D. PURPUREA*

4.4.1 Substância 8

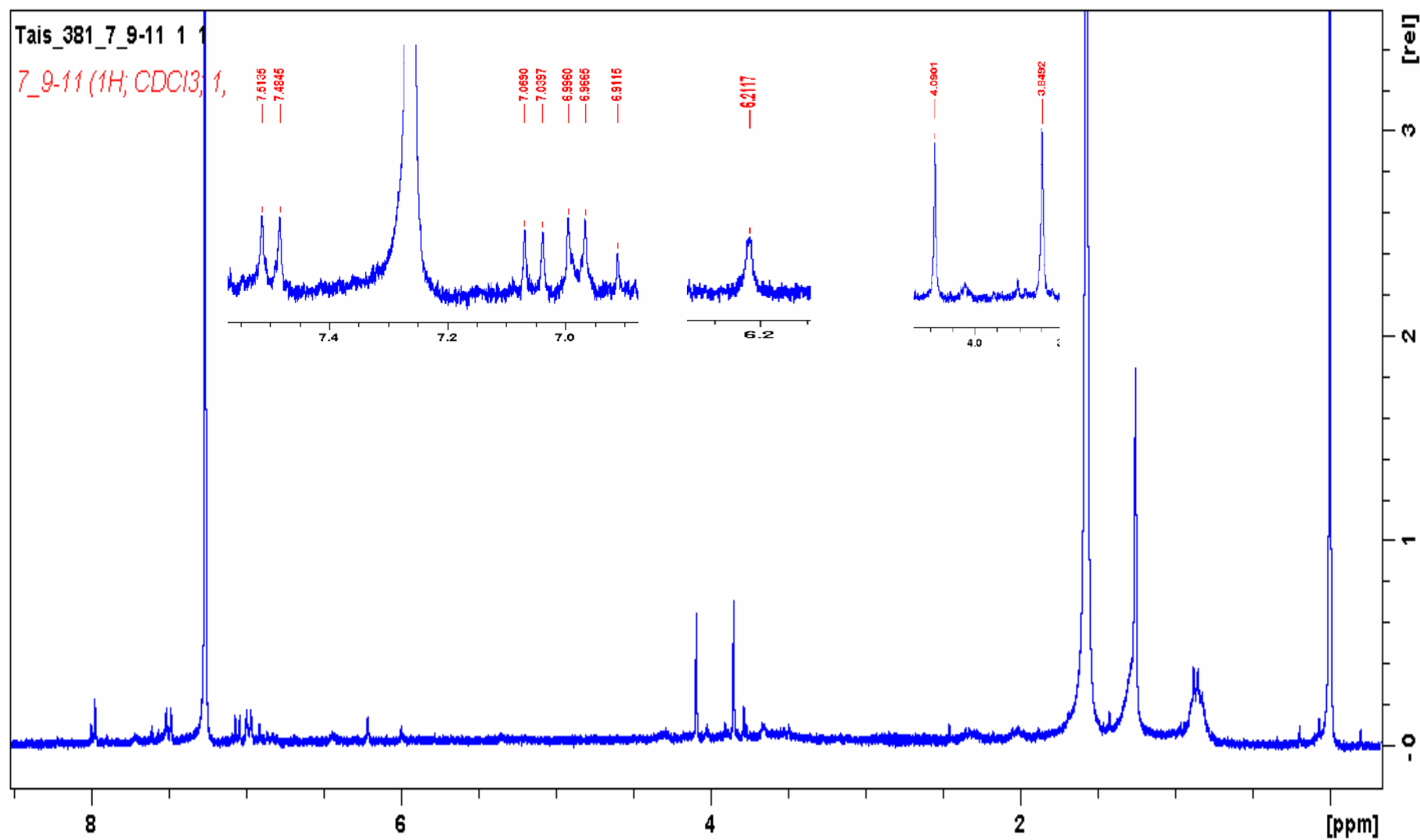
Por CCDC, a fração 7.9-11 (1,9 mg) com R_f de 0,71 mostrou características de flavonoides por mostrar fluorescência no UV 254 e 365 nm. Após análise dessa fração por espectrometria de massas de alta resolução via ESI, foi possível observar no cromatograma um pico em 5,6 min (**Figura 50**) apresentou o íon de *m/z* 297,0749 [M-H]⁻, compatível com a fórmula molecular de C₁₇H₁₃O₅.

Figura 50: Espectro de massas da substância 8



As análises dos espectros de RMN de ¹H (Figura 52) mostrou sinais em δ_H 6,97 e 6,22 que indicam a presença de um anel A com uma metoxila 4,09 na posição 7, caracterizando assim o anel A. Foram registrados dois dupletos em δ 7,05 e 7,51 ppm cuja a constante de acoplamento igual a 8,7 Hz sugerem que estes estão acoplando em *orto*, típicos de anel “B” *p*-disubstituído, com uma metoxila 3,84 na posição 4’

Figura 51: Sinais de RMN de ^1H da substância 8 em CDCl_3 (300 MHz)

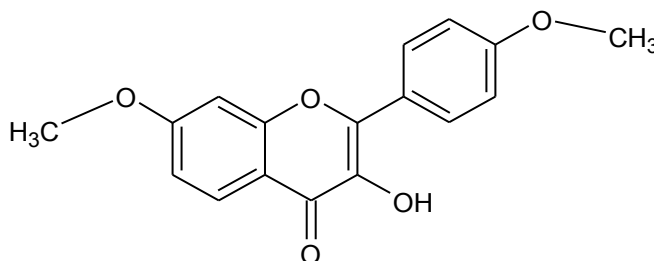


De acordo com os dados analisados de RMN de ^1H (Tabela 16) em comparação com a literatura foi possível identificar a substância 7,4'-dimetoxi-3-hidroxiavona (Figura 52) (SILVA, CARVALHO, BRAZ-FILHO, 2009).

Tabela 16: Sinais de ^1H da substância 8

Posição	δ_{H} Observado (ppm)	δ_{H} Literatura
H-2'/H-6'	7,51 ppm (2H, d, J=8,7 Hz)	8,09 ppm (2H, d, J=8,7 Hz)
H-3'/H-5'	7,05 ppm (2H, d, J=8,7 Hz)	6,94 ppm (2H, d, J=8,7 Hz)
H-5/H-6	6.97 ppm (2H, d, J=9 Hz)	6.71 ppm (2H, d, J=9 Hz)
H-8	6,22 (1H, sl)	6,32 (1H, sl)
7 OCH ₃	4,09 (3H, sl)	3,96 (3H, sl)
4' OCH ₃	3,84 (3H, sl)	3,87 (3H, sl)

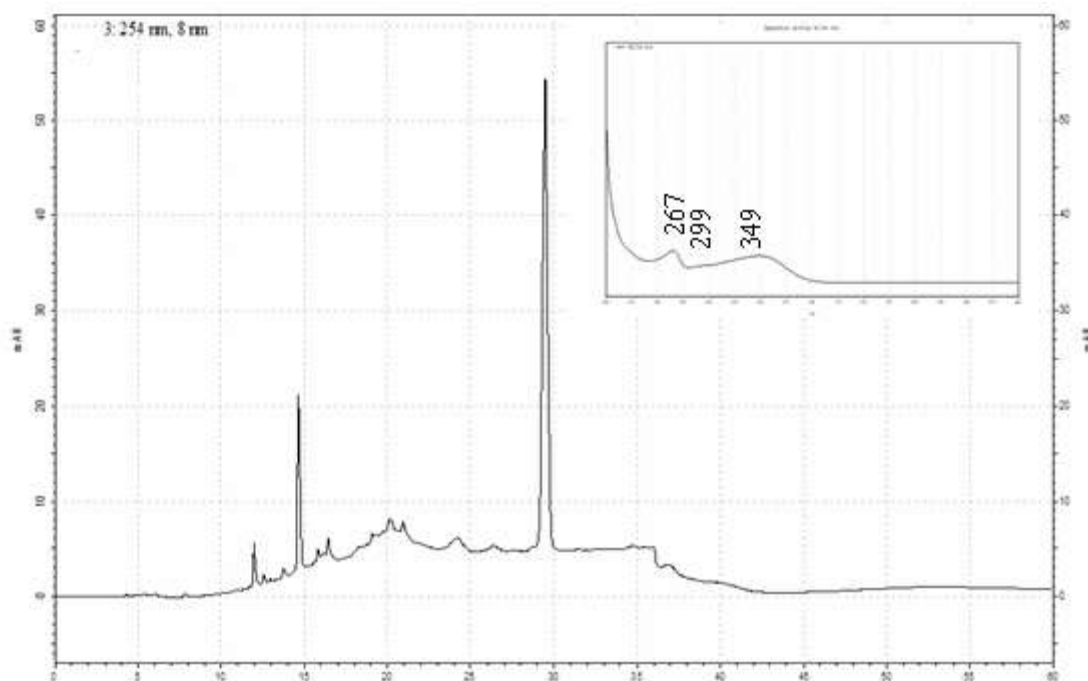
Figura 52: Estrutura da 7,4' -dimetoxi-3-hidroxiavona



4.4.2 Substância 9

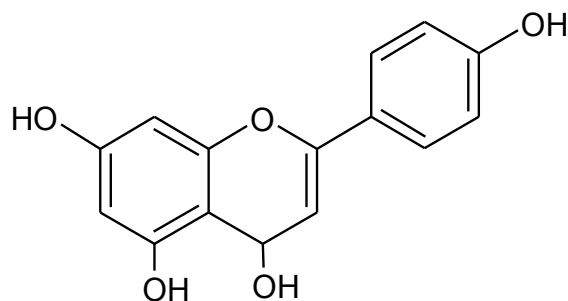
A fração 19B.7 (0,6 mg) um sólido incolor, foi purificado por CLAE e apresentou um pico intenso em $t_r = 29,10$ min quando analisado por CLAE-DAD indicando a presença de um flavonoide, pelas bandas apresentadas no espectro de UV com λ_{max} 267 e 349 (Figura 53).

Figura 53: Cromatograma e espectro de UV da substância 9. Coluna Phenomenex® Luna (2) FR C-18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), CLAE-DAD (Shimadzu®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 µm. (Para condições de eluição veja gradiente exploratório no item 3.3.3, Tabela 5)



Através de experimentos de co-injeção com padrões, foi possível identificar a flavona apigenina (**Figura 54**).

Figura 54: Estrutura da apigenina



A apigenina é uma flavona substituída por grupos hidroxí nas posições 4', 5 e 7. abundantemente encontrada em frutas e vegetais, exibe atividade antiproliferativa, anti-inflamatória e antimetastática, além de possuir atividade ansiolítica (SALEHI et al, 2019). É visto como um promissor agente quimiopreventivo do câncer de pele, entre outras atividades (BRAVO,1998).

4.4.3 Substância 10

A fração 21.28-34 (1,8 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de cor amarela. No espectro de massas (**Figura 55**) foi observado um pico base de m/z 243,0669 [M-H]⁻. Quando submetido à fragmentação este íon apresentou perda inicial de 15 u, além de perdas sequenciais de 29 e 56 u.

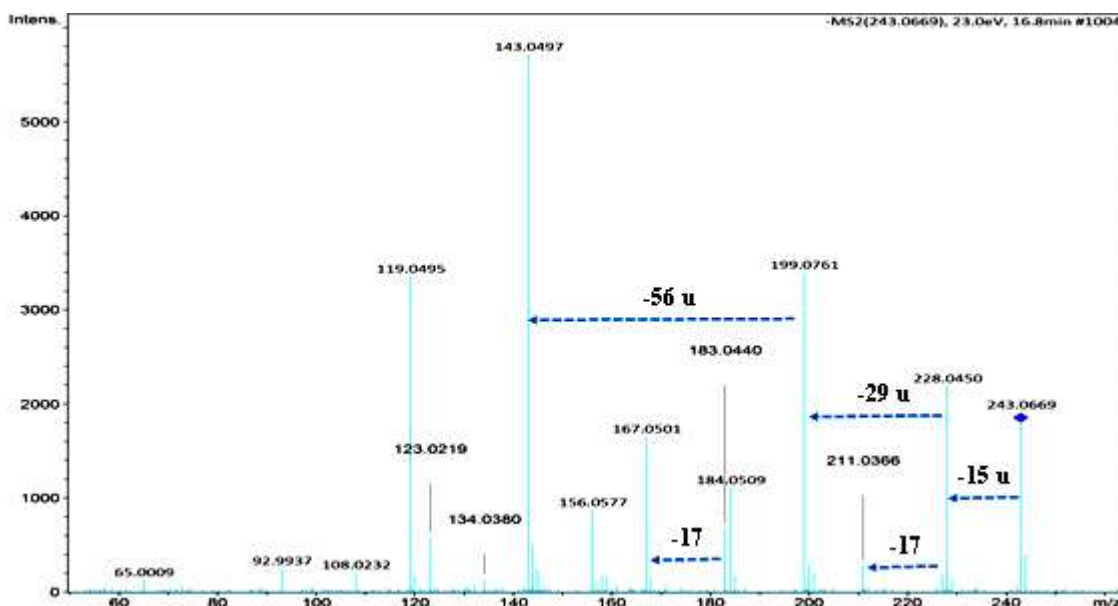


Figura 55: Espectro de ESI-EM/EM da amostra 21.28-34.

No espectro de RMN de ¹H (**Figura 55**) realizado em DMSO-d₆ 300 MHz, foram observados seis sinais entre 5 a 8 ppm, sendo quatro hidrogênios atribuídos a dois anéis aromáticos distintos em δ 7,48 ppm (2H, d, 8,6 Hz), 6,78 ppm (2H, d, 8,6 Hz), 6,22 ppm (1H, d, 2,2 Hz) e 5,59 ppm (1H, d, 2,2 Hz), e dois sinais em δ 7,22 ppm (1H, d, 16 Hz) e 6,76 ppm (1H, d, 16 Hz) característico de uma ligação dupla *trans*.

Foram registrados dois dupletos em δ 6,78 e 7,48 ppm cuja a constante de acoplamento igual a 8,6 Hz sugerem que estes estão acoplando em *orto*, típicos de anel “B” *p*-

disubstituído. Cada sinal integrado indica que existem dois hidrogênios em δ 6,78 ppm que correspondem aos hidrogênios H-2' e H-6' e outros dois hidrogênios em δ 7,48 ppm correspondentes aos hidrogênios H-3' e H-5' justificados pela simetria do anel aromático confirmando a estrutura do anel “B” (**Figura 57**).

Os sinais em δ 5,59 e δ 6,22 ppm revelaram dois dupletos com constante de acoplamento igual a 2,2 Hz, típico de acoplamento *meta* no anel aromático. Com auxílio dos mapas de contorno HSQC (**Figuras 58 e 59**) e HMBC (**Figura 60**) foi possível observar para o H-4 em δ 5,59 ppm, correlação J^1 com o carbono em δ 87,88 (C-4). Para o H-6 em 6,22, foi possível observar a correlação J^1 com o carbono em δ 99,7 (C-6), e à longa distância com os carbonos em δ 158,89 (C-2) e δ 115,65 (C-7) respectivamente, revelando o padrão de substituição do anel “A”. Ainda com o auxílio dos mapas de contorno, foi possível observar para o H-7 em δ 6,76, a correlação J^1 com o carbono em δ 115,65, e à longa distância com os carbonos em δ 158,89 (C-2) e δ 125,9 (C-1'), e, o H-8 em δ 7,22, foi possível observar a correlação J^1 com o carbono em δ 134,48, e à longa distância com os carbonos em δ 158,89 (C-2) e δ 125,09 (C-2' e C-6'). A partir desses dados e comparação (**Tabela 17**) com os da literatura (GEONSEEK et al. 2008), 21.28-34 foi identificado como o estilbeno 2,3,5,4'-tetrahidroxiestilbeno, sendo este o primeiro relato de estilbeno para a espécie.

Tabela 17: Sinais de RMN da substância 9 em DMSO-d

Posição	C	$\delta_{\text{C observado}}$	$\delta_{\text{H}} (m, J \text{ em Hz})$ Literatura	HSQC	HMBC
				$\delta_{\text{H}} (m, J \text{ em Hz})$	$^{24}J_{\text{CH}}$
2	C	158,89			
4	CH	87,88	6.18	5,59 ppm (1H, d, 2,2 Hz)	
6	CH	99,7	6.45	6,22 ppm (1H, d, 2,2 Hz)	C-2
7	CH	115,65	6.94 ()	6,76 ppm (1H, d, 16 Hz)	C-2'; C-1'
8	CH	134,48	6.98 ()	7,22 ppm (1H, d, 16 Hz)	C-2'; C-6'
1'	C	125,9			C-6'
2'	CH	125,09		7,48 ppm (2H, d, 8,6 Hz)	
3'	CH	115,65	6.82	6,78 ppm (2H, d, 8,6 Hz)	
4'	C	159,02		3,82 ppm (2H, d, 8,6 Hz)	
5'	CH	115,65	6.82	6,78 ppm (2H, d, 8,6 Hz)	C-1'
6'	CH	125,09		7,48 ppm (2H, d, 8,6 Hz)	C-8; C-4'; C-2'

Figura 56: Espectro de RMN de ^1H da substância 9 em DMSO- d_6 300 MHz

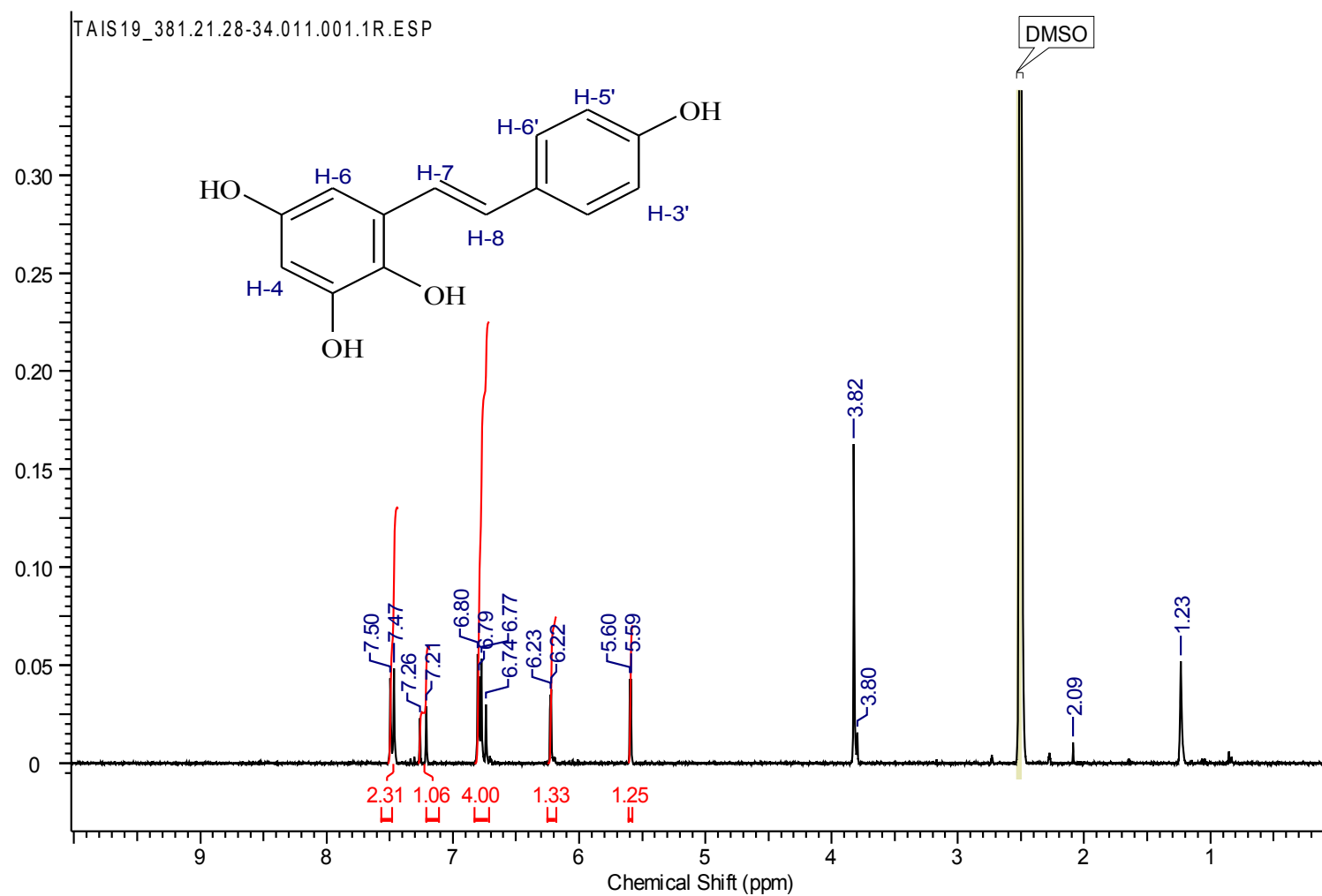


Figura 57: Expansão dos sinais de de RMN de 1H da substância 9 em DMSO-d 300 MHz

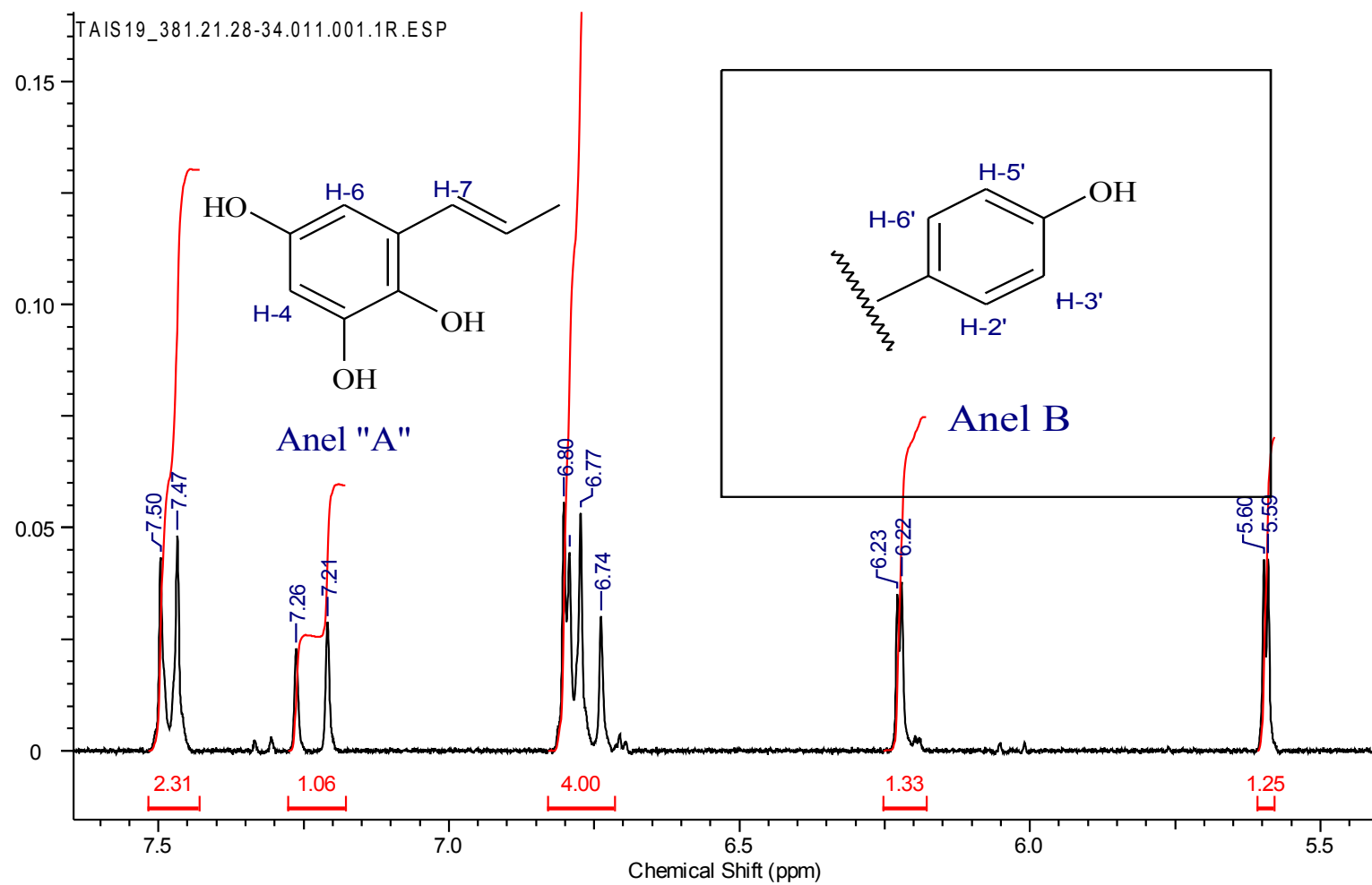


Figura 58: Mapa de contorno HMBC substância 9 em DMSO-d6 300 MHz

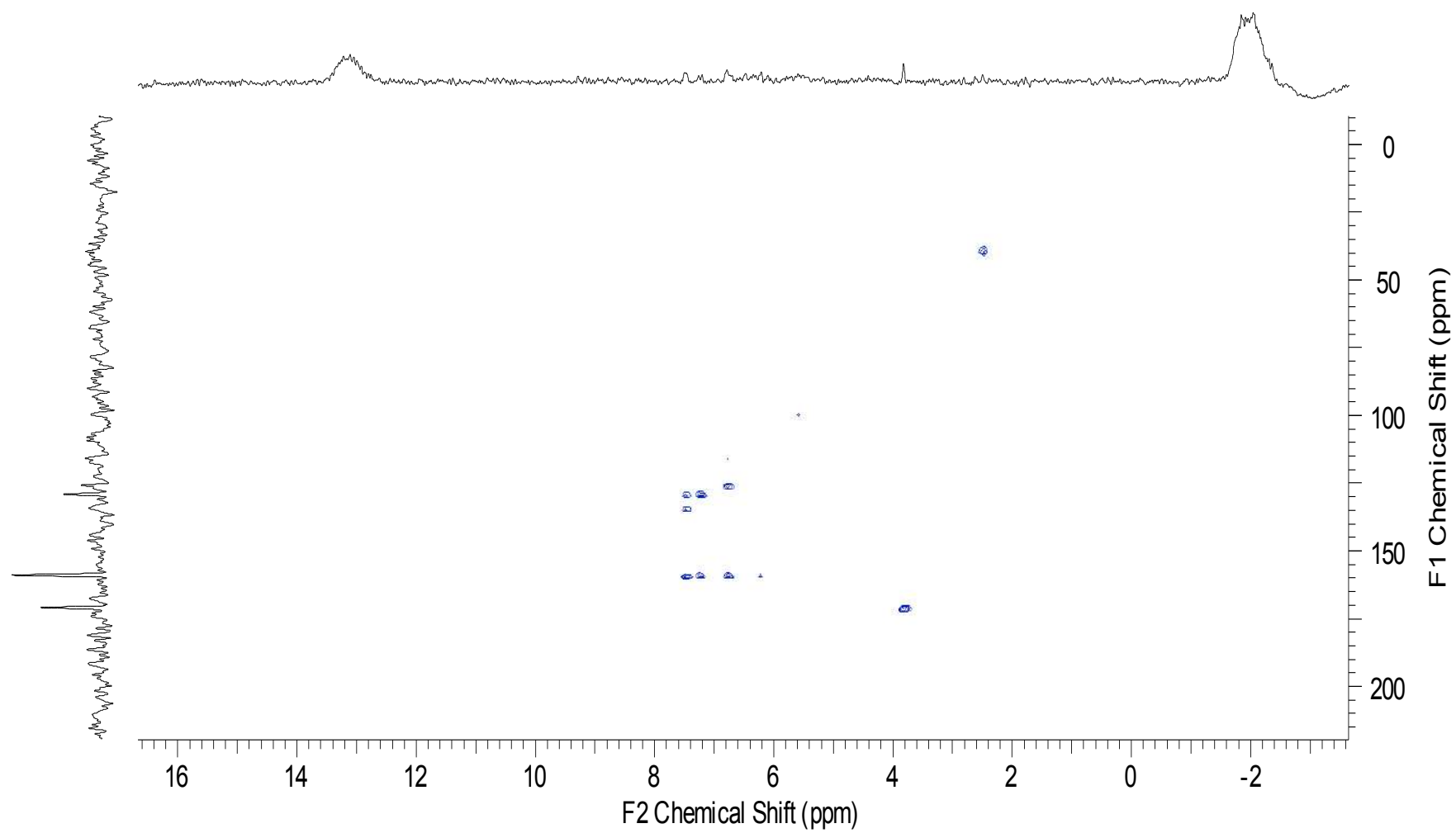


Figura 59: Expansão do mapa de contorno HMBC substância 9 em DMSO-d6 300 MHz

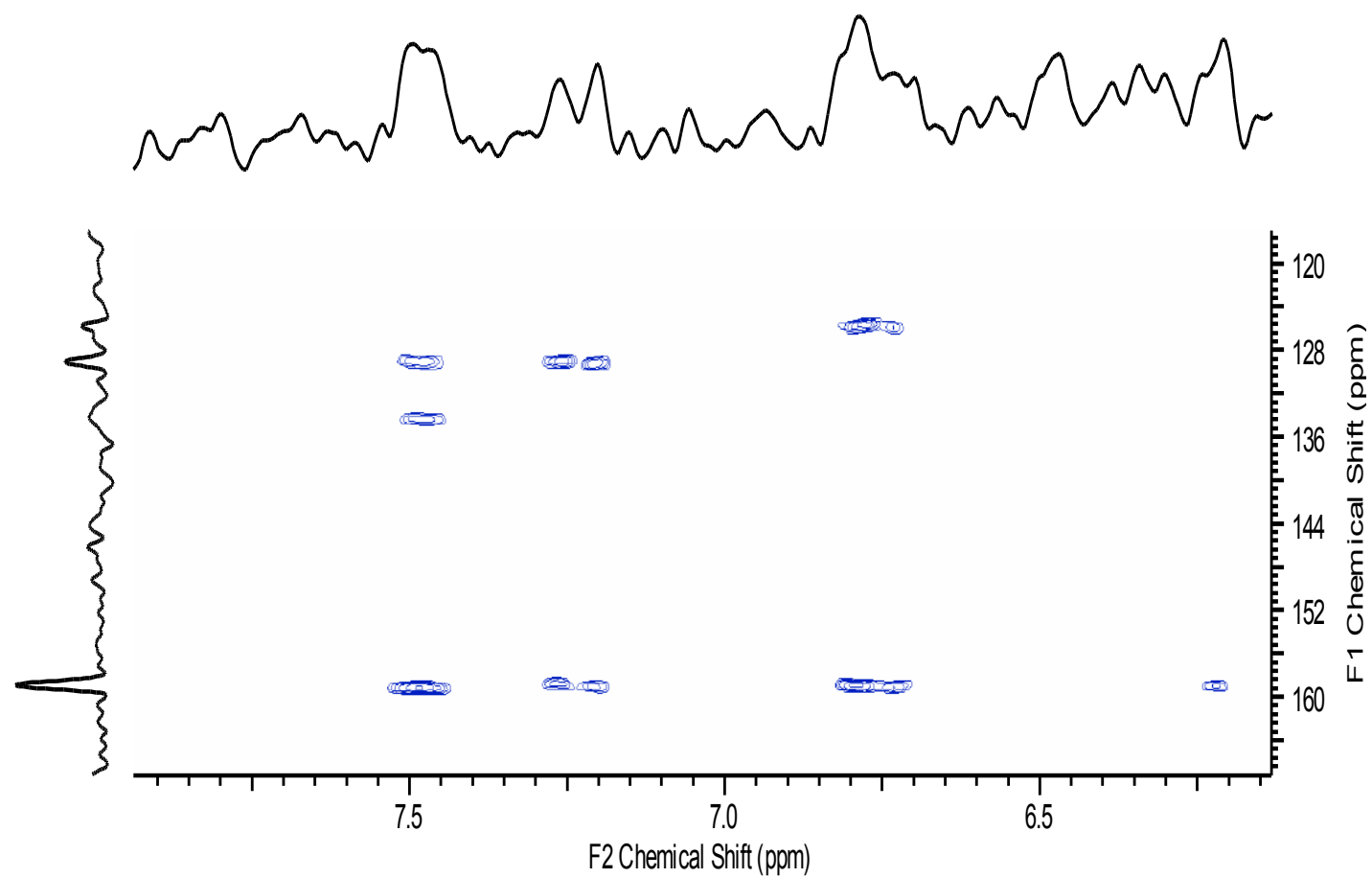
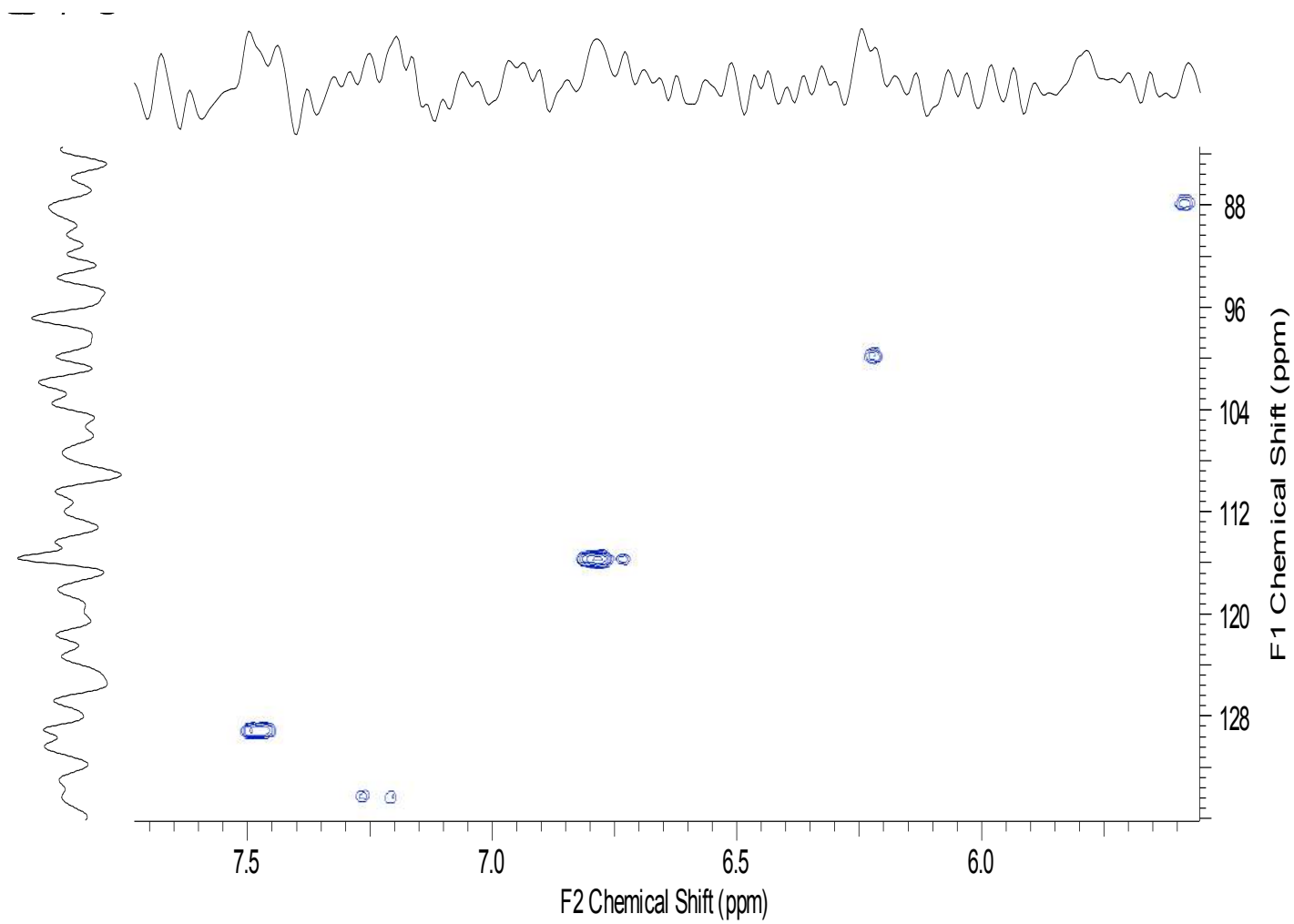


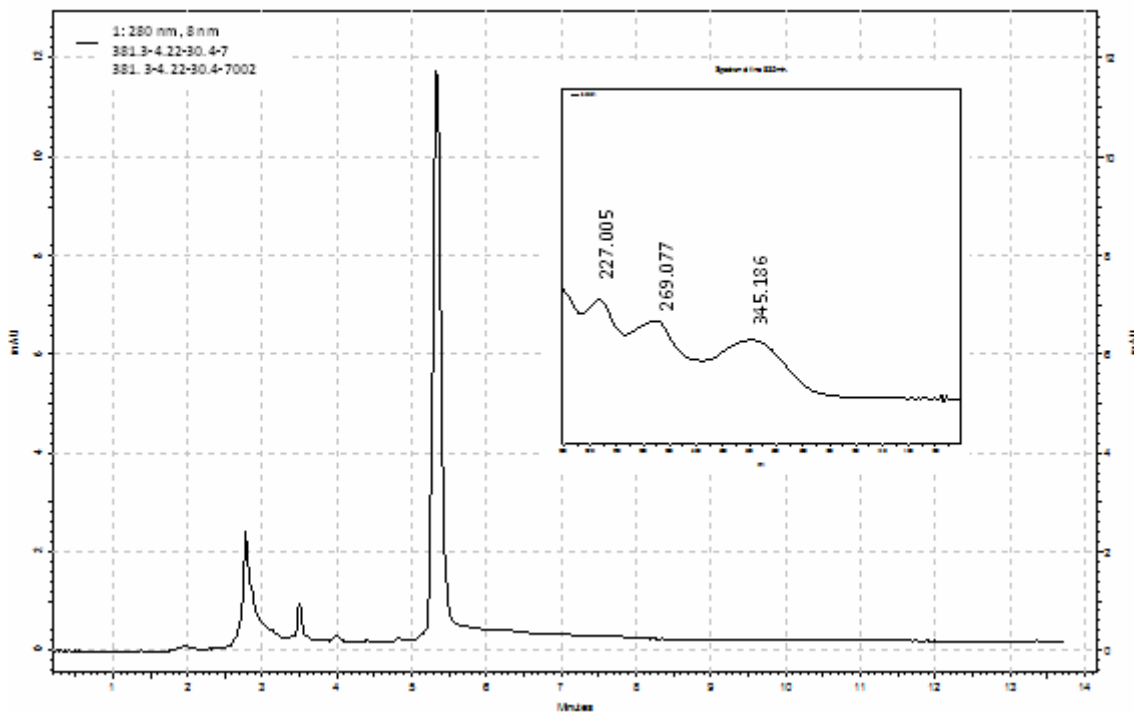
Figura 60: Expansão do mapa de contorno HSQC substância 9 em DMSO-d6 300 MHz



4.4.4 Substância 11

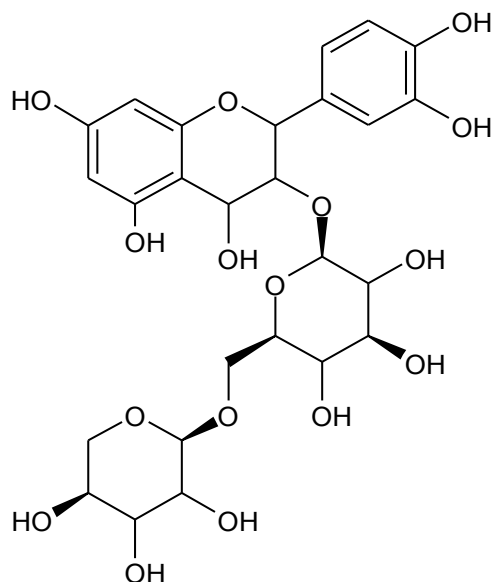
A fração 3-4.22-30.4-7 um sólido amarelo, foi analisada por CLAE e apresentou um pico intenso em $t_r = 5,4\text{min}$ quando analisado por CLAE-DAD indicando a presença de um flavonoide, pelas bandas apresentadas no espectro de UV com λ_{max} 227, 269 e 345 (**Figura 61**). Através de experimentos de co-injeção com padrões, foi possível identificar a flavona kaempferol-3-O-rutinosideo (**Figura 62**).

Figura 61: Cromatograma da fração 3.4-5 do 3º fracionamento da fase acetato das folhas em 280 nm. Coluna Phenomenex® Luna (2) FR C-18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 μm), CLAE-DAD (Shimadzu®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μm .



O kaempferol-3-O-rutinosideo é uma flavona que possui 2 unidades glicosil ligadas no carbono C3. É responsável pelo sabor amargo de alguns vegetais, e assim como a maioria dos flavonoides exibe potente atividade antioxidante (BRAVO,1998).

Figura 62: Estrutura da substância 11, kaempferol-3-O-rutinosídeo

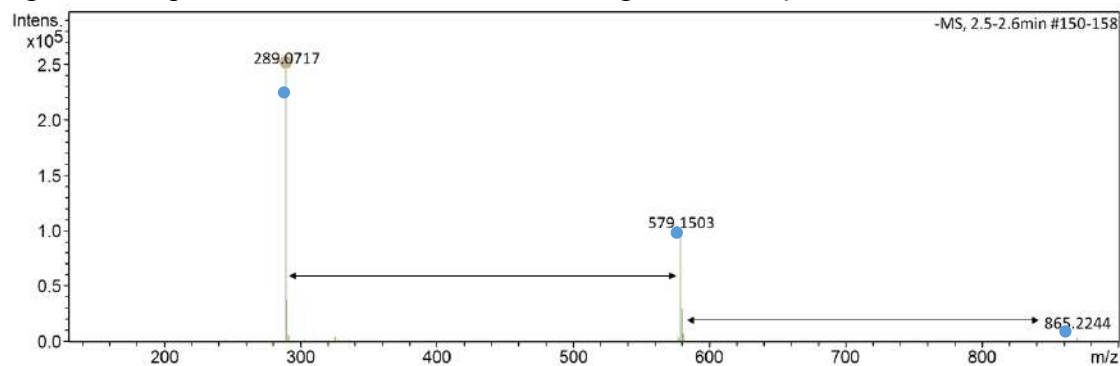


Kaempferol 3-O-rutinoside

4.4.5 Substância 12

A fração 16.11-13.10 (17,7 mg) apresentou-se como um sólido terroso vermelho, em CCDC-FR apresentou uma mancha de cor castanho-avermelhada quando revelada com Anisaldeído sulfúrico. No espectro de massas ESI-EM/EM no modo negativo (**Figura 63**) foi observado um íon molecular de m/z 865,2244 $[M-H]^-$. Quando submetido à fragmentação este íon apresentou perdas sequenciais de 290 u, característicos de trímeros de procianidinas oligoméricas.

Figura 63: Espectro de ESI-EM/EM no modo negativo da fração 16.11-13.10 da fase acetato



Os fragmentos desprotonados representados por (●) correspondem aprocianidinas com grau de polimerização variando de 1 a 3. Desta forma, esses sinais foram interpretados como os íons precursores de um monômero (m/z 289), dímero (m/z 577), trímero (m/z 865), da [epi]catequina, respectivamente, sugerindo tratar-se de uma procianidina C1.

Os espectros de segunda-ordem de procianidinas podem ser racionalizados a partir de três principais mecanismos de fragmentação: retro-Diels-Alder (RDA), quinona metídeo (QM) e clivagem heterocíclica (HRF) (GU *et al.*, 2003). O espectro desta amostra foi interpretado de acordo com os principais íons precursores observados e estão dispostos nas figuras 64, 65 e 66, e ilustram as principais rotas de fragmentação de um possível trímero encontrado em *D. purpurea*.

Figura 64: Mecanismo de fragmentação Clivagem heterocíclica (HRF)

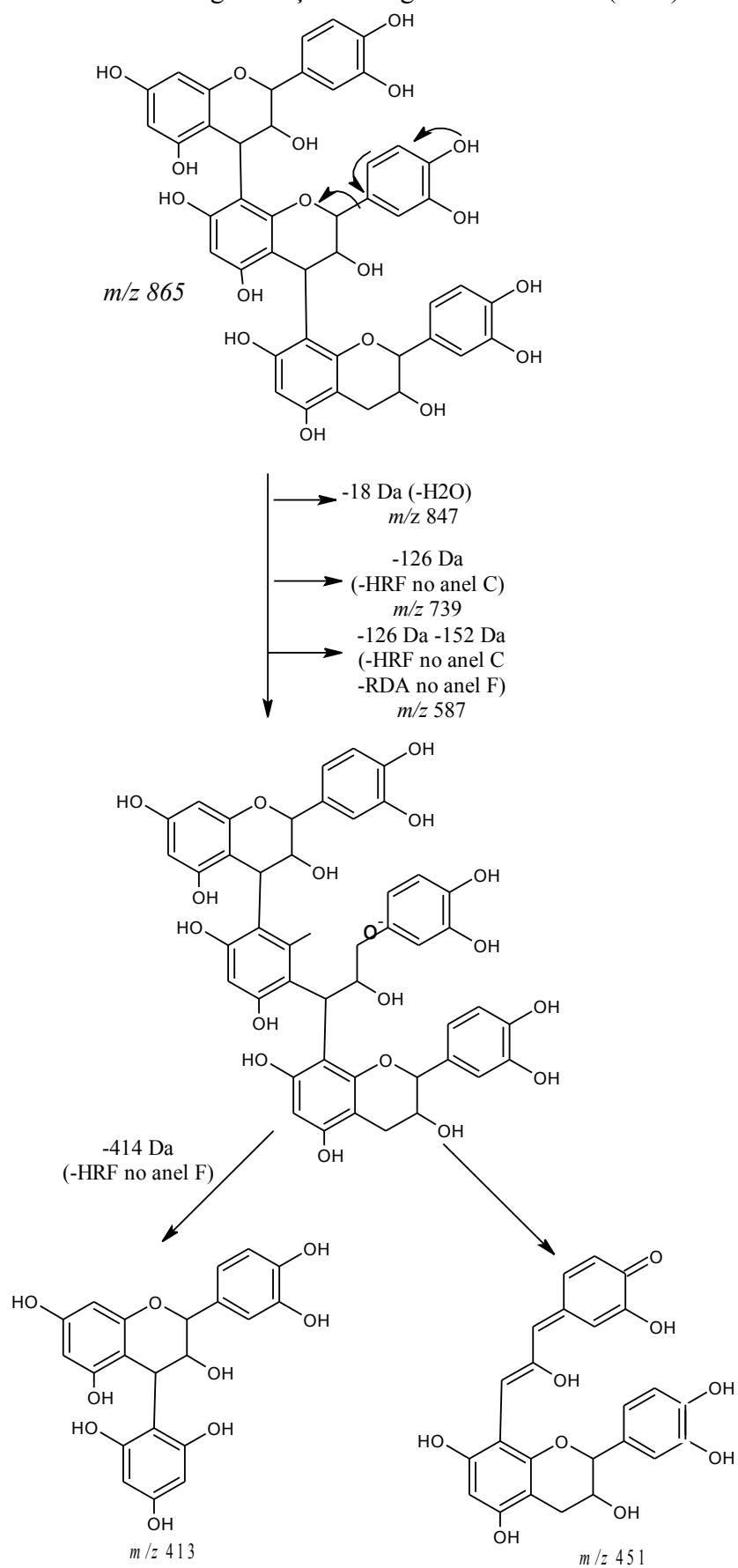


Figura 65: Mecanismo de fragmentação Retro Diels Alder (RDA)

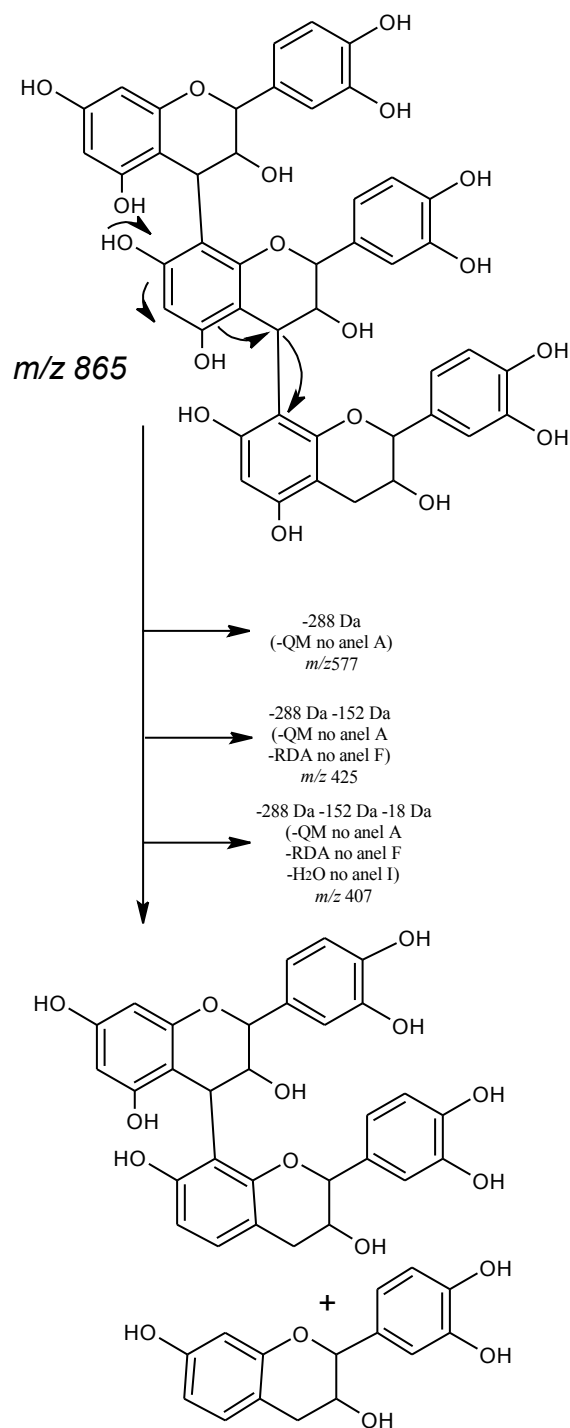
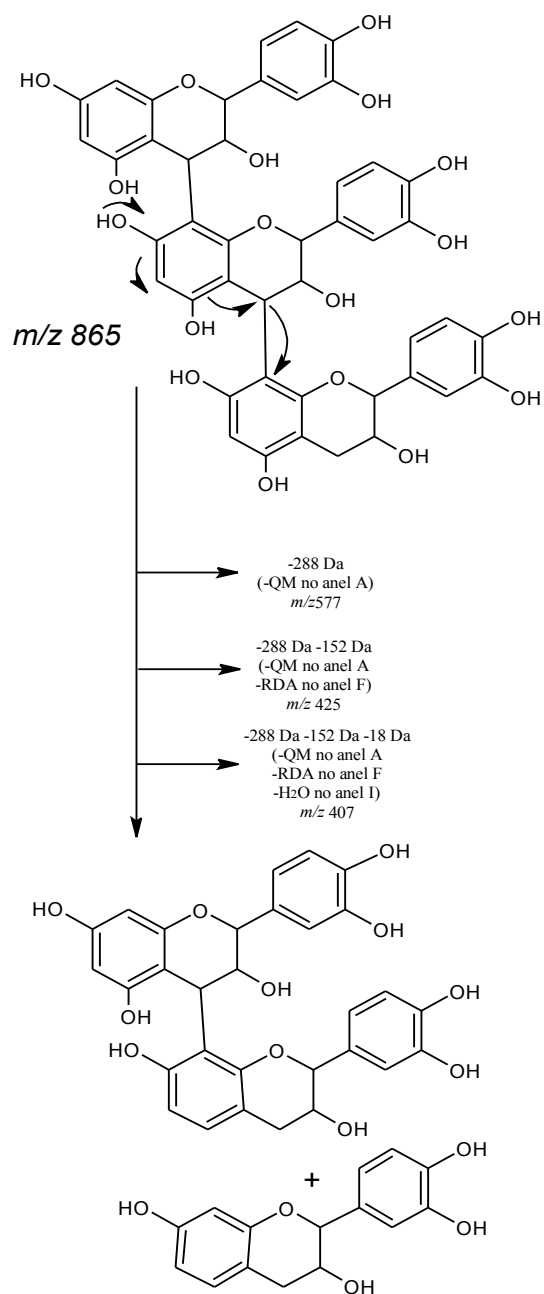


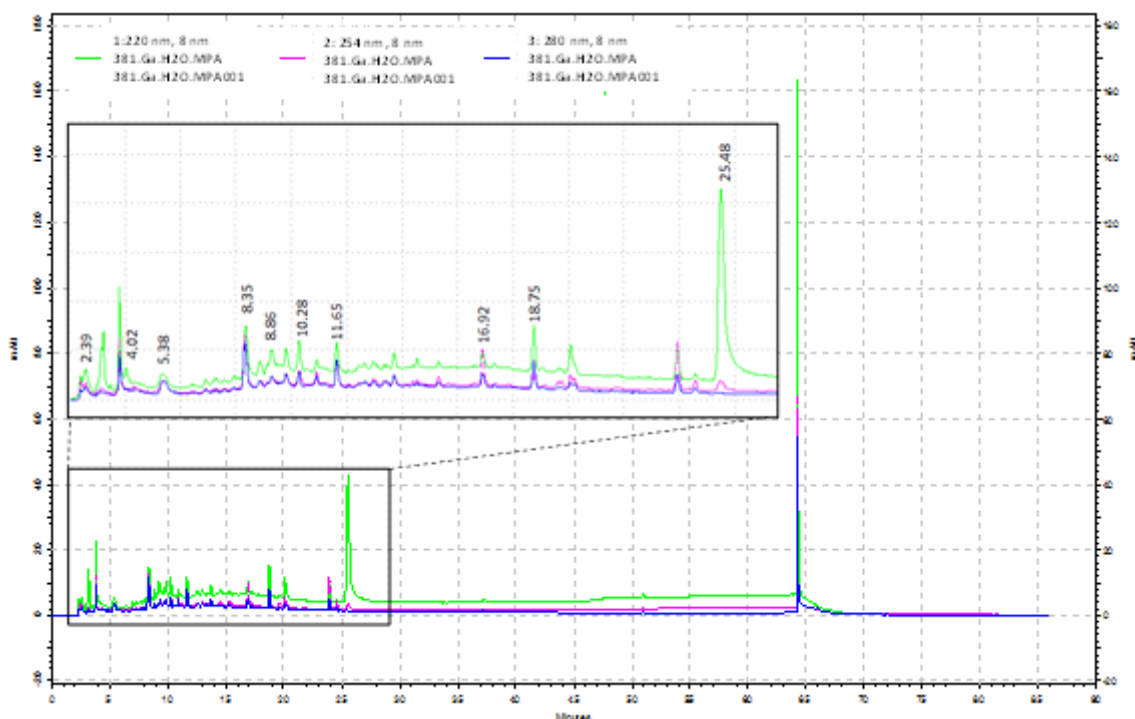
Figura 66: Mecanismo de fragmentação quiona-metídeo (QM)



4.5 Análises por CLAE-UV-DAD dos extratos hidrometanólicos das folhas de *D. purpurea*

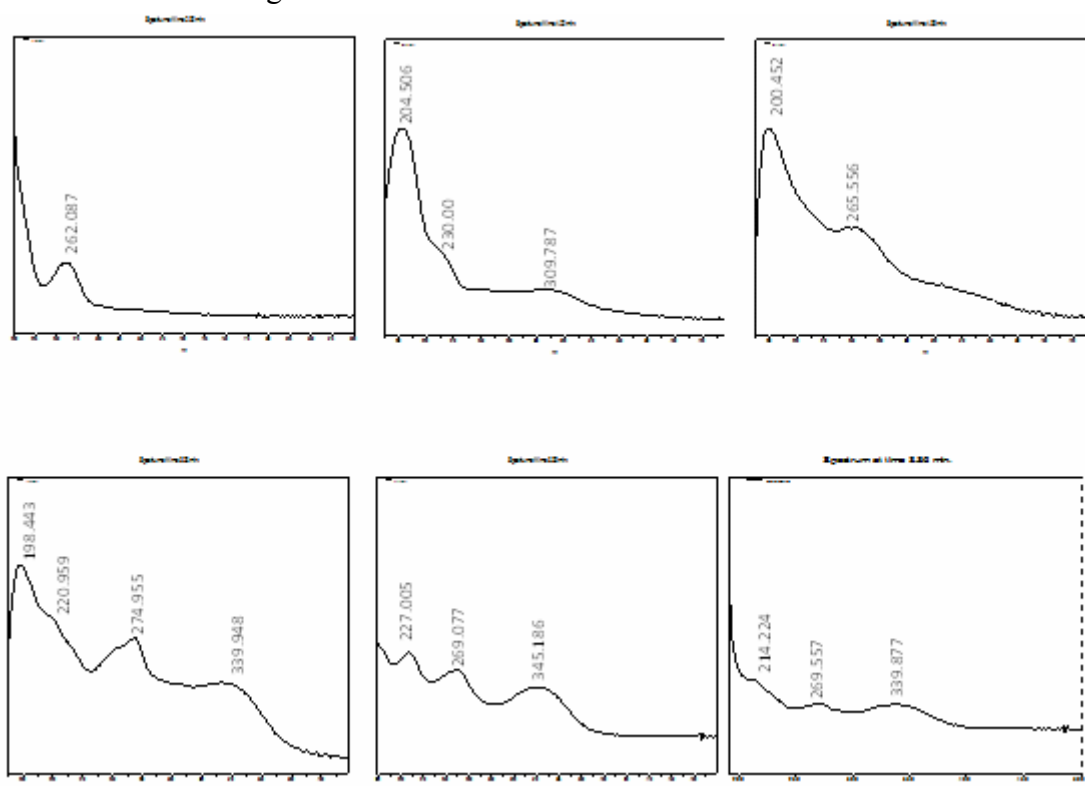
Embora a análise por CCDC tenha indicado a presença de substâncias nos três eluentes da SPE C18, a avaliação dos cromatogramas (**Figura 67**) para os três eluatos permitiu verificar que os constituintes químicos de *D.purpurea* se encontravam quase que totalmente no eluato A (MeOH/H₂O 2:8v/v). Processamento em diversos comprimentos de onda, usando o detector DAD, evidenciou enquanto que nos eluatos **B**(MeOH/H₂O 1:1 v/v) e **C** (MeOH) foram registrados apenas ruídos.

Figura 67: Perfil cromatográfico da fração MeOH/H₂O 2:8 v/v proveniente da fase hidrometanólica dos galhos de *D. purpurea*, submetida a limpeza com SPE em Strata FR18. Coluna Phenomenex® Luna (2) FR18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC-PAD (Shimadzu®), fluxo 1,0 mL min⁻¹



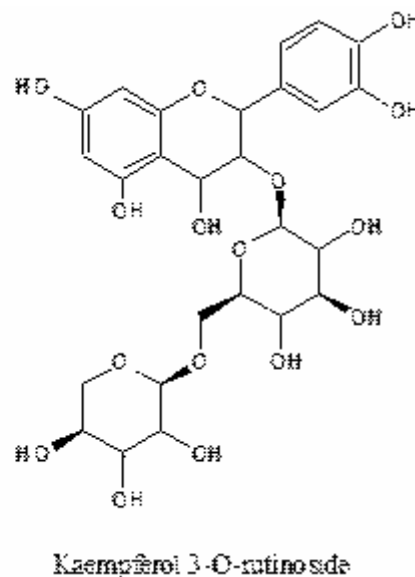
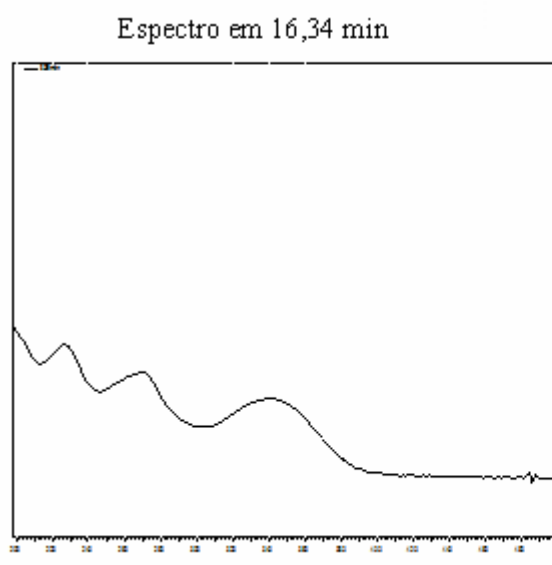
Com o auxílio do detector PAD (**figura 68**), foi realizada varredura na faixa espectral de 200-600 nm, foi possível identificar as classes de substâncias presentes na fase hidrometanólica das folhas *D. purpurea*. Assim como na fase hidrometanólica das folhas (item xxxx), foi possível visualizar a presença de catequinas monoméricas e oligoméricas (procianidinas). Flavonas e flavonóis monoméricos e possivelmente oligoméricos, e ácidos fenólicos com máximos de absorção em torno de 220 (MERKEN E BEECHER, 2000; RODRIGUES, 2010; ROHR et al., 2000).

Figura 68: Espectros na região do UV para os principais picos eluídos no cromatograma da fase hidrometanólica dos galhos



Através dos ensaios de co-injeção (condições experimentais no item 3.3.3) foi possível identificar presença do kampferol-3-O-rutinosideo, identificado como a substância 12 do fracionamento da fase AcOEt dos galhos.

Figura 69: kampferol-3-O-rutinosideo



5. ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.1 TOXICIDADE FRENTE À *ARTEMIA SALINA*

Para avaliar a toxicidade dos extratos de *Diplotropis purpurea*, foi usado o ensaio com o microcrustáceo *A. salina*. No trabalho realizado por Meyer et al (1982), foi estabelecido que havendo a mortalidade de mais de 50% dos microcrustáceos, o extrato é considerado tóxico para células de mamíferos. De acordo com o critérios estabelecidos pelo grupo de pesquisa, os extratos são considerados:

- De baixa toxicidade, quando apresentam de 0 a 20% de mortalidade;
- De média toxicidade, quando apresentam de 20 a 50% de mortalidade;
- De alta toxicidade, quando apresentam de 50 a 100% de mortalidade.

Neste trabalho, foram analisados os extratos metanólicos e aquosos dos galhos e folhas *D. purpurea*. o ensaio foi realizado em triplicata para cada uma das amostras, com concentrações variando entre 1000 a 30 µg/mL. Os dados estão apresentados em porcentagem da mortalidade (%) em cada poço (Tabela 19).

Tabela 18: Resultado do ensaio de toxicidade dos extratos de *D. purpurea* expressos em percentagem de mortalidade de *A. salina*.

EXTRATOS ($\mu\text{g/mL}$)	VALORES MÉDIOS (%)					
	1000	500	250	125	60	30
GaMeOH	83	47	24	57	40	17
GaMFH ₂ O	90	20	6	3	13	0
GaH ₂ O	67	9	19	37	0	20
FoMeOH	100	47	24	57	40	17
FoH ₂ O	90	47	37	43	3	47

A toxicidade dos extratos vegetais sobre *A. salina* sugere que estes são tóxicos para células de mamíferos, e é usado como ensaio preliminar na busca de substâncias antitumorais, antes da realização ensaios com diferentes culturas de células tumorais (MCLAUGHLIN et al., 1998). Todos os extratos apresentaram alta toxicidade na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Aos flavonoides são atribuídas as atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e anticarcinogênica, por sua habilidade de modular enzimas chaves (PANCHE, DIWAN E CHANDRA, 2016). O extrato metanólico das folhas (Fo MeOH), de onde foram isoladas diversos flavonoides com reconhecidas atividades antitumoral, apresentou 100% de mortalidade na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de IC₅₀ foram alcançados em nas concentrações de 500 e 125 $\mu\text{g/mL}$ (em destaque na Tabela 19) tanto para os extratos metanólicos de folhas e galhos, sugerindo um potencial antitumoral para estes extratos. No entanto, este é um ensaio preliminar, e outros ensaios precisam ser realizados.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A medida do potencial antibacteriano dos extratos vegetais é avaliada através do valor da CIM (Concentração Inibitória Mínima), que é a quantidade de extratos ou substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste. Este valor pode ser determinado

por diversos métodos, como por exemplo, difusão em ágar e macro e microdiluição em caldo. Vários fatores interferem no resultado da CIM, como a origem da planta, época de coleta, se o extrato foi preparado de plantas frescas ou seca, entre outros. Sendo assim, a medida desse valor é feita comparado-o frente a um padrão biológico de referência, chamado de controle positivo (OSTROSKY et al, 2008). Neste trabalho os extratos de *D. purpurea* foram avaliados pelos métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo com as bactérias que apresentaram disponibilidade no momento da realização do ensaio.

5.2.1 Método de difusão em ágar

Neste método, o extrato é colocado em um poço e se difunde através da superfície do meio de cultura contendo ágar, e assim pode inibir o crescimento da bactéria presente na área formando um halo, e através da medida deste halo é possível estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) (OSTROSKY et al, 2008). Neste estudo, os extratos metanólicos de folhas e galhos de *D. purpurea*, bem como suas respectivas fases DCM, AcOEt e hidroalcoólica foram testadas através da técnica de cavidade-poço contra 6 espécies patogênicas de bactérias: *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Nocardia brasiliensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*. Pelos tamanhos dos halos formados, estes foram classificando como:

- De alta atividade: halo maior do que 13 mm;
- De média atividade: halo entre 7 a 13 mm;
- De baixa atividade: halo menor do que 6 mm.

Na **tabela 19** estão apresentados todos os resultados obtidos:

Tabela 19.: Resultado da atividade antibacteriana dos extratos e fases de *D. purpurea* pelo método de difusão em ágar.

Bactérias	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Extratos	<i>Medida do Halo de Inibição em mm</i>					
GaMeOH	15	10	10	11=	9	9
GaFDCM	17	9	11	12	NA	NA
GaFAcOEt	11	9	NA	12	NA	7
GaMeOH/H₂O	11	7	NA	10	NA	8
FoMeOH	11	9	NA	9	8	9
FoFDCM	19	9	14	17	8	9
FoFAcOEt	17	8	12	14	11	NA
FoFMeOH/H₂O	11	9	NA	9	NA	8
Controle Positivo	30	9	8	21	21	10

O controle positivo utilizado foi oxitetraciclina

A concentração das amostras testadas foi de 20 µg/mL.

NA: Não Ativo

Todas as amostras testadas apresentaram atividade frente a *B. cereus* e *P. fluorescens*. Para *B. cereus* o melhor resultado foi o da fase DCM das folhas, que formou halo de 13 mm, seguido da fase AcOEt das folhas com halo de 11 mm. Os outros foram considerados de baixa atividade. Para *P. fluorescens*, o melhor resultado foi também o da fase DCM das folhas, que formou halo de 12 mm, seguido da fase AcOEt das folhas com halo de 8 mm. O extrato MeOH dos galhos e a fase DCM das folhas apresentaram média ou baixa atividade frente a todas as bactérias.

5.2.2 Método de microdiluição

Com o objetivo de averiguar outras atividades antimicrobianas dos extratos e fases de *D. purpurea*, estes foram testados pela metodologia de microdiluição frente à *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *Morganella morganii*, *S. marcescens*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*. Esta técnica utiliza placa de 96 poços, onde o extrato é diluído em diferentes concentrações. Esta técnica apresenta grandes vantagens, além de barato, é reproduzível e mais sensível que outros métodos disponíveis (ELOFF, 1998; OSTROSKY et al, 2008). Tudo isto torna possível experimentar várias plantas de uma única vez frente a várias cepas. Os resultados obtidos estão apresentados na **tabela 20**.

Tabela 20. Resultado da atividade antibacteriana dos extratos e fases de *D.purpurea* pelo método de microdiluição.

Bactérias	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Acinetobacter baumani</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Extratos	CIM (µg/mL)						
GaMeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000
GaFDCM	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
GaFAcOEt	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	500	>1000
GaH₂O	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
FoFMeOH/H₂O	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
FoH₂O	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

Das amostras testadas, as que apresentaram atividade antimicrobiana foram: Galho MeOH (1000 µg/mL) frente a *M. morganii* e Galho fase AcOEt na concentração de 1000 µg/mL frente a *A.baumani* e 500 µg/mL frente a *M. morganii*. Outras amostras não apresentaram atividade.

Neste teste foram utilizadas novamente as cepas de *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *S. aureus* e *P. fluorescens*, no entanto, os extratos não apresentaram atividade, enquanto no ensaio de cavidade-poço os extratos metanólicos de folhas e galhos apresentaram baixa atividade frente a *B. cereus* e *S. marcescens*, e no trabalho realizado por CURSINO (2015), utilizando os mesmos extratos deste estudo em ensaio de microdiluição, os mesmos foram altamente ativos. Isto é possível, pois ocorrem variações nos resultados quando técnicas diferentes são usadas para analisar um extrato vegetal, uma vez que vários fatores influenciam no resultado. Entre eles podemos citar: as cepas utilizadas, a origem da planta e o tipo de extrato preparado, entre outros (OSTROSKY et al, 2008).

No entanto, a atividade antibacteriana foi encontrada em outra espécie no gênero *Diplotropis* utilizando a técnica de microdiluição: extratos de diferentes polaridades de *D. ferruginea* foram ativos frente *E. coli* e *P. aeruginosa* (CERQUEIRA et al, 2011). Podemos atribuir a atividade do extrato metanólico dos galhos e da fase AcOEt dos galhos devido à presença de substâncias fenólicas, para as quais já foram identificadas em inúmeros estudos o potencial antibacteriano (ELOFF, 1998). Como por exemplo, podemos citar as substâncias fenólicas obtidas de ervas usadas como temperos (sálvia, alecrim, tomilho, manjerição, coentro, chá e lúpulo) os quais apresentaram atividade quando analisadas in vitro para patógenos alimentares (AHN et al, 2007), dentre estes podemos citar *B. cereus* e *P. fluorescens*, para os quais as amostras usadas neste estudo apresentaram atividade.

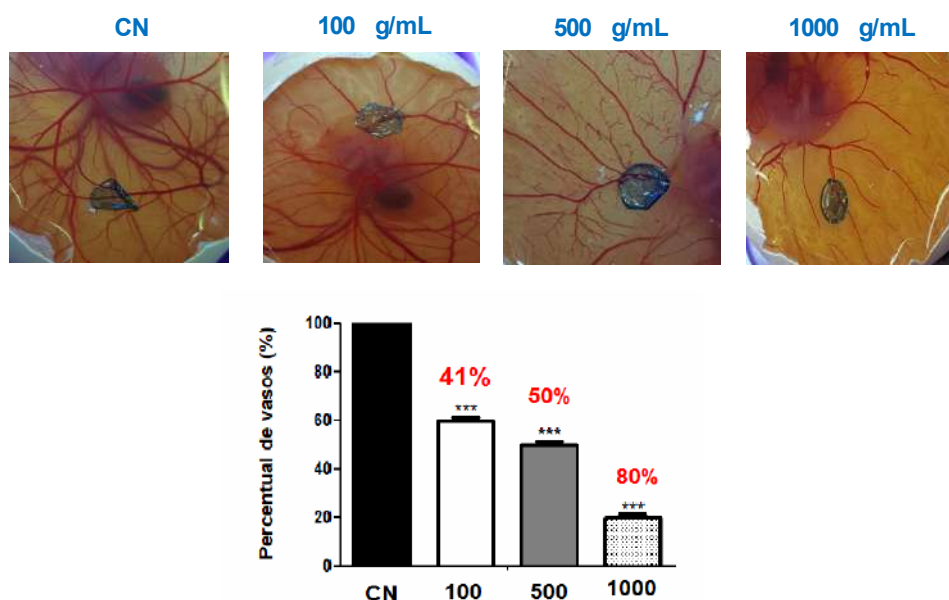
5.3 ATIVIDADE ANGIOGÊNICA DE *DIPLOTROPIS PURPUREA*

A resposta angiogênica é dada pela contagem de vasos sanguíneos na membrana corialantóica de embrião de galinha após um período entre 72-96 h, onde um aumento no número de vasos ao redor do implante dos discos de metilcelulose pode indicar uma atividade angiogênica para as amostras contidas neste disco, enquanto a diminuição do número de vasos ou a formação incompleta destes, indica a presença de um agente angiostático (RIBATTI, 2017).

5.3.1 Atividade angiogênica das folhas de *Diplotropis purpurea*

Das folhas de *D. purpurea* foram testadas as seguintes amostras: o extrato metanólico e as fases diclorometânica e hidrometanólica. O extrato metanólico das folhas de *D. purpurea* mostrou alto potencial angiostático, principalmente na concentração de 1000 µg/mL, onde houve inibição de até 80% da formação dos vasos sanguíneos (**Figura 70**). Já a fase DCM das folhas mostrou média atividade angiostática, principalmente na concentração de 1000 µg/mL, onde houve inibição de até 41% da formação dos vasos sanguíneos (**Figura 71**). Enquanto que a fase hidrometanólica das folhas (**Figura 72**) também mostrou alto potencial angiostático na concentração de 1000 µg/mL, onde houve inibição de até 80% da formação dos vasos sanguíneos, demonstrando que esta atividade está ligada às substâncias de maior polaridade presentes nas folhas.

Figura 70: Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato metanólico das folhas de *D. purpurea*



Legenda: Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN).

Figura 71: Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pela fase diclorometânica das folhas de *D. purpurea*

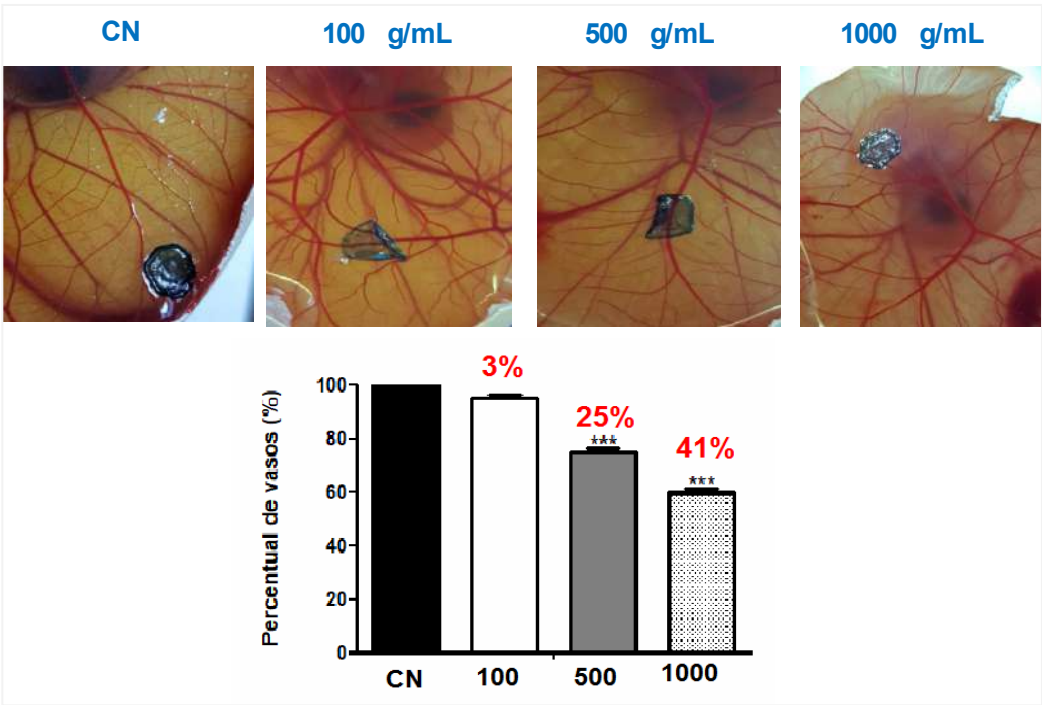
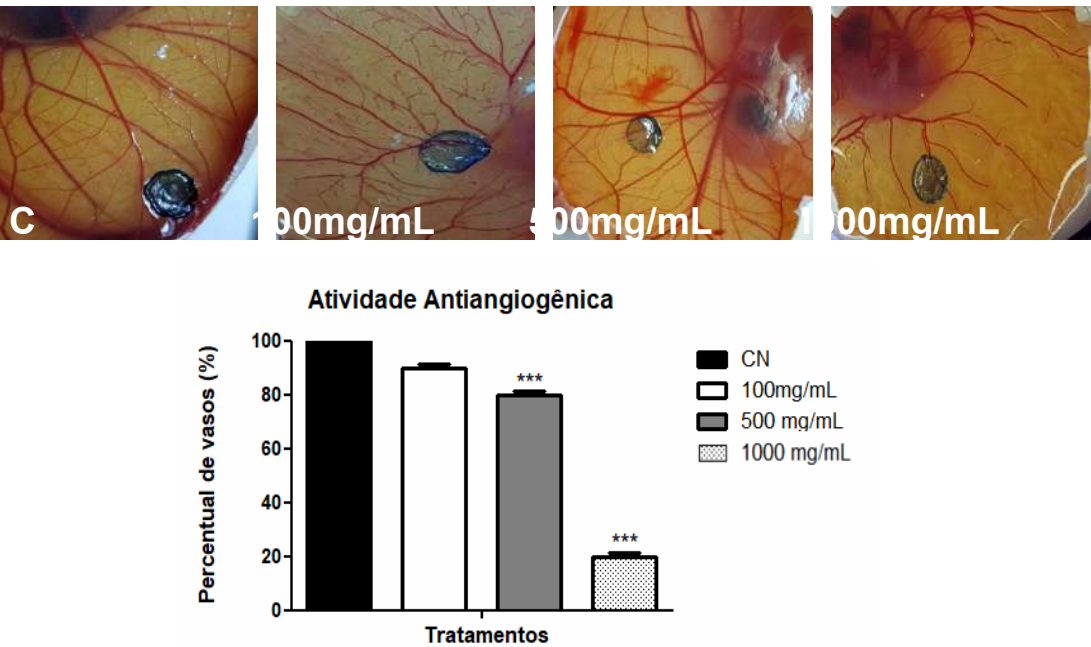


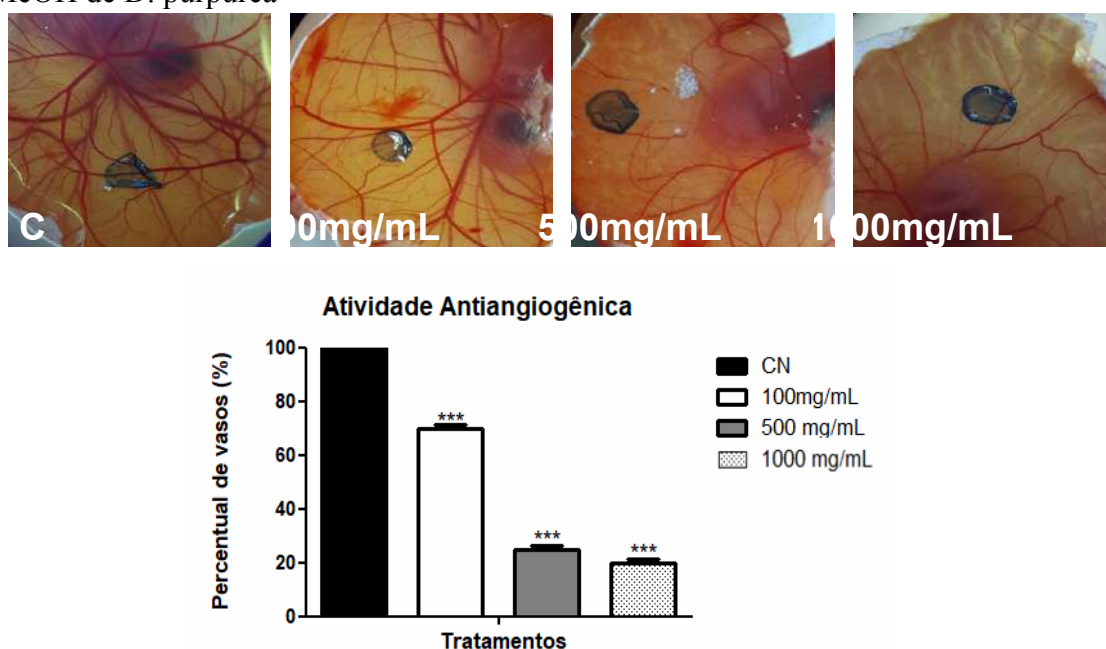
Figura 72 Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pela fase hidrometanólica das folhas de *D. purpurea*.



5.3.2 Atividade antiangiogênica dos galhos de *Diploptropis purpurea*

O extrato metanólico dos galhos de *D. purpurea* (**Figura 73**) mostrou alto potencial angiostático, principalmente na concentração de 1000 µg/mL, onde houve inibição de até 80% da formação dos vasos sanguíneos. E na concentração de 500 µg/mL o resultado ficou bem próximo, em torno de 78% de inibição. A fase DCM dos galhos (Figura 73) apresentou inibição de 70% na concentração de 1000 µg/mL. As fases AcOEt e MeOH 50% dos galhos (Figura 74) apresentaram os melhores resultados angiostático e alcançaram a CL₅₀ na concentração de 100 µg/mL.

Figura 73. Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato Galho MeOH de *D. purpurea*



Os resultados foram expressos como Média $\pm$ Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN).

Figura 74 Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo pela fase DCM dos galhos de *D. purpurea*.

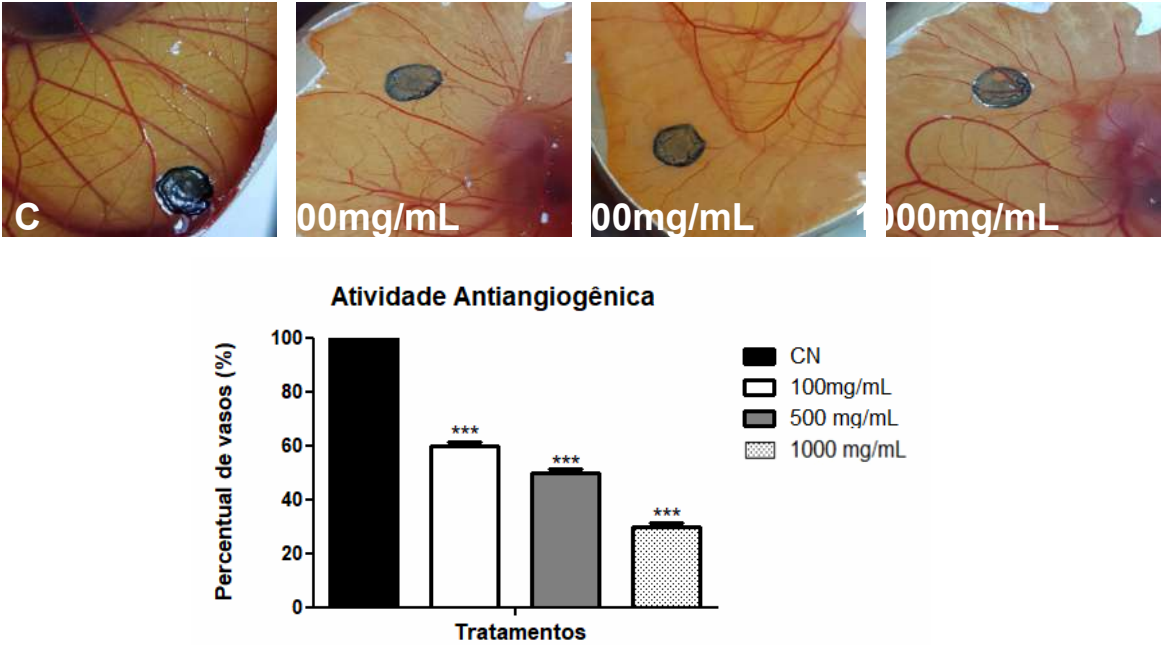


Figura 75 . Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pela Fase Acetato de Etila dos Galhos de *D. purpurea*

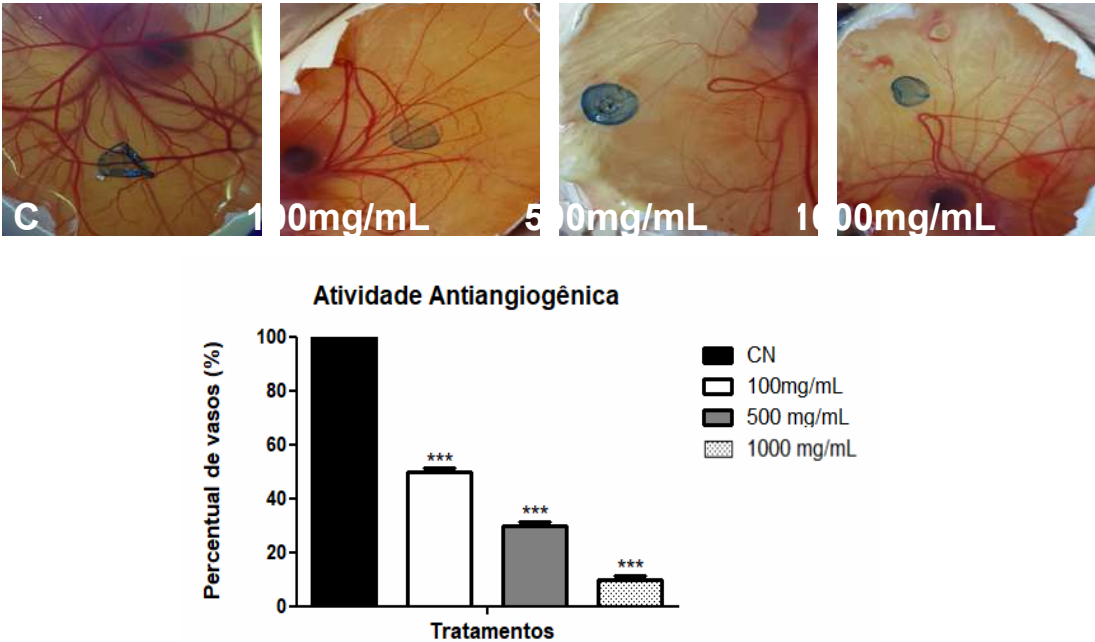
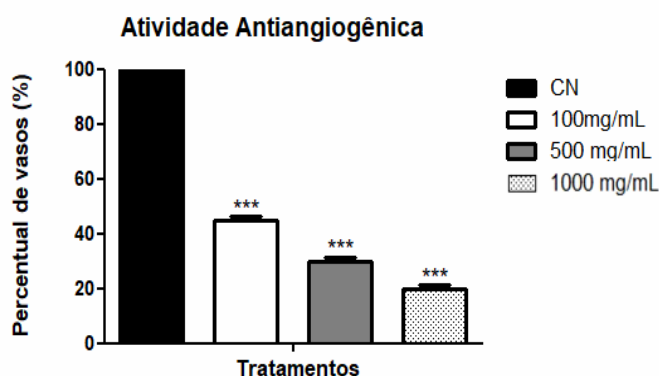


Figura 76 Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo extrato Galho H₂O de *D. purpurea*.

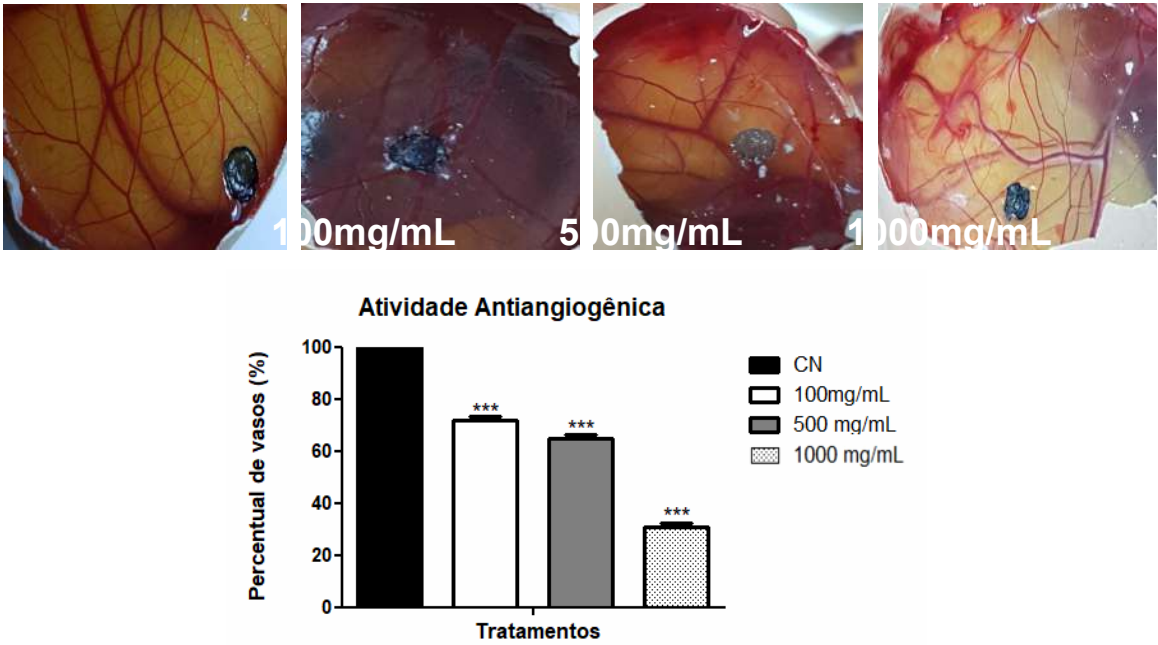


5.3.3 Atividade angiogênica das substâncias isoladas

Os fitoesteroides estigmasterol e lupeol mostraram alta atividade antiangiogênica. O triterpeno lupeol (**Figura 77**) inibiu cerca de 70% do crescimento dos vasos sanguíneos na concentração de 1000 µg/mL. Já o esteroide estigmasterol (**Figura 78**) mostrou-se altamente tóxico, causando a morte do embrião na concentração de 1000 µg/mL.

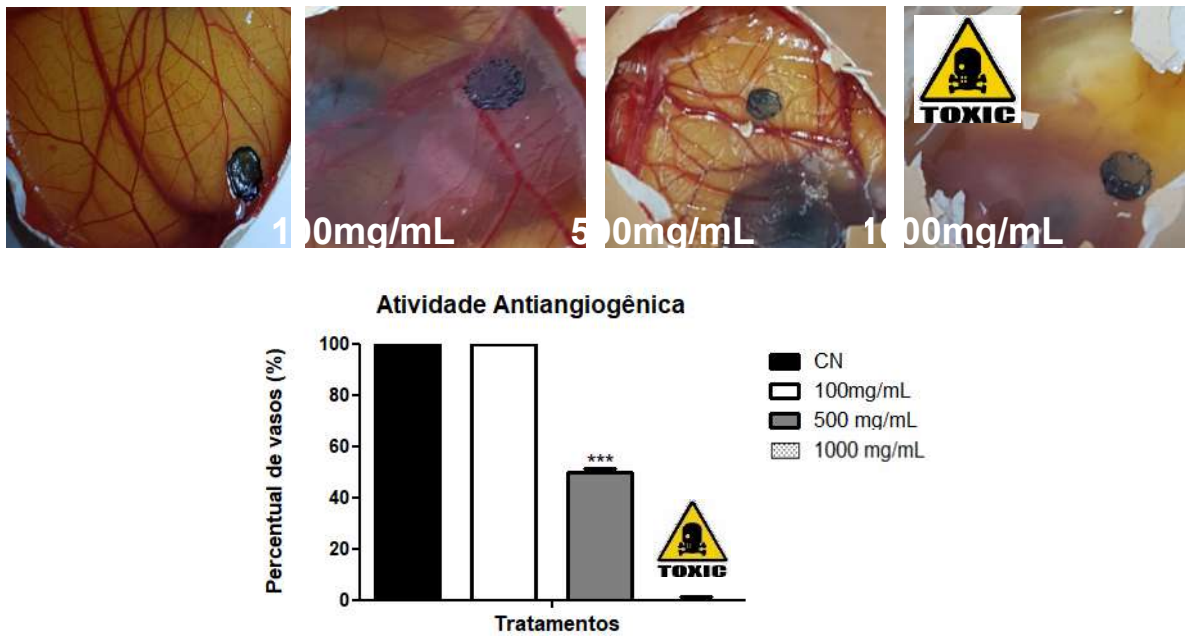
Há vários estudos na literatura apontando o potencial antiinflamatório, antitumoral, sobre artrite, diabetes, doenças coronárias e toxicidade renal e hepática para os dois, e estudos recentes mostram que o lupeol atua diretamente na indução de apoptose, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (VIJAY AVIN et al, 2014). No estudo realizado Kangsamaksin et al (2017), estigmasterol e lupeol inibiram a angiogênese em tumores em modelo de xenóerto em colangiocarcinoma *in vivo* usando ratos *wistar*, e não apresentaram toxicidade em mamíferos, ressaltando o potencial antitumoral dessas duas substâncias que são amplamente difundidas na natureza.

Figura 77 Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo lupeol



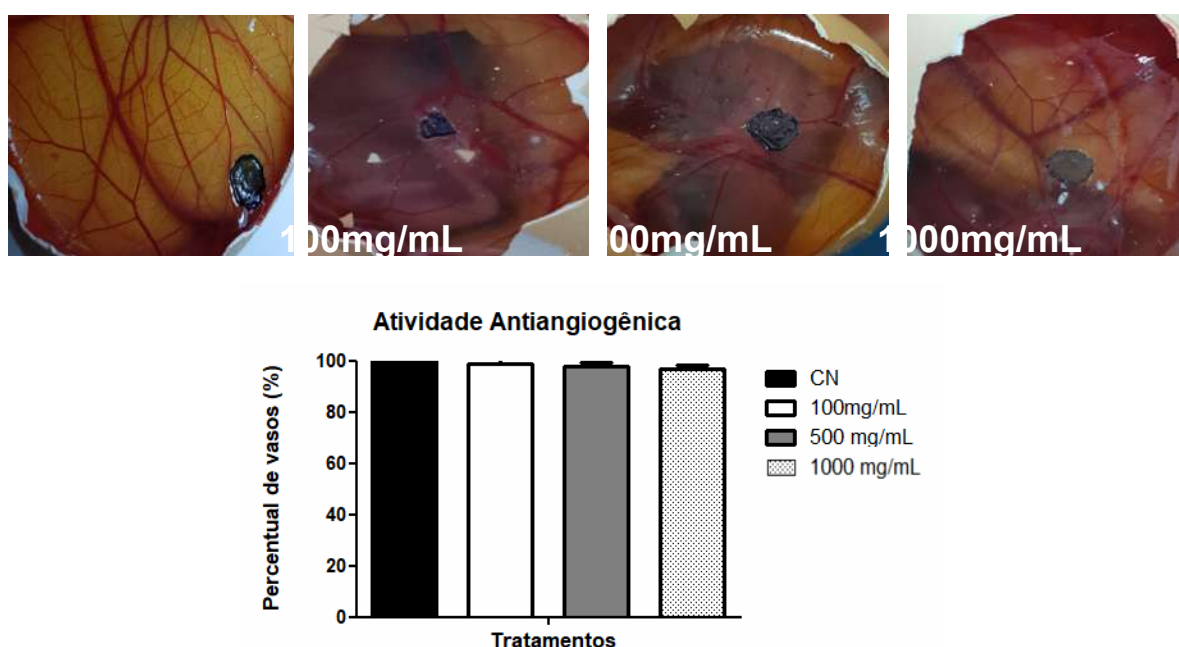
Os resultados foram expressos como Média $\pm$ Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN).

Figura 78 Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelo estigmasterol.



A quercetina (**Figura 79**) é um flavonol é amplamente distribuído na natureza, para o qual já foram relatadas as atividades antioxidante, antiinflamatória e de quimioprevenção. Apesar de já ter apresentado atividade antioangiogênica em modelos tumorais neste estudo, não foi constatada a atividade antioangiogênica em nenhuma concentração testada.

Figura 79 Avaliação da atividade antioangiogênica da quercetina



Os resultados foram expressos como Média $\pm$ Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho permitiu o isolamento de 12 substâncias dos extratos metanólicos das folhas e galhos de *D. purpurea*, contribuindo assim para o enriquecimento do conhecimento científico da espécie e do gênero.

Foram identificadas substâncias já isoladas de *D. purpurea*, como os fitoesteroides estigmasterol e β -sitosterol, e o triterpeno lupeol.

Pela primeira vez relatado para o gênero, foram identificadas as substâncias catequina, quercetina, isoorientina, 7,4'-dimetoxi-3-hidroxiflavona, 7,4'-dimetoxi-3-hidroxiflavona, apigenina, 3,5,6,4'-tetrahidroxiestilbeno.

Além das substâncias isoladas, também foi possível detectar a presença de oligômeros de (epi)catequina, as procianidinas B3 e C1.

Os extratos e fases apresentaram atividade de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, sendo que os extratos apresentaram taxa de mortalidade acima de 50% na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, considerado um ótimo resultado metanólicos e aquosos.

Quanto à atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, o extrato MeOH e as fases DCM de folhas e galhos apresentaram elevada atividade frente as bactérias *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescens*, com halos de inibição de 11 a 19 mm e de 9 a 17 mm respectivamente.

No ensaio de microdiluição as amostras galho MeOH (1000 $\mu\text{g/mL}$) foi ativa frente a *M. morganii* e galho fase AcOEt na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ frente a *A. baumani* e 500 $\mu\text{g/mL}$ frente a *M. morganii*.

Os extratos e fases de folhas e galhos apresentaram de média a alta atividade antiangiogênica, e das três substâncias testadas (estigmasterol, lupeol e quercetina) o estigmasterol 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi altamente tóxico, levando o embrião a morte.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. AGATONOVIC-KUSTRIN, S. et al. The relationship between major polyphenolic acids and stigmasterol to antioxidant activity in different extracts of *Myrmecodia platytyrea*. **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 115, p. 94–99, 2018.
2. ALLARD, Pierre-marie; WOLFENDER, Jean-luc. Deep metabolome annotation in natural products research : towards a virtuous cycle in metabolite identification. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], n. 36, p. 40–49, 2017.
3. ANTONIO, Marcos; SANTANA, Eduardo. Chemical composition of 36 Brazilian Amazon forest wood species. [s. l.], v. 61, p. 469–477, 2007.
4. ALMEIDA, J. R. G. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; DA SILVA, M. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BRAZ-FILHO, R.; BARBOSA-FILHO, J. M. Outros constituintes químicos de *Diploptropis ferrugínea* Benth. (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 44-46, 2003.
5. ALMEIDA, Jackson Roberto G. S. et al. Diploflavone, a New Flavonoid from *Diploptropis ferruginea* Benth. (Fabaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 1454–1457, 2005.
6. AVULA, B.; WANG, Y. H.; RUMALLA, C. S.; SMILLIE, T. J.; KHAN, I. A. Simultaneous determination of alkaloids and flavonoids from aerial parts of *Passiflora* species and dietary supplements using UPLC-UV-MS and HPTLC. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 9, p. 1177-1180, 2012.
7. AVIN, B. R. Vijay et al. Biochemical and Biophysical Research Communications New role of lupeol in reticence of angiogenesis , the cellular parameter of neoplastic progression in tumorigenesis models through altered gene expression. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s. l.], 2014.
8. BATT, CA. "*Bacillus cereus*." Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food International. **Journal of Food Microbiology**. 2014
9. BESERRA, Fernando Pereira et al. Lupeol, a pentacyclic triterpene, promotes migration, wound closure, and contractile effect in vitro: Possible involvement of PI3K/Akt and p38/ERK/MAPK pathways. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 1–17, 2018.
10. BRAZ-FILHO, RAIMUNDO et al. Flavonoids from amazonian Leguminosae. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 12, n. 18, p. 1184–1186, 1972.

11. BRAVO, Laura. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
12. CAPP, C.; ZENNIG, N.; WAJNR, S.; MAIA, A. L. Papel do Fator de Crescimento Endotelial Vascular nos Carcinomas de Tireóide. v. 29, n. 1, p. 51-59, 2009.
13. CERQUEIRA et al. Antimicrobial Activity of the Extract of Stem Bark of *Diploptropis Ferruginea* Benth. **Journal of Young Pharmacists**, v. 3, n. 4, p. 284-286, 2011.
14. CHEN, H. J.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 260-285, 2012.
15. CHAVES, D. A. et al. Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 524-530, 2016.
16. CHONG, J.; POUTARAUD, A.; HUGUENEY, P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. **Plant Science**, 177, 143-155, 2009.
17. COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; MCCULLAGH, M. Study of C- and O-glycosylflavones in sugarcane extracts using liquid chromatography - Exact mass measurement mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 483-490, 2008.
18. CURSINO, Lorena Mayara de Carvalho. **Estudo Fitoquímico e Bioatividade de *Diploptropis purpurea* e *Deguelia duckeana***. 2015. 188 f. Tese (Doutorado em Química) –Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus
19. A SILVA, T. M. S.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1119-1128, 2009.
20. DAS, S. et al. Design, synthesis and exploring the quantitative structure-activity relationship of some antioxidant flavonoid analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 21, p. 5050-5054, 2014.
21. DE OLIVEIRA, G. G. et al. Dereplication of Flavonoid Glycoconjugates from *Adenocalymma imperatoris-maximilianii* by Untargeted Tandem Mass Spectrometry-Based Molecular Networking. **Planta Medica**, v. 83, n. 7, p. 636-646, 2017.

22. DES, O. et al. DIFFERENTIATION DES HYDROXY-5 PAR SPECTROMETRIE. v. 345, n. 65, p. 15–16, [s.d.].
23. DOMON, B.; COSTELLO, C. E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. **Glycoconjugate Journal**, v. 5, n. 4, p. 397–409, 1988.
24. DORATO, Michael A.; BUCLEY, Lorrene A. Toxicology in the Drug Discovery and Development Process. **Current Protocols in Pharmacology**, p. 1–35, 2006.
25. DUCREY, B. et al. Analysis of flavonol glycosides of thirteen *Epilobium* species (onagraceae) by LC-UV and thermospray LC-MS. **Phytochemistry**, v. 38, n. 1, p. 129–137, 1995.
26. DUGGER, S. A., PLATT, A., GOLDSTEIN, D. B. Drug development in the era of precision medicine. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 3, 183–196, 2017.
27. DUTRA, M. G. et al. **Bauhinia unguolata L. : Investigação química por desreplicação na busca por substâncias com potencial biológicoXXVIII Congresso de Iniciação Científica**, 2008.
28. EGOSHI, C. T. et al. Quantification of tumor-induced angiogenesis on chicken embryo chorioallantoic membrane. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 1, p. 303–310, 2015.
29. ELOFF, Jacobus Nicolaas. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria a sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. May, p. 711–713, 1998.
30. FERNANDES, L. H. G. **Atividade anticarcinogênica da tributirina associada ou não ao sorafenibe em ratos Fischer-344 implantados com células JM-1.** [s.l.] Universidade de São Paulo - Programa de Pós-Graduação em Ciências Dos Alimentos - Área de Nutrição Experimental Atividade, 2018.
31. GARCÍA, M. D. et al. Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 1, p. 78–80, 1999.
32. GUIDO, Rafael V. C., ANDRICOPULO, Adriano D., OLIVA, Glaucius. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, 24(70), 81-98, 2010.
33. GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. ANTIBIÓTICOS: IMPORTÂNCIA TERAPÊUTICA E PERSPECTIVAS

- PARA A DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.
34. HADER, Donat-P. Historical development of bioassays. In: **Bioassays**. [s.l: s.n.]. p. 41–47.
 35. HAN, Y. N.; RYU, S. Y.; HAN, B. H. Antioxidant activity of resveratrol closely correlates with its monoamine oxidase-A inhibitory activity. **Archives of Pharmacal Research**, v. 13, n. 2, p. 132–135, 1990.
 36. HATA, Keishi; HORI, Kazuyuki; TAKAHASHI, Saori. Differentiation- and apoptosis-inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 65, n. 5, p. 645–648, 2002.
 37. HORTA, T. et al. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese - Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta$ 3. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 1–17, 2007.
 38. ISIK, Kamil; ÖZDEMİR-KOCAK, Fadime. Antimicrobial activity screening of some sulfonamide derivatives on some *Nocardia* species and isolates. **Microbiological Research**. 164 (2009): 49-58.
 39. JAMALUDDIN, Fathaiya; MOHAMED, Suhaila; LAJIS, Md Nordin. Hypoglycaemic effect of *Parkia speciosa* seeds due to the synergistic action of β -sitosterol and stigmasterol. **Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 339–345, 1994.
 40. JEANDET, P.; DOUILLET-BREUIL, A. C.; BESSIS, R. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism, **J. Agric. Food Chem.**, 50, 2731–2741, 2002.
 41. KANGSAMAKSIN, Thaned; CHAITHONGYOT, Supattra; WOOTHICHAIRANGSAN, Chanida. Lupeol and stigmasterol suppress tumor angiogenesis and inhibit cholangiocarcinoma growth in mice via downregulation of tumor necrosis factor- α ., p. 1–16, 2017.
 42. KARTNIG, T.; GÖBEL, I. Effect of fluorescence intensifiers on the fluorodensitometric determination of flavones and flavonols after detection with diphenylboric acid 2-aminoethyl ester. **Journal of Chromatography A**, v. 740, n. 1, p. 99–107, 1996.
 43. KIM, J. K. et al. Biotransformation of mulberroside A from *Morus alba* results in enhancement of tyrosinase inhibition. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 631–637, 2010.

44. KINGHORN, A. D.; BALANDRIN, M. F.; LIN, L. Alkaloid distribution in some species of the papilionaceous tribes sophoreae, dalbergieae, loteae, brongniartieae and bossiaeeae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 9, p. 2269-2275, 1982.
45. KONG, L.; WU, K.; LIN, H. **Inhibitory effects of quercetin on angiogenesis of experimental mammary carcinoma** Chinese Journal of Clinical Oncology, 2005.
46. L.M.L., P. et al. Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 19–24, 2011.
47. LEI, C. S. et al. Effects of quercetin combined with anticancer drugs on metastasis-associated factors of gastric cancer cells: in vitro and in vivo studies. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 51, p. 105–113, 2018.
48. LIANG, Shuang et al. Terpenoids from *daphne aurantiaca* and their potential anti-inflammatory activity. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 4, p. 532–535, 2010.
49. LIMA, Haroldo Cavalcante. *Diploptropis* Benth (Leguminosae-Faboideae)-Estudo dos táxons infragnéricos. **Acta Amazonica**, [s. l.], v. 5, n. 61, p. 61–75, 1985.
50. LIMA, Julianeli T. et al. Spasmolytic action of diploptropin, a furanoflavan from *Diploptropis ferruginea* Benth, Involves Calcium Blockade in Guinea-Pig Ileum. **Zeitschrift für Naturforschung B**, [s. l.], v. 60, n. 10, p. 1093–1100, 2005.
51. LUCETTI, Daniel L. et al. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of Inflammation**, [s. l.], v. 7, p. 1–11, 2010.
52. LV, L. et al. Stilbene glucoside from *polygonum multiflorum* thunb.: A novel natural inhibitor of advanced glycation end product formation by trapping of methylglyoxal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2239–2245, 2010.
53. MARQUES, Luís Carlos. Preparação de extratos vegetais. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**.v 3, n 2, 7 6 - 7 4, 2005.
54. MARQUES, G. S. et al. Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 51–57, 2013.
55. MATIAS, M. L. **Modificações Estruturais de Compostos Polifenólicos Glicosilados e Modulação das suas Atividades Antioxidantes**. [s.l.] Universidade de Coimbra - Departameno de Quimica Farmacêutica, 2012
56. MCLAUGHLIN, Jerry L., ROGERS, Lingling L. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v 32. 513-524, 1998.

57. MEYER, B. N. et al. *Brine Shrimp* : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, [s. l.], v. 45, n. July, p. 31–34, 1982.
58. O'CALLAGHAN, Yvonne C. et al. Cytotoxic and apoptotic effects of the oxidized derivatives of stigmasterol in the u937 human monocytic cell line. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 19, p. 10793–10798, 2010.
59. OLIVEIRA, V. G. DE; NUNOMURA, R. DE C. S.; NUNOMURA, S. M. **Desreplicação De Substâncias Fenólicas Dos Frutos De Mauritia Flexuosa L.F. Por Cromatografia Líquida Acoplada A Espectrometria De Massas**. Universidade Federal Do Amazonas - Instituto De Ciências Exatas - Programa De Pós-Graduação Em Química, 2014.
60. OLIVEIRA, F. et al. DESREPLICAÇÃO DE FLAVONOIDES DE *Hymenaea martiana* Hayne POR LC-MS/MS. p. 1–4, 2018.
61. OSTROSKY, Elissa A. et al. Divulgação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.
62. PEDRO, F.; GONALO, C. Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds - A Review of Spectroscopic Applications. **Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**, 2012.
63. PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; MCCULLAGH, M. Distinction of the C-glycosylflavone isomer pairs orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 5, p. 295–301, 2005.
64. PRATHEESHKUMAR, P. et al. Quercetin Inhibits Angiogenesis Mediated Human Prostate Tumor Growth by Targeting VEGFR- 2 Regulated AKT/mTOR/P70S6K Signaling Pathways. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–10, 2012.
65. QUEIROZ, E. F., HOSTETTMANN, K. The Importance of Hyphenated Techniques (LV/UV, LC/MS, LC/NMR) in the Search of Active Principles. **Revista Fitos**. v.2, n. 3, 39-53, 2006
66. QUEIROZ, E. F.; WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K. Modern approaches in the search for new lead antiparasitic compounds from higher plants. **Current Drug Targets**, v. 10, p. 202-211, 2009
67. RATH, G.; TOURÉ, A.; HOSTETTMANN, K. . Characterization of C-glycosylflavones from *Dissotis rotundifolia* by liquid chromatography - UV diode

- array detection - tandem mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 41, n. 5–6, p. 332–342, 1995.
68. RAUF, A. et al. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 11, p. 2109–2130, 2018.
 69. RAVAGNANI, C. P. et al. the Use of Shark Cartilage Extracts in Possible Therapies Against Cancer : a Review. **Rev. Saude**, v. 11, n. 1, p. 88–97, 2007.
 70. RODRIGUES, Cidália, COSTA, Teresa, MARTINS, Vitoria, MATOS, Fernando. Thoracic nocardiosis. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, n6, 2009.
 71. ROHR, Gabriela E. et al. Evaluation of Different Detection Modes for the Analysis of Procyanidins in Leaves and Flowers of *Crataegusspp* . Part II . Liquid Chromatography –Mass Spectrometry. **Phytochemical analysis: PCA**, [s. l.], v. 120, n. October 1998, p. 113–120, 2000.
 72. ROHR, Gabriela E.; MEIER, Beat; STICHER, Otto. Evaluation of Different Detection Modes for the Analysis of Procyanidins in Leaves and Flowers of *Crataegusspp* . Part I. Diode Array and Electrochemical Detection. **Phytochemical Analysis**, [s. l.], v. 112, n. October 1998, p. 106–112, 2000.
 73. RUSSO, GIAN LUIGI; RUSSO, MARIA; SPAGNUOLO, CARMELA; TEDESCO, IDOLO; BILOTO, STEFANIA; LANNITTI, ROBERTA; PALUMBO, R. Quercetin: A Pleiotropic Kinase Inhibitor Against Cancer. **Cancer Treatment and Research**, v. 159, p. 182–205, 2014.
 74. RYU, S. Y.; HAN, Y. N.; HAN, B. H. Monoamine oxidase-A inhibitors from medicinal plants. **Archives of Pharmacal Research**, v. 11, n. 3, p. 230–239, 1988
 75. RYU, G. et al. The radical scavenging effects of stilbene glucosides from *Polygonum multiflorum*. **Archives of pharmacal research**, v. 25, n. 5, p. 636–639, 2002.
 76. SÁNCHEZ-RABANEDA, F. et al. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 1, p. 35–42, 2003.
 77. SHARIFI-RAD, M., IRITI, M., SHARIFI-RAD, M., GIBBONS, S., & SHARIFI-RAD, J. (2016). Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of Rubiaceae, Fabaceae and Poaceae plants: A search for new sources of useful alternative antibacterials against MRSA infections. *Cellular and Molecular Biology*, 62(2), 39-45.

78. SHIN, N. H. et al. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 243, n. 3, p. 801–803, 1998.
79. SONG, W. et al. Quercetin inhibits angiogenesis-mediated human retinoblastoma growth by targeting vascular endothelial growth factor receptor. **Oncology Letters**, v. 14, n. 3, p. 3343–3348, 2017.
80. STASI, L. C. D.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica, In: UNESP (Ed.). São Paulo: [s.n.], 2002. p. 604.
81. VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T. **Plant polyphenols: Recent advances in epidemiological research and other studies on cancer prevention**. 1. ed. [s.l.] Copyright © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved., 2013. v. 39
82. VEIGA JUNIOR, V. F., PINTO, A. C., & MACIEL, M. M. (2005). **Plantas medicinais: cura segura?** *Química Nova*, 28(3), 519-528.
83. VIJAY AVIN, B. R. et al. New role of lupeol in reticence of angiogenesis, the cellular parameter of neoplastic progression in tumorigenesis models through altered gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], 2014.
84. YAO, H.; CHEN, Y.; SHI, P.; HUC, J.; LIA, S.; LIN, J. Screening and quantitative analysis of antioxidants in the fruits of *Livistona* R. Br using HPLC-DAD-ESI/MS coupled with pre-column DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2802-2807, 2012.
85. YUAN, L.; WANG, Y.; WANG, J.; XIAO, H.; LIU, X. Additive effect of zinc oxide nanoparticles and isoorientina on apoptosis in human hepatoma cell line. **Toxicology Letters**, v. 225, p. 294-304, 2014.
86. ZEEB, D. J.; NELSON, B. C.; ALBERT, K.; DALLUGE, J. Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 20, p. 5020-5026, 2000.
87. ZHAO, Pan, ZHANG, Xiujuan, DU, Pengcheng, LI, Guilian, LI, Luxi, LI, Zhenjun. Susceptibility profiles of *Nocardia* spp. to antimicrobial and antituberculous agents detected. **Nature**, 2017.
88. ZHOU, C. X. et al. Inhibition of Xanthine and Monoamine Oxidases by Stilbenoids From *Veratrum taliense*. **Planta Medica**, v. 67, p. 158–161, 2001.

89. SALEHI B, VENDITTI A, SHARIFI-RAD M, KRĘGIEL D, SHARIFI-RAD J, DURAZZO A, LUCARINI M, SANTINI A, SOUTO EB, NOVELLINO E, ANTOLAK H, AZZINI E, SETZER WN, MARTINS N. The Therapeutic Potential of Apigenin. **Int J Mol Sci.** 15;20(6):1305, 2019