



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA

CARLA DE MOURA MARTINS

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DOS  
COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Inga laurina* (Sw.) Willd  
(FABACEAE)**

Uberlândia

2017

CARLA DE MOURA MARTINS

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DOS  
COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Inga laurina* (Sw.) Willd  
(FABACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Sérgio A. L. de Moraes

Coorientador: Prof. Dr. Alberto de Oliveira

Uberlândia

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M386p  
2017

Martins, Carla de Moura, 1986-  
Prospecção fitoquímica e caracterização dos compostos bioativos de  
*Inga laurina* (Sw.) Willd (Fabaceae) / Carla de Moura Martins. - 2017.  
293 f. : il.

Orientador: Sérgio Antônio Lemos de Moraes.  
Coorientador: Alberto de Oliveira.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. *Inga* (Botânica) - Composição - Teses. 3.  
Antioxidantes - Teses. 4. Cerrados - Teses. I. Moraes, Sérgio Antônio  
Lemos de. II. Oliveira, Alberto de. III. Universidade Federal de  
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CARLA DE MOURA MARTINS

PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS  
BIOATIVOS DE *Inga laurina* (Sw.) Willd

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

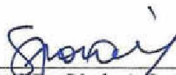
Área de Concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Sérgio A. L. de Moraes

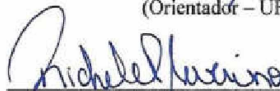
Coorientador: Prof. Dr. Alberto de Oliveira

Uberlândia, 28 de abril de 2017.

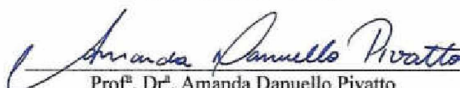
Banca examinadora:



Prof. Dr. Sérgio A. L. de Moraes  
(Orientador – UFU)



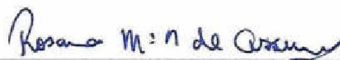
Prof. Dr. Richele Priscila Severino  
(Examinadora – UFG)



Prof. Dr. Amanda Danuello Pivatto  
(Examinadora – UFTM)



Prof. Dr. Alex Domingues Batista  
(Examinador – UFU)



Prof. Dr. Rosana Maria Nascimento de Assunção  
(Examinadora – UFU)





SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química,  
do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia  
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 67/PPQUI.

DATA: 28/04/2017

DISCENTE: Carla de Moura Martins

MATRÍCULA: 11223QMI002

TÍTULO DO TRABALHO: Prospecção fitoquímica e caracterização dos compostos bioativos de *Inga laurina* (Sw.) Willd.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química de Produtos Naturais

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Prospecção fitoquímica, ensaios biológicos e espectrofotométricos de plantas do Cerrado.

Às quatorze horas do dia vinte e oito de abril do ano dois mil e dezessete, no Auditório A, Bloco 50, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Amanda Danuello Pivatto, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Richele Priscila Severino, da Universidade Federal de Goiás, Rosana Maria Nascimento de Assunção e Alex Domingues Batista, da Universidade Federal de Uberlândia e Sérgio Antônio Lemos de Moraes, orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Regulamentar nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e aprovou o(a) candidata(o). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Prospecção fitoquímica e caracterização dos compostos bioativos de *Inga laurina* (Sw.) Willd. (Fabaceae).

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 18 horas e 10 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Profª Dra. Amanda Danuello Pivatto – UFTM

Profª Dra. Rosana Maria Nascimento de Assunção – UFU

Profª Dra. Richele Priscila Severino – UFG

Prof. Dr. Alex Domingues Batista – UFU

Professor(a) Orientador(a): Sérgio Antônio Lemos de Moraes – IQUFU

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os obstáculos superados.

A minha família que sempre me apoiou para que eu concluísse esta etapa da minha vida acadêmica, especialmente meus pais, Wantuir e Iradirce, meus irmãos, Elon e Fábio e meu noivo, Douglas.

Ao professor e orientador Sérgio Antônio Lemos de Moraes pela orientação e apoio durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao professor Alberto de Oliveira por sua coorientação e ensinamentos para o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPeN) Roberto Chang, Francisco José Tôres de Aquino, Evandro A. do Nascimento e Marcos Pivatto, por suas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores parceiros do NuPPeN, Carlos Henrique G. Martins da Universidade de Franca pela realização das análises de atividade antibacteriana e antifúngica, Glein M. de Araújo do Instituto de Biologia da UFU pela identificação da planta, Cláudio Vieira da Silva do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU pela realização das atividades antiprotozoária e citotóxica e Foued Salmen Spindola do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU pela realização da atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase.

Ao professor Norberto Peporine Lopes, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP, pela realização das análises de espectrometria de massas.

Aos amigos do laboratório de pesquisa (NuPPeN) Bruno, Daiane, Edmilson, Fabiana, Kelly, Luís, Mário, Raquel, Rodrigo e Rose pelo companheirismo, apoio e pela ajuda na realização de algumas etapas deste trabalho.

Aos alunos de Iniciação Científica Lais, Tricya, João, Alexandre e Tiara e as alunas Mikaela e Dhanubia que me auxiliaram em algumas análises deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório do Instituto de Química pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro ao projeto aprovado no edital universal 01/2011 (APQ-01178-11) e 01/14 (APQ-01392-14) e a Capes pela bolsa concedida.

Ao Instituto Federal Goiano-*Campus* Morrinhos pelo incentivo para a finalização do doutorado.

Ao Instituto de Química da UFU e ao Programa de Pós-Graduação em Química, que propiciaram a realização deste trabalho.

## RESUMO

A planta *Inga laurina* é encontrada no cerrado brasileiro e há poucos estudos na literatura sobre esta espécie, logo, o objetivo deste trabalho foi identificar os constituintes químicos das cascas e folhas da planta. Foram analisados a atividade antioxidante, antifúngica, inibidora da enzima  $\alpha$ -amilase, antibacteriana e antiprotozoária. Os resultados mostraram que os extratos e frações das folhas possuem grande quantidade de compostos fenólicos, especialmente a fração acetato de etila das folhas (FAE-F) que apresentou elevado teor de fenóis de totais e flavonoides, resultado que pode explicar a atividade antioxidante avaliada pelo método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila), a inibição da  $\alpha$ -amilase e a atividade antifúngica para *Candida glabrata*. Desta fração foi isolado o flavonoide miricetina-3-*O*-ramnosídeo e identificados onze compostos fenólicos por espectrometria de massas (EM): ácido gálico, (epi)galocatequina, derivado metílico do ácido gálico, galato de etila, miricetina-*O*-(*O*-galoil)-hexosídeo, miricetina-3-*O*-galactosídeo, miricetina galoil ramnosídeo, miricetina, quercetina-3-*O*-ramnosídeo, quercetina-3-*O*-(2''-galoil)-ramnosídeo e quercetina. Além desses compostos foram identificados a miricetina-3-*O*-acetilramnosídeo, ácido quínico digaloil, miricetina-3-*O*-ramnose-3'-*O*-ramnosídeo, ácido quínico trigaloil e ácido vanílico nas frações da coluna. Os extratos e frações das cascas da planta também apresentaram elevado teor de compostos fenólicos, como fenóis totais e proantocianidinas, especialmente as frações acetato de etila, *n*-butanol e metanol, as quais foram as amostras mais ativas para a inibição da  $\alpha$ -amilase, atividade antioxidante e atividade antifúngica para as espécies de *Candida* testadas. Da fração acetato de etila das cascas (FAEI-C e FAEI-C) foram isolados flavonoides e proantocianidinas inéditos no gênero *Inga*, 4'-*O*-metilgalocatequina, galocatequina, galocatequina-(4 $\alpha$ -8)-4'-*O*-metilgalocatequina, epigalocatequina-(2 $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7,4 $\rightarrow$ 8)-4'-*O*-metilgalocatequina e epigalocatequina-3-*O*-galoil-(2 $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7,4 $\rightarrow$ 8)-4'-*O*-metilgalocatequina. Além disso, foram identificados por EM os compostos (epi)galocatequina-3-*O*-galato, (epi)catequina-3-*O*-galato, 4'-*O*-metil-(epi)galocatequina-3-*O*-galato, (epi)galocatequina-3-*O*-(3'',4''-*O*-dimetil) galato, ácido *p*-cumárico e prodelfinidina B-4. Logo, a planta *I. laurina* foi caracterizada como uma espécie promissora como fonte de compostos fenólicos biologicamente ativos.

**Palavras-chave:** *Inga laurina*. Cerrado. Antioxidante. Antifúngico.  $\alpha$ -Amilase.

## ABSTRACT

The plant *Inga laurina* is found in Brazilian cerrado and there are few studies in the literature about this species, so the objective of this work was to identify the chemical constituents of bark and leaves that are responsible for the biological activities observed. Antioxidant activity, antifungal,  $\alpha$ -amylase inhibitor, antibacterial and antiprotozoal activity were analyzed. The results showed that the extracts and fractions of the leaves have a great amount of phenolic compounds, especially from the ethyl acetate fraction of leaves (FAE-F), which presented high total phenol content and flavonoids, a result that can explain the antioxidant activity evaluated by the method of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical, the  $\alpha$ -amylase enzyme inhibition and the antifungal activity for *Candida glabrata*. From this fraction, the flavonoid myricetin-3-*O*-rhamnoside was isolated and eleven phenolic compounds were identified by mass spectrometry (MS): gallic acid, (epi)-gallocatechin, methyl gallic acid derivative, ethyl gallate, myricetin-*O*-(*O*-galloyl)-hexoside, myricetin-3-*O*-galactoside, myricetin galloyl rhamnoside, myricetin, quercetin-3-*O*-rhamnoside, quercetin-3-*O*-(2"-galloyl)-rhamnoside and quercetin. After column fractionation of FAE-F, myricetin-3-*O*-acetyl-rhamnoside, digalloylquinic acid, myricetin-3-*O*-rhamnose-3'-*O*-rhamnose, trigalloylquinic acid and vanillic acid, were identified by MS. Extracts and fractions of the bark also showed a high content of phenolic compounds, such as total phenols and proanthocyanidins, especially the ethyl acetate, *n*-butanol and methanol fractions, which were the most active samples for inhibition of the  $\alpha$ -amylase enzyme, antioxidant activity and antifungal activity for the *Candida* species tested. From the ethyl acetate fraction of the bark (FAEI-C and FAEI-C) were isolated unreported flavonoids and proanthocyanidins in the genus *Inga* such as 4'-*O*-methylgallocatechin, gallocatechin, gallocatechin-(4 $\alpha$ -8)-4'-*O*-methylgallocatechin, epigallocatechin-(2 $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7,4 $\rightarrow$ 8)-4'-*O*-methylgallocatechin and epigallocatechin-3-*O*-galoyl- (2 $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7,4 $\rightarrow$ 8)-4'-*O*-methylgallocatechin. In addition, the compounds epigallocatechin-3-*O*-gallate, epicatechin-3-*O*-gallate, 4'-*O*-methyl-epigallocatechin-3-*O*-gallate, epigallocatechin-3-*O*-(3",4"-*O*-dimethyl) gallate, *p*-cumaric acid and prodelphinidine B-4 were identified by MS. Therefore, the *I. laurina* plant was characterized as a promising species as a source of biologically active phenolic compounds.

**Keywords:** *Inga laurina*. Brazilian Cerrado. Antioxidant. Antifungal.  $\alpha$ -Amylase.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação dos medicamentos desenvolvidos entre 1981-2014. ....	25
Figura 2: Fluxograma das rotas biossintéticas e precursores dos metabólitos secundários. ....	29
Figura 3: Rota biossintética dos flavonoides. ....	34
Figura 4: Flavonoides formados na via metabólica. ....	35
Figura 5: Biossíntese das flavonas, flavonois, catequinas e antocianidinas. ....	36
Figura 6: Classificação do gênero <i>Inga</i> de acordo com a APG III. ....	38
Figura 7: Estruturas de compostos isolados de algumas espécies do gênero <i>Inga</i> . ....	40
Figura 8: Estruturas de compostos isolados de <i>I. edulis</i> . ....	41
Figura 9: Mapa da ocorrência mundial de <i>I. laurina</i> . ....	42
Figura 10: Imagens da morfologia de <i>I. laurina</i> . ....	43
Figura 11: Galoil depsídeos de <i>I. laurina</i> . ....	45
Figura 12: Metabólitos isolados de <i>I. laurina</i> . ....	46
Figura 13: Estrutura da ingasaponina. ....	47
Figura 14: Estruturas de substâncias antioxidantes de plantas. ....	49
Figura 15: Esquema da formação de ERON no metabolismo celular. ....	50
Figura 16: Mecanismos de inibição da oxidação. ....	51
Figura 17: Estrutura dos polímeros do amido. ....	53
Figura 18: Fluxograma da extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de <i>I. laurina</i> . ....	66
Figura 19: Fluxograma do fracionamento em coluna cromatográfica do extrato etanólico das cascas de <i>I. laurina</i> . ....	67
Figura 20: Fluxograma do fracionamento da FAE das folhas de <i>I. laurina</i> . ....	80
Figura 21: Fluxograma do fracionamento das frações acetato de etila das cascas de <i>I. laurina</i> . ....	82
Figura 22: Triagem fitoquímica das frações acetato de etila das cascas de <i>I. laurina</i> . ..	89
Figura 23: Reação de um flavonol como reagente difenilborato aminoetanol. ....	89
Figura 24: Reação do colesterol com o reagente de Liebermann-Burchard. ....	90
Figura 25: Reação de sulfonação do colesterol com o reagente de Liebermann-Buchard. ....	91
Figura 26: Espectros UV-VIS dos extratos e frações das folhas e cascas de <i>I. laurina</i> . ..	92

Figura 27: Sistema de conjugação das flavonas e flavonóis. ....	93
Figura 28: Esquema da reação dos compostos fenólicos com o reagente Folin-Ciocalteu. ....	93
Figura 29: Reação de uma proantocianidina com vanilina. ....	95
Figura 30: Reações de complexação do alumínio com os flavonoides. ....	98
Figura 31: Reação do fenol com o radical DPPH. ....	101
Figura 32: Mecanismo de oxidação do fenol. ....	105
Figura 33: Voltamogramas dos extratos e frações das folhas de <i>I. laurina</i> . ....	107
Figura 34: Voltamogramas dos extratos e frações das cascas de <i>I. laurina</i> . ....	110
Figura 35: Reação do Gal-G2- $\alpha$ -CNP com a $\alpha$ -amilase. ....	113
Figura 36: Mecanismo para a clivagem da ligação glicosídica pelo sítio ativo da $\alpha$ -amilase. ....	116
Figura 37: Esquema da metodologia da microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima. ....	117
Figura 38: Reação de redução da resazurina. ....	118
Figura 39: Cromatograma por CLAE da FAE-F de <i>I. laurina</i> . ....	127
Figura 40: Estrutura da Sephadex LH-20. ....	128
Figura 41: Cromatograma CLAE/EM da FAE-F. ....	130
Figura 42: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 169. ....	132
Figura 43: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 305. ....	132
Figura 44: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 183. ....	133
Figura 45: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 197. ....	133
Figura 46: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 631. ....	134
Figura 47: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 479. ....	134
Figura 48: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 463. ....	135
Figura 49: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 615. ....	135
Figura 50: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 317. ....	136
Figura 51: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 447. ....	136
Figura 52: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 599. ....	137
Figura 53: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 301. ....	137
Figura 54: Mecanismos de fragmentações dos compostos identificados na FAE-F (I-V). ....	141

Figura 55: Mecanismos de fragmentações dos compostos identificados na FAE-F (VI-IX).	142
Figura 56: Mecanismos de fragmentações dos compostos identificados na FAE-F (X-XIII).	143
Figura 57: Cromatograma CLAE/EM da FAE1-F.	144
Figura 58: Cromatograma CLAE/EM da FAE2-F.	146
Figura 59: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 505.	147
Figura 60: Cromatograma CLAE/EM da FAE3-F.	149
Figura 61: Cromatograma CLAE/EM da FAE5-F.	151
Figura 62: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 495.	153
Figura 63: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 609.	154
Figura 64: Cromatograma CLAE/EM da FAE6-F.	154
Figura 65: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 647.	157
Figura 66: Cromatograma CLAE/EM da FAE7-F.	157
Figura 67: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 167.	159
Figura 68: Cromatograma CLAE/EM da FAE8-F.	160
Figura 69: Mecanismos de fragmentações dos compostos identificados (XIV-XVI).	162
Figura 70: Mecanismos de fragmentações dos compostos identificados XVII e XVIII.	163
Figura 71: CCD do composto FAE4-F.	164
Figura 72: Espectro UV-VIS do composto FAE4-F.	165
Figura 73: Cromatograma e espectro UV-VIS da FAE4-F.	166
Figura 74: Comparação do cromatograma por CLAE da FAE-F de <i>I. laurina</i> e da FAE4-F (em vermelho).	166
Figura 75: Espectro de massas de alta resolução do composto FAE4-F.	167
Figura 76: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 463.	168
Figura 77: Mecanismo de fragmentação para o composto FAE4-F.	169
Figura 78: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto FAE4-F.	170
Figura 79: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) na região de hidrogênios aromáticos do composto FAE4-F.	171
Figura 80: Mapa de contorno HSQC (DMSO- $d_6$ ) do composto FAE4-F na região de aromáticos.	172

Figura 81: Mapa de contorno HSQC (DMSO- $d_6$ ) na região glicosídica do composto FAE4-F. ....	172
Figura 82: Mapa de contorno COSY (DMSO- $d_6$ ) do composto FAE4-F. ....	174
Figura 83: Espectro DEPT-135 (DMSO- $d_6$ ) do composto FAE4-F.....	175
Figura 84: Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto FAE4-F.....	176
Figura 85: Cromatograma da FAEI-C.....	179
Figura 86: Cromatograma da FAEII-C.....	180
Figura 87: Cromatograma CLAE/EM da FAEI-C. ....	181
Figura 88: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 457.....	183
Figura 89: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 441.....	183
Figura 90: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 471.....	184
Figura 91: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 485.....	184
Figura 92: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 163.....	185
Figura 93: Mecanismos de fragmentação dos compostos XX-XXV. ....	186
Figura 94: Cromatograma CLAE/EM da FAEII-C.....	187
Figura 95: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 609.....	187
Figura 96: Mecanismo de fragmentação do composto XXVII.....	190
Figura 97: Cromatograma por CLAE semipreparativo da FAEI-2-C.....	191
Figura 98: Espectro de massas de alta resolução do composto FAEI-2-C.....	192
Figura 99: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 319.....	192
Figura 100: Mecanismo de fragmentação da 4'-O-metilgalocatequina. ....	194
Figura 101: Espectro RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto FAEI-2-C.....	195
Figura 102: Espectro RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) na região de aromático do composto FAEI-2-C.....	196
Figura 103: Mapa de contorno COSY (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEI-2-C. ....	198
Figura 104: Mapa de contorno HSQC (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEI-2-C. ....	199
Figura 105: Mapa de contorno HMBC (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEI-2-C.....	200
Figura 106: Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto FAEI-2-C. ...	201
Figura 107: Espectro DEPT-135 do composto FAEI-2-C. ....	202
Figura 108: Cromatograma por CLAE semipreparativo da FAEII-4-C.....	204
Figura 109: Cromatograma por CLAE semipreparativo da FAEII-5-C.....	205
Figura 110: CCD dos compostos isolados da FAEII-C com o revelador vanilina sulfúrica.....	206



Figura 111: Espectro de massas de alta resolução do composto FAEII-4-13-C. ....	207
Figura 112: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 305. ....	207
Figura 113: Mecanismo de fragmentação do íon $m/z$ 305. ....	208
Figura 114: Espectro RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto FAEII-4-13-C. ....	209
Figura 115: Espectro RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) na região de aromático do composto FAEII-4-13-C. ....	210
Figura 116: Mapa de contorno COSY ( $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto FAEII-4-13-C. ....	211
Figura 117: Mapa de contorno HSQC ( $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto FAEII-4-13-C. ....	212
Figura 118: Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto FAEII-4-13-C. ....	214
Figura 119: Espectro DEPT-135 ( $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto FAEII-4-13-C. ....	215
Figura 120: Espectro de massas de alta resolução do composto FAEII-4-14-C. ....	217
Figura 121: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 623. ....	217
Figura 122: Mecanismo de fragmentação do íon $m/z$ 623. ....	218
Figura 123: Espectro RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto FAEII-4-14-C. ....	219
Figura 124: Espectro RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) na região de aromático do composto FAEII-4-14-C. ....	220
Figura 125: Mapa de contorno COSY ( $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto FAEII-4-14-C. ....	222
Figura 126: Mapa de contorno HSQC ( $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto FAEII-4-14-C. ....	223
Figura 127: Espectro DEPT-135 ( $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto FAEII-4-14-C. ....	224
Figura 128: Mapa de contorno HMBC ( $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto FAEII-4-14-C. ....	225
Figura 129: Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto FAEII-4-14-C. ....	227
Figura 130: Espectro de massas de alta resolução do composto FAEII-4-24-C. ....	230
Figura 131: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 621. ....	231
Figura 132: Mecanismo de fragmentação do íon $m/z$ 621. ....	232
Figura 133: Espectro RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto FAEII-4-24-C. ....	234
Figura 134: Espectro RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) na região de aromático do composto FAEII-4-24-C. ....	235
Figura 135: Mapa de contorno COSY ( $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto FAEII-4-24-C. ....	236

Figura 136: Mapa de contorno HSQC (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-4-24-C.....	237
Figura 137: Mapa de contorno HMBC (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-4-24-C. ....	238
Figura 138: Mapa de contorno NOESY (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-4-24-C.....	239
Figura 139: Espectro DEPT-135 (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-4-24-C.....	240
Figura 140: Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-4-24-C.....	241
Figura 141: Espectro de massas de alta resolução do composto FAEII-5-35-C. ....	244
Figura 142: Espectro de massas (EM/EM) do íon $m/z$ 773.....	245
Figura 143: Mecanismo de fragmentação do íon $m/z$ 773.....	246
Figura 144: Espectro RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-5-35-C.....	248
Figura 145: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) na região de aromático do composto FAEII-5-35-C. ....	249
Figura 146: Mapa de contorno COSY (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-5-35-C.....	250
Figura 147: Espectro DEPT-135 (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-5-35-C.....	251
Figura 148: Estrutura da prodelfinidina A-2 3'- <i>O</i> - galoil. ....	252

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos compostos fenólicos.....	30
Tabela 2: Atividades biológicas de espécies do gênero <i>Inga</i> . ....	39
Tabela 3: Classificação das amilases.....	52
Tabela 4: <b>Concentração inicial (100%) em <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b> das amostras na cubeta utilizadas na determinação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH. ....	70
Tabela 5: Concentrações das amostras na microplaca (em $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) utilizadas na análise de inibição da $\alpha$ -amilase.....	73
Tabela 6: Rendimento da extração por maceração em etanol das cascas e folhas de <i>I. laurina</i> .....	86
Tabela 7: Rendimento da extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas e do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das cascas de <i>I. laurina</i> .....	87
Tabela 8: Triagem fitoquímica do extrato e frações das folhas de <i>I. laurina</i> .....	88
Tabela 9: Triagem fitoquímica do extrato e frações das cascas de <i>I. laurina</i> . ....	88
Tabela 10: Teor de fenóis totais (em mg EAG $\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ) das folhas e das cascas de <i>I. laurina</i> . ....	94
Tabela 11: Teor de proantocianidinas (em mg ECAT $\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ) das folhas e das cascas de <i>I. laurina</i> . ....	96
Tabela 12: Teor de flavonoides em mg EQ $\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ de folhas e cascas de <i>I. laurina</i> . ....	99
Tabela 13: Resultados da atividade antioxidante, expresso em $\text{CE}_{50}$ (em $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), para os extratos e frações de <i>I. laurina</i> . ....	102
Tabela 14: Coeficientes de correlação entre o método DPPH e o teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides das folhas e cascas de <i>I. laurina</i> . ...	103
Tabela 15: Potencial de oxidação, carga e corrente de pico dos extratos e frações das folhas de <i>I. laurina</i> .....	105
Tabela 16: Potencial de oxidação, carga e corrente de pico no tampão acetato dos extratos e frações das cascas de <i>I. laurina</i> . ....	108
Tabela 17: Potencial de oxidação, carga e corrente de pico no tampão fosfato dos extratos e frações das cascas de <i>I. laurina</i> . ....	108

Tabela 18: Coeficientes de correlação da voltametria de pulso diferencial, método DPPH, fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides das folhas de <i>I. laurina</i> .	111
Tabela 19: Coeficientes de correlação da voltametria de pulso diferencial, método DPPH, fenóis totais e proantocianidinas das cascas de <i>I. laurina</i> .	112
Tabela 20: Porcentagem de inibição da $\alpha$ -amilase para os extratos e frações das folhas e das cascas de <i>I. laurina</i> .	114
Tabela 21: Resultados da atividade inibitória da $\alpha$ -amilase, expresso em CE <sub>50</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), dos extratos e frações das folhas e das cascas de <i>I. laurina</i> .	114
Tabela 22: Resultados da atividade antibacteriana, expresso como CIM, em $\mu\text{g mL}^{-1}$ , do extrato e frações das folhas de <i>I. laurina</i> .	119
Tabela 23: Resultados da atividade antibacteriana, expresso como CIM, em $\mu\text{g mL}^{-1}$ , do extrato e frações das cascas de <i>I. laurina</i> .	120
Tabela 24: Resultados da atividade antifúngica, expresso como CIM, em $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e citotóxica, expresso como CC <sub>50</sub> , em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato e frações das folhas de <i>I. laurina</i> .	122
Tabela 25: Resultados da atividade antifúngica, expresso como CIM em $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e citotóxica, expresso como CC <sub>50</sub> , em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato e frações das cascas de <i>I. laurina</i> .	123
Tabela 26: Resultados da atividade leishmanicida, expresso como CI <sub>50</sub> , em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato e frações das folhas e cascas de <i>I. laurina</i> .	126
Tabela 27: Porcentagem da atividade antioxidante das frações da coluna da FAE-F de <i>I. laurina</i> .	128
Tabela 28: Compostos identificados na FAE-F por CLAE/EM-EM/EM.	131
Tabela 29: Compostos identificados na FAE1-F.	145
Tabela 30: Compostos identificados na FAE2-F.	148
Tabela 31: Compostos identificados na FAE3-F.	150
Tabela 32: Compostos identificados na FAE5-F.	152
Tabela 33: Compostos identificados na FAE6-F.	156
Tabela 34: Compostos identificados na FAE7-F.	158
Tabela 35: Compostos identificados na FAE8-F.	161
Tabela 36: Atribuição dos sinais de hidrogênios do espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto FAE4-F e comparados com a da miricetina-3-O-ramnosídeo.	177

Tabela 37: Atribuição dos sinais dos átomos de carbono no espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto FAE4-F (miricetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo). .....	178
Tabela 38: Compostos identificados na FAEI-C por CLAE/EM-EM/EM.....	182
Tabela 39: Compostos identificados na FAE-II-C por CLAE/EM-EM/EM. ....	188
Tabela 40: Atribuição dos hidrogênios do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto FAEI-2-C e comparados com a da (+)-(2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> )-4'- <i>O</i> -metilgalocatequina. .	202
Tabela 41: Atribuição dos carbonos do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto FAEI-2-C e comparados com a (+)-(2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> )-4'- <i>O</i> -metilgalocatequina.....	203
Tabela 42: Atribuição dos hidrogênios do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto FAEII-4-13-C e comparados com a galocatequina.....	215
Tabela 43: Atribuição dos carbonos do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto FAEII-4-13-C e comparados com a galocatequina.....	216
Tabela 44: Atribuição dos hidrogênios do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto FAEII-4-14-C e comparados com a (-)-galocatequina-(4 $\alpha$ -8)-(-)-epigalocatequina.....	228
Tabela 45: Atribuição dos carbonos do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto FAEII-4-14-C e comparados com a (-)-galocatequina-(4 $\alpha$ -8)-(-)-epigalocatequina.....	229
Tabela 46: Atribuição dos hidrogênios do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto FAEII-4-24-C e comparados com a (-)-epigalocatequina-(2 $\beta$ $\rightarrow$ <i>O</i> $\rightarrow$ 7,4 $\beta$ $\rightarrow$ 8)-(-)-galocatequina. ....	242
Tabela 47: Atribuição dos carbonos do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto FAEII-4-24-C e comparados com a (-)-epigalocatequina-(2 $\beta$ $\rightarrow$ <i>O</i> $\rightarrow$ 7,4 $\beta$ $\rightarrow$ 8)-(-)-galocatequina. ....	243
Tabela 48: Atribuição dos hidrogênios do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto FAEII-5-35-C e comparados com a prodelfinidina A-2 3'- <i>O</i> -galoil e atribuição dos carbonos do DEPT-135. ....	253
Tabela 49: Atribuição dos carbonos do composto FAEII-5-35-C obtidos pelo programa ChemDrawUltra.....	254
Tabela 50: Resultados da atividade antioxidante (método DPPH e voltametria de pulso diferencial) e inibição da $\alpha$ -amilase da miricetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo. .	255
Tabela 51: Resultados da atividade antifúngica, expresso como CIM, em $\mu\text{g mL}^{-1}$ , das FAE1-F a FAE8-F da FAE-F de <i>I. laurina</i> .....	258

Tabela 52: Resultados da atividade antifúngica, expresso como CIM, em $\mu\text{g mL}^{-1}$ , da FAEI-2-C de <i>I. laurina</i> .....	258
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AMV	Ácido mevalônico
APG	<i>Angiosperm Phylogeny Group</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BHT	Butilidroxitolueno
CC50	Concentração citotóxica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCL	<i>Culture Cell Lines</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CE50	Concentração eficiente
CHA	Clivagem heterolítica de anel
CI50	Concentração inibitória
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
CLAE/EM- EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa no modo sequencial
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNP	2-cloro-4-nitrofenol
COSY	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMAPP	3,3'-dimetilalil pirofosfato
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazila
DPPH-H	2,2-difenil-1-picrilidrazina
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
DXP	1-deoxi-D-xilose-5-fosfato

EAG	Equivalente de ácido gálico
ECAT	Equivalente de catequina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
EE	Extrato etanólico
EM/IES-EM/EM	Espectrometria de massa por ionização por eletrospray acoplado a espectrometria de massa sequencial
EM/EM	Espectrometria de massa sequencial
EQ	Equivalente de quercetina
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERON	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
FAE	Fração acetato de etila
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FB	Fração <i>n</i> -butanol
FC	Fração clorofórmio
FCC	Folin Ciocalteau
FH	Fração hexano
FPP	Farnesil pirofosfato
FM	Fração metanol
Gal-G2- $\alpha$ -CNP	$\alpha$ -(2-cloro-4-nitrofenil)- $\beta$ -1,4-galactopiranosilmaltosídeo
HAT	<i>Hydrogen Atom Transfer</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC-MS	<i>High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
HPLC-NMR	<i>High Performance Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance</i>
HPLC-NMR-MS	<i>High Performance Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance-Mass Spectrometry</i>
HSA	<i>Human salivary amylase</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HUFU	Herbário da Universidade Federal de Uberlândia
IES	Ionização por Eletrospray
IPP	3-isopentenil pirofosfato



<i>J</i>	Constante de acoplamento
LV	Leishmaniose visceral
MEP	Metilerytritol pirofosfato
MES	Tampão ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico
MOPS	Tampão 3-(N-morfolino)-propano-ácido sulfônico
NBT	Nitroazul de tetrazólio
NP	<i>Natural Product Reagent A</i> - difenilborato aminoetanol
NPPNS	Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos
NuBBE	Núcleo de Bioensaios Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
FAF	Fração acetato de etila das folhas
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PEG 4000	Polietileno glicol-4000
QM	Mecanismo quinona metídeo
QTOF	<i>Quadrupole Time of Flight</i>
RDA	Mecanismo retro-Diels Alder
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SPLET	<i>Sequential Proton Loss Electron Transfer</i>
TPP	Tiamina pirofosfato
Tris-HCl	Cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
UFC	Unidade de formação de colônias
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta-visível
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA DA TESE</b> .....	24
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	28
2.1 <i>METABOLISMO VEGETAL SECUNDÁRIO</i> .....	28
2.1.1 COMPOSTOS FENÓLICOS .....	30
2.2 <i>O GÊNERO Inga</i> .....	36
2.2.1 A PLANTA <i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd .....	41
2.3 <i>ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</i> .....	48
2.4 <i>INIBIÇÃO DE <math>\alpha</math>-AMILASE</i> .....	52
2.5 <i>ATIVIDADE ANTIMICROBIANA</i> .....	55
2.5.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA COM ÊNFASE EM DOENÇAS ORAIS... ..	56
2.5.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	57
2.6 <i>ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA</i> .....	60
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	62
3.1 <i>OBJETIVO GERAL</i> .....	62
3.2 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i> .....	62
<b>4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	63
4.1 <i>MATERIAIS E MÉTODOS</i> .....	63
4.1.1 REAGENTES E SOLVENTES .....	63
4.1.2 FASES ESTACIONÁRIAS .....	63
4.1.3 EQUIPAMENTOS .....	64
4.2 <i>COLETA E IDENTIFICAÇÃO</i> .....	65
4.3 <i>PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS E CASCAS</i> .....	65
4.4 <i>EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO DAS FOLHAS</i> .....	65
4.5 <i>FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DAS CASCAS</i> .....	66
4.6 <i>TRIAGEM FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES</i> .....	67
4.7 <i>DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS</i> .....	68
4.8 <i>DETERMINAÇÃO DE PROANTOCIANIDINAS</i> .....	69
4.9 <i>DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES</i> .....	69
4.10 <i>DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</i> .....	70
4.10.1 MÉTODO DO RADICAL DPPH .....	70
4.10.2 VOLTAMETRIA POR PULSO DIFERENCIAL.....	71

<i>4.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE <math>\alpha</math>-AMILASE</i> .....	71
4.11.1 PREPARO DA FRAÇÃO DE SALIVA ENRIQUECIDA DE $\alpha$ -AMILASE ....	72
4.11.2 PROCEDIMENTO DA ATIVIDADE INIBIDORA DE $\alpha$ -AMILASE.....	72
<i>4.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA</i> .....	74
4.12.1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS.....	74
4.12.2 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO ..	74
4.12.3 PREPARO DO INÓCULO .....	75
4.12.4 PREPARO DOS CONTROLES.....	75
4.12.5 MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA .....	75
<i>4.13 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA</i> .....	76
4.13.1 MICRORGANISMOS .....	76
4.13.2 PREPARO DO INÓCULO .....	76
4.13.3 PREPARO DOS CONTROLES.....	76
4.13.4 MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO EM CALDO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA .....	77
<i>4.14 ATIVIDADE CITOTÓXICA</i> .....	77
4.14.1 PREPARO DAS AMOSTRAS .....	78
4.14.2 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR .....	78
<i>4.15 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA</i> .....	79
4.15.2 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR .....	79
<i>4.16 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO</i> .....	80
<i>4.17 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA UV-VIS DAS AMOSTRAS</i> .....	82
<i>4.18 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS</i> .....	82
<i>4.19 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR</i> .....	83
<i>4.20 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)</i> 84	
<i>4.21 ANÁLISE ESTATÍSTICA</i> .....	84
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	85
5.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO .....	85
5.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA E ANÁLISE DOS ESPECTROS UV-VIS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E DAS CASCAS.....	87
5.3 TEOR DE FENÓIS TOTAIS.....	93
5.4 TEOR DE PROANTOCIANIDINAS.....	95

5.5 TEOR DE FLAVONOIDES.....	97
5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	100
5.6.1 MÉTODO DPPH.....	100
5.6.2 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL.....	103
5.7 ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA $\alpha$ -AMILASE.....	112
5.8 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	117
5.9 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E CITOTÓXICA.....	121
5.10 ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	125
5.11 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS FOLHAS.....	126
5.12 IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>I. laurina</i> .....	129
5.13 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO ISOLADO FAE4-F (MIRICETINA-3-O-RAMNOSÍDEO).....	163
5.14 PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA DAS CASCAS.....	179
5.15 IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES DAS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA DAS CASCAS DE <i>I. laurina</i> .....	180
5.16 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO ISOLADO DA FAEI-2-C.....	190
5.17 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DA FAEII-C DAS CASCAS.....	203
5.17.1 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO FAEII-4-13-C.....	206
5.17.2 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO FAEII-4-14-C.....	216
5.17.3 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO FAEII-4-24-C.....	230
5.17.4 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO FAEII-5-35-C.....	244
5.18 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS FAE4-F E FAEI-2-C E DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>Inga laurina</i> .....	255
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>260</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>263</b>
<b>APÊNDICE A – Fluxograma de purificação, identificação e isolamento de compostos das folhas de <i>I. laurina</i>.....</b>	<b>292</b>
<b>APÊNDICE B – Fluxograma de purificação, identificação e isolamento de compostos das cascas de <i>I. laurina</i>.....</b>	<b>293</b>

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA DA TESE

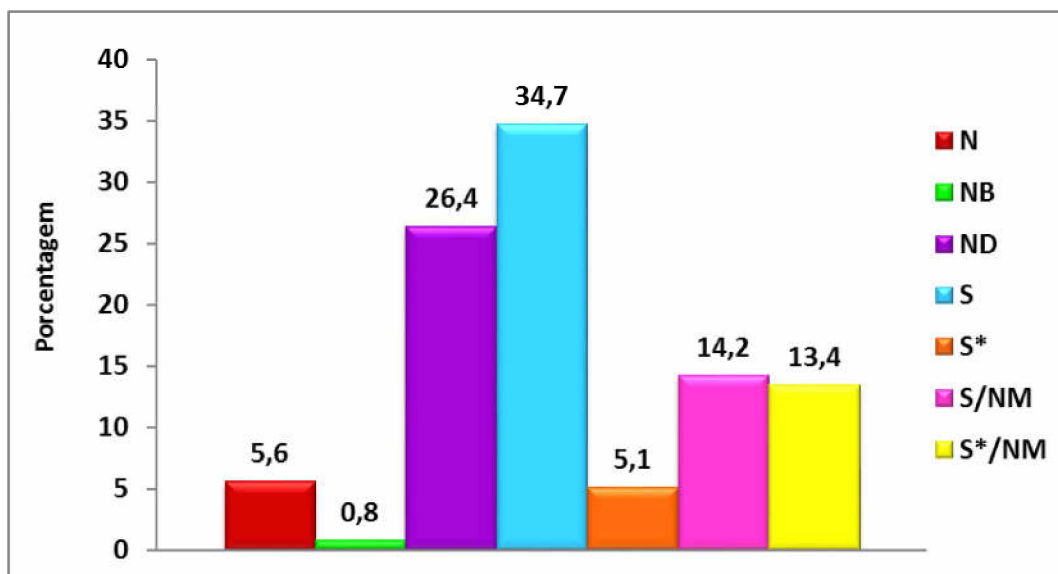
A utilização dos produtos naturais como fonte de matéria-prima para o desenvolvimento de medicamentos é historicamente conhecida. Ao longo dos anos áreas relacionadas à oncologia e doenças infecciosas foram beneficiadas com o grande número de medicamentos desenvolvidos a partir de produtos naturais, seja de plantas, microrganismos ou organismos marinhos. Atualmente, esses produtos continuam sendo bastante explorados através de pesquisas em áreas como metabolômica e genômica (GU et al., 2003, HARVEY, 2008, MISHRA; TIWARI, 2011, SOUSA; BASTOS; GURGEL, 2011, HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Nos anos 90 houve uma queda por parte das empresas farmacêuticas na procura de novos fármacos a partir de produtos naturais devido a algumas limitações, como manutenção da qualidade do extrato, isolamento de pequenas quantidades de substâncias, tempo longo no processo de seleção dos produtos naturais e complexidade estrutural das moléculas (LAM, 2007). No entanto, através do aprimoramento das técnicas hífenadas de espectroscopia (como HPLC-MS, HPLC-NMR e HPLC-NMR-MS), métodos de isolamento e identificação de substâncias, síntese orgânica, quimioinformática e genômica, a pesquisa de produtos naturais voltou ser uma área de sucesso no desenvolvimento de fármacos (LAM, 2007, HARVEY, 2008, DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Além disso, a necessidade de novos medicamentos para o tratamento do câncer, HIV e doenças infecciosas impulsionaram o emprego dos produtos naturais na pesquisa das indústrias farmacêuticas (CRAGG; NEWMAN, 2013)

Newman e Cragg publicaram vários artigos mostrando a importância dos produtos naturais no descobrimento e desenvolvimento de novos medicamentos em diversas áreas, como antimicrobianos, antitumorais, antivirais, entre outros (NEWMAN; CRAGG, 2007, 2012, NEWMAN; CRAGG; KINGSTON, 2015, NEWMAN; CRAGG, 2016). No recente trabalho publicado em 2016 os autores fizeram novamente a classificação da origem natural ou sintética de medicamentos comercializados entre 1981-2014 em que foi verificado que de 1.211 pequenas moléculas aprovadas como medicamentos, 65,5% continuam sendo elaborados a partir de substâncias isoladas de produtos naturais (Figura 1), demonstrando a importância dos produtos naturais como precursores no planejamento de novos medicamentos. A classificação dos autores segue as seguintes categorias: (N) – oriundo de produto

natural, (NB) – oriundo de produto natural “botânico” (fitoterápicos), (ND) – derivado de produto natural com modificação semissintética, (S) – totalmente sintético, (S\*) – sintético com grupo farmacofórico de origem natural e (NM) – oriundos a partir do conhecimento adquirido de produto natural (“imitação de produto natural”).

Figura 1: Classificação dos medicamentos desenvolvidos entre 1981-2014.



Fonte: adaptado de Newman e Cragg (2016).

Nos artigos científicos que discutem a utilização de produtos naturais na produção de novos medicamentos, têm-se relatado a importância de consultar bases de dados de produtos naturais, as quais possuem diversas estruturas químicas de compostos conhecidos, para aperfeiçoar as pesquisas de programas de bioprospecção de metabólitos para produção de fármacos (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012, HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Dentre as bases de dados disponíveis para pesquisa, há um banco de dados virtual de produtos naturais e derivados sobre espécies do Brasil, NUBBE DATA BANK, criado por pesquisadores do Núcleo de Bioensaios Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais do Instituto de Química da UNESP de Araraquara/SP (NUBBE, 2016).

Essa base de dados possui 640 compostos catalogados, dos quais 80% são isolados de plantas, 7% são semissintéticos, 6% são isolados de fungos e microrganismos, 5% são sintéticos, mas inspirados em produtos naturais, e 2% são produtos da biotransformação de uma planta ou fungo. Os compostos disponíveis para

consulta foram isolados dos biomas da Amazônia, da Mata Atlântica e do Cerrado (VALLI et al., 2013).

O Brasil possui uma flora muito rica em espécies de plantas, fungos e microrganismos. Dentre os biomas encontrados no país, o Cerrado caracteriza-se como a segunda maior formação vegetal, com mais de 56.000 espécies de plantas (GIULIETTI et al., 2005, FORZZA et al., 2010, MARTINELLI; MORAES, 2013). Além disso, esse bioma contempla 5% da biodiversidade do mundo (MMA, 2011) e possui quase 30% das plantas endêmicas do país, ficando atrás apenas da Mata Atlântica (FORZZA et al., 2010). Este domínio fitogeográfico é apontado como grande detentor de diversidade biológica, sendo a formação savânica com maior diversidade vegetal do mundo (GUARIM NETO; MORAIS, 2003, SILVA; DE PAULA; ESPINDOLA, 2009, MMA, 2015). Além disso, o Cerrado é considerado o maior hotspot de biodiversidade no Hemisfério Ocidental e se destaca pela grande variedade de espécies endêmicas (MYERS et al., 2000, DA SILVA; BATES, 2002, CEPF, 2016) e pela riqueza de recursos hídricos pois possui as “cabeceiras das três maiores bacias hidrográficas da América do Sul” (CEPF, 2016).

Entretanto, esse bioma vem sendo desmatado para utilização das terras na agricultura, na pecuária e para produção de carvão vegetal. Entre 2002 e 2008 a área desmatada foi de 975.710 km<sup>2</sup> (MMA, 2011), provocando uma perda da cobertura natural nativa e de conhecimento científico sobre uma flora rica em espécies vegetais. Estes dados aliados aos estudos já existentes sobre plantas medicinais do Cerrado justifica o estudo de espécies dessa região, na busca por compostos biologicamente ativos.

Muitas espécies do cerrado brasileiro são utilizadas no tratamento de enfermidades de forma empírica, sendo uma alternativa para as classes sociais de baixa renda (SILVA JÚNIOR et al., 2005). Estudos baseados em usos tradicionais das plantas do cerrado já identificaram extratos e compostos isolados com diferentes atividades biológicas, tais como antibacteriana, fitotóxica, moluscicida, inseticida, antifúngica, antiprotozoária, entre outras (SILVA; DE PAULA; ESPINDOLA, 2009, ALBERNAZ et al., 2010, CECÍLIO et al., 2012, NOVAES et al., 2013).

Dentre as diversas espécies encontradas no Cerrado, o gênero *Inga*, pertencente a família Fabaceae, possui várias espécies de plantas que apresentam atividades biológicas (VIVOT et al., 2001, SILVA et al., 2007). No entanto, não há estudos sobre a

atividade antioxidante, antimicrobiana, antiprotozoária, antifúngica e inibidora de  $\alpha$ -amilase de *Inga laurina*. Poucos metabólitos dessa planta já foram identificados, porém, nenhum engloba os objetivos deste trabalho. Assim, o estudo dos constituintes químicos da planta é importante para aumentar o conhecimento químico dessa espécie, além disso, foi aprovado pela FAPEMIG, no edital 01/2011, o projeto intitulado Prospecção fitoquímica, análise química e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana sobre microrganismos da cavidade bucal da espécie *Inga laurina* (Sw.) Willd com o objeto de identificar metabólitos bioativos da planta.

No trabalho de Furtado (2014), foi iniciado um estudo das propriedades antioxidante e antimicrobiana dos extratos dessa planta, a qual se mostrou promissora como fonte de antioxidantes, porém, não foi identificado e nem isolado nenhum constituinte. A identificação dos compostos bioativos das folhas e cascas dessa planta fez parte dos estudos do presente trabalho, que buscou contribuir para valorização do conhecimento químico de espécies do Cerrado, e a planta *I. laurina* se caracterizou como uma espécie promissora de compostos fenólicos biologicamente ativos.



## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 METABOLISMO VEGETAL SECUNDÁRIO

As plantas são responsáveis pela produção da maior parte da matéria orgânica da Terra através de processos de assimilação de carbono inorgânico e nitrogênio do ambiente, conduzidos pela energia da luz solar (SMITH et al., 2009). Esse conjunto de reações que ocorre no interior das células das plantas, chamado de metabolismo, produz substâncias como carboidratos, proteínas, ácidos graxos e ácidos nucleicos que são encontrados em vários organismos, denominados de metabólitos primários. A fotossíntese e a respiração são exemplos de reações que fazem parte do metabolismo primário (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000, SANTOS, 2010).

Os vegetais são capazes de sintetizar outros tipos de substâncias que são de ocorrência mais restrita e que não estão relacionadas de maneira direta na transformação de nutrientes essenciais para as plantas, que são denominados de metabólitos secundários (ou especiais). Eles são derivados de produtos do metabolismo primário (SANTOS, 2010).

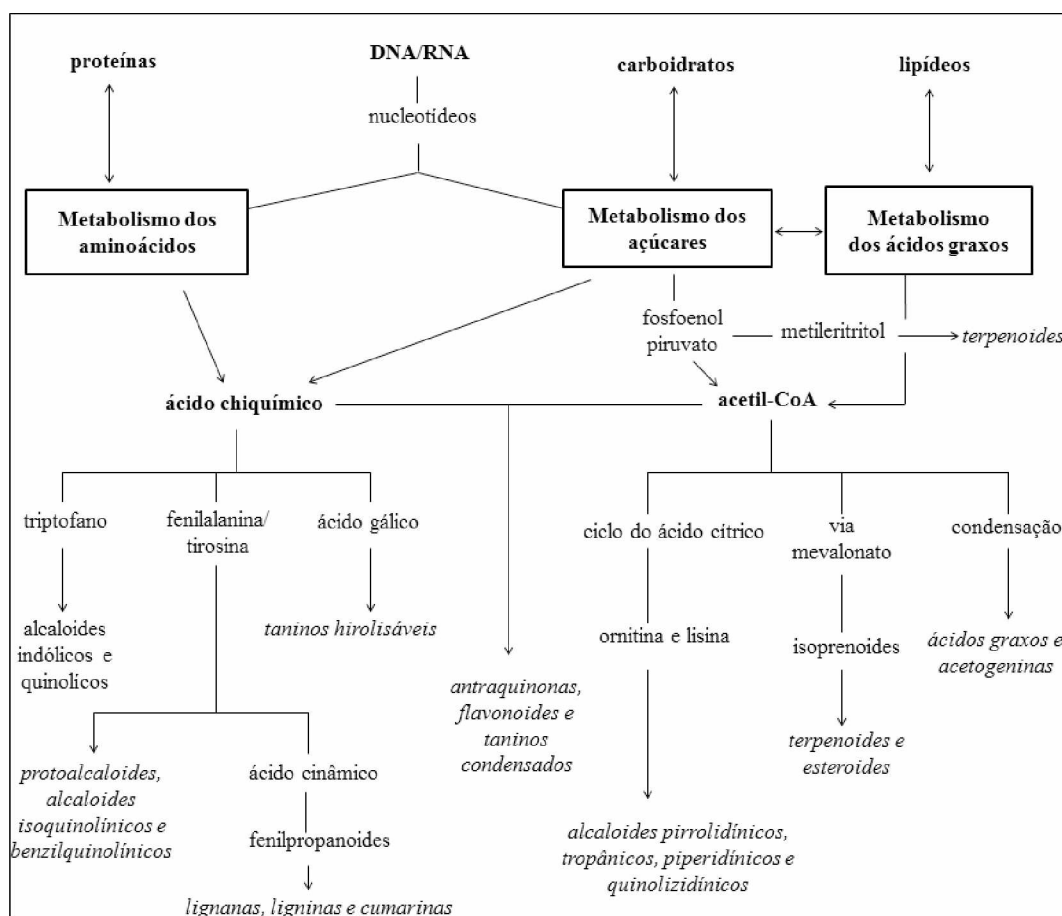
Os produtos do metabolismo secundário desempenham uma função importante na adaptação das plantas ao seu ambiente (BOURGAUD et al., 2001, SANTOS, 2010). Estes compostos são responsáveis pelas propriedades farmacológicas dos vegetais, como antibiótica, antifúngica e antiviral. Além disso, esses constituintes protegem as plantas de agentes patogênicos como insetos através da síntese de fitoalexinas, que também possuem ação anti-germinativa ou tóxica para outras plantas (atividade alelopática), além de serem importantes na proteção contra radiação UV e foto-oxidação (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000, BOURGAUD et al., 2001).

Os metabólitos secundários são sintetizados no interior das células das plantas, onde os compostos lipofílicos são armazenados nas membranas das organelas ou no retículo endoplasmático, enquanto que os compostos hidrofílicos são encontrados nos vacúolos no interior das organelas e no citosol (GUTZEIT; LUDWIG-MÜLLER, 2014).

A Figura 2 mostra um fluxograma das principais vias biossintéticas e os precursores das principais classes de metabólitos secundários. A biossíntese dos metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo dos carboidratos

através de dois intermediários, o ácido chiquímico e a acetil-CoA, ou a partir da combinação destes dois intermediários (SANTOS, 2010). Os terpenos são biossintetizados a partir de duas rotas, via acetil-CoA (rota do mevalonato) e via do metileritritol. Os alcaloides são obtidos a partir do metabolismo dos aminoácidos, via ácido chiquímico ou a partir do ciclo do ácido cítrico, via acetil-CoA. Os compostos fenólicos são biossintetizados através das vias do ácido chiquímico e da acetil-CoA, ou a partir da combinação destas rotas (LARCHER, 2003, GUTZEIT; LUDWIG-MÜLLER, 2014).

Figura 2: Fluxograma das rotas biossintéticas e precursores dos metabólitos secundários.

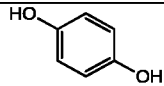
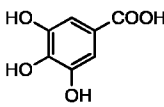
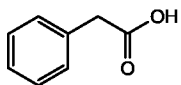
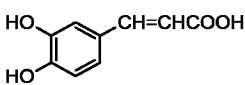
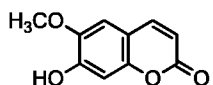
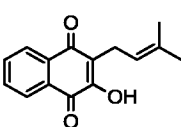


Fonte: Adaptado de Larcher (2003) e Santos (2010).

### 2.1.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

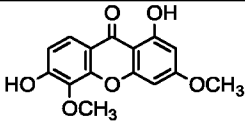
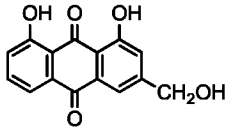
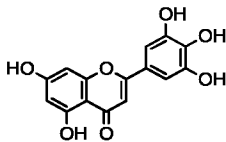
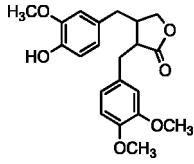
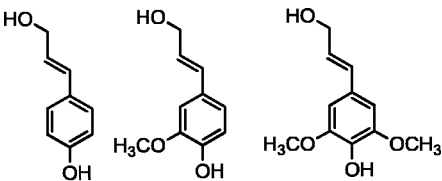
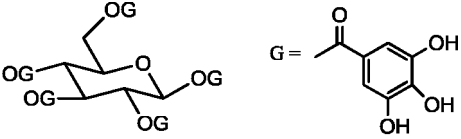
Os compostos fenólicos constituem uma ampla de classe de metabólitos encontrados em plantas e possuem uma ampla diversidade estrutural. São conhecidas mais de 8.000 estruturas químicas, desde compostos simples como os ácidos fenólicos até compostos mais complexos como os taninos (DAI; MUMPER, 2010). Esses compostos podem ser classificados de acordo com as unidades fenólicas presentes nas moléculas, como mostra a Tabela 1 (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2010).

Tabela 1: Classificação dos compostos fenólicos.

Esqueleto básico	Classe dos compostos fenólicos	Exemplos
C <sub>6</sub>	Fenóis simples, benzoquinonas	 hidroquinona
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos	 ácido gálico
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos	 ácido fenilacético
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Fenilpropanoides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas	 ácido cafeico  escopoletina
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftoquinonas	 lapachol

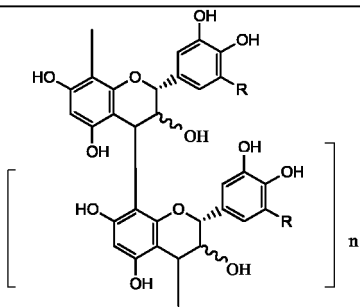
Fonte: Carvalho, Gosmann e Schenkel (2010).

Tabela 1: continuação.

Esqueleto básico	Classe dos compostos	Exemplos
	<b>fenólicos</b>	
$C_6-C_1-C_6$	Xantonas	 1,6-diidroxi-3,5-dimetoxixantona
$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos, antraquinonas	 aloe-emodina
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides isoflavonoides	 miricetina
$(C_6-C_3)_2$	Lignanas	 arctigenina
$(C_6-C_3)_n$	Ligninas	 álcoois <i>p</i> -cumarílico, coniferílico e sinapílico (precursores da formação de ligninas)
$(C_6-C_1)_n$	Taninos hidrolisáveis	 $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagaloil-D-glicose

Fonte: Carvalho, Gosmann e Schenkel (2010).

Tabela 1: continuação.

Esqueleto básico	Classe dos compostos fenólicos	Exemplos
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Taninos condensados	 <p>esqueleto de uma proantocianidina</p>

Fonte: Carvalho, Gosmann e Schenkel (2010).

Estes compostos são encontrados em vegetais, como frutas e legumes, em bebidas, como chá, café e vinho, sendo importantes constituintes da dieta humana devido as suas propriedades medicinais. Eles estão envolvidos no mecanismo de defesa das plantas, protegendo-as da radiação ultravioleta e agentes patogênicos (DAI; MUMPER, 2010). As ligninas reforçam as paredes celulares de plantas inferiores, como as samambaias, dando suporte estrutural e garantindo que elas se apoiem em superfícies (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

Dentre as diferentes classes dos compostos fenólicos, os flavonoides, juntamente com os terpenoides e alcaloides, compreendem as três maiores classes de metabólitos secundários. Os flavonoides desempenham importantes funções para as plantas, dentre as mais marcantes pode-se citar a absorção de luz destes compostos na faixa de 280-315 nm, fato que faz com que os flavonoides sejam importantes componentes na proteção solar das plantas, as quais são eficientes na captura de energia da luz solar (SHIRLEY, 1996, HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

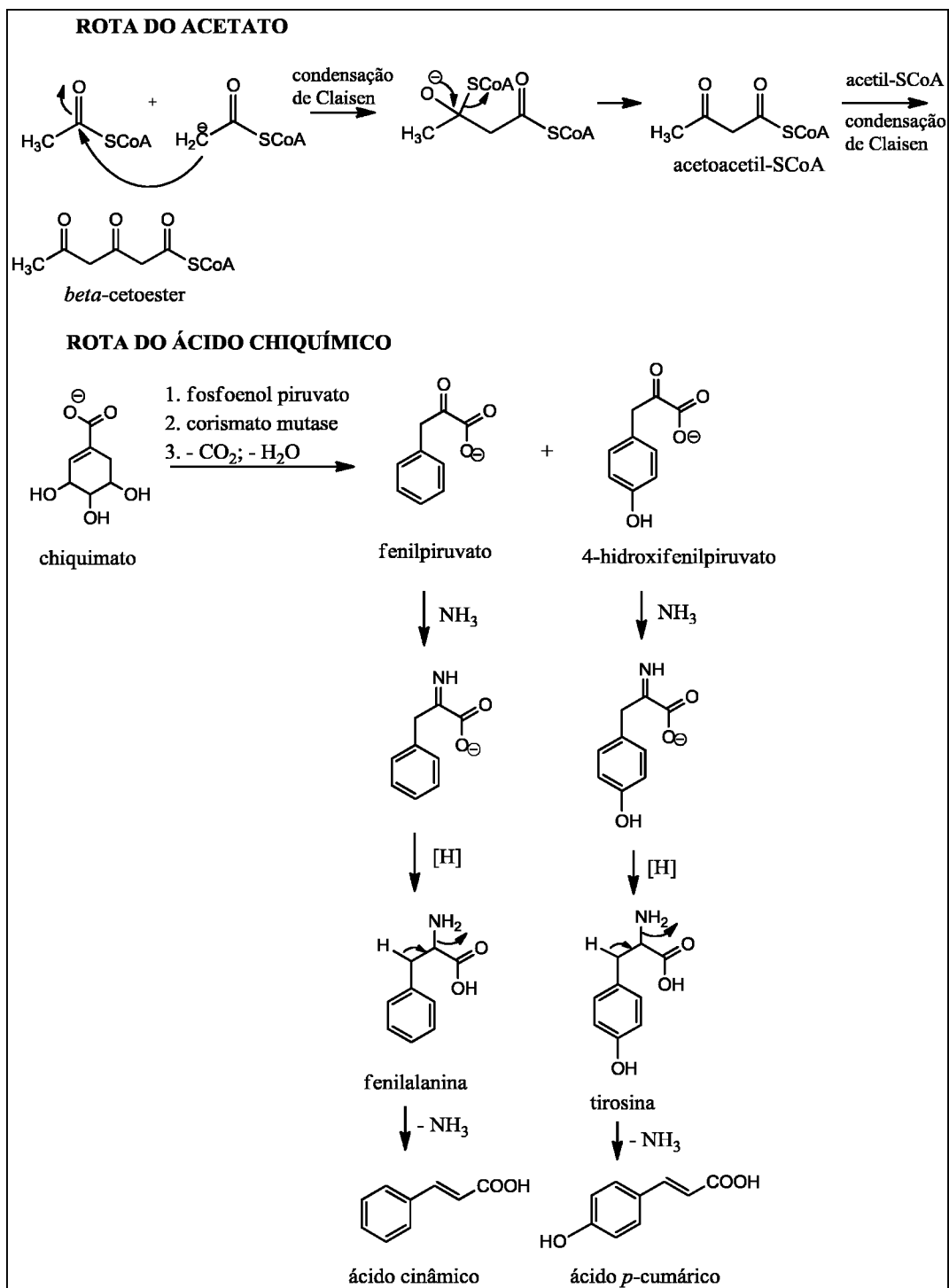
Os flavonoides são os constituintes responsáveis pela coloração das flores, frutos e sementes, característica importante na polinização e reprodução das plantas, pois as cores das plantas atraem polinizadores do néctar das flores e dispersores de sementes dos frutos maduros (SHIRLEY, 1996, KOES; VERWEIJ; QUATTROCCHIO, 2005). Além das propriedades biológicas para as plantas, esses compostos também possuem

propriedades medicinais, como antioxidante, anti-inflamatória, antitumorais e atividade inibitória de enzimas (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Os flavonoides são biossintetizados a partir de rotas metabólicas separadas, a via do acetato e a via do ácido chiquímico, a qual origina a fenilalanina e a tirosina que são as precursoras do ácido cinâmico e do ácido cumárico, respectivamente (Figura 3). O ácido cumárico forma o anel B da estrutura dos flavonoides e a ponte de três carbonos (anel C). O anel A é formado a partir da via do acetato através da condensação de três moléculas de acetil-SCoA (SANTOS, 2010).

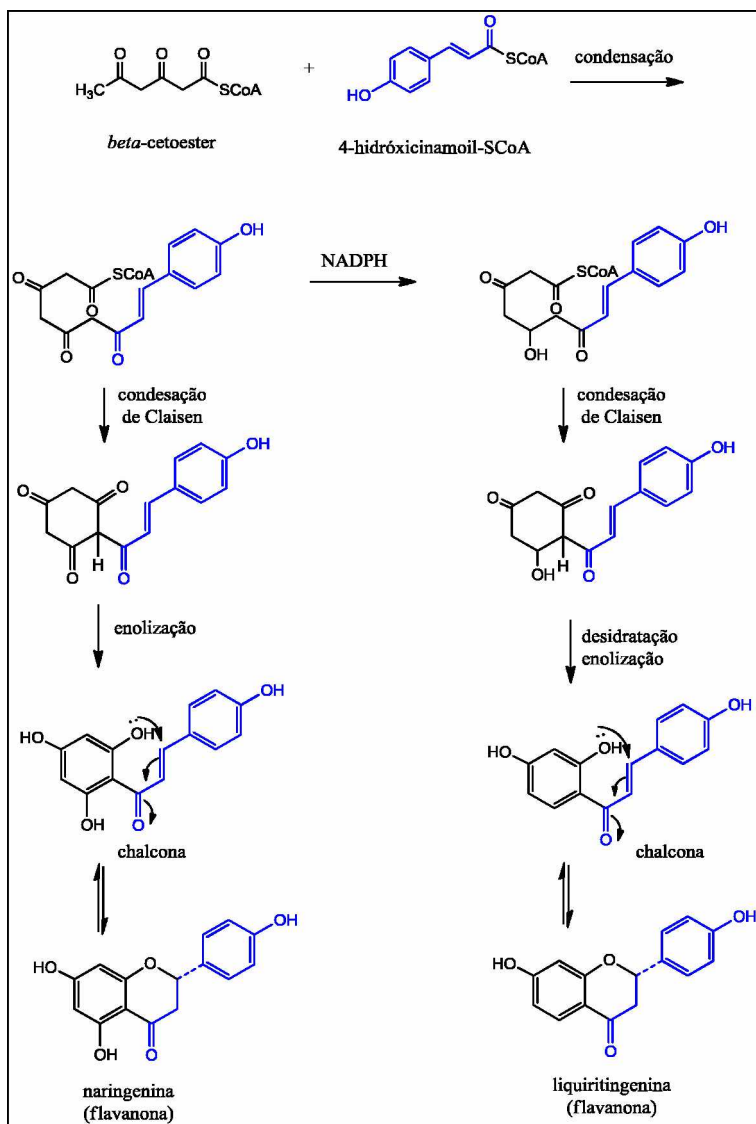
A condensação do tipo Claisen de três moléculas de acetil-SCoA forma o intermediário  $\beta$ -cetoester, o qual vai reagir com o derivado do ácido cumárico, o 4-hidróxicinamoil-SCoA. A reação do  $\beta$ -cetoester com o 4-hidróxicinamoil-SCoA leva a formação das chalconas, que são as precursoras da formação das flavanonas, a naringenina e liquiritigenina, as quais são os primeiros flavonoides formados na via metabólica (Figura 4) (LOBO; LOURENÇO, 2007, DEWICK, 2009). A partir da flavanonas são formadas outras classes de flavonoides como as flavonas, flavonois, antocianidinas e catequinas através de reações de hidroxilação (Figura 5). Também podem ocorrer reações de metilação, glicosilação e dimetilalilação que aumentam as possibilidades de estruturas químicas destes compostos (DEWICK, 2009).

Figura 3: Rota biossintética dos flavonoides.



Fonte: adaptado de Lobo e Lourenço (2007).

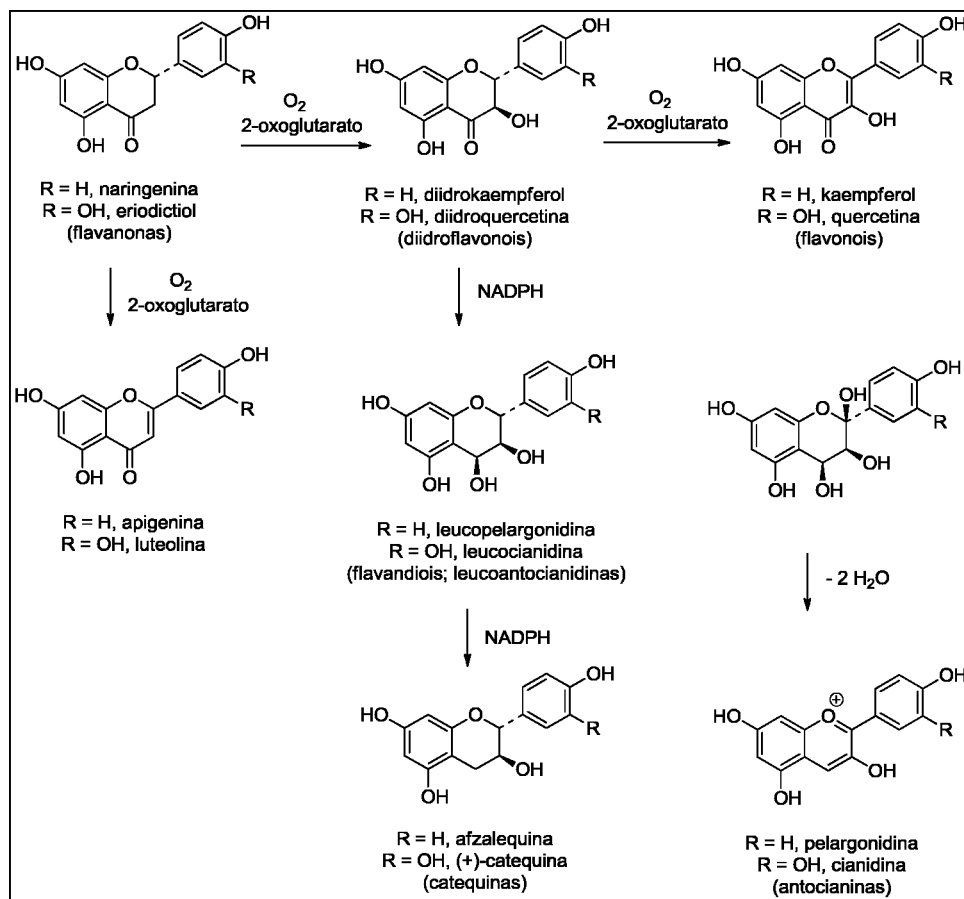
Figura 4: Flavonoides formados na via metabólica.



Fonte: Dewick (2009).



Figura 5: Biossíntese das flavonas, flavonóis, catequinas e antocianidinas.



Fonte: Dewick (2009).

## 2.2 O GÊNERO *Inga*

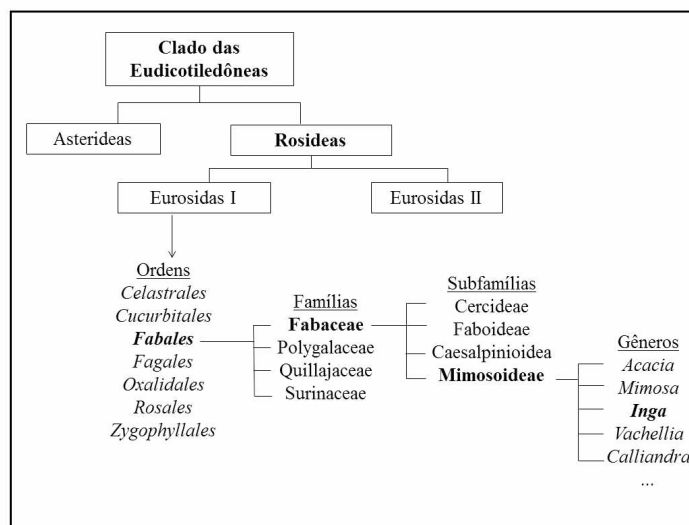
A família Fabaceae (Leguminosae), da qual o gênero *Inga* pertence, é a terceira maior família das angiospermas, atrás de Asteraceae e Orchidaceae, possui 728 gêneros e 19.325 espécies (KEW, 2006). As plantas desta família possuem ampla distribuição no Brasil, podendo ser encontradas em vários estados, como Amazonas, Ceará, Goiás, Minas Gerais e Paraná. Esta família possui 222 gêneros e 2.807 espécies presentes no país, sendo que 15 gêneros e 1.508 espécies são endêmicos (LIMA; QUEIROZ; MORIM, 2015). Como exemplos de plantas dessa família pode-se citar o angico (*Parkia* e *Piptadenia*), chuva-de-ouro (*Cassia*), copaíba (*Copaifera*), jatobá (*Hymenaea*, grão-de-bico (*Cicer*), soja (*Glycine*), feijão (*Phaseolus*) e amendoim (*Arachis*) (PANTOJA, 2010).

A família das leguminosas possui importância econômica devido ao seu uso na alimentação de milhares de pessoas no mundo (lentilha – *Lens esculenta* e ervilha – *Pisum sativum*), em medicamentos (sena – *Senna alexandria*), utilização da madeira (pau-brasil – *Caesalpinia echinata*), como corante e gomas (goma arábica de *Acacia sp.*) e para produção de óleo (amendoim – *Arachis hypogea* e soja – *Glycine max*) (KEW, 2006, AGUIAR, 2013). Além disso, as espécies dessa família são importantes como fixadoras de nitrogênio promovendo a fertilidade do solo através de interações com bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (SILVA; LOCATELLI; ESSI, 2013).

O gênero *Inga* compreende aproximadamente 300 espécies que podem ser encontradas do centro do México ao norte da Argentina, distribuídas principalmente em áreas neotropicais (BERMINGHAM; DICK, 2001). No Brasil existem 131 espécies do gênero, sendo que 51 são endêmicas (GARCIA; FERNANDES, 2015). As espécies desse gênero são utilizadas na recomposição de florestas ciliares, na recuperação de áreas degradadas, como fonte de alimento e de lenha para produção de energia e na fitoterapia (MATA; FELIX, 2007).

De acordo com a classificação proposta pela APG III (*Angiosperm Phylogeny Group*) ou Grupo de Filogenia das Angiospermas, que considera o enfoque filogenético para classificação considerando o genoma dos cloroplastos e segmentos do genoma nuclear, o gênero *Inga* pertence ao clado das eudicotiledônias, ordem Fabales, família Fabaceae e subfamília Mimosoideae (PANTOJA, 2010, STEVENS, 2012). A Figura 6 mostra a classificação do gênero segundo a APG.

Figura 6: Classificação do gênero *Inga* de acordo com a APG III.



Fonte: adaptado de Stevens (2012).

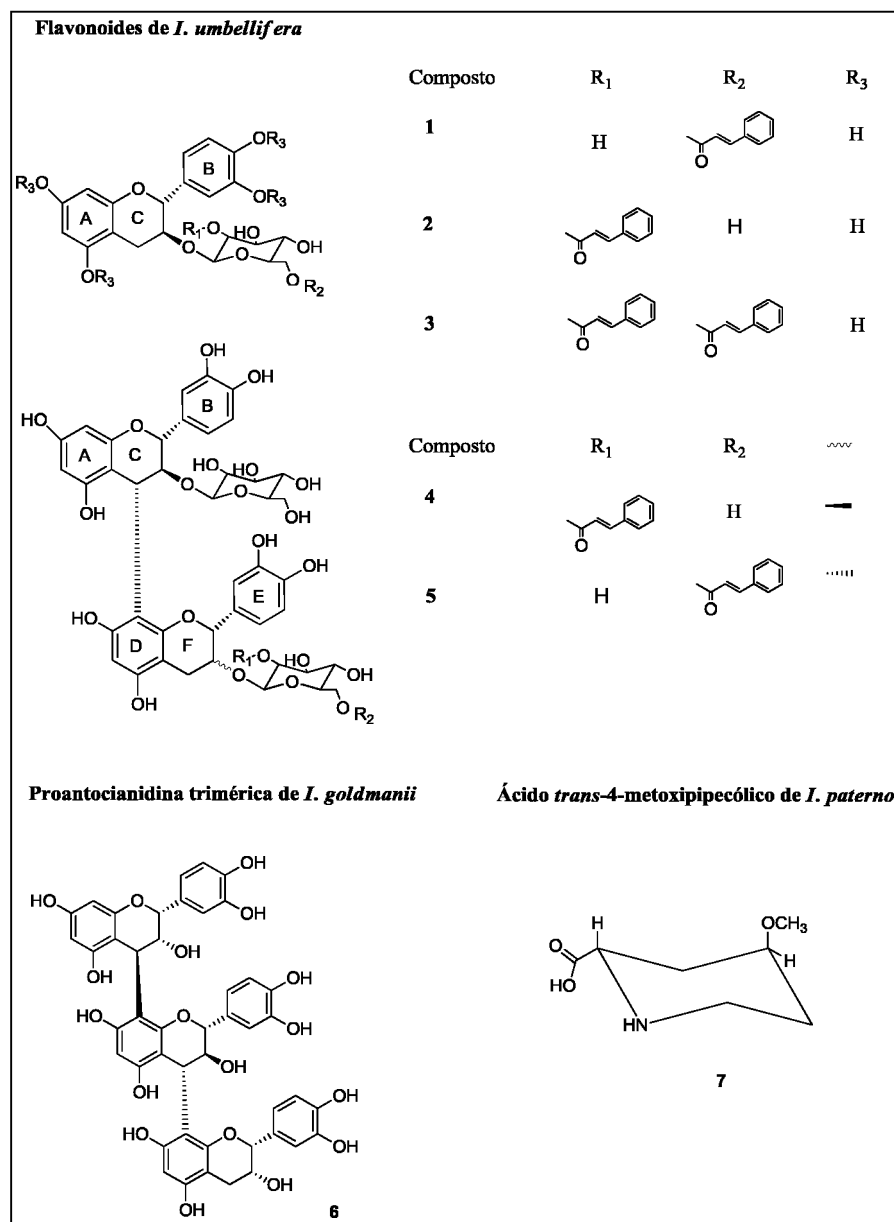
Espécies de *Inga* são utilizadas na medicina popular, especialmente por tribos indígenas na Amazônia, para tratar algumas enfermidades, tais como ingestão de sementes de *I. brachystatachya* para reduzir flatulências, tratamento de escoriações da pele utilizando folhas e raízes de *I. strigillosa*, as flores de *I. cecropietorum* são empregadas no tratamento de dores de ouvido e as flores de *I. rubiginosa* para tratamento de congestão nasal, os indígenas cheiram as flores desta espécie quando estão resfriados e limpam as secreções nas pálpebras com a polpa da vagem de *I. pilosule*, a polpa dos frutos de *I. macrophylla* é utilizada para limpar os dentes e as flores de *I. myriocephala* são esfregadas no cabelo para fortalece-lo (VIVOT et al., 2001).

Análises químicas com espécies de *Inga* mostram que o gênero é fonte promissora na busca de novos princípios ativos para fabricação de medicamentos. Estudos realizados com algumas espécies mostram diferentes atividades biológicas, como antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, aleloquímica e antitumoral (ALVAREZ et al., 1998b, VIVOT et al., 2001, LOKVAM et al., 2006, SILVA et al., 2007, SOUZA et al., 2007, PISTELLI et al., 2009, DIAS; SOUZA; ROGEZ, 2010, PINTO; SOUZA; OLIVEIRA, 2010). A Tabela 2 mostra as atividades biológicas para diferentes espécies de *Inga*, a Figura 7 mostra as estruturas químicas de alguns metabólitos isolados das folhas de *I. umbellifera*, *I. golgmanii* e *I. paterno* (MORTON et al., 1991, LOKVAM; COLEY; KURSAR, 2004, LOKVAM; KURSAR, 2005) e a Figura 8 mostra os

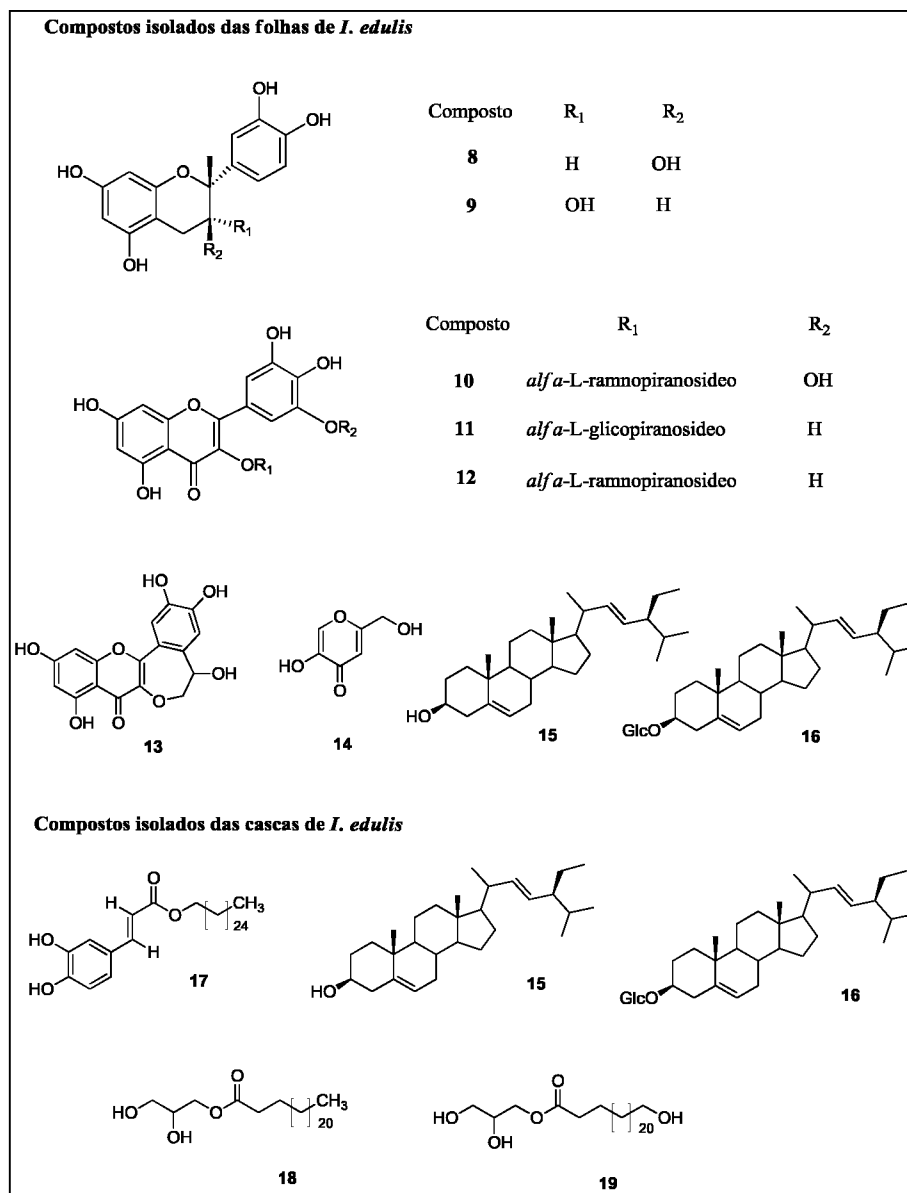
metabólitos isolados das folhas e cascas de *I. edulis* (SOUZA et al., 2007, TCHUENMOGNE et al., 2013), sendo que um novo flavonol foi isolado das folhas da planta, denominado de ingacamerounol (TCHUENMOGNE et al., 2013).

Tabela 2: Atividades biológicas de espécies do gênero *Inga*.

<b>Espécie</b>	<b>Partes da planta</b>	<b>Atividade biológica</b>	<b>Referências</b>
<i>I. edulis</i>	Folhas	Antioxidante	Souza et al. (2007); Silva et al. (2007); Dias, Souza e Rogez (2010)
<i>I. verna</i>	Folhas	Antioxidante	Vivot et al. (2001)
<i>I. marginata</i>	Folhas	Antifúngica	Pinto, Souza e Oliveira (2010)
<i>I. fendleriana</i>	Folhas	Antimicrobiana	Pistelli et al. (2009)
<i>I. umbellifera</i>	Folhas	Aleloquímica	Lokvam et al. (2006)
<i>I. marginata</i>	Cascas	Antitumoral	Alvarez et al. (1998)

Figura 7: Estruturas de compostos isolados de algumas espécies do gênero *Inga*.

Nota: **1** = (+)-catequina-3-*O*- $\beta$ -D-glico-(6-cinamoil)-piranosídeo; **2** = (+)-catequina-3-*O*- $\beta$ -D-glico-(2-cinamoil)-piranosídeo; **3** = (+)-catequina-3-*O*- $\beta$ -D-glico-(2,6-biscinamoil)-piranosídeo; **4** = catequina-3-*O*- $\beta$ -D-glicopirano-(4 $\alpha$ →8)-catequina-3-*O*- $\beta$ -D-glico-(2-cinamoil)-piranosídeo; **5** = catequina-3-*O*- $\beta$ -D-glicopirano-(4 $\alpha$ →8)-epicatequina-3-*O*- $\beta$ -D-glico-(6-cinamoil)-piranosídeo; **6** = proantocianidina trimérica; **7** = ácido *trans*-4-metoxipepecólico. Fonte: adaptado de Morton et al. (2001), Lokvam, Coley e Kursar (2004) e Lokvam e Kursar (2005).

Figura 8: Estruturas de compostos isolados de *I. edulis*.

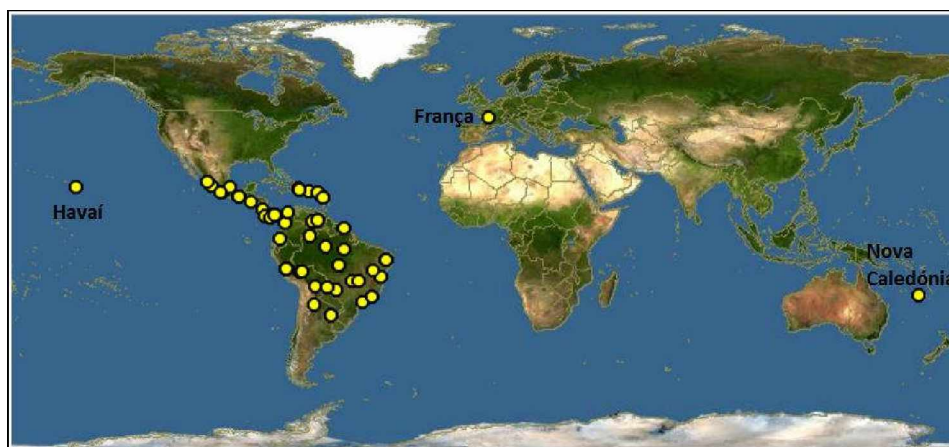
Nota: 8 = catequina; 9 = epicatequina; 10 = miricetina-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo; 11 = quecetina-3-*O*- $\alpha$ -L-glicopiranosídeo; 12 = quecetina-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo; 13 = ingacamerounol; 14 = ácido kojico; 15 = estigmasterol; 16 = estigmasterol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosídeo; 17 = hexacosanoil cafeato; 18 = 1-tetracosanil glicerol; 19 = 1-(24-hidroxitetraicosanoil) glicerol. Fonte: adaptado de Souza e outros (2007) e Tchuenmogne e outros (2013).

### 2.2.1 A PLANTA *Inga laurina* (Sw.) Willd

A planta *I. laurina* (sinônimo = *I. fagifolia* Willd.) é uma árvore tropical que pode ser encontrada principalmente na América Central e na América do Sul. Ela floresce entre os meses de setembro e novembro e os frutos são produzidos nos meses

de dezembro e janeiro (MACEDO et al., 2007, POSSETTE; RODRIGUES, 2010). De acordo com o site Discover Life, há ocorrência dessa planta em Honolulu Co, no Havaí, em Mont More, na França e em Dore no arquipélago de Nova Caledônia, na Oceania (Figura 9).

Figura 9: Mapa da ocorrência mundial de *I. laurina*.



Fonte: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Inga+laurina>

No Brasil esta planta é encontrada em vários estados, desde a região norte (Acre, Amazonas, Pará) até a região Sul, no estado do Paraná, logo, essa planta é distribuída nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Essa árvore possui vários nomes populares, dependendo da região onde é encontrada, ela é conhecida como ingá mirim, ingá feijão, ingá branco, ingá da praia, ingá chichi e ingai (GARCIA; FERNANDES, 2013).

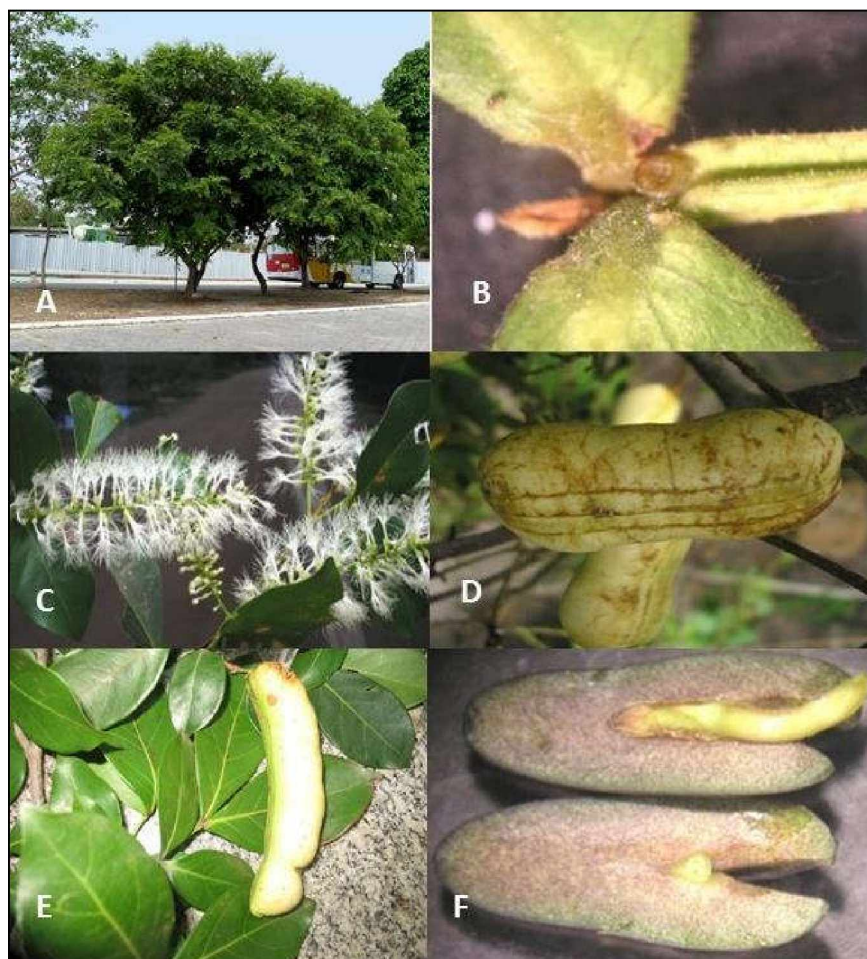
Alguns trabalhos acadêmicos sobre identificação de espécies de *Inga* na região Amazônica, no estado do Paraná e na região Nordeste, fizeram a descrição dos táxons de várias espécies (MATA, 2009, POSSETTE; RODRIGUES, 2010, SOUSA; BASTOS; GURGEL, 2011), e *I. laurina* possui táxons com as seguintes características

“Árvore até 15 m de alt. Ramos cilíndricos, glabros ou puberulentos. Estípulas 1,5–4 mm compr., lanceoladas, puberulentas ou glabras, caducas. Pecíolos 1–2 cm compr., cilíndricos, não alados, glabros ou puberulentos. Nectários foliares 0,5–2 mm diâm., cupuliformes, sésseis. Raque 2–4 cm compr., cilíndrica, alada (ala, 0,5–2,5 cm larg.), glabra ou puberulenta. Folhas 2–3 jugas; folíolos 6,7–17 × 1,9–7,2 cm, cartáceos, concolores, glabros, elípticos, ápice atenuado, base aguda, venação eucampódroma a broquidódroma, nervuras secundárias 5–11 pares, convergentes e arqueadas. Inflorescências espiciformes, axilares; pedúnculos 0,5–3 cm compr.,

cilíndricos, puberulentos; brácteas 1–2 mm compr., ovais, puberulentas, caducas. Flores sésseis; cálice 0,7–2 mm compr., cupuliforme, lobos puberulentos; corola 3–5,5 mm compr., infundibuliforme, lobos puberulentos; tubo estaminal 4–6,5 mm compr., exserto, estames 28–60, porção livre dos filetes 5–10 mm compr.; ovário 1,5–2 mm compr., elipsóide, glabro; estilete filiforme, excedendo os estames; estigma globoso; óvulos 10–20. Legume 3,7–15,2 × 1,2–2,5 × 0,3–0,7 cm, reto ou curvado, convexo, castanho, com nervações transversais proeminentes, não sulcado, coriáceo, glabro, ápice e base agudos a obtusos, margens espessas e onduladas, apiculado, estipitado. Sementes 0,8–1,2 × 0,4–0,6 cm, oblongóides a obovóides, rugosas, glabras<sup>?</sup>. (SOUSA, BASTOS e RUGEL, 2011, p. 7)

Na Figura 10 pode ser observado as características morfológicas de alguns táxons de *I. laurina*, descritos anteriormente.

Figura 10: Imagens da morfologia de *I. laurina*.



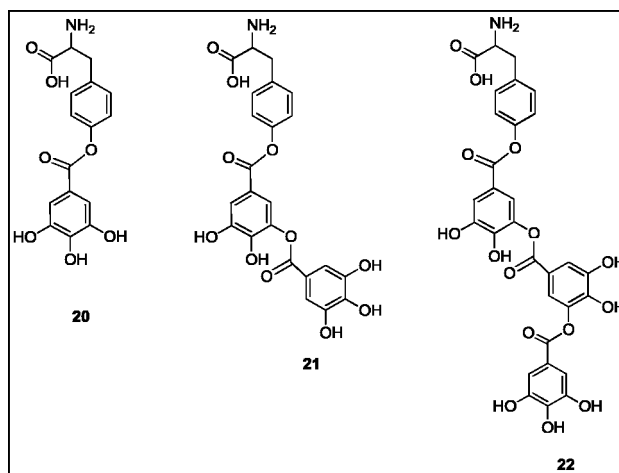
Nota: A = árvore. Fonte: Rabelo (2012); B = nectário; C = ramo com inflorescência; D = fruto maduro; E = sarcotesta. Fonte: Mata (2009); F = germinação da semente. Fonte: Mata (2009); E = sarcotesta. Fonte: arquivo pessoal.



Esta planta é utilizada na urbanização de cidades porque mantém suas folhas durante o período da seca e é empregada no reflorestamento e sombreamento de culturas de café e cacau devido a estrutura da copa (MATA, 2009, LEÃO et al., 2012). O seu fruto adocicado é utilizado como alimento pelos homens e pela fauna. As aves que se alimentam do fruto atuam como dispersadores de sementes (MACEDO et al., 2007, LEÃO et al., 2012).

Apesar dessa planta ser bastante encontrada na flora brasileira, há poucos estudos sobre sua atividade biológica e compostos identificados ou isolados. No trabalho de Santana e outros (2005) foi avaliado o teor de lignina, nitrogênio e fósforo nas folhas de *I. laurina*, e os resultados indicaram alto teor de lignina (30,7% em massa) e alto teor de nitrogênio (1,8% e, massa) quando comparados com outras espécies estudadas.

Lokvam e colaboradores (2007) encontraram alto teor do aminoácido tirosina nas folhas jovens de *I. laurina* no Panamá e isolaram três galoil depsídeos de tirosina (galoiltirosina – pó branco, digaloil tirosina – pó branco e trigaloiltirosina – pó rosa) (Figura 11). Estes compostos são os componentes fenólicos majoritários nas folhas, juntamente com o flavonoide miricetina-3-*O*- $\alpha$ -(2''-*O*-galoil)ramnosídeo. O alto teor de tirosina nas folhas jovens (10,4% em massa seca) pode ser explicado através da atuação da tirosina no mecanismo de defesa da planta contra herbívoros. Rao e colaboradores (2011) sintetizaram o galoil depsídeo (isolado de *I. laurina*) e derivados e avaliaram a atividade antioxidante pelos métodos do radical DPPH e do superóxido NBT, em que os compostos avaliados apresentaram excelentes resultados de atividade antioxidante com valores de concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) muito baixos, entre 0,55 e 8,63  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para os dois métodos estudados.

Figura 11: Galoíl depsídeos de *I. laurina*.

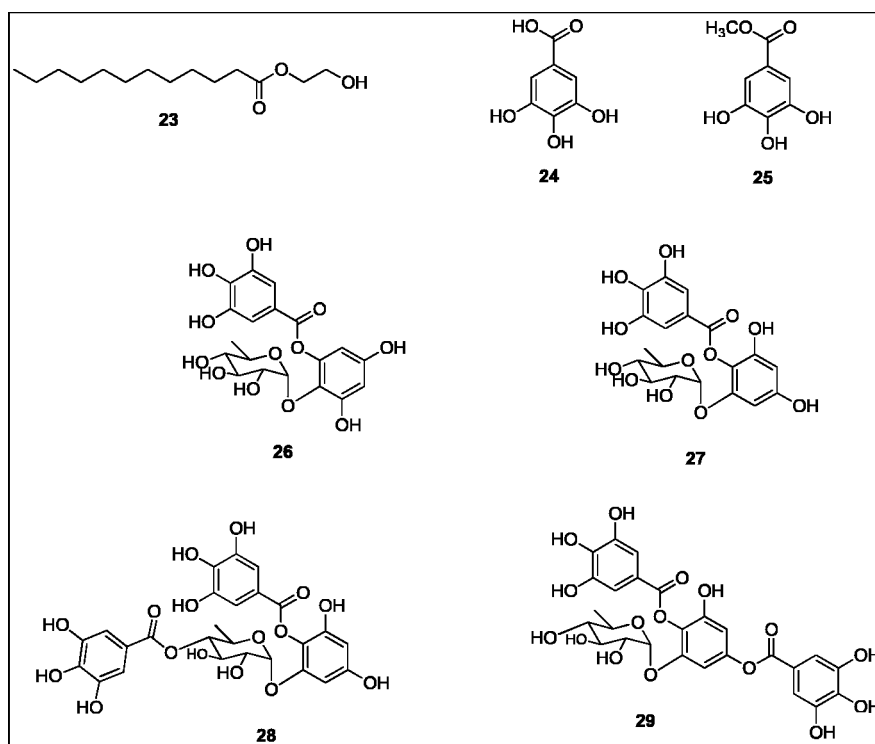
Nota: **20** = galoiltirosina, **21** = digaloiltirosina, **22** = trigaloiltirosina. Fonte: Lokvam e outros (2007).

No trabalho de Macedo e outros (2007) foi isolado e purificado um inibidor da enzima tripsina das sementes de *I. laurina*, sendo este um polipeptídeo contendo 180 unidades de aminoácidos. Foi avaliada a atividade deste inibidor contra a larva do besouro *Homalinotus coriaceus*, considerado uma praga nas culturas do coqueiro. Os resultados demonstraram que o inibidor da tripsina de *I. laurina* inibiu as proteinases do intestino e o crescimento de *H. coriaceus*, fazendo deste inibidor um candidato para o desenvolvimento de plantas transgênicas para aumentar a defesa das plantas contra insetos predadores (MACEDO et al., 2011). Além disso, também foi avaliada a atividade deste inibidor contra as larvas de *Diatraea saccharalis*, uma praga das culturas de cana, sorgo, milho e arroz, e *Heliothis virescens*, uma praga das culturas do tabaco, algodão tomate e girassol. Os resultados, também, foram promissores, em que o inibidor de tripsina de *I. laurina* apresentou propriedades inseticidas contras os insetos estudados, podendo ser utilizado na engenharia genética de plantas (RAMOS et al., 2012). Este peptídeo também apresentou atividade antifúngica, inibindo o crescimento de *C. tropicalis* e *C. buinensis* (MACEDO et al., 2016).

No trabalho de Marqui (2011) foram isolados alguns metabólitos das folhas e ramos de *I. laurina*. Da fração hexânica foi isolado o dodecanotato de 2-hidroxietila e da fração acetato de etila foram isolados o ácido gálico, galato de metila, galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila, galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila, galato de 2-(4'-galoil)ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila e galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-

6-hidroxifenila. Os compostos galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila e galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-6-hidroxifenila apresentaram elevada capacidade antioxidante avaliada pelos ensaios do radical DPPH e com o ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico). As estruturas destes compostos estão apresentadas na Figura 12.

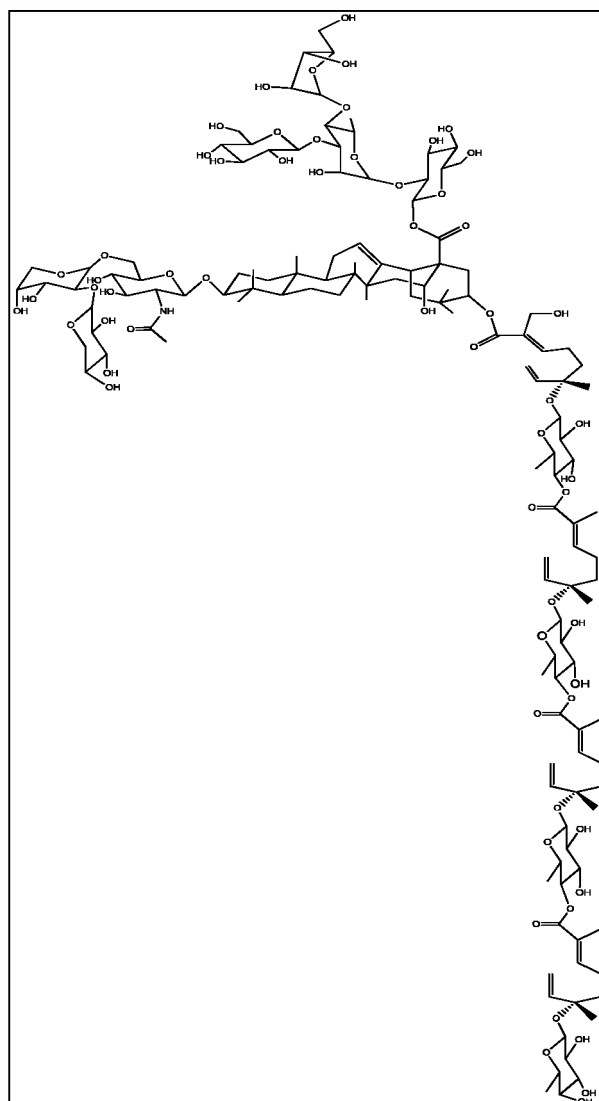
Figura 12: Metabólitos isolados de *I. laurina*.



Nota: **23** = dodecanotato de 2-hidroxietila; **24** = ácido gálico; **25** = galato de metila; **26** = galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila; **27** = galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila; **28** = galato de 2-(4'-galoil) ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila; **29** = galato de 2-ramnopiranosil-4-galoil-6-hidroxifenila. Fonte: Marqui (2011).

Das sementes de *I. laurina* foi isolada a saponina ingasaponina, sendo a primeira saponina do gênero *Inga*. Trata-se uma molécula que possui estrutura complexa de fórmula molecular  $C_{135}H_{211}NO_{61}$  (Figura 13), que apresentou atividade hemolítica e imunoadjuvante em ensaios realizados *in vitro* e *in vivo*, respectivamente (CRUZ et al., 2016).

Figura 13: Estrutura da ingasaponina.



Fonte: Cruz (2016).

Os constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas e cascas de *I. laurina* foram identificados. Foi realizado um estudo da composição química em duas estações: seca e chuvosa, em que foi verificado diferenças na composição química do óleo essencial nas duas estações. O óleo das folhas é constituído principalmente de ésteres (42,35%) na estação seca e de terpenoides, alcanos de cadeia longa e ácidos graxos na estação chuvosa, enquanto que o óleo das cascas é composto principalmente por terpenoides na estação seca e terpenoides e ácidos graxos na estação chuvosa (FURTADO et al., 2014a). Neste mesmo trabalho, também, foi avaliada a atividade

antimicrobiana dos óleos essenciais, em que foi observado melhor inibição do crescimento bacteriano nos óleos essenciais na estação chuvosa devido a maior concentração de ácidos graxos na composição dos óleos.

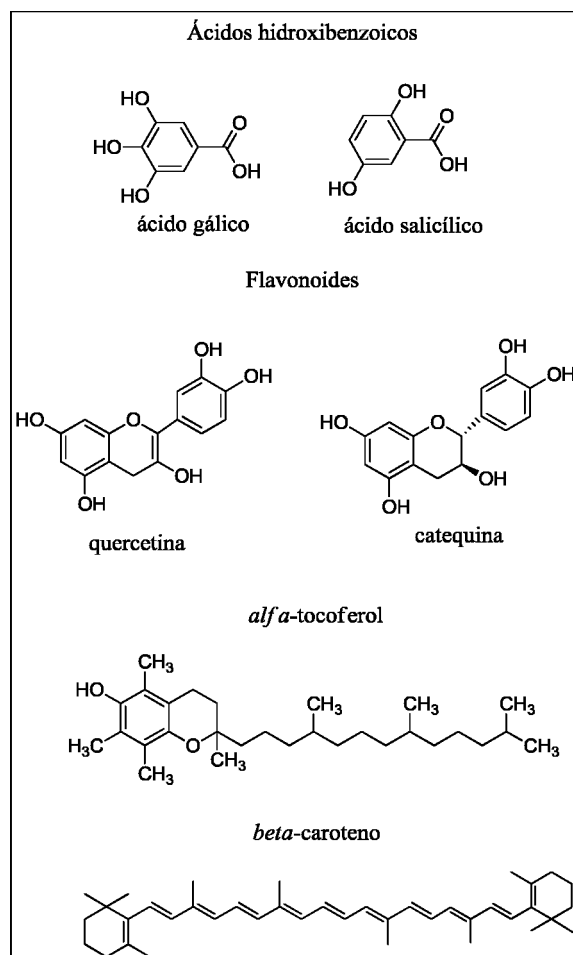
### *2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE*

Atualmente há uma grande preocupação com a alimentação humana para o consumo de alimentos benéficos a saúde, como os produtos alimentares que possuem substâncias antioxidantes. O interesse nessas substâncias se intensificou na década de 1990, quando foi reconhecido que alimentos e bebidas incluindo frutas, legumes, chá, vinho tinto, café e cacau, os quais são constituídos de substâncias polifenólicas, estão associados com a atividade antioxidante (AA) desses alimentos (ROGINSKY; LISSI, 2005). A atividade antioxidante é definida como a habilidade de uma substância, em pequena concentração, em inibir a degradação oxidativa, como por exemplo, a peroxidação de lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Nos alimentos os compostos fenólicos (como ácidos fenólicos, flavonoides, tocoferóis e carotenoides) são os principais constituintes antioxidantes (ROGINSKY; LISSI, 2005, LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

O organismo humano produz radicais livres como parte do seu metabolismo, nas células aeróbias, por exemplo, pode ocorrer o aparecimento de radicais superóxido devido à redução incompleta do oxigênio na cadeia de transporte de elétrons que ocorre no interior da mitocôndria (VERMA; PRATAP, 2010). Além disso, o organismo possui sistemas de defesa que o protegem dos radicais livres, como os sistemas enzimáticos superóxido dismutase, as catalases e a glutathione peroxidase, porém, quando há um desequilíbrio entre o mecanismo de defesa antioxidante e os radicais livres, há o aparecimento das doenças, como câncer, doenças cardiovasculares e inflamatórias, as quais estão associadas com o aparecimento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON), que causam danos às células (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007, WEIDINGER; KOZLOV, 2015). Para prevenir esse estresse oxidativo causado pelo desequilíbrio entre substâncias antioxidantes e agentes oxidantes, é recomendado na dieta humana o consumo de alimentos que possuem substâncias antioxidantes (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007, VERMA; PRATAP, 2010). Na

Figura 14 são apresentadas as estruturas de alguns compostos antioxidantes presentes em plantas.

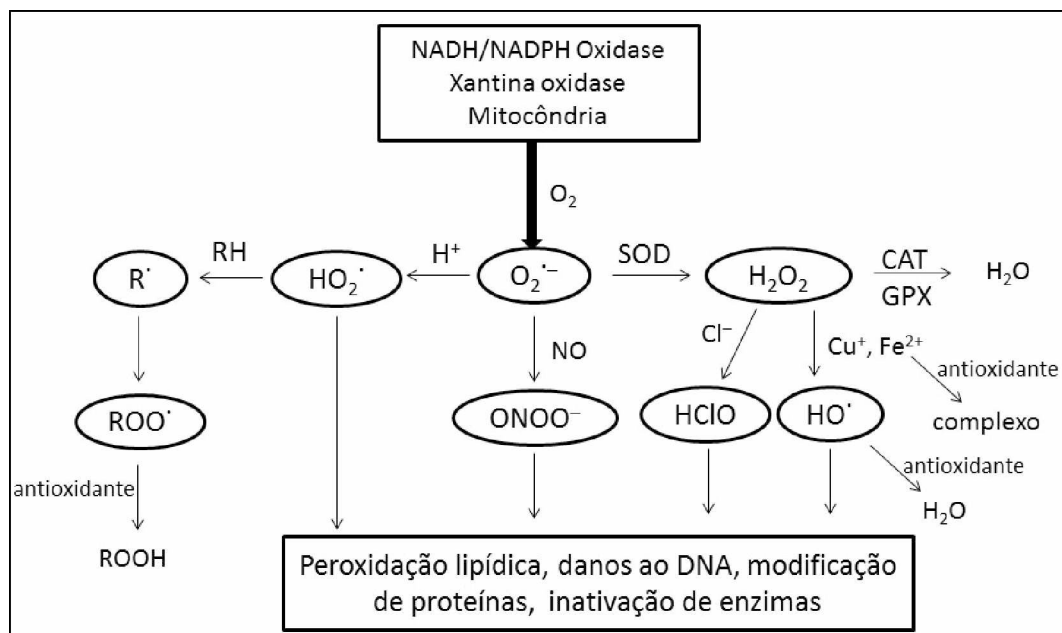
Figura 14: Estruturas de substâncias antioxidantes de plantas.



Fonte: Laguerre, Lecomte e Villeneuve (2007).

O termo ERON (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio) é usado para designar as seguintes espécies: radical hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ), radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), radical peroxila ( $\text{RO}_2^\bullet$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e ozônio ( $\text{O}_3$ ) (ARUOMA, 1998, LIU, 2010, WEIDINGER; KOZLOV, 2015). Todas essas espécies podem conduzir a reações de radicais livres nos organismos vivos, causar danos às células e provocar o aparecimento de doenças, especialmente às relacionadas com a idade (LÜ et al., 2010, WEIDINGER; KOZLOV, 2015). Na Figura 15 é apresentado um esquema que mostra a formação destas espécies no metabolismo celular.

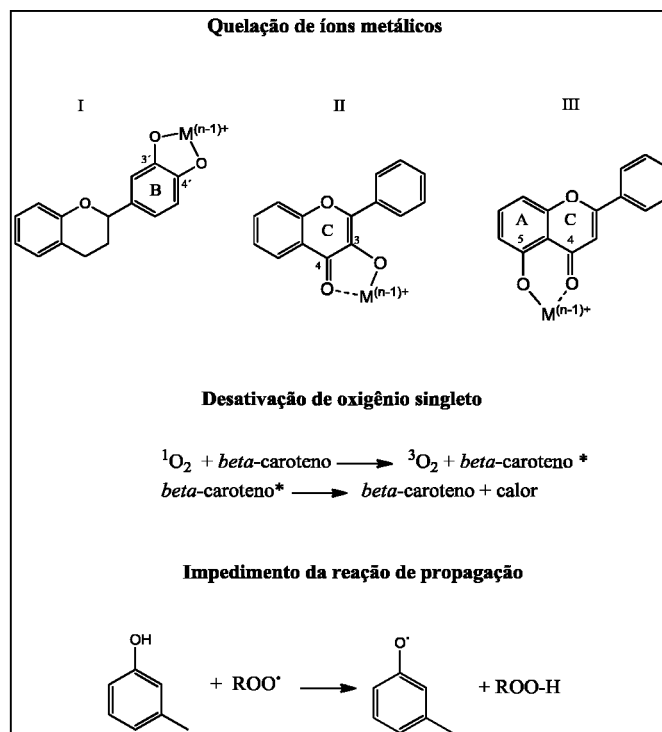
Figura 15: Esquema da formação de ERON no metabolismo celular.



Nota:  $O_2^{\bullet-}$ : radical superóxido,  $HO_2^{\bullet}$ : radical peridroxila,  $HO^{\bullet}$ : radical hidroxila,  $H_2O_2$ : peróxido de hidrogênio,  $HClO$ : ácido hipocloroso,  $ONOO^-$ : peroxinitrito,  $R^{\bullet}$ : radical alquílico lipídico,  $RH$ : lipídeo,  $ROO^{\bullet}$ : radical peroxil lipídico,  $ROOH$ : hidroperóxido lipídico,  $SOD$ : superóxido dismutase,  $CAT$ : catalase e  $GPX$ : glutathiona peroxidase. Fonte: Lü et al. (2010).

Um antioxidante é uma espécie química capaz de retardar a auto-oxidação, impedindo a formação de radicais livres ou interrompendo a propagação da reação em cadeia da etapa de oxidação através dos seguintes mecanismos: (a) impedindo a formação de espécies reativas de oxigênio ou eliminando as espécies responsáveis pela etapa de iniciação na reação de oxidação, como o radical superóxido e oxigênio singlete (b) quelação de íons metálicos que poderiam catalisar a formação de ERO, (c) retardando a fase de propagação da oxidação lipídica, interceptando os “propagadores” da oxidação ou impedindo a propagação da reação em cadeia, (d) reparando os danos oxidativos e diminuindo a concentração de  $O_2$  nas células (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007, BREWER, 2011, HAN; ZHANG; SKIBSTED, 2012). Na Figura 16 é mostrado alguns mecanismos de ação de substâncias antioxidantes.

Figura 16: Mecanismos de inibição da oxidação.



Fonte: Laguerre, Lecomte e Villeneuve (2007).

As reações de quelação de metais não são muito importantes na peroxidação de lipídeos, porém, são primordiais na inibição da quebra de cadeias simples do DNA. Substâncias como os ácidos fenólicos e flavonoides possuem esse tipo de mecanismo na prevenção oxidativa. Os carotenoides podem reagir desativando o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e o transformando em oxigênio tripleto ( $^3\text{O}_2$ ), devido ao sistema conjugado em suas estruturas, o excesso de energia absorvido no seu estado excitado pode ser liberado em interações vibracionais e rotacionais com o solvente e o meio reacional. Substâncias que podem perder um hidrogênio radical podem impedir a reação de propagação reagindo com os radicais peroxila lipídicos gerados no processo oxidativo. Compostos fenólicos, tocoferóis, flavonoides, ácidos orgânicos e estilbenos podem retardar o processo oxidativo através desse mecanismo (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).



## 2.4 INIBIÇÃO DE $\alpha$ -AMILASE

A saliva é um fluido oral secretado pelas glândulas salivares para manter a via oral úmida, a fim de evitar a abrasão da mucosa e ajudar na remoção de microrganismos, células epiteliais descamadas e restos de alimentos da cavidade oral (DAWES et al., 2015). Uma das principais enzimas da saliva é a  $\alpha$ -amilase, a qual é importante no metabolismo de carboidratos de plantas e de seres humanos (HOMOKI et al., 2016).

As amilases podem ser obtidas de plantas, animais e microrganismos e são classificadas em três categorias de acordo com o mecanismo de ação:  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e  $\gamma$ -amilase (HITESHI; GUPTA, 2014). Na Tabela 3 é mostrada a classificação das amilases.

Tabela 3: Classificação das amilases.

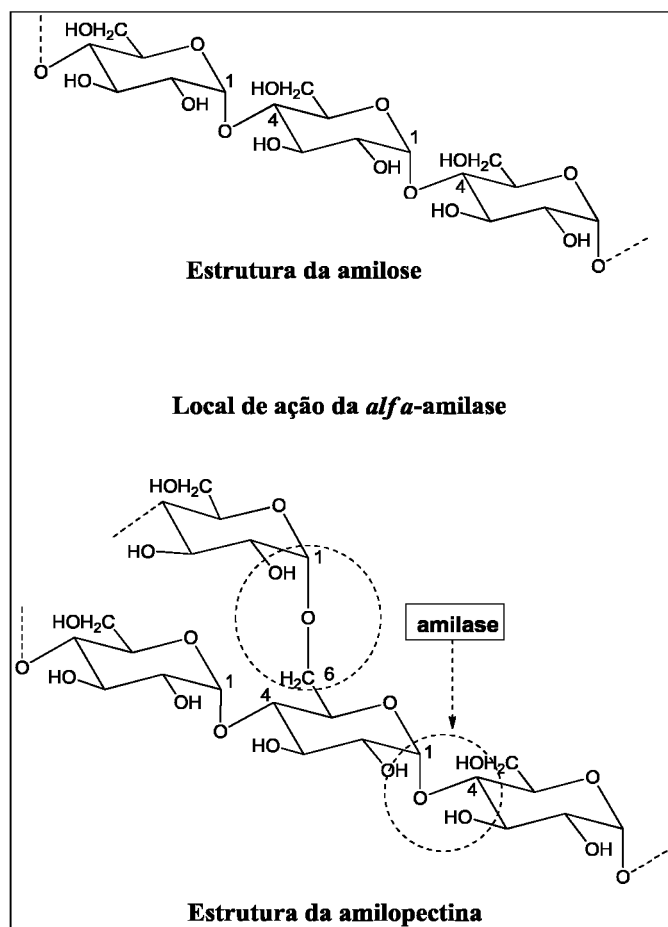
Nome da enzima	Classificação	Nomenclatura oficial	Mecanismo de ação
$\alpha$ -amilase	EC 3.2.1.1	4- $\alpha$ -D-glucano glucanoidrolase	Hidrólise das ligações internas 1,4- $\alpha$ -glicosídicas
$\beta$ -amilase	EC 3.2.1.2	4- $\alpha$ -D-glucano maltoidrolase	Hidrólise de resíduos terminais de $\alpha$ -D-glicose com ligações 1,4- glicosídicas
$\gamma$ -amilase	EC 3.2.1.3	4- $\alpha$ -D-glucano glucoidrolase	Hidrólise de resíduos terminais de $\alpha$ -D-glicose com ligações 1,4-glicosídicas ou ligações 1,6-glicosídicas.

Nota: EC: *Enzyme Commission number*. Fonte: Hiteshi e Gupta (2014).

O amido é uma substância formada por dois tipos de polímeros de glicose, a amilose e a amilopectina. A amilose é um polímero linear que possui cerca de 6.000 unidades de glicose unidas através de ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas e a amilopectina é um polímero ramificado de glicose formado através de ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas e ligações  $\alpha$ -1,6 glicosídicas. A  $\alpha$ -amilase quebra somente as ligações internas  $\alpha$ -1,4 glicosídicas da amilose ou da amilopectina (DE SOUZA; DE OLIVEIRA

MAGALHÃES, 2010). Na Figura 17 é mostrado as estruturas da amilose e da amilopectina e o local de ação da  $\alpha$ -amilase na amilopectina.

Figura 17: Estrutura dos polímeros do amido.



Fonte: adaptado de Boehlke, Zierau e Hanning (2015); de Souza, Oliveira e Magalhães (2010).

O *diabetes mellitus* é uma doença metabólica comum que afeta milhões de pessoas no mundo. Ela está associada a disfunções ou insuficiências de alguns órgãos, como olhos, rins, cérebro, coração e vasos sanguíneos, podendo causar defeitos na ação da insulina provocando a destruição de células beta do pâncreas o que retarda a produção da insulina, causando a hiperglicemia. Existem dois tipos de diabetes, o tipo 1 que é caracterizado pela deficiência absoluta de insulina, ou seja, o indivíduo não produz insulina devido a destruição das células beta do pâncreas e o tipo 2 que é

caracterizado pela deficiência relativa de insulina, ou seja, a produção de insulina pelo indivíduo é insuficiente para o controle glicêmico (BRASIL, 2006).

Uma das alternativas para o tratamento do diabetes tipo 2 consiste na inibição da  $\alpha$ -amilase, que atua na degradação do amido em glicose, a inibição dessa enzima ajuda na diminuição da concentração de glicose pós-prandial, já que haverá uma redução nos níveis de glicose no sangue (SALES et al., 2012, DASTJERDI; NAMJOYAN; AZEMI, 2015).

A inibição da  $\alpha$ -amilase também é importante no controle de pragas e insetos, pois o uso excessivo de inseticidas tem contribuído para o surgimento de insetos resistentes, causando a contaminação de grãos (MARSARO JÚNIOR et al., 2005). Essa enzima é essencial para o crescimento e desenvolvimento dos insetos, pois precisam dessa enzima para digerir os carboidratos e obter nutrientes (FRANCO et al., 2002, WANG et al., 2011, KAUR; KAUR; GUPTA, 2014). Os inibidores de amilase podem desempenhar uma função inseticida porque formam complexos com a  $\alpha$ -amilase causando sua inativação, assim ocorrerá uma baixa absorção de nutrientes retardando o desenvolvimento, podendo causar a morte do inseto devido à fome (MEHRABADI et al., 2012, RAHIMI; BANDANI, 2014).

As enzimas  $\alpha$ -amilase salivar e  $\alpha$ -amilase pancreática desempenham um papel importante na saúde dos seres humanos, porque são indicadores de distúrbios do pâncreas e das glândulas salivares, como pancreatite aguda e parotidite (KANDRA, 2003). A  $\alpha$ -amilase salivar possui três funções biológicas distintas: ela atua na degradação inicial do amido (polissacarídeos) em oligômeros, como maltose e glicose; essa enzima atua como um receptor específico de bactérias, como as bactérias bucais do gênero *Streptococos*, hidrolisando o amido que pode ser usado como alimento para as bactérias, levando a formação de um biofilme bacteriano; e ela pode se ligar ao esmalte dos dentes ou a hidroxiapatita atuando na formação da placa dentária (KANDRA, 2003, SALES et al., 2012, BOEHLKE; ZIERAU; HANNIG, 2015). Dessa forma, a inibição dessa enzima tem sido o objetivo de vários trabalhos para o tratamento de diabetes, obesidade e doenças bucais (KANDRA et al., 2004, LEE et al., 2012, SALES et al., 2012, LORDAN et al., 2013, DASTJERDI; NAMJOYAN; AZEMI, 2015, HOMOKI et al., 2016).

## 2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As doenças infecciosas são um problema de saúde pública mundial. Em 2012 9,1 milhões de pessoas morreram devido a estas doenças, incluindo doenças parasitárias e respiratórias. Os agentes patogênicos causadores dessas doenças, como bactérias, parasitas, vírus e fungos estão resistentes a certos medicamentos, fato que prejudica o tratamento e prevenção de várias infecções. Os principais problemas da resistência bacteriana são relatados para infecções respiratórias, gastrointestinais, feridas e outras enfermidades causadas por *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, as quais são bactérias resistentes aos antibióticos cujos princípios ativos são as cefalosporinas de terceira geração (WHO, 2015).

Uma grande quantidade de antibióticos é produzida no mundo para combater microrganismos causadores de doenças e o uso excessivo destes medicamentos leva ao surgimento da resistência aos antibióticos (GUPTA; DUBEY; KUMAR, 2016). Esta resistência ocorre através dos seguintes mecanismos: modificação enzimática ou inativação do antibiótico, redução da absorção do antibiótico na bactéria, aumento do efluxo do antibiótico da bactéria e alteração ou produção de um novo alvo bacteriano através de mutação genética (HANCOCK; STROHL, 2001, LIVERMORE, 2003, CHAKRABORTY et al., 2014). Além disso, os medicamentos antimicrobianos sintéticos são descritos na literatura como causadores de efeitos colaterais nos pacientes, possuem alta toxicidade e baixa tolerância e são ineficazes contra microrganismos novos (RAKHOLIYA; KANERIA; CHANDA, 2013).

Neste contexto, a pesquisa com plantas medicinais para o descobrimento de novos metabólitos com atividade antimicrobiana é uma alternativa significativa para produção de novos medicamentos resistentes às infecções microbianas (MICKYMARAY et al., 2016). Existem vários trabalhos na literatura que estudaram as propriedades antimicrobianas de plantas medicinais (MAHESH; SATISH, 2008, SILVA; FERNANDES JÚNIOR, 2010, SILVA; FERNANDES JUNIOR, 2010, RAKHOLIYA; KANERIA; CHANDA, 2013, CHAKRABORTY et al., 2014, AKHTAR; IHSAN UL; MIRZA, 2015, ASHRAF et al., 2015), comprovando que os produtos naturais são uma grande fonte de substâncias biologicamente ativas para o tratamento de doenças.

Os extratos de plantas medicinais possuem vários mecanismos de ação contra microrganismos patógenos devido as interações sinérgicas entre os compostos ativos e os agentes antimicrobianos (CHAKRABORTY et al., 2014). A utilização de extratos de plantas ou óleos essenciais em combinação com antibióticos possui melhor atividade antimicrobiana do que os componentes individuais, resultando em menores valores para concentração inibitória mínima (CIM), além disso, as plantas medicinais com atividade antimicrobiana são utilizadas na indústria alimentícia para evitar a contaminação microbiana e o crescimento de microrganismos e na indústria cosmética para prevenir a contaminação por microrganismos (RAKHOLIYA; KANERIA; CHANDA, 2013).

#### 2.5.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA COM ÊNFASE EM DOENÇAS ORAIS

A alimentação da população no mundo todo tem mudado. Atualmente há um aumento no consumo de carboidratos levando a um consumo excessivo de açúcares, além disso, com o desenvolvimento das técnicas de conservação e fermentação de alimentos houve um aumento no consumo de bebidas ácidas, essa mudança no estilo de vida da população contribuiu para o aumento nos casos de doenças sistêmicas e não transmissíveis como diabetes, aterosclerose e doenças orais (KAIDONIS; TOWNSEND, 2016).

As doenças bucais mais comuns em todo mundo que afetam as pessoas mais jovens são a cárie e a periodontite (RAKHOLIYA; KANERIA; CHANDA, 2013). A cárie dentária é causada pela acumulação e colonização de microrganismos orais, que se não for controlada pode evoluir para uma inflamação e provocar a morte do tecido. Essa doença infecciosa está associada as bactérias dos gêneros *Streptococcus*, como *S. mutans* e *S. sobrinus* e *Lactobacillus* ssp. (ALLAKER; DOUGLAS, 2009, GUPTA et al., 2009). A periodontite está relacionada à perda do suporte alveolar do dente e é causada principalmente pelas bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ALLAKER; DOUGLAS, 2009).

O uso excessivo de antibióticos no tratamento de doenças bucais tem contribuído para a resistência bacteriana dos medicamentos disponíveis no mercado, levando a um distúrbio da flora oral e intestinal, provocando vômito, diarreia e coloração do dente (RAKHOLIYA; KANERIA; CHANDA, 2013). Vários agentes antimicrobianos como ampicilina, clorexidina, sanguinarina, metronidazol e antissépticos de amônio

quaternário e compostos fenólicos têm sido muito eficazes na prevenção da cárie dentária (PORTO et al., 2009, BERNARDES et al., 2010). No entanto, esses medicamentos causam efeitos adversos nos pacientes, como os citados anteriormente. Assim, estes inconvenientes justificam a busca por novas e eficazes substâncias antimicrobianas que poderiam ser empregadas na prevenção de doenças orais.

Os produtos naturais, como as plantas medicinais, têm sido alvo de estudos para o descobrimento de novas classes de antibióticos para o tratamento de enfermidades devido ao surgimento de novas infecções (ALVIANO et al., 2008). Vários produtos comercializados atualmente possuem princípios ativos de produtos naturais, como o antisséptico bucal Listerine®, que possui os ingredientes timol, eucaliptol, salicilato de metila e mentol, obtidos a partir de óleos essenciais (ALLAKER; DOUGLAS, 2009).

Existem vários trabalhos na literatura sobre as propriedades antimicrobianas de produtos naturais com ênfase em doenças orais. Extratos de plantas, substâncias isoladas e óleos essenciais já foram estudados e apresentaram atividade antibacteriana (CHUNG et al., 2006, CUNHA et al., 2007, TSUI; WONG; RABIE, 2008, PORTO et al., 2009, BERNARDES et al., 2010, VIEIRA et al., 2014). Os principais agentes fitoquímicos identificados que possuem ação terapêutica são os fenóis, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, alcaloides e lectinas (ALLAKER; DOUGLAS, 2009).

### 2.5.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

As infecções fúngicas causam graves efeitos na saúde do homem, elas nem sempre são reconhecidas e as mortes decorrentes dessas doenças são geralmente negligenciadas. Não existem programas para o tratamento destas infecções, apenas o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (*Center for Disease Control and Prevention* – CDC) possui uma pequena vigilância micológica. Nos últimos cinco anos, do valor total investido para o desenvolvimento de novos medicamentos para doenças imunológicas e infecciosas, apenas 1,4 a 2,5% foram destinados para doenças causadas por fungos (BROWN et al., 2012).

As principais formas de manifestações de infecções fúngicas são dermatites, como pé de atleta, micose do couro cabeludo, infecção nas unhas, na mucosa oral e em órgão genitais, como a candidíase vulvovaginal, que afeta várias mulheres no mundo.

Estas infecções superficiais são causadas por fungos do gênero *Candida*, especialmente *C. albicans* (BROWN et al., 2012). Além disso, espécies dos gêneros *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* e *Candida* são responsáveis por cerca de 90% das mortes causados por infecções invasivas de fungos (BROWN et al., 2012, KATHIRAVAN et al., 2012).

Os fungos do gênero *Candida* fazem parte da flora microbiana do nosso organismo, eles estão presentes em superfícies mucosas como a cavidade bucal, a pele e órgãos genitais. Porém, quando há um desequilíbrio dessa flora surge várias doenças infecciosas, como a candidíase e a infecção na corrente sanguínea (candidemia), a qual pode se espalhar para outras partes do corpo como olhos, fígado, baço, ossos, entre outros. Essa doença pode levar a óbito as pessoas infectadas caso não seja tratada. Dentre as espécies de *Candida*, *C. albicans* é responsável pela maioria dos casos de infecção, sendo a espécie mais patogênica (ARENDRUP, 2010).

As doenças causadas por fungos são difíceis de serem detectadas e há poucas opções de medicamentos para o tratamento das doenças. Em indivíduos saudáveis o sistema imunológico consegue se defender das infecções fúngicas, porém, em indivíduos com infecções imunossupressoras, como HIV, com órgãos transplantados e em tratamento de câncer é mais comum a incidência de doenças invasivas resultando num aumento das infecções fúngicas (BROWN et al., 2012, BRANDT; PARK, 2013, PERLIN; SHOR; ZHAO, 2015).

Pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) estão sujeitos a adquirir infecções causadas por microrganismos. Vicent e outros (2009) realizaram um estudo com 13.796 pacientes, em 1.265 UTIs, em 75 países da Europa, América, Ásia e Oceania. Eles verificaram que 51% dos doentes estavam infectados com microrganismos, sendo que 16% destes pacientes estavam recebendo tratamento contra infecções causadas por fungos, especialmente para espécies de *Candida*, além disso, foi observada infecções causadas por *Staphylococcus aureus* (20%), *Pseudomonas ssp.* (20%) e *Escherichia coli* (16%). Este estudo demonstra que doenças infecciosas são um problema nos hospitais e que a descoberta de novas substâncias antimicrobianas é uma alternativa para o desenvolvimento de medicamentos para profilaxia de infecções.

Os medicamentos antifúngicos mais utilizados pertencem as seguintes classes químicas: azoles (fluconazol, voriconazol, posaconazol, e isavuconazole), polienos (anfotericina B), equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina),

fluoropirimidinas (flucitosina) e alilaminas (terbinafina) (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002, ROGERS, 2006, PERLIN; SHOR; ZHAO, 2015). Porém, tem se relatado resistência de algumas espécies com o uso destes medicamentos para o tratamento das infecções, como resistência de espécies de *Candida* e *Aspergillus* aos azoles (KLEPSE; ERNST; PFALLER, 1997, ROGERS, 2006, MORACE; PERDONI; BORGHI, 2014).

Em um trabalho sobre epidemiologia de candidemia em diferentes países da América Latina, os autores verificaram que *C. albicans* é o principal agente, responsável por 37,6% das infecções, seguido por *C. parapsilosis* (26,5%), *C. tropicalis* (17,6%), *C. guilliermondii* (6,5%), *C. glabrata* (6,3%) e *C. krusei* (2,7%), evidenciando a grande variedade de espécies patogênicas do gênero *Candida* (NUCCI et al., 2013). No mesmo trabalho foi mostrado que os fungos isolados da corrente sanguínea dos pacientes infectados foram suscetíveis ao fluconazol, voriconazol, anfotericina e anidulafungina.

Vários trabalhos na literatura explicam as possíveis causas da resistência antifúngica, acredita-se que os mecanismos da resistência envolvam a diminuição da absorção dos medicamentos, modificação do alvo da droga ou redução da droga em nível celular, restrição da entrada de medicamentos devido a regulação da bomba de efluxo que diminui a concentração do fármaco dentro da célula do fungo e evolução genética dos fungos (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002, PFALLER, 2012, PERLIN; SHOR; ZHAO, 2015).

Existem alguns trabalhos na literatura sobre a atividade antifúngica de plantas medicinais (QUIROGA; SAMPIETRO; VATTUONE, 2001, FENNER et al., 2005, ALANÍS-GARZA et al., 2007, WEBSTER et al., 2008, TEODORO et al., 2015), contudo, ainda são necessárias mais pesquisas para o desenvolvimento de medicamentos capazes de combater fungos patogênicos menos comuns, como espécies de *Fusarium* spp., que causam infecções em pacientes que estão em tratamento de quimioterapia ou que fizeram transplante de medula óssea (FLEMING; WALSH; ANAÏSSIE, 2002). Nucci e outros (2013a) relataram um aumento na incidência de infecções causadas por *Fusarium* spp. em pacientes internados na unidade de hematologia no Hospital Universitário da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sendo que as infecções começaram como infecções na pele e nas unhas em pacientes imunocomprometidos.



## 2.6 ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA

Os protozoários são microrganismos causadores de graves doenças, como a malária, leishmaniose, doença de Chagas, doença do sono e amebíase, as quais são responsáveis pela morbidade e mortalidade de milhares de pessoas em países tropicais. Não existem vacinas para essas doenças e a maioria dos medicamentos para o **tratamento em pacientes causam efeitos colaterais agressivos, são “antigos”, ou seja,** foram desenvolvidos há vários anos e alguns possuem resistência aos parasitas. Como essas doenças atingem a população mais pobre, as empresas farmacêuticas não investem em pesquisa nessa área devido à falta de retorno financeiro e o apoio ao desenvolvimento de novos medicamentos está sujeito aos órgãos públicos e as organizações não governamentais (LUPI et al., 2009, ASTELBAUER; WALOCHNIK, 2011).

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) afetam a saúde de milhares de pessoas no mundo, cerca de 1 bilhão de indivíduos sofrem devido a essas doenças (WHO, 2010). Em 2010 a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou uma lista com 17 DTN que mais atingem a população que vive na extrema pobreza e não têm acesso a programas de saúde pública, dentre estas doenças, destacam-se a doença de Chagas e a leishmaniose que são causadas por protozoários patogênicos do filo kinetoplastida.

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários de diferentes espécies de *Leishmania*, e são transmitidas por meio de picadas de flebotomíneos fêmeas infectadas. Existem 20 espécies de *Leishmania* que são patogênicas para o homem (WHO, 2010, 2012). As principais formas clínicas da doença são a leishmaniose cutânea, que é a forma mais comum da doença, a leishmaniose cutânea difusa, que é uma manifestação severa da doença que se assemelha a hanseníase virchowiana (lepra), a leishmaniose muco cutânea, que causa destruição de cavidades oral provocando a mutilação do rosto e a leishmaniose visceral (LV) (ou calazar) que é a forma mais grave da doença e pode ser fatal se não for tratada (DESJEUX, 2004). Um fator de risco para esta doença é a coinfeção, principalmente em pacientes com LV e com HIV em países do Mediterrâneo, Brasil, leste da África e subcontinente indiano (DESJEUX, 2004, WHO, 2012).

Nos países do velho mundo da Ásia, África e Europa a leishmaniose cutânea é provocada por espécies de *Leishmania major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. infantum*. Já nos países do novo mundo, na América Latina, a doença é causada por *Leishmania braziliensis*, que é a espécie mais dominante, seguida por *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* (TORRES et al., 2014). No Brasil as principais espécies causadoras de doenças na região amazônica são *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (LIMA et al., 2012), sendo que as infecções geralmente ocorrem nos membros inferiores (úlceras de Bauru) (LUPI et al., 2009). Essa é uma doença negligenciada grave no país. No período de 1980 a 2008 foram relatados mais de 70 mil casos de LV com 3.800 mortes. Em 2007, 50% dos casos da doença foi notificado na região nordeste (WERNECK, 2010).

Os medicamentos para o tratamento da leishmaniose causam efeitos colaterais adversos em pacientes, além disso, são caros e não estão disponíveis para a população mais pobre que necessita dos medicamentos para o tratamento da doença. Entre 2000 e 2011, de 850 novos medicamentos produzidos apenas 1% (5 medicamentos) foram desenvolvidos para o tratamentos de doenças negligenciadas, especialmente doença de Chagas, leishmaniose e tripanossomíase humana africana, (PEDRIQUE et al., 2013) dados que corroboram a necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de novas formulações, principalmente a partir de produtos naturais.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar as atividades antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antiprotozoária, inibidora de  $\alpha$ -amilase e citotóxica dos extratos e frações de *Inga laurina*, e caracterizar e/ou determinar a estrutura dos constituintes químicos presentes nesta espécie

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, inibidora de  $\alpha$ -amilase, antiprotozoária e citotóxica dos extratos e frações das folhas e cascas de *I. laurina*;
- Realizar o fracionamento em coluna das frações com melhores resultados das atividades biológicas testadas para isolar os constituintes bioativos;
- Identificar as estruturas das substâncias isoladas através de métodos espectroscópicos de análise como Ultravioleta-visível, RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135 (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*), RMN por correlações, HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), COSY (*Homonuclear Correlation Spectroscopy*) e NOESY, (*Nuclear Overhauser Spectroscopy*) e métodos espectrométricos como EM/IES-EM/EM (Espectrometria de Massas por Ionização por Eletrospray Acoplado a Espectrometria de Massas Sequencial).
- Submeter as substâncias isoladas, se obtidas em quantidades suficientes, aos ensaios biológicos realizados com os extratos e frações.

## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1.1 REAGENTES E SOLVENTES

- Ácido gálico, anisaldeído, acetato de sódio, hidróxido de sódio, vanilina, polietilenoglicol 4000 (PEG 4000), cloreto de alumínio, cloroplatinato de potássio – marca Vetec Química Fina LTDA).
- Catequina, 2,6-di-tercbutil-4-metilfenol (BHT), difenilboriloxietilamina (NP), 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), substrato  $\alpha$ -(2-cloro-4-nitrofenil)- $\beta$ -1,4-galactopiranosilmaltoside (Gal-G2- $\alpha$ -CNP) – marca Sigma-Aldrich.
- FolinCiocalteu – marca Cromoline
- Quercetina – marca Arborvita
- Nitrato de bismuto – marca Isofar
- Iodeto de potássio – marca Ecibra
- Carbonato de sódio – marca Reagen
- Cloreto de potássio – marca Synth
- Solventes para extrações: hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol – diversas marcas: Merck, Neon, Synth e Vetec.
- Solventes para cromatografia: metanol e acetato de etila – diversas marcas Merck, Neon, Synth e Vetec.
- Solvente grau CLAE: metanol das marcas Sigma-Aldrich e J. T. Baker.
- Solvente deuterado para RMN: DMSO + 0,05% TMS – *Cambridge Isotope Laboratories*.

#### 4.1.2 FASES ESTACIONÁRIAS

- Cromatografia em coluna
- Sephadex LH-20 – marca GE Healthcare
- Sílica C18 – marca Sorbent Technologies
- Cromatografia em camada delgada (CCD):

- Sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV<sub>254</sub> ( $\Phi = 0,20$  mm), em folhas de alumínio da marca Macherey-Nagel.

- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):

- Analítica: fase reversa C18 da marca Phenomenex modelo Luna, 4,6 mm de diâmetro interno, 25 cm de comprimento, partículas de 5  $\mu\text{m}$  e poros de 100 Å de diâmetro.

- Semipreparativa: fase reversa C18 da marca Phenomenex modelo Synergi Hydro-RP, 21,20 mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento, partículas de 4  $\mu\text{m}$  e poros de 80 Å de diâmetro

#### 4.1.3 EQUIPAMENTOS

- Banho de aquecimento FISATOM modelo 550.
- Balança analítica SHIMADZU modelo AYW220D.
- Balança de luz infravermelha para determinação da umidade Quimis modelo Kett FD-600.
- Rotaevaporador IKA modelo RV 10.
- Lavadora ultra-sônica modelo USC 750 - Unique
- Liofilizador TERRONI modelo LS3000.
- Potenciostato Drop Sens  $\mu\text{Stat}$  200 e software Drop View 1.0.
- Espectrofotômetro Thermo Scientific, modelo Genesys 10S.
- Espectrofotômetro Hitachi, modelo U-2000.
- Espectrômetro de massas de alta resolução Bruker Daltonics modelo Micro-Q-TOF-II com fonte de ionização por eletrospray (IES).
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent, modelo Infinity 1260 acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução QTOF (*Quadrupole Time of Flight*) Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por eletrospray (IES).
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, modelo LC-6AD.
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Bruker modelo Ascend™ 400 Avance III HD (9,2 Tesla).

#### *4.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO*

A coleta do material vegetal (folhas e cascas) foi realizada próximo à rodovia BR-050 (18°59'13.96''S; 48°12'42.16''O), no município de Uberlândia, MG. A planta foi coletada de indivíduos diferentes, próximos uns aos outros. Ela foi identificada pelo professor Dr. Glein Monteiro de Araújo do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e sua exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (HUFU), com o seguinte número de registro: 64050 (FURTADO, 2014).

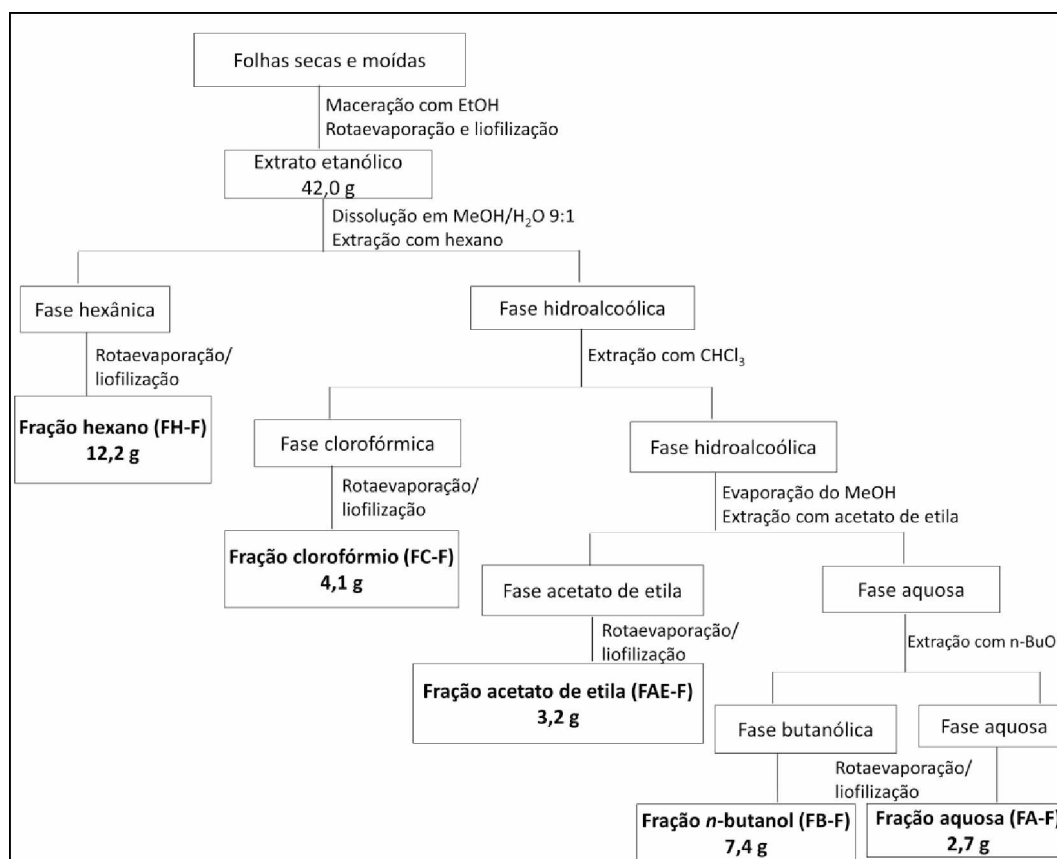
#### *4.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS E CASCAS*

Após secagem em estufa a aproximadamente 35 °C e moagem do material vegetal em moinho de facas, o extrato foi preparado, submetendo as amostras à extração à temperatura ambiente com etanol. Foram utilizados 1.400,0 g de cascas secas e moídas e realizadas 08 extrações em intervalo de 48h para cada repetição. Foram utilizados 900,0 g de folhas e realizadas 3 extrações durante um período de 48h para cada repetição (FURTADO, 2014). Ao final do processo de extração, foi realizada uma filtração simples utilizando papel de filtro e em seguida o solvente foi evaporado em rotaevaporador sob pressão reduzida. Depois de secos os extratos etanólicos foram liofilizados e os rendimentos calculados.

#### *4.4 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO DAS FOLHAS*

O extrato etanólico das folhas (42,0 g) foi solubilizado em solução metanol:água (9:1) e posteriormente submetido à extração líquido-líquido em um funil de separação utilizando solventes de polaridades crescentes (hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol) (Figura 18). Cada uma das frações obtidas foi concentrada em rotaevaporador, sob pressão reduzida, em banho a 40 °C, fornecendo, então, as respectivas frações do extrato bruto. As frações foram liofilizadas e guardadas em frascos de vidro sob refrigeração até o momento das análises (FURTADO, 2014).

Figura 18: Fluxograma da extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *I. laurina*.

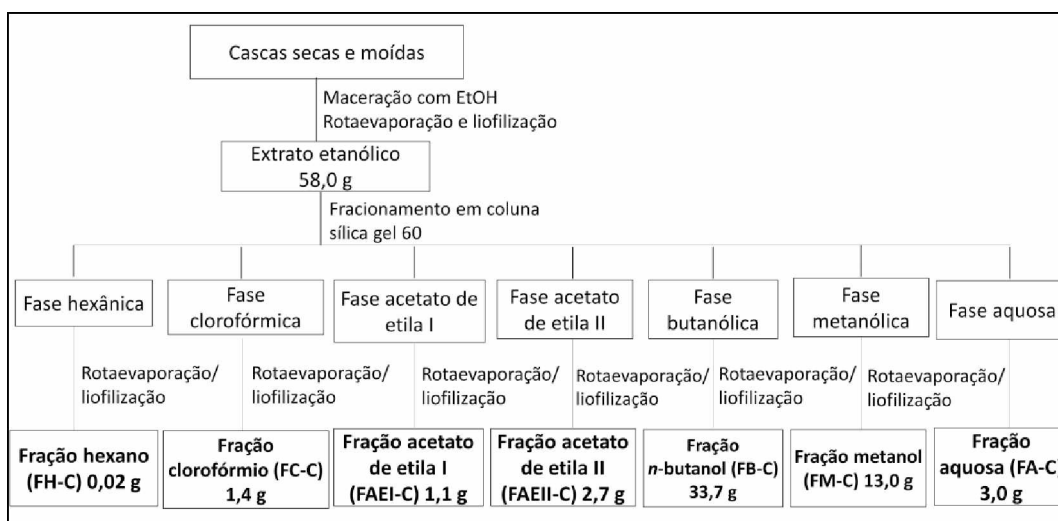


Fonte: autora.

#### 4.5 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DAS CASCAS

Foram utilizados 58,0 g do extrato etanólico das cascas e 300,0 g de sílica gel 60. O extrato foi adicionado no topo da coluna de diâmetro 7,6 cm, acima da fase estacionária (sílica). Foram adicionados solventes de polaridades crescentes na coluna: 1,1 L de hexano, 2,0 L de clorofórmio, 2,0 L de acetato de etila, 2,0 L de *n*-butanol, 2,0 mL de metanol e 2,0 L de água (Figura 19). As soluções obtidas foram concentradas em rotaevaporador, sob pressão reduzida, em banho a 40°C. As frações foram liofilizadas e guardadas em frascos de vidro sob refrigeração até o momento das análises.

Figura 19: Fluxograma do fracionamento em coluna cromatográfica do extrato etanólico das cascas de *I. laurina*.



Fonte: autora.

#### 4.6 TRIAGEM FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Para investigação da classe de metabólitos secundários presentes nos extratos e frações, foram preparadas soluções em metanol na concentração de aproximadamente  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . As soluções foram aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) em fase estacionária de sílica gel 60 com indicador de fluorescência. Foram utilizadas duas fases móveis: I) clorofórmio:metanol:hidróxido de amônio (9:1:0,25) e II) acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (10:1,1:1,1:2,6), de acordo com a metodologia de Wagner e Bladt (1996). Os reveladores empregados na triagem também foram preparados de acordo com esta referência e estão descritos abaixo.

- Detecção de flavonoides:** foram preparadas duas soluções, solução metanólica de difenilboriloxietilamina (NP) 1% ( $\text{m v}^{-1}$ ) (A) e solução etanólica de polietileno glicol-4000 (PEG4000) 5% ( $\text{m v}^{-1}$ ) (B). A solução reveladora foi preparada misturando 10,0 mL da solução A e 8,0 mL da solução B. Após borrifação na placa de CCD, a revelação foi observada em câmara de luz UV (365 nm).
- Detecção de alcaloides:** foram utilizados dois reagentes:
  - Dragendorff: foram preparadas duas soluções, na solução A foram dissolvidos cerca de 0,85 g de nitrato de bismuto em 10,0 mL de ácido acético glacial e adicionado 40,0 mL de água destilada sob aquecimento. Na solução B foram



dissolvidos em torno de 8,00 g de iodeto de potássio em 30,0 mL de água. Foi preparada uma solução estoque misturando-se as soluções A e B na mesma proporção. A solução reveladora foi preparada misturando-se 1,0 mL da solução estoque, 2,0 mL de ácido acético glacial e 10,0 mL de água.

– Iodocloroplatinado: foram preparadas duas soluções, a solução A composta de cloroplatinato de potássio 5% em água ( $\text{m v}^{-1}$ ) e a solução B composta de iodeto de potássio 10% em água ( $\text{m v}^{-1}$ ). A solução reveladora foi preparada misturando-se 1,0 mL da solução A, 9,0 mL da solução B e 10,0 mL de água.

c) Reveladores universais – detecção de diferentes classes de metabólitos como terpenoides, esteroides, saponinas, fenilpropanoides, flavonoides e proantocianidinas

– Anisaldeído-ácido sulfúrico: foi preparada uma solução de anisaldeído 5% ( $\text{v v}^{-1}$ ) em ácido acético glacial. Foram adicionados na solução 85,0 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem. O revelador foi borrifado na placa CCD, ela foi aquecida a 100 °C por 5 a 10 min e analisada.

– Liebermann-Burchard: foi preparada uma solução adicionando-se 5,0 mL de anidrido acético e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado a 50,0 mL de etanol absoluto, sob banho de gelo. A placa foi borrifada com o revelador e aquecida a 100 °C por 5 a 10 min. A placa foi analisada em câmara luz UV (365 nm).

- Vanilina sulfúrica: foi preparada uma solução de vanilina em etanol a 0°C. Foram adicionados 15,0 g de vanilina em 250,0 mL de etanol e adicionados 2,5 mL de ácido sulfúrico.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

O teor de fenóis totais foi determinado pelo método de Folin–Ciocalteu utilizando a metodologia descrita por Moraes e colaboradores (2008). Para a reação colorimétrica foram adicionados em um tubo de ensaio 0,5 mL de solução metanólica na concentração 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  das amostras, 2,5 mL de solução aquosa do reativo Folin-Ciocalteu a 10% ( $\text{v v}^{-1}$ ) e 2,0 mL de solução aquosa recém preparada de carbonato de sódio 7,5% ( $\text{m v}^{-1}$ ). A mistura foi colocada durante 5 min em banho-maria a 50 °C e posteriormente a absorvância foi medida em um espectrofotômetro da marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S, em 760 nm. Para a leitura do branco foi adicionado ao

tubo de ensaio 0,5 mL de metanol e seguido o mesmo procedimento. O teor de fenóis totais foi determinado através da equação da reta obtida pela curva analítica construída com ácido gálico (10 a 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato ( $\text{mg EAG g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ).

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DE PROANTOCIANIDINAS

O teor de proantocianidinas foi determinado pelo método da vanilina sulfúrica utilizando a metodologia descrita por Moraes e colaboradores (2008). Em um tubo de ensaio foram adicionados 2,0 mL de solução metanólica das amostras na concentração 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3,0 mL de uma solução recém-preparada de vanilina em ácido sulfúrico 70% (v v<sup>-1</sup>), na concentração de 5 mg mL<sup>-1</sup>. A mistura foi colocada em banho-maria a 50 °C durante 15 min. A medida da absorvância das amostras foi realizada em um espectrofotômetro da marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S, em 500 nm. Para a leitura do branco foi adicionado ao tubo de ensaio 2,0 mL de metanol e seguido o mesmo procedimento. O teor de proantocianidinas foi determinado através da equação da reta obtida pela curva analítica construída com catequina (1 a 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e expresso em miligrama equivalente de catequina por grama de extrato ( $\text{mg ECAT g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ).

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES

O teor de flavonoides foi determinado utilizando a metodologia descrita por Woisky e Salatino (1998). Em um tubo de ensaio foram adicionados 2,0 mL de solução em metanol das amostras (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 1,0 mL de solução de  $\text{AlCl}_3$  em metanol 5% (m v<sup>-1</sup>) e 2,0 mL de metanol. A mistura foi deixada em repouso por 30 min a temperatura ambiente. A leitura da absorvância das amostras foi realizada em um espectrofotômetro da marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S, em 425 nm. Para leitura do branco foi adicionado 2,0 mL de metanol e seguido o mesmo procedimento. O teor de flavonoides foi determinado através da equação da reta obtida pela curva analítica construída com quercetina (1 a 35  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e expresso em miligrama equivalente de quercetina por grama de extrato ( $\text{mg EQ g}_{\text{extrato}}^{-1}$ ).

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

##### 4.10.1 MÉTODO DO RADICAL DPPH

A determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH foi realizada utilizando a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com adaptações. Foram preparadas soluções das amostras em metanol e diluídas nas concentrações de 83, 66, 49, 32 e 15% a partir da amostra inicial (100%) (Tabela 4). Em tubos de ensaio, protegidos da luz, foram adicionados 0,3 mL de solução das amostras e 2,7 mL de solução em metanol de DPPH ( $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A mistura contendo a amostra e a solução de DPPH foi deixada em repouso, a temperatura ambiente, durante 1 hora. Após esse intervalo, a leitura da absorbância foi realizada no espectrofotômetro da marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S, em 517 nm. Para leitura do controle, as soluções das amostras foram substituídas por 0,3 mL metanol. A leitura do branco foi realizada substituindo 2,7 mL da solução de DPPH por metanol. O butilidroxitolueno (BHT) foi utilizado como controle positivo.

Tabela 4: Concentração inicial (100%) em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  das amostras na cubeta utilizadas na determinação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH.

Amostras		Amostras	
<b>EE-F</b>	25	<b>EE-C</b>	10
<b>FH-F</b>	100	<b>FH-C</b>	-
<b>FC-F</b>	80	<b>FC-C</b>	150
<b>FAE-F</b>	12	<b>FAEI-C e FAEII-C</b>	20
<b>FB-F</b>	20	<b>FB-C</b>	8
<b>FM-F</b>	-	<b>FM-C</b>	10

Nota: EE-F: extrato etanólico das folhas, FH-F: fração hexano das folhas, FC-F: fração clorofórmio das folhas, FAE-F: fração acetato de etila das folhas, FB-F: fração *n*-butanol das folhas, FM-F: fração metanol das folhas. EE-C: extrato etanólico das cascas, FH-C: fração hexano das cascas, FC-C: fração clorofórmio das cascas, FAE-C: fração acetato de etila das cascas, FB-C: fração *n*-butanol das cascas, FM-C: fração metanol das cascas.

A porcentagem de atividade antioxidante (AA) após 1 hora de reação que corresponde à porcentagem de DPPH sequestrado foi determinada pela Equação 1

$$\%AA = \{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] / Abs_{controle}\} 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que  $Abs_{controle}$  é a absorbância inicial da solução em metanol de DPPH,  $Abs_{amostra}$  é a absorbância da mistura reacional (DPPH + amostra) e  $Abs_{branco}$  é a absorbância da amostra em metanol.

A concentração eficiente, quantidade de amostra necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% ( $CE_{50}$ ) foi determinada a partir da equação da reta de uma curva analítica do gráfico da porcentagem de DPPH sequestrado após 1 hora de reação *versus* as concentrações das amostras.

#### 4.10.2 VOLTAMETRIA POR PULSO DIFERENCIAL

O ensaio por voltametria de pulso diferencial foi realizado no potenciostato Drop Sens  $\mu$ Stat 200 e software Drop View 1.0 para a aquisição dos dados. Foi utilizada uma célula eletroquímica, formada por um sistema com três eletrodos: eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo de referência Ag/AgCl (saturado em KCl) e um eletrodo auxiliar de platina.

Foram utilizados como eletrólitos 10,0 mL de solução tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 contendo KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito suporte e 10,0 mL de solução tampão acetato 0,2 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,5 contendo KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito suporte. Foi utilizado 1,0 mL de solução em metanol das amostras na concentração 1.000  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. A velocidade de varredura foi 25 mV s<sup>-1</sup> com faixa de potencial entre -0,3 a 1,0 V. A altura do potencial foi de 60 mV. A duração do pulso foi de 10 ms e o degrau de potencial foi de 6 mV. O tempo de coleta da corrente foi de 50 ms. O eletrodo de carbono vítreo foi polido entre as medidas voltamétricas.

#### 4.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE $\alpha$ -AMILASE

A atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase foi determinada utilizando o método cinético da reação da amilase com o substrato  $\alpha$ -(2-cloro-4-nitrofenil)- $\beta$ -1,4-galactopiranosilmaltoside (Gal-G2- $\alpha$ -CNP) com detecção espectrofotométrica (GOUVEIA et al., 2014). As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia

Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com a colaboração do Prof. Dr. Foued Salmen Espindola.

#### 4.11.1 PREPARO DA FRAÇÃO DE SALIVA ENRIQUECIDA DE $\alpha$ -AMILASE

Foi preparada uma fração de saliva enriquecida com  $\alpha$ -amilase a partir da coleta de saliva humana de cinco indivíduos. O material coletado foi armazenado a -20 °C por 48 h. Após este período ele foi descongelado e centrifugado a 12.000 x g por 10 min a 20 °C. O sobrenadante foi fracionado em uma coluna de Q-Sefarose utilizando como eluente 50 mM de Tris-HCl (cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano) (pH 8,0), EDTA 10 mM e 10 mM de tampão EGTA. O volume eluído da coluna de Q-Sefarose foi dialisado três vezes em solução tampão de bicarbonato de amônio (pH 7,0), liofilizado e solubilizado em solução tampão de fosfato salino (pH 7,2).

#### 4.11.2 PROCEDIMENTO DA ATIVIDADE INIBIDORA DE $\alpha$ -AMILASE

A fração enriquecida com  $\alpha$ -amilase salivar humana (HSA – *Human Salivary Amylase*) foi diluída 1.000 vezes em 50 mM de tampão ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico (MES), contendo cloreto de cálcio (5 mM), tiocianato de potássio (140 mM) e cloreto de sódio (300 mM) em pH 6,0. Foi preparada uma mistura **contendo 5  $\mu$ L** de solução da amostra em dimetilsulfóxido (DMSO) (Tabela 5) **e 45  $\mu$ L da HSA diluída** 1.000 vezes. Essa mistura foi incubada durante 30 minutos a 37 °C. Foram adicionados **na microplaca 8  $\mu$ L da amostra incubada com HSA e 320  $\mu$ L do substrato Gal-G2- $\alpha$ -CNP** (12 mM) e a leitura da absorbância foi realizada em 405 nm, durante 3 minutos, em intervalo de 1 minuto, a 37 °C. A acarbose foi utilizada como controle positivo.

Tabela 5: Concentrações das amostras na microplaca (em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) utilizadas na análise de inibição da  $\alpha$ -amilase.

Amostras		Amostras		Acarbose
<b>EE-F</b>	1,2 a 12,4	<b>EE-C</b>	0,2 a 2,5	-
<b>FH-F</b>	2,5 a 24,8	<b>FH-C</b>	-	-
<b>FC-F</b>	24,8	<b>FC-C</b>	24,8	-
<b>FAE-F</b>	2,5 a 12,4	<b>FAEI-C e FAEII-C</b>	24,8	-
<b>FB-F</b>	1,2 a 12,4	<b>FB-C</b>	0,2 a 2,5	-
<b>FM-F</b>	-	<b>FM-C</b>	0,2 a 2,5	-
-	-	-	-	0,0024 - 0,1220

A porcentagem de inibição de  $\alpha$ -amilase foi determinada pela Equação 2. As Equações 3 e 4 determinam a atividade de  $\alpha$ -amilase em  $\text{U mL}^{-1}$  e a atividade da enzima em porcentagem (%), respectivamente, e foram utilizadas no cálculo da porcentagem de inibição na equação 2.

$$\text{Inibição de } \alpha\text{-amilase (\%)} = 100 - (\text{atividade de } \alpha\text{-amilase em \%}) \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Atividade de } \alpha\text{-amilase (U mL}^{-1}\text{)} = \left[ \left( \frac{\Delta \text{Abs}}{\text{min}} \right) V f F d \right] / (\varepsilon V s I) \quad \text{Equação 3}$$

$$\text{Atividade de } \alpha\text{-amilase (\%)} = (A_{\text{amostra}} / A_{\text{controle}}) 100 \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

$\Delta \text{Abs/min} = [(\text{Abs3} - \text{Abs1})/2]$  que corresponde a diferença de absorbância em 3 e 1 minutos (Abs = absorbância);

$Vf$  é o volume total da reação (328  $\mu\text{L}$ );

$Fd$  é o fator de diluição da saliva (1.000);

$\varepsilon$  é o coeficiente de absortividade do 2-cloro-*p*-nitrofenol;

$Vs$  é o volume de amostra incubada com amilase (8  $\mu\text{L}$ );

$I$  é o comprimento do percurso da luz (0,97);

$A_{\text{amostra}}$  é a atividade da  $\alpha$ -amilase na presença da amostra;

$A_{\text{controle}}$  é a atividade da  $\alpha$ -amilase.

A concentração eficiente, quantidade e amostra necessária para inibir em 50% a atividade de  $\alpha$ -amilase ( $CE_{50}$ ) foi determinada a partir da equação da reta de uma curva analítica do gráfico de porcentagem de inibição *versus* a concentração das amostras.

#### 4.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo, de acordo com o CLSI para os microrganismos anaeróbios (CLSI, 2012a) e CLSI para os microrganismos aeróbios (CLSI, 2012b). As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca (LaPeMA), com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

##### 4.12.1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS

Foram utilizadas as seguintes **cepas padrão** provenientes da “**American Type Culture Collection**” (ATCC): *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Actinomyces naeslundii*, (ATCC 19039) e *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285).

##### 4.12.2 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO

As amostras foram preparadas com concentrações de  $8.000 \mu\text{g mL}^{-1}$  em DMSO (solução de partida). Desta solução foram retirados  $125 \mu\text{L}$  e acrescentados a  $1.875 \mu\text{L}$  de caldo tripton de soja (TSB), obtendo-se uma solução mãe para microrganismos aeróbicos de concentração  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para microrganismos anaeróbicos, foram retirados  $162,5 \mu\text{L}$  da solução de partida e acrescentados a  $2.437,5 \mu\text{L}$  de caldo Schaedler suplementado, para obtenção de uma solução mãe de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.12.3 PREPARO DO INÓCULO

As culturas dos microrganismos aeróbicos crescidos no meio Ágar triptona de soja enriquecido com 5% de sangue de carneiro durante 24 horas foram transferidas para uma solução salina. O mesmo procedimento foi realizado para preparação das culturas das bactérias anaeróbicas com crescimento de 72 horas em ágar Schaedler. O inóculo foi padronizado fazendo a comparação deste com o tubo 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) para bactérias na escala Mc Farland.

#### 4.12.4 PREPARO DOS CONTROLES

Foram utilizados como controle positivo o dicloridrato de clorexidina para bactérias aeróbias, testado nas concentrações de  $0,0115 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $59,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  e o metronidazol para bactérias anaeróbias, testado nas concentrações de  $0,0115 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $5,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Também foram realizados os controles de esterilidade dos caldos TSB e Schaedler, do inóculo, da esterilidade da clorexidina e do metronidazol, da esterilidade das amostras e do solvente DMSO (5 a 1%).

#### 4.12.5 MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar e os materiais utilizados (vidrarias, ponteiros e os meios de cultura) foram esterilizados. Foram utilizadas microplacas estéreis com 96 poços. Em cada poço foram adicionados o inóculo, o caldo triptona soja ou caldo Schaedler e as soluções das amostras. O volume final em cada poço foi de  $100 \mu\text{L}$  para os microrganismos aeróbicos e  $200 \mu\text{L}$  para os anaeróbicos. As soluções das amostras foram avaliadas nas concentrações de 400 a  $0,195 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

As placas que continham bactérias aeróbicas foram seladas com parafilme e incubadas a  $36^\circ\text{C}$  por 24 h em microaerofilia. Após o período de incubação, foram adicionados em cada poço  $30 \mu\text{L}$  de solução aquosa de resazurina a  $0,01\%$  m  $\text{v}^{-1}$ . Os microrganismos anaeróbicos foram incubados por 48 a 72 h em câmara de anaerobiose,



a 36 °C. Foi utilizado o mesmo revelador (resazurina) para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para os microrganismos anaeróbicos.

#### 4.13 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A atividade antifúngica foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo para determinação da CIM. As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca (LaPeMA), com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

##### 4.13.1 MICRORGANISMOS

Para a determinação da atividade antifúngica das amostras foram utilizadas as seguintes cepas padrão provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC): *Candida albicans* (ATCC 28366), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida glabrata* (ATCC 15126).

##### 4.13.2 PREPARO DO INÓCULO

O preparo do inóculo foi realizado de acordo com o protocolo de referência CLSI M27-A3 (CLSI, 2008). Primeiramente os fungos foram cultivados em placas de petri contendo ágar Sabouraud por 24 horas a 37°C. Após esse período, com o auxílio de alça de platina esterilizada, foram transferidas colônias das leveduras para tubos contendo 2,0 mL de solução salina 0,85 %. O inóculo foi preparado usando método espectrofotométrico (530 nm) e comparado com a escala de McFarland 0,5 para se obter o valor de  $6 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Em seguida, foram realizadas as diluições em caldo RPMI até que o inóculo atingisse  $1,2 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>.

##### 4.13.3 PREPARO DOS CONTROLES

Para o controle positivo foi utilizada a droga anfotericina B, sendo diluída em caldo para obter a concentração de 8 µg mL<sup>-1</sup> a 0,031 µg mL<sup>-1</sup>, na microplaca de 96 poços. Para a validação dos ensaios, o controle anfotericina B foi testado frente a cepas

de referência *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*, para se obter uma faixa de CIM entre 0,5 a 2,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para validação da metodologia e dos resultados para as demais leveduras segundo o CLSI M27-A3 (CLSI, 2008).

Foram realizados os controles de esterilidade do meio de cultura (caldo RPMI), do inóculo (que apresentou crescimento devido a ausência de agentes antimicrobianos), de esterilidade dos antifúngicos, de esterilidade dos extratos e do solvente (DMSO). O controle do solvente foi realizado para que não haja dúvidas a respeito da inibição do crescimento do microrganismo, pois em algumas concentrações o solvente pode levar a inibição do crescimento microbiano. O solvente foi avaliado nas concentrações de 1% a 5% em v v<sup>-1</sup>. No primeiro poço tem-se a maior concentração de DMSO (5%), nos outros poços a concentração é menor.

#### 4.13.4 MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO EM CALDO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços, onde foram feitas diluições seriadas em concentrações de 3.000 a 1,46  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O meio de cultura utilizado foi o caldo RPMI tamponado com MOPS e pH final de 7,2. Nas microplacas foram realizadas diluições seriadas, com volume final no poço de 200  $\mu\text{L}$ . Para o controle positivo foi realizado o mesmo processo, com concentrações de 8 a 0,031  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para controle negativo a concentração utilizada foi de 10% a 1% v v<sup>-1</sup>.

Após a montagem das microplacas, estas foram incubadas por 48 horas a 37°C, decorrido este período foi determinada a CIM através do uso do revelador resazurina. A leitura foi realizada observando-se a mudança da coloração da resazurina onde a presença da cor azul representou ausência de crescimento enquanto que a cor vermelha foi interpretada como presença de crescimento fúngico.

#### 4.14 ATIVIDADE CITOTÓXICA

As análises da atividade citotóxica foram realizadas no Laboratório de Tripanosomatídeos da Universidade Federal de Uberlândia do Instituto de Ciências Biomédicas, com a colaboração do Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva. O teste de

viabilidade celular foi realizado com a célula Vero ATCC CCL 81 (fibroblastos de rim de macaco verde da África).

#### 4.14.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras a serem testadas foram dissolvidas em metanol e diluídas no meio de cultura DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle Medium*) suplementado, sendo assim obtida uma solução mãe na concentração de  $640 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A concentração final de metanol da solução mãe não excedeu 3%.

#### 4.14.2 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

A atividade citotóxica foi realizada utilizando o método de diluição em microplaca. Foi preparada uma solução contendo  $1.10^6$  células Vero em 10,0 mL de meio DMEM suplementado, desta solução foi pipetado 100  $\mu\text{L}$  para cada poço da análise, a placa foi incubada por 6 horas à 37 °C com atmosfera úmida e 5% de  $\text{CO}_2$  para as células se aderirem ao fundo do poço. Após este intervalo, o meio de cultura foi retirado e em seguida foram adicionadas as amostras nas concentrações 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O volume final de cada poço foi de 100  $\mu\text{L}$  e a quantidade de células presentes em cada poço foi de  $1.10^4$  células.

Após a preparação da placa, ela foi incubada por 48 horas à 37 °C com atmosfera úmida e 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de solução reveladora de resazurina a 3 mM, em PBS (*Phosphate Buffered Saline*), em cada poço da placa (ROLÓN et al., 2006), em seguida as placas foram incubadas novamente por 24 h nas mesmas condições. A leitura da absorvância foi realizada em 595 nm em um espectrofotômetro de microplaca.

Os ensaios foram realizados em triplicata e a partir das absorvâncias de cada concentração testada, a viabilidade celular foi calculada de acordo com o controle de crescimento. A concentração citotóxica ( $\text{CC}_{50}$ ) (concentração que apresenta 50% de viabilidade celular) foi calculada por meio de um gráfico dose-resposta com regressão não linear (PILLAY et al., 2007). Foram realizados os controles de crescimento, do solvente, das amostras, controle negativo (100% de células lisadas) e controle do meio.

A partir de valores conhecidos de  $CC_{50}$  e de CIM foi calculado o índice de seletividade (IS) (CASE et al., 2006) através da equação 5:

$$IS = \log \frac{CC_{50}}{CIM} \quad \text{Equação 5}$$

#### 4.15 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA

As análises da atividade antiprotozoária foram realizadas no Laboratório de Tripanosomatídeos da Universidade Federal de Uberlândia do Instituto de Ciências Biomédicas, com a colaboração do Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva.

##### 4.15.2 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

O teste de viabilidade celular foi realizado por microdiluição em placa de 96 poços, através da diluição da solução mãe em meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*) para a *Leishmania amazonensis*. O volume final de cada poço foi de 100  $\mu\text{L}$ , sendo 20  $\mu\text{L}$  de inoculo (solução a  $1.10^8$  parasitas em 2,0 mL) com 80  $\mu\text{L}$  das concentrações das amostras (512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

A placa de *Leishmania amazonensis* foi incubada por 48 horas a 25°C. Em seguida foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  em cada poço de uma solução de resazurina a 3 mM em PBS (ROLÓN et al., 2006) e foi realizada uma nova incubação por 24 horas a 25°C. Em seguida, a leitura foi realizada em 595 nm em um espectrofotômetro de microplaca. Foram realizados os controles de crescimento, do solvente, das amostras, controle negativo (100% de inibição dos protozoários) e controle do meio.

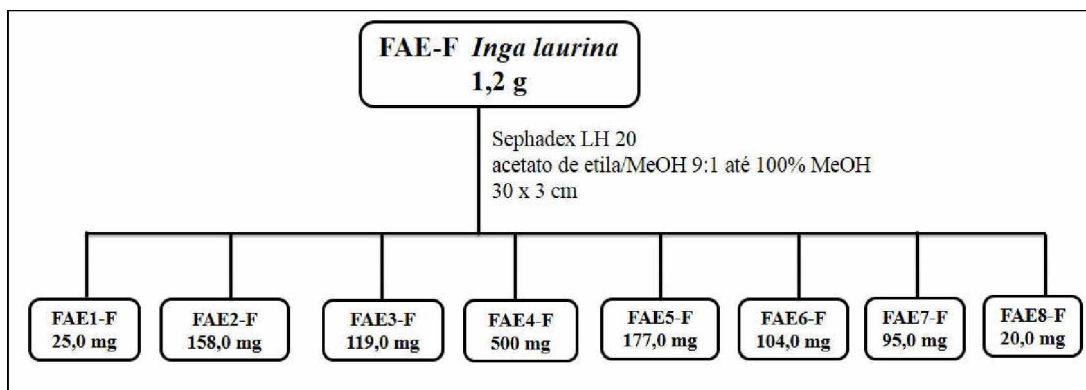
Todos os ensaios foram realizados em triplicata, a partir dos resultados das absorbâncias, a viabilidade foi calculada em função do controle crescimento. O valor de  $CI_{50}$  (concentração inibitória de 50% dos protozoários) foi determinado através de um gráfico de dose resposta entre as concentrações da amostra e a viabilidade, com regressão não linear.

#### 4.16 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO

Para a separação dos compostos da FAE-F foi utilizado uma coluna de vidro de 30,0 cm de altura e 3,0 cm de diâmetro contendo 34,0 g de Sephadex LH-20 em acetato de etila:metanol (9:1), utilizada como fase estacionária (Figura 20). Foram utilizados 0,60 g de amostra dissolvida em acetato de etila:metanol (9:1), eluída com o seguinte sistema de solvente, em gradiente: 300,0 mL de acetato de etila:metanol (9:1), 300,0 mL de acetato de etila:metanol (8:2), 300,0 mL de acetato de etila:metanol (7:3), 200,0 mL de acetato de etila:metanol (6:4), 200,0 mL de acetato de etila:metanol (1:1), 200,0 mL de acetato de etila:metanol (4:6), 200,0 mL de acetato de etila:metanol (3:7), 100,0 mL de acetato de etila:metanol (2:8), 100,0 mL de acetato de etila:metanol (1:9) e 300,0 mL de metanol. Foram coletadas 128 frações com cerca de 15,0 mL cada.

As frações coletadas foram analisadas por CCD utilizando fase estacionária de sílica gel 60 (0,63-0,2 mm, 70-230 mesh, com indicador de fluorescência) e fase móvel contendo uma mistura de acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (10:1,1:1,1:2,6). Foram utilizados os reveladores NP-PEG e Liebermann-Burchard para análise comparativa da CDD de acordo com o fator de retenção. As 128 frações foram agrupadas em 8 grupos, denominados de FAE1-F a FAE8-F. Essa coluna foi repetida com mais 0,60 g de amostra para que fosse obtido maior quantidade de massa das frações. Foi realizado o mesmo procedimento no novo fracionamento e as frações foram reunidas de acordo com o perfil de CCD da coluna anterior. Da fração FAE4-F foi obtido um composto com massa de aproximadamente 500 mg.

Figura 20: Fluxograma do fracionamento da FAE das folhas de *I. laurina*.



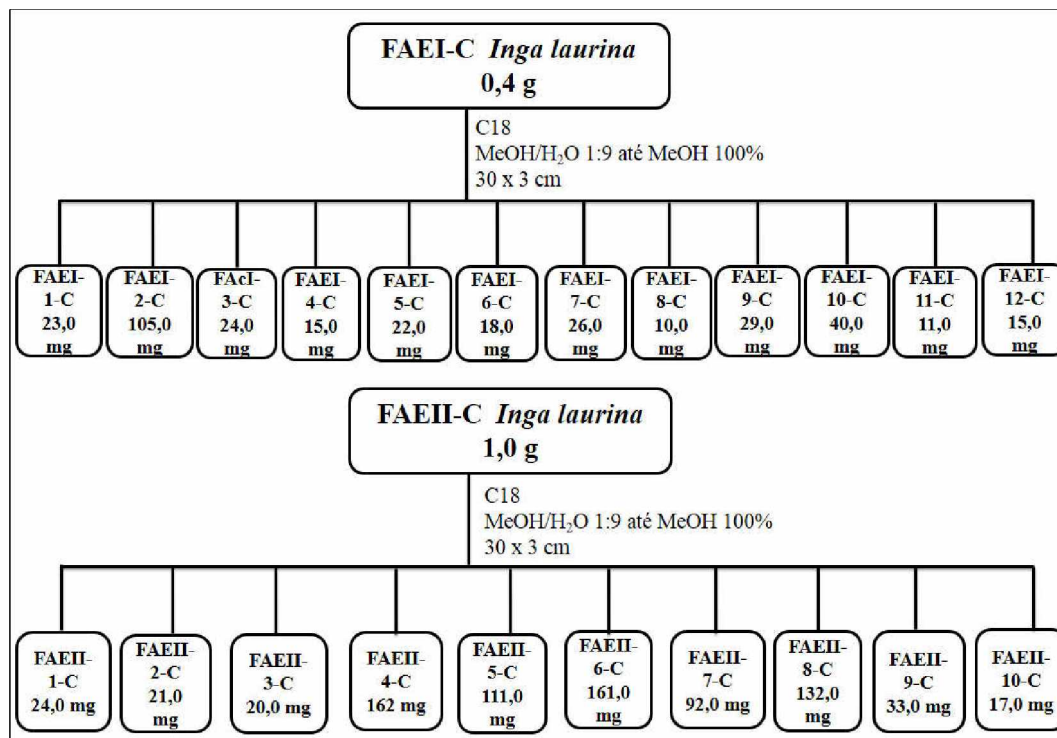
Fonte: autora.

Para a separação dos compostos da FAEI-C foi utilizada uma coluna de vidro de 30,0 cm de altura e 3,0 cm de diâmetro contendo como fase estacionária cerca de 60,0 g sílica modificada do tipo C18 e foi utilizado como fase móvel metanol (Figura 21). Foram utilizados 0,40 g de amostra dissolvida em metanol e feito uma pastilha com C18. A coluna foi eluída com solução metanol:água em diferentes proporções até a chegar a 10% de metanol. A partir desse ponto foi aplicada a amostra e a coluna foi eluída com o seguinte sistema de solvente, em gradiente: 80,0 mL de soluções em metanol:água, começando com 10% de metanol até chegar a 100% de metanol, sendo a proporção aumentada gradativamente em 5%. Foram coletadas 140 frações com cerca de 15,0 mL cada.

As frações coletadas foram analisadas por CCD utilizando fase estacionária de sílica gel 60 (0,63-0,2 mm, 70-230 mesh, com indicador de fluorescência) e eluente contendo uma mistura de acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (10:1,1:1,1:2,6). Foram utilizados os reveladores Anisaldeído e Liebermann-Burchard para análise comparativa da CDD de acordo com o fator de retenção. As 140 frações foram agrupadas em 12 grupos, denominados de FAEI-1-C a FAEI-12-C. A fração FAEI-2-C apresentou somente uma mancha na placa cromatográfica e foi purificada utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (subitem 4.20).

Para a separação dos compostos da FAEII-C foi realizado o mesmo procedimento da FAEI-C, porém, foi utilizado 100,0 g de C18 em metanol e 1,0 g de amostra (Figura 21). A coluna foi eluída em gradiente utilizando 70,0 mL de soluções em metanol:água. Foram coletadas 99 frações com cerca de 15,0 mL cada. As frações coletadas foram analisadas por CCD e utilizados os reveladores Vanilina Sulfúrica e Liebermann-Burchard para análise comparativa da CDD de acordo com o fator de retenção. As 99 frações foram agrupadas em 10 grupos, denominados de FAEII-1-C a FAEII-10-C. As frações FAEII-4-C e FAEII-5-C, que tiveram maior massa, foram purificadas utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (subitem 4.20).

Figura 21: Fluxograma do fracionamento das frações acetato de etila das cascas de *I. laurina*.



Fonte: autora.

#### 4.17 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA UV-VIS DAS AMOSTRAS

A análise do espectro de UV-VIS dos extratos etanólicos e das frações das folhas e das cascas foi realizada em um espectrofotômetro da marca Hitachi, modelo U-2000, utilizando uma varredura de 190 a 700 nm. Foram preparadas soluções em metanol de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  das amostras para varredura na faixa dos comprimentos de onda.

#### 4.18 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A análise da FAE4-F foi realizada no Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) da Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto com a colaboração do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes. Foi utilizado um espectrômetro de massas de alta resolução Bruker Daltonics modelo Micro-Q-TOF-II com fonte de ionização por eletrospray (IES). As amostras foram solubilizadas em metanol e introduzidas utilizando seringa (100  $\mu\text{L}$ ),

adaptada a uma bomba de infusão direta com fluxo de 200  $\mu\text{L hora}^{-1}$ . O capilar foi aquecido a 200 °C com fluxo de gás nebulizante de 8  $\text{L min}^{-1}$  e 4,5 kV.

A análise das frações das cascas e das folhas foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (IGEB-UFU) em um HPLC (marca Agilent modelo Infinity 1260) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução QTOF (*Quadropole Time of Flighth*) da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por eletrospray (IES). Os parâmetros cromatograficos foram: coluna Agilent modelo Zorbax, 2,1 mm de diâmetro interno, 5 cm de comprimento, partículas de 1,8  $\mu\text{m}$ , fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1%, v v<sup>-1</sup>) (A) e metanol (B), com o seguinte sistema gradiente de solventes: 2% de B (0 min), 98% de B (0-15 min); 100% de B (15-17 min); 2% B (17-18 min) e 2% B (18-22 min). Os parametros de ionização foram: pressão do nebulizador de 58 psi, gas secante a 8 $\text{L min}^{-1}$  a uma temperatura de 220 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5kV.

Para as análises de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) as energias de colisão foram ajustadas de acordo com cada íon precursor (moléculas desprotonadas,  $[\text{M} - \text{H}]^-$ ). Os dados obtidos foram medidos de alta resolução de massa e comparadas através do erro (em ppm) calculado em relação a massa exata utilizando a seguinte equação:

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{(\text{massa exata} - \text{massa experimental})}{\text{massa exata}} \cdot 10^6 \quad \text{Equação 6}$$

#### 4.19 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As análises foram realizadas na Universidade Federal de Uberlândia, no laboratório multiusuário do Instituto de Química, no Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) da marca Bruker modelo Ascend™ 400 Avance III HD (9,2 Tesla). As amostras foram solubilizadas em dimetilssulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ). Foram realizadas análises de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DEPT135 e por correlação COSY (*Homonuclear Correlation Spectroscopy*,  $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ ), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*,  $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ ), HMBC (*Heteronuclear Multiplebond Coherence*,  $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ ) e NOESY (*Nuclear Overhauser Spectroscopy*,  $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ ). As análises foram realizadas nas frequências de 400 MHz para hidrogênio e 100 MHz para carbono.



#### 4.20 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As frações acetato de etila e as frações da coluna das folhas e das cascas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD). Foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo LC-6AD (equipamento multiusuário da UFU lotado no Instituto de Química); coluna de fase reversa C18 da marca Phenomenex modelo Luna, 4,6 mm de diâmetro interno, 25 cm de comprimento, partículas de 5  $\mu\text{m}$  e poros de 100 Å de diâmetro. Foi injetado um volume de 20  $\mu\text{L}$  de solução em metanol a 3.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  da FAE-F, 1.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  das frações da coluna das folhas e das FAEI-2-C, FAEII-4-C e FAEII-5-C. Foi utilizado como fase móvel água deionizada (fase móvel A) e metanol (fase móvel B) e empregado o seguinte sistema de solventes para as folhas: 50 % B (25 min) com fluxo de 0,8  $\text{mL min}^{-1}$ . Para a obtenção do perfil cromatográfico das frações das cascas foi utilizado o sistema de solventes: 10 % B (5 min), 20% de B (10 min); 30% de B (25 min); 70% de B (40 min) e 100% B (55 min).

Para purificação das frações obtidas após a cromatografia em coluna das frações FAEI-C e FAEII-C foi utilizada coluna semipreparativa de fase reversa C18 da marca Phenomenex modelo Synergi Hydro-RP, 21,20 mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento, partículas de 4  $\mu\text{m}$  e poros de 80 Å de diâmetro. Foi injetado um volume de 100  $\mu\text{L}$  de solução em metanol das frações e utilizado como fase móvel água deionizada (fase móvel A) e metanol (fase móvel B) e empregado o seguinte sistema de solventes: 10% B (5 min), 20% de B (10 min); 30% de B (25 min); 70% de B (40 min) e 100% B (55 min) com fluxo de 8,0  $\text{mL min}^{-1}$ . As concentrações das amostras foram 90  $\text{mg mL}^{-1}$  da FAEI-2-C, 100  $\text{mg mL}^{-1}$  da FAEII-5-C e 146  $\text{mg mL}^{-1}$  da FAEII-4-C.

#### 4.21 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram avaliados utilizando o método da Análise de Variância (ANOVA), sendo considerados estatisticamente diferentes os resultados com nível de significância menor que 5 % ( $P < 0,05$ ). Foi utilizado o teste de Tukey para determinar as diferenças significativas entre as médias. Análises foram realizadas usando o programa SigmaPlot 11.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

O processo de extração é uma das primeiras etapas para o isolamento de metabólitos a partir de uma espécie vegetal. Existem várias técnicas de extração de produtos naturais, como maceração, percolação, extração utilizando um extrator Soxhlet, turbólise e sonicação (STICHER, 2008, CHAN et al., 2011). No trabalho foi escolhida a técnica de maceração para evitar a degradação de substâncias bioativas com o aquecimento e por ser uma técnica simples de executar.

A escolha do solvente é um fator importante para a extração, pois o uso de um solvente de baixa polaridade irá extrair compostos lipofílicos, enquanto solventes alcoólicos extraem com maior rendimento uma ampla classe de compostos polares e não-polares. Além disso, o uso de solventes de maior polaridade na primeira extração permite que sejam realizadas extrações para obtenção de frações de diferentes polaridades (STICHER, 2008).

No processo de extração ocorrem dois fenômenos, a dissolução e a difusão de substâncias solúveis das células das plantas. Quando o solvente penetra nas células de espécies vegetais ocorre uma interação entre as moléculas a serem extraídas e o solvente devido a indução de momento de dipolo nas moléculas. Essa interação é caracterizada pela constante dielétrica do solvente, em que solventes de maior polaridade possuem constante dielétrica maior que solventes de baixa polaridade, logo moléculas ionizáveis e polares se dissolvem em líquidos de maior constante dielétrica e moléculas apolares se dissolvem em líquidos de baixa constante dielétrica (MARQUES, VIGO, 2009 apud (BONOMINI, 2013).

O etanol foi o solvente utilizado no processo de maceração. Este solvente possui um valor de constante dielétrica próximo de 25,0, um valor considerado baixo quando se compara com a constante dielétrica da água (próximo a 79,0), por isso este solvente solubiliza várias substâncias de polaridade intermediária (MEDEIROS; KANIS, 2010).

O rendimento da extração por maceração em etanol das folhas e cascas está apresentado na Tabela 6.

Tabela 6: Rendimento da extração por maceração em etanol das cascas e folhas de *I. laurina*.

	<b>Massa da amostra após secagem (g)</b>	<b>Massa de extrato obtida (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>Cascas</b>	1.400,0	234,5	16,8
<b>Folhas*</b>	900,0	54,0	6,0

Nota: \* resultado obtido no trabalho de Furtado (2014)

O extrato etanólico das folhas de *I. laurina* foi preparado no trabalho de Furtado (2014). Foram utilizados 900,0 g de amostra seca e obtidos 54,0 g de extrato, apresentando um rendimento de 6,0%, valor menor do que a extração das cascas. Porém, a extração das folhas foi realizada com menos repetição (03 macerações) em relação às cascas, fato que pode justificar o menor rendimento.

A realização da extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas também foi realizada no trabalho de Furtado (2014), cujo rendimento obtido de cada extração está apresentado na Tabela 7.

Não foi possível realizar a extração líquido-líquido do extrato etanólico das cascas de *I. laurina*, pois durante o processo houve a formação de emulsões que dificultou a separação das fases, então, foi realizado o fracionamento cromatográfico desse extrato. Os rendimentos estão apresentados na Tabela 7. Durante esse processo foram obtidas duas frações acetato de etila. Esse fato foi devido a obtenção de frações de cores diferentes quando foi adicionado o solvente acetato de etila na coluna. A FAEI-C possui coloração verde e a FAEII-C coloração vermelha.

Tabela 7: Rendimento da extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas e do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das cascas de *I. laurina*.

<b>Amostras</b>	<b>Folhas (42,2 g)</b>	<b>Amostras</b>	<b>Cascas (58,0 g)</b>
	(Furtado (2014))		
<b>FH-F</b>	12,2 g – 29,0 %	<b>FH-C</b>	0,02 g – 0,04%
<b>FC-F</b>	4,1 g – 9,7 %	<b>FC-C</b>	1,42 g – 2,5 %
<b>FAE-F</b>	3,2 g – 7,6 %	<b>FAEI-C</b>	1,1 g – 1,9%
		<b>FAEII-C</b>	2,7 g – 4,7 %
<b>FB-F</b>	7,4 g – 17,5 %	<b>FB-C</b>	33,7 g – 58,2 %
<b>FM-F</b>	-	<b>FM-C</b>	13,0 g – 22,4 %
<b>FA-F</b>	2,7 g – 6,3 %	<b>FA-C</b>	3,0 g – 5,2 %

Analisando os resultados da Tabela 7 foi possível verificar que para o extrato das folhas a fração que apresentou maior rendimento foi a hexano seguida da fração *n*-butanol, enquanto que para o extrato das cascas o maior rendimento foi obtido na fração *n*-butanol. Esses resultados inferem que os constituintes das folhas e cascas são diferentes, uma vez que nas folhas as substâncias do extrato etanólico foram mais solúveis em solventes apolares e nas cascas elas foram mais solúveis em solventes de maior polaridade.

Foi obtido um baixo rendimento na FH-C, logo, não foi realizado nenhum ensaio com essa amostra. As FA-F e FA-C também não foram utilizadas nos ensaios experimentais porque essas amostras não se solubilizaram em etanol, metanol e água, que foram os solventes utilizados nos testes realizados neste trabalho.

## 5.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA E ANÁLISE DOS ESPECTROS UV-VIS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E DAS CASCAS

O perfil fitoquímico dos extratos, frações das folhas e frações das cascas de *I. laurina* apresentaram diferenças em seus constituintes, como pode ser observado nas Tabelas 8 e 9. Não foram identificados alcaloides em nenhuma das partes da planta. Os flavonoides podem estar presentes em maior concentração nas folhas de *I. laurina*, especialmente na FAE-F, seguido de outras classes de metabólitos como terpenos, esteroides e saponinas, que tiveram menor magnitude. Nas cascas não foram

identificados flavonoides nas amostras estudadas, ela é constituída principalmente de diferentes classes de metaólitos como terpenos, esteroides, saponinas ou fenilpropanoides.

Tabela 8: Triagem fitoquímica do extrato e frações das folhas de *I. laurina*.

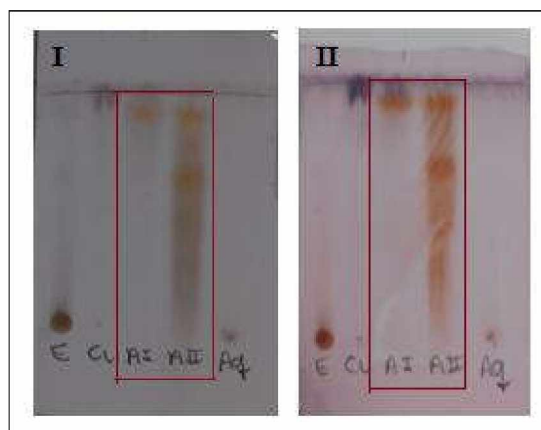
Folhas	Flavonoides	Reveladores universais		Alcaloides	
	NP/PEG	Liebermann-Buchard	Anisaldeído	Dragendorff	Iodocloro platinado
<b>EE-F</b>	++	+	+	-	-
<b>FH-F</b>	-	+	+	-	-
<b>FC-F</b>	++	+	+	-	-
<b>FAE-F</b>	+++	+	+	-	-
<b>FB-F</b>	+	+	++	-	-

Tabela 9: Triagem fitoquímica do extrato e frações das cascas de *I. laurina*.

Cascas	Flavonoides	Reveladores universais		Alcaloides	
	NP/PEG	Liebermann-Buchard	Anisaldeído	Dragendorff	Iodocloro platinado
<b>EE-C</b>	-	++	++	-	-
<b>FC-C</b>	-	+	+	-	-
<b>FAEI-C e FAEII-C</b>	-	+++	+++	-	-
<b>FB-C</b>	-	+++	+++	-	-
<b>FM-C</b>	-	+++	+++	-	-

Através da triagem fitoquímica das FAEI-C e FAEII-C de *I. laurina* foi possível verificar que essas frações possuem perfil fitoquímico diferente, quando as placas cromatográficas foram reveladas com os reagentes de Liebermann-Burchard e Anisaldeído como pode ser observado na Figura 22. Dessa forma, essas amostras foram analisadas separadamente nos ensaios biológicos.

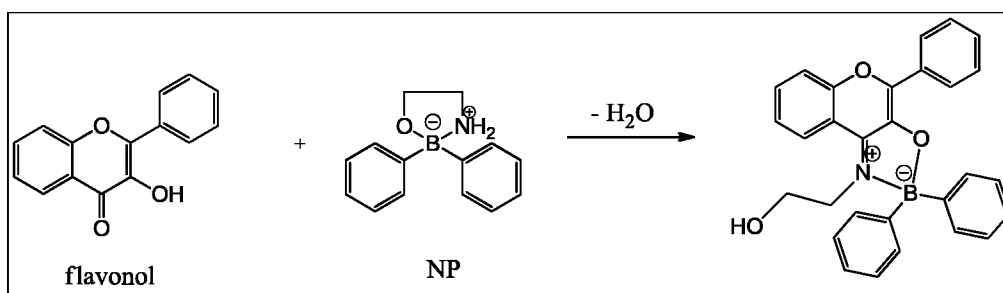
Figura 22: Triagem fitoquímica das frações acetato de etila das cascas de *I. laurina*.



Nota: I: revelador Liebermann-Buchard; II: revelador Anisaldeído; AI = FAEI-C; AII = FAEII-C: Fonte: autora.

Os flavonoides reagem com o revelador difenilborato aminoetanol (*Natural Product Reagent A* - NP) formando complexos que possuem fluorescência verde-amarelo-laranja, dependendo da estrutura do flavonoide, que pode ser observada na luz ultravioleta ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) (MATTEINI et al., 2011). Esse revelador não reage com todas as classes de flavonoides, mas é muito utilizado para a detecção de flavonas e flavonois os quais possuem uma carbonila no carbono C4 da estrutura do flavonoide (KARTNIG; GÖBEL, 1996). O polietilenoglicol (PEG) é utilizado como intensificador de fluorescência. A Figura 23 ilustra a reação de um flavonol com o revelador NP.

Figura 23: Reação de um flavonol como reagente difenilborato aminoetanol.

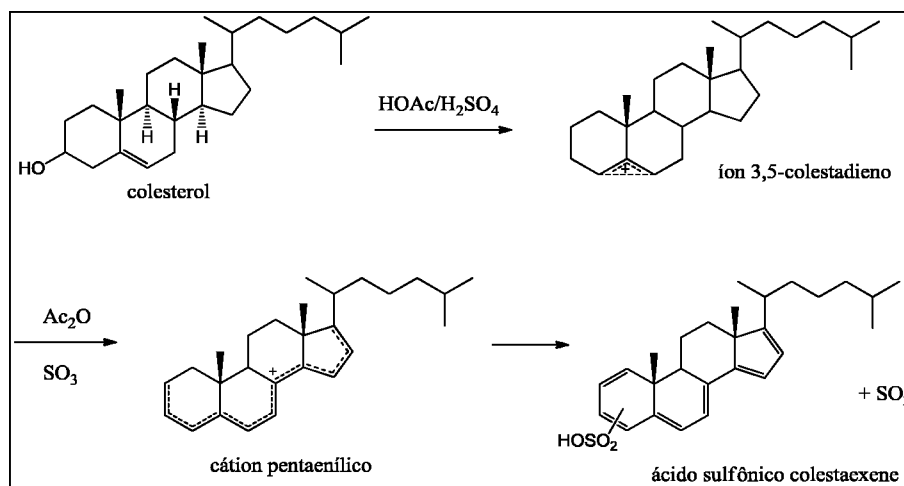


Fonte: Jork e outros (1990).

O teste de Liebermann-Burchard é utilizado para identificação do colesterol, resultando na formação de um composto de coloração verde-escura. Esse reagente

também é utilizado para detectar terpenos e saponinas, dando como resultado positivo o aparecimento de coloração escura na cromatoplaça (ATINAFU; BEDEMO, 2011). Um dos mecanismos propostos para a reação do reagente com o colesterol está apresentado na Figura 24. Na primeira etapa da reação ocorre a protonação da hidroxila do colesterol e em seguida eliminação de água levando a formação do íon 3,5-colestadieno. Em seguida ocorrem várias reações de oxidação formando um intermediário, o cátion pentaenílico, que leva a formação do ácido sulfônico colestaexeno que possui um sistema conjugado no anel (BURKE et al., 1974).

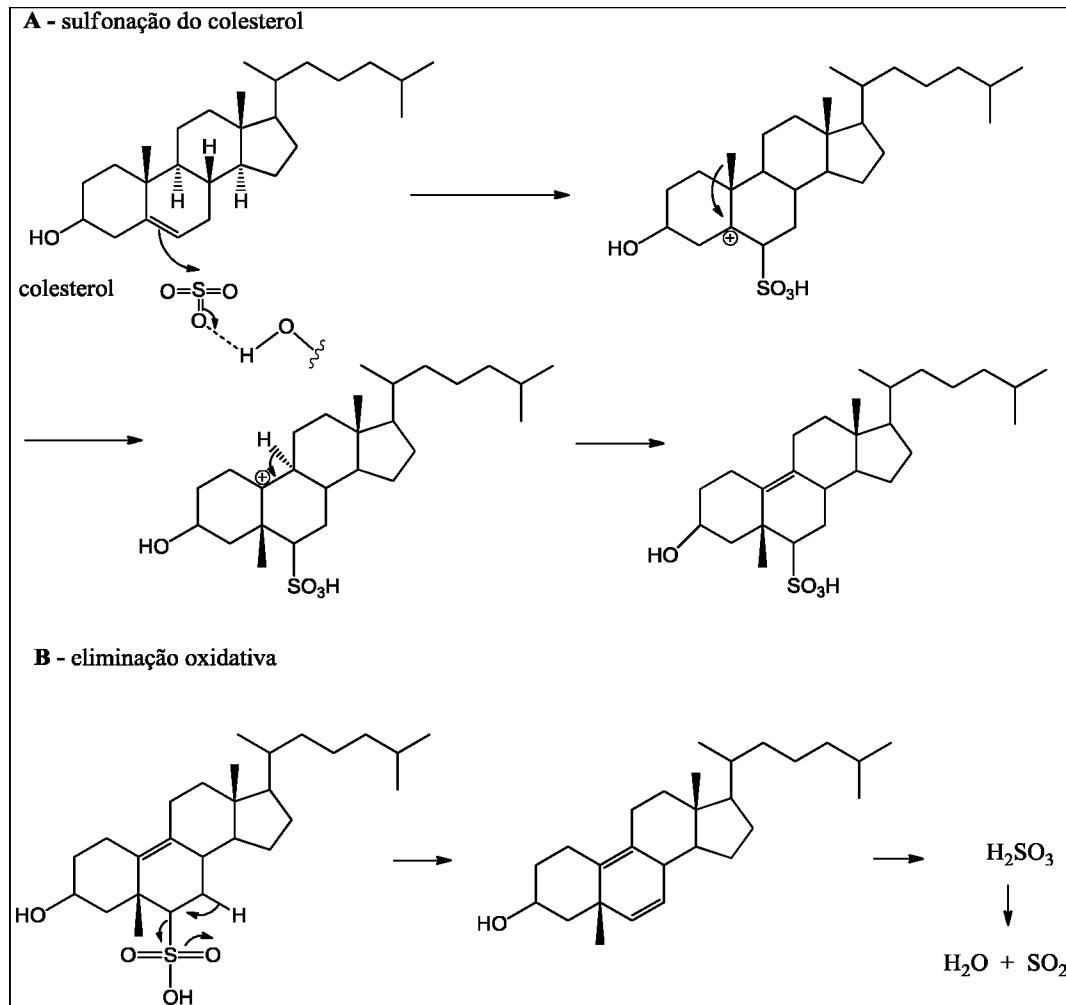
Figura 24: Reação do colesterol com o reagente de Liebermann-Burchard.



Fonte: Burke e outros (1974).

Xiong, Wilson e Pang (2007) propuseram outro mecanismo para a reação do colesterol com o reagente de Liebermann-Buchard (Figura 25). A primeira proposta é a formação de derivados de sulfato e acetato em várias posições da cadeia carbônica, que após vários rearranjos formam compostos insaturados. Outra proposta é a eliminação oxidativa do grupo ácido sulfônico ( $\text{SO}_3\text{H}$ ) que também forma duplas ligações. Estas reações ocorrem várias vezes até a formação de polienos, e consequentemente, esteroides aromáticos.

Figura 25: Reação de sulfonação do colesterol com o reagente de Liebermann-Buchard.



Fonte: adaptado de Xiong, Wilson e Pang (2007).

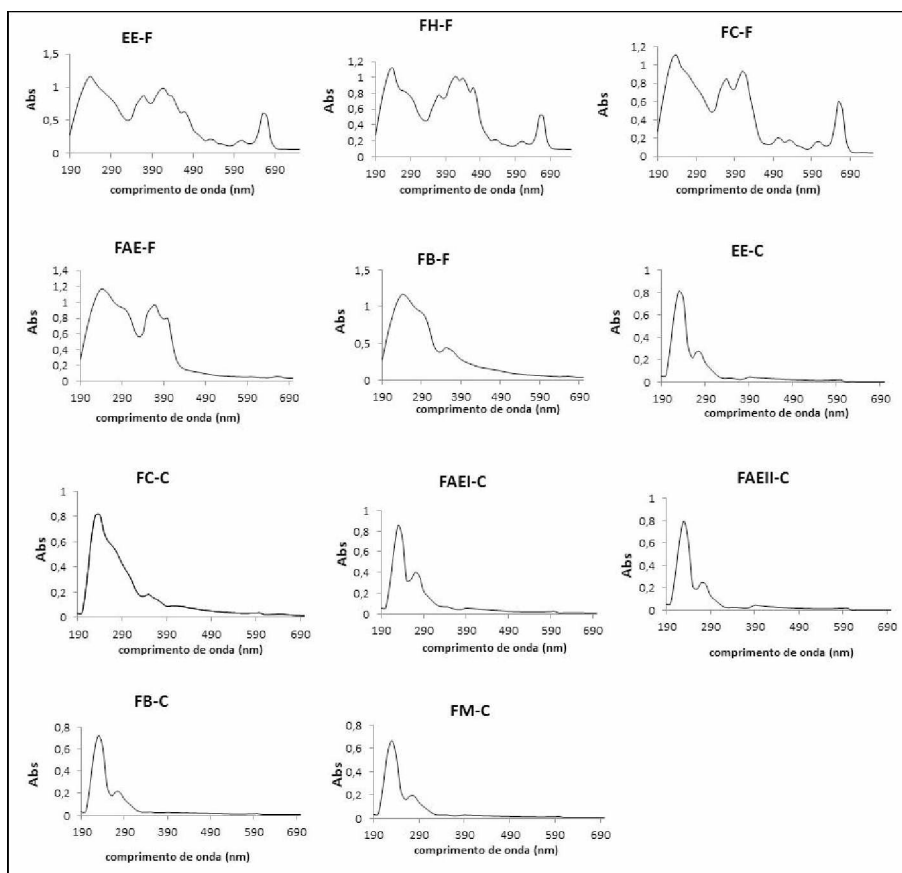
Os reagentes anisaldeído sulfúrico e vanilina sulfúrica também são empregados na detecção de esteroides, saponinas e compostos fenólicos. A identificação dos compostos acontece devido a condensação com o anisaldeído/vanilina formando produtos coloridos devido ao sistema conjugado formado na reação (KATO, 1964, JORK et al., 1990, SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001).

Os espectros de UV-VIS dos extratos e frações das folhas e das cascas foram obtidos na região entre 190-700 nm (Figura 26). A partir dos espectros foi possível verificar que o perfil das amostras de folhas e cascas são diferentes. Nas folhas foi observado a presença de duas bandas que são características da presença de flavonoides do tipo flavonas e flavonóis que possuem o anel C conjugado com os anéis A e B, uma



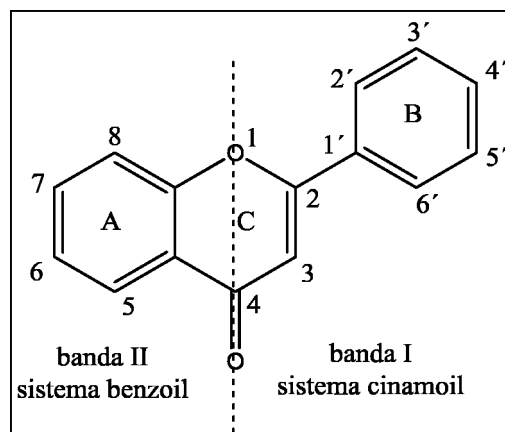
banda entre 300-380 nm relacionada com as transições eletrônicas do anel B (sistema cinamoil – banda I) e uma banda entre 240-280 nm relacionada com as transições eletrônicas do anel A (sistema benzoil – banda II) (Figura 27). No entanto, nas amostras de cascas há a presença apenas da banda do anel A (entre 240-280 nm) e não há a banda referente ao anel B, indicando que os flavonoides presentes nas cascas pertencem a classes diferentes que os das folhas, como as flavanonas, flavanois e flavan-3-óis, em que o anel heterocíclico C é saturado e, portanto, não ocorre conjugação com os anéis A e B (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970, RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996, ALONSO-SALCES et al., 2004, KUMAR; PANDEY, 2013). Além disso, no extrato etanólico e frações hexano e clorofórmio das folhas foi observado a presença da banda de absorção em 660 nm que é atribuída a presença de clorofila nas amostras. Esses resultados corroboram com a triagem fitoquímica das amostras, inferindo que os constituintes químicos das folhas e cascas de *I. laurina* são diferentes.

Figura 26: Espectros UV-VIS dos extratos e frações das folhas e cascas de *I. laurina*.



Fonte: autora.

Figura 27: Sistema de conjugação das flavonas e flavonois.

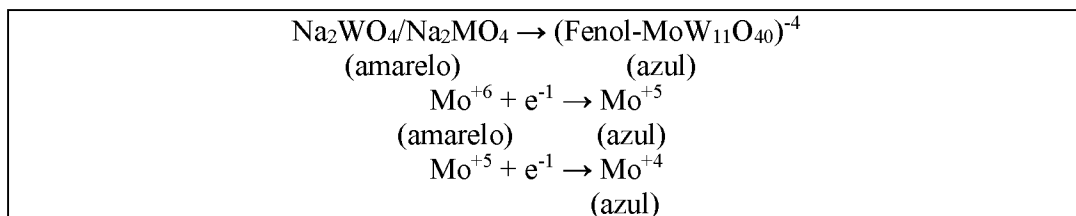


Fonte: Mabry, Markham e Thomas (1970).

### 5.3 TEOR DE FENÓIS TOTAIS

O reagente de Folin-Ciocalteu (FCC) consiste de uma mistura de tungstato e molibdato de sódio, em que o tungstênio e o molibdênio estão no estado de oxidação  $6^+$ . Em meio básico, na presença de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  aquoso, os compostos fenólicos formam complexos fosfomolibdico-fosfotungstico, os quais são reduzidos através de transferência de elétrons formando óxidos de coloração azul intensa que absorvem em 760 nm (PETERSON, 1979, JULKUNEN-TIITTO, 1985, ROGINSKY; LISSI, 2005, AVELLA; GARCÍA; CISNEROS, 2008, AGBOR; VINSON; DONNELLY, 2014). Na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, ocorre uma mudança no estado de oxidação dos metais que passa para  $5^+/4^+$  conferindo coloração azul ao complexo formado (AGBOR; VINSON; DONNELLY, 2014). A Figura 28 apresenta um esquema para a reação de um composto fenólico com o reagente FCC.

Figura 28: Esquema da reação dos compostos fenólicos com o reagente Folin-Ciocalteu.



Fonte: Agbor, Vinson e Donnelly (2014).

O teor de fenóis totais foi calculado a partir da equação da reta da curva analítica construída com ácido gálico ( $y = 0,0143x + 0,0189$ ;  $R = 0,9982$ ). Os resultados estão expressos em mg EAG g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>. A Tabela 10 mostra os resultados obtidos para os extratos, frações das folhas e frações das cascas de *I. laurina*.

Tabela 10: Teor de fenóis totais (em mg EAG g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>) das folhas e das cascas de *I. laurina*.

Amostras	Folhas	Amostras	Cascas
<b>EE-F</b>	127,7 ± 0,1	<b>EE-C</b>	384,5 ± 7,8 <sup>a</sup>
<b>FH-F</b>	35,0 ± 0,1	<b>FH-C</b>	-
<b>FC-F</b>	82,2 ± 1,0	<b>FC-C</b>	26,0 ± 4,0
<b>FAE-F</b>	475,3 ± 1,9	<b>FAEI-C</b>	291,5 ± 8,0
		<b>FAEII-C</b>	477,9 ± 9,3
<b>FB-F</b>	135,9 ± 1,5	<b>FB-C</b>	400,6 ± 3,2 <sup>a</sup>
<b>FM-F</b>	-	<b>FM-C</b>	346,0 ± 1,8

Nota: Resultados apresentados como média ± desvio padrão para os ensaios realizados em triplicata. As análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5%.

As FAE-F e FAEII-C apresentaram o maior teor de compostos fenólicos do que as outras frações, seguido das FB-C e FM-C. Esse resultado pode ser explicado pela maior polaridade do solvente, o qual solubiliza maior quantidade de substâncias polares.

Os resultados encontrados para o teor de fenóis totais para o extrato etanólico das folhas e cascas de *I. laurina* foram maiores que os encontrados para *I. marginata*, que apresentou valores de 31,63 e 16,69 mg EAG g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>, respectivamente. As frações acetato de etila de *I. laurina* também possuem maiores teores de fenóis totais que o extrato acetato de etila de *I. marginata*, que apresentou valores de 8,37 e 9,89 mg EAG g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup> para folhas e cascas respectivamente (RIEGER, 2011).

O extrato metanólico 50% das folhas de *I. edulis* apresentou teor de fenóis totais de 496,5 mg EAG g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup> (SOUZA et al., 2007), valor maior que o extrato etanólico das folhas de *I. laurina*. No trabalho de Dias, Sousa e Rogez (2010) o teor de fenóis totais do extrato acetona:água:ácido acético (10:28:2 v:v:v) das folhas de *I. edulis* foi avaliado e os autores encontraram valores de 15,8 e 357,5 mg EAG g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup> para a fração hexânica e aquosa, respectivamente. Os extratos em metanol:etanol:água:ácido

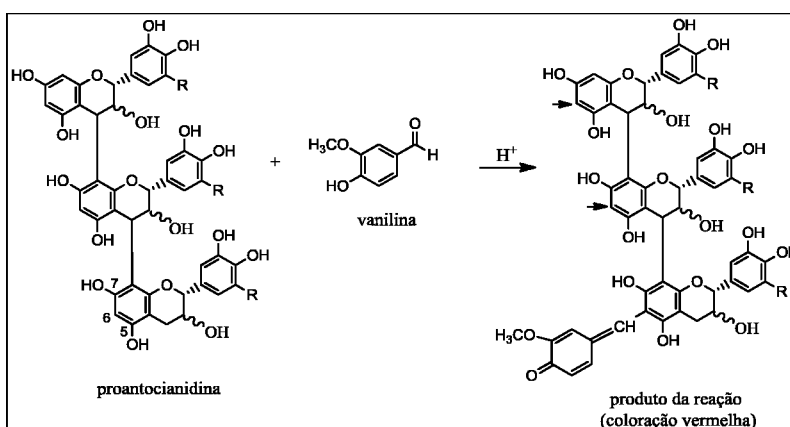
clorídrico 69:20:10:1 (v:v:v:v) de folhas, cascas, frutos e sementes de *I. edulis* apresentaram teores de fenóis de 9,8, 14,8, 0,7 e 0,4 mg EAG g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>, respectivamente (SILVA et al., 2007), que foram menores que os encontrados para *I. laurina*.

As diferenças nos valores de fenóis totais podem ocorrer devido aos diferentes solventes utilizados na extração. As soluções com acetona extraem compostos de menor polaridade como proantocianidinas e alguns flavonóis, enquanto que soluções metanólicas extraem compostos de maior polaridade como os flavanóis (DIAS; SOUZA; ROGEZ, 2010). Então, nos resultados encontrados para *I. laurina*, os solventes mais polares, como acetato de etila e *n*-butanol, foram os melhores extratores de compostos mais polares, o que justifica a maior concentração de compostos fenólicos.

#### 5.4 TEOR DE PROANTOCIANIDINAS

O método da vanilina sulfúrica se baseia na reação de substituição aromática eletrofílica das proantocianidinas (taninos condensados) com a vanilina, na presença de um catalisador ácido, formando produtos coloridos que absorvem em 500 nm (SUN; RICARDO-DA-SILVA; SPRANGER, 1998, SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001, SOUSA, 2015). A Figura 29 ilustra a reação entre uma proantocianidina e a vanilina.

Figura 29: Reação de uma proantocianidina com vanilina.



Nota: as setas no produto indicam outros sítios ativos para a reação.

Fonte: Schofield, Mbugua e Pell (2001).

Cunha (2013) e Sousa (2015) propuseram um mecanismo para a reação entre o tanino condensado e a vanilina. A primeira etapa da reação é a formação do eletrófilo (vanilina acidificada) para a reação de substituição aromática eletrofílica, em seguida ocorre a reação entre um monômero do tanino com o eletrófilo, após várias etapas e a eliminação de água, chega-se ao produto final. O carbono C6 do monômero do tanino é o carbono mais suscetível a doar elétrons para a vanilina acidificada porque ele está na posição *orto* em relação as hidroxilas dos carbonos C5 e C7 e na posição *para* em relação ao oxigênio do anel diidropirano.

O teor de proantocianidinas foi calculado a partir da equação da reta da curva analítica construída com catequina ( $y = 0,0439x - 0,0061$ ;  $R = 0,9995$ ). Os resultados estão expressos em mg ECAT g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>. A Tabela 11 mostra os resultados obtidos para os extratos, frações das folhas e das cascas de *I. laurina*.

Tabela 11: Teor de proantocianidinas (em mg ECAT g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup>) das folhas e das cascas de *I. laurina*.

Amostras	Folhas	Amostras	Cascas
<b>EE-F</b>	76,7 ± 1,3 <sup>a</sup>	<b>EE-C</b>	449,6 ± 12,6 <sup>c</sup>
<b>FH-F</b>	20,2 ± 1,9	<b>FH-C</b>	-
<b>FC-F</b>	43,3 ± 4,5	<b>FC-C</b>	27,6 ± 1,2
<b>FAE-F</b>	68,1 ± 4,4 <sup>a</sup>	<b>FAEI-C</b>	262,2 ± 8,2
		<b>FAEII-C</b>	467,2 ± 12,4 <sup>b,c</sup>
<b>FB-F</b>	59,7 ± 4,1	<b>FB-C</b>	492,4 ± 11,9 <sup>b</sup>
<b>FM-F</b>	-	<b>FM-C</b>	341,8 ± 15,8

Nota: Resultados foram apresentados como média ± desvio padrão para os ensaios realizados em triplicata. As análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5%.

O extrato e as frações das cascas de *I. laurina* tiveram um maior teor de proantocianidinas que as amostras de folhas, com exceção da FC-C. Esse resultado corrobora a triagem fitoquímica das amostras, uma vez que as cascas tiveram resultado positivo com reveladores que reagem com os taninos condensados, como o anisaldeído e o Liebermann-Burchard. Comparando os teores de fenóis totais e proantocianidinas de *I. laurina*, pode ser inferido que a cascas da planta possui grande concentração de

compostos fenólicos, especialmente de monômeros de flavanois, como flavan-4-ois, flavan-3,4-diois e flavan-3-ois, que formam as proantocianidinas (COS et al., 2004).

Em comparação com outras espécies do Cerrado, os valores encontrados para a cascas de *I. laurina* foram superiores aos valores de *Cassia bakeriana*, que apresentou teor de proantocianidinas de 197,8, e 174,6 mg ECAT g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup> para o extrato em etanol e a fração acetato de etila das cascas, respectivamente. Porém, as amostras das folhas de *I. laurina* tiveram um teor de proantocianidinas menor do que esta espécie, que apresentou teores de 150,9, 71,5 e 115,1 mg ECAT g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup> para o extrato em etanol, fração hexano e fração acetato de etila das folhas, respectivamente (CUNHA, 2013).

### 5.5 TEOR DE FLAVONOIDES

Os flavonoides são biossintetizados através da rota do ácido chiquímico e da rota da acetil-CoA. A partir da rota do acetato é formado o *beta*-cetoester, que origina o anel A do flavonoide, e a partir da rota do ácido chiquímico é formado o ácido *p*-cumário que origina os anéis B e C (Figuras 3 e 4, p. 34 e 35). Dessa forma, o esqueleto básico de um flavonoide é constituído pelos grupamentos benzoil (oriundos do acetato) e cinamoil (oriundo do ácido chiquímico) (Figura 27, p. 93).

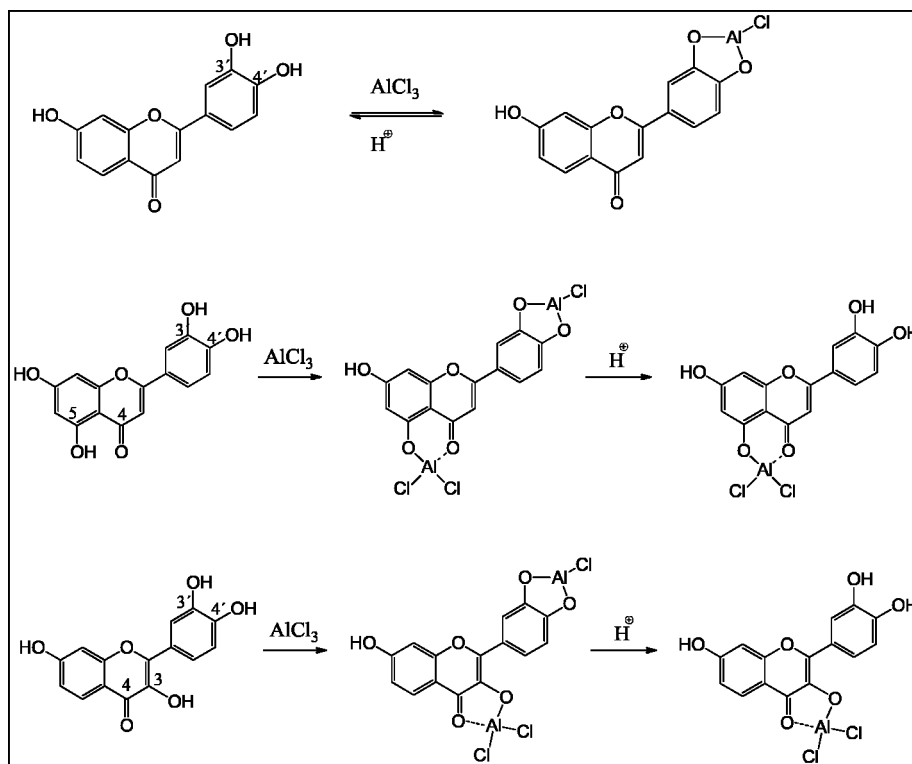
A presença dos sistemas de conjugação benzoil e cinamoil permite distinguir as classes de flavonoides, por exemplo, o comprimento de onda da banda I permite diferenciar flavonas e flavonois (3-hidroxiavonas), as flavonas possuem absorção entre 304-350 nm, os flavonois entre 352-380 nm e os flavonois substituídos (hidroxila substituída por grupamento metílico ou glicosídico) a absorção ocorre entre 328-357 nm (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

Os flavonoides formam complexos com o íon alumínio (Al<sup>3+</sup>), essa reação de complexação permite determinar o teor de flavonoides através da medida da absorvância da solução. Contudo, os comprimentos de onda das bandas I e II são deslocados para comprimentos de onda maiores na presença de cloreto de alumínio (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998).

A complexação dos flavonoides com o alumínio é seletiva para a presença de grupos hidroxila nos carbonos C3 e C5 e pela presença da carbonila no carbono C4, em que os complexos formados são estáveis. Podem ser formados complexos na presença de hidroxilas nos carbonos C3' e C4', porém, esses complexos são instáveis e

decompõem na presença de ácido (DENG; VAN BERKEL, 1998, BOUDET; CORNARD; MERLIN, 2000, CORNARD; MERLIN, 2002). A Figura 30 ilustra as formas de complexação dos flavonoides com o alumínio.

Figura 30: Reações de complexação do alumínio com os flavonoides.



Fonte: Mabry, Markham e Thomas (1970).

O teor de flavonoides foi calculado a partir da equação da reta da curva analítica construída com quercetina ( $y = 0,0251x - 0,0051$ ;  $R = 0,9994$ ). Os resultados estão expressos em  $\text{mg ECQ g}_{\text{extrato}}^{-1}$ . A Tabela 12 mostra os resultados obtidos para os extratos e frações das folhas e das cascas de *I. laurina*.

Tabela 12: Teor de flavonoides em mg EQ g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup> de folhas e cascas de *I. laurina*.

<b>Amostras</b>	<b>Folhas</b>	<b>Amostras</b>	<b>Cascas</b>
<b>EE-F</b>	133,1 ± 3,5	<b>EE-C</b>	5,5 ± 0,1
<b>FH-F</b>	33,6 ± 2,1 <sup>a</sup>	<b>FH-C</b>	-
<b>FC-F</b>	205,9 ± 9,2	<b>FC-C</b>	6,5 ± 0,2 <sup>b</sup>
<b>FAE-F</b>	359,3 ± 10,6	<b>FAEI-C</b>	4,2 ± 0,3 <sup>c</sup>
		<b>FAEII-C</b>	4,4 ± 0,1 <sup>c</sup>
<b>FB-F</b>	24,2 ± 1,2 <sup>a</sup>	<b>FB-C</b>	6,8 ± 0,5 <sup>b</sup>
<b>FM-F</b>	-	<b>FM-C</b>	8,2 ± 0,5

Nota: Resultados apresentados como média ± desvio padrão para os ensaios realizados em triplicata. As análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5%.

Os teores de flavonoides de todas as amostras das folhas foram superiores ao das cascas. Esse resultado corrobora a triagem fitoquímica e o perfil dos espectros de UV-VIS das amostras, pois foram identificados flavonoides pelo teste do NP/PEG apenas nas amostras de folhas, e o perfil dos espectros de UV-VIS indica a presença de duas bandas de absorção que caracteriza a presença de flavonoides. Além disso, pode-se inferir que os flavonoides presentes nas folhas pertencem a classe dos flavonois ou flavonas, uma vez que essas classes formam complexos com o alumínio e o com revelador NP/PEG.

Contudo, não pode ser descartada a presença de outras classes de flavonoides nas amostras de cascas, pois como o extrato das cascas apresentou grande teor de fenóis totais e de proantocianidinas, essa amostra pode conter compostos como flavanona, flavanonol, flavan-3-ol, isoflavona ou antocianinas, que não formam complexos com o alumínio.

O teor de flavonoides das folhas de *I. laurina* foi maior que o das folhas da *Eugenia calycina*, uma espécie do Cerrado, que apresentou valores de 22,7, 16,3 51,3 e 35,8 mg EQ g<sub>extrato</sub><sup>-1</sup> para o extrato etanólico, fração hexano, acetato de etila e *n*-butanol, respectivamente (SOUSA, 2015).



## 5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 5.6.1 MÉTODO DPPH

A atividade antioxidante é definida como a habilidade de um composto em inibir a degradação oxidativa, como a peroxidação de lipídios. Dentre os componentes presentes em alimentos e plantas os compostos fenólicos são as principais substâncias antioxidantes nas amostras. O principal mecanismo de ação da atividade antioxidante dos polifenóis está relacionado com a habilidade em reagir com radicais livres (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Existem os métodos diretos e indiretos de determinação da atividade antioxidante. Os métodos diretos envolvem a presença de substratos oxidáveis, como lipídeos, proteínas vegetais, DNA ou fluidos biológicos, em que as substâncias oxidantes são avaliadas pela capacidade de inibir a degradação oxidativa dos substratos em condições naturais de oxidação. Os métodos indiretos medem a capacidade de uma substância em reduzir um radical livre através da transferência de hidrogênio ou de elétrons, ou um metal de transição através de transferência de elétrons. Dentre os métodos indiretos estão o método do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) o método de redução do ferro e a voltametria (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

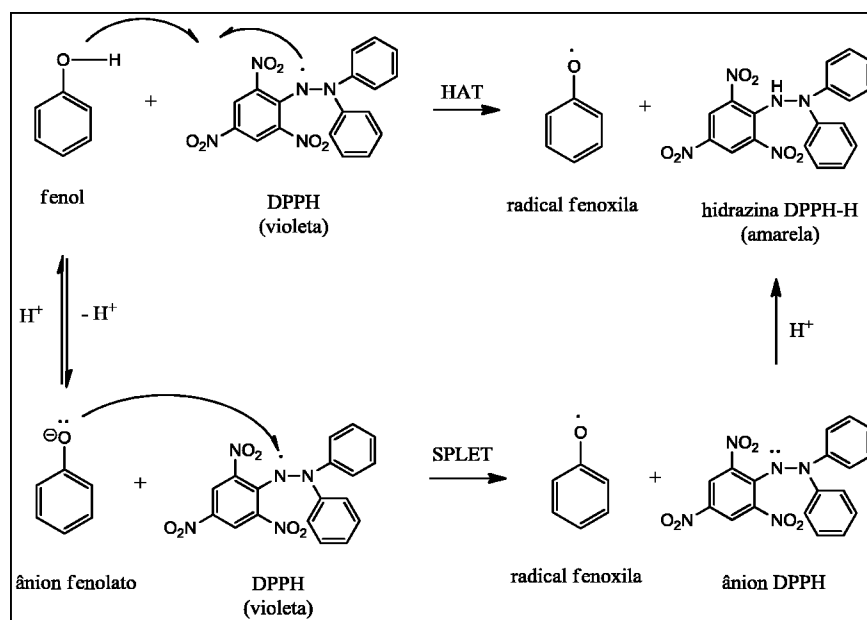
A metodologia da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH se baseia na reação de substâncias doadoras de hidrogênio com o DPPH. O radical DPPH possui coloração violeta e possui absorção em 517 nm, quando reage com um antioxidante, ele é reduzido a 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) e perde a coloração violeta (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). A reação é monitorada em 517 nm por ser o comprimento de onda máximo da absorção do radical DPPH (PÉREZ; AGUILAR, 2013). A atividade antioxidante é proporcional à porcentagem remanescente do radical DPPH, ou seja, que não reagiu com os compostos antioxidantes. A concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) representa a concentração de amostra necessária para reagir com 50% do radical DPPH (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Os compostos fenólicos reagem com o radical DPPH através de dois mecanismos: transferência de átomo de hidrogênio (HAT – *hydrogen atom transfer*) e transferência de elétrons pela perda de prótons (SPLET – *sequential proton loss*

*electron transfer*) (FOTI; DAQUINO; GERACI, 2004; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). No mecanismo HAT os compostos fenólicos transferem diretamente um átomo de hidrogênio para o radical DPPH e no mecanismo SPLET, ocorre primeiramente a desprotonação dos compostos fenólicos formando ânions fenolatos, e, em seguida, estes transferem um elétron para o radical DPPH, formando o ânion DPPH. Ambos os mecanismos formam o radical fenoxila, que é estabilizado por ressonância (LIU, 2010). A Figura 31 ilustra os mecanismos da reação do fenol, um composto fenólico simples, com o radical DPPH.

O mecanismo da reação é influenciado por fatores como concentração do DPPH, polaridade do solvente, temperatura e pH (XIE; SCHAICH, 2014). Foti, Daquino e Geraci (2004) realizaram um estudo sobre a atividade antioxidante de 10 compostos fenólicos, eles verificaram que em solventes próticos, como metanol e etanol, o mecanismo principal é o SPLET, enquanto que o HAT ocorre lentamente devido as ligações de hidrogênio do solvente, que possuem constante dielétrica relativamente alta e suportam a ionização dos ácidos de Bronsted.

Figura 31: Reação do fenol com o radical DPPH.



Fonte: adaptado de Liu (2010).

Foram determinados os teores de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides nos extratos e frações das folhas e das cascas de *I. laurina*, as amostras apresentaram

resultados promissores como fonte de compostos fenólicos, logo, foram realizados os ensaios da capacidade antiradicalar pelo método do radical DPPH e medida do potencial de oxidação das amostras.

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH, para os extratos e frações de *I. laurina*, após 1 hora de reação.

Tabela 13: Resultados da atividade antioxidante, expresso em CE<sub>50</sub> (em µg mL<sup>-1</sup>), para os extratos e frações de *I. laurina*.

<b>Amostras</b>	<b>Folhas</b>	<b>Amostras</b>	<b>Cascas</b>
<b>EE-F</b>	10,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	<b>EE-C</b>	4,4 ± 0,7 <sup>c</sup>
<b>FH-F</b>	44,4 ± 0,8	<b>FH-C</b>	-
<b>FC-F</b>	31,1 ± 1,6	<b>FC-C</b>	95,3 ± 3,3
<b>FAE-F</b>	5,5 ± 0,8	<b>FAEI-C</b>	7,5 ± 0,5 <sup>b</sup>
		<b>FAEII-C</b>	7,2 ± 0,9 <sup>b</sup>
<b>FB-F</b>	13,7 ± 1,8 <sup>a</sup>	<b>FB-C</b>	3,7 ± 0,5 <sup>c</sup>
<b>FM-F</b>	-	<b>FM-C</b>	4,6 ± 0,2 <sup>c</sup>
<b>BHT</b>			7,2 ± 0,3

Nota: Resultados apresentados como média ± desvio padrão para os ensaios realizados em triplicata. As análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5%. BHT: butilidroxitolueno, antioxidante sintético (controle positivo).

O EE-F e a FAE-F assim como o EE-C, FAEI-C, FAEII-C, FB-C e FM-C foram as amostras que apresentaram melhores resultados de atividade antioxidante porque possuem os menores valores de CE<sub>50</sub>. Quanto menor o valor de CE<sub>50</sub>, menos quantidade de amostra é necessário para reagir com o DPPH, e, portanto, melhor é a atividade antioxidante. De acordo com Reynerston, Basile e Nennely (2005), valores de CE<sub>50</sub> menores que 50 µg mL<sup>-1</sup> indicam que as amostras possuem elevada atividade antioxidante, enquanto que valores entre 50 e 100 µg mL<sup>-1</sup> são considerados como moderada atividade antioxidante. Assim, as amostras de *I. laurina* são promissoras como fonte de antioxidantes, visto que a maioria das amostras apresentou resultados de CE<sub>50</sub> abaixo de 50 µg mL<sup>-1</sup> e muito próximos do controle positivo BHT.

Comparando os resultados da atividade antioxidante com outras espécies do Cerrado, obtidos utilizando o mesmo solvente (metanol) e com o mesmo tempo de

reação (1 h) foi verificado que o extrato etanólico das folhas de *I. laurina* possui resultado de  $CE_{50}$  melhor que as espécies *Vernonia brasiliiana*, *Cassia bakeriana* e *Eugenia calycina*, que apresentaram valores de  $CE_{50}$  de 25, 17,04 e 19,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (MARTINS, 2012, CUNHA, 2013, SOUSA, 2015). O extrato etanólico e as frações acetato de etila das cascas de *I. laurina* também apresentaram menor valor de  $CE_{50}$  quando comparado com a cascas de *C. bakeriana*, que possui  $CE_{50}$  igual a 17,92 e 19,38  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o extrato etanólico e fração acetato de etila, respectivamente (CUNHA, 2013). A fração acetato de etila e *n*-butanol das folhas de *I. laurina* apresentou valores próximos aos das folhas de *E. calycina* que possui valores de 6,4 e 8,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (SOUSA, 2015).

Comparando os resultados de  $CE_{50}$  (expresso em  $1/CE_{50}$ , visto que quanto menor o valor de  $CE_{50}$  melhor é a atividade) com os de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides dos extratos e frações, verifica-se que há uma correlação positiva entre os resultados (correlação direta) (CALLEGARI-JACQUES, 2003), inferindo que quanto melhor a atividade antioxidante, maior o teor de compostos fenólicos. Foi obtida fraca correlação entre a atividade antioxidante pelo método DPPH e o teor de flavonoides das amostras de cascas, esse resultado é explicado pelo baixo teor de flavonoides encontrado para estas amostras. Essa correlação foi avaliada estatisticamente pelo método de Pearson e os coeficientes de correlação estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Coeficientes de correlação entre o método DPPH e o teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides das folhas e cascas de *I. laurina*.

	Folhas	Cascas
	$1/CE_{50}$	$1/CE_{50}$
<b>Fenóis totais</b>	0,942	0,745
<b>Proantocianidinas</b>	0,716	0,835
<b>Flavonoides</b>	0,726	0,274

Nota: a correlação pelo método de Pearson foi realizada utilizando o Programa Sigma Plot 11.0.

### 5.6.2 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL

As substâncias antioxidantes agem combatendo os radicais livres (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio - ERON) através de vários mecanismos, dentre eles

está o poder de doar elétrons as ERON, agindo como agentes redutores. Dessa forma, a medida do potencial de oxidação destas substâncias, através de técnicas eletroquímicas, está relacionada com sua capacidade antioxidante (GANDRA et al., 2004).

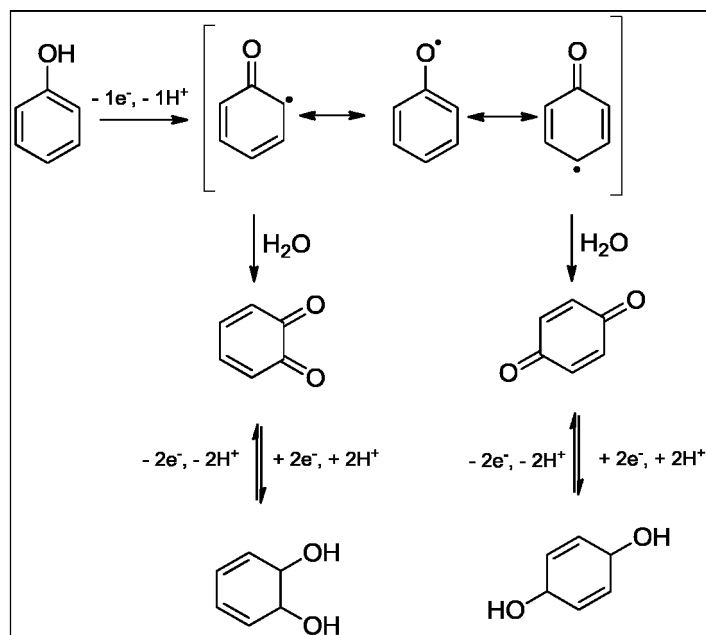
As técnicas voltamétricas, especialmente a voltametria cíclica e a voltametria de pulso diferencial, correlacionam os potenciais de oxidação com a atividade antioxidante, quanto menor o potencial de oxidação, maior a capacidade de doar elétrons da amostra em estudo, e, portanto, melhor é a atividade antioxidante (ALVES et al., 2010). Outros parâmetros como a intensidade da corrente anódica e a área sob a curva do gráfico da corrente *versus* potencial estão relacionados com a concentração das espécies redutoras na amostra analisada (MAGALHÃES et al., 2008).

Estas técnicas apresentam algumas vantagens, tais como: podem ser aplicadas na determinação da atividade antioxidante de compostos fenólicos, uma vez que estes compostos são naturalmente eletroativos e não é necessário utilizar espécies reativas, tornando simples o processo de análise; são seletivas para a espécie em estudo, podendo utilizar pequena quantidade de amostra (alta sensibilidade); não há interferência de amostras turvas e requer o uso de instrumentação simples (BLASCO et al., 2007).

Na técnica da voltametria de pulso diferencial (VPD) são aplicados pequenos pulsos de amplitude constante (entre 10 e 100 mV) em uma rampa de potencial crescente. São realizadas medidas da corrente antes da aplicação e no final de cada pulso, a diferença entre essas medidas é plotada em um gráfico *versus* o potencial aplicado, obtendo-se o voltamograma, que consiste em uma curva de forma gaussiana (GULABOSKI; PEREIRA, 2008, PACHECO, 2013).

Durante a análise os compostos fenólicos são oxidados e ocorre a formação de radicais fenoxila, que são estabilizados por ressonância. Em seguida estes radicais são hidrolisados em um potencial alto, formando os produtos de oxidação, quinona e catecol (GIL; COUTO, 2013). A Figura 32 ilustra o mecanismo de oxidação do fenol.

Figura 32: Mecanismo de oxidação do fenol.



Fonte: Gil e Couto (2013).

A Tabela 15 mostra os resultados obtidos do potencial de oxidação, carga e corrente de pico para o extrato e as frações das folhas de *I. laurina* nos dois tampões utilizados, acetato e fosfato.

Tabela 15: Potencial de oxidação, carga e corrente de pico dos extratos e frações das folhas de *I. laurina*.

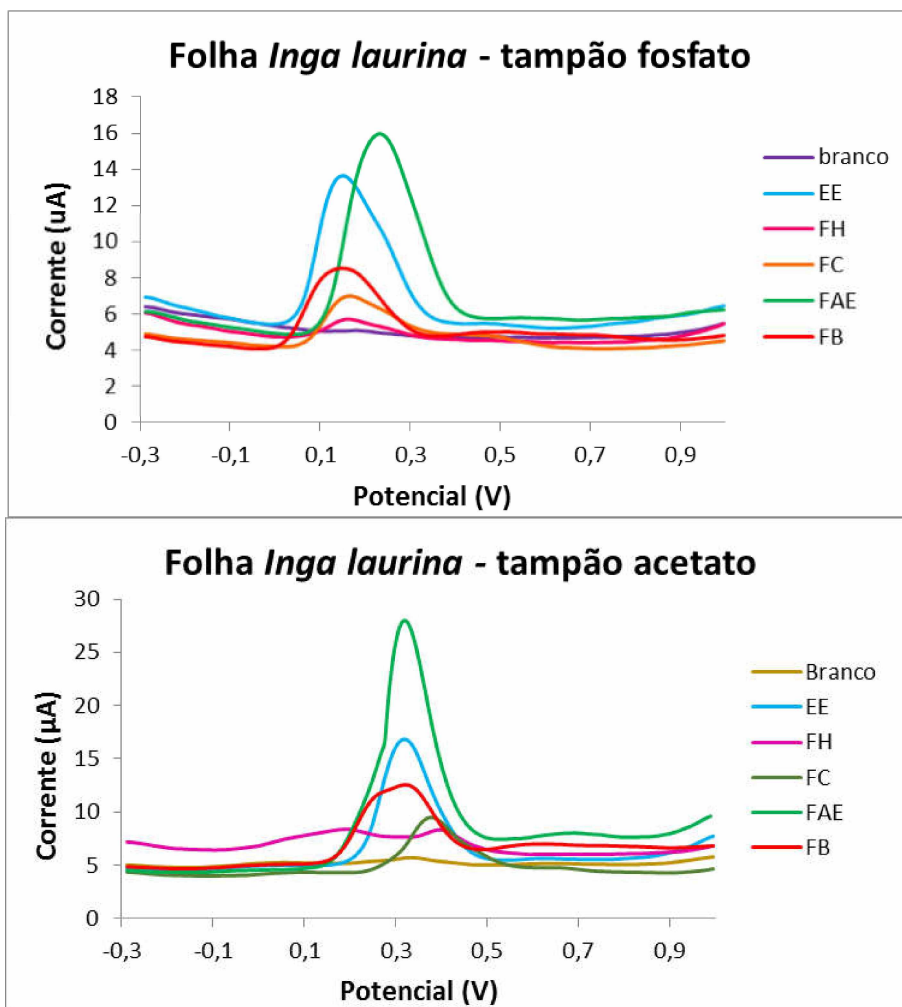
Amostras	Tampão acetato			Tampão fosfato		
	Carga ( $\mu C$ )	Corrente ( $\mu A$ )	Potencial de oxidação (V)	Carga ( $\mu C$ )	Corrente ( $\mu A$ )	Potencial de oxidação (V)
<b>EE-F</b>	$60,4 \pm 2,8$	$11,4 \pm 0,1$	$0,318 \pm 0,0$	$49,4 \pm 4,9$	$7,7 \pm 0,4$	$0,166 \pm 0,015$
<b>FH-F</b>	$3,5 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,1$	$0,404 \pm 0,007$	$1,6 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,158 \pm 0,003$
<b>FC-F</b>	$25,6 \pm 4,0$	$5,1 \pm 0,1$	$0,362 \pm 0,033$	$14,3 \pm 1,1$	$2,3 \pm 0,1$	$0,162 \pm 0,006$
<b>FAE-F</b>	$112,6 \pm 4,8$	$21,3 \pm 0,9$	$0,324 \pm 0,0$	$73,6 \pm 1,8$	$10,6 \pm 0,3$	$0,228 \pm 0,006$
<b>FB-F</b>	$49,5 \pm 3,5$	$7,0 \pm 0,4$	$0,324 \pm 0,0$	$31,0 \pm 2,1$	$4,3 \pm 0,2$	$0,152 \pm 0,003$

Nota: Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão para os ensaios realizados em triplicata. As análises da carga mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5%.

Na Tabela 15 pode ser observado que o EE-F, FAE-F e FB-F foram as amostras com os menores potenciais de oxidação no tampão acetato, coincidindo com os resultados de atividade antioxidante pelo método DPPH, pois foram as amostras com o menor valor de  $CE_{50}$ , indicando melhor atividade antioxidante. Entretanto, no tampão fosfato a FAE-F apresentou maior potencial de oxidação, inferindo que o pH do eletrólito influenciou o potencial de oxidação dos compostos presentes na amostra. Em estudos realizados sobre o potencial de oxidação de flavonoides, foi verificado que o pH do meio reacional influencia o potencial de oxidação das amostras, inferindo que a concentração de íons  $H_3O^+$  tem um papel importante no mecanismo de oxidação (TIMBOLA et al., 2006, GIL; COUTO, 2013).

Em relação a carga e a corrente de pico das amostras, foi verificado que o EE-F, FAE-F e FB-F apresentaram os maiores valores nos dois tampões, ou seja, são as amostras com a maior concentração de compostos fenólicos que oxidam no potencial aplicado, resultado que confere com os teores de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides, como também com a melhor atividade antioxidante para essas amostras. A Figura 33 mostra os voltamogramas obtidos na análise da VPD das amostras das folhas.

Figura 33: Voltamogramas dos extratos e frações das folhas de *I. laurina*.



Fonte: autora.

As Tabelas 16 e 17 mostram os resultados obtidos do potencial de oxidação e da de carga para os extratos e frações das cascas de *I. laurina* nos dois tampões utilizados, acetato e fosfato.



Tabela 16: Potencial de oxidação, carga e corrente de pico no tampão acetato dos extratos e frações das cascas de *I. laurina*.

Amostras	Tampão acetato					
	Carga ( $\mu\text{C}$ )	Corrente ( $\mu\text{A}$ )	Potencial de oxidação (V)	Carga ( $\mu\text{C}$ )	Corrente ( $\mu\text{A}$ )	Potencial de oxidação (V)
<b>EE-C</b>	$129,3 \pm 5,8$	$20,6 \pm 1,1$	$0,260 \pm 0,007$	$7,1 \pm 0,9^f$	$1,6 \pm 0,1^{\text{hi}}$	$0,592 \pm 0,003$
<b>FC-C</b>		$15,4 \pm 1,1^d$	$0,335 \pm 0,003$			
<b>FAEI-C</b>	$18,4 \pm 3,1$	$2,9 \pm 0,6$	$0,328 \pm 0,009$	$12,1 \pm 1,4^e$	$2,0 \pm 0,3^{\text{gh}}$	$0,640 \pm 0,007$
<b>FAEII-C</b>	$181,4 \pm 7,0^{\text{b,c}}$	$26,4 \pm 0,8$	$0,256 \pm 0,003$	$10,5 \pm 0,6^e$	$2,2 \pm 0,1^g$	$0,600 \pm 0,000$
<b>FB-C</b>		$23,1 \pm 1,2$	$0,331 \pm 0,001$			
<b>FM-C</b>	$186,7 \pm 1,8^{\text{a,b}}$	$32,9 \pm 0,4$	$0,246 \pm 0,000$	$6,8 \pm 0,2^f$	$1,5 \pm 0,1^i$	$0,582 \pm 0,000$
		$17,2 \pm 0,6^d$	$0,335 \pm 0,002$			
<b>FM-C</b>	$172,4 \pm 8,8^{\text{a,c}}$	$29,5 \pm 1,6$	$0,246 \pm 0,000$	$6,0 \pm 0,4^f$	$1,3 \pm 0,1^i$	$0,58 \pm 0,003$
		$17,0 \pm 0,7^d$	$0,334 \pm 0,001$			

Nota: Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão para os ensaios realizados em triplicata. As análises de carga e corrente com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 17: Potencial de oxidação, carga e corrente de pico no tampão fosfato dos extratos e frações das cascas de *I. laurina*.

Amostras	Tampão fosfato					
	Carga ( $\mu\text{C}$ )	Corrente ( $\mu\text{A}$ )	Potencial de oxidação (V)	Carga ( $\mu\text{C}$ )	Corrente ( $\mu\text{A}$ )	Potencial de oxidação (V)
<b>EE-C</b>	$140,6 \pm 5,3$	$23,9 \pm 0,9$	$0,118 \pm 0,003$	$5,6 \pm 0,5^a$	$1,2 \pm 0,1^b$	$0,470 \pm 0,003$
<b>FC-C</b>		$14,3 \pm 0,5$	$0,198 \pm 0,002$			
<b>FAEI-C</b>	$29,7 \pm 3,0$	$4,2 \pm 0,3$	$0,117 \pm 0,003$	$14,8 \pm 1,3$	$2,9 \pm 0,1$	$0,496 \pm 0,003$
<b>FAEII-C</b>		$4,0 \pm 0,3$	$0,163 \pm 0,001$			
<b>FB-C</b>	$51,0 \pm 7,6$	$6,5 \pm 1,1$	$0,165 \pm 0,003$	$6,6 \pm 1,5^a$	$1,3 \pm 0,1^b$	$0,512 \pm 0,003$
<b>FM-C</b>		$30,1 \pm 0,6$	$0,108 \pm 0,000$			
<b>FM-C</b>	$179,4 \pm 3,0$	$16,6 \pm 0,2$	$0,197 \pm 0,001$	$125,0 \pm 3,5$	$12,5 \pm 0,2$	$0,200 \pm 0,002$
		$21,0 \pm 0,9$	$0,116 \pm 0,003$			

Nota: Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão para os ensaios realizados em triplicata. As análises de carga com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5%.

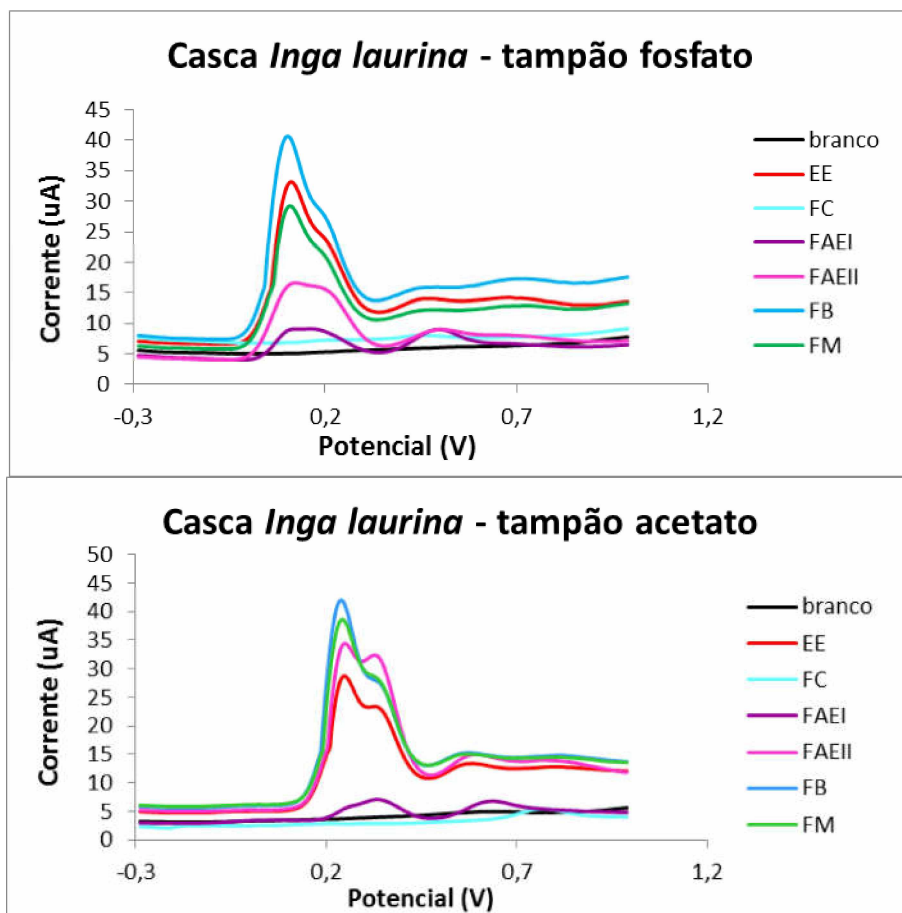
Analisando os resultados das Tabelas 16 e 17 e, comparando com os resultados na Tabela 15, é possível verificar que os constituintes químicos presentes nos extratos e frações das folhas e das cascas de *I. laurina* pertencem a diferentes classes de metabólitos secundários, pois apresentaram potenciais de oxidação diferentes. Este resultado corrobora a triagem fitoquímica e o espectro UV-VIS das amostras (subitem 5.2, p. 87).

Nos extratos e frações das cascas é possível verificar a presença de até três potenciais de oxidação em uma amostra, sendo que dois deles estão sobrepostos. Esse resultado pode ser explicado pela presença de várias hidroxilas nas espécies químicas das amostras, que oxidam em potenciais diferentes, pois os picos de oxidação do voltamograma correspondem a oxidação dos grupos fenólicos presentes na estrutura química (ZHANG et al., 2011, TEIXEIRA et al., 2013). A presença do potencial de oxidação maior que 0,400 V pode ser atribuído a oxidação de subprodutos formados na reação eletroquímica, pois a carga é muito pequena quando comparada com a carga no potencial entre 0,100 e 0,300 V, para os dois tampões, como também devido a grupamentos fenólicos que oxidam em um potencial maior (TIMBOLA et al., 2006, TEIXEIRA et al., 2013).

Os maiores valores de carga e corrente de pico foram obtidos para as FAEII-C, FB-C e FM-C, as quais foram as amostras com os maiores teores de fenóis totais e proantocianidinas e melhores resultados de  $CE_{50}$ .

A Figura 34 mostra os voltamogramas obtidos na análise da VPD das amostras das cascas.

Figura 34: Voltamogramas dos extratos e frações das cascas de *I. laurina*.



Fonte: autora.

A análise da VPD para as amostras das folhas e das cascas foi realizada no tampão acetato (pH 4,5) e tampão fosfato (pH 7,0). Foi verificado que o potencial de oxidação e a corrente de pico foram menores no tampão fosfato (maior pH) para todas as amostras analisadas, resultado que corrobora vários trabalhos na literatura sobre o potencial de oxidação de compostos fenólicos (GIACOMELLI et al., 2002, JANEIRO et al., 2007, LIANG et al., 2008, FERNANDES et al., 2012) em que foi observado a diminuição do potencial e da corrente de pico com o aumento do pH.

Este resultado pode ser explicado pelo aumento da nucleofilicidade dos compostos orgânicos (fenólicos) com o aumento do pH, que justifica o menor valor do potencial de oxidação em pH 7,0 e pelo fato do pH influenciar a concentração e o coeficiente de difusão das espécies eletroativas que são oxidadas. Em meio neutro ou alcalino, os grupos hidroxila dos compostos fenólicos estão totalmente ionizados

(desprotonados) aumentando a hidrofilicidade e diminuindo a adsorção de compostos na superfície do eletrodo de trabalho, em meio ácido os compostos fenólicos não estão totalmente ionizados e consequentemente a adsorção destes compostos na superfície do eletrodo é maior, o que justifica o menor valor da corrente de pico para os extratos e frações das folhas e das cascas no tampão fosfato e maior valor de corrente no tampão acetato (menor pH) (GIACOMELLI et al., 2002, FERNANDES et al., 2012).

Foi realizada a correlação entre a carga e a atividade antioxidante (expressa como  $1/CE_{50}$ ), o teor de fenóis totais, de proantocianidinas e de flavonoides para as amostras de folhas e de cascas, com exceção para a correlação do teor de flavonoides das cascas. Não foi realizada a correlação com o teor de flavonoides porque a cascas apresentou baixo teor de flavonoides, além disso, não foi realizada a correlação com a fração clorofórmio das cascas porque essa amostra não apresentou potencial de oxidação na faixa entre 0,100-0,300 V, que foi a faixa utilizada para realizar a correlação entre as amostras. O coeficiente de correlação entre as amostras está apresentado nas Tabelas 18 e 19, em que pode ser observada forte correlação para a maioria das amostras, inferindo que quanto maior o teor de compostos fenólicos maior é a carga das amostras. Foi obtida fraca correlação entre a carga das cascas no tampão fosfato e o teor de fenóis totais, fato que pode ser explicado pela baixa carga das frações acetato de etila neste tampão.

Tabela 18: Coeficientes de correlação da voltametria de pulso diferencial, método DPPH, fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides das folhas de *I. laurina*.

	Folhas	
	Tampão acetato	Tampão fosfato
	Carga	Carga
<b><math>1/CE_{50}</math></b>	0,965	0,956
<b>Fenóis totais</b>	0,938	0,882
<b>Proantocianidinas</b>	0,794	0,846
<b>Flavonoides</b>	0,744	0,698

Nota: a correlação pelo método de Pearson foi realizada utilizando o Programa Sigma Plot 11.0.

Tabela 19: Coeficientes de correlação da voltametria de pulso diferencial, método DPPH, fenóis totais e proantocianidinas das cascas de *I. laurina*.

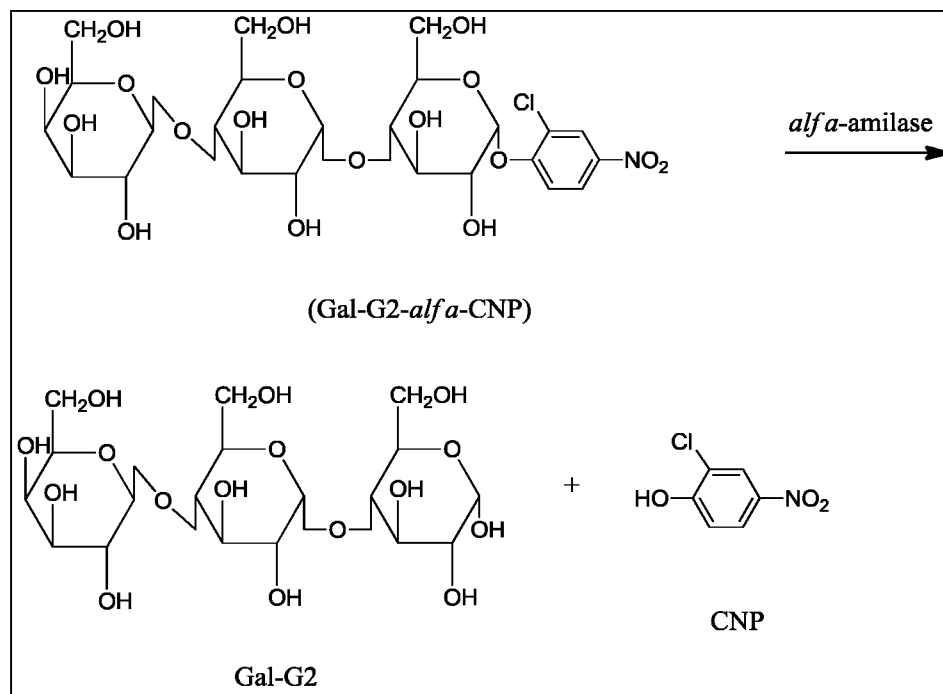
	<b>Cascas</b>	
	<b>Tampão acetato</b>	<b>Tampão fosfato</b>
	<b>Carga</b>	<b>Carga</b>
<b>1/CE<sub>50</sub></b>	0,508	0,922
<b>Fenóis totais</b>	0,747	0,134
<b>Proantocianidinas</b>	0,773	0,577

Nota: a correlação pelo método de Pearson foi realizada utilizando o Programa Sigma Plot 11.0.

### 5.7 ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA $\alpha$ -AMILASE

A metodologia da determinação da atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase baseia-se na reação de hidrólise do substrato  $\alpha$ -(2-cloro-4-nitrofenil)- $\beta$ -1,4-galactopiranosilmaltoside (Gal-G2- $\alpha$ -CNP) formando como produtos o 2-cloro-4-nitrofenol (CNP) e o 1,4-galactopiranosilmaltoside (Gal-G2) (Figura 35). A velocidade de formação do CNP é medida colorimetricamente a 405 nm. A enzima  $\alpha$ -amilase catalisa a reação de hidrólise, sendo observada coloração amarela da solução da amostra devido a formação do CNP. Na presença de uma substância que inibe a enzima, não ocorre a formação do CNP e não é observada a coloração amarela da solução. O aumento no valor da absorvância é proporcional a atividade da enzima na amostra (YAMAGUCHI; WAKASUGI; SAKAKIMA, 2008, MEDICHEM, 2010, BIOCLIN, 2015).

Figura 35: Reação do Gal-G2- $\alpha$ -CNP com a  $\alpha$ -amilase.



Fonte: adaptado de Morishita et al. (2000).

A Tabela 20 mostra os resultados da porcentagem de inibição da  $\alpha$ -amilase para os extratos e frações das folhas e das cascas de *I. laurina*. As amostras das folhas apresentaram alta porcentagem de inibição, com exceção para a FC-F que não foi ativa na concentração testada. O EE-C, FB-C e FM-C foram as amostras que apresentaram atividade inibitória da enzima. As FC-C e FAEI-C e FAEII-C não foram ativas na concentração testada.

Tabela 20: Porcentagem de inibição da  $\alpha$ -amilase para os extratos e frações das folhas e das cascas de *I. laurina*.

<b>Amostras</b>	<b>Folhas</b>	<b>Amostras</b>	<b>Cascas</b>
<b>EE-F</b>	97,8 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	<b>EE-C</b>	97,9 $\pm$ 0,1
<b>FH-F</b>	93,0 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	<b>FH-C</b>	-
<b>FC-F</b>	26,5 $\pm$ 5,9	<b>FC-C</b>	14,8 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>
<b>FAE-F</b>	89,1 $\pm$ 0,8	<b>FAEI-C</b>	13,8 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>
		<b>FAEI-C</b>	30,0 $\pm$ 5,1 <sup>b</sup>
<b>FB-F</b>	97,2 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	<b>FB-C</b>	97,4 $\pm$ 0,1
<b>FM-F</b>	-	<b>FM-C</b>	96,5 $\pm$ 0,1
<b>Acarbose</b>			99,6 $\pm$ 0,2

Nota: Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão para os ensaios realizados em triplicata. O teste de normalidade falhou para esta análise. As análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5%.

Após a obtenção dos valores da porcentagem de inibição, as amostras com os melhores resultados foram analisadas em diferentes concentrações para o cálculo do CE<sub>50</sub>, ou seja, a quantidade de amostra capaz de inibir 50% da enzima. Os resultados estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21: Resultados da atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase, expresso em CE<sub>50</sub> ( $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), dos extratos e frações das folhas e das cascas de *I. laurina*.

<b>Amostras</b>	<b>Folhas</b>	<b>Amostras</b>	<b>Cascas</b>
<b>EE-F</b>	7,9 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	<b>EE-C</b>	0,4 $\pm$ 0,01
<b>FH-F</b>	11,9 $\pm$ 0,5	<b>FH-C</b>	-
<b>FC-F</b>	-	<b>FC-C</b>	-
<b>FAE-F</b>	8,1 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	<b>FAEI-C e FAEII-C</b>	-
<b>FB-F</b>	6,2 $\pm$ 0,2	<b>FB-C</b>	0,5 $\pm$ 0,02
<b>FM-F</b>	-	<b>FM-C</b>	0,6 $\pm$ 0,01
<b>Acarbose</b>			0,013 $\pm$ 0,003

Nota: Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão para os ensaios realizados em triplicata. As análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5%.

Todas as amostras apresentaram resultados de  $CE_{50}$  muito promissores, visto que todos os resultados estão abaixo de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , especialmente as amostras das cascas, que apresentaram os menores valores e melhor atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase.

Estes resultados podem ser explicados pela presença de compostos fenólicos nas amostras, como mostrado em ensaios anteriores, como alto teor de flavonoides e fenóis totais nas folhas, e nas cascas a alta concentração de proantocianidinas pode ser responsável pela excelente atividade inibitória. Várias plantas já foram estudadas em relação a atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase, na família Fabaceae, a qual pertence o *I. laurina*, as espécies *Cajanus cajan* L., *Galega officinalis* L., *Olneya tesota* A. Gray, *Phaseolus vulgaris* L. e *Tamarindus indica* L. apresentaram porcentagem de inibição na faixa entre 45 a 100% (SALES et al., 2012). Neste mesmo artigo, os autores também relatam as principais classes de metabólitos secundários que inibem a enzima, como flavonoides, terpenos, ácidos cinâmicos e derivados e proantocianidinas.

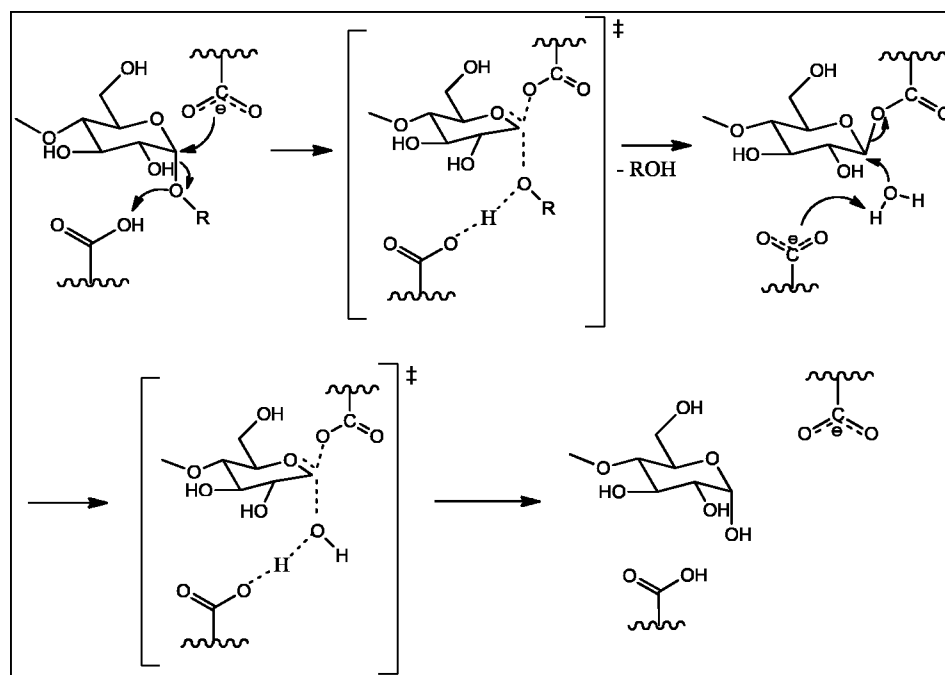
Vários trabalhos na literatura relatam a atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase de compostos fenólicos (ROHN; RAWEL; KROLL, 2002, TADERA et al., 2006, LO PIPARO et al., 2008, KIM et al., 2010). Especialmente para os flavonoides os trabalhos apresentam os resultados de diferentes classes de compostos em relação a inibição da enzima, em que foi mostrado que a atividade inibitória é devido as ligações de hidrogênio das hidroxilas com os sítios ativos da enzima, a presença da carbonila no carbono C4 na estrutura dos flavonoides, formando um sistema condensado planar, que favorece a formação de um sistema  $\pi$  conjugado aumentando a inibição da enzima (LO PIPARO et al., 2008, XIAO et al., 2013). Além disso, a hidroxilação e presença de grupos galoil aumentam a atividade enquanto a metilação, metoxilação e glicosilação diminuem a atividade de inibição (XIAO et al., 2013).

Rohn, Rawel e Kroll (2002) estudaram a atividade de inibição da  $\alpha$ -amilase de vários compostos fenólicos e seus resultados demonstraram que a *p*-benzoquinona apresentou melhor atividade inibitória, assim como os compostos fenólicos que formam quinonas, como ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido gálico, enquanto que os compostos que não formam quinonas foram menos reativos. Esse resultado corrobora o mecanismo de reação dos compostos fenólicos com as enzimas, uma vez que durante a reação são formadas as quinonas que podem se polimerizar e interagir com os sítios ativos das enzimas.



A  $\alpha$ -amilase atua na degradação de carboidratos, desempenhando um papel importante na dieta humana. Os inibidores desta enzima contribuem para a regulação dos níveis de glicose no sangue, pois retardam a digestão de carboidratos, diminuindo a hiperglicemia pós-prandial (TADERA et al., 2006). Kuriki e Imanaka (1999) e Lo Piparo e outros (2008) propuseram um mecanismo para a clivagem da ligação glicosídica dos polissacarídeos pelo sítio ativo da  $\alpha$ -amilase. Na reação  $S_N2$  (Figura 36) o grupo carboxilato do sítio ativo da enzima reage como um nucleófilo e ataca o carbono anomérico do açúcar formando um estado de transição. Em seguida ocorre a quebra da ligação glicosídica do substrato. Numa segunda etapa da reação uma molécula de água ataca o carbono anomérico rompendo a ligação entre o substrato e a enzima. A reação termina com a inserção de uma hidroxila no centro anomérico.

Figura 36: Mecanismo para a clivagem da ligação glicosídica pelo sítio ativo da  $\alpha$ -amilase.

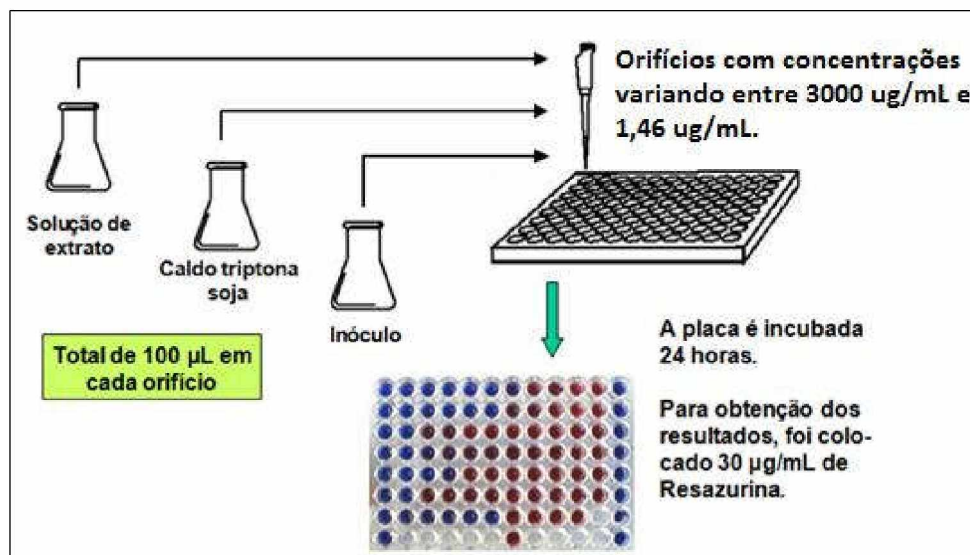


Fonte: Kuriki e Imanaka (1999).

### 5.8 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A metodologia da diluição em caldo baseia-se na preparação de soluções diluídas de diferentes concentrações da amostra a ser testada, a qual é colocada em um meio de cultura ocupando um volume mínimo de 2,0 mL para o método da macrodiluição ou em volumes menores para o método da microdiluição utilizando placas de microtitulação de 96 poços. Em seguida o inóculo é adicionado em cada poço e as placas são incubadas sob condições específicas, de acordo com o microrganismo do ensaio (Figura 37). Para a determinação da CIM (menor concentração da amostra necessária pra inibir o crescimento bacteriano) são empregados reagentes que mudam de cor de acordo com a presença ou ausência de crescimento bacteriano, como a resazurina, em que a coloração vermelha indica a presença de crescimento bacteriano e a azul, ausência de crescimento bacteriano (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Figura 37: Esquema da metodologia da microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima.

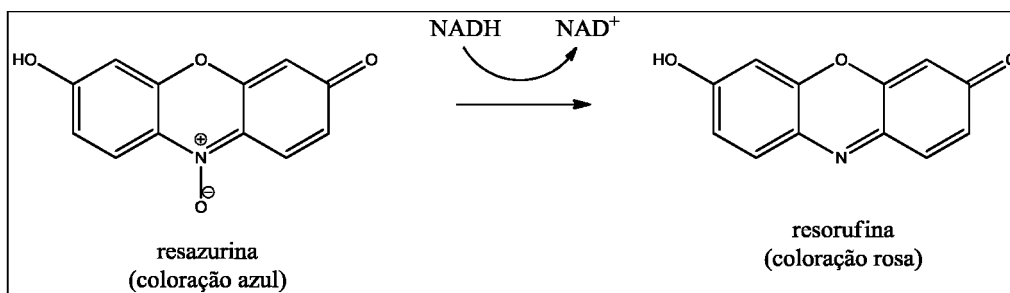


Fonte: Cunha (2013).

A resazurina é um corante de coloração azul que é empregado como indicador para avaliação do crescimento celular. Este composto quando entra em contato com as células de microrganismos, como bactérias e fungos, é reduzido a resorufina (Figura

38), que possui coloração rosa e fluorescente, através de oxirredutases presentes no interior das células (RISS et al., 2004, SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007).

Figura 38: Reação de redução da resazurina.



Fonte: Riss e outros (2004).

Os resultados da CIM, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , dos extratos, frações das folhas e frações das cascas de *I. laurina* estão apresentados nas Tabelas 22 e 23, respectivamente. De maneira geral, para todas as amostras testadas, os valores das CIM's são iguais ou maiores que  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo que a maioria das amostras não foi ativa frente aos microrganismos bucais avaliados nas concentrações testadas. De acordo com Ríos e Recio (2005) resultados de concentrações menores que  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  para extratos são considerados promissores como agentes antibacterianos, e as amostras do ingá apresentaram resultados superiores para todas as amostras estudadas. Portanto, a planta não apresentou bons resultados de atividade antimicrobiana frente as bactérias bucais avaliadas.

Tabela 22: Resultados da atividade antibacteriana, expresso como CIM, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , do extrato e frações das folhas de *I. laurina*.

	Microrganismos	EE-F	FH-F	FC-F	FAE-F	FB-F	DC
<b>Aeróbios</b>	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	0,922
	<i>S. mitis</i> ATCC 49456	> 400	400	400	400	> 400	3,688
	<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	3,688
	<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717	> 400	400	400	400	> 400	1,844
	<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	400	400	200	> 400	> 400	3,688
	<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	400	> 400	400	> 400	> 400	3,688
<b>Anaeróbios</b>	<i>A. naeslundii</i> ATCC 19039	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	1,844
	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	1,844

Concentrações das amostras testadas: 0,195  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; Concentrações do controle positivo: 0,0115  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 5,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . DC: Dicloridrato de clorexidina (controle positivo).

Tabela 23: Resultados da atividade antibacteriana, expresso como CIM, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , do extrato e frações das cascas de *I. laurina*.

	Microrganismos	EE-C	FC-C	FAEI-C	FAEII-C	FB-C	FM-C	DC
Aeróbios	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	0,922
	<i>S. mitis</i> ATCC 49456	> 400	400	> 400	> 400	> 400	> 400	3,688
	<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	400	400	> 400	> 400	> 400	> 400	3,688
	<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	1,844
	<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	3,688
	<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	3,688
Anaeróbios	<i>A. naeslundii</i> ATCC 19039	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	1,844
	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	1,844

Concentrações das amostras testadas: 0,195  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; Concentrações do controle positivo: 0,0115  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 59,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . DC: Dicloridrato de clorexidina (controle positivo).

Embora os extratos e frações de *I. laurina* não tiveram bons resultados para a atividade antibacteriana, os óleos essenciais desta espécie apresentaram resultados promissores para as bactérias bucais avaliadas. Os óleos essenciais das folhas e casca obtidos na estação de seca evidenciaram CIM's de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para as bactérias *P. gingivalis* e *S. mitis*. O óleo das folhas apresentou o mesmo valor de CIM para as bactérias *P. nigrescens*, *S. mutans* e *S. salivarius*. E, na estação chuvosa, os óleos essenciais das folhas e casca apresentaram melhores valores de concentrações inibitórias para as bactérias aeróbias (25 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (FURTADO et al., 2014a). Dessa forma, comparando os resultados de atividade antibacteriana dos óleos essenciais com os extratos e frações da espécie *I. laurina*, os óleos indicaram forte atividade uma vez que os valores de CIM foram iguais ou abaixo 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

A atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas e do caule de *I. laurina*, coletada em Porto Rico, foi avaliada frente ao microrganismo *Mycobacterium tuberculosis*. A planta não apresentou resultado significado, quando comparado com outras espécies estudadas, apresentando porcentagem de inibição de 62 e 30% para a

folhas e caule, respectivamente (ANTOUN et al., 2001). O extrato etanólico das cascas de *Inga marginata* coletadas no município de Cáqueza, na Colômbia, foi avaliado contra as bactérias *S. aureus*, *Escherichia coli*, *S. gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*, não sendo ativo contra essas bactérias. As saponinas isoladas deste extrato apresentaram baixa inibição contra *S. aureus* e *S. gallinarum* (ALVAREZ et al., 1998a).

Outra espécie de *Inga*, coletada em Santo Domingo, na República Dominicana foi estudada contra bactérias gram-positivas (*S. aureus*) e gram-negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*) pelo método de difusão em disco. O extrato etanólico das folhas e das cascas de *Inga vera* apresentou moderada atividade antibacteriana, enquanto a casca foi mais ativa do que as folhas apresentando zonas de inibição entre 7 e 20 mm de diâmetro para todas as bactérias estudadas. A folhas não apresentaram zona de inibição para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (LOZANO et al., 2013).

A planta *Inga fendleriana* apresentou atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas. Os extratos acetato de etila e *n*-butanol tiveram valores de CIM entre 125 e 850  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os flavonoides isolados desta espécie, quercetina-3-metileter, miricetina-3-O-ramnosídeo e tricetina apresentaram atividade antibacteriana com valores de CIM na faixa entre 31 a 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (PISTELLI et al., 2009).

### 5.9 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E CITOTÓXICA

A metodologia empregada na atividade antifúngica (determinação da CIM) foi a mesma utilizada para a determinação da atividade antibacteriana descrita no item anterior. Ambas as análises foram realizadas no mesmo laboratório.

Os resultados da CIM para a atividade antifúngica, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e da atividade citotóxica, expresso em  $\text{CC}_{50}$ , em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , dos extratos e frações das folhas e das cascas de *I. laurina* estão apresentados nas Tabelas 24 e 25, respectivamente.

O EE-F e as FAE-F e FB-F foram as amostras mais ativas frente aos microrganismos avaliados, pois apresentaram resultados de CIM menores que 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , como observado na Tabela 24. A FH-F apresentou melhor atividade para *C. glabrata* e a FC-F não apresentou atividade antifúngica dentro do intervalo das concentrações testadas (CIM acima de 3.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

O EE-C e as FAEII-C, FB-C e FM-C foram as amostras com os melhores resultados, pois inibiram os fungos avaliados em concentrações menores que  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 25). A FC-C não apresentou atividade frente aos microrganismos avaliados, pois os valores da CIM são iguais ou superiores a  $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$  e a FAEI-C apresentou inibição apenas para *C. glabrata*, com resultado para CIM de  $23,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Tabela 24: Resultados da atividade antifúngica, expresso como CIM, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e citotóxica, expresso como  $\text{CC}_{50}$ , em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato e frações das folhas de *I. laurina*.

CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )					
Microrganismos	EE-F	FH-F	FC-F	FAE-F	FB-F
<i>C. albicans</i> ATCC 28366	46,8	1500	>3000	93,8	11,7
<i>C. glabrata</i> ATCC 15126	11,7	187,5	>3000	11,7	23,4
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	93,8	3000	>3000	93,8	46,8
IS					
Microrganismos	EE-F	FH-F	FC-F	FAE-F	FB-F
<i>C. albicans</i> ATCC 28366	0,9	- 0,6	> - 0,8	> 0,7	> 1,6
<i>C. glabrata</i> ATCC 15126	1,5	0,3	> - 0,8	> 1,6	> 1,3
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	0,6	- 0,9	> - 0,8	> 0,7	> 1,0
<b>CC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	352±5	384±9	>512	>512	>512
<b>Célula Vero</b>					

Concentrações das amostras testadas:  $1,46 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . IS: índice de seletividade.

Tabela 25: Resultados da atividade antifúngica, expresso como CIM em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e citotóxica, expresso como  $\text{CC}_{50}$ , em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato e frações das cascas de *I. laurina*.

CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )						
Microrganismos	EE-C	FC-C	FAEI-C	FAEII-C	FB-C	FM-C
<i>C. albicans</i> ATCC 28366	46,8	1000	500	23,4	46,8	11,7
<i>C. glabrata</i> ATCC 15126	48,8	>1000	23,4	23,4	46,8	11,7
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	24,4	1000	1000	46,8	46,8	23,4
IS						
Microrganismos	EE-C	FC-C	FAEI-C	FAEII-C	FB-C	FM-C
<i>C. albicans</i> ATCC 28366	0,5	- 0,5	- 0,1	> 1,3	0,5	0,9
<i>C. glabrata</i> ATCC 15126	0,5	> - 0,5	1,2	> 1,3	0,5	0,9
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	0,8	- 0,5	- 0,4	> 1,0	0,5	0,6
<b><math>\text{CC}_{50}</math> (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	152±7	343±22	374±12	>512	163±21	101±21
<b>Célula Vero</b>						

Concentrações das amostras testadas: 0,48  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . IS: índice de seletividade.

Em relação a atividade citotóxica, quanto menor o valor de  $\text{CC}_{50}$  maior é a citotoxicidade em relação as células Vero, pois uma pequena concentração da amostra é necessária para inibir o crescimento de 50% das células. Porém, para relacionar os resultados da atividade antifúngica com a concentração citotóxica, foi calculado o índice de seletividade (IS). O IS indica se a amostra é mais seletiva para a atividade antifúngica ou mais tóxica para as células Vero. Quanto mais positivo o valor do IS maior é a seletividade para inibir o crescimento dos fungos e, um valor negativo indica que a amostra é mais tóxica para as células do que seletiva para inibição do crescimento antimicrobiano (CASE et al., 2006). O EE-F, FAE-F e FB-F foram as amostras mais seletivas aos microrganismos e a FAEII-C foi a amostra mais seletiva, com valores de IS maiores que um.

Outras espécies de *Inga* foram estudadas em relação à atividade antifúngica. O extrato etanólico das folhas de *I. vera*, coletada em Santo Domingo, na República Dominicana apresentou baixa inibição contra *C. albicans*, apresentando zona de



inibição entre 7 e 15 mm de diâmetro, sendo que para uma boa inibição a zona de inibição seria maior que 20 mm (LOZANO et al., 2013). O extrato etanólico das cascas e das sementes de *I. edulis* **apresentou resultado de CIM de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$**  frente a *C. albicans* (BASTOS et al., 2015), valor superior ao encontrado para a cascas de *I. laurina*. O extrato etanólico das folhas de *I. marginata*, coletada em Londrina, no Paraná, não apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans* e *C. krusei*, apenas para *C. tropicalis* com zona de inibição de 0,9 cm pelo método de difusão em placa (DANIEL et al., 2014).

A promissora atividade antifúngica de *I. laurina* pode estar relacionada a presença de compostos fenólicos nas amostras estudadas. Os extratos e frações das folhas e das cascas da planta apresentaram elevada quantidade de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides (especialmente as folhas) e estes compostos são relatados na literatura como potenciais agentes antifúngicos (SANCHES et al., 2005, DAGLIA, 2012, ANSARI et al., 2013, MARTINS et al., 2015, TEODORO et al., 2015).

Como relatado na introdução (subitem 2.5.2, p. 57), os medicamentos utilizados no tratamento de doenças causadas por fungos pertencem principalmente às classes dos azoles, polienos, equinocandinas, fluoropirimidinas e alilalaminas. Esses compostos possuem como alvo para a inibição de fungos a parede celular, a biossíntese do ergosterol, síntese de proteínas, DNA ou RNA e o conjunto de microtubulos presente no interior das células das plantas (ODDS; BROWN; GOW, 2003).

Os polienos, como a anfotericina B, interagem hidrofobicamente com o ergosterol, que é o principal componente da membrana celular dos fungos, responsável pela fluidez da célula. Esta interação altera a permeabilidade e provoca o escape dos componentes citoplasmáticos, causando a morte celular. Os azoles, como o fluconazol e itraconazol inibem a enzima 14- $\alpha$ -desmetilase que participa da conversão do lanosterol ao ergosterol, a qual é uma das etapas da síntese do ergosterol, levando a depleção deste composto. As alilalaninas, como a terbinafina e naftifina, também possuem como alvo a síntese do ergosterol, elas inibem a epoxidação do esqualeno, que é um precursor da síntese do ergosterol, o acúmulo do esqualeno altera a permeabilidade da membrana celular causando sua morte. A 5-fluorocitosina penetra nas células do fungo através da enzima permease e uma vez dentro da célula, este composto é convertido em 5-fluoroacil que se incorpora ao RNA e inibe a síntese do DNA provocando a morte do

microrganismo. E as equinocandinas atuam na inibição da síntese da  $\beta$ -glucana, que é um componente da parede celular dos fungos (GHANNOUM; RICE, 1999, ODDS; BROWN; GOW, 2003, CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006, MYERS, 2006).

Dentre os compostos fenólicos que possuem atividade antifúngica, alguns deles já foram estudados em relação ao seu mecanismo de ação, como os derivados dos ácidos cafeico, quínico e clorogênico que atuam na inibição da síntese da 1,3- $\beta$ -glucana (MA et al., 2010), o eugenol e o metileugenol que atuam na interrupção da síntese do ergosterol (AHMAD et al., 2010), assim como a epigallocatequina-3-galato (NAVARRO-MARTÍNEZ; GARCÍA-CÁNOVAS; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, 2006), timol e carvacrol (AHMAD et al., 2011). A isoquercetina e a curcumina causam danos as células das membranas dos fungos, aumentando sua permeabilidade e provocando o vazamento de componentes celulares (LEE; LEE, 2014, YUN et al., 2015). Logo, estes mecanismos de ação podem explicar a atividade antifúngica dos extratos e frações de *I. laurina*, que possui grande quantidade de compostos fenólicos.

#### 5.10 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

Os resultados da atividade leishmanicida, expressos em  $CI_{50}$ , em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , dos extratos e frações das folhas e das cascas de *I. laurina* estão apresentados na Tabela 26. Os resultados foram obtidos a partir dos gráficos de viabilidade celular. A partir deste gráfico foi calculado a concentração inibitória do crescimento de 50% dos protozoários ( $CI_{50}$ ).

As amostras de *I. laurina* apresentaram resultados de  $CI_{50}$  maiores que  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sugerindo que as amostras não foram ativas para o protozoário avaliado, nas concentrações testadas. Portanto, a planta possui pequena atividade leishmanicida frente ao protozoário *Leishmania amazonensis*.

Tabela 26: Resultados da atividade leishmanicida, expresso como  $CI_{50}$ , em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato e frações das folhas e cascas de *I. laurina*.

Folhas						
Microrganismo	EE-F	FH-F	FC-F	FAE-F	FB-F	
<i>Leishmania amazonensis</i>	297 ± 35	> 512	111 ± 25	> 512	> 512	
Cascas						
	EE-C	FC-C	FAEI-C	FAEII-C	FB-C	FM-C
<i>Leishmania amazonensis</i>	217±34	> 512	> 512	> 512	303±30	290±38
Anfotericina B	0,29 ± 0,01					

Nota: anfotericina B: controle positivo.

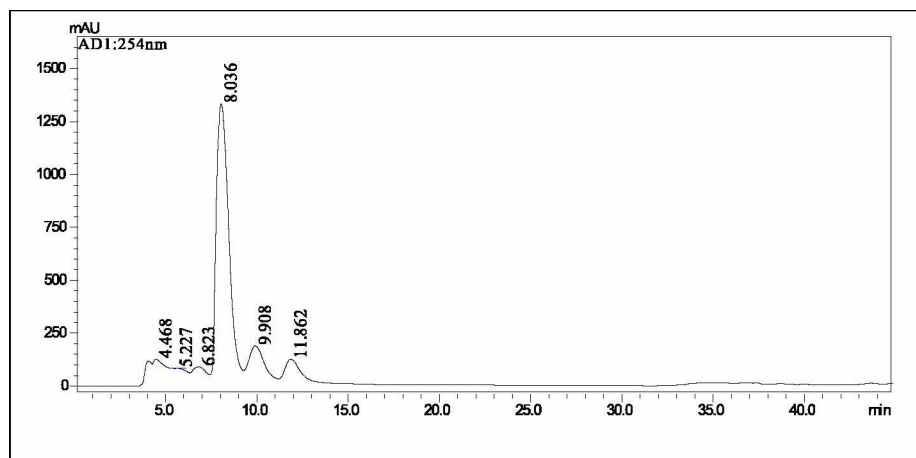
Foram encontrados poucos trabalhos na literatura sobre atividade antiprotozoária de espécies de *Inga*. O extrato aquoso das cascas de *I. alba* apresentou baixa atividade leishmanicida frente aos protozoários *L. guyanensis*, *L. major* e *L. donovani* com resultados de  $CI_{50}$  de 435, 298 e 205  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (MANS et al., 2016). Na comunidade nativa Asháninka, localizada no Peru, as cascas da planta *Inga* sp. são utilizadas pela população local no tratamento de leishmanioses (LUZIATELLI et al., 2010). Em um recente trabalho publicado sobre plantas medicinais utilizadas no tratamento de leishmanioses na região Amazônica, foi verificado que de 83 famílias de plantas avaliadas no estudo, a família Fabaceae foi a que apresentou a maior quantidade de espécies citadas e de 201 gêneros citados, o *Inga* possuiu o maior número de citações, sendo a espécie *I. alba* a que apresentou maior citação (ODONNE et al., 2017).

#### 5.11 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DAS FOLHAS

A partir dos resultados obtidos nas análises descritas anteriormente (atividade antioxidante e atividade antifúngica), as FAE-F e FB-F foram as que apresentaram os melhores resultados nos ensaios das atividades biológicas, logo, estas duas amostras são as mais promissoras para a identificação e isolamento de substâncias bioativas. Através da triagem fitoquímica (Tabela 8, p.88) e análise do perfil dos espectros UV-VIS

(Figura 26, p.92) destas amostras, foi possível verificar que elas possuem metabólitos diferentes, especialmente em relação a composição de flavonoides. A FAE-F foi a escolhida para o isolamento de compostos porque foi a amostra com o maior teor de flavonoides e fenóis totais em relação a FB-F. O cromatograma da FAE-F também indicou a presença de poucos sinais (Figura 39) contribuindo para a escolha desta fração para o isolamento de compostos.

Figura 39: Cromatograma por CLAE da FAE-F de *I. laurina*.



Condições cromatográficas: método isocrático 50 % de MeOH (B)/H<sub>2</sub>O (A) em 25 min, fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. Fonte: autora.

A FAE-F foi submetida ao fracionamento cromatográfico com Sephadex LH-20 (subitem 4.16, p.80) e as frações obtidas foram agrupadas em 08 frações de acordo com o perfil cromatográfico analisado por CCD (FAE1-F a FAE8-F). A porcentagem de atividade antioxidante dessas frações foi avaliada pelo método do radical DPPH utilizando a equação 1 (subitem 4.10.1, p.71), os resultados estão apresentados na Tabela 27, as FAE-2-F a FAE-8-F foram as amostras com maior porcentagem de atividade antioxidante. A fração FAE4-F, após análise por CCD, mostrou a presença de uma única mancha, indicando ser um composto isolado, que posteriormente foi identificado por espectrometria de massa de alta resolução e RMN. No apêndice A está apresentado o fluxograma de purificação, identificação e isolamento de compostos da FAE-F.

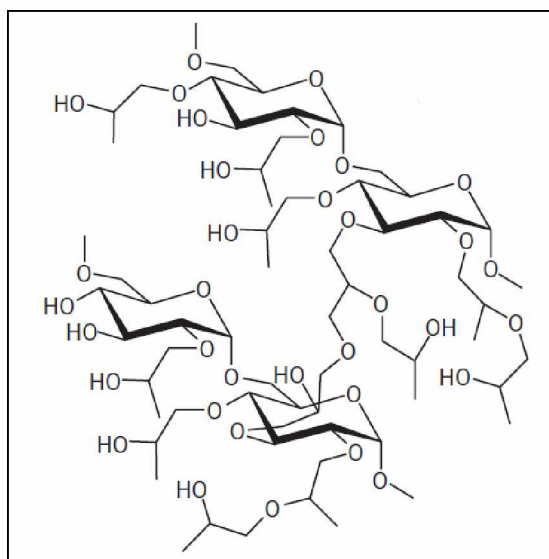
Tabela 27: Porcentagem da atividade antioxidante das frações da coluna da FAE-F de *I. laurina*.

Frações	FAE1	FAE2	FAE3	FAE4	FAE5	FAE6	FAE7	FAE8
% AA	2,8	83,0	91,3	90,0	90,1	89,7	84,9	85,1

Concentração das frações testadas: 100 µg mL<sup>-1</sup>.

A Sephadex LH-20 (Figura 40) é um gel de dextrana empregada como fase estacionária na cromatografia em coluna para o isolamento de compostos de acordo com seu tamanho molecular, porém, de acordo com o solvente utilizado no fracionamento o mecanismo de separação pode ocorrer por adsorção ou partição entre a matriz e o eluente (HEALTHCARE, 1995, BIOSCIENCES, 2002, ÇITOGLU; ACIKARA, 2012), especialmente se os compostos a serem separados tiveram massa molecular inferior a 1.000 g mol<sup>-1</sup> (MADLAND, 2013). O eluente utilizado no fracionamento pode ser água, solventes orgânicos ou misturas dos eluentes em diferentes proporções. O limite de separação da Sephadex LH-20 é 4.000 g mol<sup>-1</sup>, compostos com massas moleculares maiores que 4.000 g mol<sup>-1</sup> não conseguem passar pelos espaços da matriz e consequentemente não podem ser separados (MADLAND, 2013).

Figura 40: Estrutura da Sephadex LH-20.



Fonte: Biosciences (2002).

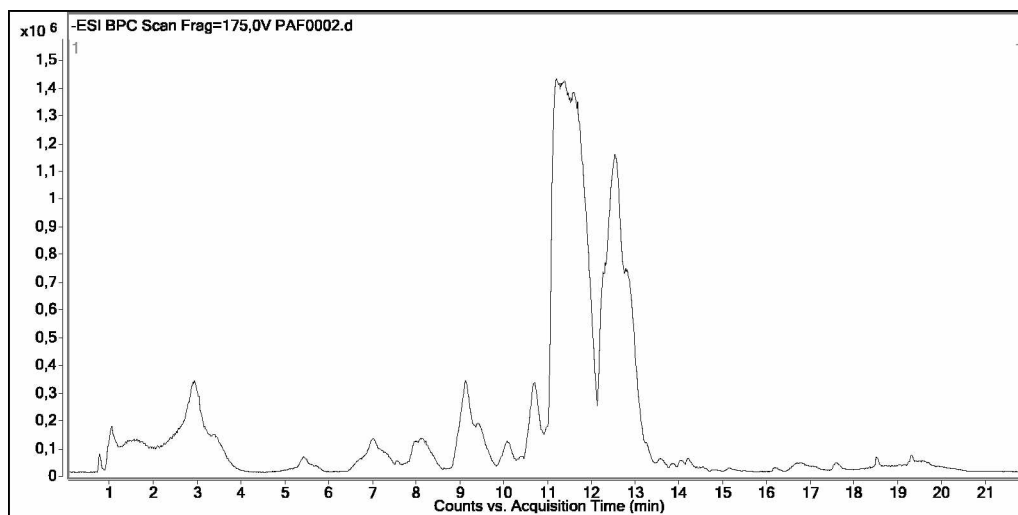
Este gel, obtido a partir da hidroxipropilação da Sephadex G-25, possui propriedades hidrofílicas (H) e lipofílicas (L), as quais conferem a esta matriz a capacidade de inchar em solventes de diferentes polaridades, desde os menos polares até os de maior polaridade, como a água. O grau do inchamento assim como o limite de exclusão depende da polaridade da fase móvel (HEALTHCARE, 1995, MADLAND, 2013).

Vários trabalhos na literatura utilizaram a Sephadex LH-20 no fracionamento em coluna para separação de compostos, especialmente de flavonoides (JOHNSTON; STERN; WAISS JR, 1968, ÇITOGLU; ACIKARA, 2012). Em um estudo realizado com oito espécies de *Salvia* L., para identificação de flavonoides, os autores utilizaram a Sephadex-LH20 como fase estacionária para purificação dos flavonoides e utilizaram um sistema de gradiente de solventes, começando com uma solução a 20% de MeOH, sendo a concentração de MeOH aumentada gradativamente até 100% (KHARAZIAN, 2014). Singh e outros (2009) isolaram diferentes flavonoides da fração acetato de etila da amora e utilizaram como eluente a água e metanol, eles iniciaram a coluna empacotada em Sephadex-LH20 com água e a concentração de metanol foi aumentada gradativamente até 100% MeOH.

#### 5.12 IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *I. laurina*

A FAE-F de *I. laurina* apresentou bons resultados para a atividade antioxidante e antifúngica, logo, esta fração foi submetida a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrômetro de massas de alta resolução (CLAE/EM) com ionização por eletrospray (IES) no modo negativo e análise por espectrometria de massa sequencial (EM/EM), o cromatograma está apresentado na Figura 41. Foi possível identificar 13 compostos (Tabela 28) nesta fração a partir dos espectros de EM/EM (Figuras 42-53) e por comparação com dados da literatura.

Figura 41: Cromatograma CLAE/EM da FAE-F.



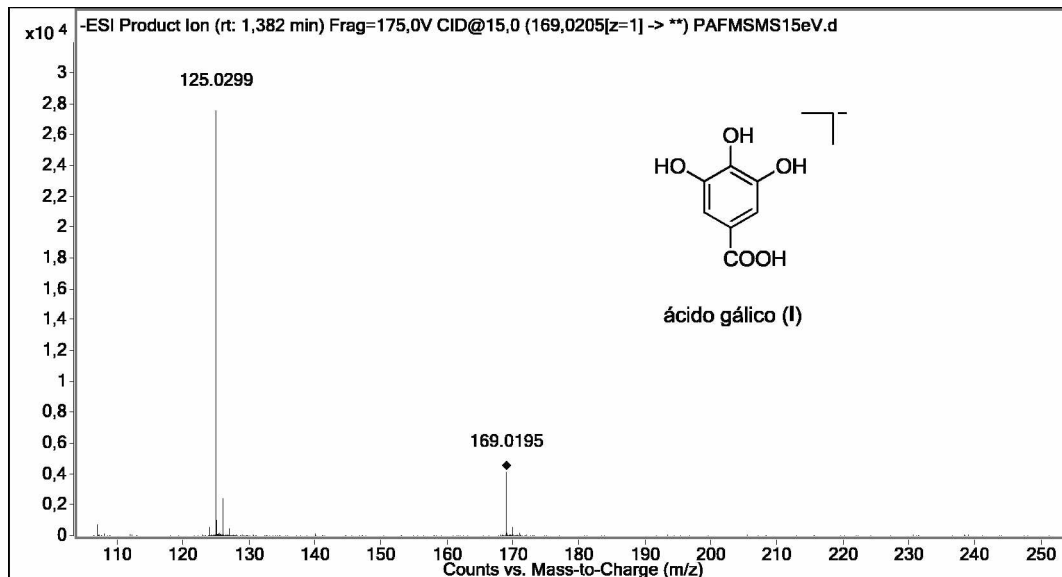
Condições cromatográficas: fase móvel: água acidificada com ácido fórmico ( $0,1\% \text{ v v}^{-1}$ ) (A) e metanol (B), sistema gradiente de solventes: 2% de B (0 min), 98% de B (0-15 min); 100% de B (15-17 min); 2% B (17-18 min) e 2% B (18-22 min). Fonte: autora.

Tabela 28: Compostos identificados na FAE-F por CLAE/EM-EM/EM.

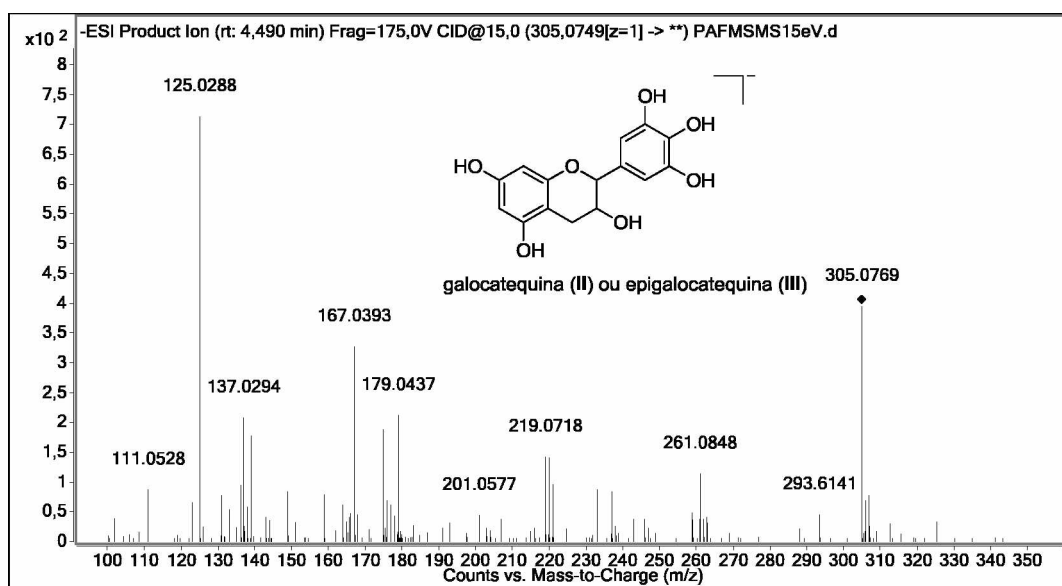
<b>t<sub>R</sub>(min)</b>	<b>[M – H]<sup>–</sup></b>	<b>Massa exata</b>	<b>Erro (ppm)</b>	<b>Fragmentos m/z</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>Composto</b>	<b>Referências</b>
2,9	169,0158	169,0142	-9,5	125	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	ácido gálico (I)	(ABDEL-HAMEED; BAZAID; SALMAN, 2013, FRACASSETTI et al., 2013)
5,4	305,0663	305,0667	1,3	261, 219, 167/165, 125	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	galocatequina (II) ou epigalocatequina (III)	(SUN et al., 2007, MENA et al., 2012)
5,0	311,1199			223, 139		n.i	
6,9	183,0300	183,0299	-0,5	168, 124	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	derivado metílico do ácido gálico (IV)	(ABDEL-HAMEED; BAZAID; SALMAN, 2013)
6,9	285,0724			203, 152/151, 108		n.i	
8,1	453,1048			313, 169		n.i	
9,1	197,0468	197,0455	-6,6	169, 124/123	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	galato de etila (V)	(SUN et al., 2007, WYREPKOWSKI et al., 2014)
10,1	631,0956	631,0941	-2,4	479, 316, 169	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>17</sub>	miricetina- <i>O</i> -( <i>O</i> -galoil)-hexosídeo (VI)	(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013, TAAMALLI et al., 2014)
10,7	479,0826	479,0831	1,0	316, 178	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>13</sub>	miricetina-3- <i>O</i> -galactosídeo (VII)	(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013, TAAMALLI et al., 2014)
11,1	463,0904	463,0888	-3,5	316, 178	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	miricetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (VIII)	(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013)
12,2	615,1007	615,0992	-2,4	463, 316/317, 178	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>16</sub>	miricetina galoil ramnosídeo (IX)	(RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2013, TAAMALLI et al., 2014)
12,4	317,0326	317,0303	-7,3	178, 151	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	miricetina (X)	(SUN et al., 2007, FRACASSETTI et al., 2013, ABU-REIDAH et al., 2015)
12,7	447,0955	447,0933	-4,9	300/301	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (XI)	(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013, TAAMALLI et al., 2014)
13,3	767,1120			615, 449, 317, 169		n.i	
13,5	599,1044	599,1042	-0,3	447, 301, 169, 151	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>15</sub>	quercetina-3- <i>O</i> -(2''-galoil)-ramnosídeo (XII)	(ESTRADA et al., 2005, KIM et al., 2013)
13,8	301,0357	301,0354	-1,0	178/179, 151	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	quercetina (XIII)	(SUN et al., 2007)
14,1	461,0717			357, 316, 179		n.i	
14,1	583,1085			316		n.i	
14,2	613,1187			461, 316		n.i	

Nota: t<sub>R</sub> = tempo de retenção; n.i = não identificado. Fonte: autora.



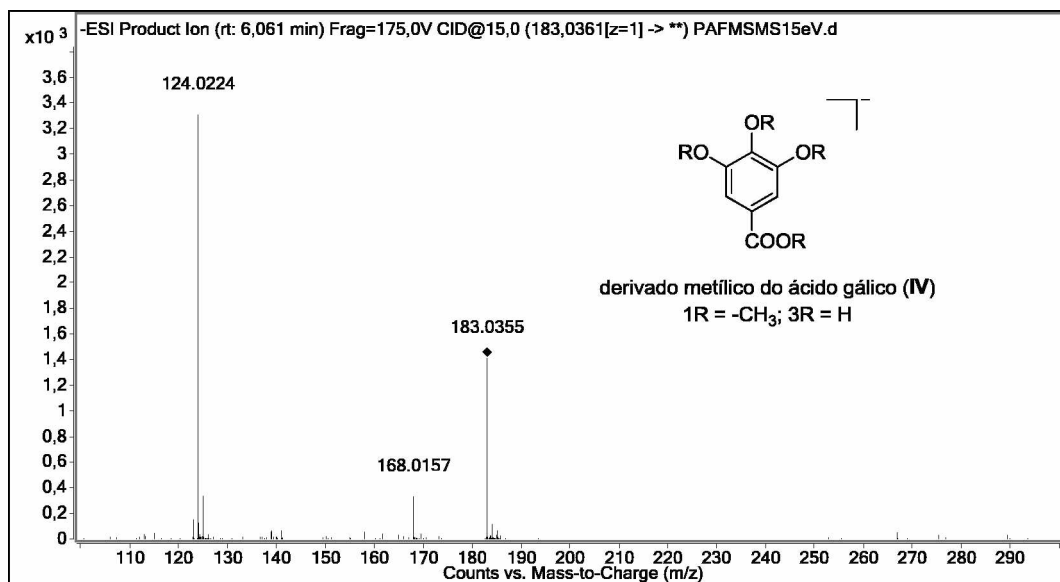
Figura 42: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  169.

Fonte: autora.

Figura 43: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  305.

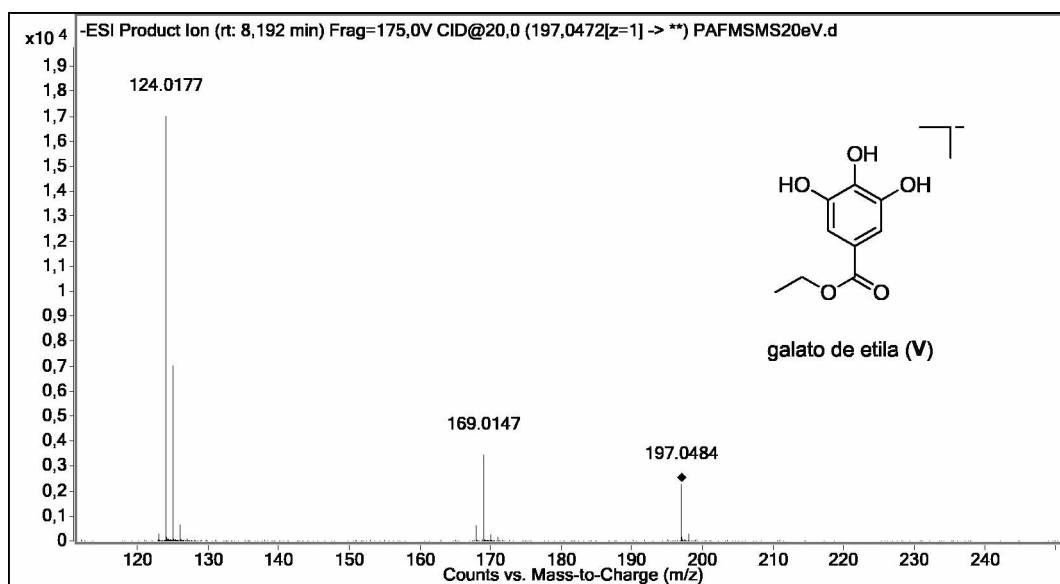
Fonte: autora.

Figura 44: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  183.

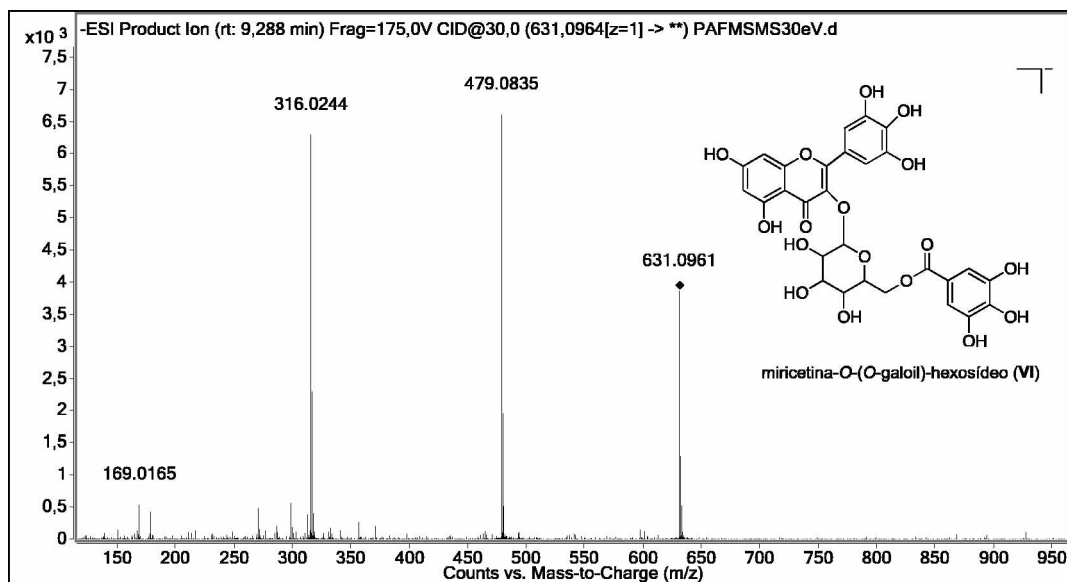


Fonte: autora.

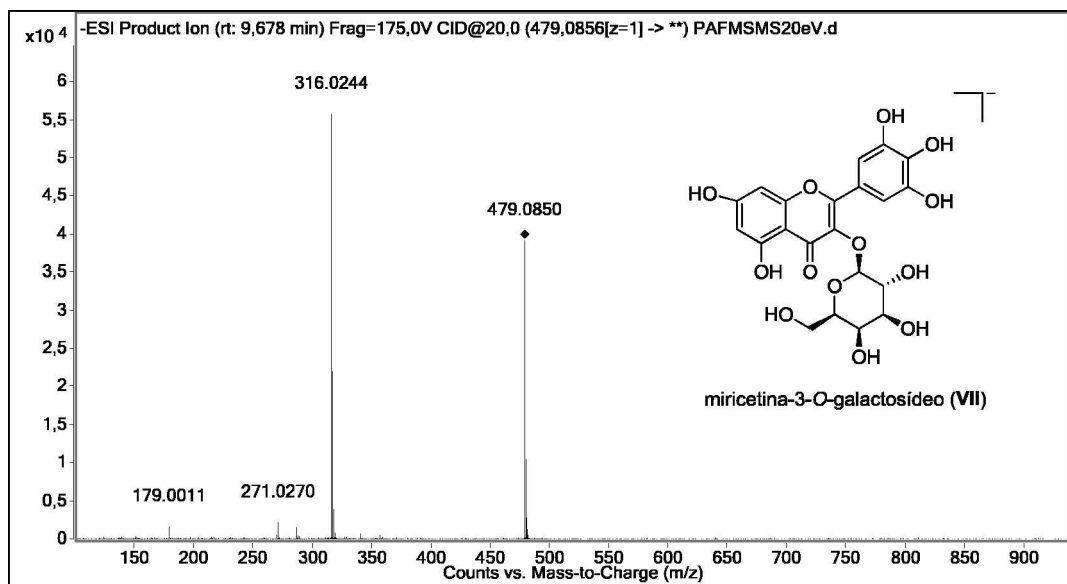
Figura 45: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  197.



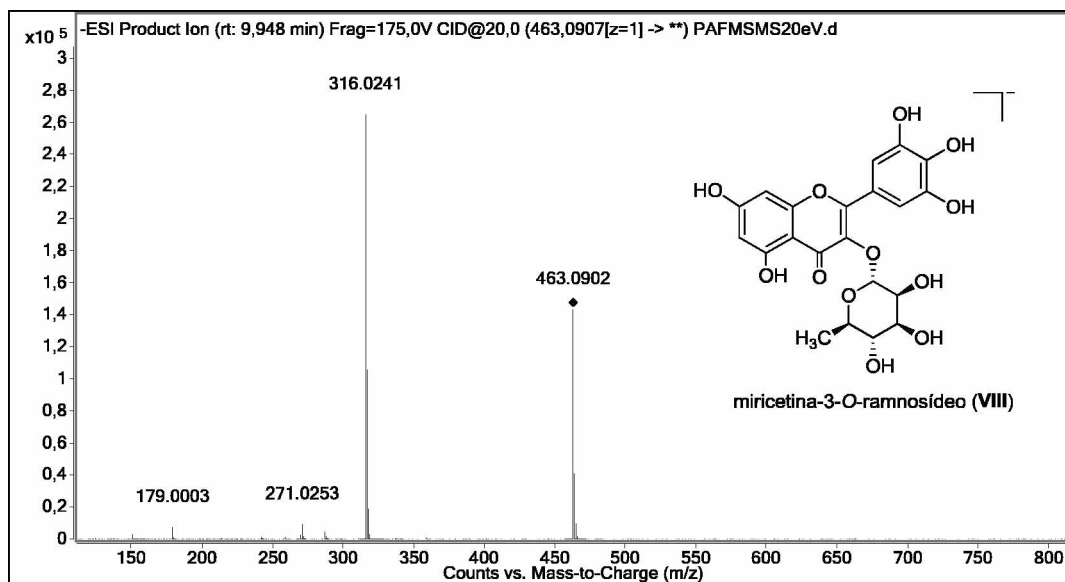
Fonte: autora.

Figura 46: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  631.

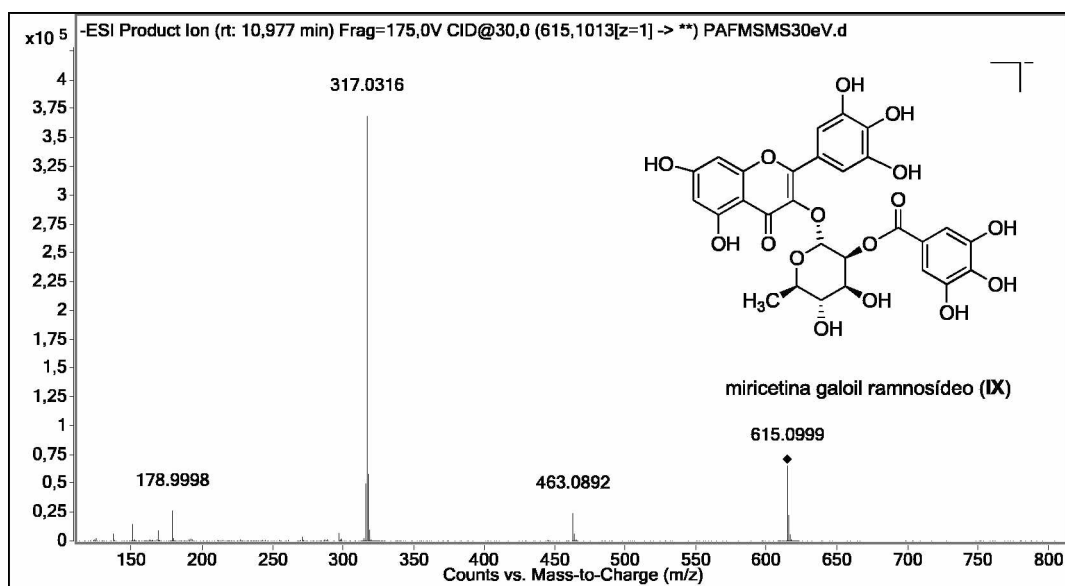
Fonte: autora.

Figura 47: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  479.

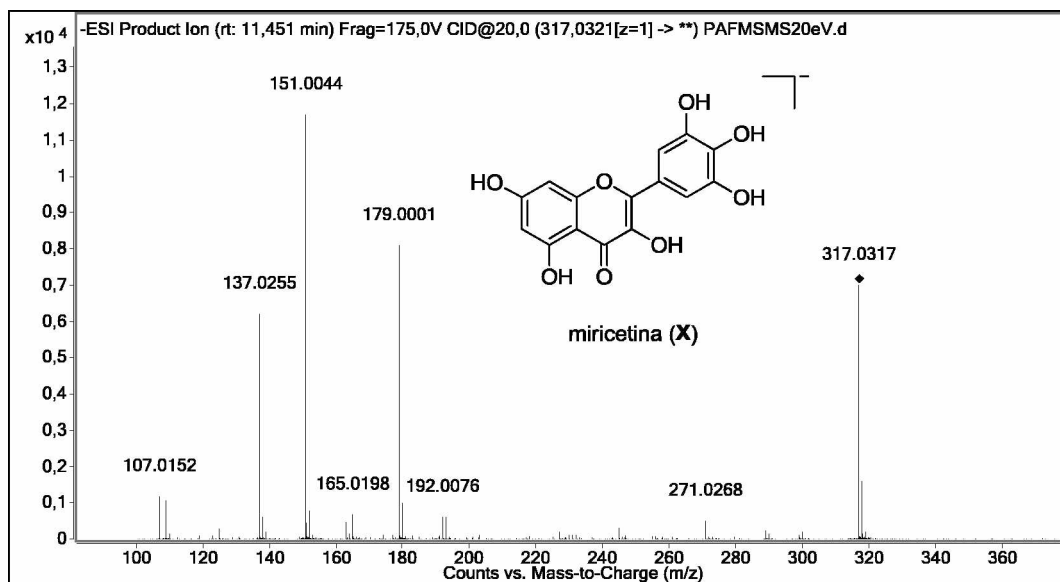
Fonte: autora.

Figura 48: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  463.

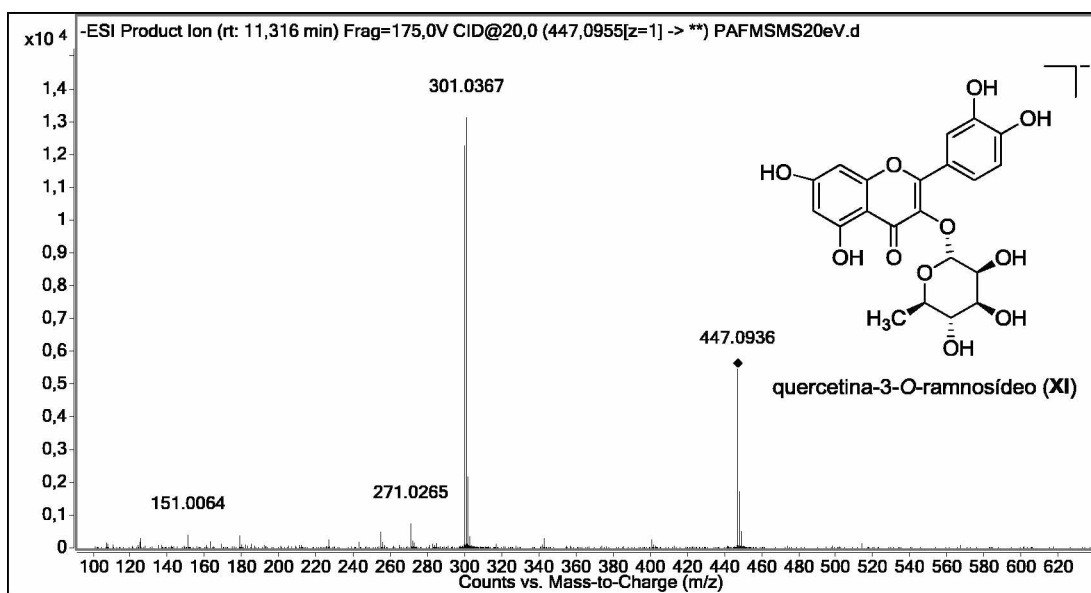
Fonte: autora.

Figura 49: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  615.

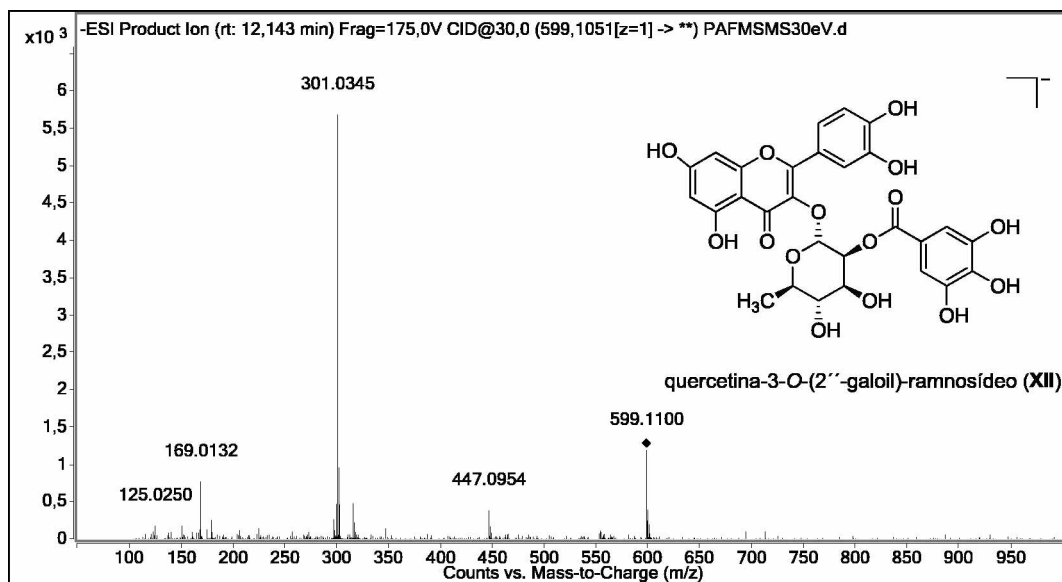
Fonte: autora.

Figura 50: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  317.

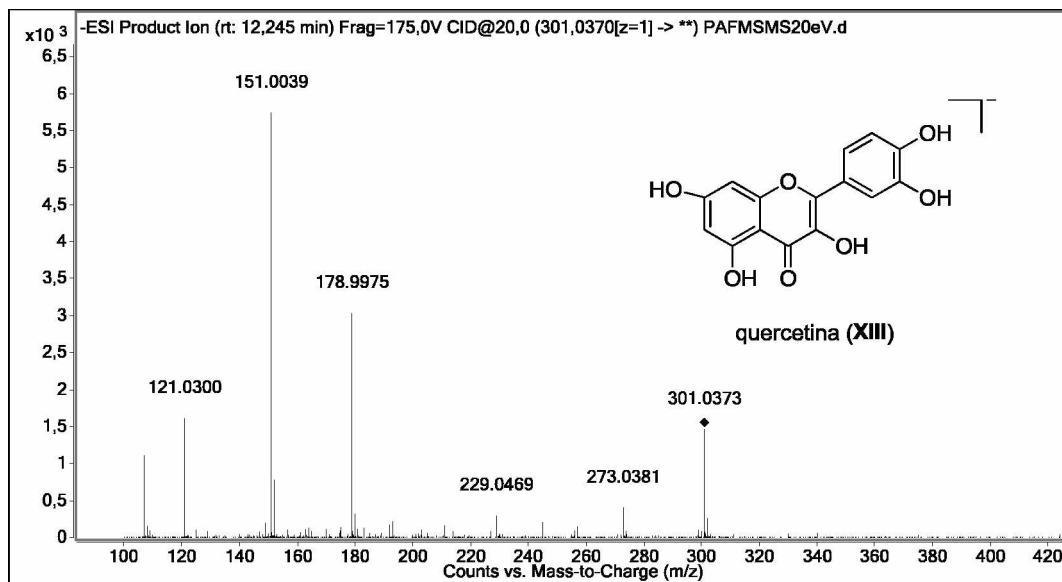
Fonte: autora.

Figura 51: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  447.

Fonte: autora.

Figura 52: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  599.

Fonte: autora.

Figura 53: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  301.

Fonte: autora.

Os principais mecanismos de fragmentação propostos neste trabalho, estão apresentados nas Figuras 54-56 e foram baseados nos mecanismos de fragmentação para proantocianidinas e flavonoides, sendo retro-Diels-Alder (RDA), quinona metídeo (QM) e clivagem heterolítica de anel (CHA) (GU et al., 2003, RODRIGUES et al., 2007, SILVA;

CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009, DEMARQUE et al., 2016, MAGRINI, 2016). Além disso, as propostas de fragmentação para os compostos foram baseadas nas referências citadas na Tabela 28.

O íon  $m/z$  169 (composto **I**) foi identificado como o ácido gálico, a principal fragmentação deste íon é a perda de 44 Da  $[M - CO_2 - H]^-$  que forma o íon  $m/z$  125 (Figura 54). O íon  $m/z$  305 (galocatequina (**II**) ou epigalocatequina (**III**)) foi atribuído como (epi)galocatequina, uma vez que para a determinação da estrutura correta é necessário a realização da RMN para confirmar a estereoquímica do composto e sua separação só é viabilizada via coluna quirais. Através da análise por EM não é possível atribuir a estrutura precisa desse íon. A formação dos íons  $m/z$  137  $[M-168-H]^-$  e  $m/z$  167  $[M-138-H]^-$  ocorre através do mecanismo RDA no anel C, originando os dois fragmentos. A partir da eliminação de um hidrogênio e clivagem dos anéis B e C ocorre a formação dos íons  $m/z$  179, perda de 126 Da, e  $m/z$  125, perda de 180 Da. O íon  $m/z$  261 é formado através do mecanismo QM, que após a perda de 44 Da  $[M - CH_2=CH-OH - H]^-$  origina o respectivo íon (Figura 54).

O íon  $m/z$  183 (composto **IV**) foi identificado como um derivado metílico do ácido gálico, a perda de 15 Da  $[M - CH_3 - H]^-$  através de uma clivagem homolítica origina o íon  $m/z$  168, que em seguida perde 44 Da  $[M - CH_3 - CO_2 - H]^-$  para formar o íon  $m/z$  124. A proposta de fragmentação para o íon  $m/z$  197 (composto **V**, galato de etila) é a perda de eteno,  $CH_2=CH_2$ ,  $[M - 28 - H]^-$  que origina o íon  $m/z$  169, em seguida ocorre a perda de  $CO_2$  originando o íon  $m/z$  125 (Figura 54). Os compostos **IV** e **V** podem ser considerados artefatos formados durante o processo de extração líquido-líquido do extrato etanólico com o solvente acetato de etila, em que ocorreu acetilação do ácido gálico (**I**).

As principais fragmentações do íon  $m/z$  631 (composto **VI** - miricetina-*O*-(*O*-galoil)-hexosídeo) são a perda de fragmentos de massa 152 Da que origina o íon  $m/z$  479 e a perda de mais 163 Da para formar o íon  $m/z$  316. A primeira etapa do mecanismo (Figura 55) é a perda do grupamento galoil através do mecanismo quinona metídeo que forma o íon  $m/z$  479  $[M-152-H]^-$ , em seguida ocorre uma clivagem homolítica da ligação entre o carbono anomérico C1'' da hexose e o oxigênio da aglicona resultando na perda do glicosídeo e formação do íon  $m/z$  316  $[M-315-H]^-$ .

O íon  $m/z$  479 (composto **VII** - miricetina-3-*O*-galactopiranosídeo) possui como principal fragmentação a perda de fragmento de massa 163 Da que origina o íon  $m/z$  316.

A formação do íon  $m/z$  316  $[M-163-H]^-$  ocorre através da clivagem homolítica da ligação entre o carbono anomérico C1'' e o oxigênio da aglicona (Figura 55).

O íon  $m/z$  463 (composto **VIII** – miricetina-3-*O*-ramnosídeo) foi isolado da FAE-F. As análises da EM/EM serão discutidas no próximo subitem (5.13) junto com as análises de RMN.

Foram encontrados dois possíveis isômeros para o íon  $m/z$  615 (composto **IX** - miricetina-galoil-ramnosídeo), a miricetina-3-*O*-(2''-*O*-galoil)-ramnosídeo e a miricetina-3-*O*-(3''-*O*-galoil)-ramnosídeo (LEE et al., 2000), porém, apenas com a análise da espectrometria de massa não pode-se afirmar qual dos isômeros está presente na FAE-F. Para mostrar o mecanismo de fragmentação o grupo galoil foi ligado no oxigênio do carbono C2'', porém, a posição desse grupo não interfere no mecanismo de fragmentação (Figura 55). A primeira etapa do mecanismo é a perda do grupamento galoil através do mecanismo quinona metídeo que forma o íon  $m/z$  463  $[M-152-H]^-$ , em seguida ocorre uma clivagem heterolítica da ligação entre o carbono C1'' da ramnose e o oxigênio da aglicona resultando na perda da ramnose e formação do íon  $m/z$  317  $[M-298-H]^-$ . O íon  $m/z$  317 está em equilíbrio ceto-enólico, em que através do mecanismo de formação quinona metídeo no anel B ocorre a formação do íon  $m/z$  179  $[M-436-H]^-$ .

O íon  $m/z$  317 (composto **X**) foi identificado como a miricetina. A formação dos íons  $m/z$  151  $[M-166-H]^-$  e  $m/z$  165  $[M-152-H]^-$  ocorre através do mecanismo RDA no anel C, originando os dois fragmentos. A miricetina existe em equilíbrio com a forma ceto, no equilíbrio ceto-enólico, logo, a partir do mecanismo QM no anel B da forma ceto, ocorre a formação de dois fragmentos que originam os íons  $m/z$  179  $[M-138-H]^-$  e  $m/z$  137  $[M-180-H]^-$  (Figura 56). Esta proposta de fragmentação se assemelha com as fragmentações encontradas para a quercetagenina ( $m/z$  317) (PAREJO et al., 2004) que difere da miricetina na posição de uma hidroxila, na quercetagenina há três hidroxilas no anel A e duas hidroxilas no anel B.

A principal fragmentação do íon  $m/z$  447 (composto **XI**- quercetina-3-*O*-ramnosídeo) é a perda da ramnose por clivagem homolítica ou heterolítica da ligação entre o carbono anomérico C1'' e o oxigênio da aglicona, originando o íon em  $m/z$  300  $[M-147-H]^-$  e 301  $[M-146-H]^-$ , respectivamente (Figura 56).

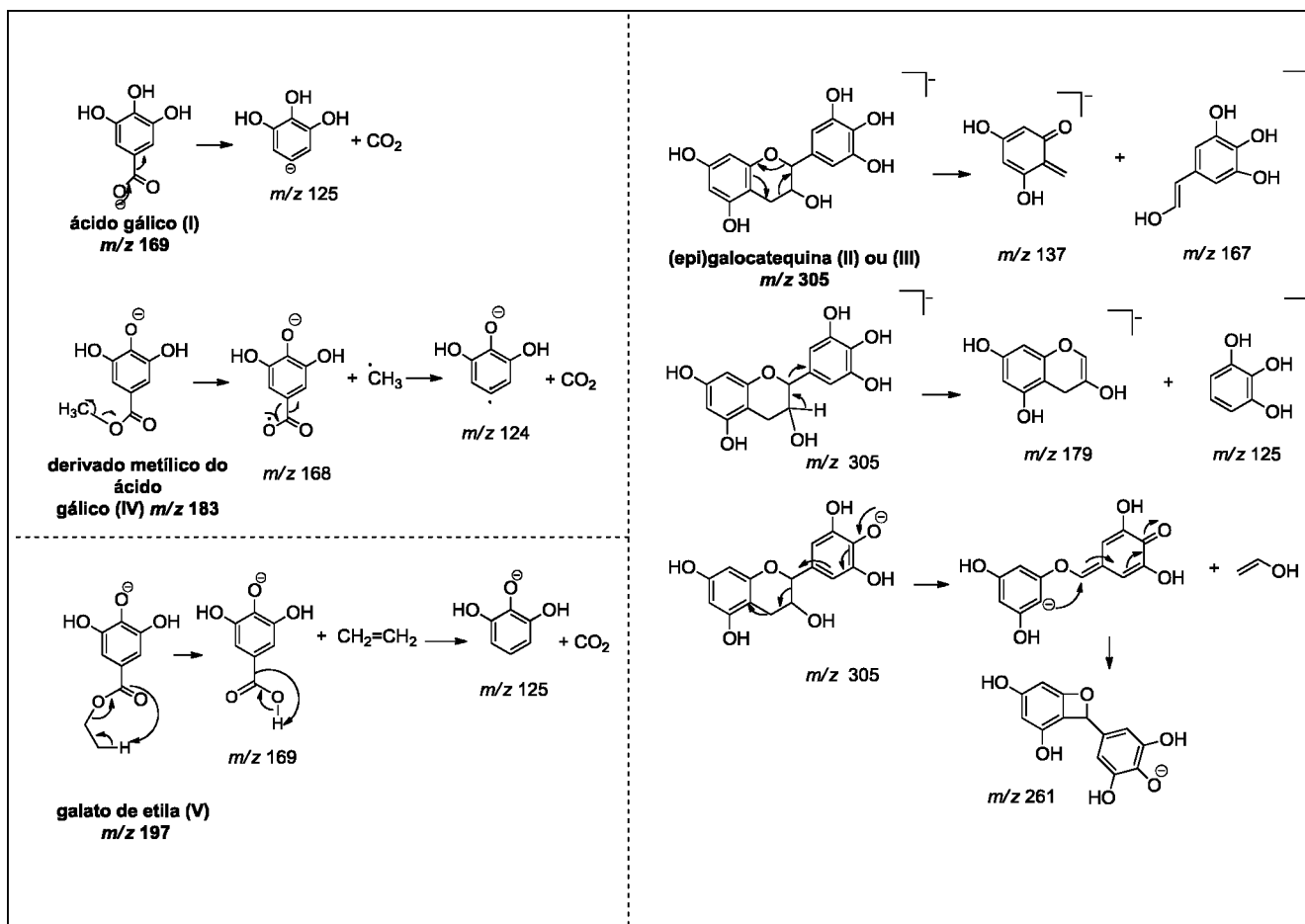
O íon  $m/z$  599 foi identificado como sendo a quercetina-3-*O*-(2''-galoil)-ramnosídeo (composto **XII**). A proposta de fragmentação deste íon se assemelha ao mecanismo proposto para miricetina galoil ramnosídeo (composto **XIX**). A primeira etapa



do mecanismo é a perda do grupamento galoil através do mecanismo quinona metídeo originando o íon  $m/z$  447  $[M-152-H]^-$ , em seguida ocorre uma clivagem heterolítica da ligação entre o carbono C1'' da ramnose e o oxigênio da aglicona resultando na perda da ramnose e formação do íon  $m/z$  301  $[M-146-H]^-$  (Figura 56).

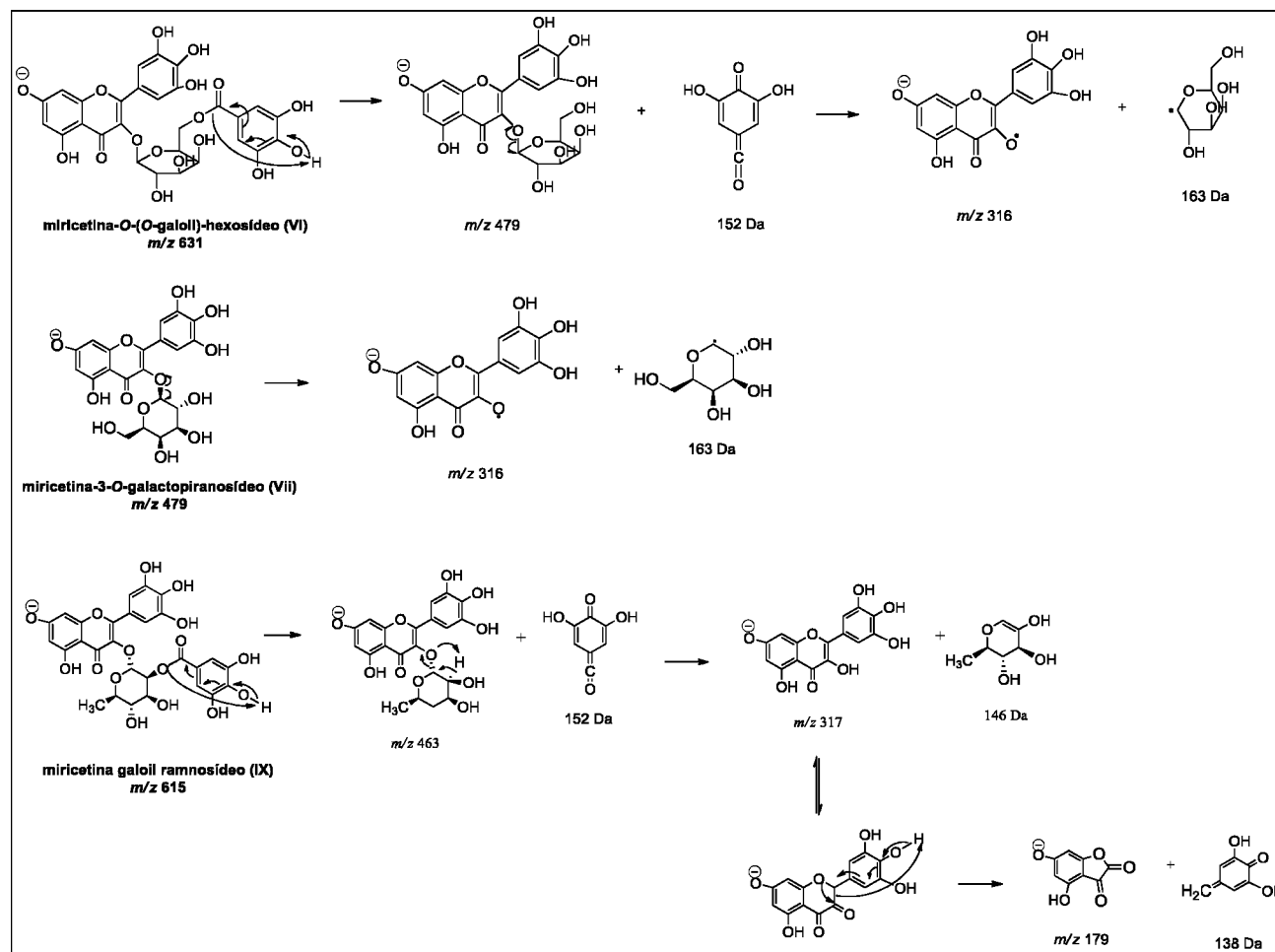
Por último, o íon  $m/z$  301 (composto **XIII**) foi identificado como a quercetina, o mecanismo de fragmentação proposto foi semelhante ao da miricetina (composto **X**), cuja estrutura se assemelha ao da quercetina, a diferença é que a miricetina possui uma hidroxila a mais no carbono C-5'' do anel B do flavonoide. Através do mecanismo RDA no anel C ocorre a formação dos íons  $m/z$  151  $[M-150-H]^-$  e  $m/z$  149  $[M-152-H]^-$ , e a partir do mecanismo QM no anel B ocorre a formação dos íons  $m/z$  179  $[M-122-H]^-$  e  $m/z$  121  $[M-180-H]^-$  (Figura 56).

Figura 54: Mecanismos de fragmentações dos compostos identificados na FAE-F (I-V).



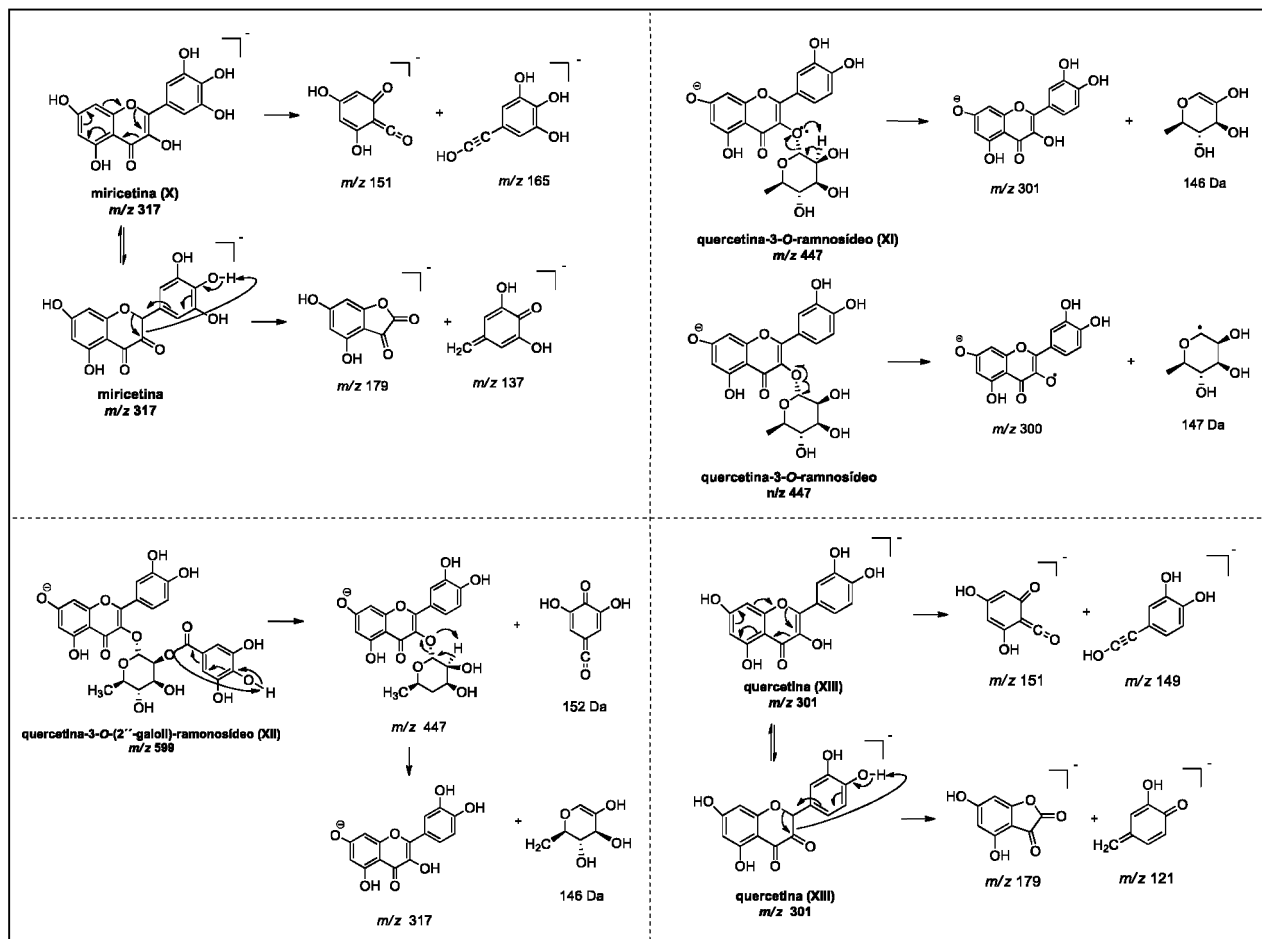
Fonte: autora.

Figura 55: Mecanismos de fragmentações dos compostos identificados na FAE-F (VI-IX).



Fonte: autora.

Figura 56: Mecanismos de fragmentações dos compostos identificados na FAE-F (X-XIII).

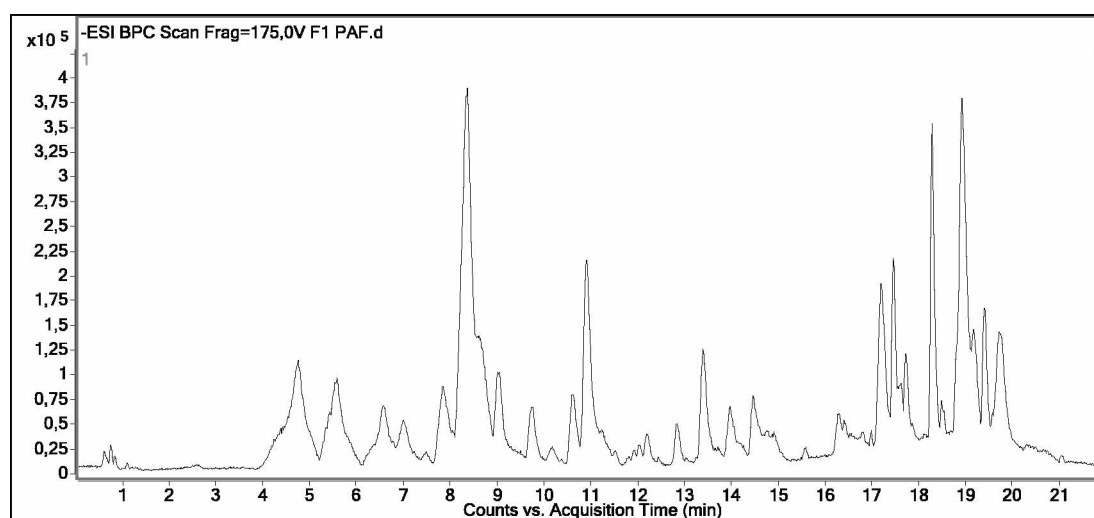


Fonte: autora.

As frações FAE1-F até FAE-8-F também foram analisadas por espectrometria massas (CLAE/EM-EM/EM), da FAE4-F foi isolado um flavonoide, logo esta fração será analisada no subitem 5.13.

Na Figura 57 está apresentado o cromatograma da FAE1-F e na Tabela 29 os compostos identificados nesta fração. Foram identificados dois compostos na FAE1-F a partir da comparação com dados da literatura, que estão presentes na FAE-F (Tabela 28, p. 131) que foram o derivado metílico do ácido gálico (**IV**) e galato de etila (**V**).

Figura 57: Cromatograma CLAE/EM da FAE1-F.



Condições cromatográficas: fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1%, v v<sup>-1</sup>) (A) e metanol (B), sistema gradiente de solventes: 2% de B (0 min), 98% de B (0-15 min); 100% de B (15-17 min); 2% B (17-18 min) e 2% B (18-22 min). Fonte: autora.

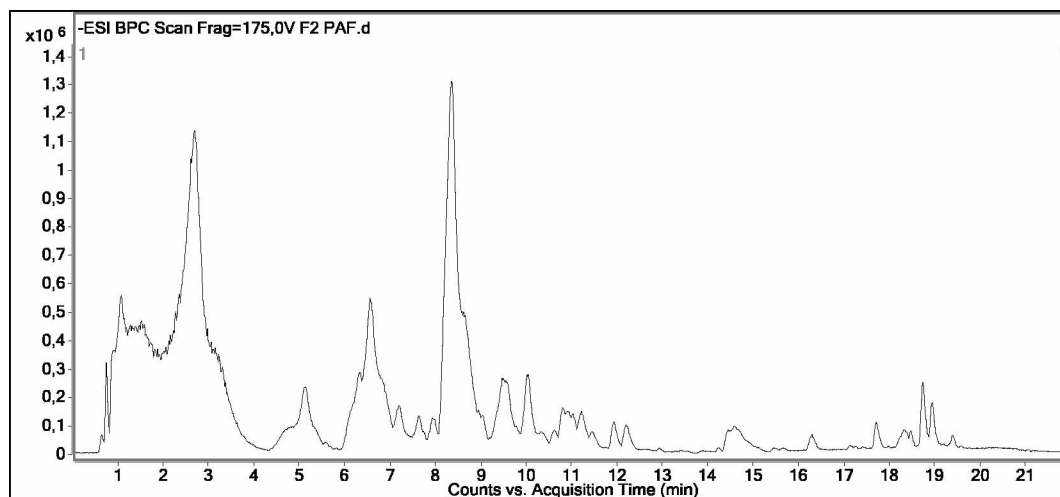
Tabela 29: Compostos identificados na FAE1-F.

$t_{R(\min)}$	$[M - H]^-$	Massa exata	Erro (ppm)	Fragmentos $m/z$	Fórmula molecular	Composto	Referências
4,8	161,0451			143		n.i	
4,8	345,0795			275, 203, 161		n.i	
5,6	161,0818			117		n.i	
6,5	138,0559			123, 111		n.i	
6,5	183,0297	183,0299	1,1	168, 124	$C_8H_8O_5$	Derivado metílico do ácido gálico (IV)	(ABDEL-HAMEED; BAZAID; SALMAN, 2013)
7,9	175,0975			131, 113		n.i	
8,3	197,0456	197,0455	- 0,5	169, 124/123	$C_9H_{10}O_5$	Galato de etila (V)	(SUN et al., 2007, WYREPKOWSKI et al., 2014)
9,0	151,0399			136, 107		n.i	
9,0	241,1444			197, 139		n.i	
9,8	186,0771			154, 126		n.i	
9,8	237,1132			195, 137, 121		n.i	
10,6	299,1497			269, 213, 185, 155		n.i	
10,9	187,0976			149, 125		n.i	
12,8	651,2278			383		n.i	
13,9	327,2174			211, 171		n.i	
14,5	329,2336			211		n.i	
17,2	293, 2126			249, 183, 113		n.i	

Fonte: autora.

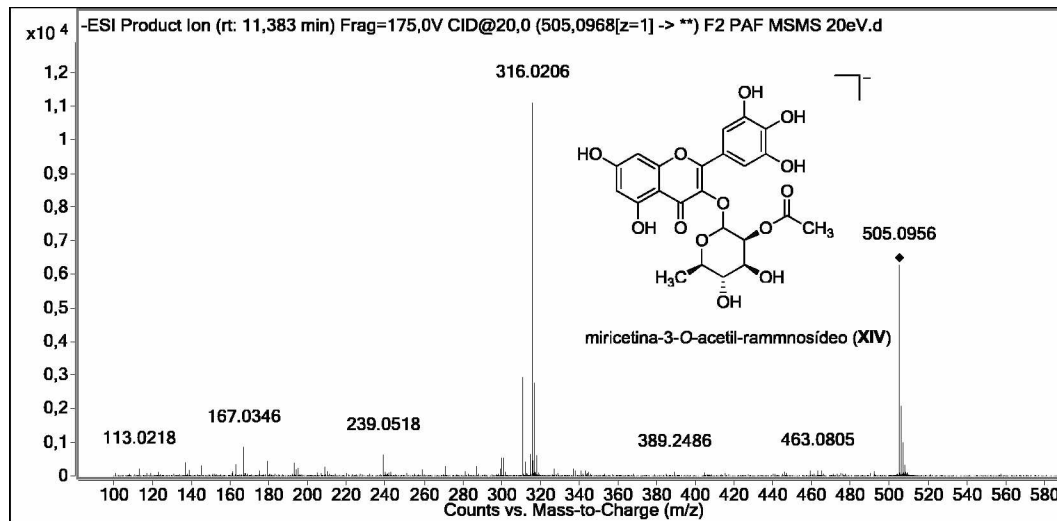
Na Figura 58 está apresentado o cromatograma da FAE2-F e na Tabela 30 os compostos identificados nesta fração.

Figura 58: Cromatograma CLAE/EM da FAE2-F



Condições cromatográficas: fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1%, v v<sup>-1</sup>) (A) e metanol (B), sistema gradiente de solventes: 2% de B (0 min), 98% de B (0-15 min); 100% de B (15-17 min); 2% B (17-18 min) e 2% B (18-22 min). Fonte: autora.

Foram identificados sete compostos na FAE2-F a partir da comparação com dados da literatura. Os compostos **I**, **IV**, **V**, **VIII**, **X** e **XIII** foram identificados na FAE-F e o composto **XIV** foi identificado apenas na FAE2-F. O composto **XIV** ( $m/z$  505 – Figura 59) foi identificado como a miricetina-3-*O*-acetil-rammnosídeo, a formação do íon  $m/z$  463 ocorre através da perda de 42 Da  $[M - CH_2=C=O - H]^+$ , em seguida ocorre uma clivagem homolítica entre o oxigênio da aglicona e o carbono C1'' que origina o íon  $m/z$  316 ocorrendo a perda de 147 Da referente a ramnose (Figura 69).

Figura 59: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  505.

Fonte: autora.



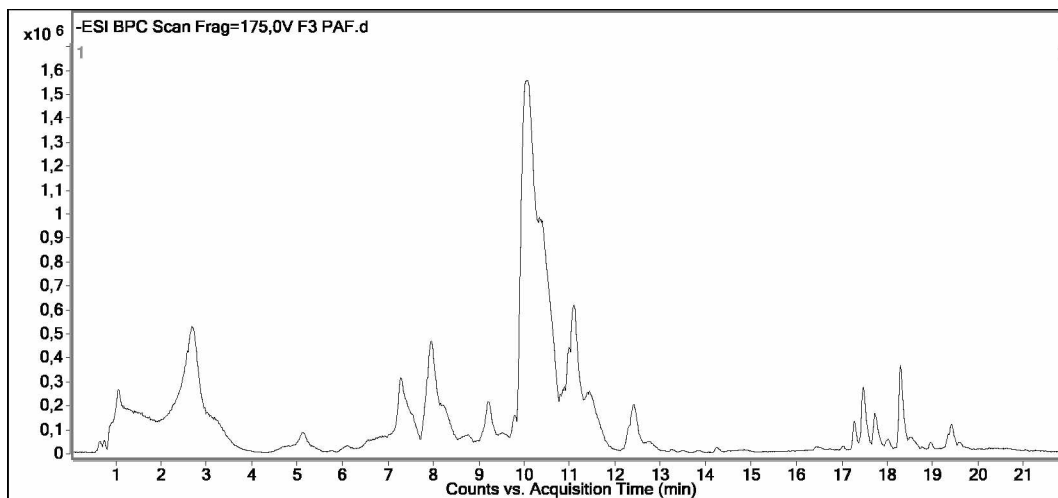
Tabela 30: Compostos identificados na FAE2-F.

$t_R(\text{min})$	$[M - H]^-$	Massa exata	Erro (ppm)	Fragmentos $m/z$	Fórmula molecular	Composto	Referências
2,6	169,0147	169,0142	- 2,9	125	$C_7H_6O_5$	Ácido gálico (I)	(ABDEL-HAMEED; BAZAID; SALMAN, 2013, FRACASSETTI et al., 2013)
5,1	311,1148			223, 139		n.i	
6,3	183, 0308	183,0299	- 4,9	168, 124	$C_8H_8O_5$	Derivado metílico do ácido gálico (IV)	(ABDEL-HAMEED; BAZAID; SALMAN, 2013)
6,3	285,0639			152, 108		n.i	
7,2	257,1409			213, 155		n.i	
7,9	365,0527			316/315, 287, 178, 151		n.i	
8,3	197,0467	197,0455	- 6,1	169, 124	$C_9H_{10}O_5$	Galato de etila (V)	(SUN et al., 2007, WYREPKOWSKI et al., 2014)
8,9	387,1309			251, 167		n.i	
8,9	241,1455			197, 139		n.i	
9,5	451,1262			311, 167		n.i	
10,1	463, 0892	463,0888	- 0,9	316, 178	$C_{21}H_{19}O_{12}$	Miricetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (VIII)	SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013)
10,1	567,2095			523, 341, 179		n.i	
10,6	521,2032			271, 211		n.i	
10,8	505,0999	505,0988	- 2,2	463, 316, 271, 163	$C_{23}H_{22}O_{13}$	Miricetina-3- <i>O</i> -acetil-ramnosídeo (XIV)	(FARIA; MARQUES; MERCADANTE, 2011, NEGRI; TABACH, 2013)
11,0	317,0316	317,0303	- 4,1	178, 151	$C_{15}H_{10}O_8$	Miricetina (X)	(SUN et al., 2007, FRACASSETTI et al., 2013, ABU-REIDAH et al., 2015)
11,9	609,2204			565, 383, 179		n.i	
12,2	301,0364	301,0354	- 3,3	178, 141	$C_{15}H_{10}O_7$	Quercetina (XIII)	(SUN et al., 2007)

Fonte: autora.

Na Figura 60 está apresentado o cromatograma da FAE3-F e na Tabela 31 os compostos identificados nesta fração.

Figura 60: Cromatograma CLAE/EM da FAE3-F.



Condições cromatográficas: fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% v v<sup>-1</sup>) (A) e metanol (B), sistema gradiente de solventes: 2% de B (0 min), 98% de B (0-15 min); 100% de B (15-17 min); 2% B (17-18 min) e 2% B (18-22 min). Fonte: autora.

Foram identificados seis compostos na FAE3-F. Todos os compostos encontrados nesta fração já foram identificados nas frações anteriores, os compostos **I**, **IV**, **VIII**, **X** e **XI** na FAE-F e o **XIV** na FAE2-F.

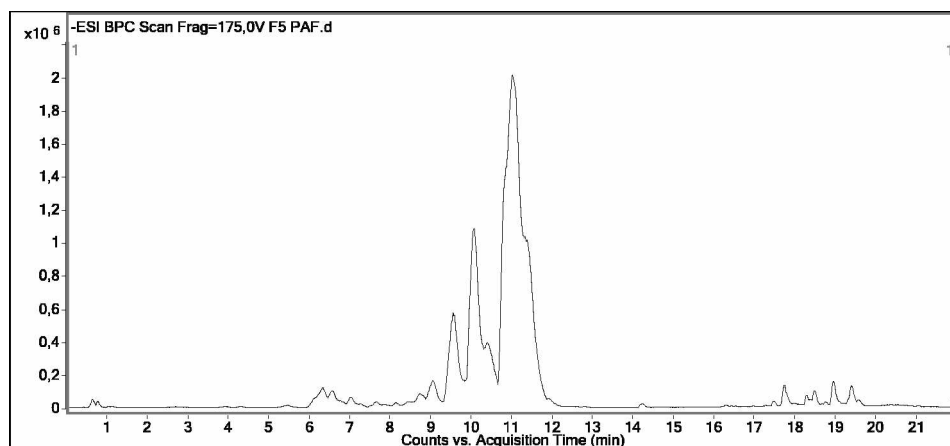
Tabela 31: Compostos identificados na FAE3-F.

$t_R(\text{min})$	$[M - H]^-$	Massa exata	Erro (ppm)	Fragmentos $m/z$	Fórmula molecular	Composto	Referências
2,6	169,0149	169,0142	- 4,1	125	$C_7H_6O_5$	Ácido gálico (I)	(ABDEL-HAMEED; BAZAID; SALMAN, 2013, FRACASSETTI et al., 2013)
5,1	311,1146			223, 139		n.i	
5,7	315,0723			211, 169, 125		n.i	
6,3	183,0304	183,0299	- 2,7	168, 124	$C_8H_8O_5$	Derivado metílico do ácido gálico (IV)	(ABDEL-HAMEED; BAZAID; SALMAN, 2013)
6,3	285,0620					n.i	
7,2	453,1050			313, 169		n.i	
7,9	365,0526			347, 316, 287, 178, 151		n.i	
9,2	537,1986			331, 271		n.i	
9,7	421,1150					n.i	
9,8	463,0894	463,0888	- 1,3	316, 178	$C_{21}H_{19}O_{12}$	Miricetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (VIII)	(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013)
10,9	317,0319	317,0303	- 5,0	178, 151	$C_{15}H_{10}O_8$	Miricetina (X)	(SUN et al., 2007, FRACASSETTI et al., 2013, ABU-REIDAH et al., 2015)
10,9	505,1008	505,0988	- 4,0	463, 316, 271, 178	$C_{23}H_{22}O_{13}$	Miricetina-3- <i>O</i> -acetil-ramnosídeo (XIV)	(FARIA; MARQUES; MERCADANTE, 2011, NEGRI; TABACH, 2013)
11,1	447,0952	447,0933	- 4,2	300/301, 151	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (XI)	(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013, TAAMALLI et al., 2014)
12,4	613,1219			445, 316		n.i	

Fonte: autora.

Na Figura 61 está apresentado o cromatograma da FAE5-F e na Tabela 32 os compostos identificados nesta fração.

Figura 61: Cromatograma CLAE/EM da FAE5-F.



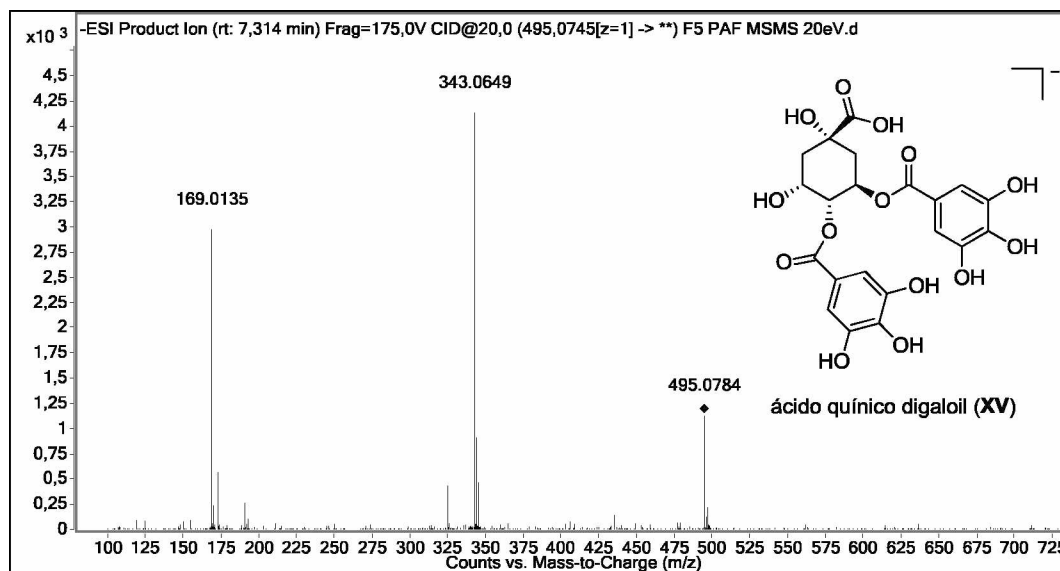
Condições cromatográficas: fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1%,  $v/v$ ) (A) e metanol (B), sistema gradiente de solventes: 2% de B (0 min), 98% de B (0-15 min); 100% de B (15-17 min); 2% B (17-18 min) e 2% B (18-22 min). Fonte: autora.

Na FAE5-F foram identificados 8 compostos, sendo que seis compostos foram identificados na FAE-F (**IV**, **VI**, **VII**, **VIII**, **IX**, e **XII**). Os compostos **XV** e **XVI** foram identificados apenas na FAE5-F. O íon  $m/z$  495 (Figura 62) corresponde ao composto **XV** (ácido quínico digaloil), a proposta de fragmentação deste íon está apresentada na Figura 69. A partir do mecanismo QM ocorre a perda de 152 Da (grupo galoil) originando o íon  $m/z$  343, em seguida ocorre a perda de outro grupo galoil (152 Da) e ocorre a formação do íon  $m/z$  191 que corresponde ao íon do ácido quínico. O íon  $m/z$  169 corresponde ao ânion galoil, que se forma a partir de vários rearranjos na estrutura do íon  $m/z$  191.

Tabela 32: Compostos identificados na FAE5-F.

$t_R(\text{min})$	$[M - H]^-$	Massa exata	Erro (ppm)	Fragmentos $m/z$	Fórmula molecular	Composto	Referências
6,3	285,0622					n.i	
6,5	183,0301	183,0299	- 1,1	168, 124	$C_8H_8O_5$	Derivado metílico do ácido gálico (IV)	(ABDEL-HAMEED; BAZAID; SALMAN, 2013)
7,0	495,0786	495,0780	- 1,2	343, 169	$C_{21}H_{20}O_{14}$	Ácido quínico digaloil (XV)	(SANNOMIYA et al., 2005, PEREIRA et al., 2015, SOBEH et al., 2016)
7,6	541,1203			389, 169		n.i	
8,5	605,1161			465, 313, 169		n.i	
9,0	631,0953	631,0941	- 1,9	479, 316, 169	$C_{28}H_{24}O_{17}$	Miricetina- <i>O</i> -( <i>O</i> -galoil)-hexosídeo (VI)	(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013, TAAMALLI et al., 2014)
9,5	479,0853	479,0831	- 4,6	316, 178	$C_{21}H_{19}O_{13}$	Miricetina-3- <i>O</i> -galactosídeo (VII)	(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013, TAAMALLI et al., 2014)
10,0	463,0907	463,0888	- 4,1	316, 178	$C_{21}H_{19}O_{12}$	Miricetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (VIII)	(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013)
10,3	609,1482	609,1461	- 3,4	463, 316, 178	$C_{27}H_{30}O_{16}$	Miricetina-3- <i>O</i> -ramnose-3'- <i>O</i> -ramnosídeo (XVI)	Estrutura proposta pela autora.
10,8	615,1031	615,0992	- 6,3	463, 316, 178	$C_{28}H_{24}O_{16}$	Miricetina galoil ramnosídeo (IX)	(RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2013, TAAMALLI et al., 2014)
11,6	767,1126			615, 449, 317, 169		n.i	(LEE et al., 2000, LEE et al., 2006)(LEE et al., 2000, LEE et al., 2006)(LEE et al., 2000, LEE et al., 2006)(LEE et al., 2000, LEE et al., 2006)
11,8	599,1065	599,1042	- 3,8	447, 301, 169, 151	$C_{28}H_{24}O_{15}$	Quercetina-3- <i>O</i> -(2''-galoil)-ramnosídeo (XII)	(ESTRADA et al., 2005, KIM et al., 2013)
14,2	431,1738					n.i	

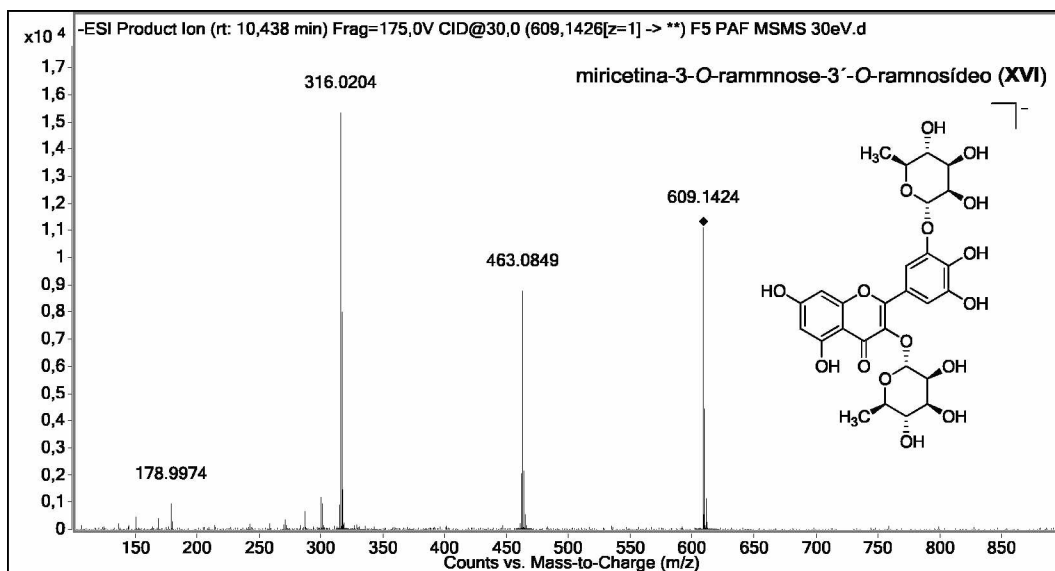
Fonte: autora.

Figura 62: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  495.

Fonte: autora.

O íon  $m/z$  609 (composto **XVI**) possui os fragmentos  $m/z$  463, 316 e 178 (Figura 63), os quais correspondem ao composto **VIII** que foi identificado como miricetina-3-*O*-ramnosídeo, a perda de 146 Da (grupo ramnosil) do íon  $m/z$  609 forma o íon  $m/z$  463, o qual perde mais 146 Da para formar o íon  $m/z$  316, logo, foi sugerido uma proposta para a estrutura do íon  $m/z$  609, o qual possui dois grupos ramnosil ligados a aglicona miricetina. Foi encontrado na literatura a estrutura para a miricetina-3'-*O*-ramnose-3-*O*-galactosídeo (NASIM et al., 1992), logo, foi proposto um estrutura semelhante com os dois grupos ramnosil nas posições 3 e 3' da aglicona, a miricetina-3-*O*-ramnose-3'-*O*-ramnosídeo. O mecanismo de fragmentação do íon  $m/z$  609 está apresentado na Figura 69.

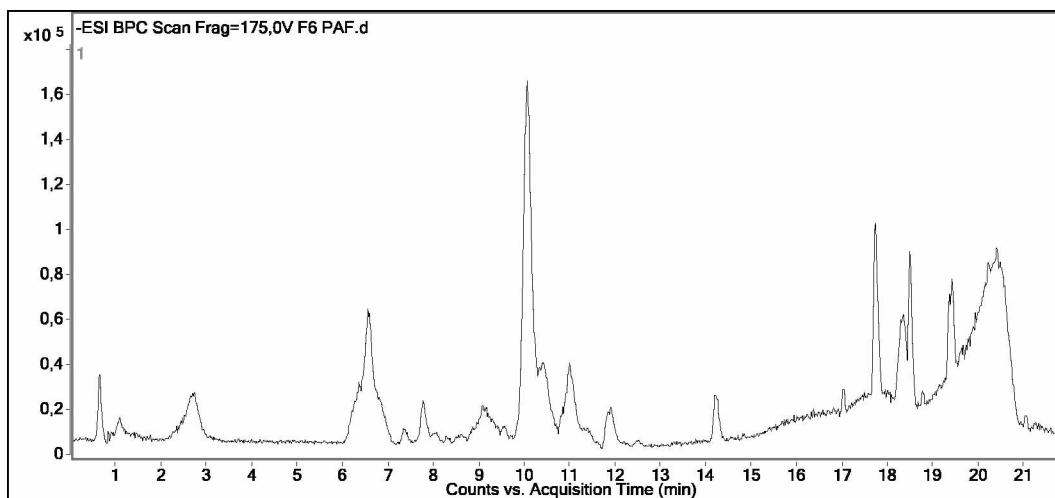
Figura 63: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  609.



Fonte: autora.

Na Figura 64 está apresentado o cromatograma da FAE6-F e na Tabela 33 os compostos identificados nesta fração.

Figura 64: Cromatograma CLAE/EM da FAE6-F.



Condições cromatográficas: fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% v v<sup>-1</sup>) (A) e metanol (B), sistema gradiente de solventes: 2% de B (0 min), 98% de B (0-15 min); 100% de B (15-17 min); 2% B (17-18 min) e 2% B (18-22 min). Fonte: autora.

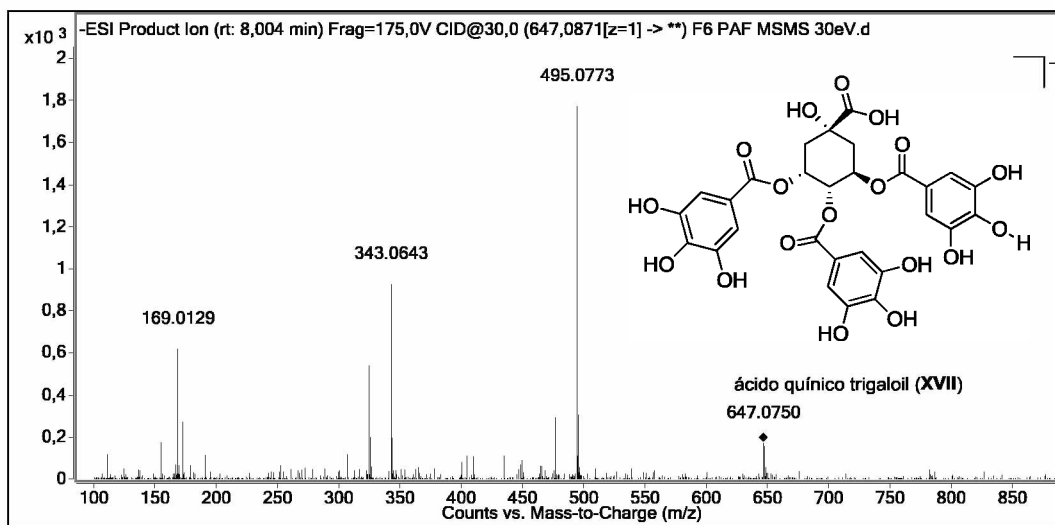
Foram identificados seis compostos na FAE6-F, os compostos **I**, **IV**, **VII**, **VIII**, e **IX** foram identificados nas frações anteriores e o composto **XVII** foi identificado nesta fração como sendo o ácido quínico trigaloil, que corresponde ao íon  $m/z$  647 (Figura 65). O mecanismo de fragmentação deste íon se assemelha com o íon  $m/z$  495 (composto **XV** – ácido quínico digaloil), no íon  $m/z$  647 ocorre a perda de três grupos galoil  $[M - 3 \times 152 - H]^-$  para formar o íon  $m/z$  191 (ácido quínico), que após vários rearranjos origina o íon  $m/z$  169 (Figura 70).



Tabela 33: Compostos identificados na FAE6-F.

$t_{R(\min)}$	$[M - H]^-$	Massa exata	Erro (ppm)	Fragmentos $m/z$	Fórmula molecular	Composto	Referências
2,6	169,0146	169,0142	- 2,4	125	$C_7H_6O_5$	Ácido gálico (I)	(ABDEL-HAMEED; BAZAID; SALMAN, 2013, FRACASSETTI et al., 2013)
6,5	183,0304	183,0299	- 2,7	168, 124	$C_8H_8O_5$	Derivado metílico do ácido gálico (IV)	(ABDEL-HAMEED; BAZAID; SALMAN, 2013)
6,9	607,1069			439, 301, 177		n.i	
7,3	759,1199			589, 571, 453, 301, 177		n.i	
7,7	647,0885	647,0890	0,8	495, 343, 325, 169	$C_{28}H_{24}O_{18}$	Ácido quínico trigaloil (XVII)	(PEREIRA et al., 2015)
9,1	151,0408			136, 107		n.i	
9,5	479,0834	479,0831		316, 178	$C_{21}H_{19}O_{13}$	Miricetina-3- <i>O</i> -galactosídeo (VII)	(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013, TAAMALLI et al., 2014)
9,5	765,1303					n.i	
10,0	463,0899	463,0888	- 2,4	316, 178	$C_{21}H_{19}O_{12}$	Miricetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (VIII)	(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013)
10,9	615,1011	615,0992	- 3,1	463, 316/317, 178	$C_{28}H_{24}O_{16}$	Miricetina galoil ramnosídeo (IX)	(RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2013, TAAMALLI et al., 2014)
11,8	521,1323			489, 352, 169		n.i	

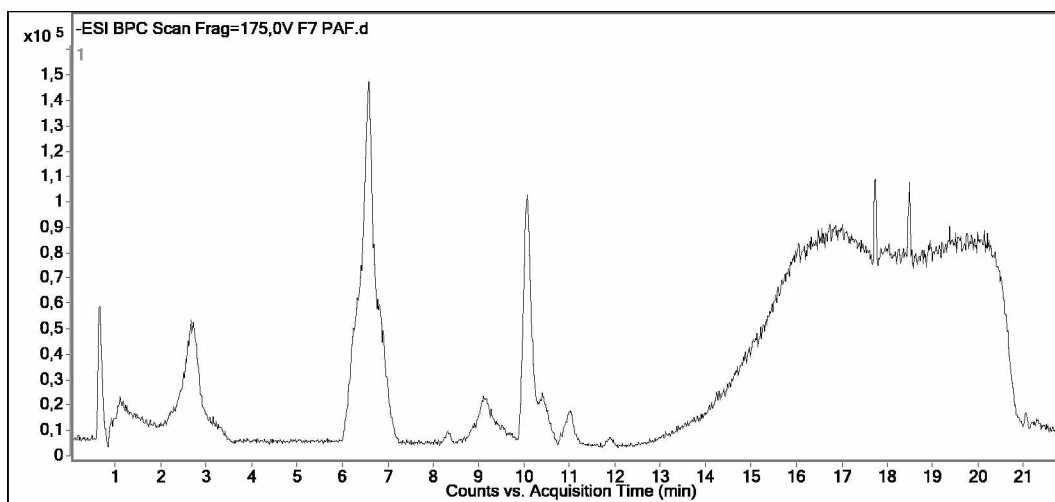
Fonte: autora.

Figura 65: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  647.

Fonte: autora.

Na Figura 66 está apresentado o cromatograma da FAE7-F e na Tabela 34 os compostos identificados nesta fração.

Figura 66: Cromatograma CLAE/EM da FAE7-F.



Condições cromatográficas: fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% v v<sup>-1</sup>) (A) e metanol (B), sistema gradiente de solventes: 2% de B (0 min), 98% de B (0-15 min); 100% de B (15-17 min); 2% B (17-18 min) e 2% B (18-22 min). Fonte: autora.

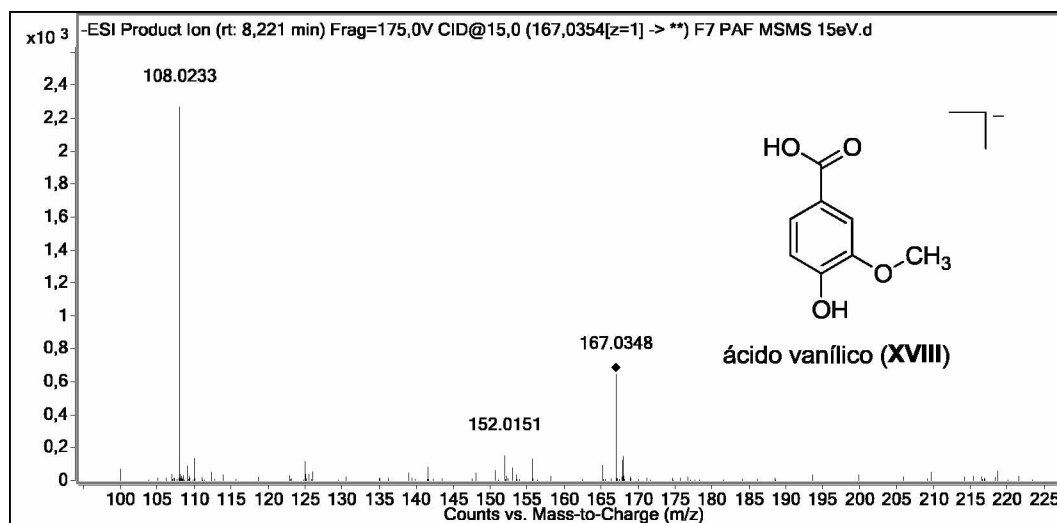
Tabela 34: Compostos identificados na FAE7-F.

$t_{R(min)}$	$[M - H]^-$	Massa exata	Erro (ppm)	Fragmentos $m/z$	Fórmula molecular	Composto	Referências
2,6	169,0149	169,0142	- 4,1	125	$C_7H_6O_5$	Ácido gálico (I)	(ABDEL-HAMEED; BAZAID; SALMAN, 2013, FRACASSETTI et al., 2013)
6,5	183,0310	183,0299	- 6,0	168, 124	$C_8H_8O_5$	Derivado metílico do ácido gálico (IV)	(ABDEL-HAMEED; BAZAID; SALMAN, 2013)
8,3	167,0361	167,0350	- 6,6	108	$C_8H_8O_4$	Ácido vanílico (XVIII)	(SANZ et al., 2012)
9,1	151,0412					n.i	
10,0	463,0899	463,0888	- 2,4	316, 178	$C_{21}H_{19}O_{12}$	Miricetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (VIII)	(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013)
10,9	615,1004	615,0992	- 2,0	463, 316/317, 178	$C_{28}H_{24}O_{16}$	Miricetina galoil ramnosídeo (IX)	(RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2013, TAAMALLI et al., 2014)
10,9	187,0987			125		n.i	
11,9	521,1305			489, 343		n.i	
13,7	297,1546			183, 119		n.i	

Fonte: autora.

Na FAE7-F foram identificados cinco compostos, dos quais quatro foram identificados nas frações anteriores (compostos **I**, **IV**, **VIII**, e **IX**). O íon  $m/z$  167 (composto **XVIII**) foi identificado como o ácido vanílico (Figura 67). A perda de 15 Da origina o íon  $m/z$  152  $[M - CH_3 - H]^-$ , que em seguida perde 44 Da e forma o íon  $m/z$  108  $[M - CO_2 - H]^-$  (Figura 70).

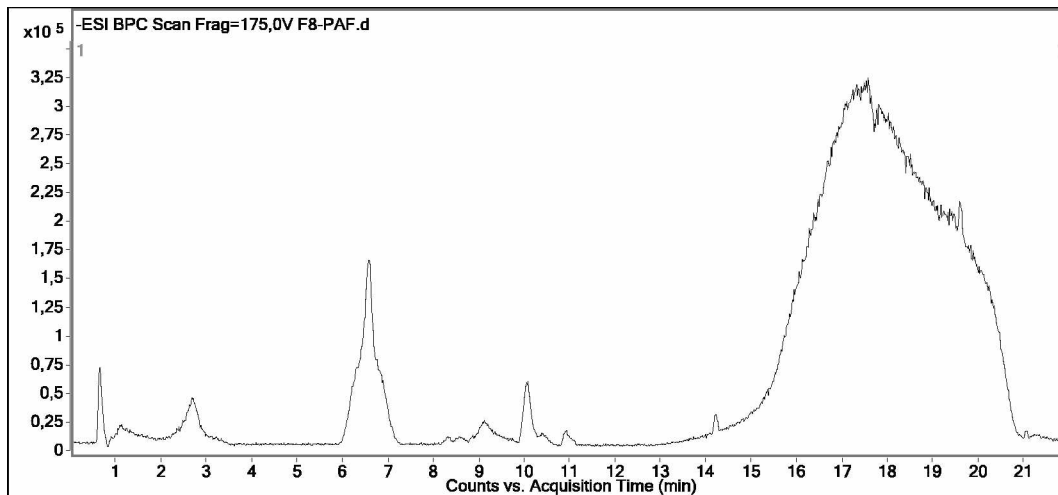
Figura 67: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  167.



Fonte: autora.

Na Figura 68 está apresentado o cromatograma da FAE8-F e na Tabela 35 os compostos identificados nesta fração.

Figura 68: Cromatograma CLAE/EM da FAE8-F.



Condições cromatográficas: fase móvel: água acidificada com ácido fórmico ( $0,1\% \text{ v v}^{-1}$ ) (A) e metanol (B), sistema gradiente de solventes: 2% de B (0 min), 98% de B (0-15 min); 100% de B (15-17 min); 2% B (17-18 min) e 2% B (18-22 min). Fonte: autora.

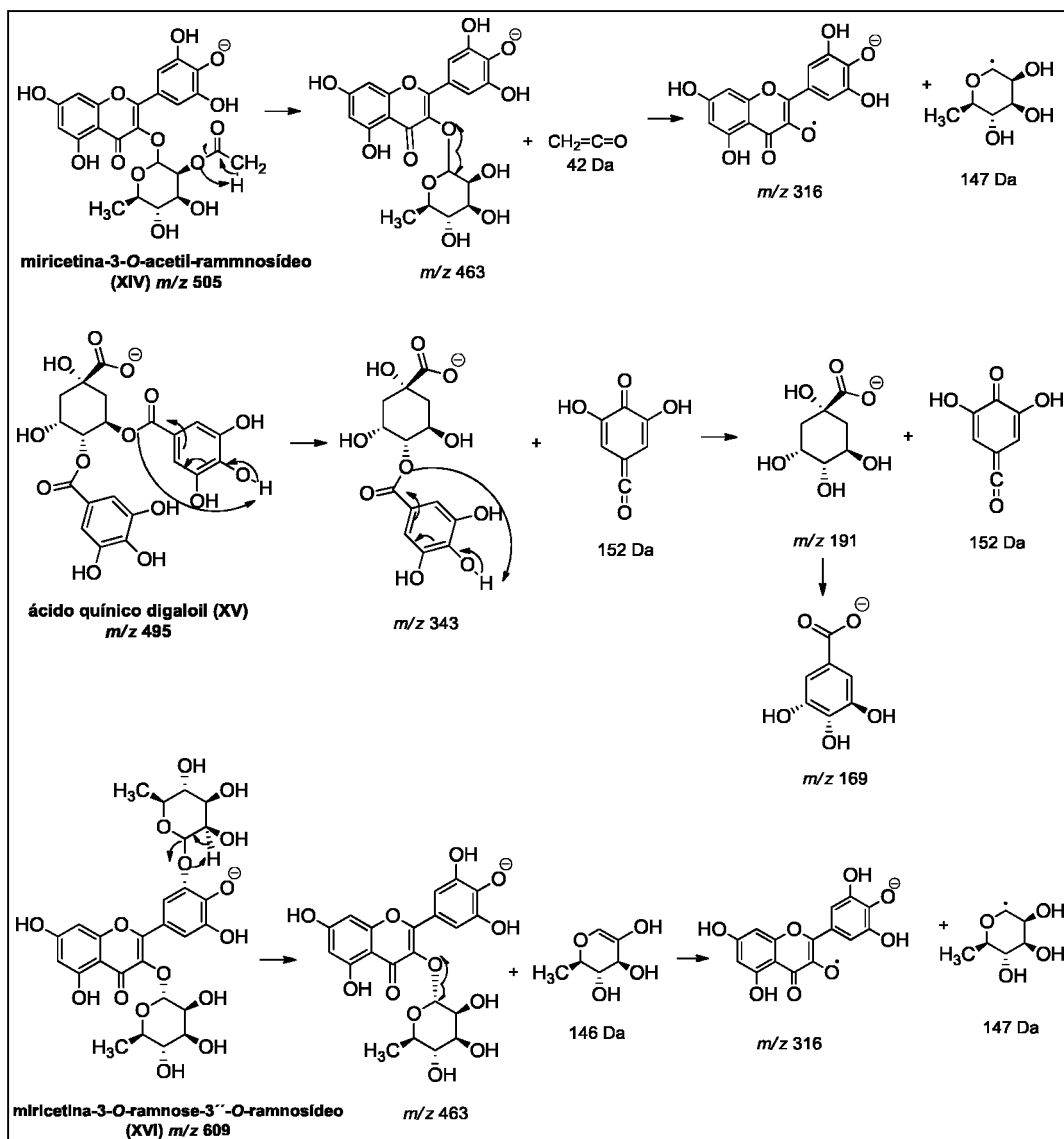
Os compostos identificados na FAE8-F foram os mesmos da FAE7-F, este fato pode ser explicado porque estas duas frações foram as últimas coletadas na coluna, e foram separadas em duas frações.

Tabela 35: Compostos identificados na FAE8-F.

$t_{R(min)}$	$[M - H]^-$	Massa exata	Erro (ppm)	Fragmentos $m/z$	Fórmula molecular	Composto	Referências
2,6	169,0149	169,0142	- 4,1	125	$C_7H_6O_5$	Ácido gálico (I)	(ABDEL-HAMEED; BAZAID; SALMAN, 2013, FRACASSETTI et al., 2013)
6,5	183,0310	183,0299	- 6,0	168, 124	$C_8H_8O_5$	Derivado metílico do ácido gálico (IV)	(ABDEL-HAMEED; BAZAID; SALMAN, 2013)
8,5	167,0361	167,0350	- 6,6	108	$C_8H_8O_4$	Ácido vanílico (XVIII)	(SANZ et al., 2012)
8,5	213,9644			134		n.i	
9,0	151,0412					n.i	
10,0	463,0899	463,0888	- 2,4	316, 178	$C_{21}H_{19}O_{12}$	Miricetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (VIII)	(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013)
10,9	187,0989			125		n.i	
10,9	615,1004	615,0992	- 2,0	463, 316/317, 178	$C_{28}H_{24}O_{16}$	Miricetina galoil ramnosídeo (IX)	(RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2013, TAAMALLI et al., 2014)
14,19	431,1726					n.i	

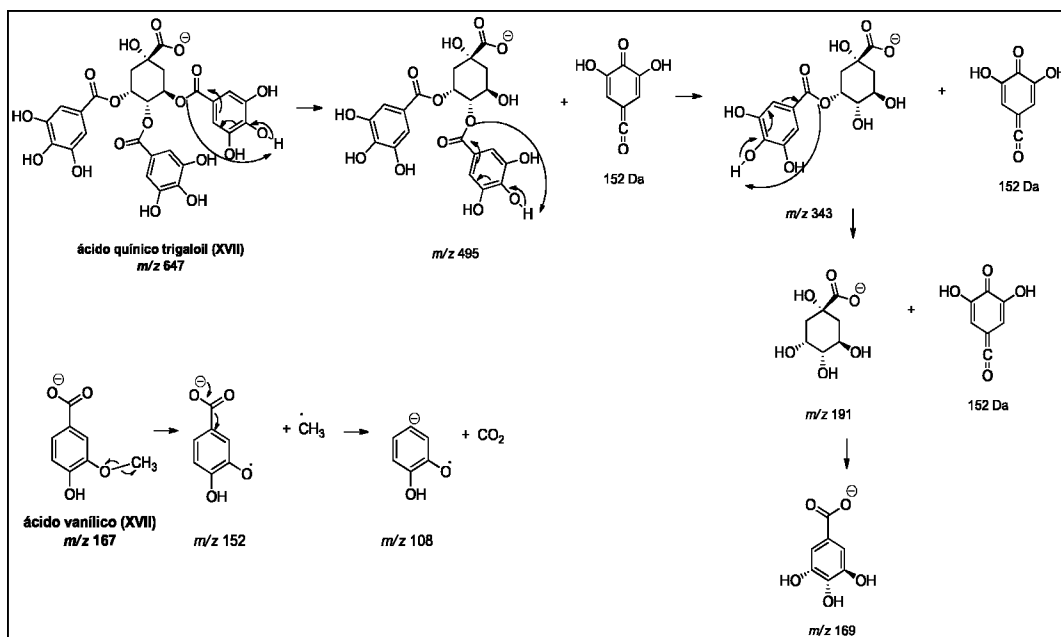
Fonte: autora.

Figura 69: Mecanismos de fragmentações dos compostos identificados (XIV-XVI).



Fonte: autora.

Figura 70: Mecanismos de fragmentações dos compostos identificados **XVII** e **XVIII**.



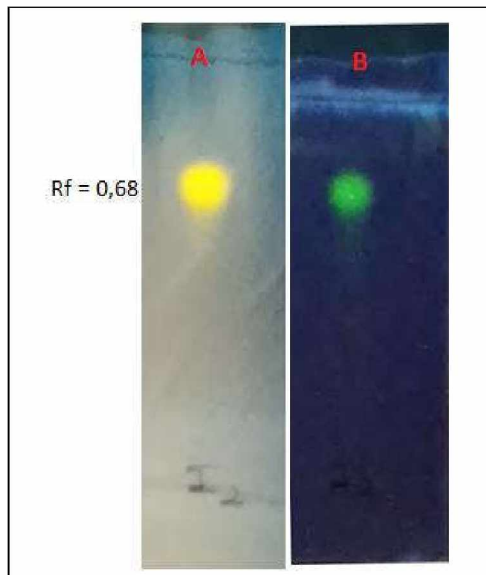
Fonte: autora.

### 5.13 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO ISOLADO FAE4-F (MIRICETINA-3-O-RAMNOSÍDEO)

Após o fracionamento da FAE-F de *I. laurina*, a fração FAE4-F apresentou apenas uma mancha na placa cromatográfica analisada por CCD (Figura 71). A placa foi analisada utilizando como eluente acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (10:1,1:1,1:2,6) e empregado os reveladores NP/PEG (A) e Liebermann-Buchard (B) com revelação em 365 nm.



Figura 71: CCD do composto FAE4-F.



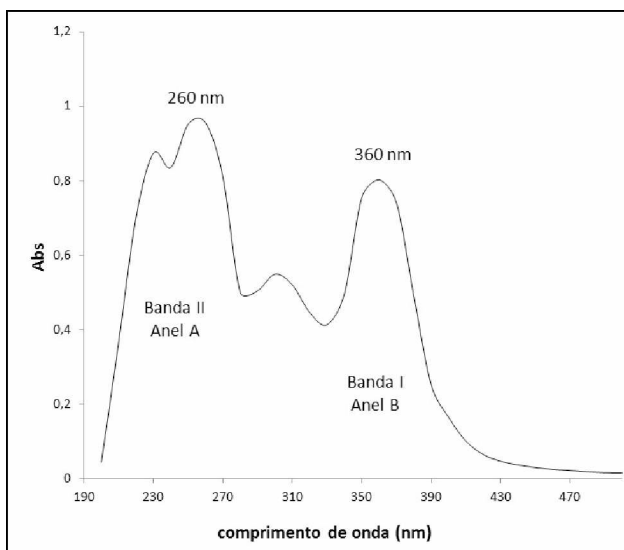
A: revelador NP/PEG; B: revelador Liebermann-Buchard. Fonte: autora.

O composto FAE4-F apresentou fluorescência amarela em 365 nm com o revelador NP/PEG, característico de flavonóis glicosilados, e apresentou fluorescência verde com o revelador Liebermann-Buchard. Conforme discutido no subitem 5.2, os flavonoides formam complexos fluorescentes no UV com o reagente NP

O reagente de Liebermann-Buchard é empregado na identificação principalmente de terpenos e saponinas, em que ocorre a formação de um composto conjugado que apresenta fluorescência no UV (XIONG; WILSON; PANG, 2007, ATINAFU; BEDEMO, 2011). A presença da fluorescência verde com o composto FAE4-F pode ser explicada pela protonação das hidroxilas ou formação de derivados sulfônicos que formam compostos insaturados ou cátions, que apresentam fluorescência verde no UV, em 365 nm.

O perfil do espectro UV/VIS do composto FAE4-F é característico de flavonoides, pois apresenta duas bandas de absorção, a banda I em 360 nm atribuída às transições eletrônicas do anel B (sistema cinamoil) e a banda II em 260 nm referente às transições no anel A (sistema benzoil), como pode ser observado na Figura 72.

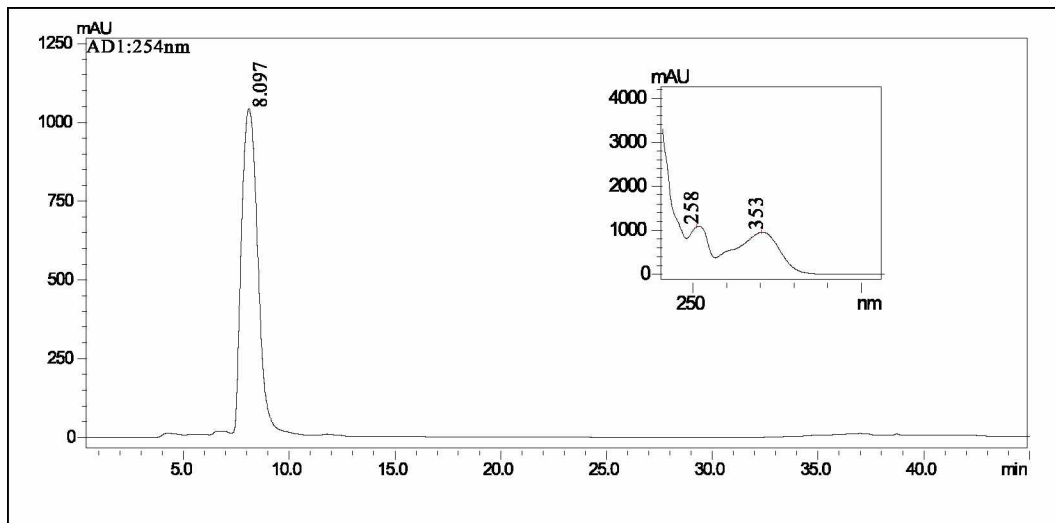
Figura 72: Espectro UV-VIS do composto FAE4-F.



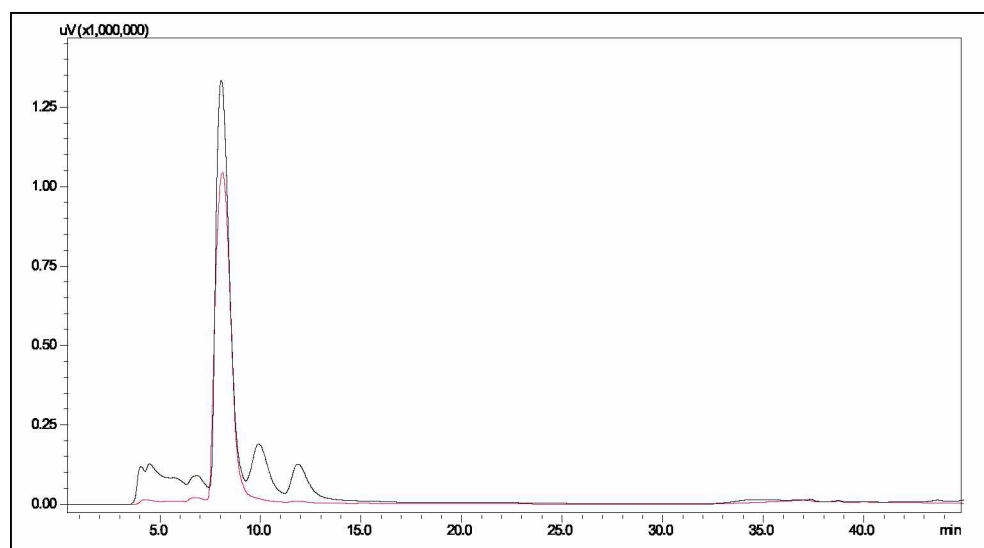
Fonte: autora.

A FAE4-F foi analisada por CLAE analítico para verificar sua pureza. O cromatograma e o espectro UV-VIS obtidos por CLAE do composto isolado FAE4-F estão apresentados na Figura 73. O cromatograma indicou a presença de apenas um sinal intenso em 8,1 min e o espectro UV-VIS do composto apresenta duas bandas de absorção características de flavonoides (258 e 353 nm), como explicado anteriormente. Portanto, a partir das informações da CCD e CLAE pode-se concluir que o composto FAE4-F é um flavonoide. O perfil cromatográfico da fração FAE4-F foi comparado com o perfil da FAE das folhas de *I. laurina* (Figura 74), em que se verifica que o composto FAE4-F (em vermelho) é o componente de maior intensidade na FAE.

Figura 73: Cromatograma e espectro UV-VIS da FAE4-F.



Condições cromatográficas: método isocrático 50 % de MeOH (B)/H<sub>2</sub>O (A) em 25 min, fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. Fonte: autora.

Figura 74: Comparação do cromatograma por CLAE da FAE-F de *I. laurina* e da FAE4-F (em vermelho).

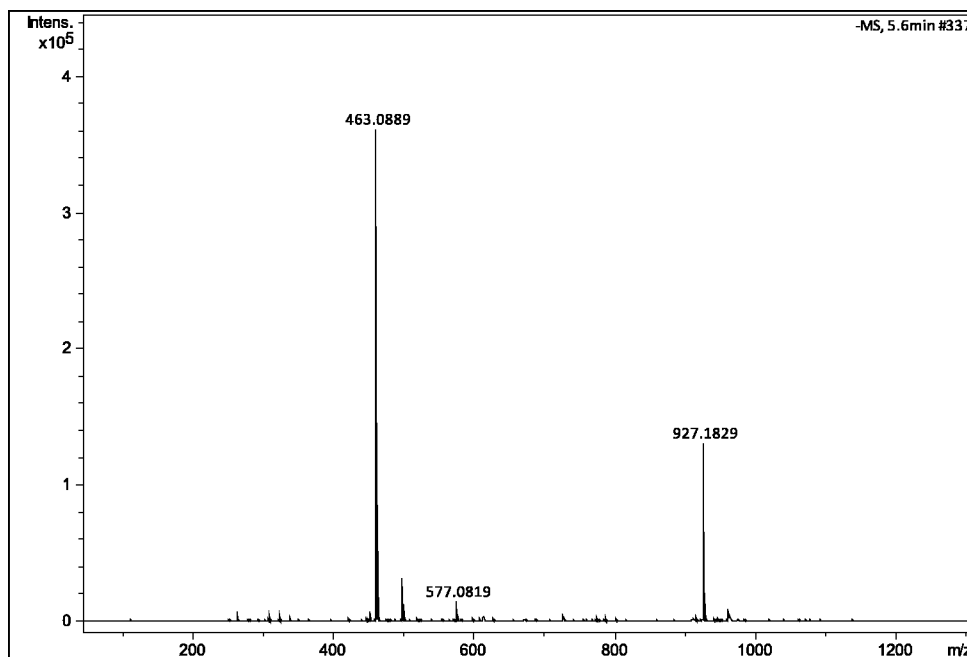
Condições cromatográficas: método isocrático 50 % de MeOH (B)/H<sub>2</sub>O (A) em 25 min, fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. Fonte: autora.

O espectro de massas de alta resolução e os espectros de RMN confirmaram a estrutura do composto. O composto FAE4-F é a miricetina-3-*O*-ramnosídeo, um flavonoide glicosilado que possui coloração amarela e aspecto cristalino, fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>, massa molar 464,38 g.mol<sup>-1</sup> e ponto de decomposição em

aproximadamente 200°C. Não há na literatura o valor do ponto de fusão do composto. Ao realizar a medida do ponto de fusão da amostra ela começou a se decompor em 200°C, em que se verificou a mudança de cor da amarela para alaranjada e posteriormente preta com o aumento da temperatura.

Os espectros de massas foram obtidos por ionização por eletrospray (IES) no modo negativo. A Figura 75 mostra o espectro de massas de alta resolução do composto FAE4-F, em que é possível verificar a massa molecular do composto  $[M - H]^-$   $m/z$  463,0889 (massa adquirida). A massa exata do composto (miricetina-3-*O*-ramnosídeo) foi obtida pelo programa ChemDraw Ultra (versão 10.0)  $m/z$  463,0882 ( $C_{21}H_{19}O_{12}$ ), obtendo um erro de 1,5 ppm. O pico  $m/z$  927,1829 corresponde a formação de *cluster* da miricetina-3-*O*-ramnosídeo.

Figura 75: Espectro de massas de alta resolução do composto FAE4-F.

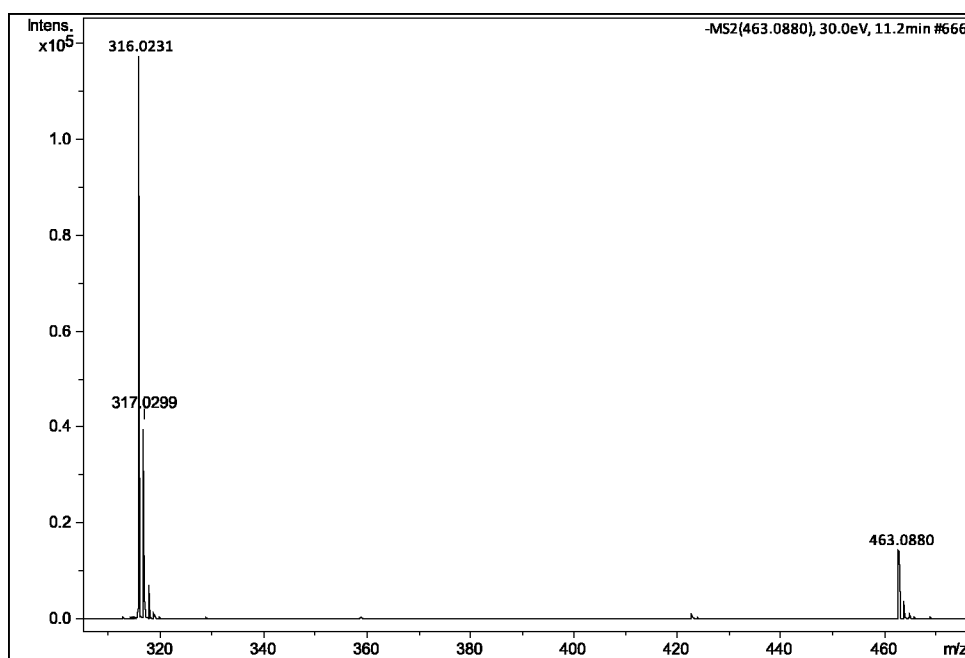


Fonte: autora.

A principal fragmentação do composto é a perda do açúcar na molécula, uma ramnose, originando o íon  $m/z$  316  $[M-147-H]^-$  de maior intensidade, que corresponde a aglicona. A Figura 76 mostra o espectro de massas (EM/EM) com a principal fragmentação do composto FAE4-F e a Figura 77 apresenta uma proposta para o mecanismo de fragmentação da molécula, em que a perda da ramnose pode ocorrer por

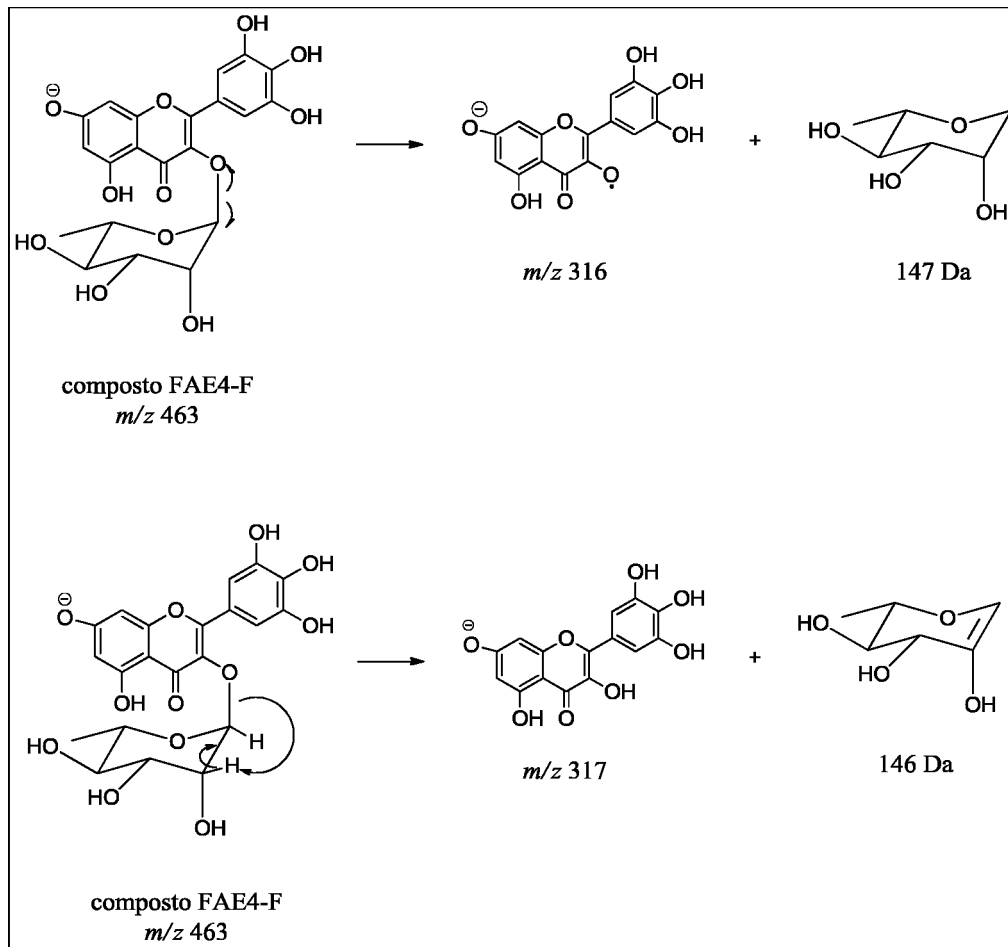
quebra homolítica da ligação entre o carbono anomérico C1'' e o oxigênio da aglicona, originando o íon  $m/z$  316 ou por quebra heterolítica com a eliminação da molécula de açúcar com uma ligação dupla, originando o pico de menor intensidade  $m/z$  317 [M-146-H]<sup>+</sup>. O espectro da Figura 76 corrobora com o espectro obtido no trabalho de Saldanha, Vilegas e Dokkedal (2013) em que foram identificados flavonoides em *Myrcia bella* Cambess utilizando a mesma técnica empregada neste trabalho (EM/IES-EM/EM), dentre eles a miricetina-3-*O*-ramnosídeo e a fragmentação também corresponde ao composto identificado no extrato metanólico das folhas de *Pistacia lentiscus* (RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2013).

Figura 76: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  463.



Fonte: autora.

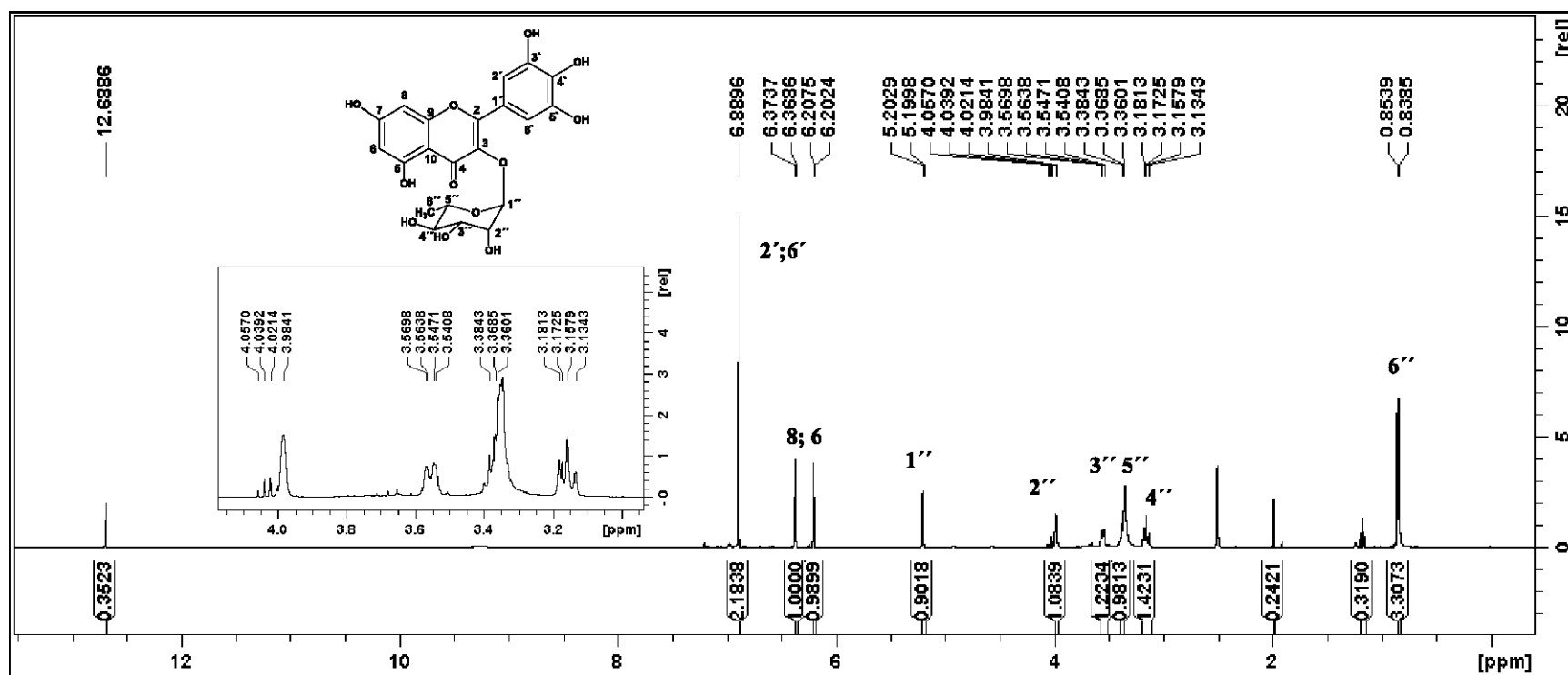
Figura 77: Mecanismo de fragmentação para o composto FAE4-F.



Fonte: autora.

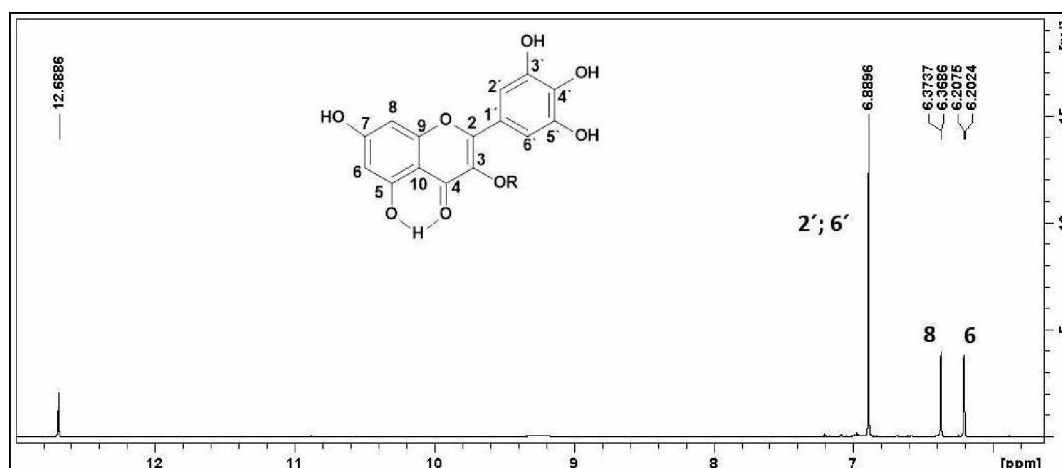
A Figura 78 mostra o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto FAE4-F e a Figura 79 a ampliação na região de hidrogênios aromáticos.

Figura 78: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) do composto FAE4-F.



Fonte: autora.

Figura 79: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) na região de hidrogênios aromáticos do composto FAE4-F.



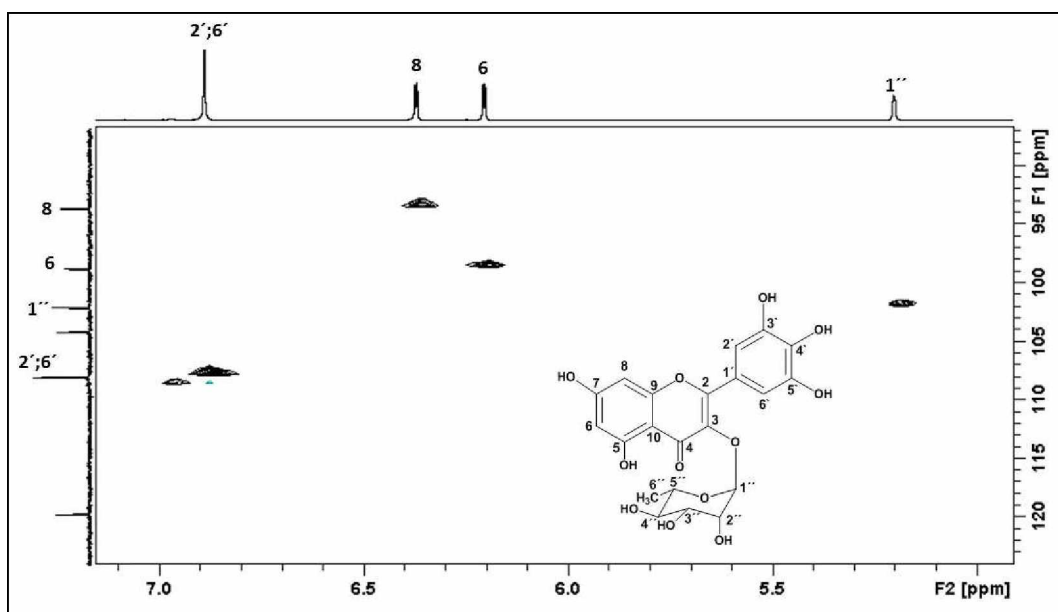
Fonte: autora.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 79) apresentou três sinais referentes aos hidrogênios aromáticos do composto. Foram observados dois dupletos em  $\delta$  6,20 e 6,37, ambos com constante de acoplamento  $J = 2,0$  Hz, característico de acoplamentos *meta* dos hidrogênios dos carbonos C6 e C8, respectivamente, no anel A. Há também um singlete intenso em  $\delta$  6,89 que foi atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6' do anel B que são equivalentes. O sinal em 12,69 ppm corresponde ao hidrogênio da hidroxila do carbono C5 que faz ligação de hidrogênio com a carbonila do carbonila C4, correspondendo a uma hidroxila quelada.

Através do mapa de contorno HSQC (Figura 80) foram feitas as correlações dos carbonos e hidrogênios na região de aromáticos, assim como dos hidrogênios glicosídicos com os carbonos da unidade de ramnose (Figura 81).

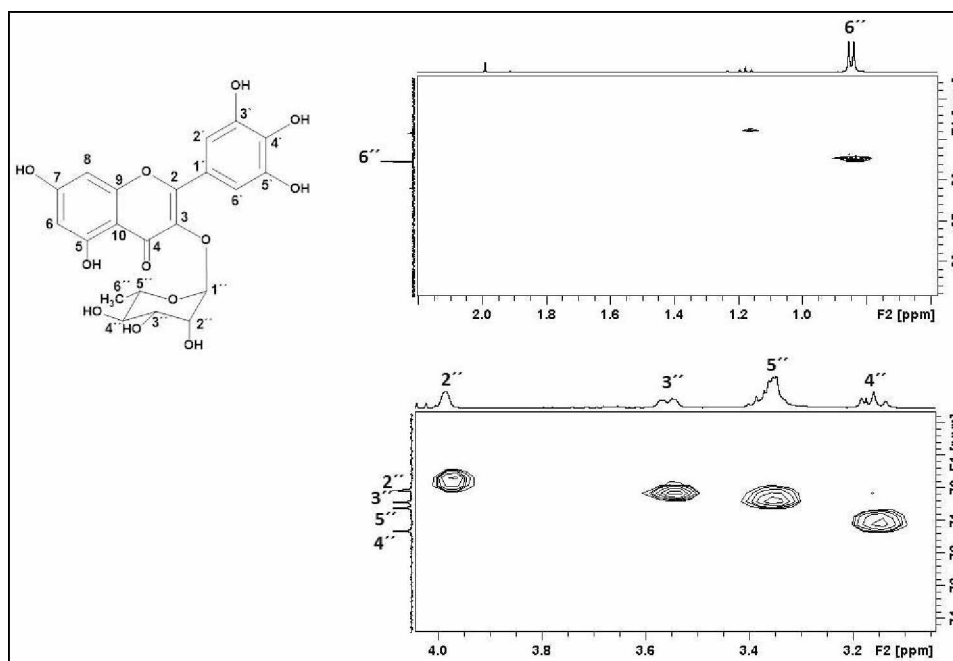


Figura 80: Mapa de contorno HSQC (DMSO- $d_6$ ) do composto FAE4-F na região de aromáticos.



Fonte: autora.

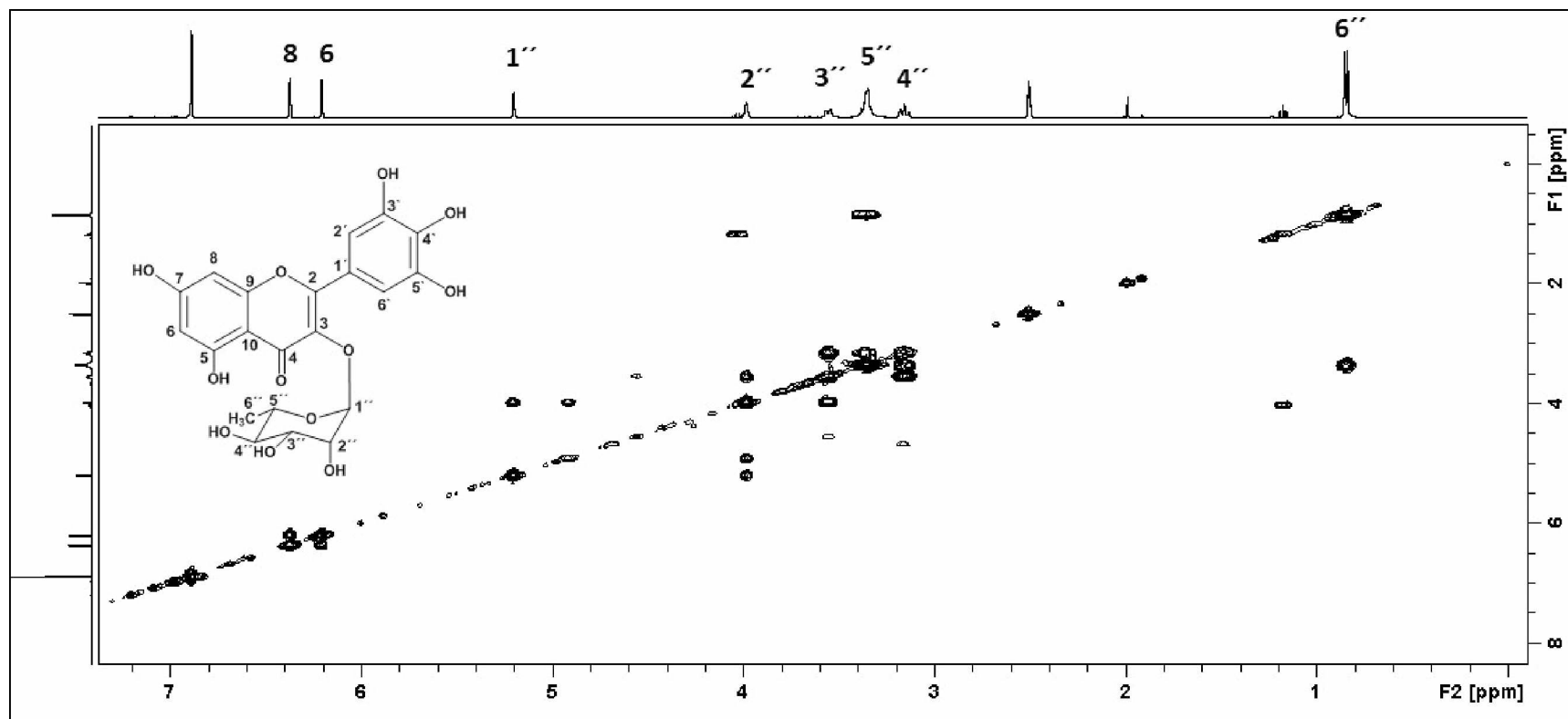
Figura 81: Mapa de contorno HSQC (DMSO- $d_6$ ) na região glicosídica do composto FAE4-F.



Fonte: autora.

Na análise do mapa de contorno de HSQC (Figura 80) foi possível observar o sinal em  $\delta$  5,20 (1H, duplete,  $J = 1,2$  Hz) característico de hidrogênio ligado ao carbono anomérico (C1'',  $\delta$  101,94) da ramnose. Este valor da constante de acoplamento é característico de hidrogênio na posição equatorial no anel glicosídico, e seu acoplamento com o hidrogênio H-2'' (axial-equatorial ou equatorial-equatorial). Assim, pode-se inferir que o composto FAE4-F trata-se da miricetina-3-*O*-ramnosídeo (SOUZA et al., 2007, HAYDER et al., 2008).

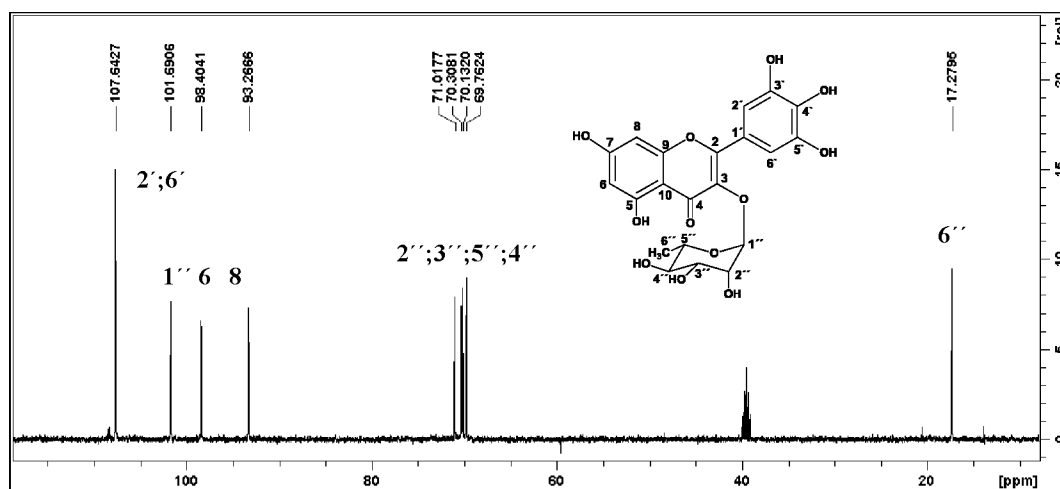
Pela análise do mapa de contorno COSY (Figura 82), o duplete em  $\delta$  0,84 (3H,  $J = 6,2$  Hz) foi atribuído o H-6'' que apresenta acoplamento com H-5'' em  $\delta$  3,37 (1H, multiplete). O sinal em  $\delta$  3,37 referente ao H-5'' foi observado como um multiplete devido a pequena constante de acoplamento com os hidrogênios H-4'' e H-6''. O multiplete em  $\delta$  3,16 (1H) foi atribuído ao hidrogênio H-4'', o qual está acoplado com H-3'' em  $\delta$  3,55 (duplo duplete, 1H,  $J = 9,3$  e  $2,6$  Hz). O sinal  $\delta$  3,98 (1H, singlete alargado) foi atribuído ao H-2'' que está acoplado com H-3'' e H-1'' em  $\delta$  3,55 e  $\delta$  5,20 respectivamente. As atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios do composto FAE4-F foram comparados com a da miricetina-3-*O*-ramnosídeo e estão apresentados na Tabela 36.

Figura 82: Mapa de contorno COSY (DMSO-  $d_6$ ) do composto FAE4-F.

Fonte: autora.

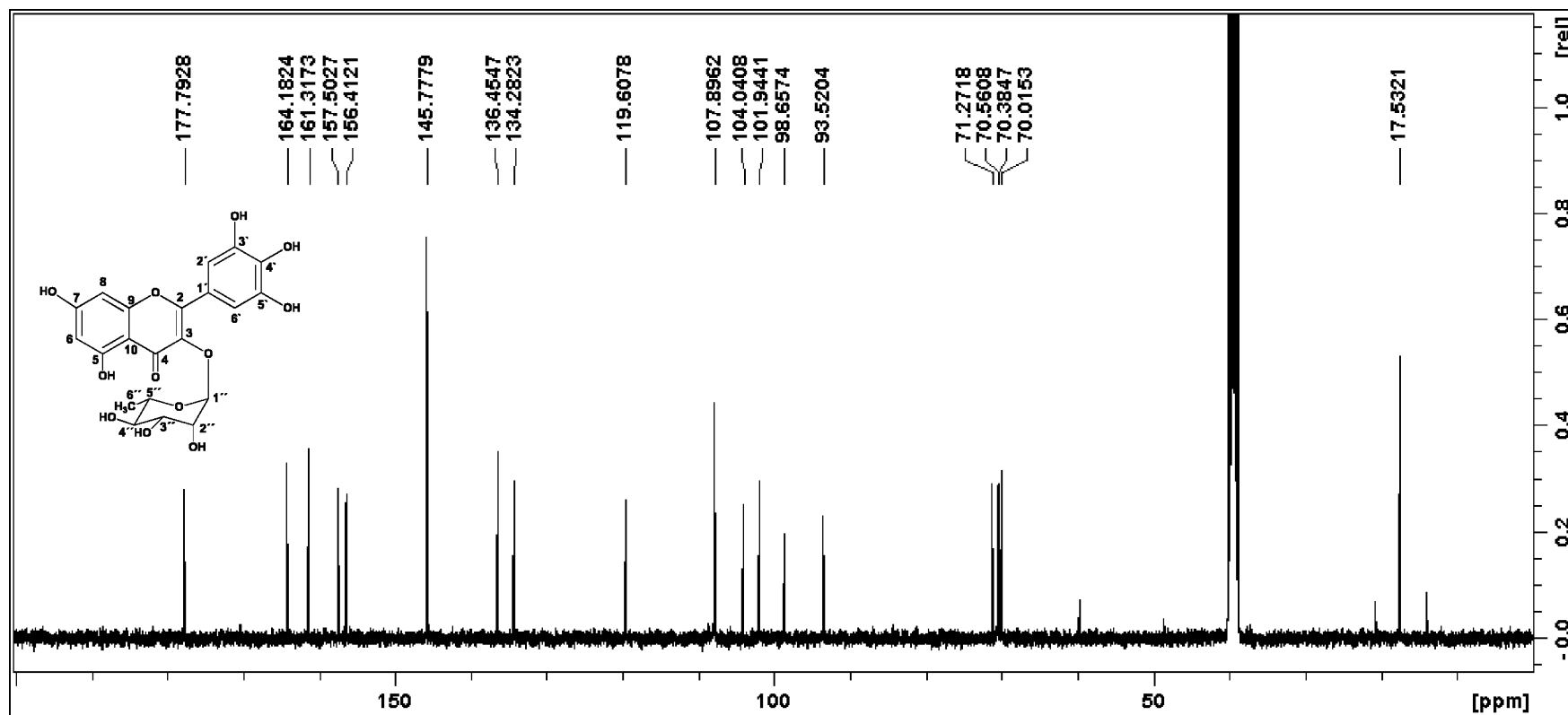
Os espectros de DEPT-135 e RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 83 e 84, respectivamente) permitiram confirmar os sinais dos carbonos do composto FAE4-F. Na Tabela 37 são apresentadas as atribuições dos deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto FAE4-F (miricetina-3-*O*-ramnosídeo).

Figura 83: Espectro DEPT-135 (DMSO- $d_6$ ) do composto FAE4-F



Fonte: autora.

Figura 84: Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) do composto FAE4-F.



Fonte: autora.

Tabela 36: Atribuição dos sinais de hidrogênios do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto FAE4-F e comparados com a da miricetina-3-*O*-ramnosídeo.

Posição	RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta^1$ ; $m^2$ ; $J^3$	COSY	RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta^1$ ; $m^2$ ; $J^3$ (CERUKS et al., 2007)
6	6,20 <i>d</i> (2,0)	H-8	6,36 <i>d</i> (1,8)
8	6,35 <i>d</i> (2,0)	H-6	6,18 <i>d</i> (1,8)
2'	6,89 <i>s</i>	-	7,04 <i>s</i>
6'	6,89 <i>s</i>	-	7,04 <i>s</i>
1''	5,20 <i>d</i> (1,2)	H-2''	5,18 <i>d</i> (1,0)
2''	3,98 <i>s</i>	H-1'' e H-3''	
3''	3,55 <i>dd</i> (2,6 e 9,3)	H-2'' e H-4''	3,1-4,0 <i>m</i>
4''	3,16 <i>m</i>	H-3'' e H-5''	
5''	3,37 <i>m</i>	H-4'' e H-6''	
6''	0,84 <i>d</i> (6,2)	H-5''	0,79 <i>d</i> (5,3)

Nota: 1: deslocamento químico em ppm utilizando TMS como padrão interno; 2: multiplicidade (*s* = singleto, *d* = duplete, *dd* = duplo duplete, *m* = multiplete); 3: constante de acoplamento expresso em Hz.

Tabela 37: Atribuição dos sinais dos átomos de carbono no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto FAE4-F (miricetina-3-*O*-ramnosídeo).

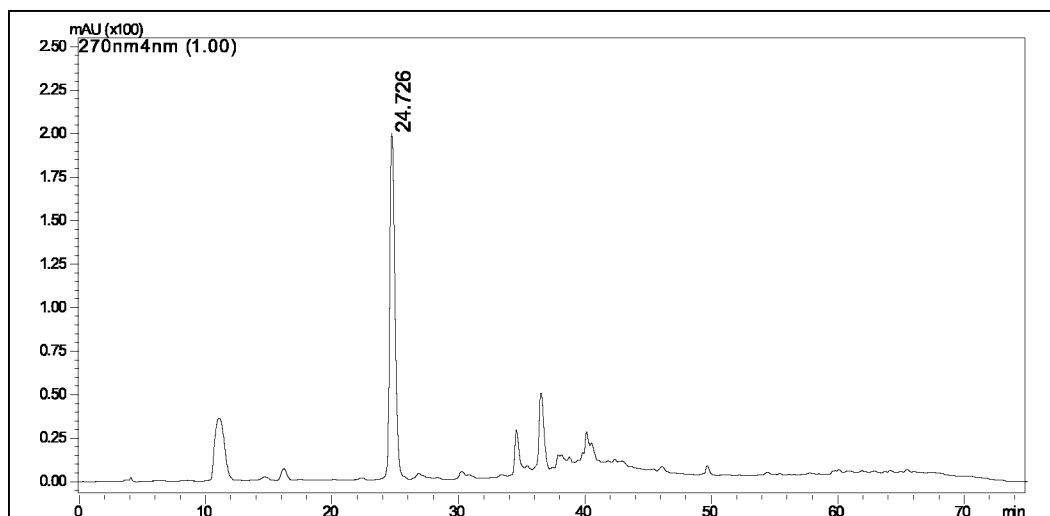
Posição	$\delta^1$	$\delta^2$	RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, DMSO- $d_6$ DEPT-135)	HSQC <sup>1</sup>	RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz, metanol- $d_4$ ) (CERUKS et al., 2007)
<b>2</b>	156,4	156,4	C	-	158,3
<b>3</b>	136,5	135,1	C	-	134,5
<b>4</b>	177,8	178,2	C	-	177,9
<b>5</b>	161,3	161,8	C	-	162,9
<b>6</b>	98,7	98,3	CH	6,20	99,9
<b>7</b>	164,2	166,4	C	-	165,4
<b>8</b>	93,5	94,0	CH	6,35	94,3
<b>9</b>	157,5	158,8	C	-	157,5
<b>10</b>	104,1	104,5	C	-	105,0
<b>1'</b>	119,6	121,8	C	-	122,5
<b>2'</b>	107,9	107,9	CH	6,89	109,5
<b>3'</b>	145,8	146,1	C	-	146,4
<b>4'</b>	134,3	135,2	C	-	137,1
<b>5'</b>	145,8	146,1	C	-	146,4
<b>6'</b>	107,9	107,9	CH	6,89	109,5
<b>1''</b>	101,9	109,3	CH	5,20	102,0
<b>2''</b>	70,0	75,1	CH	3,98	70,3
<b>3''</b>	70,4	71,0	CH	3,55	70,4
<b>4''</b>	71,3	73,7	CH	3,16	71,3
<b>5''</b>	70,6	74,3	CH	3,37	69,6
<b>6''</b>	17,5	17,0	CH <sub>3</sub>	0,84	17,2

Nota: 1:  $\delta$  em ppm utilizando TMS como padrão interno; 2:  $\delta$  teórico obtido no programa ChemDrawUltra (versão 10.0).

#### 5.14 PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA DAS CASCAS

As FAEI-C e FAEII-C apresentaram bons resultados nos ensaios biológicos (antioxidante e antifúngico), logo, estas amostras foram promissoras para a identificação e isolamento de substâncias bioativas. Além disso, a análise por CCD destas frações (Figura 22, p. 89) indicou a presença de poucas manchas na placa cromatográfica e os cromatogramas obtido por CLAE analítico (Figuras 85 e 86) indicaram a presença de poucos sinais, especialmente a FAEI-C, a qual possui um pico majoritário em 24,7 min, inferindo melhor separação dos constituintes na cromatografia em coluna.

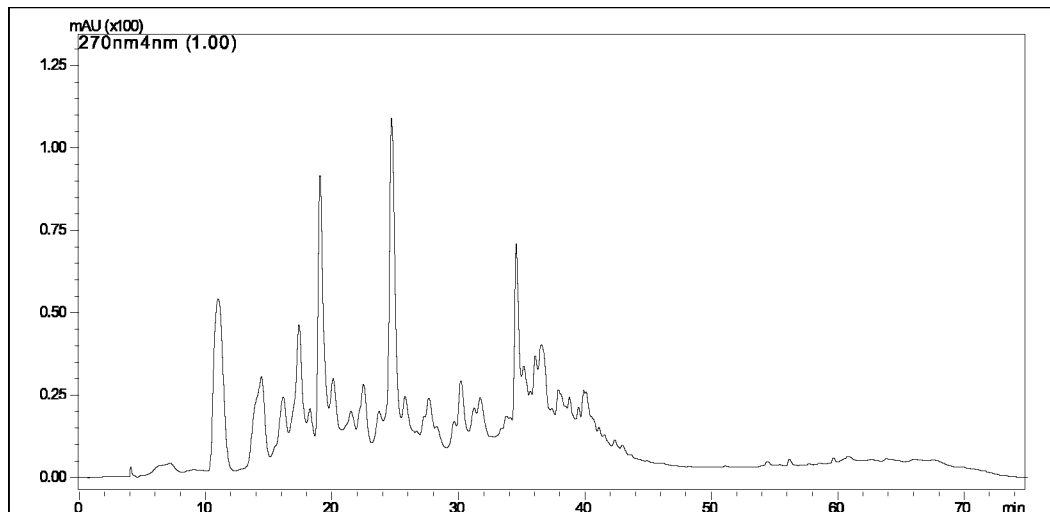
Figura 85: Cromatograma da FAEI-C.



Condições cromatográficas: 10 % B (5 min), 20% de B (10 min); 30% de B (25 min); 70% de B (40 min) e 100% B (55 min). Fonte: autora.



Figura 86: Cromatograma da FAEII-C.



Condições cromatográficas: 10 % B (5 min), 20% de B (10 min); 30% de B (25 min); 70% de B (40 min) e 100% B (55 min). Fonte: autora.

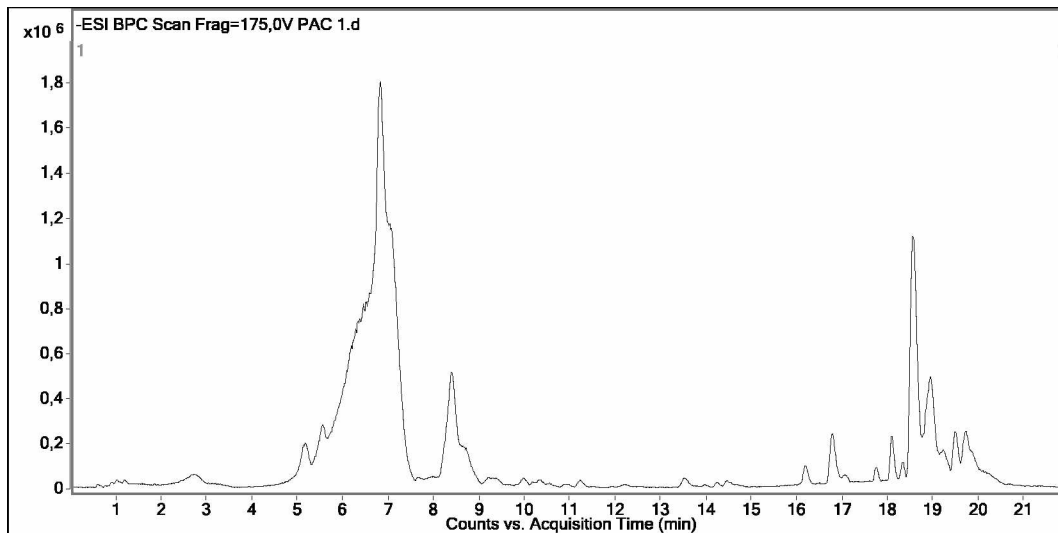
As FAEI-C e FAEII-C foram submetidas ao fracionamento cromatográfico em coluna com C18. A fase estacionária C18 possui um grupo octadecil ( $C_{18}$ ) quimicamente ligado ao átomo de silício. Este ligante volumoso confere maior hidrofobicidade à superfície da sílica e promove uma melhor eficiência cromatográfica e permite que ela fique estável ao utilizar fases móveis mais ácidas (SILVA et al., 2004, NAZARIO; LANÇAS, 2013).

No apêndice B está apresentado o fluxograma de purificação, identificação e isolamento de compostos das FAEI-C e FAEII-C.

#### 5.15 IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES DAS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA DAS CASCAS DE *I. laurina*

As FAEI-C e FAEII-C de *I. laurina* foram submetidas a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrômetro de massas de alta resolução (CLAE/EM) com ionização por eletrospray (IES) no modo negativo, e análise por espectrometria de massa sequencial (EM/EM), o cromatograma da FAEI-C está apresentado na Figura 87. Foi possível identificar 07 compostos (Tabela 38) na FAEI-C a partir dos espectros de EM/EM (Figuras 88-92) e por comparação com dados da literatura.

Figura 87: Cromatograma CLAE/EM da FAEI-C.



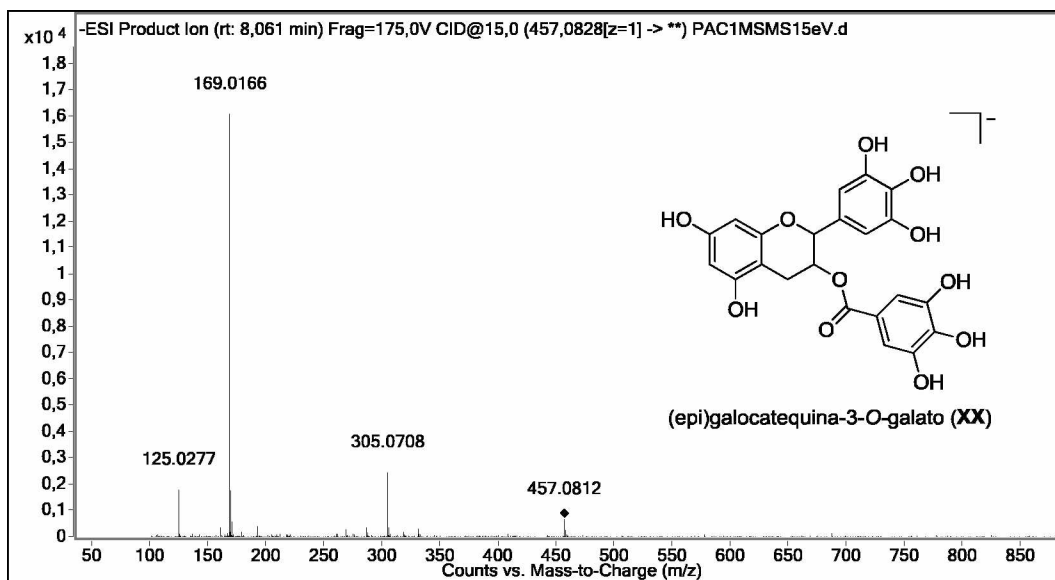
Condições cromatográficas: fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% v v<sup>-1</sup>) (A) e metanol (B), sistema gradiente de solventes: 2% de B (0 min), 98% de B (0-15 min); 100% de B (15-17 min); 2% B (17-18 min) e 2% B (18-22 min). Fonte: autora.

Os compostos **I**, **II**, **III** e **V** foram identificados na fração acetato de etila das folhas (Tabela 28). O composto **XIX** foi isolado desta fração e as análises de EM/EM e RMN serão discutidos no próximo subitem (5.16).

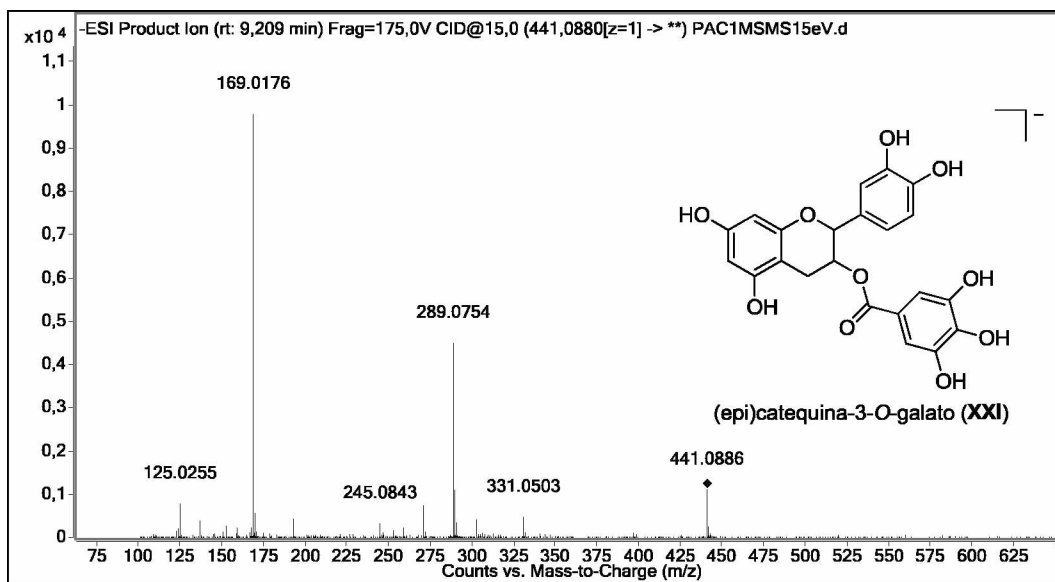
Tabela 38: Compostos identificados na FAEI-C por CLAE/EM-EM/EM.

tr(min)	[M – H] <sup>-</sup>	Massa exata	Erro (ppm)	Fragmentos <i>m/z</i>	Fórmula molecular	Composto	Referências
2,7	169,0145	169,0142	- 1,8	125	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	ácido gálico (I)	(ABDEL-HAMEED; BAZAID; SALMAN, 2013, FRACASSETTI et al., 2013)
5,2	305,0645	305,0667	7,2	261, 219, 167, 125	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	galocatequina (II) ou epigalocatequina (III)	(SUN et al., 2007, MENA et al., 2012)
6,4	319,0829	319,0823	- 1,9	166, 137/138	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	4'- <i>O</i> -metil-(epi)galocatequina (XIX)	(GARCIA et al., 1993, MAREGESI et al., 2010, RODRIGUES, 2011, HENRIQUES et al., 2016)
7,7	457,0772	457,0776	0,9	305, 169	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	(epi)galocatequina-3- <i>O</i> -galato (XX)	(DOU et al., 2007, SAVIC et al., 2014, HENRIQUES et al., 2016)
8,4	197,0457	197,0455	- 1,0	169, 124	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	galato de etila (V)	(SUN et al., 2007, WYREPKOWSKI et al., 2014)
9,1	441,0827	441,0827	0	289, 245, 169, 125	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	(epi)catequina-3- <i>O</i> -galato (XXI)	(DOU et al., 2007, SAVIC et al., 2014)
9,3	471,0922	471,0933	2,3	319, 183, 169, 125	C <sub>23</sub> H <sub>12</sub> O <sub>11</sub>	4'- <i>O</i> -metil-(epi)galocatequina-3- <i>O</i> -galato (XXII)	(HENRIQUES et al., 2016)
9,7	425,0877			305, 287, 161, 125		n.i	
9,7	717,1819			608, 397, 319, 215		n.i	
10,1	287,0555			161, 125		n.i	
10,2	455,0989			305, 287, 161, 125		n.i	
10,3	485,1083	485,1089	1,2	305, 287, 197, 161, 125	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	(epi)galocatequina-3- <i>O</i> -(3'',4''- <i>O</i> -dimetil) galato (XXIII) ou (epi)galocatequina-3- <i>O</i> -(3'',5''- <i>O</i> -dimetil) (XXIV)	(CHIU; LIN, 2005, KIRITA et al., 2015)
10,4	651,1700			331, 319, 305, 287		n.i	
10,9	665,1854			345, 319		n.i	
10,9	187,0972			125		n.i	
13,6	163,0398	163,0401	1,8	119	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	ácido <i>p</i> -cumárico (XXV)	(SUN et al., 2007)

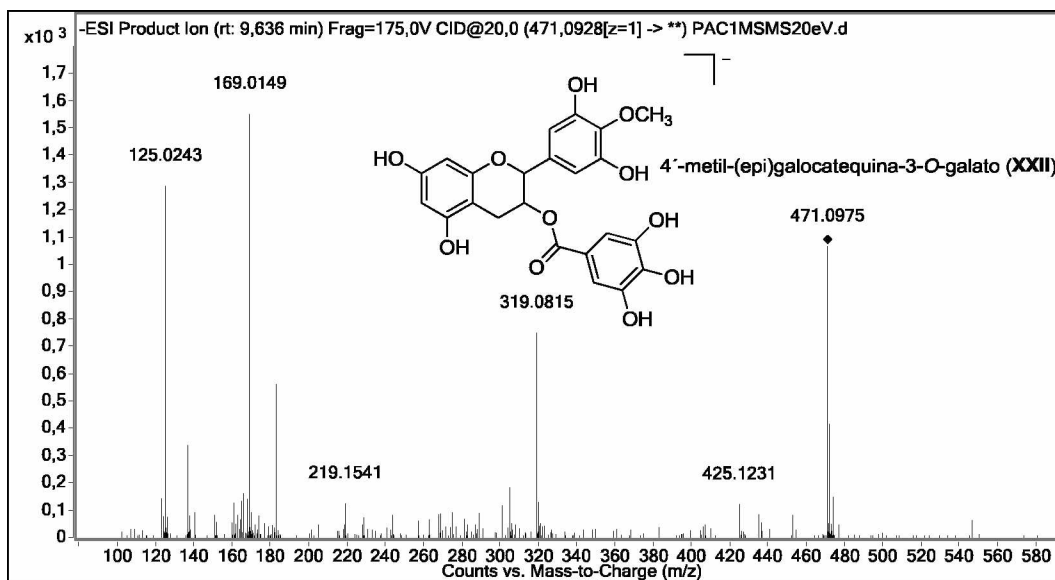
Fonte: autora.

Figura 88: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  457.

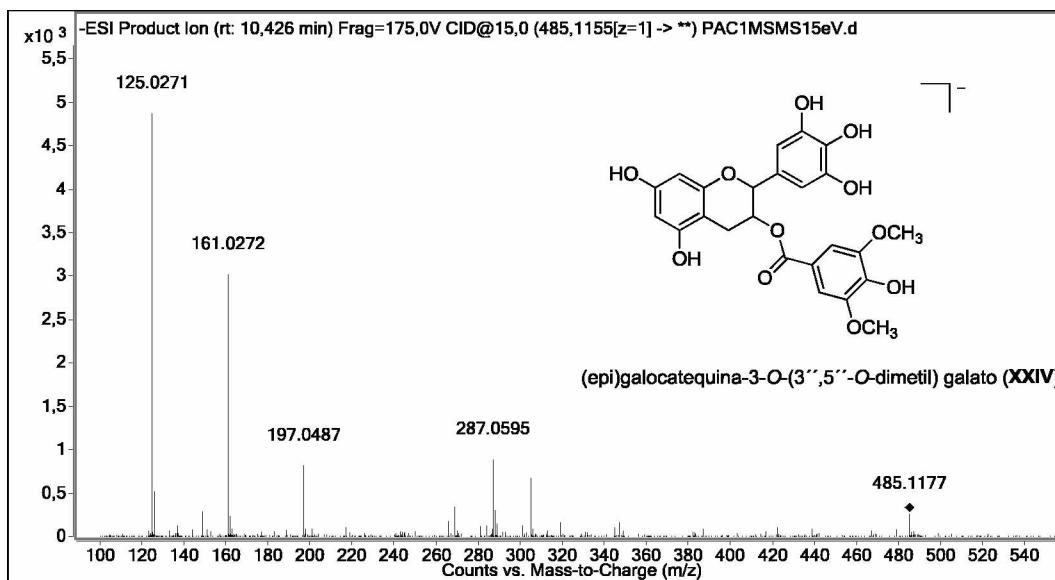
Fonte: autora.

Figura 89: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  441.

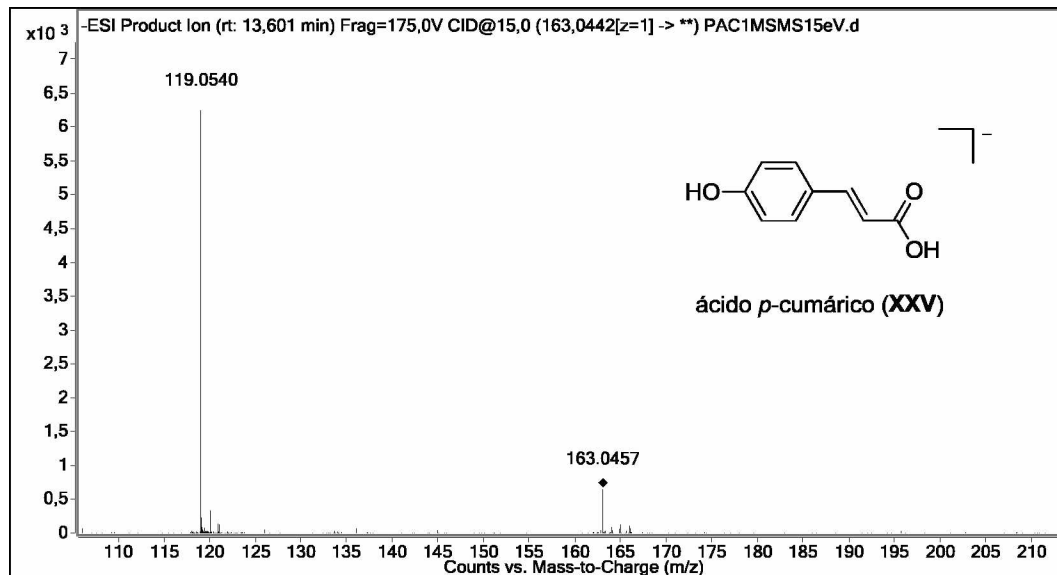
Fonte: autora.

Figura 90: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  471.

Fonte: autora.

Figura 91: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  485.

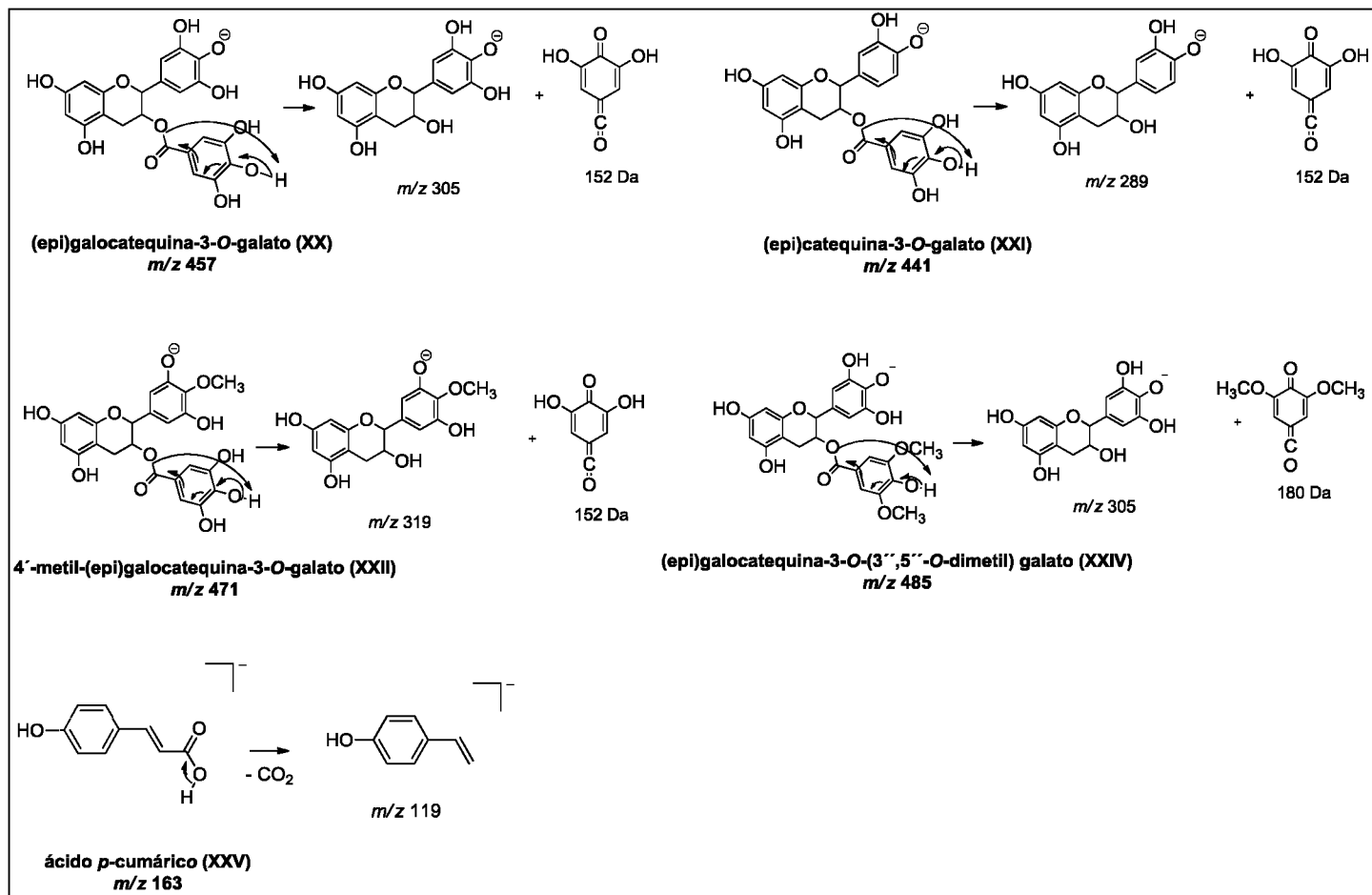
Fonte: autora.

Figura 92: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  163.

Fonte: autora.

Os mecanismos de fragmentação dos compostos **XX-XXV** estão apresentados na Figura 93. A principal fragmentação dos íons é a perda de 152 Da (grupo galoil) através do mecanismo QM, ocorrendo a formação dos íons  $m/z$  305, 289 e 319 nos compostos **XX**, **XXI** e **XXII**, respectivamente. Os compostos **XXIII** e **XXIV** foram identificados como sendo derivados da (epi)galocatequina com dois grupos metil ligados ao grupo galoil, foi apresentada apenas a fragmentação para o composto **XXIV** porque a fragmentação do composto **XXIII** é semelhante ao composto **XXIV**. A principal fragmentação do íon  $m/z$  485 (compostos **XXIV/XXV**) também é a perda do grupo galoil formando o íon  $m/z$  305. O composto **XXV** foi identificado como ácido *p*-cumárico,  $m/z$  163. A formação do íon  $m/z$  119 corresponde a perda de  $\text{CO}_2$  [ $\text{M} - 44 - \text{H}$ ] $^-$  do íon  $m/z$  163.

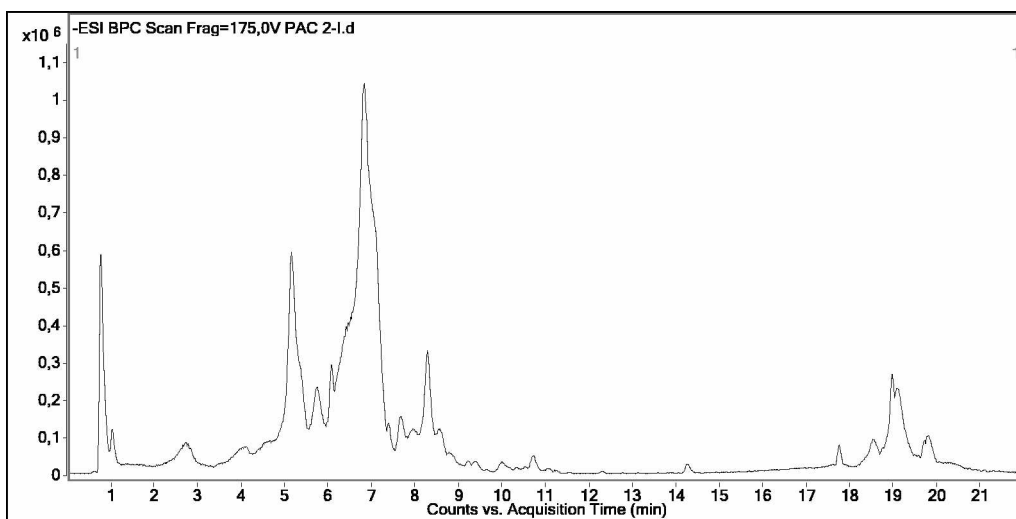
Figura 93: Mecanismos de fragmentação dos compostos XX-XXV.



Fonte: autora.

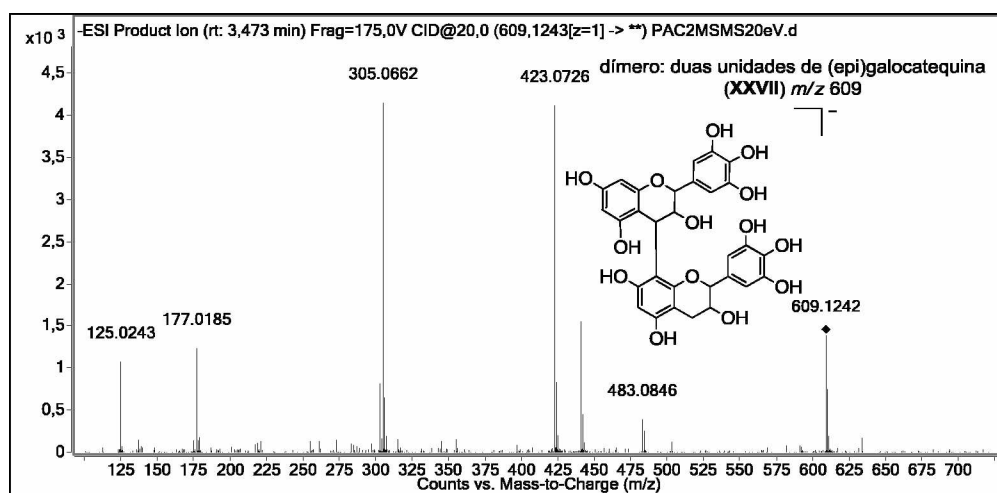
O cromatograma da FAEII-C está apresentado na Figura 94. Foi possível identificar apenas 02 compostos diferentes das frações das folhas e das cascas já analisadas (Tabela 39) a partir dos padrões de fragmentação de massa sequencial e por comparação com dados da literatura. O composto **XXVI** foi isolado desta fração e as análises de EM/EM serão discutidas no subitem 5.17.2. O espectro de EM/EM do composto identificado **XXVII** está apresentado na Figura 95.

Figura 94: Cromatograma CLAE/EM da FAEII-C.



Condições cromatográficas: fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% v v<sup>-1</sup>) (A) e metanol (B), sistema gradiente de solventes: 2% de B (0 min), 98% de B (0-15 min); 100% de B (15-17 min); 2% B (17-18 min) e 2% B (18-22 min). Fonte: autora.

Figura 95: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  609.



Fonte: autora.



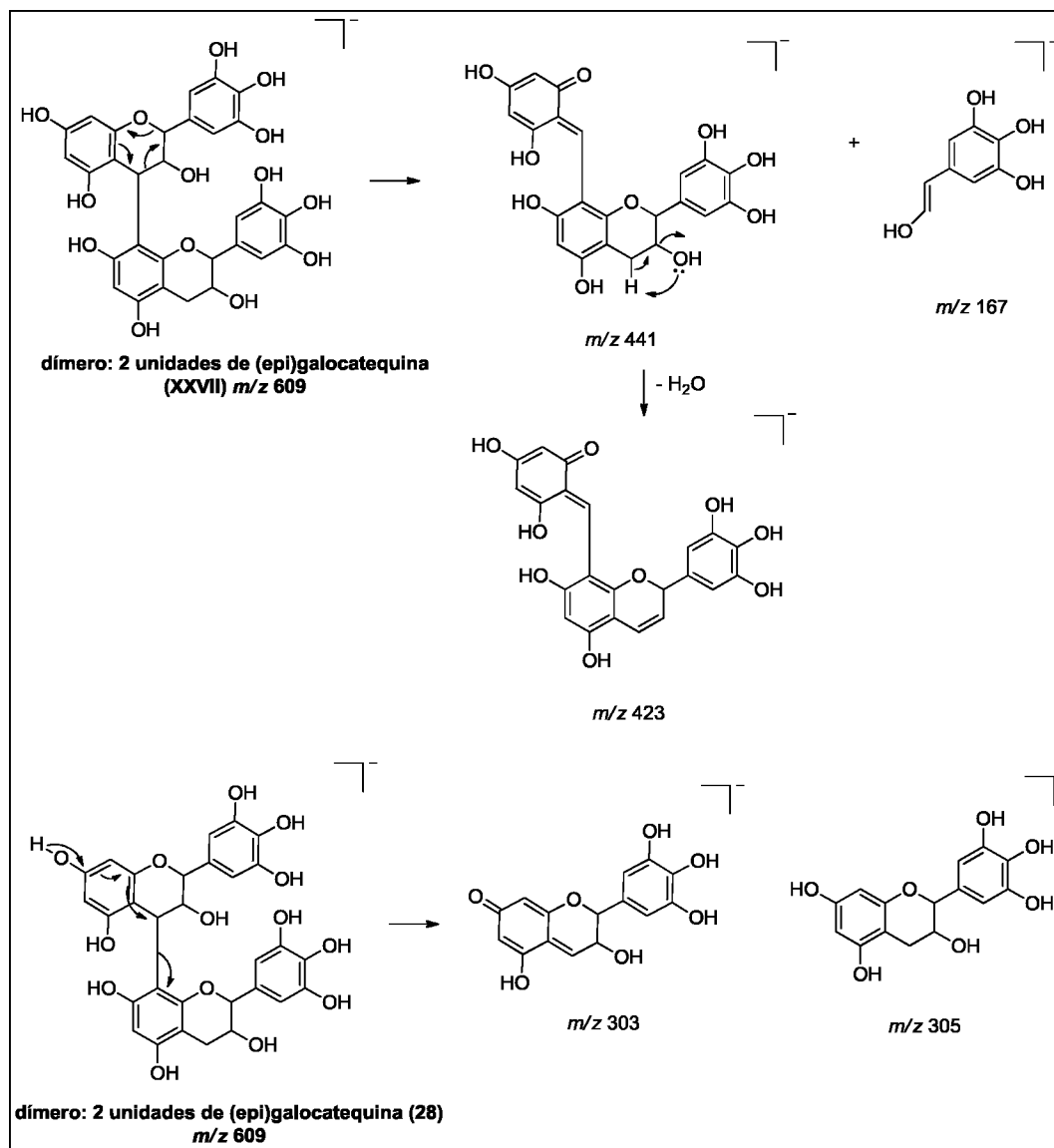
Tabela 39: Compostos identificados na FAE-II-C por CLAE/EM-EM/EM.

tr(min)	[M – H] <sup>-</sup>	Massa exata	Erro (ppm)	Fragmentos m/z	Fórmula molecular	Composto	Referências
0,8	623,1409	623,1406	- 0,5	497, 455, 437, 303, 125	C <sub>31</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	dímero: 4'-O-metil-(epi)galocatequina e (epi)galocatequina (XXVI)	(HENRIQUES et al., 2016)
1,1	305,0662	305,0667	1,6	261, 219, 167, 125	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	galocatequina (II) ou epigalocatequina (III)	(SUN et al., 2007, MENA et al., 2012)
2,7	169,0142	169,0142	0	125	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	ácido gálico (I)	(ABDEL-HAMEED; BAZAID; SALMAN, 2013, FRACASSETTI et al., 2013)
3,3	609,1242	609,1250	1,3	483, 441, 423, 305, 177, 125	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	prodelfinidina B-4 (XXVII) dímero: duas unidades de(epi)galocatequina	(DOU et al., 2007, RIEHLE; VOLLMER; ROHN, 2013, HENRIQUES et al., 2016, MAGGI et al., 2016)
5,1	623,1402	623,1406	0,6	497, 455, 437, 303, 125	C <sub>31</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	dímero: 4'-O-metil-(epi)galocatequina e (epi)galocatequina (XXVI)	(HENRIQUES et al., 2016)
5,5	927,1952			741, 623, 455, 303, 125		n.i.	
6,0	775,1504			623, 497, 455, 437, 303, 177, 169, 125		n.i.	
6,8	319,0830	319,0823	- 2,2	181, 166, 137, 125	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	4'-O-metil-(epi)galocatequina (XIX)	(GARCIA et al., 1993, MAREGESI et al., 2010, RODRIGUES, 2011, HENRIQUES et al., 2016)
7,6	457,0789	457,0776	- 2,8	305, 169	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	(epi)galocatequina-3-O-galato (XX)	(DOU et al., 2007, SAVIC et al., 2014, HENRIQUES et al., 2016)
8,4	197,0463	197,0455	- 4,1	169, 124	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	galato de etila (V)	(SUN et al., 2007, WYREPKOWSKI et al., 2014)
8,7	605,1160			465, 453, 313, 169, 125		n.i.	
8,9	497,1321			313, 169, 125		n.i.	
9,1	151,0410					n.i.	
9,1	441,0848	441,0827	- 4,8	289, 245, 169, 125	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	(epi)catequina-3-O-galato (XXI)	(DOU et al., 2007, SAVIC et al., 2014)
9,3	471,0955	471,0933	- 4,7	319, 183, 169, 125	C <sub>23</sub> H <sub>12</sub> O <sub>11</sub>	4'-O-metil-(epi)galocatequina-3-O-galato (XXII)	(HENRIQUES et al., 2016)
9,6	649,1435			465, 313, 305, 169, 125		n.i.	
9,8	717,1839			608, 397, 319, 215		n.i.	
10,7	541,1379			313, 227, 169		n.i.	
11,001	693,1476			541, 465, 313, 169, 125		n.i.	

Fonte: autora.

O mecanismo de fragmentação do composto **XXVII** está apresentado na Figura 96. O íon  $m/z$  441  $[M - 168 - H]^-$  é formado a partir do mecanismo RDA no anel C. Em seguida ocorre a eliminação de água para formar o íon  $m/z$  423. Através do mecanismo QM ocorre a clivagem entre as unidades monoméricas de (epi)galocatequina e a formação do íon  $m/z$  305.

A identificação por CLAE/EM-EM/EM dos compostos das frações acetato de etila das folhas e das cascas corroborou os resultados obtidos até o momento, pois as classes de flavonoides presentes nas folhas e nas cascas apresentam diferenças, como foi verificado na triagem fitoquímica, nos espectros UV-VIS, teor de proantocianidinas e teor de flavonoides. Nas folhas foram identificados principalmente flavonoides derivados da miricetina e quercetina que pertencem a classe dos flavonois, enquanto na casca foram identificados principalmente flavonoides derivados na (epi)galocatequina que pertence a classe dos flavan-3-óis. A principal diferença na estrutura química dos flavonoides está no anel C, nos flavonois há uma ligação dupla no anel C que permite a conjugação com o anel B e por isso a presença de duas bandas de absorção no espectro UV-VIS, além da presença da carbonila no carbono C4 do anel C, que permite a complexação com os reagentes utilizados nos ensaios da triagem fitoquímica e teor de flavonoides, enquanto nos flavan-3-óis o anel C é saturado e há a presença de uma hidroxila no carbono C3 do anel C, além disso essa classe forma a estrutura das proantocianidinas, por isso foi encontrado um resultado maior no ensaio do teor de proantocianidinas para as cascas.

Figura 96: Mecanismo de fragmentação do composto **XXVII**.

Fonte: autora.

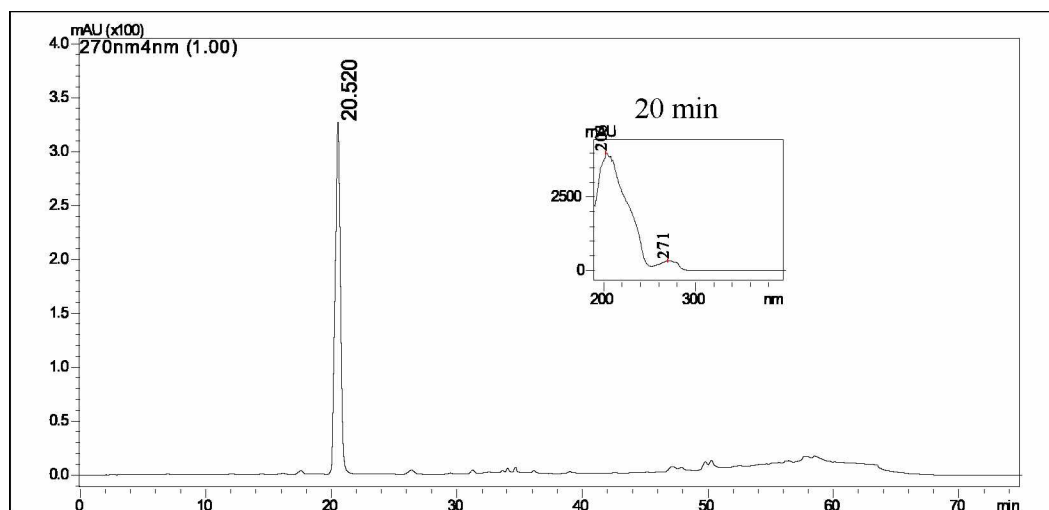
### 5.16 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO ISOLADO DA FAEI-2-C

Após o fracionamento da FAEI-C de *I. laurina*, foram obtidas 12 frações (Figura 21, p. 82). Destas frações, a FAEI-2-C apresentou uma mancha na placa cromatográfica analisada por CCD que foi separada obtendo 105 mg, em seguida essa fração foi purificada por CLAE semipreparativo. O cromatograma desta fração está apresentado na Figura 97, em que se observa a presença de um pico majoritário em 20,5 min, após a

coleta e evaporação do solvente, foram obtidos 45 mg do composto purificado, o qual foi identificado por RMN e EM/IES-EM/EM no modo negativo.

Na Figura 97 está apresentado o espectro de UV-VIS do composto FAEI-2-C, em que pode ser observado a presença de uma banda em 271 nm sugerindo a absorvância característica do anel A da estrutura de um flavonoide, logo, este composto pertence a classe dos flavanóis, nos quais o anel C não está conjugado com o anel B e por isso a presença de apenas uma banda de absorção (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996, ALONSO-SALCES et al., 2004, KUMAR; PANDEY, 2013).

Figura 97: Cromatograma por CLAE semipreparativo da FAEI-2-C.

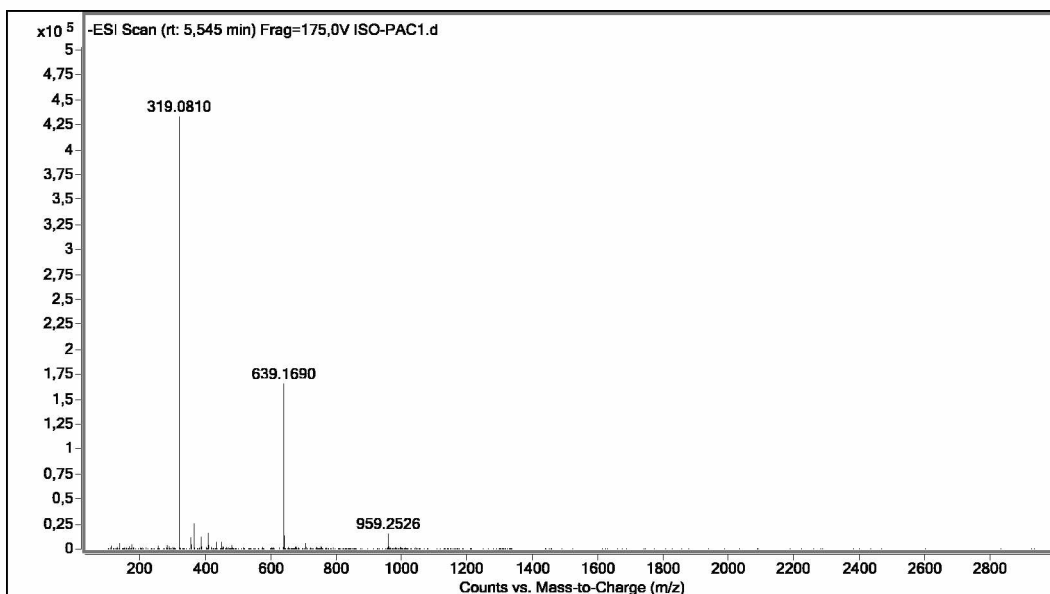


Condições cromatográficas: fase móvel – água (A) e metanol (B), sistema gradiente de solventes – 10% B (5 min), 20% de B (10 min); 30% de B (25 min); 70% de B (40 min) e 100% B (55 min) com fluxo de 8,0 mL min<sup>-1</sup>. Fonte: autora.

Após a análise por EM/IES-EM/EM no modo negativo e por RMN, foi possível identificar este composto como a 4'-O-metilgalocatequina (**XIX**), um composto de coloração branca que possui massa molecular de 320,09 g mol<sup>-1</sup> (C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>).

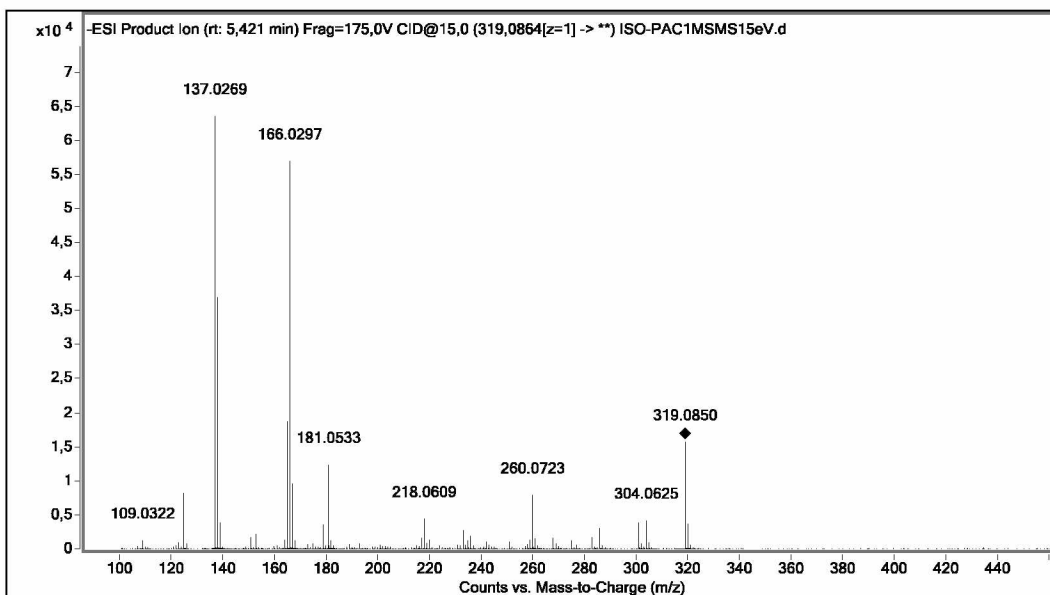
A partir do espectro de massas de alta resolução do composto FAEI-2-C (Figura 98) foi possível determinar a massa molecular do composto [M – H]<sup>-</sup> *m/z* 319,0810 (massa adquirida), a massa exata do composto obtida pelo programa ChemDraw Ultra (versão 10.0) foi *m/z* 319,0823, obtendo um erro de -4,1 ppm. Os picos *m/z* 639,1690 e *m/z* 959,2526 correspondem a formação de *cluster* do composto FAEI-2-C. Os principais fragmentos do íon *m/z* 319, obtidos por massa sequencial, estão apresentados na Figura 99.

Figura 98: Espectro de massas de alta resolução do composto FAEI-2-C.



Fonte: autora.

Figura 99: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  319.

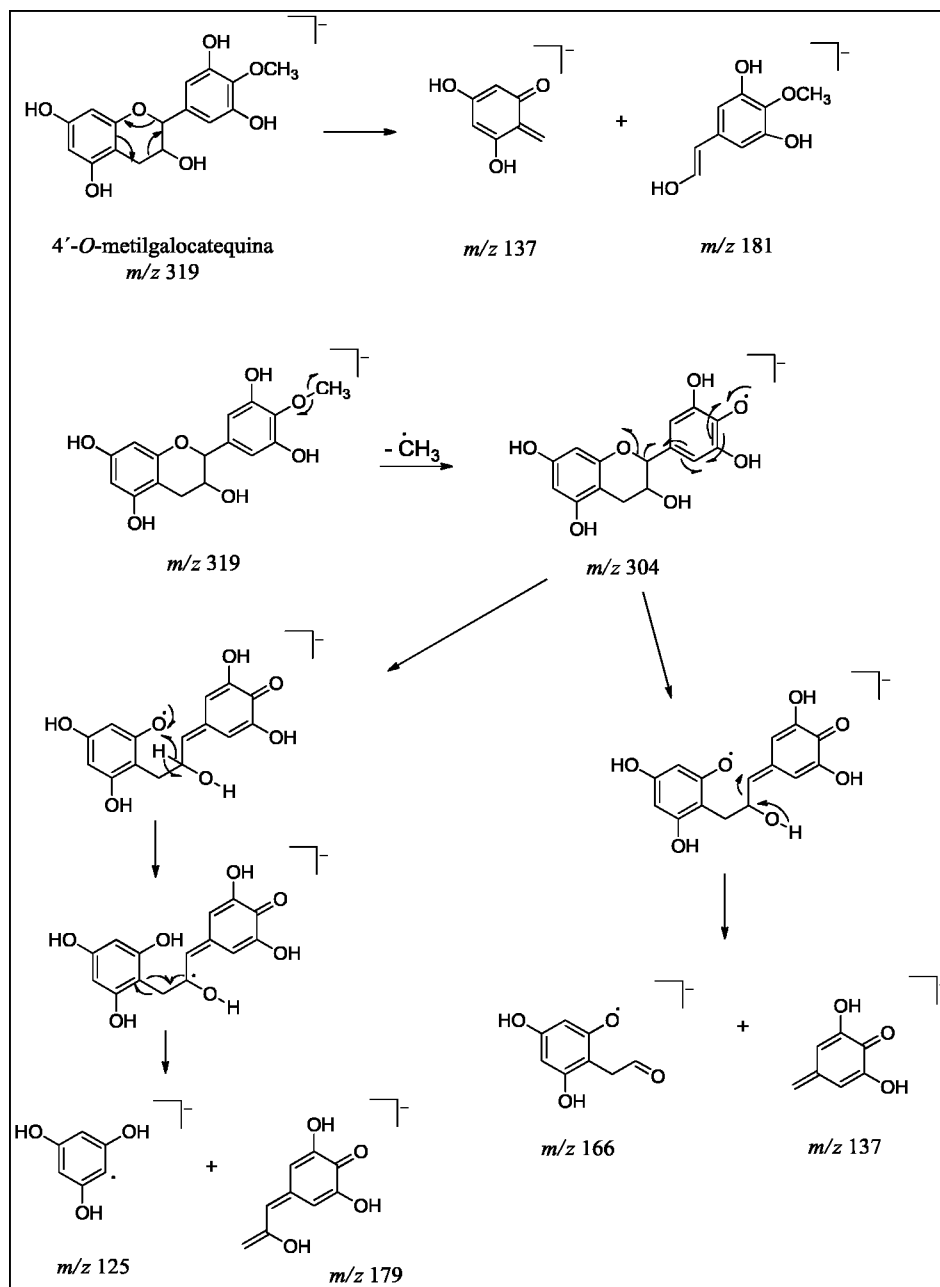


Fonte: autora.

A proposta de fragmentação para o composto FAEI-2-C está apresentada na Figura 100. A formação dos íons  $m/z$  137  $[M-182-H]^-$  e  $m/z$  181  $[M-138-H]^-$  ocorre através do mecanismo RDA no anel C, originando os dois fragmentos. A perda de uma

metila através de uma clivagem homolítica da metoxila origina o íon  $m/z$  304  $[M-15-H]^-$ . A partir desse íon ocorre a formação dos íons  $m/z$  166  $[M-153-H]^-$  através do mecanismo clivagem heterocíclica de anel (CHA), esta clivagem é favorecida pela formação de uma radical fenóxido no anel A, o qual é estabilizado pela deslocalização de elétrons, em que ocorre a ruptura do anel C da estrutura do flavonoide. O íon  $m/z$  125  $[M-194-H]^-$  é formado após a CHA através da captura do hidrogênio carbinólico (H-3), resultando na transferência de um elétron para o carbono C-3. Em seguida ocorre uma clivagem homolítica entre os carbonos C-4 e C-10 (MIKETOVA et al., 2000, LI; DEINZER, 2007, RODRIGUES et al., 2007, HAMED et al., 2014, DEMARQUE et al., 2016).

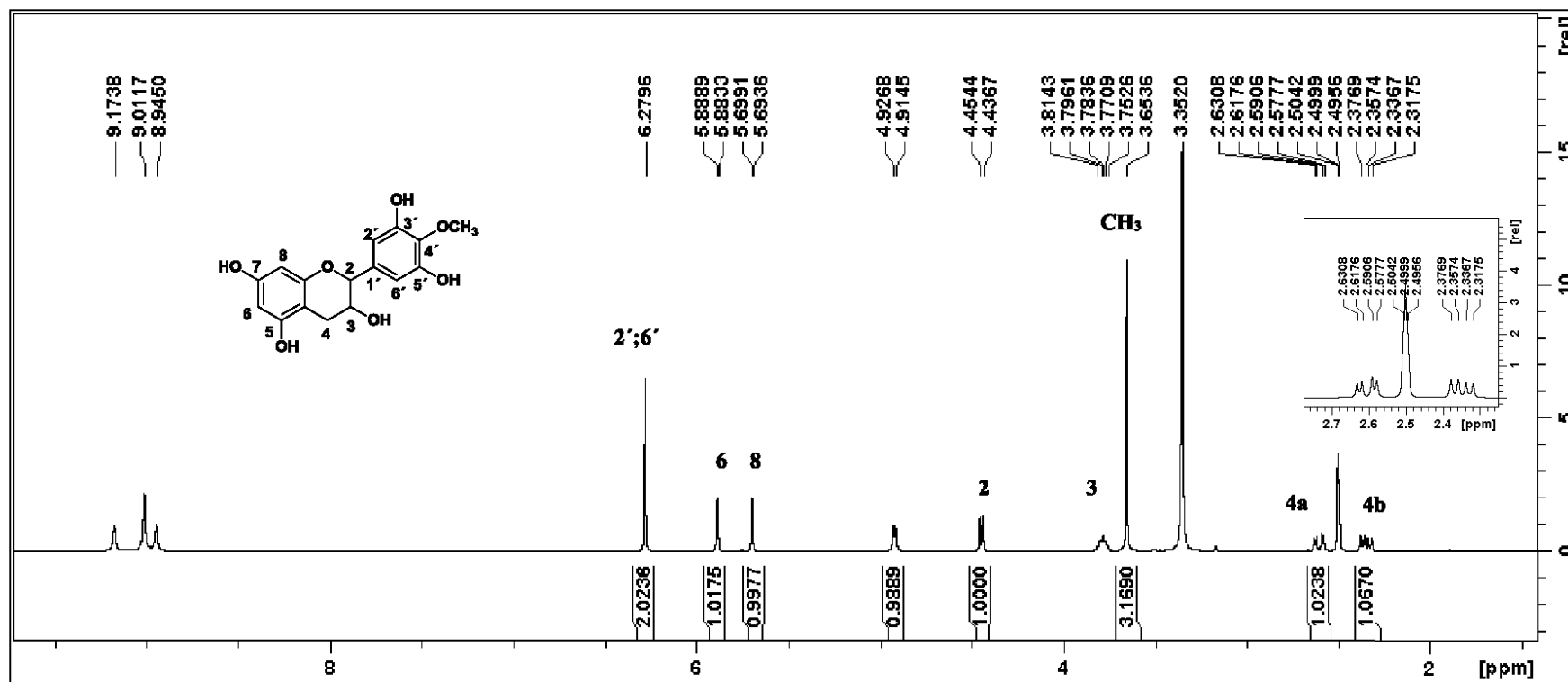
Figura 100: Mecanismo de fragmentação da 4'-*O*-metilgalocatequina.



Fonte: a autora, adaptado de Miketova e outros (2000), Rodrigues e outros (2007) e Hamed e outros (2014).

A Figura 101 mostra o espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto FAEI-2-C e a Figura 102 a ampliação do espectro na região de hidrogênios aromáticos.

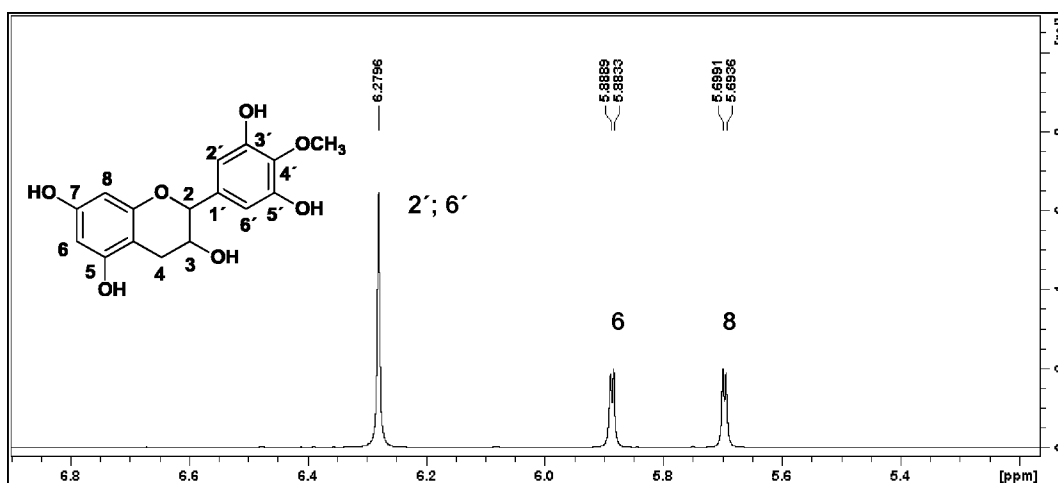
Figura 101: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) do composto FAEI-2-C.



Fonte: autora.



Figura 102: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) na região de aromático do composto FAEI-2-C.



Fonte: autora.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 101) aparecem três sinais na região entre  $\delta$  8,0 e 9,2, estes sinais são atribuídos as interações intermoleculares do solvente utilizado nas análises (DMSO) e as hidroxilas de compostos fenólicos. Como os compostos presentes nas frações analisadas pertencem a classe dos flavonoides, os hidrogênios das hidroxilas fenólicas fazem ligação de hidrogênio com o oxigênio do DMSO e, então, aparecem os sinais na região acima de  $\delta$  8,0 dependendo da estrutura do composto (ABRAHAM; MOBLI, 2007, CHARISIADIS et al., 2014).

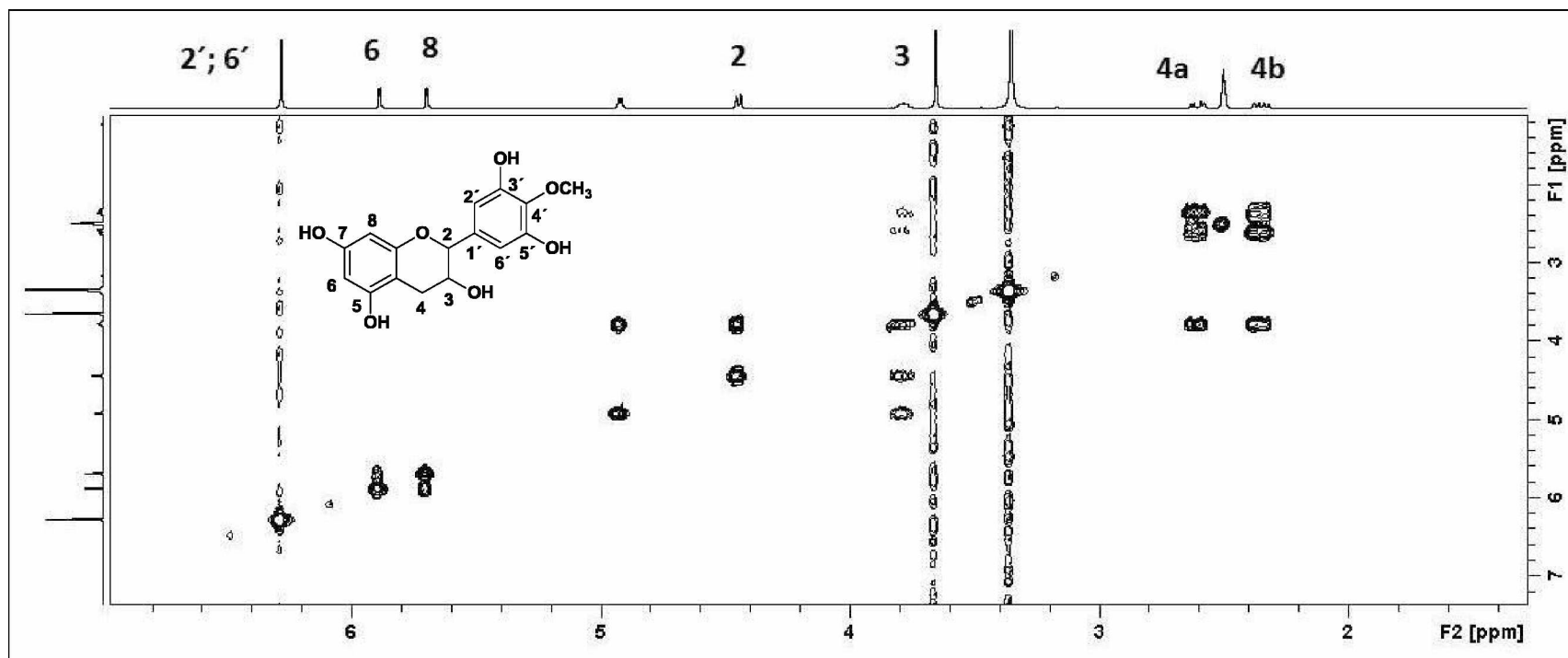
No espectro da Figura 101 foi observada a presença de um singlete em  $\delta$  3,65, o qual foi atribuído aos hidrogênios do grupo metil, pois este sinal está deslocado devido a desblindagem do átomo de oxigênio ligado ao grupo metila. O duplete em  $\delta$  4,44 (1H,  $J = 7,2$  Hz) foi atribuído H-2 e o multiplete em  $\delta$  3,78 (1H) ao H-3, o valor da constante de acoplamento encontrada para H-2 é característica de hidrogênios *trans*-diaxial, fato que justifica que o composto FAEI-2-C seja um derivado da galocatequina e não da epigalocatequina. Também foram atribuídos os sinais dois duplos dupletos em  $\delta$  2,60 (1H,  $J = 16,1$  e  $5,2$  Hz) ao H-4a e  $\delta$  2,34 (1H,  $J = 16,0$  e  $7,8$  Hz) ao H-4b. Os hidrogênios do carbono C4 estão ao lado do carbono C3, o qual é assimétrico, assim os sinais do H-4 são desdobrados em duplo duplete por serem diastereotópicos, apresentando acoplamento vicinal (H4a-H3; H4b-H3) e geminal (H4a-H4b).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  na região de aromáticos (Figura 102) aparecem três sinais referentes aos hidrogênios do composto nos anéis A e B do flavonoide, um

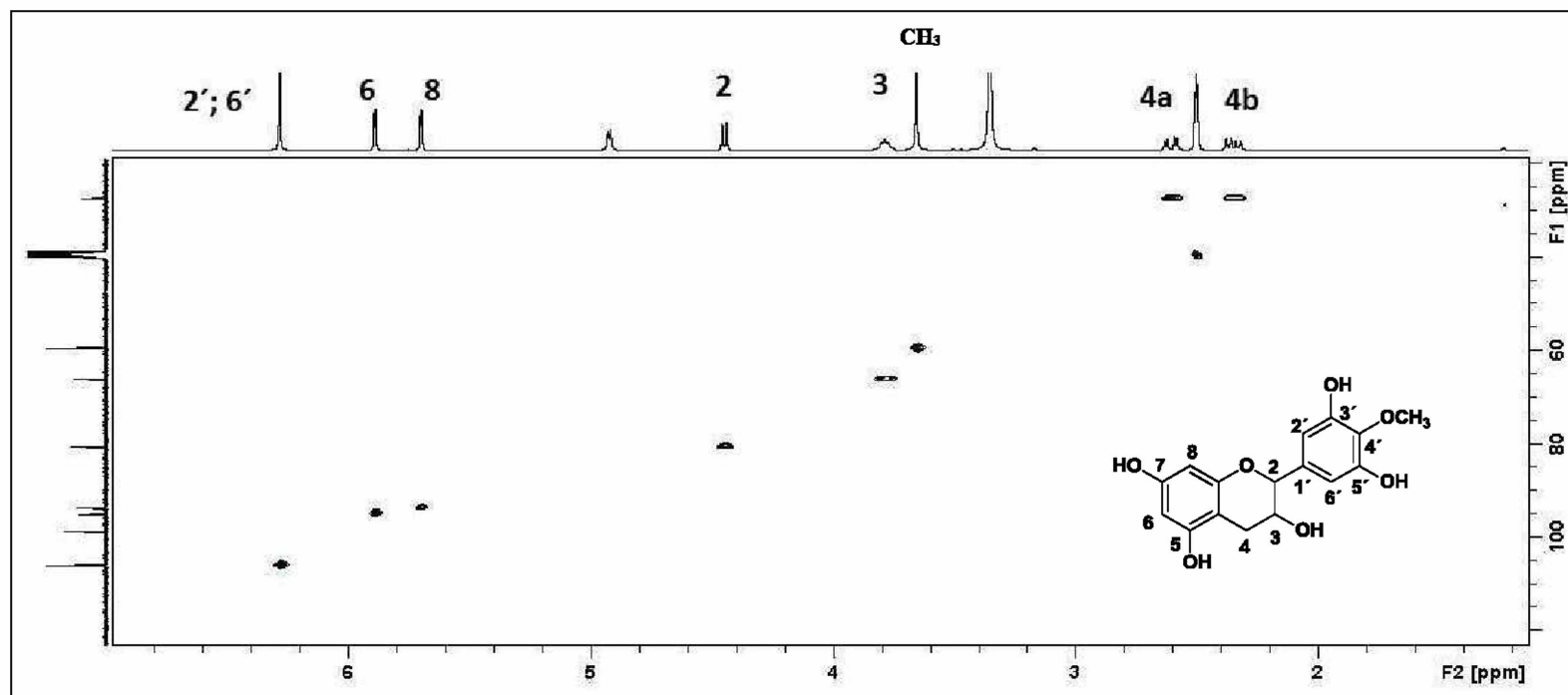
**singleto em  $\delta$  6,28** atribuído a H-2' e H-6' que são equivalentes e dois dupletos em  $\delta$  5,89 e 5,70, ambos com  $J = 2,2$  Hz, característico de acoplamentos *meta* dos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, no anel A.

Através da análise do mapa de contorno COSY (Figura 103) foram confirmados os acoplamentos entre os hidrogênios do composto. O H-2 em  $\delta$  4,44 (duplete) acopla com o H-3 em  $\delta$  3,78 (multiplete), o qual está acoplado com H-4a em  $\delta$  2,60 e H4b em  $\delta$  2,34 (duplos dupletos). Foi possível verificar os acoplamentos entre H-6 em  $\delta$  5,89 e H-8 em  $\delta$  5,70, os quais estão na posição *meta* no anel A.

Através mapa de contorno HSQC (Figura 104) foram feitas as correlações dos carbonos e hidrogênios do composto. Os hidrogênios H-2' e H-6' correlacionam com os carbonos C2' e C6' em  $\delta$  106,1, que são equivalentes, H-6 correlaciona com o carbono C6 em  $\delta$  95,1 e o H-8 com C-8 em  $\delta$  93,8. Também foram feitas as correlações entre hidrogênio e carbono no anel C, o H-2 correlaciona com C2 em  $\delta$  80,8, H-3 com C3 em  $\delta$  66,3 e H4a e H4b com C4 em  $\delta$  27,5.

Figura 103: Mapa de contorno COSY (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEL-2-C.

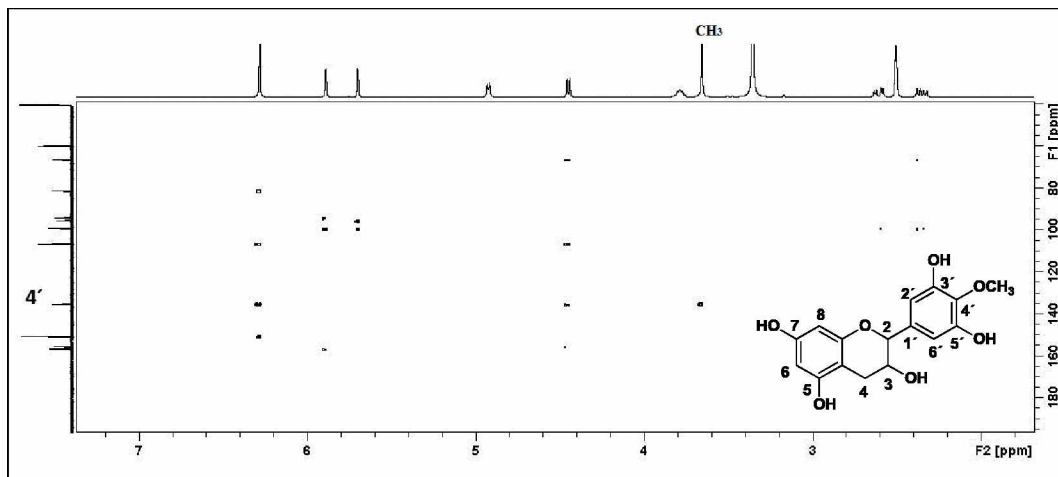
Fonte: autora.

Figura 104: Mapa de contorno HSQC (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEL-2-C.

Fonte: autora.

A posição do grupo metil foi confirmada pela análise do mapa de contorno HMBC (Figura 105), em que foi verificado que os hidrogênios metílicos em  $\delta$  3,65 (singleto) estão correlacionados com C4' em  $\delta$  135,0 que pertence ao anel B da estrutura do flavan-3-ol.

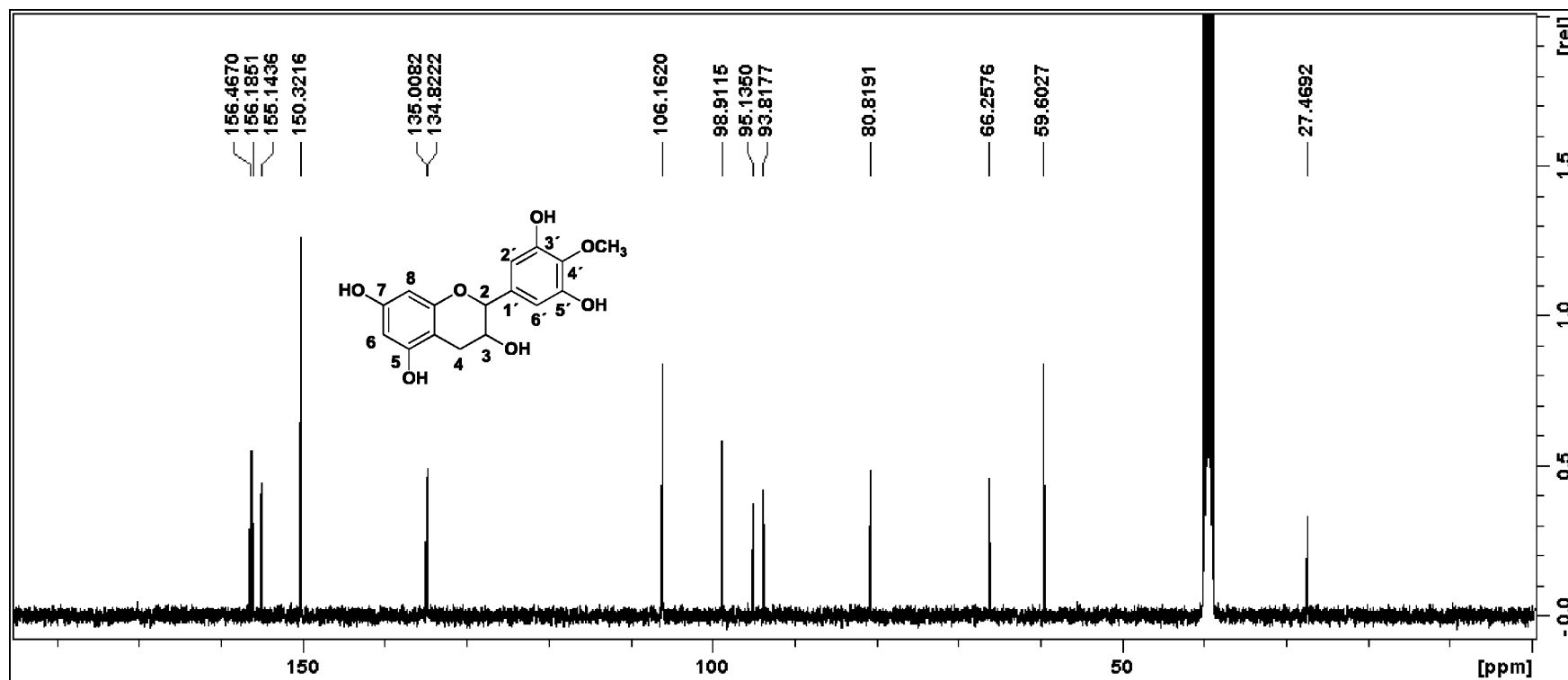
Figura 105: Mapa de contorno HMBC (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEI-2-C.



Fonte: autora.

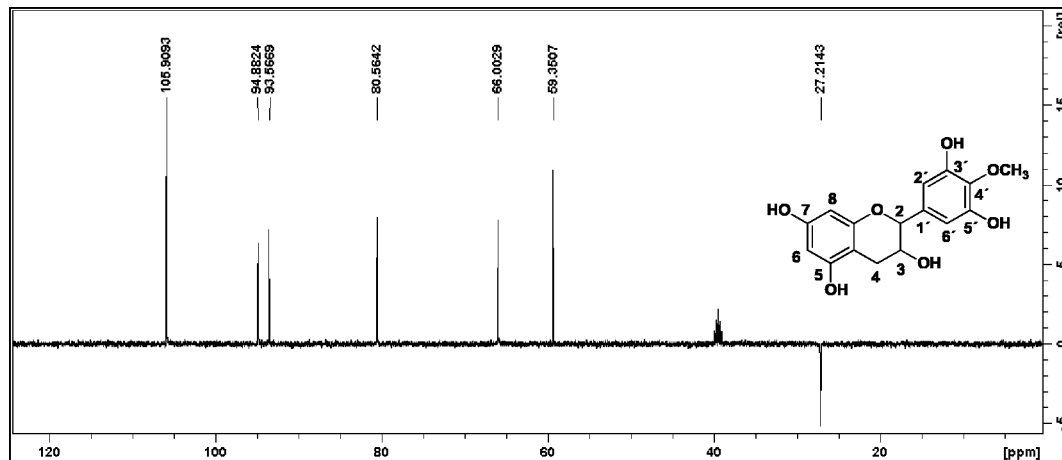
A partir dos espectros de RMN (aliados aos de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 106) e DEPT-135 (Figura 107)) e por comparação com os dados da literatura, o composto FAEI-2-C foi identificado como a 4'-O-metilgalocatequina. É a primeira vez que este composto foi isolado e identificado no gênero *Inga*.

As Tabelas 40 e 41 mostram as correlações de todos os hidrogênios e carbonos do composto FAEI-2-C.

Figura 106: Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto FAEI-2-C.

Fonte: autora.

Figura 107: Espectro DEPT-135 do composto FAEI-2-C.



Fonte: autora.

Tabela 40: Atribuição dos hidrogênios do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto FAEI-2-C e comparados com a da (+)-(2*R*, 3*S*)-4'-*O*-metilgalocatequina.

Posição	RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta^1$ ; $m^2$ ; $J^3$	COSY	RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta^1$ ; $m^2$ ; $J^3$ (RODRIGUES, 2011)
<b>2</b>	4,44 <i>d</i> (7,2)	H-3	4,45 <i>d</i> (7,5)
<b>3</b>	3,78 <i>m</i>	H-2 e H-4a,b	3,80 <i>d</i> (6,5)
<b>4a</b>	2,60 <i>dd</i> (5,2 e 16,1)	H-3 e H-4b	2,62 <i>dd</i> (5,1 e 15,9)
<b>4b</b>	2,34 <i>dd</i> (7,8 e 16,1)	H-3 e H-4a	2,37 <i>dd</i> (7,8 e 16,2)
<b>6</b>	5,89 <i>d</i> (2,2)	H-8	5,88 <i>d</i> (2,5)
<b>8</b>	5,70 <i>d</i> (2,2)	H-6	5,71 <i>d</i> (2,5)
<b>2'</b>	6,28 <i>s</i>	-	6,28 <i>s</i>
<b>6'</b>	6,28 <i>s</i>	-	6,28 <i>s</i>
<b>(CH<sub>3</sub>)</b>	3,65 <i>s</i>	-	3,65 <i>s</i>

Nota: 1: deslocamento químico em ppm utilizando TMS como padrão interno; 2: multiplicidade (*s* = singlete, *d* = duplete, *dd* = duplo duplete, *m* = multiplete); 3: constante de acoplamento expresso em Hz.

Tabela 41: Atribuição dos carbonos do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto FAEI-2-C e comparados com a (+)-(2*R*, 3*S*)-4'-*O*-metilgalocatequina.

Posição	$\delta^1$	$\delta^2$	(100 MHz, DEPT-135, DMSO- $d_6$ )	HSQC <sup>1</sup>	RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, DMSO- $d_6$ ) (RODRIGUES, 2011)
<b>2</b>	80,8	86,0	CH	4,44	82,4
<b>3</b>	66,3	67,7	CH	3,78	68,6
<b>4</b>	27,5	28,1	CH <sub>2</sub>	2,60; 2,34	27,9
<b>5</b>	156,2	157,2	C	-	157,5
<b>6</b>	95,1	95,3	CH	5,89	96,4
<b>7</b>	156,5	157,8	C	-	157,7
<b>8</b>	93,8	94,8	CH	5,70	95,6
<b>9</b>	155,1	157,3	C	-	156,6
<b>10</b>	98,9	99,4	C	-	100,7
<b>1'</b>	134,8	130,6	C	-	136,6
<b>2'</b>	106,1	107,4	CH	6,28	107,4
<b>3'</b>	150,3	150,7	C	-	151,5
<b>4'</b>	135,0	137,3	C	-	136,4
<b>5'</b>	150,3	150,7	C	-	151,5
<b>6'</b>	106,1	107,4	CH	6,28	107,4
<b>(CH<sub>3</sub>)</b>	59,6	60,8	CH <sub>3</sub>	3,65	60,8

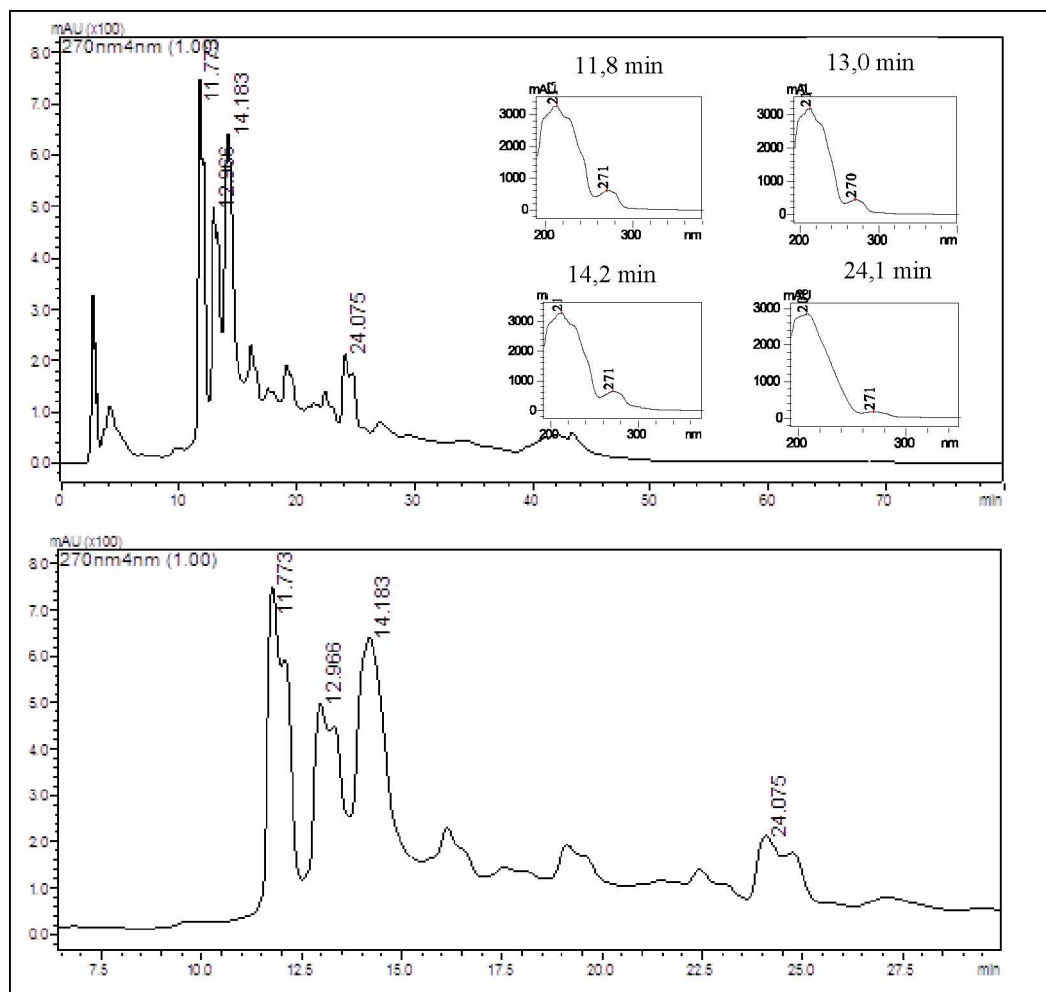
Nota: 1:  $\delta$  em ppm utilizando TMS como padrão interno; 2:  $\delta$  teórico obtido no programa ChemDrawUltra (versão 10.0).

#### 5.17 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DA FAEII-C DAS CASCAS

A partir do fracionamento em coluna da FAEII-C, foram obtidas 10 frações (Figura 21, p. 82), as frações FAEII-4-C e FAEII-5-C foram submetidas a análise por CLAE semipreparativo para separação dos constituintes químicos. A partir do cromatograma da FAEII-4-C (Figura 108) foi observado a presença de quatro picos majoritários, em 11,8, 13,0, 14,2 e 24,1 min e pelo perfil da FAEII-5-C (Figura 109) os picos em 16,9 e 35,5 min foram coletados para identificação dos compostos.

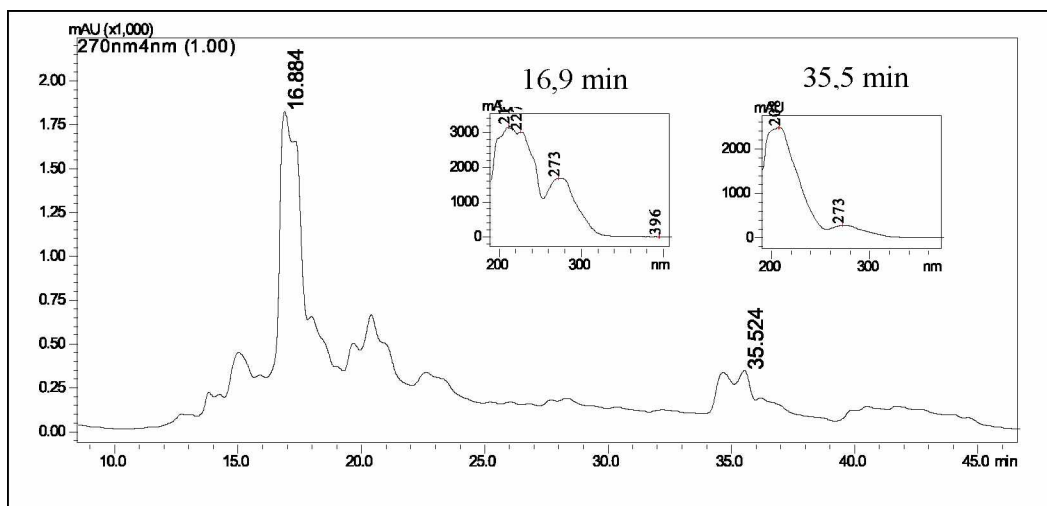


Figura 108: Cromatograma por CLAE semipreparativo da FAEII-4-C.



Condições cromatográficas: fase móvel – água (A) e metanol (B), sistema gradiente de solventes – 10% B (5 min), 20% de B (10 min); 30% de B (25 min); 70% de B (40 min) e 100% B (55 min) com fluxo de 8,0 mL min<sup>-1</sup>. Fonte: autora.

Figura 109: Cromatograma por CLAE semipreparativo da FAEII-5-C.



Condições cromatográficas: fase móvel – água (A) e metanol (B), sistema gradiente de solventes – 10% B (5 min), 20% de B (10 min); 30% de B (25 min); 70% de B (40 min) e 100% B (55 min) com fluxo de 8,0 mL min<sup>-1</sup>. Fonte: autora.

Nos espectros das Figuras 108 e 109 está apresentado o espectro de UV-VIS dos compostos das FAEII-4-C e FAEII-5-C, em que pode ser observado a presença de uma banda na região em aproximadamente 270 nm, a qual é atribuída o anel A da estrutura de uma flavonoide, logo, estes compostos pertencem a classe dos flavanois, em que o anel C não está conjugado com o anel B e por isso eles apresentam apenas uma banda de absorção (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996, ALONSO-SALCES et al., 2004, KUMAR; PANDEY, 2013).

Após a separação dos picos da FAEII-4-C por CLAE semipreparativo foi verificado que o pico em 11,8 min não estava puro, pois apresentou duas manchas na placa cromatográfica analisada por CCD, enquanto os picos em 13,0, 14,2 e 24,1 min apresentaram apenas uma mancha na análise por CCD (Figura 110), logo estes compostos foram submetidos a análise por CLAE/EM-EM/EM no modo negativo e RMN para identificação dos compostos. Na FAEII-5-C o composto em 16,9 min também não estava puro após a análise por CCD e o composto em 35,5 min apresentou apenas uma mancha (Figura 110) na placa cromatográfica e foi submetido a análise por CLAE/EM-EM/EM e RMN.

Figura 110: CCD dos compostos isolados da FAEII-C com o revelador vanilina sulfúrica.



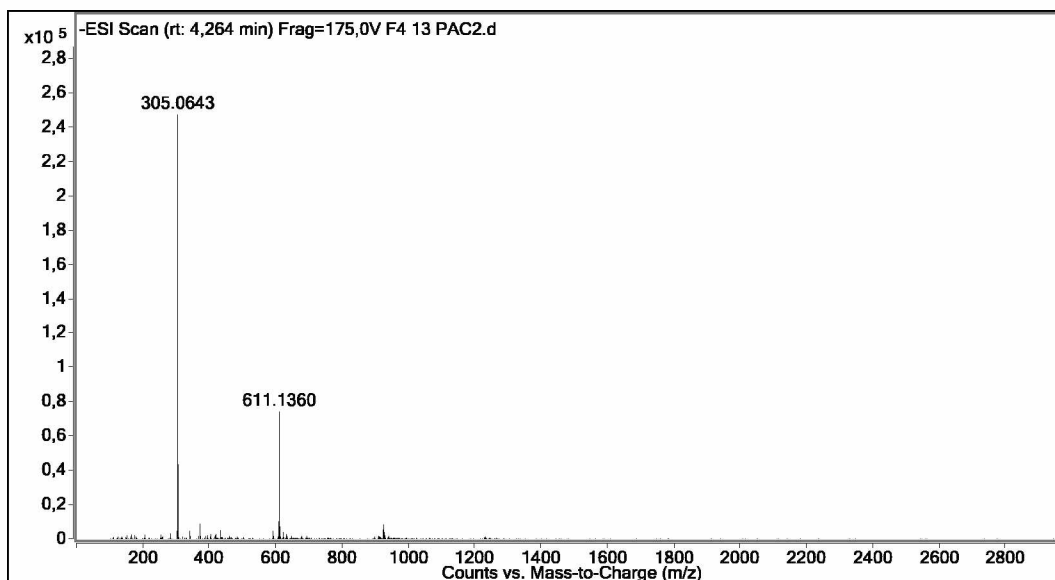
Nota: 1= FAEI-2-C, 2 = FAEII-4-13-C; 3= FAEII-4-14-C; 4= FAEII-4-24-C; 5= FAEII-5-35-C. Fonte: autora.

#### 5.17.1 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO FAEII-4-13-C

O composto FAEII-4-13-C (13 corresponde ao tempo de coleta na CLAE semipreparativa) foi coletado e após a evaporação do solvente foram obtidos 5,9 mg do composto, a partir da comparação com dados da literatura e pela análise dos espectros de EM/IES-EM/EM no modo negativo e RMN ele foi identificado como a galocatequina (composto **II**), que possui massa molecular de  $306,07 \text{ g mol}^{-1}$  ( $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_7$ ), o qual foi identificado nas frações acetato de etila das folhas e das cascas.

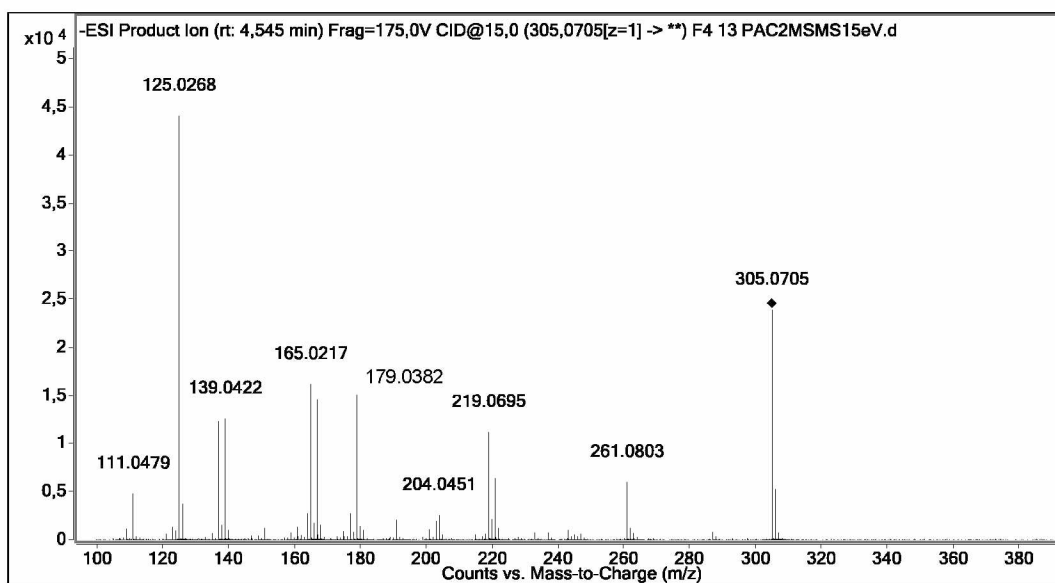
O espectro de massas de alta resolução do composto FAEII-4-13-C está apresentado na Figura 111. A partir deste espectro foi possível determinar a massa molecular do composto  $[\text{M} - \text{H}]^-$   $m/z$  305,0643 (massa adquirida), a massa exata do composto obtida pelo programa ChemDraw Ultra (versão 10.0) foi  $m/z$  305,0667, obtendo um erro de 7,9 ppm. O pico  $m/z$  611,1360 corresponde a formação de *cluster* do composto FAEII-4-13-C. O espectro de massas sequencial do íon  $m/z$  305 está apresentado na Figura 112.

Figura 111: Espectro de massas de alta resolução do composto FAEII-4-13-C.



Fonte: autora.

Figura 112: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  305.

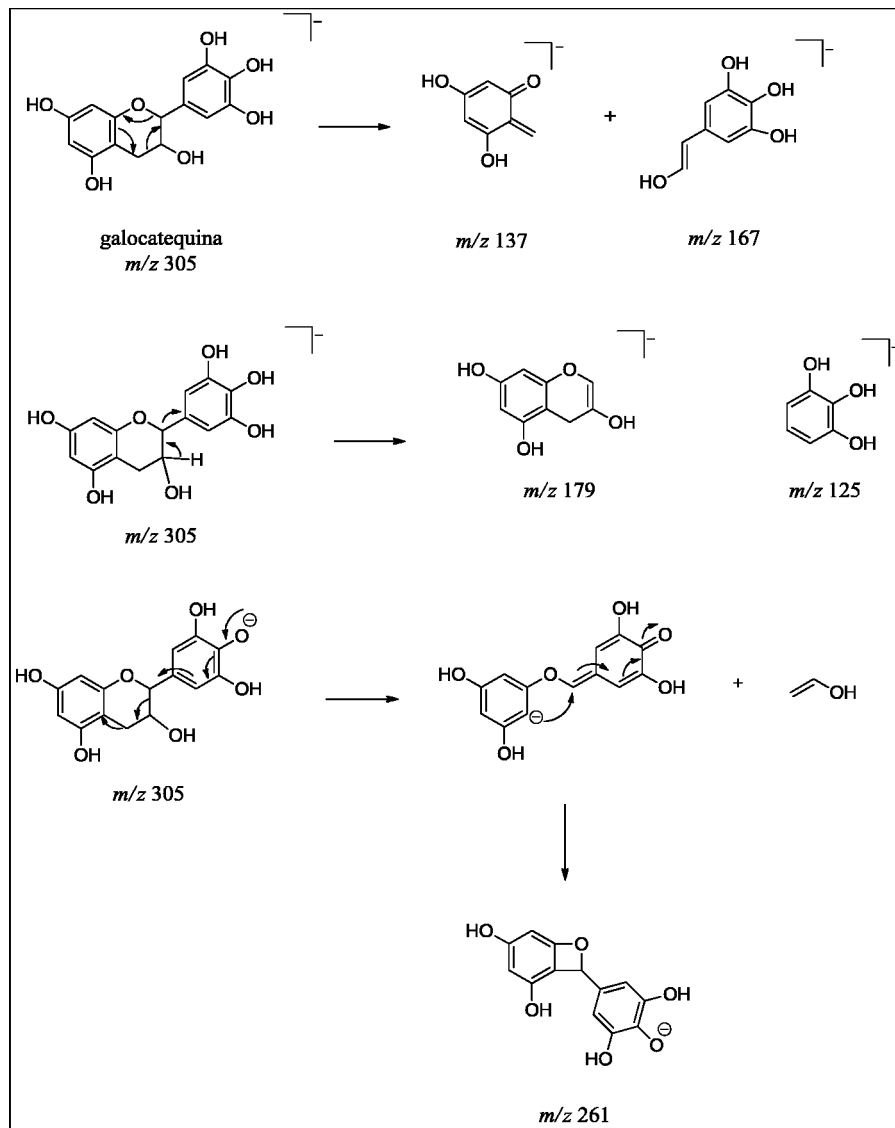


Fonte: autora.

A proposta de fragmentação para o composto FAEII-4-13-C está apresentada na Figura 113. As fragmentações deste íon são semelhantes ao do íon  $m/z$  319 (Figura 100). Através do mecanismo RDA no anel C ocorre a formação dos íons  $m/z$  137  $[M-168-H]^-$  e  $m/z$  167  $[M-138-H]^-$ . A partir de eliminação de um hidrogênio do anel C,

ocorre a formação dos íons  $m/z$  179  $[M-126-H]^-$  e  $m/z$  125  $[M-180-H]^-$ . Através do mecanismo quinona metídeo e CHA ocorre a formação do íon  $m/z$  261  $[M-44-H]^-$  (MIKETOVA et al., 2000, LI; DEINZER, 2007, RODRIGUES et al., 2007, HAMED et al., 2014, DEMARQUE et al., 2016).

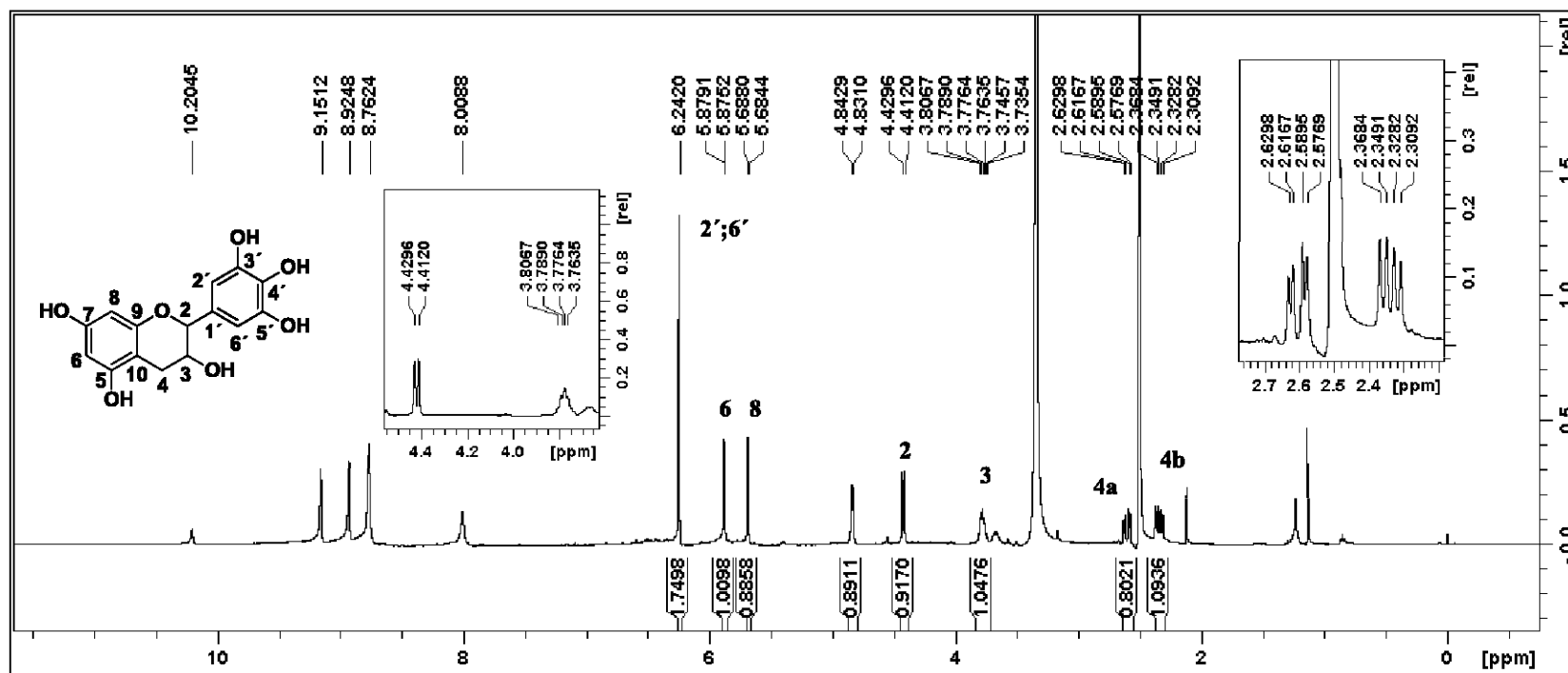
Figura 113: Mecanismo de fragmentação do íon  $m/z$  305.



Fonte: autora.

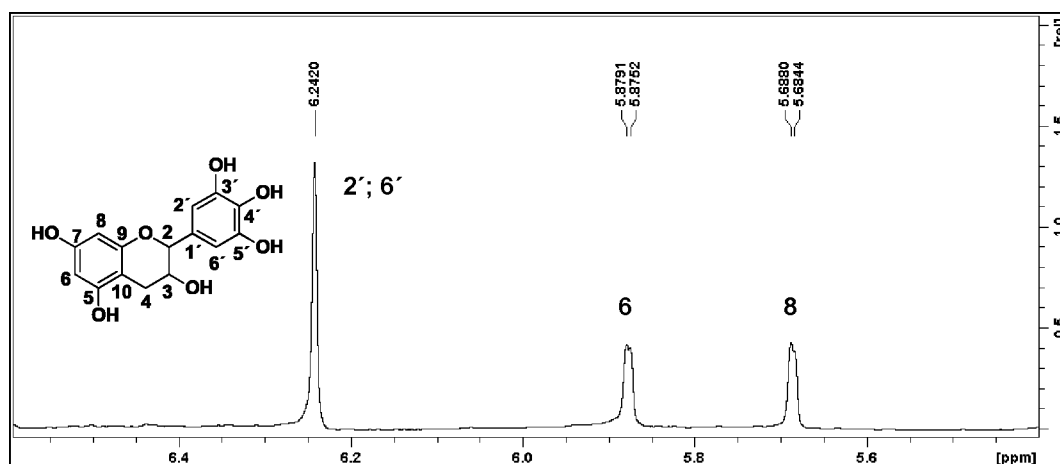
A Figura 114 mostra o espectro de RMN de  $^1H$  do composto FAEII-4-13-C e a Figura 115 o espectro na região de aromáticos.

Figura 114: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) do composto FAElI-4-13-C.



Fonte: autora.

Figura 115: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) na região de aromático do composto FAEII-4-13-C.



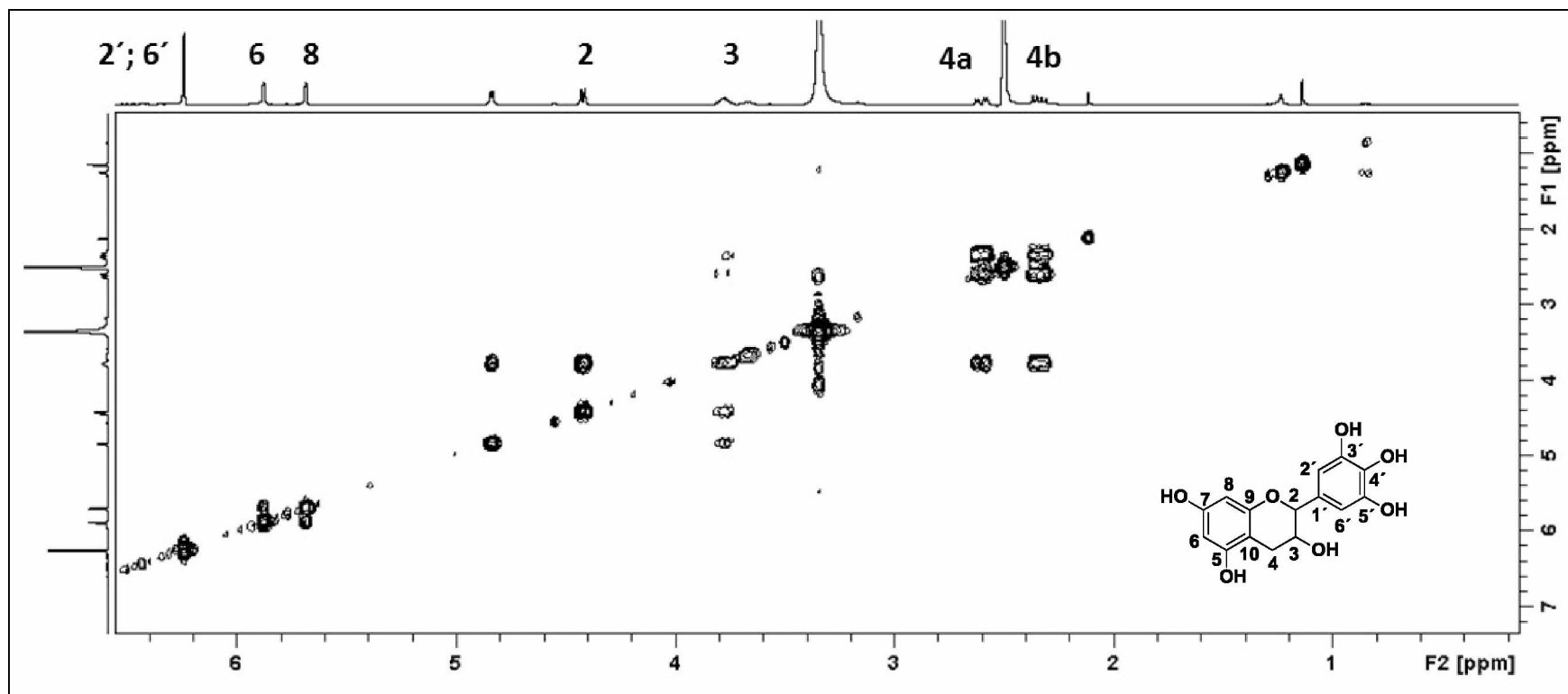
Fonte: autora.

No espectro da Figura 114 o duplete em  $\delta$  4,42 (1H,  $J = 7,0$  Hz) foi atribuído H-2 e o multiplete em  $\delta$  3,78 (1H) ao H-3, o valor da constante de acoplamento encontrada para H-2 e H-3 é característica de hidrogênios *trans*-diaxial, fato que justifica que o composto FAEII-4-13-C seja a galocatequina e não a epigalocatequina. Os sinais dos dois duplos dupletos em  $\delta$  2,60 (1H,  $J = 16,0$  e  $5,1$  Hz) e  $\delta$  2,34 (1H,  $J = 16,0$  e  $7,7$  Hz) foram atribuídos aos H-4a e H-4b do anel C, os quais são diastereotópicos.

No espectro da Figura 115 aparecem três sinais referentes aos hidrogênios aromáticos do composto, o **singleto em  $\delta$  6,24** (2H) foi atribuído a H-2' e H-6' que são equivalentes e os dois dupletos em  $\delta$  5,88 e 5,69 (1H) foram atribuídos ao H-6 e H-8, respectivamente, ambos possuem constante de acoplamento  $J = 1,6$  Hz, característico de acoplamentos *meta* no anel A.

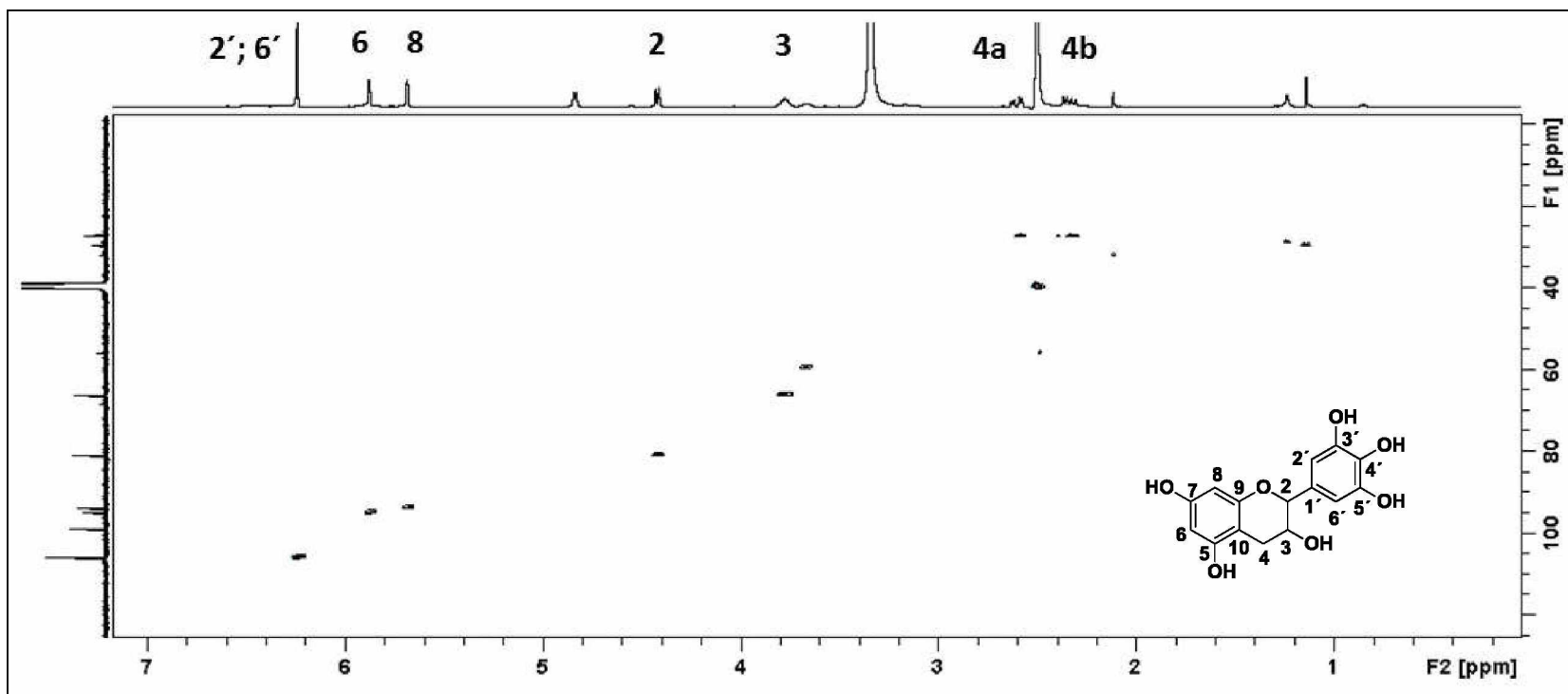
O mapa de contorno COSY (Figura 116) confirmou os acoplamentos entre os hidrogênios do composto. O H-3 ( $\delta$  3,78) acopla com H-2 em  $\delta$  4,42, H4a em  $\delta$  2,60 e H4b em  $\delta$  2,34. Foi possível verificar os acoplamentos entre H-4a e o H4b (duplos dupletos) no anel C e entre H-6 em  $\delta$  5,88 e H-8 em  $\delta$  5,69 (dupletos), os quais estão na posição *meta* no anel A.

Através do mapa de contorno HSQC (Figura 117) foram feitas as correlações dos carbonos e hidrogênios do composto FAEII-4-13-C.

Figura 116: Mapa de contorno COSY (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-4-13-C.

Fonte: autora.



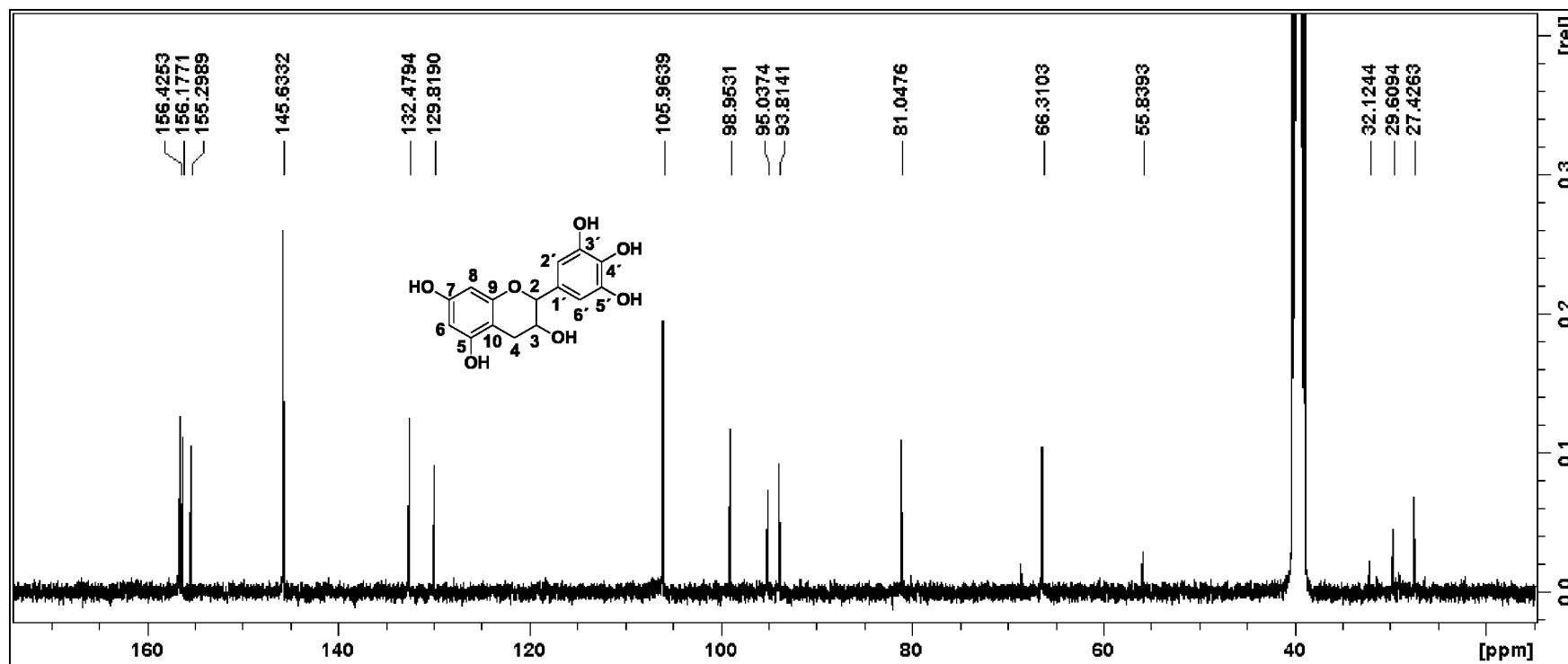
Figura 117: Mapa de contorno HSQC (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-4-13-C.

Fonte: autora.

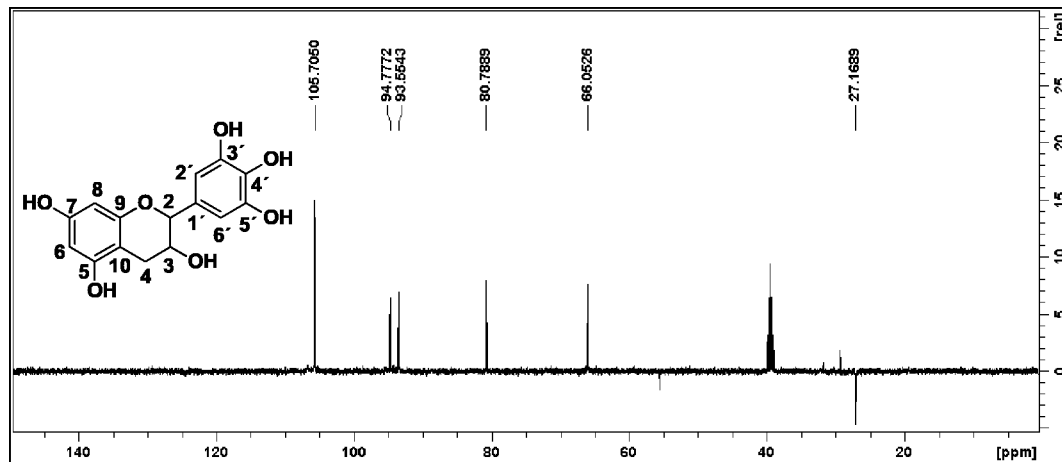
Através do mapa de contorno HSQC (Figura 117) foi possível atribuir os deslocamentos dos carbonos na molécula. Os hidrogênios H-2'' e H-6'' correlacionam com os carbonos C2'' e C6'' (CH) em  $\delta$  106,0, que são equivalentes, H-6 correlaciona com C6 (CH) em  $\delta$  95,0 e o H-8 com C-8 (CH) em  $\delta$  93,8. Os H-4a e 4b correlacionam com o carbono em  $\delta$  27,4 (CH<sub>2</sub>), H-3 com o C3 em  $\delta$  66,3 e H-2 com C2 em  $\delta$  81,0.

A partir dos espectros de RMN (aliados aos de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 118) e DEPT-135 (Figura 119) obtidos e por comparação com os dados da literatura, o composto FAEII-4-13-C foi identificado como a galocatequina. Este composto foi identificado pela primeira vez no gênero *Inga*.

As Tabelas 42 e 43 mostram as correlações de todos os hidrogênios e carbonos do composto FAEII-4-13-C.

Figura 118: Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto FAEII-4-13-C.

Fonte: autora.

Figura 119: Espectro DEPT-135 (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-4-13-C.

Fonte: autora.

Tabela 42: Atribuição dos hidrogênios do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto FAEII-4-13-C e comparados com a galocatequina.

Posição	RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta^1$ ; $m^2$ ; $J^3$	COSY	RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta^1$ ; $m^2$ ; $J^3$ (MOHAMMED, 2015)
2	4,42 <i>d</i> (7,0)	H-3	5,41 <i>d</i> (7,6)
3	3,78 <i>m</i>	H-2 e H-4a,b	3,96 <i>m</i>
4a	2,60 <i>dd</i> (5,1 e 16,0)	H-3 e H-4b	2,82 <i>dd</i> (5,3 e 16,1)
4b	2,34 <i>dd</i> (7,7 e 16,0)	H-3 e H-4a	2,51 <i>dd</i> (7,6 e 16,1)
6	5,88 <i>d</i> (1,6)	H-8	5,91 <i>d</i> (2,3)
8	5,69 <i>d</i> (1,6)	H-6	5,86 <i>d</i> (2,3)
2'	6,24 <i>s</i>	-	6,41 <i>s</i>
6'	6,24 <i>s</i>	-	6,41 <i>s</i>

Nota: 1: deslocamento químico em ppm utilizando TMS como padrão interno; 2: multiplicidade (*s* = singlete, *d* = duplete, *dd* = duplo duplete, *m* = multipeto); 3: constante de acoplamento expresso em Hz.

Tabela 43: Atribuição dos carbonos do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto FAEII-4-13-C e comparados com a galocatequina.

Posição	$\delta^1$	$\delta^2$	(100 MHz, DEPT-135, DMSO- $d_6$ )	HSQC <sup>1</sup>	RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (MOHAMMED, 2015)
<b>2</b>	81,0	86,0	CH	4,42	82,8
<b>3</b>	66,3	67,7	CH	3,78	68,7
<b>4</b>	27,4	28,1	$\text{CH}_2$	2,60; 2,34	28,0
<b>5</b>	156,2	157,2	C	-	157,5
<b>6</b>	95,0	95,3	CH	5,88	96,3
<b>7</b>	156,4	157,8	C	-	157,7
<b>8</b>	93,8	94,8	CH	5,69	95,5
<b>9</b>	155,3	157,3	C	-	156,8
<b>10</b>	98,9	99,4	C	-	100,7
<b>1'</b>	129,8	130,9	C	-	131,5
<b>2'</b>	106,0	107,8	CH	6,24	107,2
<b>3'</b>	145,6	146,3	C	-	146,8
<b>4'</b>	132,5	133,3	C	-	133,9
<b>5'</b>	145,6	146,3	C	-	146,8
<b>6'</b>	106,0	107,8	CH	6,24	107,2

Nota: 1:  $\delta$  em ppm utilizando TMS como padrão interno; 2:  $\delta$  teórico obtido no programa ChemDrawUltra (versão 10.0).

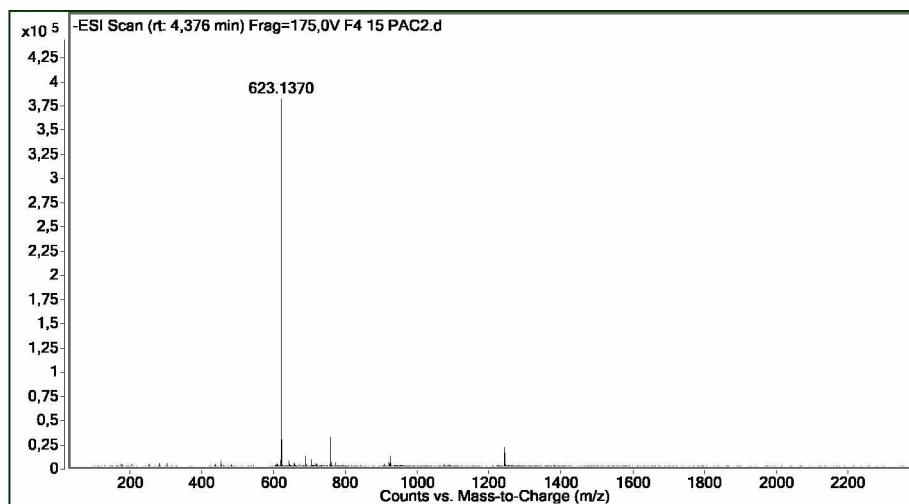
#### 5.17.2 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO FAEII-4-14-C

O composto com tempo de retenção em 14,2 min foi coletado e o solvente evaporado, foram obtidos 5,2 mg do composto FAEII-4-14-C. A partir da comparação com dados da literatura e pela análise dos espectros de IES-EM-EM no modo negativo e RMN o composto FAEII-4-14-C foi identificado como uma proantocianidina tipo B, a galocatequina-(4 $\alpha$ -8)-4'-O-metilgalocatequina (composto **XXVI**), que possui massa molecular 624,15 g mol<sup>-1</sup> ( $\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$ ).

O espectro de massas de alta resolução do composto FAEII-4-14-C está apresentado na Figura 120. A partir deste espectro foi possível determinar a massa molecular do composto  $[\text{M} - \text{H}]^-$   $m/z$  623,1370 (massa adquirida), a massa exata do

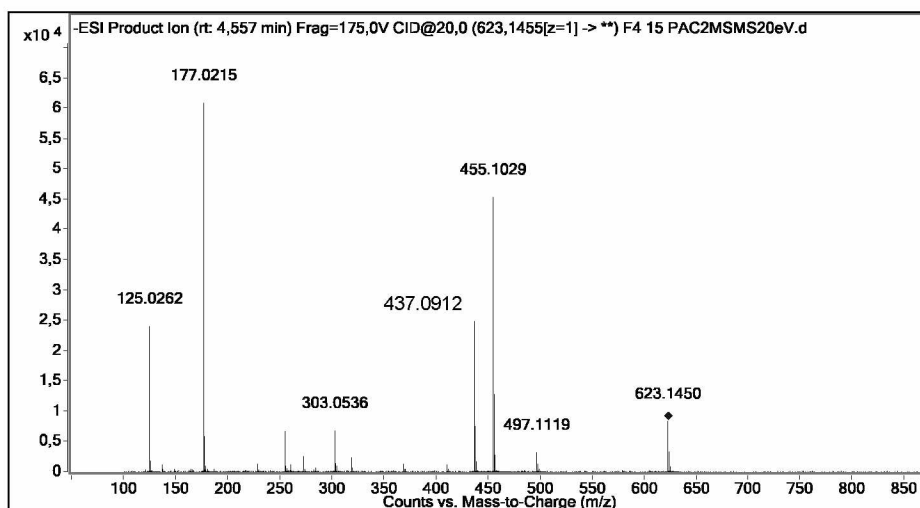
composto obtida pelo programa ChemDraw Ultra (versão 10.0) foi  $m/z$  623,1406, obtendo um erro de 5,8 ppm. O espectro de massas sequencial do íon  $m/z$  623 está apresentado na Figura 121.

Figura 120: Espectro de massas de alta resolução do composto FAEII-4-14-C.



Fonte: autora.

Figura 121: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  623.

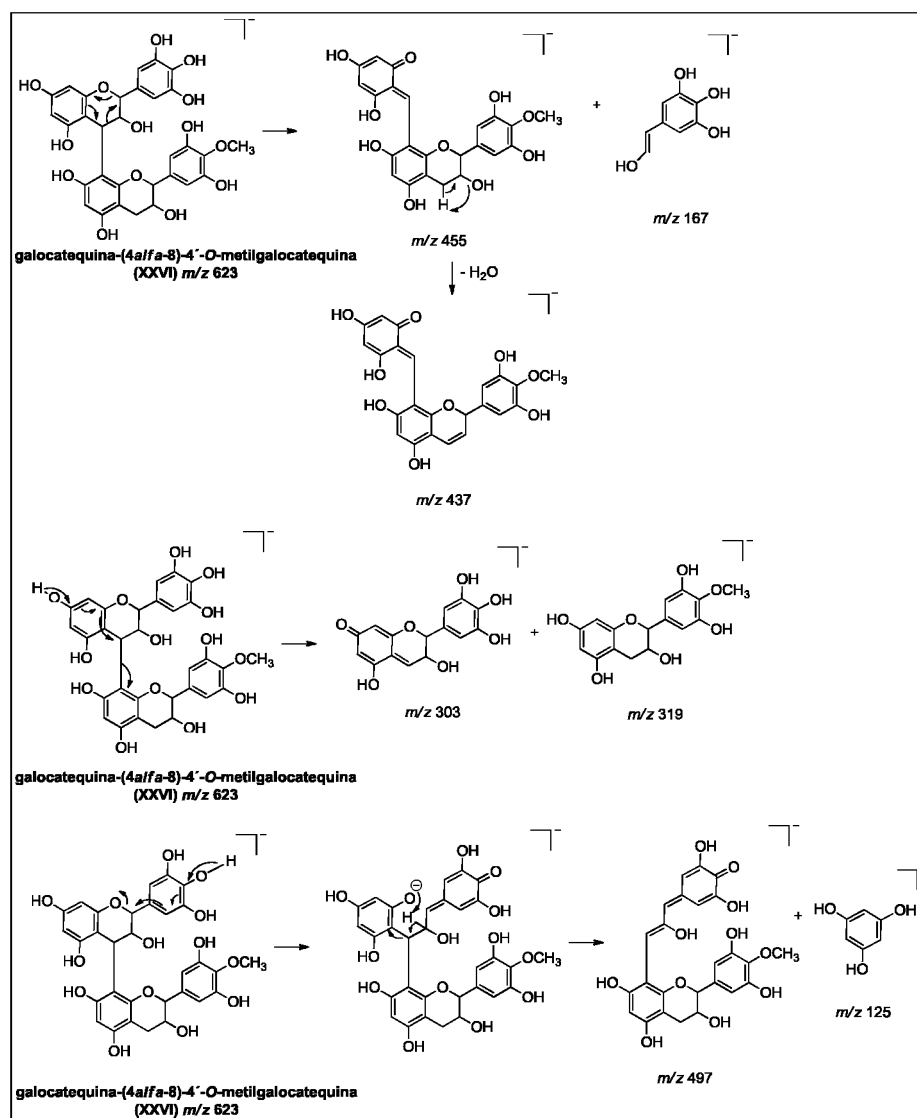


Fonte: autora.

O mecanismo de fragmentação para o composto FAEII-4-14-C está apresentado na Figura 122. Através do mecanismo RDA no anel C da unidade I da proantocianidina ocorre a formação dos íons  $m/z$  455  $[M-168-H]^-$  e  $m/z$  167  $[M-456-H]^-$ . A partir de

eliminação de uma molécula de água do íon  $m/z$  455 ocorre a formação do íon  $m/z$  437. A partir do mecanismo QM da unidade I ocorre a formação dos íons  $m/z$  303 [M-320-H]<sup>-</sup> e  $m/z$  319 [M-304-H]<sup>-</sup>. E através do mecanismo QM e CHA do íon  $m/z$  623 ocorre a formação dos íons  $m/z$  125 [M-498-H]<sup>-</sup> e  $m/z$  497 [M-126-H]<sup>-</sup> (RODRIGUES et al., 2007, DEMARQUE et al., 2016).

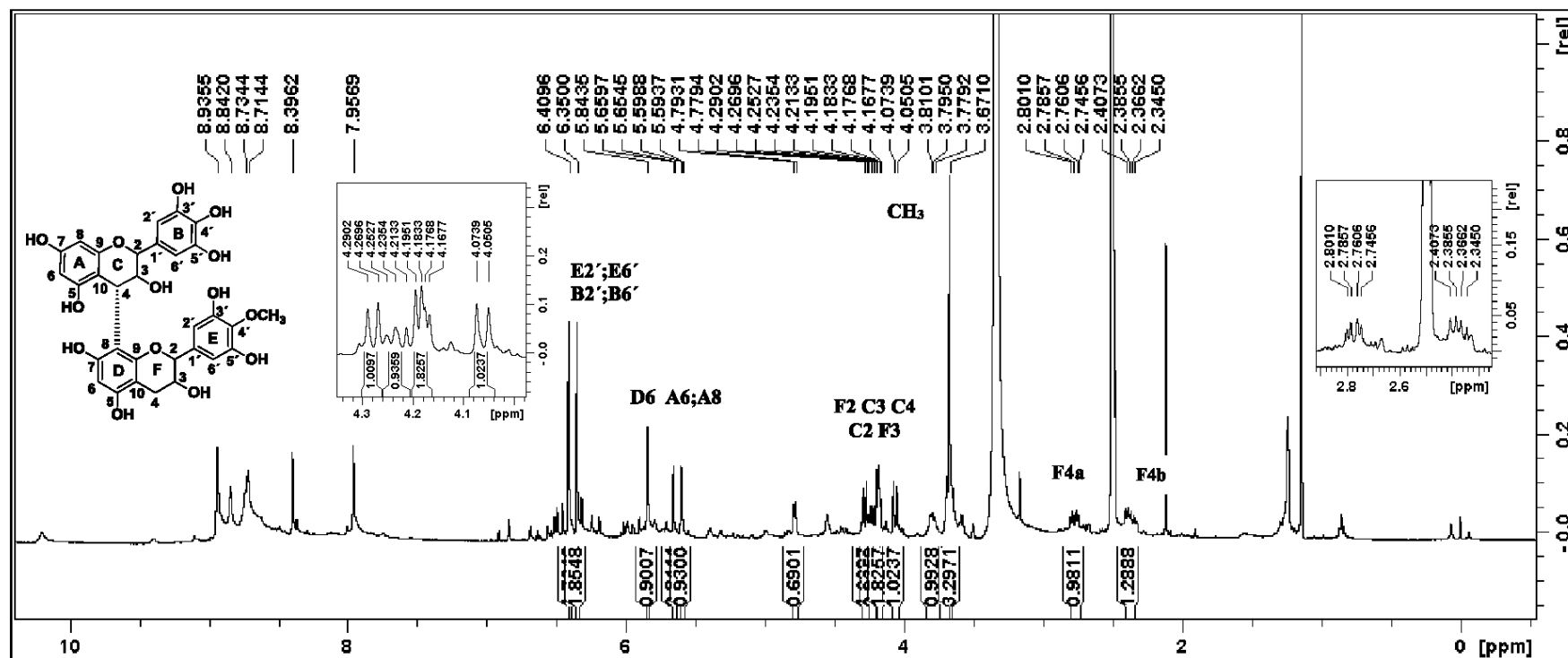
Figura 122: Mecanismo de fragmentação do íon  $m/z$  623.



Fonte: autora.

A Figura 123 mostra o espectro de RMN de  $^1H$  do composto FAElI-4-14-C e a Figura 124 o espectro na região de hidrogênios aromáticos.

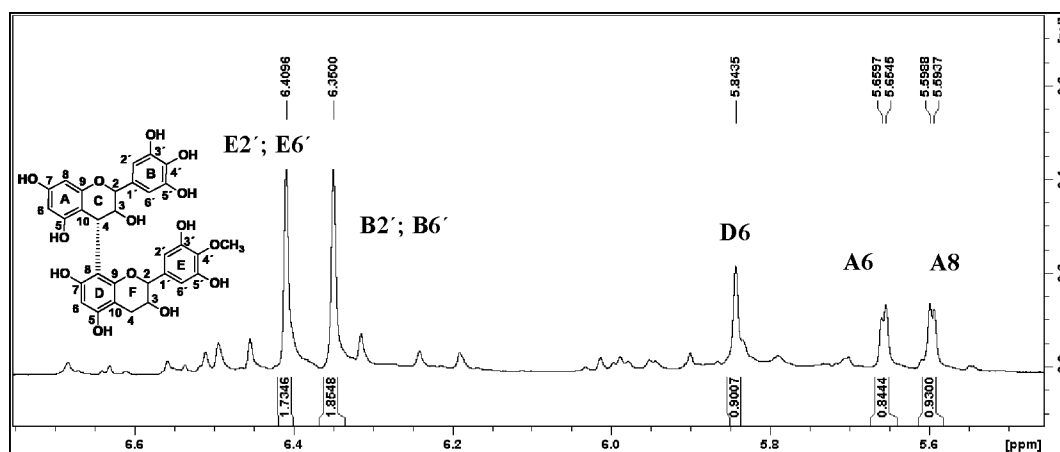
Figura 123: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) do composto FAEL-4-14-C.



Fonte: autora.



Figura 124: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) na região de aromático do composto FAElI-4-14-C.



Fonte: autora.

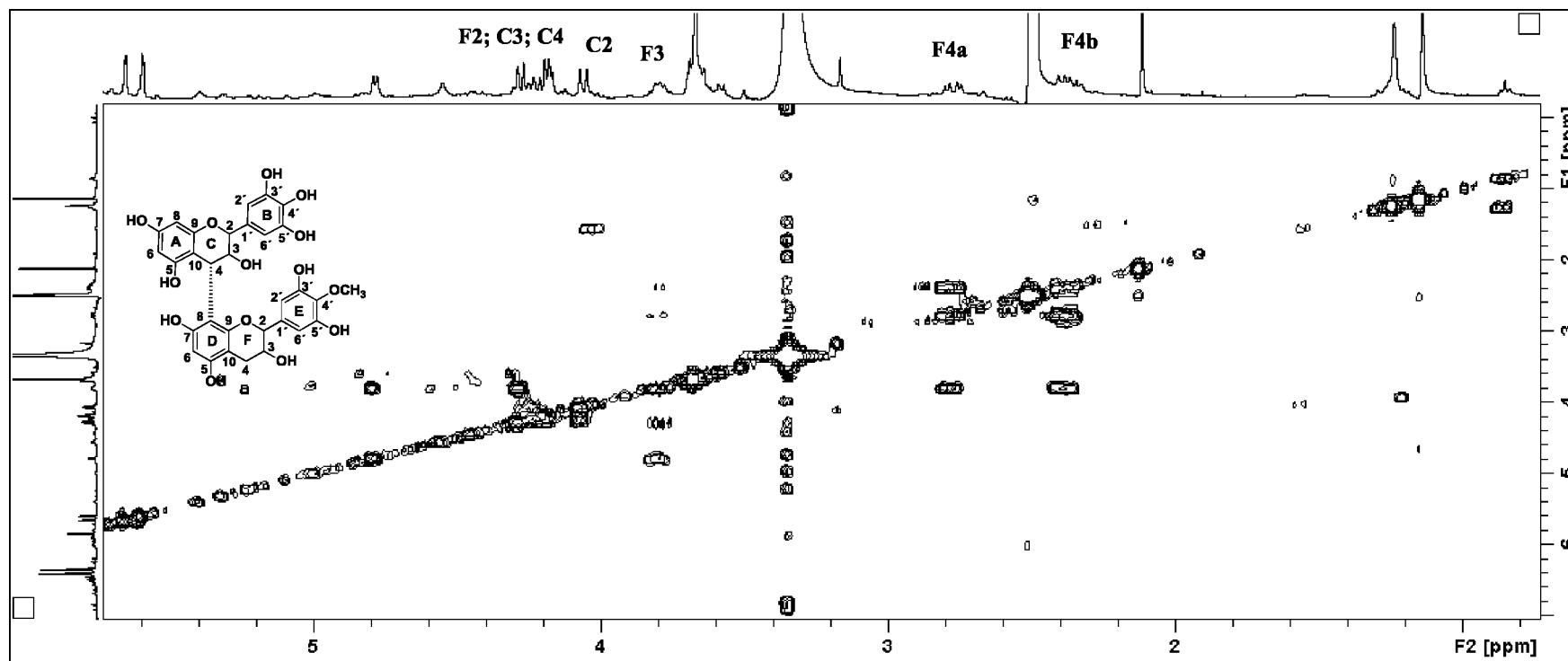
No espectro de RMN da Figura 123 o duplete em  $\delta$  4,06 (1H,  $J = 9,3$  Hz) foi atribuído H-2 do anel C e o **triplete alargado** em  $\delta$  4,24 (1H,  $J = 6,9$  e  $8,8$  Hz) ao H-3 do anel C. Em  $\delta$  4,18 aparece um sinal semelhante a um duplo duplete (2H,  $J = 6,8$  e  $4,2$  Hz) o qual foi atribuído ao H-4 do anel C, embora fosse esperado apenas um duplete para o H-4, há um sinal sobreposto nessa região, que explicaria a presença do duplo duplete e a integral para a presença de dois hidrogênios, contudo o valor da constante de acoplamento de (6,8 Hz) indica que há um hidrogênio que acopla com o H-2 ( $J = 6,9$  Hz). O duplete em  $\delta$  4,28 (1H,  $J = 8,2$  Hz) foi atribuído ao H-2 do anel F, o multipeto em  $\delta$  3,79 (1H) ao H-3 do anel F e os sinais dos dois duplos dupletos em  $\delta$  2,77 (1H,  $J = 16,1$  e  $6,0$  Hz) e  $\delta$  2,37 (2H,  $J = 16,3$  e  $8,6$  Hz) foram atribuídos aos H-4a e H-4b do anel F. Os valores das constantes de acoplamento para H-2 e H-3 dos anéis C e F é característica de hidrogênios *trans*-diaxial, fato que justifica que o composto FAElI-4-14-C seja um dímero da galocatequina. **A presença do singleto em  $\delta$  3,67 (3H) confirma a presença de um grupo metil, o que indica que o composto possui uma unidade da proantocianidina derivada da metil galocatequina (composto FAElI-2-C, subitem 5.16).**

No espectro da Figura 124 aparecem cinco sinais referentes aos hidrogênios aromáticos da proantocianidina, o **singleto em  $\delta$  6,41 (2H)** foi atribuído a H-2' e H-6' do anel E, o **singleto em  $\delta$  6,35 (2H)** foi atribuído a H-2' e H-6' do anel B e o **singleto em  $\delta$  5,84 (1H)** ao H-6 do anel D. Os dois dupletos em  $\delta$  5,65 e 5,59 (1H,  $J = 2,0$  Hz) foram atribuídos ao H-6 e H-8, respectivamente, acoplados na posição *meta* no anel A.

Através da análise do mapa de contorno COSY (Figura 125) foi verificado os acoplamentos entre os hidrogênios do composto. Os H-4a e H-4b do anel F (dois duplos dupletos em  $\delta$  2,77 e 2,37, respectivamente) acoplam entre si e com H-3 do anel F (multiplete em  $\delta$  3,79). O H-2 do anel C (duplete em  $\delta$  4,06) acopla com H-3 do anel C (triplete alargado em  $\delta$  4,24).

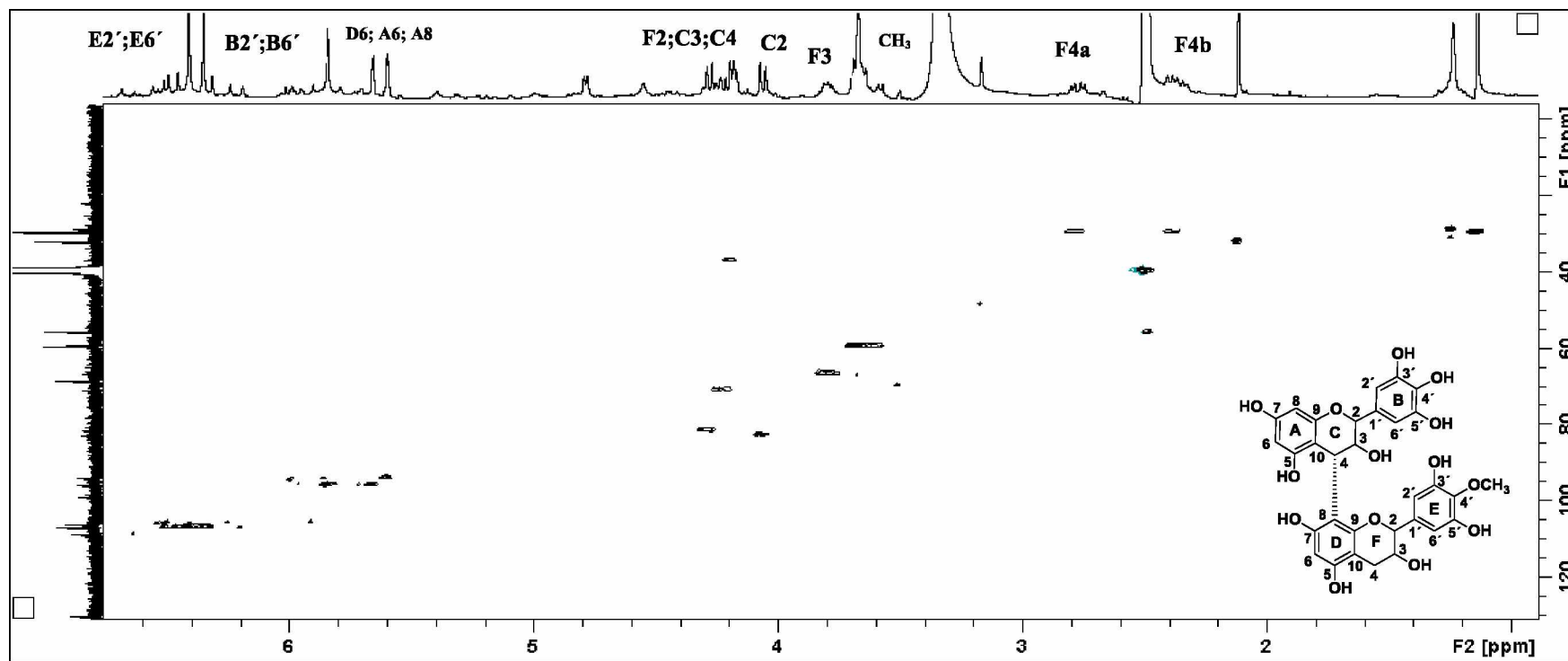
Através do mapa de contorno HSQC (Figura 126) e DEPT-135 (Figura 127) foram feitas as correlações dos carbonos e hidrogênios do composto FAEII-4-14-C. Alguns sinais dos carbonos do composto estavam pouco intensos no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , logo para a confirmação do deslocamento do carbono foi analisado os sinais do DEPT-135.

Pela análise do mapa de contorno HSQC (Figura 126), na região de aromáticos, os hidrogênios H-2' e H-6' correlacionam com os carbonos C2' e C6' (CH) no anel E em  $\delta$  107,0, os quais são equivalentes, H-6 correlaciona com o carbono C6 (CH) em  $\delta$  95,9 no anel D, H-2' e H-6' correlaciona com os carbonos C2' e C6' (CH) no anel B em  $\delta$  106,9, H-6 correlaciona com C-6 (CH) em  $\delta$  95,9 no anel A e o H-8 com C-8 em  $\delta$  94,9 também no anel A. No anel C, os hidrogênios H-2, H-3 e H-4 correlacionam com os carbonos C2, C3 e C4 (todos CH) em  $\delta$  82,6, 70,8 e 36,9, respectivamente. No anel F, H-2, H-3 e H-4a,b correlacionam com C2, C3 (ambos CH) e C4 (CH<sub>2</sub>) em  $\delta$  81,3, 66,6 e 29,6 respectivamente.

Figura 125: Mapa de contorno COSY (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-4-14-C.

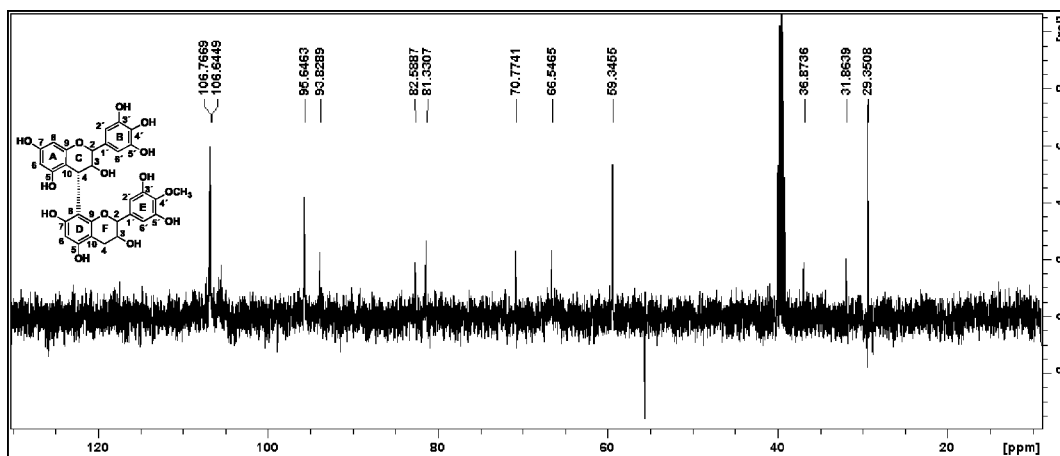
Fonte: autora.

Figura 126: Mapa de contorno HSQC (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-4-14-C.



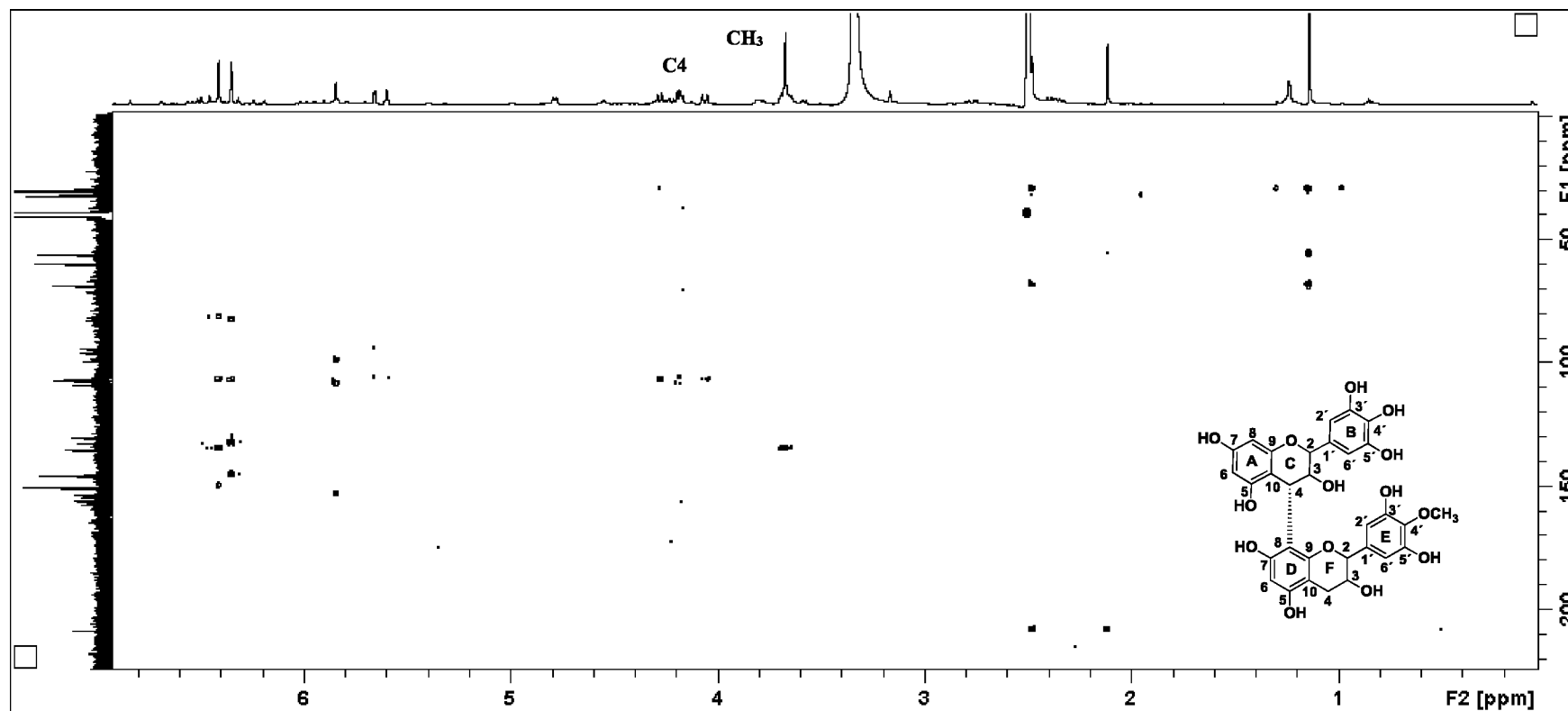
Fonte: autora.

Figura 127: Espectro DEPT-135 (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-4-14-C.



Fonte: autora.

A posição do grupo metil foi confirmada pela análise do mapa de contorno HMBC (Figura 128), em que o hidrogênio em  $\delta$  3,67 (CH<sub>3</sub>) está correlacionado com o carbono em  $\delta$  134,9 que corresponde ao C4' do anel E. A confirmação da ligação entre H-4 do anel C e C8 do anel D também foi feita pela análise do mapa de contorno HMBC, em que foi verificado a correlação do H-4 do anel C com C7 e C8 no anel D.

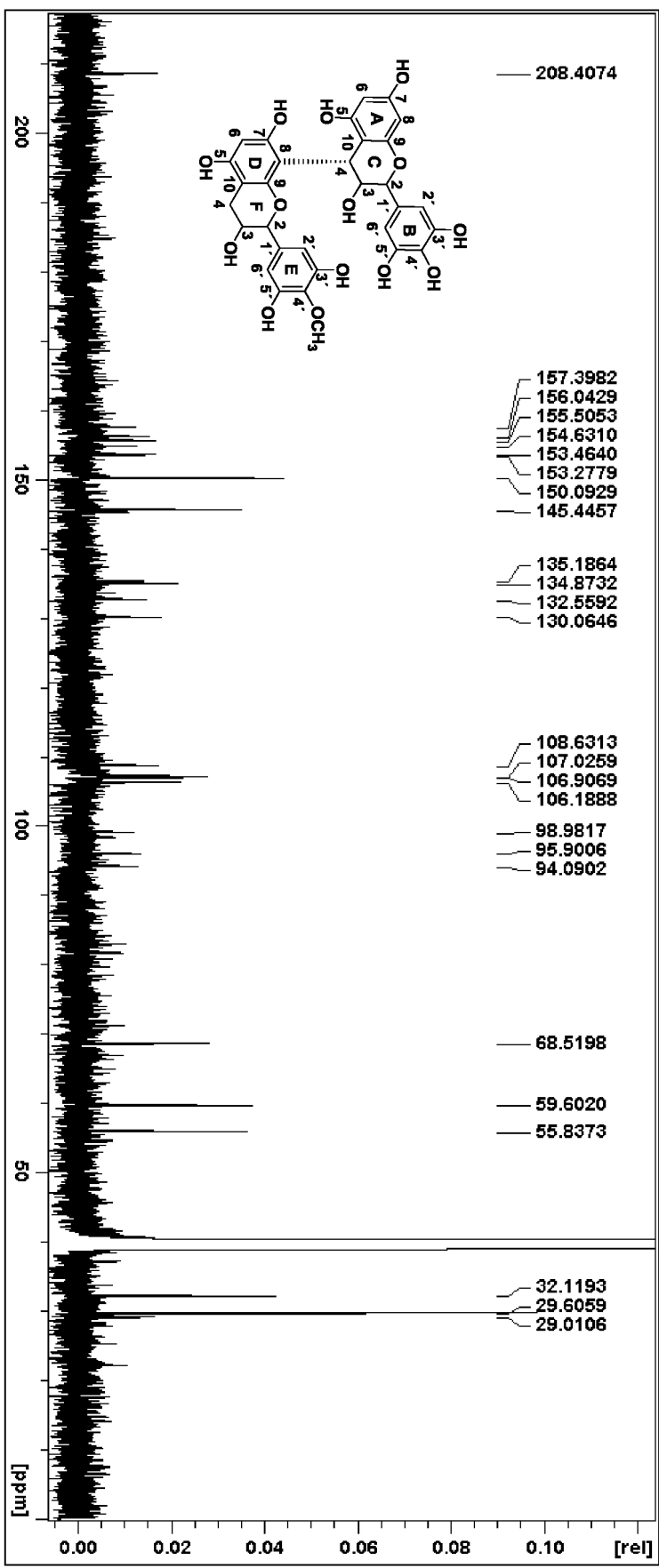
Figura 128: Mapa de contorno HMBC (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-4-14-C.

Fonte: autora.

A partir dos espectros e mapas de contorno de RMN apresentados acima e ao de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 129) e por comparação com os dados da literatura, o composto FAEII-4-14-C foi identificado como a galocatequina-(4 $\alpha$ -8)-4'-*O*-metilgalocatequina, que possui estereoquímica semelhante com a procianidina B3 . Não foi encontrado na literatura a identificação deste composto em espécies de *Inga*, logo é a primeira vez que este composto foi identificado e isolado no gênero *Inga*.

As Tabelas 44 e 45 mostram as correlações de todos os hidrogênios e carbonos do composto FAEII-4-14-C. Não foi encontrado na literatura dados sobre a análise de RMN para este composto, logo nas Tabelas 44 e 45 foram comparados os resultados com a (-)-galocatequina-(4 $\alpha$ -8)-(-)-epigalocatequina, uma proantocianidina que possui estrutura semelhante ao composto FAEII-4-14-C.

Figura 129: Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto FAII-4-14-C.



Fonte: autora.



Tabela 44: Atribuição dos hidrogênios do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto FAEII-4-14-C e comparados com a (-)-galocatequina-(4 $\alpha$ -8)-(-)-epigalocatequina.

Posição	RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta^1$ ; $m^2$ ; $J^3$	COSY	RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, CD $_3$ OD) $\delta^1$ ; $m^2$ ; $J^3$ (JANECKI; KOŁODZIEJ, 2010)
<b>2 C</b>	4,06 <i>d</i> (9,3)	H-3C	4,34 <i>d</i> (9,7)
<b>3 C</b>	4,24 <i>ta</i> (8,8 e 6,9)	H-2C	4,55 <i>dd</i> (7,9 e 9,7)
<b>4 C</b>	4,18 <i>dd</i> (6,8 e 4,2)	-	4,63 <i>d</i> (7,9)
<b>6 A</b>	5,65 <i>d</i> (2,0)	-	5,84 <i>d</i> (2,4)
<b>8 A</b>	5,59 <i>d</i> (2,0)	-	5,78 <i>d</i> (2,4)
<b>2'B</b>	6,35 <i>s</i>	-	6,56 <i>s</i>
<b>6'B</b>	6,35 <i>s</i>	-	6,56 <i>s</i>
<b>2 F</b>	4,28 <i>d</i> (8,2)	H-3F	4,87 <i>sa</i>
<b>3 F</b>	3,79 <i>m</i>	H-2F e H-4a,b F	4,21 <i>m</i>
<b>4a F</b>	2,77 <i>dd</i> (16,1 e 6,0)	H-3F e H4b	2,8-2,9 <i>m</i>
<b>4b F</b>	2,37 <i>dd</i> (16,3 e 8,6)	H-3F e H4a	
<b>6 D</b>	5,84 <i>s</i>	-	5,98 <i>s</i>
<b>2'E</b>	6,41 <i>s</i>	-	6,59 <i>s</i>
<b>6'E</b>	6,41 <i>s</i>	-	6,59 <i>s</i>
<b>CH<sub>3</sub></b>	3,67 <i>s</i>	-	-

Nota: 1: deslocamento químico em ppm utilizando TMS como padrão interno; 2: multiplicidade (*s* = singleto, *sa* = singleto alargado, *d* = duplete, *dd* = duplo duplete, *ta* = tripleto alargado, *m* = multiplete); 3: constante de acoplamento expresso em Hz.

Tabela 45: Atribuição dos carbonos do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto FAElI-4-14-C e comparados com a (-)-galocatequina-(4 $\alpha$ -8)-(-)-epigalocatequina.

Posição	$\delta^1$	$\delta^2$	(100 MHz, DEPT-135, DMSO- $d_6$ )	HSQC <sup>1</sup>	RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, CD $_3$ OD) (JANECKI; KOŁODZIEJ, 2010)
<b>2 C</b>	82,6	83,4	CH	4,06	84,0
<b>3 C</b>	70,8	72,6	CH	4,24	73,7
<b>4 C</b>	36,9	36,8	CH	4,18	38,9
<b>5 A</b>	156,0	157,3	C	-	152,2-158,7
<b>6 A</b>	95,9	95,7	CH	5,65	96,2
<b>7 A</b>	157,4	158,0	C	-	155,2-158,7
<b>8 A</b>	94,1	95,2	CH	5,59	97,5
<b>9 A</b>	155,5	157,4	C	-	155,2-158,7
<b>10 A</b>	106,2	100,5	C	-	106,7
<b>1'B</b>	132,6	130,9	C	-	131,7
<b>2'B</b>	106,9	107,8	CH	6,35	107,2
<b>3'B</b>	145,4	146,3	C	-	146,7
<b>4'B</b>	130,1	133,3	C	-	133,4
<b>5'B</b>	145,4	146,3	C	-	146,7
<b>6'B</b>	106,9	107,8	CH	6,35	107,2
<b>2 F</b>	81,3	83,8	CH	4,28	79,9
<b>3 F</b>	66,6	67,7	CH	3,79	67,4
<b>4a F</b>	29,6	28,2	CH $_2$	2,77	29,8
<b>4b F</b>	29,6	28,2	CH $_2$	2,37	29,8
<b>5 D</b>	153,3	154,7	C	-	155,2-158,7
<b>6 D</b>	95,9	95,8	CH	5,84	108,5
<b>7 D</b>	153,5	157,3	C	-	155,2-158,7
<b>8 D</b>	108,6	106,8	C	-	97,7
<b>9 D</b>	154,6	153,3	C	-	155,2-158,7
<b>10 D</b>	99,0	103,5	C	-	99,4
<b>1'E</b>	135,2	130,6	C	-	131,7
<b>2'E</b>	107,0	107,4	CH	6,41 s	107,7
<b>3'E</b>	150,1	150,7	C	-	146,7
<b>4'E</b>	135,2	137,3	C	-	133,4
<b>5'E</b>	150,1	150,7	C	-	146,7
<b>6'E</b>	107,0	107,4	CH	6,41 s	107,7
<b>CH<math>_3</math></b>	59,6	60,8	CH $_3$	3,67 s	-

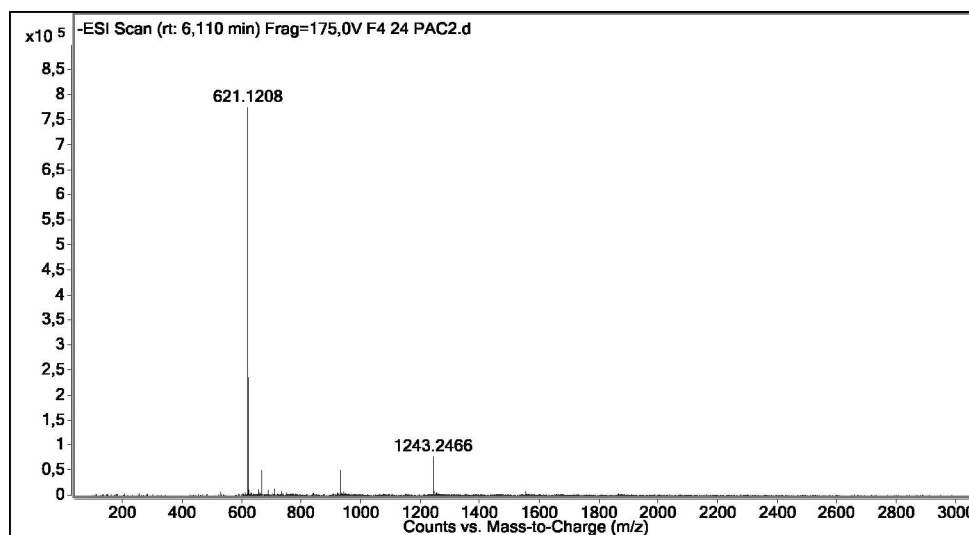
Nota: 1:  $\delta$  em ppm utilizando TMS como padrão interno; 2:  $\delta$  teórico obtido no programa ChemDrawUltra (versão 10.0).

### 5.17.3 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO FAEII-4-24-C

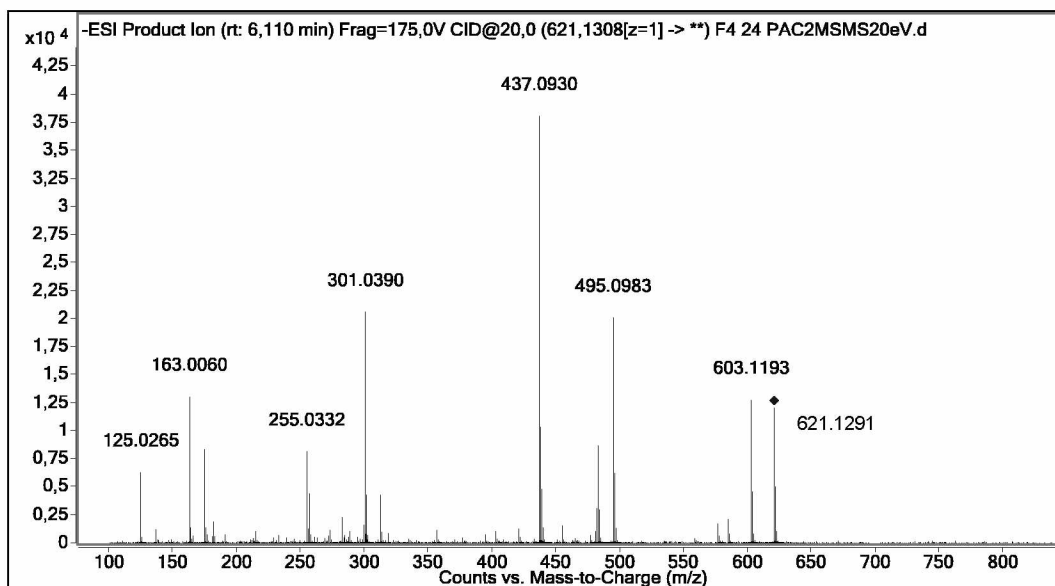
O composto com tempo de retenção em 24,1 min na CLAE semipreparativa foi coletado e o solvente evaporado, foram obtidos 3,8 mg do composto FAEII-4-24-C. Pela comparação com dados da literatura e pela análise dos espectros de IES-EM-EM no modo negativo e RMN o composto FAEII-4-24-C foi identificado como uma proantocianidina tipo A, a epigallocatequina-(2→O→7, 4→8)-4'-O-metilgallocatequina, que possui massa molecular 622,13 g mol<sup>-1</sup> (C<sub>31</sub>H<sub>26</sub>O<sub>14</sub>). Este composto não foi identificado na FAEII-C por CLAE/EM-EM/EM (Tabela 39, p.188), logo ele é o composto com numeração **XXVII**.

O espectro de massas de alta resolução do composto FAEII-4-24-C está apresentado na Figura 130. Por este espectro foi possível determinar a massa molecular do composto [M – H]<sup>-</sup> *m/z* 621,1208 (massa adquirida), a massa exata do composto obtida pelo programa ChemDraw Ultra (versão 10.0) foi *m/z* 621,1250, obtendo um erro de 6,8 ppm. O espectro de massas sequencial do íon *m/z* 621 está apresentado na Figura 131.

Figura 130: Espectro de massas de alta resolução do composto FAEII-4-24-C



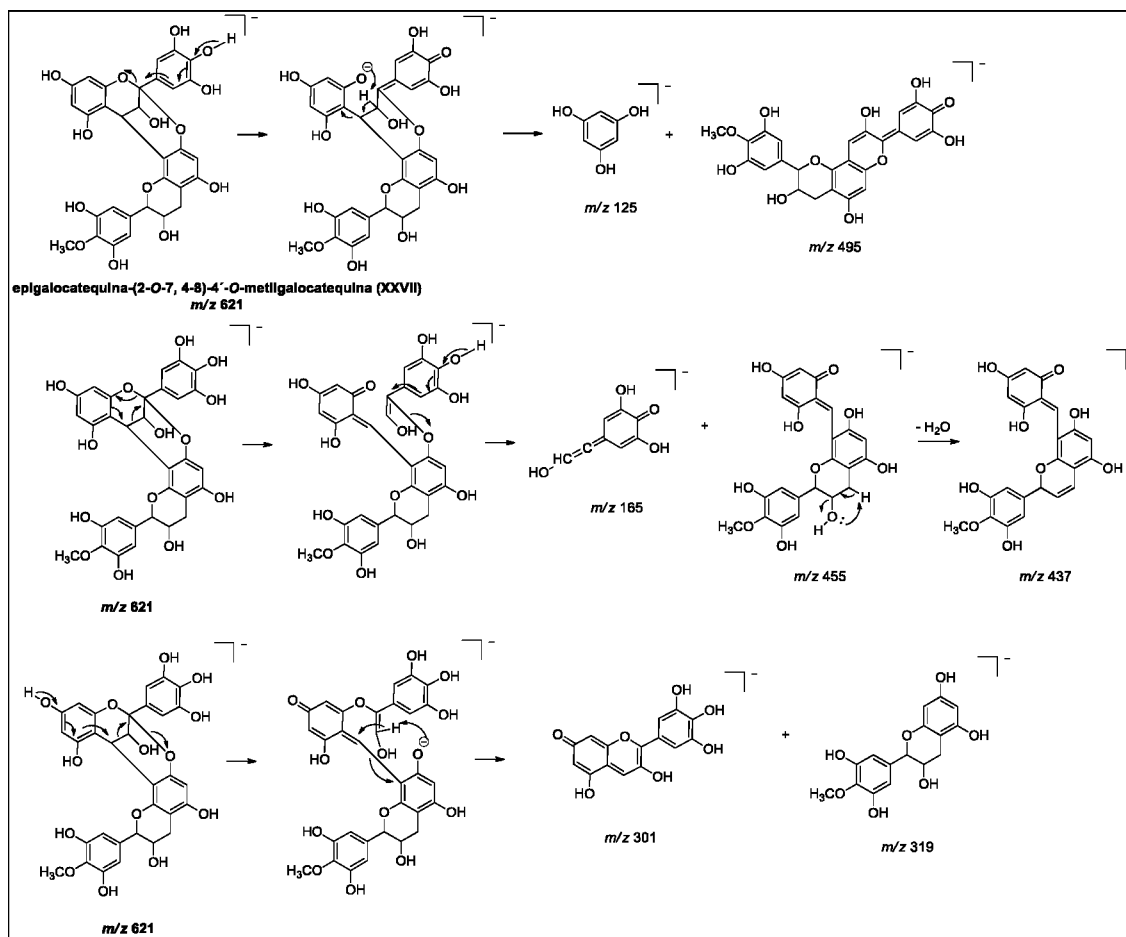
Fonte: autora.

Figura 131: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  621.

Fonte: autora.

O mecanismo de fragmentação para o composto FAEII-4-24-C está apresentado na Figura 132. Através do mecanismo CHA no anel C da unidade I da proantocianidina ocorre a formação dos íons  $m/z$  495  $[M-126-H]^-$  e  $m/z$  125  $[M-496-H]^-$ , esta clivagem é favorecida pela formação de um íon fenóxido, o qual é estabilizado pela deslocalização de elétrons. Os íons  $m/z$  125 e 495 são formados através da captura do hidrogênio carbinólico (H-3 do anel C), resultando na transferência de um elétron para o carbono C-3. A partir dos mecanismos RDA no anel C e QM ocorre a formação dos íons  $m/z$  165  $[M-456-H]^-$  e  $m/z$  455  $[M-167-H]^-$ , o qual perde uma molécula de água para a formar o íon  $m/z$  437. E a partir do mecanismo QM no anel A ocorre a formação dos íons  $m/z$  301  $[M-320-H]^-$  e  $m/z$  319  $[M-302-H]^-$  (RODRIGUES et al., 2007, DEMARQUE et al., 2016).

Figura 132: Mecanismo de fragmentação do íon  $m/z$  621.



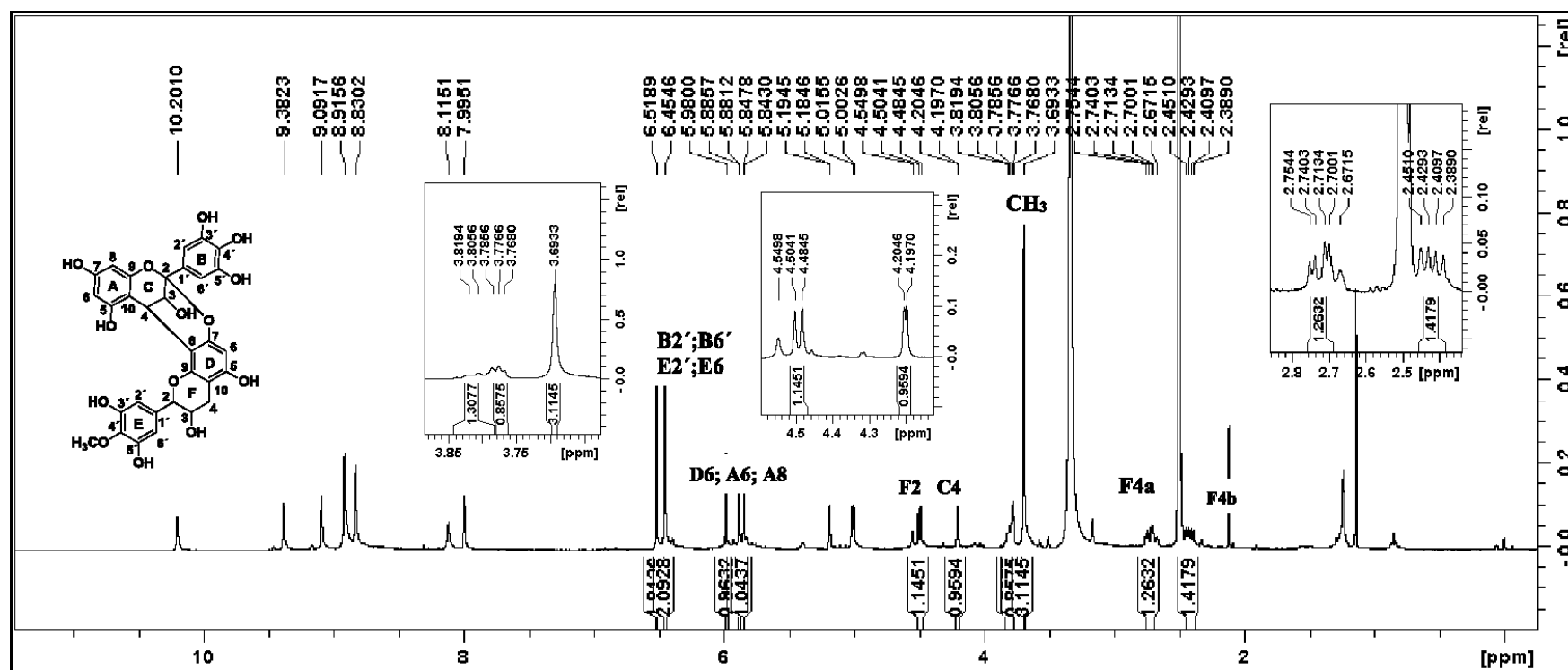
Fonte: autora.

A Figura 133 mostra o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto FAElI-4-24-C e a Figura 134 o espectro na região de hidrogênios aromáticos.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Figura 133 o duplete em  $\delta$  3,78 (1H,  $J = 3,4$  Hz) foi atribuído ao H-3 do anel C e o duplete em  $\delta$  4,20 (1H,  $J = 3,0$  Hz) ao H-4 do anel C. Os valores da constante de acoplamento para H-3 e H-4 no anel C são característicos de proantocianidinas tipo A (JACQUES et al., 1974, FOO et al., 2000, ESATBEYOGLU; WRAY; WINTERHALTER, 2013). O duplete em  $\delta$  4,49 (1H,  $J = 7,8$  Hz) foi atribuído ao H-2 do anel F, o multipeto em  $\delta$  3,80 (1H) ao H-3 do anel F e os sinais dos dois duplos dupletos em  $\delta$  2,73 (1H,  $J = 16,2$  e  $5,5$  Hz) e  $\delta$  2,42 (1H,  $J = 16,3$  e  $8,5$  Hz) aos H-4a e H-4b do anel F. A constante de acoplamento do H-2 do anel F é característica de hidrogênios *trans*-diaxial, resultado que corrobora com que a unidade terminal da proantocianidina (composto FAElI-4-24-C) seja derivada da galocatequina. O sinal de um singleto em  $\delta$  3,69 (3H) confirma a presença de um grupo metil, o que sugere que o composto possui uma unidade da proantocianidina derivada da metilgalocatequina (composto FAEl-2-C, subitem 5.16).

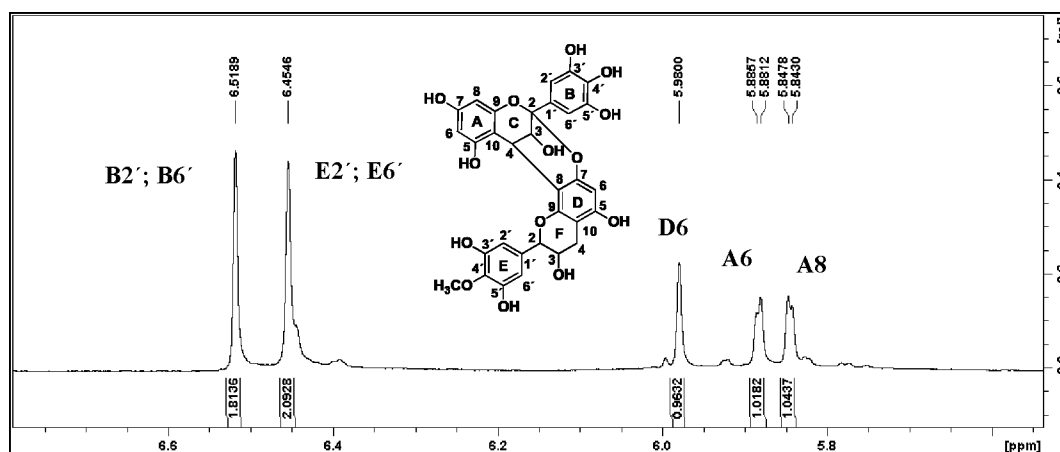
Na região de hidrogênios aromáticos o singleto em  $\delta$  6,52 (2H) foi atribuído a H-2' e H-6' do anel B, o singleto em  $\delta$  6,45 (2H) foi atribuído a H-2' e H-6' do anel E e o singleto em  $\delta$  5,98 (1H) ao H-6 do anel D. Os dois dupletos em  $\delta$  5,88 e 5,85 (1H,  $J = 1,9$  Hz) foram atribuídos ao H-6 e H-8 do anel A, os quais estão acoplados na posição *meta* no anel aromático (Figura 134).

Pela análise do mapa de contorno COSY (Figura 135) foi verificado os acoplamentos entre o H-3 (duplete em  $\delta$  3,78) e H-4 (duplete em  $\delta$  4,20) do anel C e, no anel F, o H-2 (duplete em  $\delta$  4,49) acopla com o H-3 (multipeto em  $\delta$  3,80), o qual acopla com H-4a e H-4b (dois duplos dupletos em  $\delta$  2,73 e 2,42, respectivamente) que estão acoplados entre si.

Figura 133: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) do composto FAEL-4-24-C.

Fonte: autora.

Figura 134: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) na região de aromático do composto FAElI-4-24-C.

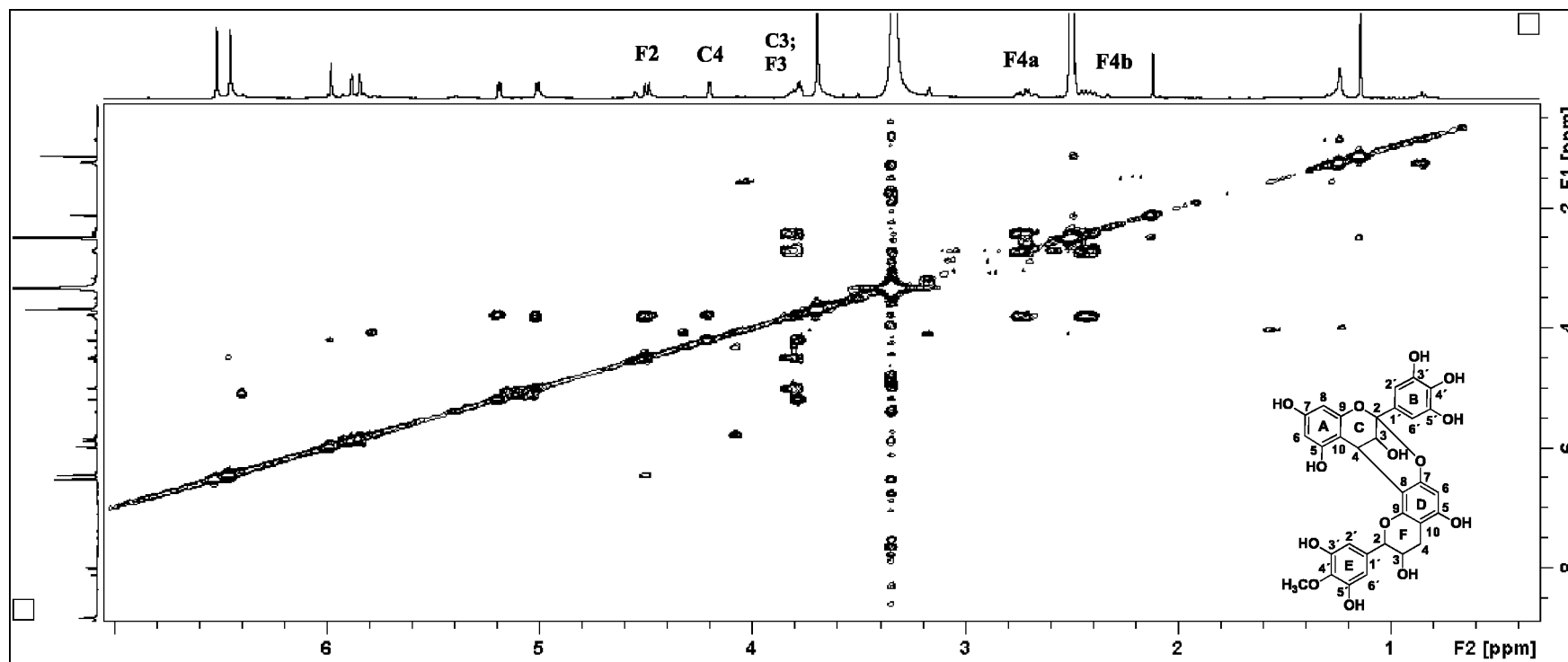


Fonte: autora.

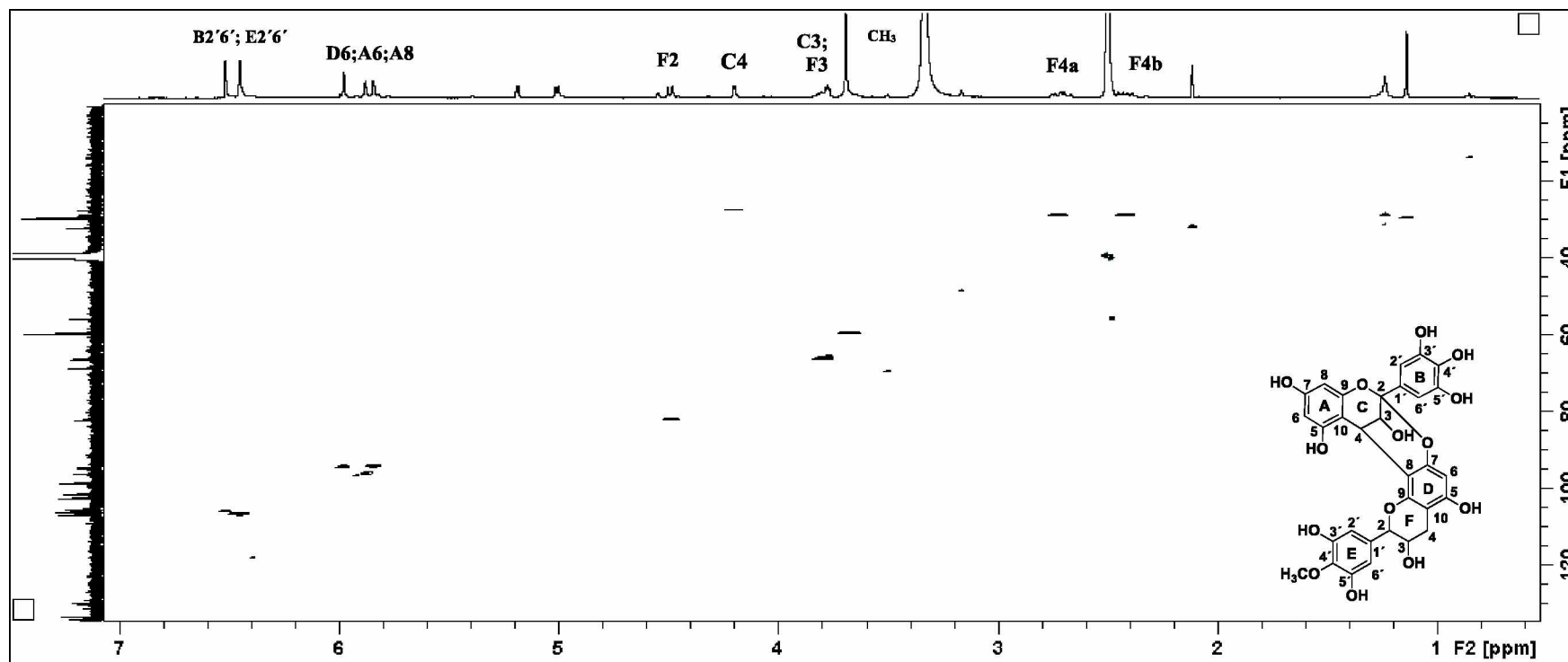
Através do mapa de contorno HSQC (Figura 136) foram feitas as correlações dos carbonos e hidrogênios do composto FAElI-4-24-C. Na região de aromáticos os hidrogênios H-2' e H-6' correlacionam com C2' e C6' (CH) no anel E em  $\delta$  106,8, H-6 no anel D com C6 (CH) em  $\delta$  94,6, H-2' e H-6' com C2' e C6' (CH) em  $\delta$  106,0 no anel B e, no anel A, H-6 correlaciona com C-6 (CH) em  $\delta$  96,2 e H-8 com C-8 em  $\delta$  94,4. No anel C, os H-3 e H-4 correlacionam com C3 e C4 (ambos CH) em  $\delta$  66,2 e 27,2, respectivamente. No anel F, H-2, H-3 e H-4a,b correlacionam com C2, C3 (ambos CH) e C4 (CH<sub>2</sub>) em  $\delta$  82,1, 66,4 e 28,6, respectivamente.

Os hidrogênios do grupo metil correlacionam com o carbono em  $\delta$  59,7. A posição do grupo metil na estrutura da proantocianidina foi confirmada pela análise do mapa de contorno HMBC (Figura 137), em que os hidrogênios metílicos (singleto em  $\delta$  3,69) estão correlacionados com o carbono em  $\delta$  135,0 que corresponde ao C4' do anel E. A confirmação da ligação entre H-4 do anel C e C8 do anel D também foi feita pela análise do mapa de contorno HMBC, em que foi verificado a correlação do H-4 do anel C com C7 e C8 no anel D e a correlação do H-6 com C5 e C7 do anel D. Além disso, pela análise do mapa de contorno NOESY (Figura 138) foi verificado o acoplamento entre H-6 do anel A com H-2' do anel E.

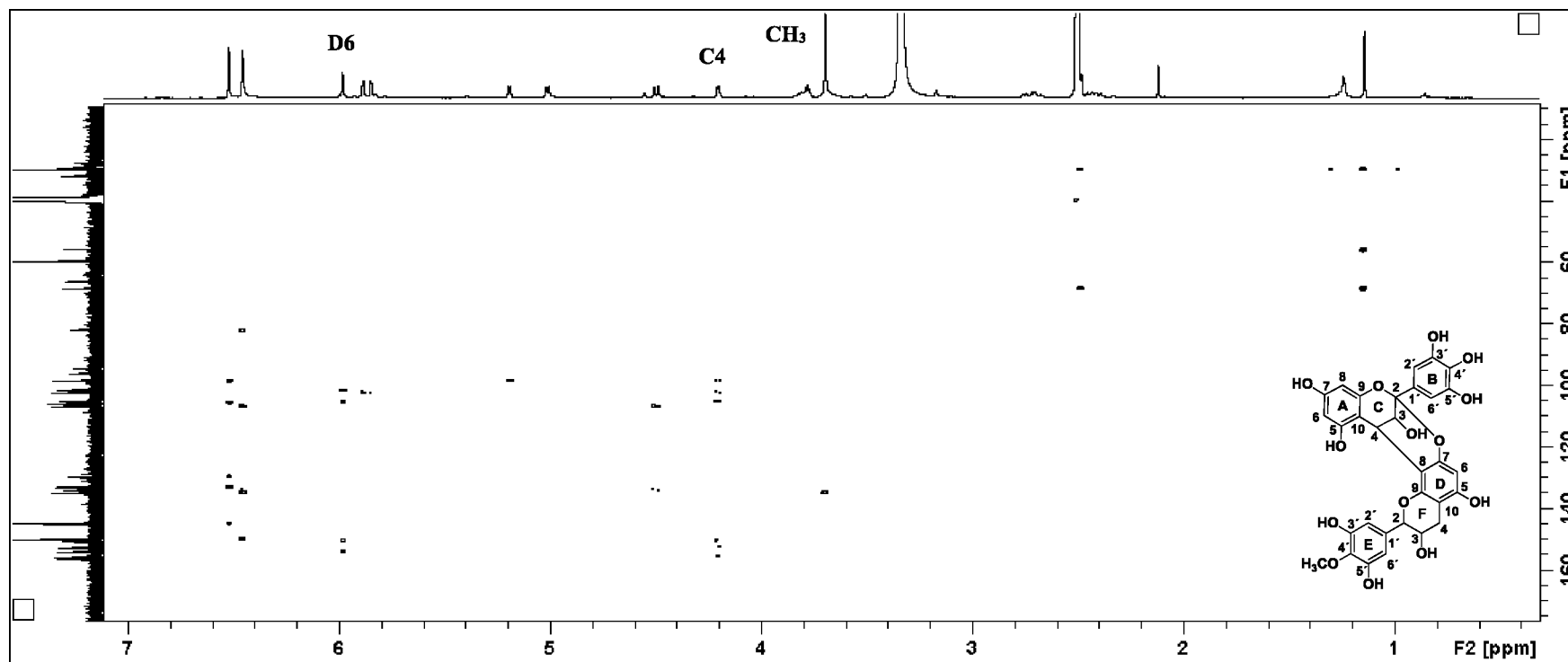


Figura 135: Mapa de contorno COSY (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-4-24-C.

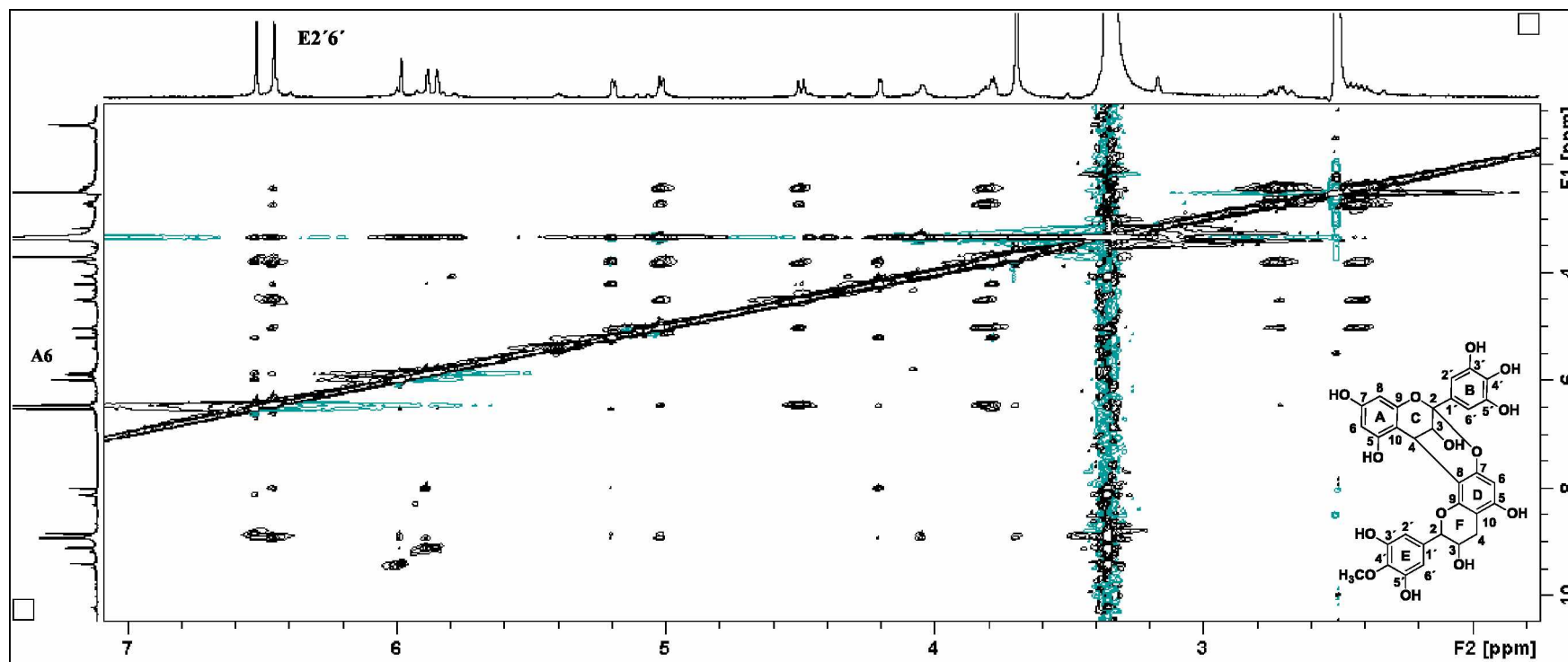
Fonte: autora.

Figura 136: Mapa de contorno HSQC (DMSO-*d*<sub>6</sub>) do composto FAEII-4-24-C.

Fonte: autora.

Figura 137: Mapa de contorno HMBC (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-4-24-C.

Fonte: autora.

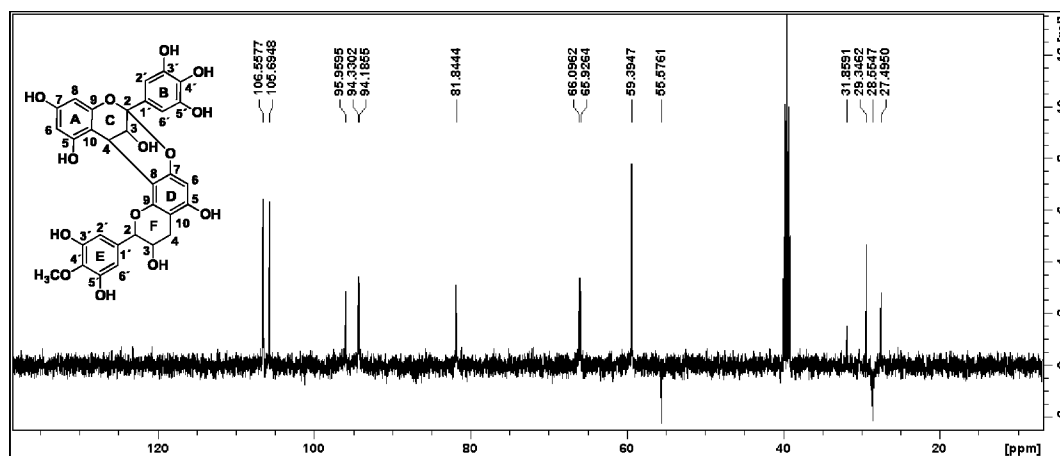
Figura 138: Mapa de contorno NOESY (DMSO- $d_6$ ) do composto FAElI-4-24-C.

Fonte: autora.

A partir dos espectros e mapas de contorno de RMN apresentados acima e aos de DEPT-135 e de RMN de  $^{13}\text{C}$  e (Figuras 139 e 140, respectivamente) e por comparação com os dados da literatura, o composto FAEII-4-24-C foi identificado como a epigalocatequina-(2 $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7, 4 $\rightarrow$ 8)-4'-O-metilgalocatequina. Para a confirmação da estereoquímica do composto seria necessário realizar a análise de Dicroísmo Circular que identificaria se a ligação entre as duas unidades da proantocianidina seria *alfa* ou *beta*. (epigalocatequina-(2 $\alpha$  $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7, 4 $\alpha$  $\rightarrow$ 8)-4'-O-metilgalocatequina ou epigalocatequina-(2 $\beta$  $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7, 4 $\beta$  $\rightarrow$ 8)-4'-O-metilgalocatequina). O composto FAEII-4-24-C foi identificado pela primeira vez em plantas do gênero *Inga*.

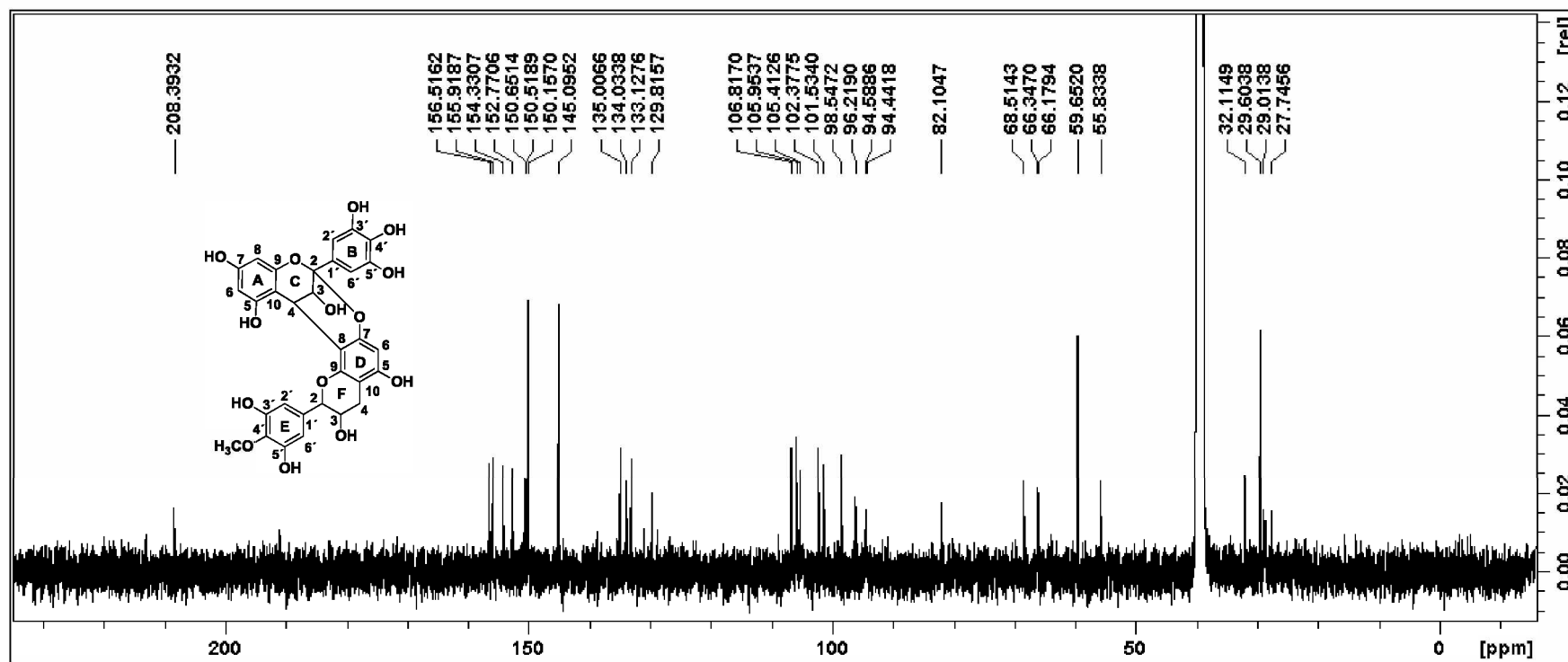
As Tabelas 46 e 47 mostram as correlações de todos os hidrogênios e carbonos do composto FAEII-4-24-C. Não foi encontrado na literatura resultados de RMN para este composto, logo nas Tabelas 46 e 47 os sinais de RMN do composto FAEII-4-24-C foram comparados os da (-)-epigalocatequina-(2 $\beta$  $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7,4 $\beta$  $\rightarrow$ 8)-(-)-galocatequina, uma proantocianidina tipo A que possui estrutura semelhante ao composto FAEII-4-24-C.

Figura 139: Espectro DEPT-135 (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-4-24-C.



Fonte: autora.

Figura 140: Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) do composto FAEII-4-24-C.



Fonte: autora.

Tabela 46: Atribuição dos hidrogênios do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto FAEII-4-24-C e comparados com a (-)-epigallocatequina-( $2\beta \rightarrow O \rightarrow 7,4\beta \rightarrow 8$ )-(-)-galocatequina.

Posição	RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) $\delta^1$ ; $m^2$ ; $J^3$	COSY	RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta^1$ ; $m^2$ ; $J^3$ (ZANG et al., 2013)
<b>3 C</b>	3,78 <i>d</i> (3,4)	H-4C	4,07 (3,5)
<b>4 C</b>	4,20 <i>d</i> (3,0)	H-3C	4,28 (3,5)
<b>6 A</b>	5,88 <i>d</i> (1,9)	-	6,02 (2,3)
<b>8 A</b>	5,85 <i>d</i> (1,9)	-	6,09 (2,3)
<b>2'B</b>	6,52 <i>s</i>	-	6,76 <i>s</i>
<b>6'B</b>	6,52 <i>s</i>	-	6,76 <i>s</i>
<b>2 F</b>	4,49 <i>d</i> (7,8)	H-3F	4,63 (6,4)
<b>3 F</b>	3,80 <i>m</i>	H-2F e H-4a,bF	4,05 <i>m</i>
<b>4a F</b>	2,73 <i>dd</i> (16,2 e 5,5)	H-3F e H4b	2,88 (16,6 e 5,0)
<b>4b F</b>	2,42 <i>dd</i> (16,3 e 8,5)	H-3F e H4a	2,60 (16,6 e 7,0)
<b>6 D</b>	5,98 <i>s</i>	-	6,10 <i>s</i>
<b>2'E</b>	6,45 <i>s</i>	-	6,38 <i>s</i>
<b>6'E</b>	6,45 <i>s</i>	-	6,38 <i>s</i>
<b>CH<sub>3</sub></b>	3,69 <i>s</i>	-	-

Nota: 1: deslocamento químico em ppm utilizando TMS como padrão interno; 2: multiplicidade (*s* = singleto, *d* = duplete, *dd* = duplo duplete ; *m* = multiplete); 3: constante de acoplamento expresso em Hz.

Tabela 47: Atribuição dos carbonos do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto FAEII-4-24-C e comparados com a (-)-epigallocatequina-( $2\beta \rightarrow O \rightarrow 7,4\beta \rightarrow 8$ )-(-)-galocatequina.

Posição	$\delta^1$	$\delta^2$	(100 MHz, DEPT-135, DMSO- $d_6$ )	HSQC <sup>1</sup>	RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (ZANG et al., 2013)
<b>2 C</b>	98,5	116,9	C	-	100,5
<b>3 C</b>	66,2	67,1	CH	3,78	67,6
<b>4 C</b>	27,7	29,2	CH	4,20	29,5
<b>5 A</b>	155,9	157,8	C	-	154,2
<b>6 A</b>	96,2	95,7	CH	5,88	97,7
<b>7 A</b>	156,5	158,0	C	-	158,2
<b>8 A</b>	94,4	95,2	CH	5,85	96,6
<b>9 A</b>	152,8	155,9	C	-	151,4
<b>10 A</b>	102,4	104,0	C	-	104,4
<b>1'B</b>	133,1	134,4	C	-	131,4
<b>2'B</b>	106,0	107,8	CH	6,52	107,7
<b>3'B</b>	145,1	146,3	C	-	146,3
<b>4'B</b>	129,8	133,3	C	-	134,7
<b>5'B</b>	145,1	146,3	C	-	146,3
<b>6'B</b>	106,0	107,8	CH	6,52	107,7
<b>2 F</b>	82,1	83,8	CH	4,49	82,5
<b>3 F</b>	66,4	67,7	CH	3,80	68,3
<b>4a F</b>	28,6	28,4	$\text{CH}_2$	2,73	27,4
<b>4b F</b>	28,6	28,4	$\text{CH}_2$	2,42	27,4
<b>5 D</b>	150,5	153,9	C	-	156,1
<b>6 D</b>	94,6	96,6	CH	5,98	97,6
<b>7 D</b>	150,7	152,4	C	-	155,0
<b>8 D</b>	105,4	106,6	C	-	108,6
<b>9 D</b>	154,3	152,5	C	-	152,6
<b>10 D</b>	101,5	102,5	C	-	101,6
<b>1'E</b>	134,0	130,6	C	-	131,5
<b>2'E</b>	106,8	107,4	CH	6,45	106,8
<b>3'E</b>	150,2	150,7	C	-	146,9
<b>4'E</b>	135,0	137,3	C	-	134,0
<b>5'E</b>	150,2	150,7	C	-	146,9
<b>6'E</b>	106,8	107,4	CH	6,45	106,8
<b>CH<sub>3</sub></b>	59,7	60,8	$\text{CH}_3$	3,69	-

Nota: 1:  $\delta$  em ppm utilizando TMS como padrão interno; 2:  $\delta$  teórico obtido no programa ChemDrawUltra (versão 10.0).

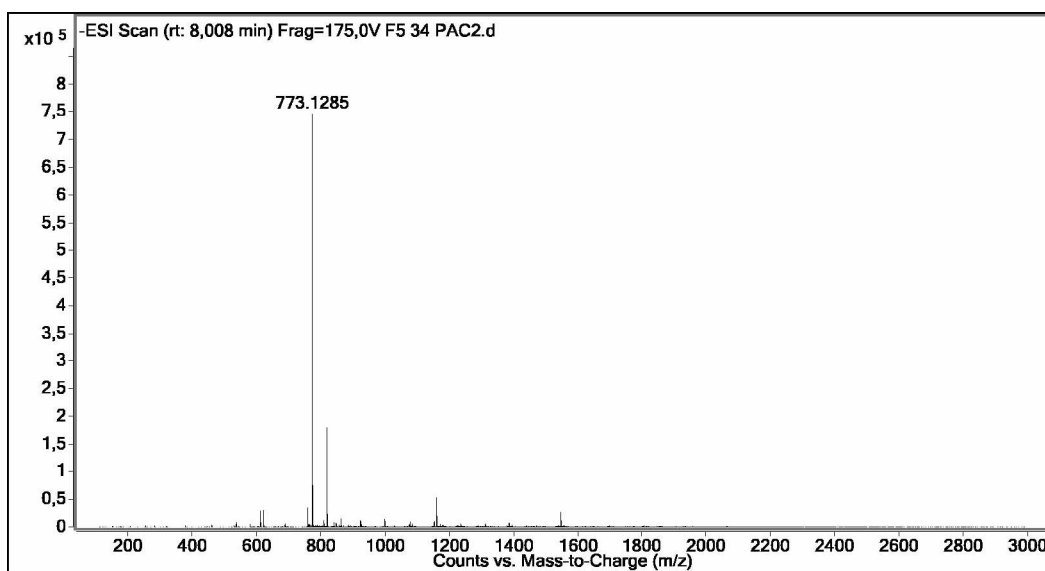


#### 5.17.4 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO FAEII-5-35-C

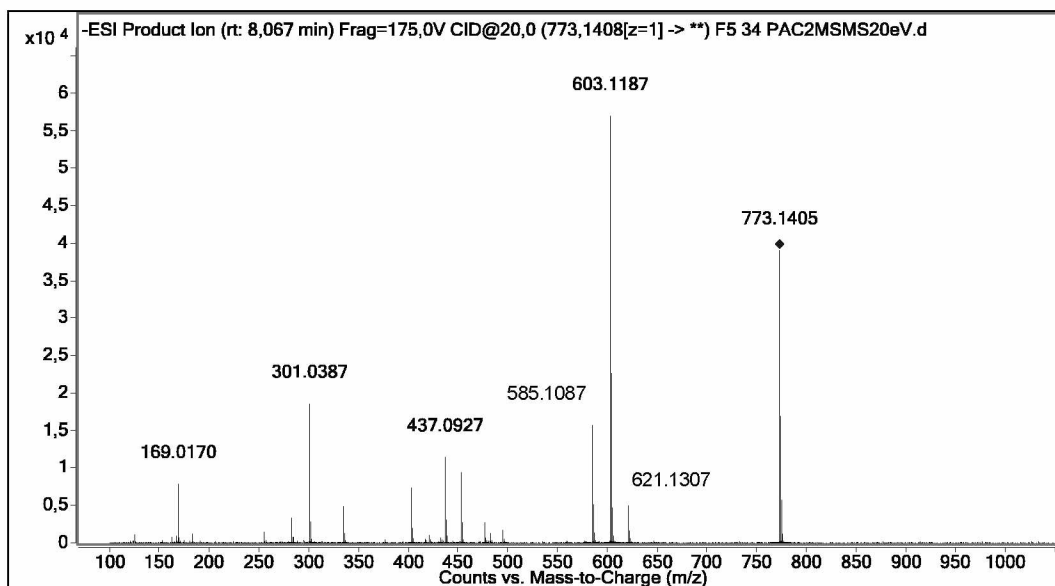
O composto com tempo de retenção em 35,5 min na CLAE semipreparativa foi coletado e o solvente evaporado, foram obtidos 1,7 mg do composto FAEII-5-35-C. Devido a pouca massa obtida não foi possível obter o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para identificação do composto, foram realizadas as análises de CLAE/EM-EM/EM no modo negativo e RMN de  $^1\text{H}$ , COSY, HSQC e DEPT-135 para elucidar uma proposta para a estrutura do composto. Pela comparação com dados da literatura e pela análise dos espectros de IES-EM-EM e RMN o composto FAEII-5-35-C foi identificado como uma proantocianidina tipo A, um derivado galoil da epigallocatequina-(2 $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7, 4 $\rightarrow$ 8)-4'-O-metilgallocatequina (FAEII-4-24-C), que possui massa molecular 774,14 g mol $^{-1}$  (C $_{38}$ H $_{30}$ O $_{18}$ ). Este composto não foi identificado na FAEII-C por CLAE/EM-EM/EM (Tabela 39, p.188), logo ele é o composto com numeração **XXVIII**.

O espectro de massas de alta resolução do composto FAEII-5-35-C está apresentado na Figura 141. Através deste espectro foi possível determinar a massa molecular do composto  $[\text{M} - \text{H}]^-$   $m/z$  773,1285 (massa adquirida), a massa exata do composto obtida pelo programa ChemDraw Ultra (versão 10.0) foi  $m/z$  773,1359, obtendo um erro de 9,6 ppm. O espectro de massas sequencial do íon  $m/z$  773 está apresentado na Figura 142.

Figura 141: Espectro de massas de alta resolução do composto FAEII-5-35-C.



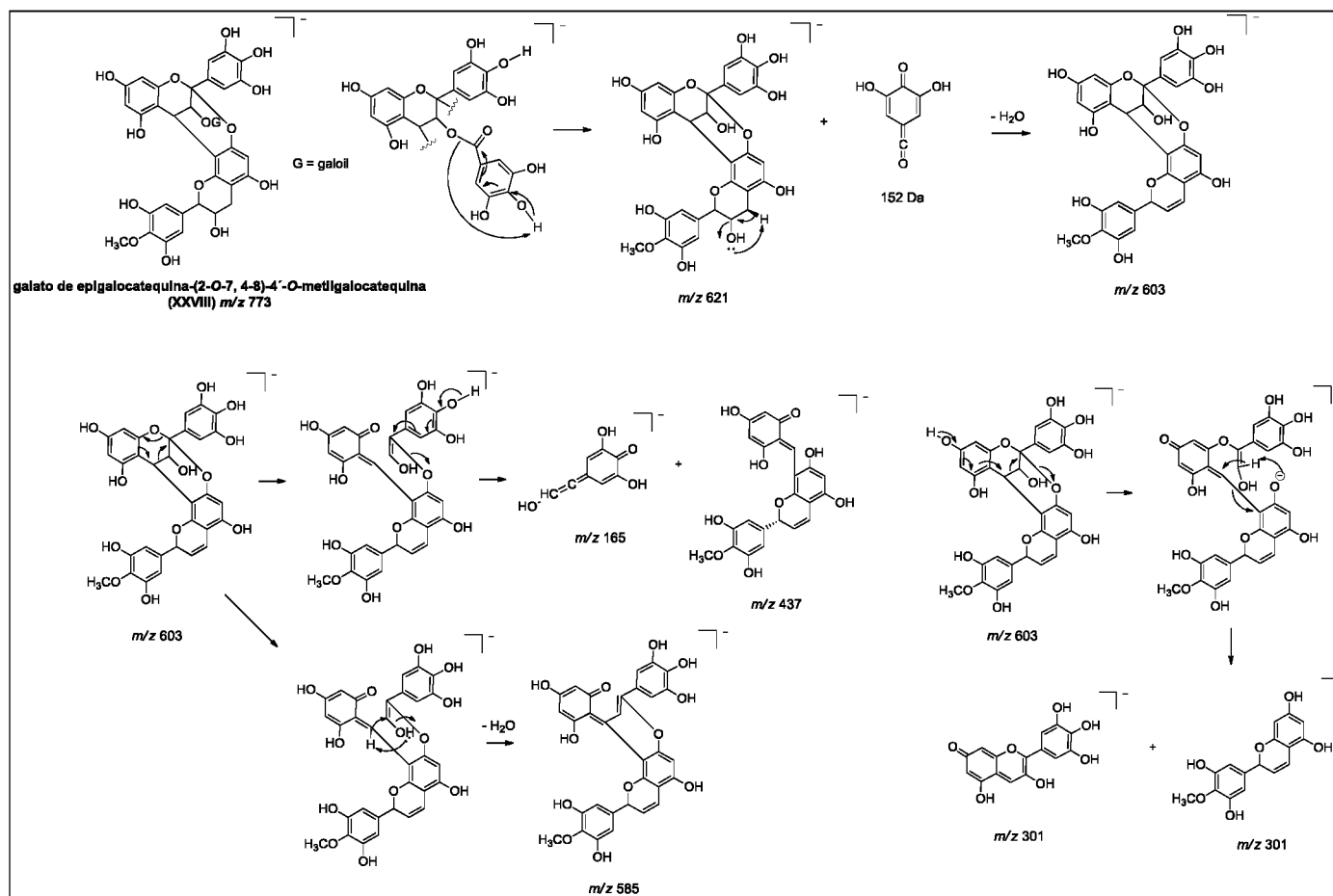
Fonte: autora.

Figura 142: Espectro de massas (EM/EM) do íon  $m/z$  773.

Fonte: autora.

O mecanismo de fragmentação do composto FAEII-5-35-C é semelhante ao mecanismo do composto FAEII-4-24-C (Figura 132, p. 232). A proposta de fragmentação está apresentada na Figura 143. A perda do grupo galoil (152 Da) através do mecanismo QM origina o íon  $m/z$  621  $[M-152-H]^-$ , em seguida ocorre a perda de uma molécula de água para formação do íon  $m/z$  603. A partir do íon  $m/z$  603 são formados os íons  $m/z$  437, 585 e 301. O íon  $m/z$  437  $[M-336-H]^-$  é formado através do mecanismo RDA no anel C e QM, o íon  $m/z$  585  $[M-188-H]^-$  é formado através do mecanismo RDA no anel C e perda de uma molécula de água, e o íon  $m/z$  301  $[M-472-H]^-$  é formado a partir do mecanismo QM no anel A com a formação de um íon fenóxido e captura do hidrogênio carbinólico (H-3 do anel C) (RODRIGUES et al., 2007, DEMARQUE et al., 2016).

Figura 143: Mecanismo de fragmentação do íon  $m/z$  773.



Fonte: autora.

A Figura 144 mostra o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto FAEII-5-35-C e a Figura 145 o espectro na região de hidrogênios aromáticos.

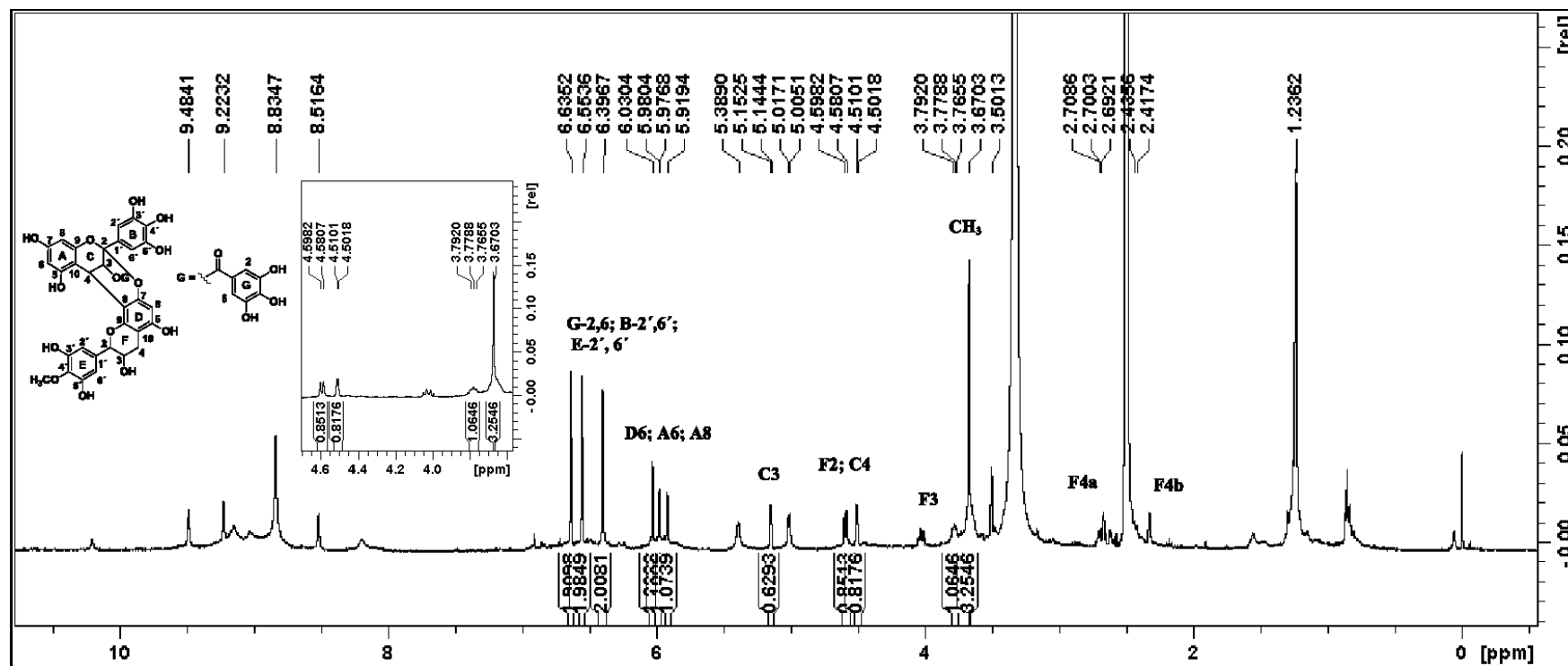
Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos compostos FAEII-4-24-C (Figura 133, p. 234) e FAEII-5-35-C (Figura 144) foram comparados, e foi verificado que o composto da FAEII-5 apresentava o sinal de um singlete ( $\delta$  6,64; 2H) a mais na região de aromático em relação ao composto da fração FAEII-4, o qual foi atribuído aos hidrogênios H-2 e H-6 (equivalentes) do grupo galoil. O duplete em  $\delta$  5,15 (1H,  $J = 3,2$  Hz) foi atribuído ao H-3 do anel C e o duplete em  $\delta$  4,51 (1H,  $J = 3,3$  Hz) ao H-4 do anel C, as constantes de acoplamento são características de proantocianidinas tipo A, assim como no composto FAEII-4-24-C.

Foram feitas as atribuições dos outros hidrogênios do composto FAEII-5-35-C, o singlete em  $\delta$  6,55 (2H) foi atribuído a H-2' e H-6' no anel B, o singlete em  $\delta$  6,40 (2H) foi atribuído a H-2' e H-6' no anel E e o singlete em  $\delta$  6,03 (1H) a H-6 no anel D. Os dois dupletos em  $\delta$  5,98 (1H,  $J = 1,4$  Hz) e  $\delta$  5,92 (1H,  $J = 1,5$  Hz) foram atribuídos a H-6 e H-8, respectivamente, acoplados na posição *meta* no anel A. O sinal do duplete em  $\delta$  4,59 (1H,  $J = 7,0$  Hz) foi atribuído ao H-2 do anel F e o multiplete em  $\delta$  3,77 (1H) a H-3 do anel F. A constante de acoplamento do H-2 do anel F é característica de hidrogênios *trans*-diaxial, resultado que indica que a unidade terminal da proantocianidina seja derivada da galocatequina. O sinal de um singlete em  $\delta$  3,67 (3H) indica a presença de um grupo metil, o que justifica que o composto possui uma unidade da proantocianidina derivada da metil galocatequina (composto FAEI-2-C, subitem 5.16).

Na região próxima ao sinal do solvente DMSO há dois sinais em  $\delta$  2,70 e 2,43 que foram atribuídos a H-4a e H-4b do anel F, no espectro da Figura 144 estes sinais ficaram pouco intensos e não foi possível identificar os dois duplos dupletos esperados para estes hidrogênios, porém, no mapa de contorno COSY (Figura 146) foi possível verificar o acoplamento entre estes hidrogênios e com o H-3 do anel F.

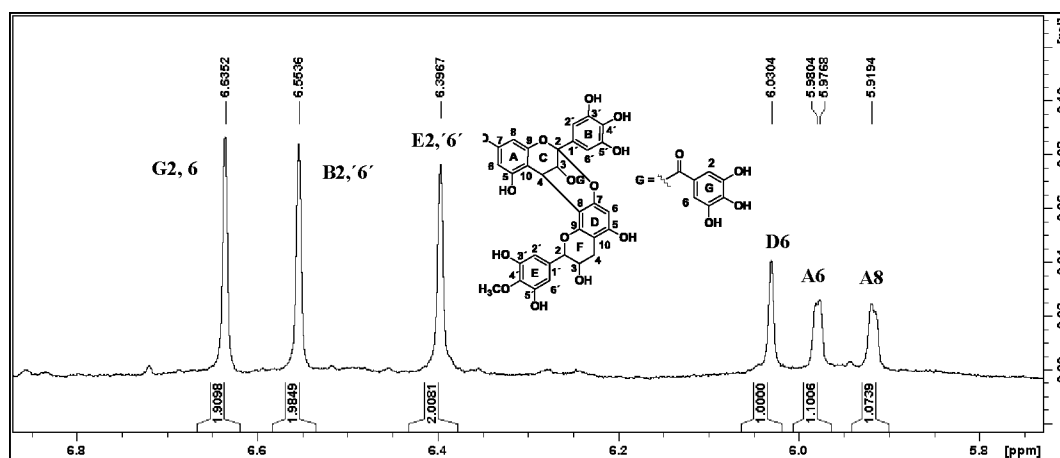
Através da análise do mapa de contorno COSY (Figura 146) foi verificado os acoplamentos entre H-3 (duplete em  $\delta$  5,15) e H-4 (o duplete em  $\delta$  4,41) no anel C e, no anel F, o acoplamento entre H-2 (duplete em  $\delta$  4,49) e H-3 (multiplete em  $\delta$  3,77).

Figura 144: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) do composto FAEL-5-35-C.

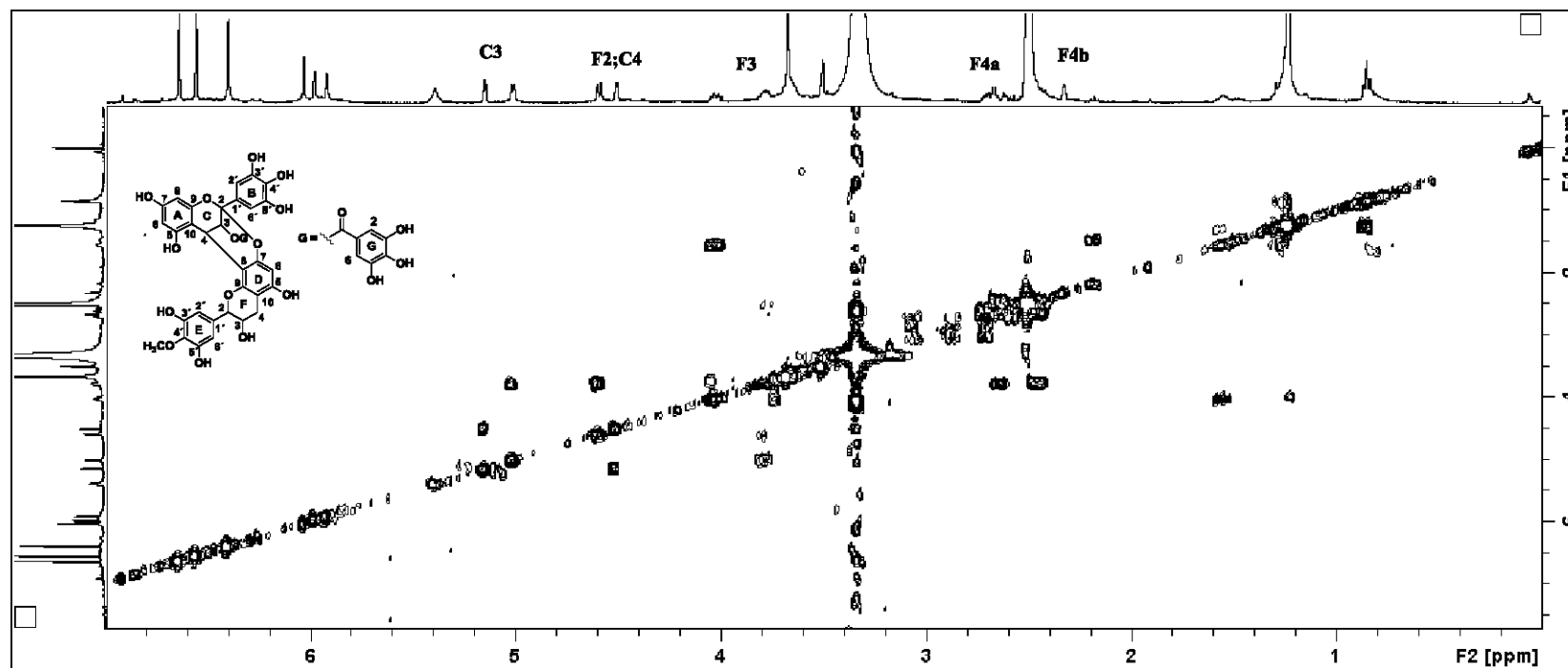


Fonte: autora.

Figura 145: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) na região de aromático do composto FAElI-5-35-C.



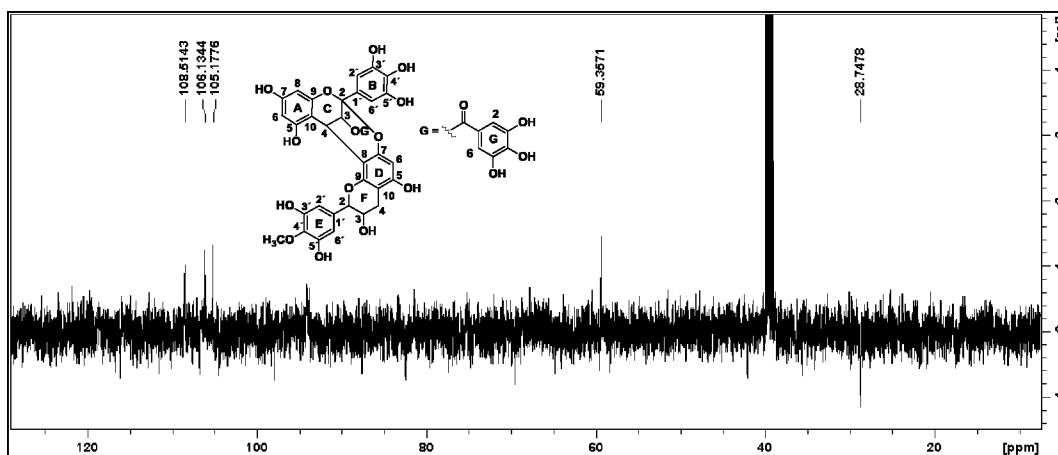
Fonte: autora.

Figura 146: Mapa de contorno COSY (DMSO- $d_6$ ) do composto FAEII-5-35-C.

Fonte: autora.

Pela análise do mapa de contorno HSQC e do espectro DEPT-135 foram feitas as correlações entre hidrogênio e carbono apenas para os sinais que apareceram no espectro DEPT-135 (Figura 147), que foram os sinais na região de aromáticos, o sinal do grupo metil e o sinal do CH<sub>2</sub> do H-4a,b do anel F. Os hidrogênios H-2 e H-6 correlacionam com os carbonos C2 e C6 (CH) no grupo galoil em  $\delta$  108,5, os hidrogênios do anel B H-2' e H-6' correlacionam com os carbonos C2' e C6' (CH) em  $\delta$  105,2, os hidrogênios do anel E H-2' e H-6' correlacionam com os carbonos C2' e C6' (CH) em  $\delta$  106,1, os hidrogênios metílicos correlacionam com o carbono em  $\delta$  59,6 e os hidrogênios H-4a e H-4b com C4 no anel F em  $\delta$  28,8.

Figura 147: Espectro DEPT-135 (DMSO-*d*<sub>6</sub>) do composto FAEII-5-35-C.

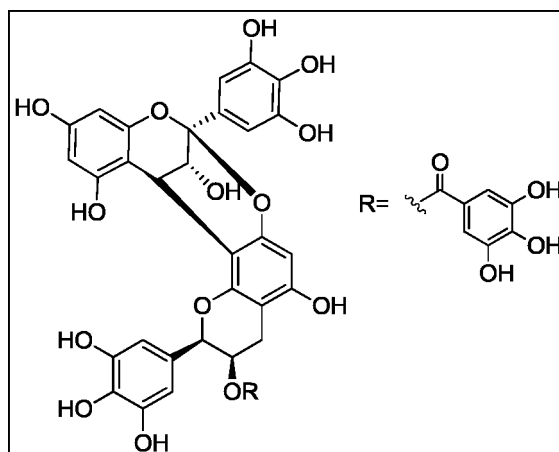


Fonte: autora.

A partir dos espectros e mapas de contorno de RMN apresentados acima e por comparação com os dados da literatura, o composto FAEII-5-35-C foi identificado como a epigalocatequina-3-*O*-galoil-(2→*O*→7, 4→8)-4'-*O*-metilgalocatequina. Não foi encontrado na literatura resultados de RMN para o composto identificado. Porém, foi encontrado dados de RMN para prodelfinidina A-2 3'-*O*-galoil (Figura 148) (HASHIMOTO; NONAKA; NISHIOKA, 1989). Pela comparação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios foi concluído que o grupo galoil do composto FAEII-5-35-C está ligado na unidade I da proantocianidina, pois o sinal do H-3 do anel C está mais deslocado devido a presença do grupo galoil, na prodelfinidina o H-3 do anel F é que possui o sinal mais deslocado, pois o grupo galoil está ligado neste carbono. O composto FAEII-5-35-C foi identificado pela primeira vez em plantas do gênero *Inga*.



Figura 148: Estrutura da prodelfinidina A-2 3'-*O*- galoil.



Fonte: Hashimoto, Nonaka e Nishioka (1989).

A Tabela 48 apresenta as correlações de todos os hidrogênios do composto FAEII-5-35-C que foram comparados com a prodelfinidina A-2 3'-*O*-galoil e a tabela 49 apresenta as correlações dos carbonos do composto FAEII-5-35-C obtido pelo programa ChemDrawUltra e comparados com o DEPT-135.

Tabela 48: Atribuição dos hidrogênios do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto FAEII-5-35-C e comparados com a prodelfinidina A-2 3'-*O*-galoil e atribuição dos carbonos do DEPT-135.

Posição	RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta^1$ ; $m^2$ ; $J^3$	COSY	RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, CD $_3$ COCD $_3$ +D $_2$ O) $\delta^1$ ; $m^2$ ; $J^3$ (HASHIMOTO; NONAKA; NISHIOKA, 1989)	(100 MHz, DEPT-135, DMSO- $d_6$ )
<b>3 C</b>	5,15 <i>d</i> (3,2)	H-4C	4,16 <i>d</i> (4,0)	-
<b>4 C</b>	4,51 <i>d</i> (3,3)	H-3C	4,50 <i>d</i> (4,0)	-
<b>6 A</b>	5,98 <i>d</i> (1,4)	-	6,09 <i>d</i> (2,0)	-
<b>8 A</b>	5,92 <i>d</i> (1,5)	-	6,29 <i>d</i> (2,0)	-
<b>2 G</b>	6,64 <i>s</i>	-	7,17 <i>s</i>	108,5 (CH)
<b>6 G</b>	6,64 <i>s</i>	-	7,17 <i>s</i>	108,5 (CH)
<b>2'B</b>	6,55 <i>s</i>	-	6,78 <i>s</i>	105,2 (CH)
<b>6'B</b>	6,55 <i>s</i>	-	6,78 <i>s</i>	105,2 (CH)
<b>2 F</b>	4,59 <i>d</i> (7,0)	H-3F	-	-
<b>3 F</b>	3,77 <i>m</i>	H-2F e H- 4a,bF	5,15 <i>m</i>	-
<b>4a F</b>	2,70 <i>m</i>	H-3F e H4b	2,82-3,30 <i>m</i>	28,8 (CH $_2$ )
<b>4b F</b>	2,43 <i>m</i>	H-3F e H4a		28,8 (CH $_2$ )
<b>6 D</b>	6,03 <i>s</i>	-	6,15 <i>s</i>	-
<b>2'E</b>	6,40 <i>s</i>	-	6,88 <i>s</i>	106,1 (CH)
<b>6'E</b>	6,40 <i>s</i>	-	6,88 <i>s</i>	106,1 (CH)
<b>CH<math>_3</math></b>	3,67 <i>s</i>	-	-	59,6 (CH $_3$ )

Nota: 1: deslocamento químico em ppm utilizando TMS como padrão interno; 2: multiplicidade (*s* = singlete, *d* = duplete, *m* = multiplete); 3: constante de acoplamento expresso em Hz.

Tabela 49: Atribuição dos carbonos do composto FAEII-5-35-C obtidos pelo programa ChemDrawUltra.

Posição	$\delta^2$	(100 MHz, DEPT-135, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	HSQC <sup>1</sup>
<b>2 C</b>	115,6	C	-
<b>3 C</b>	68,4	CH	5,15
<b>4 C</b>	28,0	CH	4,51
<b>5 A</b>	157,3	C	
<b>6 A</b>	95,7	CH	5,98
<b>7 A</b>	158,0	C	
<b>8 A</b>	95,2	CH	5,92
<b>9 A</b>	155,9	C	
<b>10 A</b>	104,0	C	
<b>1'B</b>	134,4	C	
<b>2'B</b>	107,8	105,2 (CH)	6,55
<b>3'B</b>	146,3	C	
<b>4'B</b>	133,3	C	
<b>5'B</b>	146,3	C	
<b>6'B</b>	107,8	105,2 (CH)	6,55
<b>1 G</b>	165,9		
<b>2 G</b>	109,6	108,5 (CH)	6,64
<b>3 G</b>	146,1		
<b>4 G</b>	140,3		
<b>5 G</b>	146,1		
<b>6 G</b>	109,6	108,5 (CH)	6,64
<b>2 F</b>	83,8	CH	4,59
<b>3 F</b>	67,7	CH	3,77
<b>4a F</b>	28,4	28,8 (CH <sub>2</sub> )	2,70
<b>4b F</b>	28,4	28,8 (CH <sub>2</sub> )	2,43
<b>5 D</b>	153,9	C	
<b>6 D</b>	96,6	CH	6,03
<b>7 D</b>	152,4	C	
<b>8 D</b>	106,6	C	
<b>9 D</b>	152,5	C	
<b>10 D</b>	102,5	C	
<b>1'E</b>	130,6	C	
<b>2'E</b>	107,4	106,1 (CH)	6,40
<b>3'E</b>	150,7	C	
<b>4'E</b>	137,3	C	
<b>5'E</b>	150,7	C	
<b>6'E</b>	107,4	106,1 (CH)	6,40
<b>CH<sub>3</sub></b>	60,8	59,6 (CH <sub>3</sub> )	3,67

Nota: 1:  $\delta$  em ppm utilizando TMS como padrão interno.

2:  $\delta$  teórico obtido no programa ChemDrawUltra (versão 10.0).

### 5.18 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS FAE4-F E FAE1-2-C E DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Inga laurina*

A FAE4-F (miricetina-3-*O*-ramnosídeo) foi submetida a análise da atividade antioxidante (método DPPH e voltametria de pulso diferencial), atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase e atividade antifúngica. Os resultados das atividades biológicas da FAE4-F estão apresentados nas Tabelas 50 e 51. Na Tabela 51 também estão apresentados os resultados da atividade antifúngica das frações FAE1-F a FAE8-F.

Tabela 50: Resultados da atividade antioxidante (método DPPH e voltametria de pulso diferencial) e inibição da  $\alpha$ -amilase da miricetina-3-*O*-ramnosídeo.

	DPPH	Voltametria				$\alpha$ -amilase
	CE <sub>50</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Acetato Carga ( $\mu\text{C}$ )	Potencial (V)	Fosfato Carga ( $\mu\text{C}$ )	Potencial (V)	% inibição
<b>FAE4-F – miricetina-3-<i>O</i>- ramnosídeo</b>	7,8 $\pm$ 0,3	222,5 $\pm$ 10,5	0,316 $\pm$ 0,003	158,3 $\pm$ 2,5	0,162 $\pm$ 0,001	33,7 $\pm$ 4,6
<b>BHT</b>	7,2 $\pm$ 0,3	-	-	-	-	-
<b>Acarbose</b>	-	-	-	-	-	99,6 $\pm$ 0,2

Nota: BHT – butilidroxitolueno (controle positivo).

O flavonoide miricetina-3-*O*-ramnosídeo apresentou elevada atividade de sequestro do radical DPPH, pois o valor de CE<sub>50</sub> é menor que 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , além disso o resultado é muito próximo ao BHT.

No trabalho de Sousa (2015) foram avaliadas as atividades antioxidante (DPPH e voltametria) e inibidora de  $\alpha$ -amilase de quatro flavonoides isolados das folhas de *Eugenia calycina*, rutina, isoquercitrina, quercitrina e (-)-epicatequina. Os resultados de CE<sub>50</sub> pelo método DPPH para estes quatro flavonoides foram 5,52, 6,45, 6,44 e 2,89  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Estes resultados foram melhores que o encontrado para a miricetina-3-*O*-ramnosídeo, especialmente para a (-)-epicatequina, pois quanto menor o valor de CE<sub>50</sub> melhor é a atividade antioxidante. Porém, no trabalho de Hayder e outros (2008) foi avaliada a atividade antioxidante e antígeno tóxica da miricetina-3-*O*-ramnosídeo, em que este composto apresentou elevada atividade de inibição da enzima xantina oxidase, alto potencial de sequestro de radicais livres, promissora atividade

antimutagênica e ausência de mutagenicidade, caracterizando este composto como um fitofarmacêutico de interesse. Substâncias com propriedades antimutagênicas são importantes para proteger o organismo humano de ataque de radicais livres ao DNA, envelhecimento e câncer (HAYDER et al., 2008).

O baixo valor no resultado de  $CE_{50}$  da miricetina-3-*O*-ramnosídeo pode ser explicado porque este composto possui uma hidroxila no carbono C3' do anel B, ligação dupla entre os carbonos C2 e C3 no anel C e carbonila no carbono C4, estas características estruturais dos flavonóis explicam a atividade antioxidante destes compostos, pois favorece a estabilização do radical formado através da deslocalização de elétrons e **formação de um sistema  $\pi$  conjugado**. Quando se compara a atividade antioxidante da aglicona com a respectiva aglicona glicosilada, a aglicona apresenta melhor atividade antioxidante porque o grupamento glicosídico possui efeito estérico na estrutura do flavonoide, reduzindo a atividade antioxidante (COOK; SAMMAN, 1996, RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997, HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002, KUMAR; PANDEY, 2013).

O composto miricetina-3-*O*-ramnosídeo apresentou menor potencial de oxidação (no tampão acetato) que os flavonoides rutina, isoquercitrina e quercitrina, que possuem potencial de oxidação de 0,408, 0402 e 0402 V, respectivamente, e um valor muito próximo ao da (-)-epicatequina, que possui potencial de 0,318 V, o menor potencial de oxidação para miricetina-3-*O*-ramnosídeo infere que este composto é mais facilmente oxidado, resultando em uma boa atividade antioxidante, como foi encontrado pelo método DPPH. Em relação a carga, a miricetina-3-*O*-ramnosídeo apresentou maior valor que rutina, isoquercitrina, quercitrina e (-)-epicatequina, que apresentaram resultados de 210,2, 203,3, 200,9 e 162,6  $\mu$ C. Esse resultado pode ser explicado pela maior massa molar da miricetina-3-*O*-ramnosídeo em relação aos outros flavonoides, pois o coeficiente de difusão é proporcional a massa molar, logo, compostos com maior massa molar chegam mais facilmente a superfície do eletrodo, aumentando a carga (PACHECO, 2013, SOUSA, 2015).

O flavonoide isolado das folhas de *I. laurina* apresentou baixa inibição da  $\alpha$ -amilase, e por isso não foi realizado o cálculo do  $CE_{50}$ . A FAE-F da qual o flavonoide foi isolado apresentou elevada atividade inibitória desta enzima, (89,1 % de inibição e  $CE_{50} = 8,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Tabelas 20 e 21, p.114), logo, pode ser sugerido que a atividade de inibição da enzima pela fração pode ocorrer por sinergismo entre os flavonoides

presentes na amostra, além da miricetina-3-*O*-ramnosídeo, outros flavonoides foram identificados na FAE-F (Tabela 28, p.131) e em combinação estes flavonoides aumentam a eficácia da atividade inibitória ou a amostra pode possuir um metabólito que seja responsável pela inibição da enzima. Vários trabalhos na literatura relatam efeitos sinérgicos entre produtos naturais para aumentar a atividade biológica, como atividade antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, entre outras (SILVA; FERNANDES JUNIOR, 2010, BREWER, 2011, ABREU; MCBAIN; SIMOES, 2012, RADULOVIC et al., 2013).

Os resultados da atividade antifúngica das frações das folhas de *I. laurina* e dos compostos isolados miricetina-3-*O*-ramnosídeo (FAE4-F) e 4'-*O*-metilgalocatequina (FAEI-2-C) estão apresentados nas Tabelas 51 e 52.

As frações da coluna FAE1-F, FAE2-F e FAE5-F não apresentaram atividade anti levedura dentro do intervalo das concentrações testadas (3000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  - 1,46  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A fração FAE4-F, que corresponde ao composto isolado miricetina-3-*O*-ramnosídeo, inibiu o crescimento de todas as leveduras com concentração de 93,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  como pode observado na Tabela 51. Mesmo o composto miricetina-3-*O*-ramnosídeo ter apresentado atividade frente aos microrganismos testados, seria interessante que os valores de CIM estivessem abaixo de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , por tratar-se de um composto isolado (RÍOS; RECIO, 2005). Este resultado corrobora o resultado da atividade antifúngica para este composto no trabalho de Salazar-Aranda e outros (2015) que obtiveram resultado para a CIM maior que 83  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *C. albicans* e *C. tropicalis* (isolado clínico 166), porém, neste trabalho o resultado da CIM para *C. glabrata* foi de 3,9 e 7,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para isolados clínicos da levedura.

As frações FAE3-F e FAE4-F apresentaram os mesmos resultados de CIM que FAE-F, com exceção da FAE4-F que foi menos ativa para *C. glabrata*. A partir destes resultados é possível inferir que a miricetina-3-*O*-ramnosídeo pode ser a substância responsável pela atividade antifúngica da FAE-F para *C. albicans* e *C. tropicalis* e pode ser sugerido que o sinergismo entre os compostos presentes na FAE-F e FAE3-F contribuiu para a melhor atividade contra *C. glabrata* ou um dos metabólitos presentes nessas frações seja responsável pela atividade contra o microrganismo.

Tabela 51: Resultados da atividade antifúngica, expresso como CIM, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , das FAE1-F a FAE8-F da FAE-F de *I. laurina*.

Amostras	Microrganismos		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
	ATCC 28366	ATCC 13803	ATCC 15126
<b>FAE1-F</b>	> 3000	> 3000	> 3000
<b>FAE2-F</b>	> 3000	> 3000	> 3000
<b>FAE3-F</b>	93,8	93,8	11,7
<b>FAE4-F</b>	93,8	93,8	93,8
<b>miricetina-3-O-ramnosídeo</b>			
<b>FAE5-F</b>	> 3000	> 3000	> 3000
<b>FAE6-F</b>	5,9	5,9	5,9
<b>FAE7-F</b>	5,9	11,7	5,9
<b>FAE8-F</b>	11,7	23,4	5,9
<b>FAE-F</b>	93,8	93,8	11,7

Concentrações das amostras testadas: 1,46  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 3.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Tabela 52: Resultados da atividade antifúngica, expresso como CIM, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , da FAEI-2-C de *I. laurina*.

Amostras	Microrganismos		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
	ATCC 28366	ATCC 13803	ATCC 15126
<b>FAEI-2-C</b>	> 3000	> 3000	> 3000
<b>4'-O-metilgalocatequina</b>			
<b>FAEI-C</b>	500	1000	23,4

Concentrações da amostra testada: 1,46  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 3000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

As frações FAE6-F, FAE7-F e FAE8-F exibiram resultados de atividade antifúngica melhores que a FAE-F, especialmente a FAE6-F que inibiu todas as leveduras com concentração de 5,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O resultado encontrado para a fração FAE6-F pode ser considerado como um forte efeito antifúngico, uma vez que este valor está abaixo do que é considerado promissor para um composto puro (CIM < 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (RÍOS; RECIO, 2005). A constituição química das frações FAE6-F, FAE7-F e FAE8-F são semelhantes quando analisadas por CLAE/EM-EM/EM (Tabelas 33, 34 e 35). Esse fato pode explicar a maior atividade dessas frações frente às espécies de *Candida* avaliadas. Os compostos identificados nestas frações, como ácido gálico, ácido vanílico, ácido quínico, além da miricetina-3-O-ramnosídeo, são descritos na literatura

como substâncias que possuem atividade antifúngica (MARTINS et al., 2015, SALAZAR-ARANDA et al., 2015, TEODORO et al., 2015, SELEEM; PARDI; MURATA, 2017). Além disso, alguns trabalhos demonstram que a combinação de compostos fenólicos, moléculas isoladas ou frações, com agentes antifúngicos comerciais melhoram a atividade biológica reduzindo o valor da CIM (DA SILVA et al., 2014, MEIRELLES et al., 2017). Nestes trabalhos os autores explicam que o sinergismo entre os compostos é responsável pelo aumento da atividade antifúngica frente as espécies de *Candida*.

Alguns trabalhos na literatura discutem sobre o sinergismo entre os compostos fenólicos em diferentes atividades biológicas (TAFESH et al., 2011, PALAFOX-CARLOS et al., 2012, LEWANDOWSKA et al., 2014). No trabalho de Da Silva e outros (2014) a atividade antifúngica frente a *C. tropicalis* foi aumentada quando houve a combinação dos flavonoides catequina, quercetina e epigallocatequina com o fluconazol (medicamento empregado no tratamento de doenças causadas por fungos), diminuindo o valor da CIM. Segundo os autores o sinergismo destas substâncias provoca danos as células mitocondriais levando a morte celular por apoptose devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio no meio intracelular. Foi verificado efeito sinérgico entre os flavonoides quercetina e campferol na redução da proliferação de linhagens de células cancerígenas do cólon e da mama (ACKLAND; WAARSENBURG; JONES, 2005). No trabalho de Wang e outros (2016) os autores sintetizaram vários compostos derivados da chalcona e realizaram o ensaio da atividade antifúngica frente a *C. albicans* destes compostos com o fluconazol. Foi verificado uma diminuição na CIM, resultado que foi explicado pelo sinergismo entre os compostos sintetizados e o fármaco fluconazol.

Foi realizado o ensaio da atividade antifúngica para o composto isolado FAEI-2-C, a 4'-*O*-metilgalocatequina (Tabela 52). Quando analisado sozinho, o composto 4'-*O*-metilgalocatequina não apresentou atividade, pois o valor da CIM foi superior a 3000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Este resultado foi maior que a fração de origem (FAEI-C), sugerindo que a combinação (sinergismo) dos flavonoides presentes na fração acetato de etila I das cascas é importante para a atividade contra as espécies de *Candida*, especialmente para *C. glabrata*, que foi a espécie mais sensível à FAEI-C.



## 6 CONCLUSÕES

Os extratos e frações das folhas de *I. laurina* apresentaram resultados positivos para a presença de flavonoides através da triagem fitoquímica realizada e análise dos espectros UV-VIS das amostras. Já os extratos e frações das cascas não tiveram os mesmos resultados que as folhas. As cascas apresentaram resultado positivo para a presença de terpenos, saponinas, esteroides e fenilpropanoides na triagem fitoquímica e possuem perfil químico diferente nos espectros UV-VIS. Logo, os constituintes químicos das folhas e cascas da planta pertencem a classes de metabólitos diferentes.

As amostras das folhas e das cascas apresentaram alto teor de fenóis totais, especialmente a FAE-F as FAEI-C, FAEII-C, FB-C e FM-C.

As amostras das cascas apresentaram maior teor de proantocianidinas em relação às folhas, com destaque para as FAEI-C, FAEII-C, FB-C e FM-C, que também foram as amostras que tiveram maior teor de fenóis totais. Em relação ao teor de flavonoides, as folhas apresentaram resultado superior ao das cascas, especialmente a fração acetato de etila. Estes resultados indicaram que os constituintes das folhas são flavonoides do tipo flavonóis, que formam complexos com o cloreto de alumínio (reagente utilizado no ensaio do teor de flavonoides) e os das cascas são do tipo flavan-3-óis, os quais não formam complexos com o cloreto de alumínio, mas são os monômeros que formam as proantocianidinas, por isso as cascas tiveram alto teor de proantocianinas. Este resultado foi corroborado pela análise por CLAE/EM-EM/EM.

Os extratos e frações das folhas e das cascas apresentaram elevada capacidade de sequestro do radical DPPH, pois os valores de  $CE_{50}$  foram menores que  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , especialmente a FAE-F e as FAEI-C, FAEII-C, FB-C e FM-C. Estas amostras foram as que apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos, resultado que explica a atividade antioxidante para as amostras.

A planta apresentou resultado promissor para a inibição da enzima  $\alpha$ -amilase. Todas as amostras estudadas apresentaram resultado de  $CE_{50}$  menor que  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , que pode estar relacionado a grande quantidade de compostos fenólicos que as amostras possuem. As amostras FB-C e FM-C foram mais promissoras que as das folhas, pois o valor de  $CE_{50}$  foi menor que  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  para estas frações.

As amostras das folhas e cascas não foram ativas frente aos microrganismos bucais avaliados neste trabalho e ao protozoário *L. amazonensis*. Os resultados da CIM

para os microrganismos foram iguais ou superiores a  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a maioria das amostras, e os resultados de  $\text{CI}_{50}$  foram maiores que  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

A FAE-F e as FAEI-C, FAEII-C, FB-C e FM-C foram as amostras mais ativas frente os fungos do gênero *Candida*, resultado que pode ser explicado pelo alto teor de compostos fenólicos destas amostras.

A FAE-F é constituída principalmente por flavonoides pertencentes a classe dos flavonois, foram identificados por EM os seguintes compostos: miricetina-3-*O*-ramnosídeo (composto isolado e identificado por RMN), ácido gálico, (epi)galocatequina, derivado metílico do ácido gálico, galato de etila, miricetina-*O*-(*O*-galoil)-hexosídeo, miricetina-3-*O*-galactosídeo, miricetina galoil ramnosídeo, miricetina, quercetina-3-*O*-ramnosídeo, quercetina-3-*O*-(2''-galoil)-ramnosídeo, quercetina, miricetina-3-*O*-acetil-ramnosídeo, ácido quínico digaloil, miricetina-3-*O*-ramnose-3'-*O*-ramnosídeo, ácido quínico trigaloil e ácido vanílico. Estes compostos justificam os resultados promissores da atividade antioxidante, antifúngica e inibitória da enzima  $\alpha$ -amilase para esta amostra.

A fração da coluna FAE6-F apresentou o melhor resultado ( $\text{CIM} = 5,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para a inibição do crescimento dos fungos *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, resultado que pode ser explicado pela combinação entre os compostos fenólicos presentes nesta fração, pois a atividade antifúngica foi melhor que a fração de origem FAE-F e que o composto isolado miricetina-3-*O*-ramnosídeo ( $\text{CIM} = 93,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Em relação as FAEI-C e FAEII-C foram identificados flavonoides do tipo flavan-3-óis, que possuem estrutura química diferente dos flavonois identificados na FAE-F. Foram identificados por EM os seguintes flavonoides nas FAEI-C e FAEII-C: (epi)galocatequina-3-*O*-galato, (epi)catequina-3-*O*-galato, 4'-*O*-metil-(epi)galocatequina-3-*O*-galato, (epi)galocatequina-3-*O*-(3'',4''-*O*-dimetil) galato ou (epi)galocatequina-3-*O*-(3'',5''-*O*-dimetil) galato, ácido *p*-cumárico e prodelfinidina B-4 e isolados cinco compostos inéditos em plantas do gênero *Inga*, 4'-*O*-metilgalocatequina, galocatequina, galocatequina-(4 $\alpha$ -8)-4'-*O*-metilgalocatequina, epigalocatequina-(2 $\rightarrow$ *O* $\rightarrow$ 7,4 $\rightarrow$ 8)-4'-*O*-metilgalocatequina e epigalocatequina-3-*O*-galoil-(2 $\rightarrow$ *O* $\rightarrow$ 7,4 $\rightarrow$ 8)-4'-*O*-metilgalocatequina, os quais foram identificados pelas técnicas de RMN e EM. Os compostos fenólicos presentes nas cascas explicam os resultados promissores da atividade antioxidante, antifúngica e inibitória da enzima  $\alpha$ -amilase.

A partir da identificação dos metabólitos das frações acetato de etila das folhas e das cascas da planta *I. laurina* foi concluído que as amostras são constituídas majoritariamente de compostos fenólicos, especialmente flavonoides, que são substâncias biologicamente ativas de interesse farmacológico.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMEED, E.-S. S.; BAZAID, S. A.; SALMAN, M. S. Characterization of the Phytochemical Constituents of Taif Rose and Its Antioxidant and Anticancer Activities. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, n. 0, p. 13, Oct. 2013.
- ABRAHAM, R. J.; MOBIL, M. An NMR, IR and theoretical investigation of <sup>1</sup>H Chemical Shifts and hydrogen bonding in phenols. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Chichester, v. 45, n. 10, p. 865-877, Oct. 2007.
- ABREU, A. C.; MCBAIN, A. J.; SIMOES, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural Product Reports**, London, v. 29, n. 9, p. 1007-1021, Set. 2012.
- ABU-REIDAH, I. M.; ALI-SHTAYEH, M. S.; JAMOUS, R. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, Barking, v. 166, n. 0, p. 179-191, Jan. 2015.
- ACKLAND, M. L.; WAARSENBURG, S. V. D.; JONES, R. Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines. **In Vivo**, Athens, v. 19, n. 1, p. 69-76, Jan./Feb. 2005.
- AGBOR, G. A.; VINSON, J. A.; DONNELLY, P. E. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. **International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics (IJFS)**, [S.l.], v. 3, n. 8, p. 147-156, Aug. 2014.
- AGUIAR, C. **Botânica para Ciências Agrárias e do Ambiente**. 3. ed. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, 2013. 92 p.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v. 30, n. 1, p. 41-50, Jan. 2011.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; MANZOOR, N.; KHAN, L. A. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 48, n. 1, p. 35-41, Jan. 2010.
- AKHTAR, N.; IHSAN UL, H.; MIRZA, B. Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. **Arabian Journal of Chemistry**, Saudi Arabia, v. 0, n. 0, p. 1-13, Feb. 2015.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Riyadh, v. 21, n. 2, p. 143-152, Apr. 2013.
- ALANÍS-GARZA, B. A.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, G. M.; SALAZAR-ARANDA, R.; WAKSMAN DE TORRES, N.; RIVAS-GALINDO, V. M. Screening of antifungal

activity of plants from the northeast of Mexico. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 114, n. 3, p. 468-471, Dec. 2007.

ALBERNAZ, L. C.; DE PAULA, J. E.; ROMERO, G. A. S.; SILVA, M. D. R. R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L. S. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 131, n. 1, p. 116-121, Aug. 2010.

ALLAKER, R. P.; DOUGLAS, C. W. I. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 1, p. 8-13, 2009.

ALONSO-SALCES, R. M.; NDJOKO, K.; QUEIROZ, E. F.; IOSET, J. R.; HOSTETTMANN, K.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, F. On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1046, n. 1-2, p. 89-100, Aug. 2004.

ALVAREZ, J. C.; SERRANO, R. P.; OSPINA, L. F.; TORRES, L. A. A. Actividad biológica de las saponinas de la corteza de *Inga marginata* Willd. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 1, n. 27, p. 17-26, Sep. 1998a.

ALVAREZ, J. C.; SERRANO, R. P.; OSPINA, L. F.; TORRES, L. A. A. Actividad Biológica de las saponinas de la corteza de *Inga marginata* Willd. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, S.l., v. 27, n. 1, p. 17-19, Noviembre 1998b.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALVIANO, W. S.; ALVIANO, D. S.; DINIZ, C. G.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, C. S.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; SOUZA, M. M. G.; BOLOGNESE, A. M. *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 53, n. 6, p. 545-552, Jun. 2008.

ANSARI, M. A.; ANURAG, A.; FATIMA, Z.; HAMEED, S. Natural Phenolic Compounds: A Potential Antifungal Agent [2013]. Disponível em: <<http://www.formatex.info/microbiology4/vol2/1189-1195.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2016.

ANTOUN, M. D.; RAMOS, Z.; VAZQUES, J.; OQUENDO, I.; PROCTOR, G. R.; GERENA, L.; FRANZBLAU, S. G. Evaluation of the flora of Puerto Rico for in vitro antiplasmodial and antimycobacterial activities. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 15, n. 7, p. 638-642, Nov. 2001.

ARENDRUP, M. C. Epidemiology of invasive candidiasis. **Current Opinion in Critical Care**, Hagerstown, v. 16, n. 5, p. 445-452, Oct. 2010.

ARUOMA, O. I. Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 75, n. 2, p. 199-212, February 1998.

ASHRAF, A.; SARFRAZ, R. A.; RASHID, M. A.; SHAHID, M. Antioxidant, antimicrobial, antitumor, and cytotoxic activities of an important medicinal plant (*Euphorbia royleana*) from Pakistan. **Journal of Food and Drug Analysis**, Taipei City, v. 23, n. 1, p. 109-115, Mar. 2015.

ASTELBAUER, F.; WALOCHNIK, J. Antiprotozoal compounds: state of the art and new developments. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 38, n. 2, p. 118-124, Aug. 2011.

ATINAFU, D. G.; BEDEMO, B. Estimation of total free fatty acid and cholesterol content in some commercial edible oils in Ethiopia, Bahir DAR. **Journal of Cereals and Oil seeds**, [S.l.], v. 2, n. 6, p. 71-76, Nov. 2011.

AVELLA, D. M. G.; GARCÍA, C. A. O.; CISNEROS, A. M. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. In: Simposio de Metrología 2008, 2008, Santiago de Querétaro, México. **Anais**. Santiago de Querétaro, México: 2008.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Xi'an, v. 0, n. 0, p., 2016.

BASTOS, I. S.; PIERI, F. A.; YAMAGUCHI, K. K. D. L.; LAMARÃO, C. V.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; ORLANDI, P. P. Antibacterial and antifungal activities of extracts from Amazon plants. In: 28º Congresso Brasileiro Microbiologia 28, 2015, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: SBM, 2015.

BERMINGHAM, E.; DICK, C. The Inga--Newcomer or Museum Antiquity? **Science**, New York, v. 293, n. 5538, p. 2214-2216, September 2001.

BERNARDES, W. A.; LUCARINI, R.; TOZATTI, M. G.; SOUZA, M. G. M.; ANDRADE SILVA, M. L.; DA SILVA FILHO, A. A.; MARTINS, C. H. G.; MILLER CROTTI, A. E.; PAULETTI, P. M.; GROppo, M.; CUNHA, W. R. Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* against Oral Pathogens: Relevance of Carnosic Acid and Carnosol. **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, v. 7, n. 7, p. 1835-1840, Jul. 2010.

BIOCLIN Amilase Cinética. [2015]. Disponível em:  
<[http://www.bioclin.com.br/sitebioclin/wordpress/wp-content/uploads/arquivos/instrucoes/INSTRUcoes\\_AMILASE\\_CINETICA.pdf](http://www.bioclin.com.br/sitebioclin/wordpress/wp-content/uploads/arquivos/instrucoes/INSTRUcoes_AMILASE_CINETICA.pdf)>.  
Acesso em: 29 mar. 2016.

BIOSCIENCES, A. Sephadex LH-20. In: BIOSCIENCES, A. **Gel Filtration - principles and methods**, Amersham Biosciences, 2002. cap. 5, p. 81-85.

BLASCO, A. J.; CREVILLÉN, A. G.; GONZÁLEZ, M. C.; ESCARPA, A. Direct electrochemical sensing and detection of natural antioxidants and antioxidant capacity in vitro systems. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 19, n. 22, p. 2275-2286, Nov. 2007.

BOEHLKE, C.; ZIERAU, O.; HANNIG, C. Salivary amylase – The enzyme of unspecialized euryphagous animals. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 60, n. 8, p. 1162-1176, Aug. 2015.

BONOMINI, T. J. **Padronização de metodologia para extração do fitoconstituente majoritário das flores de *Allamanda cathartica* L. (APOCYNACEAE)**. 2013. 35 f. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2013.

BOUDET, A.-C.; CORNARD, J.-P.; MERLIN, J.-C. Conformational and spectroscopic investigation of 3-hydroxyflavone–aluminium chelates. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Amsterdam v. 56, n. 4, p. 829-839, Mar. 2000.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, Shannon, v. 161, n. 5, p. 839-851, Oct. 2001.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, Zürich, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRANDT, M. E.; PARK, B. J. Think Fungus—Prevention and Control of Fungal Infections. **Emerging Infectious Disease journal**, Atlanta, v. 19, n. 10, p. 1688, Oct. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Diabetes Mellitus**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 64 p.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221-247, Jun. 2011.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 4, n. 165, p. 1-9, Dec. 2012.

BURKE, R. W.; DIAMONDSTONE, B. I.; VELAPOLDI, R. A.; MENIS, O. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 20, n. 7, p. 794-801, Jul. 1974.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 255 p.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Revista española de quimioterapia**, Barcelona, v. 19, n. 2, p. 130-139, Jun. 2006.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos e heterosídeos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao**

**medicamento**, Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. cap. 519-536, p. 20.

CASE, R. J.; FRANZBLAU, S. G.; WANG, Y.; CHO, S. H.; SOEJARTO, D. D.; PAULI, G. F. Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 106, n. 1, p. 82-89, Jun. 2006.

CECÍLIO, A. B.; FARIA, D. B. D.; OLIVEIRA, P. D. C.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D. A. D.; SOBRAL, M. E. G.; DUARTE, M. G. R.; MOREIRA, C. P. D. S.; SILVA, C. G.; ALMEIDA, V. L. D. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 141, n. 3, p. 975-981, Jun. 2012.

CEPF. **Perfil do Ecossistema Hotspot de Biodiversidade do Cerrado**. 1. ed. Critical Ecosystem Partnership Fund, 2016. 495 p.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; LAGO, J. H. G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 597-599, Jun. 2007.

CHAKRABORTY, B.; NATH, A.; SAIKIA, H.; SENGUPTA, M. Bactericidal activity of selected medicinal plants against multidrug resistant bacterial strains from clinical isolates. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Haikou, v. 7, n. Supplement 1, p. S435-S441, Sep. 2014.

CHAN, C.-H.; YUSOFF, R.; NGOH, G.-C.; KUNG, F. W.-L. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1218, n. 37, p. 6213-6225, Sep. 2011.

CHARISIADIS, P.; KONTOGIANNI, V.; TSIAFOULIS, C.; TZAKOS, A.; SISKOS, M.; GEROTHANASSIS, I. 1H-NMR as a Structural and Analytical Tool of Intra- and Intermolecular Hydrogen Bonds of Phenol-Containing Natural Products and Model Compounds. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 9, p. 13643, Sep. 2014.

CHIU, F.-L.; LIN, J.-K. HPLC Analysis of Naturally Occurring Methylated Catechins, 3'- and 4'-Methyl-epigallocatechin Gallate, in Various Fresh Tea Leaves and Commercial Teas and Their Potent Inhibitory Effects on Inducible Nitric Oxide Synthase in Macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 18, p. 7035-7042, Sep. 2005.

CHUNG, J. Y.; CHOO, J. H.; LEE, M. H.; HWANG, J. K. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, v. 13, n. 4, p. 261-266, 2006.

ÇİTOĞLU, G. S.; ACIKARA, Ö. B. Column Chromatography for Terpenoids and Flavonoids. In: DHANARASU, S. **Chromatography and Its Applications**, Rijeka: In Tech, 2012. cap. 2, p. 14-51.



**CLSI Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard - third edition. CLSI document M 27-A3.** 3. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. 27 p.

**CLSI Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. CLSI Document M11-A8.** 8. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012a. 39 p.

**CLSI Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI Document M7-A9.** 9. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012b. 63 p.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 7, n. 2, p. 66-76, Feb. 1996.

CORNARD, J. P.; MERLIN, J. C. Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III). **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 92, n. 1, p. 19-27, Sep. 2002.

COS, P.; BRUYNE, T. D.; HERMANS, N.; APERS, S.; BERGHE, D. V.; VLIETINCK, A. J. Proanthocyanidins in Health Care: Current and New Trends. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 11, n. 10, p. 1345-1359, May. 2004.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Amsterdam, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, Jun. 2013.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B. B. et al. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 24, p. 1250.

CRUZ, M. D. F. S. J.; PEREIRA, G. M.; RIBEIRO, M. G.; DA SILVA, A. M.; TINOCO, L. W.; DA SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Ingasaponin, a complex triterpenoid saponin with immunological adjuvant activity from *Inga laurina*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 420, n. 0, p. 23-31, Feb. 2016.

CUNHA, L. C. S. **Estudo fitoquímico, atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica da espécie *Cassia bakeriana* Craib**. 2013. 285 f. (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

CUNHA, L. C. S.; ANDRADE E SILVA, M. L.; FURTADO, N. A. J. C.; VINHOLIS, A. H. C.; MARTINS, C. H. G.; DA SILVA FILHO, A. A.; CUNHA, W. R. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens. **Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-a Journal of Biosciences**, Berlin, v. 62, n. 9-10, p. 668-672, Sep-Oct. 2007.

DA SILVA, C. R.; DE ANDRADE NETO, J. B.; DE SOUSA CAMPOS, R.; FIGUEIREDO, N. S.; SAMPAIO, L. S.; MAGALHÃES, H. I. F.; CAVALCANTI, B. C.; GASPAR, D. M.; DE ANDRADE, G. M.; LIMA, I. S. P.; DE BARROS VIANA, G. S.; DE MORAES, M. O.; LOBO, M. D. P.; GRANGEIRO, T. B.; NOBRE JÚNIOR, H.

V. Synergistic Effect of the Flavonoid Catechin, Quercetin, or Epigallocatechin Gallate with Fluconazole Induces Apoptosis in *Candida tropicalis* Resistant to Fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 58, n. 3, p. 1468-1478, Mar. 2014.

DA SILVA, J. M. C.; BATES, J. M. Biogeographic Patterns and Conservation in the South American Cerrado: A Tropical Savanna *Hotspot*. **Bioscience**, [S.l], v. 52, n. 3, p. 225-234, Mar. 2002.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 23, n. 2, p. 174-181, Apr. 2012.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, Oct. 2010.

DANIEL, J. F. D. S.; IWASSO, D. R.; FIORINI, M. A.; RIEGER, S. C.; FARIA, T. D. J.; ANDREI, C. C.; REZENDE, M. I.; BARBOSA, A. M. Antimicrobial activity of Brazilian plants of the genera Leguminosae and Myrtaceae

**Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos v. 8, n. 28, p. 958-966, Jul. 2014.

DASTJERDI, Z. M.; NAMJOYAN, F.; AZEMI, M. E. Alpha Amylase Inhibition Activity of Some Plants Extract of *Teucrium* Species. **European Journal of Biological Sciences**, Faisalabad v. 7, n. 1, p. 26-31, 2015.

DAWES, C.; PEDERSEN, A. M. L.; VILLA, A.; EKSTRÖM, J.; PROCTOR, G. B.; VISSINK, A.; AFRAMIAN, D.; MCGOWAN, R.; ALIKO, A.; NARAYANA, N.; SIA, Y. W.; JOSHI, R. K.; JENSEN, S. B.; KERR, A. R.; WOLFF, A. The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 60, n. 6, p. 863-874, Jun. 2015.

DE SOUZA, P. M.; DE OLIVEIRA MAGALHÃES, P. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry – A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 850-861, Oct-Dec. 2010.

DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, London, v. 33, n. 3, p. 432-455, Mar. 2016.

DENG, H.; VAN BERKEL, G. J. Electrospray mass spectrometry and UV/visible spectrophotometry studies of aluminum(III)–flavonoid complexes. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 33, n. 11, p. 1080-1087, Nov. 1998.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Exeter, v. 27, n. 5, p. 305-318, Sep. 2004.

DEWICK, P. M. The skikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In: DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Product: a biosynthetic approach**, Cinchester: Jonh Wiley & Sons, 2009. cap. 4, p. 137-186.

- DIAS, A. L. D. S.; SOUZA, J. N. S. D.; ROGEZ, H. Enriquecimento de compostos fenólicos de folhas de *Inga edulis* por extração em fase sólida: quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 38-42, Dezembro. 2010.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, Basel, v. 2, n. 2, p. 303, Apr. 2012.
- DOU, J.; LEE, V. S. Y.; TZEN, J. T. C.; LEE, M.-R. Identification and Comparison of Phenolic Compounds in the Preparation of Oolong Tea Manufactured by Semifermentation and Drying Processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 18, p. 7462-7468, Sep. 2007.
- ESATBEYOGLU, T.; WRAY, V.; WINTERHALTER, P. Identification of Two Novel Prodelphinidin A-Type Dimers from Roasted Hazelnut Skins (*Corylus avellana* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n. 51, p. 12640-12645, Dec 2013.
- ESTRADA, O.; HASEGAWA, M.; GONZALEZ-MUJICA, F.; MOTTA, N.; PERDOMO, E.; SOLORZANO, A.; MÉNDEZ, J.; MÉNDEZ, B.; ZEA, E. G. Evaluation of flavonoids from Bauhinia megalandra leaves as inhibitors of glucose-6-phosphatase system. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 19, n. 10, p. 859-863, Oct. 2005.
- FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, Barking, v. 126, n. 4, p. 1571-1578, Jun. 2011.
- FENNER, R.; SORTINO, M.; KUZE RATES, S. M.; DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A. P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E.; ZACCHINO, S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. **Phytomedicine**, Stuttgart v. 12, n. 3, p. 236-240, Mar. 2005.
- FERNANDES, I. P. G.; OLIVEIRA, S. C. B.; GHALKHANI, M.; SHAHROKHIAN, S.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electrochemical Oxidation Mechanisms of the Antioxidants Daidzein and 7-Hydroxy-4-chromone. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 24, n. 3, p. 618-626, Mar. 2012.
- FLEMING, R. V.; WALSH, T. J.; ANAISSIE, E. J. Emerging and less common fungal pathogens. **Infectious Disease Clinics**, Philadelphia, v. 16, n. 4, p. 915-933, Dec. 2002.
- FOO, L. Y.; LU, Y.; HOWELL, A. B.; VORSA, N. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated Escherichia coli in vitro. **Phytochemistry**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 173-181, May 2000.
- FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A.; JR., A. A. D. C.; PEIXOTO, A. L.; WALTER, B. M. T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D. P. D.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H. C. D.; PRADO, J.; STEHMANN, J. R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; PIRANI, J. R.; SYLVESTRE, L. D. S.; MAIA, L. C.; LOHMANN, L. G.;

PAGANUCCI, L.; SILVEIRA, M.; NADRUZ, M.; MAMEDE, M. C. H.; BASTOS, M. N. C.; MORIM, M. P.; BARBOSA, M. R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.; SOUZA, V. C. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio : Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. 875 p.

FOTI, M. C.; DAQUINO, C.; GERACI, C. Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH• Radical in Alcoholic Solutions. **The Journal of Organic Chemistry**, Columbus, v. 69, n. 7, p. 2309-2314, Apr. 2004.

FRACASSETTI, D.; COSTA, C.; MOULAY, L.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, Barking, v. 139, n. 1-4, p. 578-588, Aug. 2013.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 397-412, Jan. 2002.

FURTADO, F.; DE AQUINO, F.; NASCIMENTO, E.; MARTINS, C.; DE MORAIS, S.; CHANG, R.; CUNHA, L.; LEANDRO, L.; MARTINS, C.; MARTINS, M.; SILVA, C.; MACHADO, F.; DE OLIVEIRA, A. Seasonal Variation of the Chemical Composition and Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Essential Oils from *Inga laurina* (Sw.) Willd. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 4, p. 4560-4577, Apr. 2014a.

FURTADO, F. B. **Estudo químico, análise do óleo essencial e atividades biológicas de *Inga laurina* (Sw.) Willd.** 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Insitituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

GANDRA, P. G.; ALVES, A. A.; MACEDO, D. V. D.; KUBOTA, L. T. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 980-985, Dec. 2004.

GARCIA, F. C. P.; FERNANDES, J. M. *Inga* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. [2013]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23007>>. Acesso em: 26 dez. 2015.

GARCIA, F. C. P.; FERNANDES, J. M. *Inga* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. [2015]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22803>>. Acesso em: 23 dez. 2015.

GARCIA, J.; MASSOMA, T.; MORIN, C.; MPONDO, T. N.; NYASSÉ, B. 4'-O-methylgallocatechin from *Panda oleosa*. **Phytochemistry**, Oxford v. 32, n. 6, p. 1626-1628, Jan. 1993.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 501-517, Oct. 1999.

GIACOMELLI, C.; CKLESS, K.; GALATO, D.; MIRANDA, F. S.; SPINELLI, A. Electrochemistry of Caffeic Acid Aqueous Solutions with pH 2.0 to 8.5. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 332-338, Jun. 2002.

GIL, E. S.; COUTO, R. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 23, n. 3, p. 542-558, Jun. 2013.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P. D.; WANDERLEY, M. D. G. L.; BERG, C. V. D. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-61, Jul. 2005.

GOUVEIA, N. M.; ALVES, F. V.; FURTADO, F. B.; SCHERER, D. L.; MUNDIM, A. V.; ESPINDOLA, F. S. An in vitro and in vivo study of the  $\alpha$ -amylase activity of phaseolamin. **Journal of Medicinal Food**, New York, v. 17, n. 8, p. 915-920, Aug. 2014.

GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; PRIOR, R. L. Screening of Foods Containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS/MS and Thiolytic Degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 25, p. 7513-7521, Dec. 2003.

GUARIMNETO, G.; MORAIS, R. G. D. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 561-584, December. 2003.

GULABOSKI, R.; PEREIRA, C. M. Electroanalytical Techniques and Instrumentation in Food Analysis. In: IN: VNTLE, S. **Handbook of Food Analysis Instruments**, CRC Press, 2008. cap. 17, p. 379-402.

GUPTA, D.; DUBEY, J.; KUMAR, M. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of some medicinal plants against selected common human pathogenic microorganisms. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Haikou, v. 6, n. 1, p. 15-20, Jan. 2016.

GUPTA, N.; SAINI, S.; MAHAJAN, A.; KUNDRA, S.; YADAV, A. Dental caries, gingivitis, periodontitis: a review. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 8, n. 1, p. 75-84, Jan/abr. 2009.

GUTZEIT, H. O.; LUDWIG-MÜLLER, J. Biosynthesis and chemical properties of natural substances in plants. In: GUTZEIT, H. O.; LUDWIG-MÜLLER, J. **Plant Natural Products: synthesis, biological functions and practical applications**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014. cap. 1, p. 1-79.

HAMED, A. I.; AL-AYED, A. S.; MOLDOCH, J.; PIACENTE, S.; OLESZEK, W.; STOCHMAL, A. Profiles analysis of proanthocyanidins in the argun nut (*Medemia argun*--an ancient Egyptian palm) by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 49, n. 4, p. 306-315, Apr. 2014.

HAN, R.-M.; ZHANG, J.-P.; SKIBSTED, L. H. Reaction Dynamics of Flavonoids and Carotenoids as Antioxidants. **Molecules**, Basel, v. 17, n. 2, p. 2140, Feb. 2012.

HANCOCK, R. E. W.; STROHL, W. R. Editorial overview: Antimicrobials in the 21st century. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 4, n. 5, p. 491-492, Oct. 2001.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, n. 6, p. 481-504, Nov. 2000.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, Oct. 2008.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 14, n. 2, p. 111-129, Feb. 2015.

HASHIMOTO, F.; NONAKA, G.-I.; NISHIOKA, I. Tannins and Related Compounds. XC. : 8-C-Ascorbyl (-)-Epigallocatechin 3-O-Gallate and Novel Dimeric Flavan -3-ols, Oolonghomobisflavans A and B, from Oolong Tea. (3). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 37, n. 12, p. 3255-3263, 1989.

HAYDER, N.; BOUHLEL, I.; SKANDRANI, I.; KADRI, M.; STEIMAN, R.; GUIRAUD, P.; MARIOTTE, A.-M.; GHEDIRA, K.; DIJOUX-FRANCA, M.-G.; CHEKIR-GHEDIRA, L. In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis*: Modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 567-581, Apr. 2008.

HEALTHCARE, G. Sephadex LH-20. [1995]. Disponível em: <[https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc18110722AB\\_20110830184615.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc18110722AB_20110830184615.pdf)>. Acesso em: 10 abr. 2016.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 13, n. 10, p. 572-584, Oct. 2002.

HENRIQUES, B. O.; CORRÊA, O.; AZEVEDO, E. P. C.; PÁDUA, R. M.; DE OLIVEIRA, V. L. S.; OLIVEIRA, T. H. C.; BOFF, D.; DIAS, A. C. F.; DE SOUZA, D. G.; AMARAL, F. A.; TEIXEIRA, M. M.; CASTILHO, R. O.; BRAGA, F. C. In Vitro TNF- $\alpha$  Inhibitory Activity of Brazilian Plants and Anti-Inflammatory Effect of *Stryphnodendron adstringens* in an Acute Arthritis Model. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2016, n. 0, p. 1-15, New York 2016.

HITESHI, K.; GUPTA, R. Thermal adaptation of alpha-amylases: a review. **Extremophiles**, Berlin, v. 18, n. 6, p. 937-944, Nov. 2014.

HOMOKI, J. R.; NEMES, A.; FAZEKAS, E.; GYÉMÁNT, G.; BALOGH, P.; GÁL, F.; AL-ASRI, J.; MORTIER, J.; WOLBER, G.; BABINSZKY, L.; REMENYIK, J. Anthocyanin composition, antioxidant efficiency, and  $\alpha$ -amylase inhibitor activity of

different Hungarian sour cherry varieties (*Prunus cerasus* L.). **Food Chemistry**, Barking, v. 194, n., p. 222-229, Mar. 2016.

JACQUES, D.; HASLAM, E.; BEDFORD, G. R.; GREATBANKS, D. Plant proanthocyanidins. Part II. Proanthocyanidin-A2 and its derivatives. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, London, v. 0, n. 0, p. 2663-2671, Jan. 1974.

JANECKI, A.; KOŁODZIEJ, H. Anti-Adhesive Activities of Flavan-3-ols and Proanthocyanidins in the Interaction of Group A-Streptococci and Human Epithelial Cells. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 10, p. 7139-7152, Oct. 2010.

JANEIRO, P.; NOVAK, I.; SERUGA, M.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electroanalytical Oxidation of p-Coumaric Acid. **Analytical Letters**, New York, v. 40, n. 17, p. 3309-3321, Dec. 2007.

JOHNSTON, K. M.; STERN, D. J.; WAISS JR, A. C. Separation of flavonoid compounds on Sephadex LH-20. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 33, n. 0, p. 539-541, 1968.

JORK, H.; FUNK, W.; FISCHER, W.; WIMMER, H. **Thin-Layer Chromatography: reagents and detection methods**. 1. ed. Weinheim, Basel (Switzerland), Cambridge, New York, 1990. 497 p.

JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 33, n. 2, p. 213-217, Mar. 1985.

KAIDONIS, J.; TOWNSEND, G. The 'sialo-microbial-dental complex' in oral health and disease. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, Jena, v. 203, n. 0, p. 85-89, Jan. 2016.

KANDRA, L.  $\alpha$ -Amylases of medical and industrial importance. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, Amsterdam, v. 666-667, n. 0, p. 487-498, Dec. 2003.

KANDRA, L.; GYÉMÁNT, G.; ZAJÁ CZ, Á.; BATTA, G. Inhibitory effects of tannin on human salivary  $\alpha$ -amylase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 319, n. 4, p. 1265-1271, Jul. 2004.

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**, Amsterdam, v. 740, n. 1, p. 99-107, Jul. 1996.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE, A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P.; MUKTA, M. S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 20, n. 19, p. 5678-5698, Oct. 2012.

KATO, K. A new color reaction of steroid with anhydrous aluminum chloride and anisaldehyde. IV. Studies on the reaction mechanism. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 12, n. 11, p. 1319-1328, Nov. 1964.



KAUR, R.; KAUR, N.; GUPTA, A. K. Structural features, substrate specificity, kinetic properties of insect  $\alpha$ -amylase and specificity of plant  $\alpha$ -amylase inhibitors. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 116, n. 0, p. 83-93, Nov. 2014.

KEW Leguminosae. [2006]. Disponível em:

<<http://www.kew.org/science/directory/teams/Leguminosae/completetext.html>>.

Acesso em: 23 dez. 2015.

KHARAZIAN, N. Flavonoid Constituents in Some Species of *Salvia* L. (Lamiaceae) in Iran. **Journal of Sciences-Islamic Republic of Iran**, Tehran, v. 25, n. 3, p. 219-227, 2014.

KIM, H.; KIM, J.-K.; KANG, L.; JEONG, K.; SEUNHO JUNG† Docking and Scoring of Quercetin and Quercetin Glycosides against  $\alpha$ -Amylase Receptor **Bulletin of the Korean Chemical Society**, Seoul, v. 31, n. 2, p. 461-463, Feb. 2010.

KIM, Y. J.; JUNG, E. B.; SEO, S. J.; PARK, K. H.; LEE, M. W.; LEE, C. S. Quercetin-3-O-(2"-galloyl)- $\alpha$ -l-rhamnopyranoside prevents TRAIL-induced apoptosis in human keratinocytes by suppressing the caspase-8- and Bid-pathways and the mitochondrial pathway. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 204, n. 3, p. 144-152, Aug. 2013.

KIRITA, M.; TANAKA, Y.; TAGASHIRA, M.; KANDA, T.; MAEDA-YAMAMOTO, M. Cloning and characterization of a novel O-methyltransferase from *Flammulina velutipes* that catalyzes methylation of pyrocatechol and pyrogallol structures in polyphenols. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Abingdon, v. 79, n. 7, p. 1111-1118, Mar. 2015.

KLEPSE, M. E.; ERNST, E. J.; PFALLER, M. A. Update on antifungal resistance. **Trends in Microbiology**, Cambridge v. 5, n. 9, p. 372-375, Sep. 1997.

KOES, R.; VERWEIJ, W.; QUATTROCCHIO, F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 10, n. 5, p. 236-242, May. 2005.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **The Lancet**, [S.l.], v. 359, n. 9312, p. 1135-1144, Mar. 2002.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **Scientific World Journal**, New York, v. 2013, n. 0, p. 1-16, Dec. 2013.

KURIKI, T.; IMANAKA, T. The concept of the  $\alpha$ -amylase family: Structural similarity and common catalytic mechanism. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 87, n. 5, p. 557-565, 1999.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 244-282, Sep. 2007.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 15, n. 6, p. 279-289, Jun. 2007.



LARCHER, W. The Environment of Plants. In: LARCHER, W. **Physiological Plant Ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups**, Berlin: Springer, 2003. cap. 1, p. 1.

LEÃO, J. R. A.; LIMA, J. P. C.; PINTO, S. N.; PAIVA, A. V. Seed germination and initial growth of seedlings of ingá-mirim - *Inga laurina* (Sw.) Willd – used in urban forestry city, Acre state - Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, Piracicaba, v. 7, n. 3, p. 10-17, 2012.

LEE, S. H.; PARK, M. H.; HAN, J. S.; JEONG, Y.; KIM, M.; JEON, Y. J. Bioactive compounds extracted from Gamtae (*Ecklonia cava*) by using enzymatic hydrolysis, a potent alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 1149-1155, Aug. 2012.

LEE, T.-H.; QIU, F.; WALLER, G. R.; CHOU, C.-H. Three New Flavonol Galloylglycosides from Leaves of *Acacia confusa*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, n. 5, p. 710-712, May. 2000.

LEE, T. H.; LIU, D. Z.; HSU, F. L.; WU, W. C.; HOU, W. C. Structure-activity relationships of five myricetin galloylglycosides from leaves of *Acacia confusa*. **Botanical Studies**, Taipei, v. 47, n. 1, p. 37-43, Jan. 2006.

LEE, W.; LEE, D. G. An antifungal mechanism of curcumin lies in membrane-targeted action within *Candida albicans*. **IUBMB Life**, London, v. 66, n. 11, p. 780-785, Nov. 2014.

LEWANDOWSKA, U.; GORLACH, S.; OWCZAREK, K.; HRABEC, E.; SZEWCZYK, K. Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. **Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)**, Warsaw, v. 68, n. 0, p. 528-540, Jan. 2014.

LI, H.-J.; DEINZER, M. L. Tandem Mass Spectrometry for Sequencing Proanthocyanidins. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 79, n. 4, p. 1739-1748, Feb. 2007.

LIANG, J.; TIAN, Y.-X.; FU, L.-M.; WANG, T.-H.; LI, H.-J.; WANG, P.; HAN, R.-M.; ZHANG, J.-P.; SKIBSTED, L. H. Daidzein as an Antioxidant of Lipid: Effects of the Microenvironment in Relation to Chemical Structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 21, p. 10376-10383, Nov. 2008.

LIMA, H. C.; QUEIROZ, L. P.; MORIM, M. P. S.; V.C.; DUTRA, V.F.; BORTOLUZZI, R.L.C.; IGANCI, J.R.V.; FORTUNATO, R.H.; VAZ, A.M.S.F.; SOUZA, E.R. DE; FILARDI, F.L.R.; VALLS, J.F.M.; GARCIA, F.C.P.; FERNANDES, J.M.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; PEREZ, A.P.F.; MANSANO, V.F.; MIOTTO, S.T.S.; TOZZI, A.M.G.A.; MEIRELES, J.E.; LIMA, L.C.P.; OLIVEIRA, M.L.A.A.; FLORES, A.S.; TORKE, B.M.; PINTO, R.B.; LEWIS, G.P.; BARROS, M.J.F.; SCHÜTZ, R.; PENNINGTON, T.; KLITGAARD, B.B.; RANDO, J.G.; SCALON, V.R.; CARDOSO, D.B.O.S.; COSTA, L.C. DA; SILVA, M.J. DA; MOURA, T.M.; BARROS, L.A.V. DE; SILVA, M.C.R.; QUEIROZ, R.T.; SARTORI, A.L.B.; CAMARGO, R. A.; LIMA, I.B.;

COSTA, J.; SOARES, M.V.B.; SNAK, C.; SÃO-MATEUS, W.; FALCÃO, M. J.; MARTINS, M.V.; REIS, I.P.; CORDULA, E Fabaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. [2015]. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 23 dez. 2015.

LIMA, J. P. S. D.; PINHEIRO, M. L. B.; SANTOS, A. M. G.; PEREIRA, J. L. D. S.; SANTOS, D. M. F.; BARISON, A.; SILVA-JARDIM, I.; COSTA, E. V. In vitro antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 6, p., Nov./Dez. 2012.

LIU, Z.-Q. Chemical Methods To Evaluate Antioxidant Ability. **Chemical Reviews**, Washington, v. 110, n. 10, p. 5675-5691, October 2010.

LIVERMORE, D. M. Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 36, n. Supplement 1, p. S11-S23, Jan. 2003.

LO PIPARO, E.; SCHEIB, H.; FREI, N.; WILLIAMSON, G.; GRIGOROV, M.; CHOU, C. J. Flavonoids for Controlling Starch Digestion: Structural Requirements for Inhibiting Human  $\alpha$ -Amylase. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 51, n. 12, p. 3555-3561, Jun. 2008.

LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. Metabólitos derivados do ácido chiquímico. In: LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. **Biossíntese de Produtos Naturais**, Lisboa: IST Press, 2007. cap. 5, p. 151-192.

LOKVAM, J.; BRENES-ARGUEDAS, T.; LEE, J. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Allelochemic function for a primary metabolite: the case of l-tyrosine hyper-production in *Inga umbellifera* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 93, n. 8, p. 1109-1115, August 2006.

LOKVAM, J.; CLAUSEN, T. P.; GRAPOV, D.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Galloyl Depsides of Tyrosine from Young Leaves of *Inga laurina*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 70, n. 1, p. 134-136, January 2007.

LOKVAM, J.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Cinnamoyl glucosides of catechin and dimeric procyanidins from young leaves of *Inga umbellifera* (Fabaceae). **Phytochemistry**, London, v. 65, n. 3, p. 351-358, Feb. 2004.

LOKVAM, J.; KURSAR, T. A. Divergence in Structure and Activity of Phenolic Defenses in Young Leaves of Two Co-Occurring *Inga* Species. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, n. 11, p. 2563-2580, Nov. 2005.

LORDAN, S.; SMYTH, T. J.; SOLER-VILA, A.; STANTON, C.; ROSS, R. P. The  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 141, n. 3, p. 2170-2176, Dec. 2013.

LOZANO, C. M.; VASQUEZ-TINEO, M. A.; RAMIREZ, M.; JIMENEZ, F. In vitro antimicrobial activity screening of tropical medicinal plants used in Santo Domingo, Dominican Republic. Part I. **Pharmacognosy Communications**, [S.l.], v. 3, n. 2, p., Apr.-Jun. 2013.

- LÜ, J.-M.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 840-860, Apr. 2010.
- LUPI, O.; BARTLETT, B. L.; HAUGEN, R. N.; DY, L. C.; SETHI, A.; KLAUS, S. N.; MACHADO PINTO, J.; BRAVO, F.; TYRING, S. K. Tropical dermatology: Tropical diseases caused by protozoa. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 60, n. 6, p. 897-925, Jun. 2009.
- LUZIATELLI, G.; SØRENSEN, M.; THEILADE, I.; MØLGAARD, P. Asháninka medicinal plants: a case study from the native community of Bajo Quimiriki, Junín, Peru. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, London, v. 6, n. 21, p. 1-23, Aug. 2010.
- MA, C.-M.; ABE, T.; KOMIYAMA, T.; WANG, W.; HATTORI, M.; DANESHTALAB, M. Synthesis, anti-fungal and 1,3- $\beta$ -d-glucan synthase inhibitory activities of caffeic and quinic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 18, n. 19, p. 7009-7014, Oct. 2010.
- MABRY, T.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The Ultraviolet Spectra of Flavones and Flavonols. In: MABRY, T. et al. **The Systematic Identification of Flavonoids**, New York: Springer-Verlag, 1970. cap. 5, p. 41-103.
- MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. D. G. M.; FRANCO, O. L.; MIGLIOLO, L.; DE OLIVEIRA, C. F. R. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 158, n. 2, p. 164-172, February 2011.
- MACEDO, M. L. R.; GARCIA, V. A.; FREIRE, M. D. G. M.; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry**, London, v. 68, n. 8, p. 1104-1111, April 2007.
- MACEDO, M. L. R.; RIBEIRO, S. F. F.; TAVEIRA, G. B.; GOMES, V. M.; BARROS, K. M. C. A.; MARIA-NETO, S. Antimicrobial Activity of ILTI, a Kunitz-Type Trypsin Inhibitor from *Inga laurina* (SW.) Willd. **Current Microbiology**, New York, v. 72, n. 5, p. 538-544, May. 2016.
- MADLAND, E. **Extraction, isolation and structure elucidation of saponins from *Herniaria incana***. 2013. 84 f. (Master thesis) - Department of Chemistry, Norwegian University of Science and Technology, 2013.
- MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008.
- MAGGI, F.; LUCARINI, D.; PAPA, F.; PERON, G.; DALL'ACQUA, S. Phytochemical analysis of the labdanum-poor *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter et

Burdet growing in central Italy. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 66, n. 0, p. 50-57, Jun. 2016.

MAGRINI, V. **Estudo fitoquímico dos extratos de folhas, galhos e cascas do caule de *Calycophyllum spruceanum* Benth para testes de potencial de cosmético funcional**. 2016. 145 f. (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Araraquara, 2016.

MAHESH, B.; SATISH, S. Antimicrobial Activity of Some Important Medicinal Plant Against Plant and Human Pathogens. **World Journal of Agricultural Sciences**, [S.l.], v. 4, n. supplement 1, p. 839-843, 2008.

MANS, D. R. A.; BEERENS, T.; MAGALI, I.; SOEKHOE, R. C.; SCHOONE, G. J.; OEDAIRADJSINGH, K.; HASRAT, J. A.; VAN DEN BOGAART, E.; SCHALLIG, H. D. F. H. In vitro evaluation of traditionally used Surinamese medicinal plants for their potential anti-leishmanial efficacy. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 180, n. 2, p. 70-77, Mar. 2016.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 46, n. 0, p. 3-9, Jul. 1998.

MAREGESI, S. M.; HERMANS, N.; DHOOGHE, L.; CIMANGA, K.; FERREIRA, D.; PANNECOUQUE, C.; BERGHE, D. A. V.; COS, P.; MAES, L.; VLIETINCK, A. J.; APERS, S.; PIETERS, L. Phytochemical and biological investigations of *Elaeodendron schlechteranum*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 129, n. 3, p. 319-326, Jun. 2010.

MARQUI, S. R. D. **Bioprospecção em espécies de Fabaceae: agentes quimiopreventivos e substâncias de interesse agroecético**. 2011. 200 f. (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

MARSARO JÚNIOR, A. L.; LAZZARI, S. M. N.; FIGUEIRA, E. L. Z.; HIROOKA, E. Y. Inibidores de amilase em híbridos de milho como fator de resistência a *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 433-450, Jun. 2005.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 1100 p.

MARTINS, M. M. **Consituientes voláteis, fenóis totais, capacidade antioxidante e biológica de folhas, flores e raízes da *Vernonia brasiliensis* Less**. 2012. 67 f. (Mestre em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MARTINS, N.; BARROS, L.; HENRIQUES, M.; SILVA, S.; FERREIRA, I. C. F. R. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 74, n. 15, p. 648-670, Nov. 2015.

MATA, M. F. **O gênero *Inga* (Leguminosae, Mimosoideae) no nordeste do Brasil: citogenética, taxonomia e tecnologia de sementes**. 2009. 229 f. (Tese) - Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2009.

MATA, M. F.; FELIX, L. P. FLORA DA PARAÍBA, BRASIL: *Inga* Mill. (Leguminosae - Mimosoideae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 135-137, Jul. 2007.

MATTEINI, P.; AGATI, G.; PINELLI, P.; GOTI, A. Modes of complexation of rutin with the flavonoid reagent diphenylborinic acid 2-aminoethyl ester. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, [S.l.], v. 142, n. 9, p. 885-893, Sep. 2011.

MEDEIROS, J. D.; KANIS, L. A. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 5, p. 796-802, Nov. 2010.

MEDICHEM Manual Procedure  $\alpha$ -Amylase. [2010]. Disponível em: <http://www.medichem-me.com/Method/english/Amylase%20total%20IFCC.pdf>. Acesso em: 29 mar. 2016.

MEHRABADI, M.; BANDANI, A. R.; MEHRABADI, R.; ALIZADEH, H. Inhibitory activity of proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitors from Triticale seeds against *Eurygaster integriceps* salivary  $\alpha$ -amylases: Interaction of the inhibitors and the insect digestive enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 102, n. 3, p. 220-228, Mar. 2012.

MEIRELLES, G. C.; PIPPI, B.; HATWIG, C.; BARROS, F. M. C. D.; OLIVEIRA, L. F. S. D.; POSER, G. L. V.; FUENTEFRIA, A. M. Synergistic antifungal activity of the lipophilic fraction of *Hypericum carinatum* and fluconazole. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 27, n. 1, p. 118-123, 2017.

MENA, P.; CALANI, L.; DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BRUNI, R.; CROZIER, A.; DEL RIO, D. Rapid and Comprehensive Evaluation of (Poly)phenolic Compounds in Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice by UHPLC-MSn. **Molecules**, Basel, v. 17, n. 12, p. 14821, Dec. 2012.

MICKYMARAY, S.; AL ABOODY, M. S.; RATH, P. K.; ANNAMALAI, P.; NOORUDDIN, T. Screening and antibacterial efficacy of selected Indian medicinal plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v., n., p., Jan. 2016.

MIKETOVA, P.; SCHRAM, K. H.; WHITNEY, J.; LI, M.; HUANG, R.; KERNS, E.; VALCIC, S.; TIMMERMANN, B. N.; ROURICK, R.; KLOHR, S. Tandem mass spectrometry studies of green tea catechins. Identification of three minor components in the polyphenolic extract of green tea. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 35, n. 7, p. 860-869, Jul. 2000.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 46, n. 10, p. 4769-4807, Oct. 2011.



MMA. Ministério do Meio Ambiente. **Plano de Ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas: cerrado**. Brasília: MMA, 2011. 200 p.

MMA O Bioma Cerrado. [2015]. Disponível em:

<<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

MOHAMMED, A. E.-S. I. Phytoconstituents and the study of antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of *Rhus tripartita* growing in Egypt **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, New Delhi, v. 4, n. 2, p. 276-281, 2015.

MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 254-259, Dec. 2014.

MORAIS, S. A. L. D.; AQUINO, F. J. T. D.; NASCIMENTO, E. A. D.; OLIVEIRA, G. S. D.; CHANG, R.; SANTOS, N. C. D.; ROSA, G. M. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 28, n., p. 198-207, December. 2008.

MORISHITA, Y.; IINUMA, Y.; NAKASHIMA, N.; MAJIMA, K.; MIZUGUCHI, K.; KAWAMURA, Y. Total and Pancreatic Amylase Measured with 2-Chloro-4-nitrophenyl-4-O- $\beta$ -d-galactopyranosylmaltoside. **Clinical Chemistry**, New York, v. 46, n. 7, p. 928-933, Jul. 2000.

MORTON, T. C.; ZEKTZER, A. S.; RIFE, J. P.; ROMEO, J. T. *Trans*-4-methoxypipelicolic acid, an amino acid from *Inga paterno*. **Phytochemistry**, London, v. 30, n. 7, p. 2397-2399, 1991.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, Basingstoke, v. 403, n. 6772, p. 853-858, Feb. 2000.

MYERS, R. S. Antifungal Agents [2006]. Disponível em:

<[http://courses.washington.edu/medch401/pdf\\_text/401\\_06\\_VI\\_Antifungal.pdf](http://courses.washington.edu/medch401/pdf_text/401_06_VI_Antifungal.pdf)>.

Acesso em: 04 abr. 2016.

NASIM, K. T.; ARYA, R.; BABU, V.; ILYAS, M. Myricetin 3'-rhamnoside-3-galactoside from *Buchanania lanzan* (anacardiaceae). **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, n. 7, p. 2569-2570, Jul. 1992.

NAVARRO-MARTÍNEZ, M. D.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N. Tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits ergosterol synthesis by disturbing folic acid metabolism in *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 57, n. 6, p. 1083-1092, Jun. 2006.

NAZARIO, C. E. D.; LANÇAS, F. M. Suportes cromatográficos e fases estacionárias para cromatografia líquida: preparo, evolução e tendências. **Scientia Chromatographica**, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 111-135, Nov. 2013.

NEGRI, G.; TABACH, R. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 23, n. 6, p. 851-860, Dec. 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 70, n. 3, p. 461-477, Mar. 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 75, n. 3, p. 311-335, Mar. 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 79, n. 3, p. 629-661, Mar. 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I. Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures. In: WERMUTH, C. G. et al. **The Practice of Medicinal Chemistry**, 4 ed. Elsevier: Amsterdam, 2015. cap. 5, p. 101-139.

NOVAES, P.; MOLINILLO, J. G.; VARELA, R.; MACÍAS, F. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 12, n. 4, p. 839-855, Dec. 2013.

NUBBE Núcleo de Bioensaios Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais. [2016]. Disponível em: <<http://nubbe.iq.unesp.br/portal/index.html>>. Acesso em: 14 mai. 2016.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I. N.; CORTES, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAYA, M. E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; ECHEVARRIA, J. I.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. e59373, Mar. 2013.

NUCCI, M.; VARON, A. G.; GARNICA, M.; AKITI, T.; BARREIROS, G.; TROPE, B. M.; NOUËR, S. A. Increased Incidence of Invasive Fusariosis with Cutaneous Portal of Entry, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 19, n. 10, p. 1567-1572, Oct. 2013a.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 11, n. 6, p. 272-279, Jun. 2003.

ODONNE, G.; HOUËL, E.; BOURDY, G.; STIEN, D. Treating leishmaniasis in Amazonia: A review of ethnomedicinal concepts and pharmaco-chemical analysis of traditional treatments to inspire modern phytotherapies. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 199, n. 0, p. 211-230, Mar. 2017.

PACHECO, W. F. S.; F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 4, p. 516-537, Ago. 2013.

PALAFOX-CARLOS, H.; GIL-CHÁVEZ, J.; SOTELO-MUNDO, R.; NAMIESNIK, J.; GORINSTEIN, S.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. Antioxidant Interactions between **Major Phenolic Compounds Found in 'Ataulfo' Mango Pulp: Chlorogenic, Gallic, Protocatechuic and Vanillic Acids**. *Molecules*, Basel, v. 17, n. 11, p. 12657-12664, Oct. 2012.

PANTOJA, S. C. D. S. **Sistemática Vegetal II**. 1. ed. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro: Universidade Castelo Branco, 2010. 36 p.

PAREJO, I.; JÁUREGUI, O.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; CODINA, C. Characterization of acylated flavonoid-O-glycosides and methoxylated flavonoids from *Tagetes maxima* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 18, n. 23, p. 2801-2810, Oct. 2004.

PEDRIQUE, B.; STRUB-WOURGAFT, N.; SOME, C.; OLLIARO, P.; TROUILLER, P.; FORD, N.; PÉCOUL, B.; BRADOL, J.-H. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000-11): a systematic assessment. **The Lancet Global Health**, England, v. 1, n. 6, p. e371-e379, Dec. 2013.

PEREIRA, V. V.; DA FONSECA, F. A.; BENTO, C. S. O.; OLIVEIRA, P. M.; ROCHA, L. L.; AUGUSTI, R.; MENDONÇA FILHO, C. V.; SILVA, R. R. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprint of the *Byrsonima Species*. **Revista Virtual de Química**, [S.l.], v. 7, n. 6, p. 2539-2548, Nov./Dec. 2015.

PÉREZ, J. A. M.; AGUILAR, T. A. F. Chemistry of Natural Antioxidants and Studies Performed with Different Plants Collected in Mexico. In: IN: MORALES-GONZÁLEZ, J. A. **Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants**, Rijeka: Intech, 2013. cap. 3, p. 59-85.

PERLIN, D. S.; SHOR, E.; ZHAO, Y. Update on Antifungal Drug Resistance. **Current Clinical Microbiology Reports**, [Cham], v. 2, n. 2, p. 84-95, Jun. 2015.

PETERSON, G. L. Review of the folin phenol protein quantitation method of lowry, rosebrough, farr and randall. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 100, n. 2, p. 201-220, Dec. 1979.

PFALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 125, n. 1, Supplement, p. S3-S13, Jan. 2012.

PILLAY, P.; VLEGGAAR, R.; MAHARAJ, V. J.; SMITH, P. J.; LATEGAN, C. A.; CHOUTEAU, F.; CHIBALE, K. Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staehelinoides* and their utilization towards a simplified pharmacophore. **Phytochemistry**, New York, v. 68, n. 8, p. 1200-1205, Apr. 2007.

PINTO, J. M. A.; SOUZA, E. A.; OLIVEIRA, D. F. Use of plant extracts in the control of common bean anthracnose. **Crop Protection**, v. 29, n. 8, p. 838-842, Aug. 2010.

PISTELLI, L.; BERTOLI, A.; NOCCIOLI, C.; MENDEZ, J.; MUSMANNO, R. A.; DI MAGGIO, T.; CORATZA, G. Antimicrobial activity of *Inga fendleriana* extracts and



isolated flavonoids. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 4, n. 12, p. 1679-1683, Dec. 2009.

PORTO, T.; RANGEL, R.; FURTADO, N.; DE CARVALHO, T.; MARTINS, C.; VENEZIANI, R.; DA COSTA, F.; VINHOLIS, A.; CUNHA, W.; HELENO, V.; AMBROSIO, S. Pimarane-type Diterpenes: Antimicrobial Activity against Oral Pathogens. **Molecules**, Basel, v. 14, n. 1, p. 191, Jan. 2009.

POSSETTE, R. F. D. S.; RODRIGUES, W. A. O gênero *Inga* Mill. (Leguminosae - Mimosoideae) no estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 354-368, Jun. 2010.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, May. 2005.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 74, n. 1, p. 89-96, Jan. 2001.

RABELO, A. Frutas nativas da Amazônia. [2012]. Disponível em: <http://frutasnativasdaamazonia.blogspot.com.br/2012/02/normal-0-21-microsoftinternetexplorer4.html>. Acesso em: 10 maio 2017.

RADULOVIC, N. S.; BLAGOJEVIC, P. D.; STOJANOVIC-RADIC, Z. Z.; STOJANOVIC, N. M. Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 20, n. 7, p. 932-952, 2013.

RAHIMI, V.; BANDANI, A. R. Comparison of the effects of cereal and legume proteinaceous seed extracts on alpha-amylase activity and development of the Sunn pest. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Suwon, v. 17, n. 1, p. 7-11, Mar. 2014.

RAKHOLIYA, K. D.; KANERIA, M. J.; CHANDA, S. V. Medicinal Plants as Alternative Sources of Therapeutics against Multidrug-Resistant Pathogenic Microorganisms Based on Their Antimicrobial Potential and Synergistic Properties. In: KALPNA D. RAKHOLIYA, M. J. K., SUMITRA V. CHANDA. **Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components**, San Diego: Academic Press, 2013. cap. 11, p. 165-179.

RAMOS, V. D. S.; CABRERA, O. G.; CAMARGO, E. L. O.; AMBRÓSIO, A. B.; VIDAL, R. O.; DA SILVA, D. S.; GUIMARÃES, L. C.; MARANGONI, S.; PARRA, J. R. P.; PEREIRA, G. A. G.; MACEDO, M. L. R. Molecular cloning and insecticidal effect of *Inga laurina* trypsin inhibitor on *Diatraea saccharalis* and *Heliothis virescens*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 156, n. 3-4, p. 148-158, Nov. 2012.

RAO, B. V.; RAMANJANEYULU, K.; RAMBABU, T.; SUNDARI DEVI, C. B. T. Synthesis and antioxidant activity of Galloyltyrosine, derivatives from young leaves of

Inga laurina. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, Guntur, v. 2, n. 4, p. 39-44, Oct./Dec. 2011.

REYNERTSON, K. A.; MARGARET J. BASILE; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven Myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, Manoa, v. 3, n. 1, p. 25-35, 2005.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 2, n. 4, p. 152-159, Apr. 1997.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, Tarrytown, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIEGER, S. C. **Constituintes químicos e atividades antioxidante, bacteriostática e anti-helmíntica de *Inga marginata* Willd.** 2011. 126 f. (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Centro de Ciências Exatas - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RIEHLE, P.; VOLLMER, M.; ROHN, S. Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions — Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. **Food Research International**, [S.l.], v. 53, n. 2, p. 891-899, Oct. 2013.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 100, n. 1-2, p. 80-84, Aug. 2005.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM, G. S. et al. **Assay Guidance Manual**, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD), 2004. cap. 12, p. 1-23.

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C. D.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 21, n. 12, p. 1907-1914, 2007.

RODRIGUES, J. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: Metodologia para estabelecimento de perfis quali e quantitativos para extratos vegetais.** 2011. 140 f. (Tese) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C.; QUIRANTES-PINÉ, R.; AMESSIS-OUCHMOUKH, N.; MADANI, K.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIERREZ, A. A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from *Pistacia lentiscus* leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 77, n. 0, p. 167-174, Apr. 2013.

- ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 27, n. Supplement 1, p. 7-11, Jun. 2006.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, Oxford, v. 92, n. 2, p. 235-254, Sep. 2005.
- ROHN, S.; RAWEL, H. M.; KROLL, J. Inhibitory Effects of Plant Phenols on the Activity of Selected Enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 12, p. 3566-3571, Jun. 2002.
- ROLÓN, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, Berlin, v. 99, n. 2, p. 103-107, July. 2006.
- SALAZAR-ARANDA, R.; GRANADOS-GUZMÁN, G.; PÉREZ-MESEGUER, J.; GONZÁLEZ, G.; DE TORRES, N. Activity of polyphenolic compounds against *Candida glabrata*. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 10, p. 17903-17912, Sep. 2015.
- SALDANHA, L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 7, p. 8402, Jul. 2013.
- SALES, P. M. D.; SOUZA, P. M. D.; SIMEONI, L. A.; MAGALHÃES, P. D. O.; SILVEIRA, D.  $\alpha$ -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, Edmonton, v. 15, n. 1, p. 141-183, Jan. 2012.
- SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. D. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 101-107, Mar. 2005.
- SANNOMIYA, M.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 19, n. 16, p. 2244-2250, Jul. 2005.
- SANTANA, M. E.; LODGE, D. J.; LEBOW, P. Relationship of host recurrence in fungi to rates of tropical leaf decomposition. **Pedobiologia**, Jena, v. 49, n. 6, p. 549-564, Nov. 2005.
- SANTOS, R. I. D. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. cap. 16, p. 403-434.
- SANZ, M.; DE SIMÓN, B. F.; CADAHÍA, E.; ESTERUELAS, E.; MUÑOZ, A. M.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I.; PINTO, E. LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. americana* L.) heartwood. Effect of

toasting intensity at cooperage. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 47, n. 7, p. 905-918, Jul. 2012.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, Duluth, v. 42, n. 4, p. 321-324, Aug. 2007.

SAVIC, I. M.; NIKOLIC, V. D.; SAVIC, I. M.; NIKOLIC, L. B.; LOVIC, M. D.; JOVIC, M. D. THE QUALITATIVE ANALYSIS OF THE GREEN TEA EXTRACT USING ESI-MS METHOD. **Advanced technologies**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 30-37, May. 2014.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, May 2001.

SELEEM, D.; PARDI, V.; MURATA, R. M. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 76, n. 0, p. 76-83, Apr. 2017.

SHIRLEY, B. W. Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 1, n. 11, p. 377-382, Nov. 1996.

SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 270-276, Apr. 2004.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, n. 3, p. 1012-1018, 2007.

SILVA, F. M.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Mycoses**, Berlin, v. 52, n. 6, p. 511-517, Jan. 2009.

SILVA JÚNIOR, M. C.; SANTOS, G. C. D.; NOGUEIRA, P. E.; MUNHOZ, C. B.; RAMOS, A. E. **100 Árvores do Cerrado - Guia de Campo**. 1ª. ed. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado, 2005. 278 p.

SILVA, L. N. D.; LOCATELLI, A. P. C.; ESSI, L. Leguminosas campestres da Universidade Federal de Santa Maria, campus Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Brazilian Journal of Science**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 256-262, abr./jun. 2013.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES JUNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.

SILVA, T. M. S. D.; CARVALHO, M. G. D.; BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. pahudosum* Moric. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1119-1128, 2009.

- SINGH, A. P.; WILSON, T.; KALK, A. J.; CHEONG, J.; VORSA, N. Isolation of specific cranberry flavonoids for biological activity assessment. **Food Chemistry**, Barking, v. 116, n. 4, p. 963-968, Oct. 2009.
- SMITH, A. M.; COUPLAND, G.; DOLAN, L.; HARBERD, N.; JONES, J.; MARTIN, C.; SABLÓWSKI, R.; AMEY, A. Metabolism. In: SMITH, A. M. et al. **Plant Biology**, Garland Science: Taylor & Francis Group, LLC, 2009. cap. 4, p. 167.
- SOBEH, M.; ELHAWARY, E.; PEIXOTO, H.; LABIB, R. M.; HANDOUSSA, H.; SWILAM, N.; EL-KHATIB, A. H.; SHARAPOV, F.; MOHAMED, T.; KRSTIN, S.; LINSCHIED, M. W.; SINGAB, A. N.; WINK, M.; AYOUB, N. Identification of phenolic secondary metabolites from *Schotia brachypetala* Sond. (Fabaceae) and demonstration of their antioxidant activities in *Caenorhabditis elegans*. **PeerJ**, Corte Madera, v. 4, n. 0, p. e2404, Nov. 2016.
- SOUSA, J. D. S. D.; BASTOS, M. D. N. D. C.; GURGEL, E. S. C. O gênero *Inga* (Leguminosae-Mimosoideae) na Província Petrolífera de Urucu, Coari, Amazonas, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro v. 62, n. 2, p. 283-297, 2011.
- SOUSA, R. M. F. D. **ESTUDO QUÍMICO DE *Eugenia calycina* Cambess E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E INIBIDORA DE ALFA-AMILASE**. 2015. 222 f. (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.
- SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; SILVA, M. N. D.; ARRUDA, M. S. P.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 6, p. 1276-1280, 2007.
- STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website. [2012]. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>>. Acesso em: 23 dez. 2015.
- STICHER, O. Natural product isolation. **Natural Product Reports**, London, v. 25, n. 3, p. 517-554, Jun. 2008.
- SUN, B.; RICARDO-DA-SILVA, J. M.; SPRANGER, I. Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 10, p. 4267-4274, Sep. 1998.
- SUN, J.; LIANG, F.; BIN, Y.; LI, P.; DUAN, C. Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries. **Molecules**, Basel, v. 12, n. 3, p. 679, Mar. 2007.
- TAAMALLI, A.; ISWALDI, I.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; ZARROUK, M. UPLC-QTOF/MS for a Rapid Characterisation of Phenolic Compounds from Leaves of *Myrtus communis* L. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 25, n. 1, p. 89-96, Feb 2014.

TADERA, K.; MINAMI, Y.; TAKAMATSU, K.; MATSUOKA, T. Inhibition of alpha-Glucosidase and alpha-Amylase by Flavonoids. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 52, n. 2, p. 149-153, Apr. 2006.

TAFESH, A.; NAJAMI, N.; JADOUN, J.; HALAHLIH, F.; RIEPL, H.; AZAIZEH, H. Synergistic Antibacterial Effects of Polyphenolic Compounds from Olive Mill Wastewater. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2011, n. 0, p. 9, May 2011.

TCHUENMOGNE, A. M. T.; DONFACK, E. V.; KONGUE, M. D. T.; LENTA, B. N.; NGOUELA, S.; TSAMO, E.; SIDHU, N.; DITTRICH, B.; LAATSCH, H. Ingacamerounol, a new flavonol and other chemical constituents from leaves and stem bark of *Inga edulis* Mart. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, Seoul, v. 34, n. 12, p. 3859-3862, 2013.

TEIXEIRA, J.; GASPAR, A.; GARRIDO, E. M.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, n. 0, p. 251754, Jul. 2013.

TEODORO, G. R.; ELLEPOLA, K.; SENEVIRATNE, C. J.; KOGA-ITO, C. Y. Potential Use of Phenolic Acids as Anti-Candida Agents: A Review. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, n. 0, p. 1-11, Dec. 2015.

TIMBOLA, A. K.; SOUZA, C. D. D.; GIACOMELLI, C.; SPINELLI, A. Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 139-148, Feb. 2006.

TORRES, F. A. E.; PASSALACQUA, T. G.; VELÁSQUEZ, A. M. A.; DE SOUZA, R. A.; COLEPICOLO, P.; GRAMINHA, M. A. S. New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 24, n. 3, p. 265-276, Jun. 2014.

TSUI, V. W. K.; WONG, R. W. K.; RABIE, A. B. M. The inhibitory effects of naringin on the growth of periodontal pathogens *in vitro*. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 22, n. 3, p. 401-406, Mar. 2008.

VALLI, M.; DOS SANTOS, R. N.; FIGUEIRA, L. D.; NAKAJIMA, C. H.; CASTRO-GAMBOA, I.; ANDRICOPULO, A. D.; BOLZANI, V. S. Development of a Natural Products Database from the Biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 76, n. 3, p. 439-444, Mar. 2013.

VERMA, A. K.; PRATAP, R. The biological potential of flavones. **Natural Product Reports**, London, v. 27, n. 11, p. 1571-1593, Sep. 2010.

VIEIRA, D. R. P.; AMARAL, F. M. M.; MACIEL, M. C. G.; NASCIMENTO, F. R. F.; LIBÉRIO, S. A.; RODRIGUES, V. P. Plant species used in dental diseases: Ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 155, n. 3, p. 1441-1449, Sep. 2014.

VINCENT, J.-L.; RELLO, J.; MARSHALL, J.; SILVA, E.; ANZUETO, A.; MARTIN, C. D.; MORENO, R.; LIPMAN, J.; GOMERSALL, C.; SAKR, Y.; REINHART, K.

International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **JAMA**, Chicago, v. 302, n. 21, p. 2323-2329, Dec. 2009.

VIVOT, E.; MUNOZ, J. D.; CRUANES, M. D.; CRUANES, M. J.; TAPIA, A.; HIRSCHMANN, G. S.; MARTINEZ, E.; DI SAPIO, O.; GATTUSO, M.; ZACCHINO, S. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp affinis. Its morphological and micrographic characteristics. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 76, n. 1, p. 65-71, Jun. 2001.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer, 1996. 384 p.

WANG, J. R.; DENG, M.; LIU, Y. X.; QIAO, X.; CHEN, Z. H.; JIANG, Q. T.; PU, Z. E.; WEI, Y. M.; NEVO, E.; ZHENG, Y. L. Adaptive polymorphism of tetrameric alpha-amylase inhibitors in wild emmer wheat. **Genes & Genomics**, v. 33, n. 4, p. 357-364, Aug. 2011.

WANG, Y.-H.; DONG, H.-H.; ZHAO, F.; WANG, J.; YAN, F.; JIANG, Y.-Y.; JIN, Y.-S. The synthesis and synergistic antifungal effects of chalcones against drug resistant *Candida albicans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 26, n. 13, p. 3098-3102, Jul. 2016.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R. J.; SAND, C.; RENNIE, R. P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 115, n. 1, p. 140-146, Jan. 2008.

WEIDINGER, A.; KOZLOV, A. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. **Biomolecules**, Basel, v. 5, n. 2, p. 472, Apr. 2015.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saude Publica**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 644-645, Apr. 2010.

WHO *First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases*; World Health Organization: 2010; p 184.

WHO *Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis*.; Technical report series; no. 975; World Health Organization: 2012.

WHO *Health in 2015: from MDGs, Millennium Development Goals to SDGs, Sustainable Development Goals*.; World Health Organization: Geneva., 2015; p 216.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, Cardiff, v. 37, n. 2, p. 99-105, Jun. 1998.

WYREPKOWSKI, C.; GOMES DA COSTA, D.; SINHORIN, A.; VILEGAS, W.; DE GRANDIS, R.; RESENDE, F.; VARANDA, E.; DOS SANTOS, L. Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 10, p. 16039, Oct. 2014.

XIAO, J.; NI, X.; KAI, G.; CHEN, X. A Review on Structure–Activity Relationship of Dietary Polyphenols Inhibiting  $\alpha$ -Amylase. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 53, n. 5, p. 497-506, Jan. 2013.

XIE, J.; SCHAICH, K. M. Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, n. 19, p. 4251-4260, May 2014.

XIONG, Q.; WILSON, W. K.; PANG, J. The Liebermann–Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangement of Cholesterol in Acid. **Lipids**, Berlin, v. 42, n. 1, p. 87-96, Jan. 2007.

YAMAGUCHI, M.; WAKASUGI, J.; SAKAKIMA, J. Competitive and product inhibition-based  $\alpha$ -amylase activity analysis method. **Clinical Biochemistry**, Tarrytown, v. 41, n. 4–5, p. 325-330, Mar. 2008.

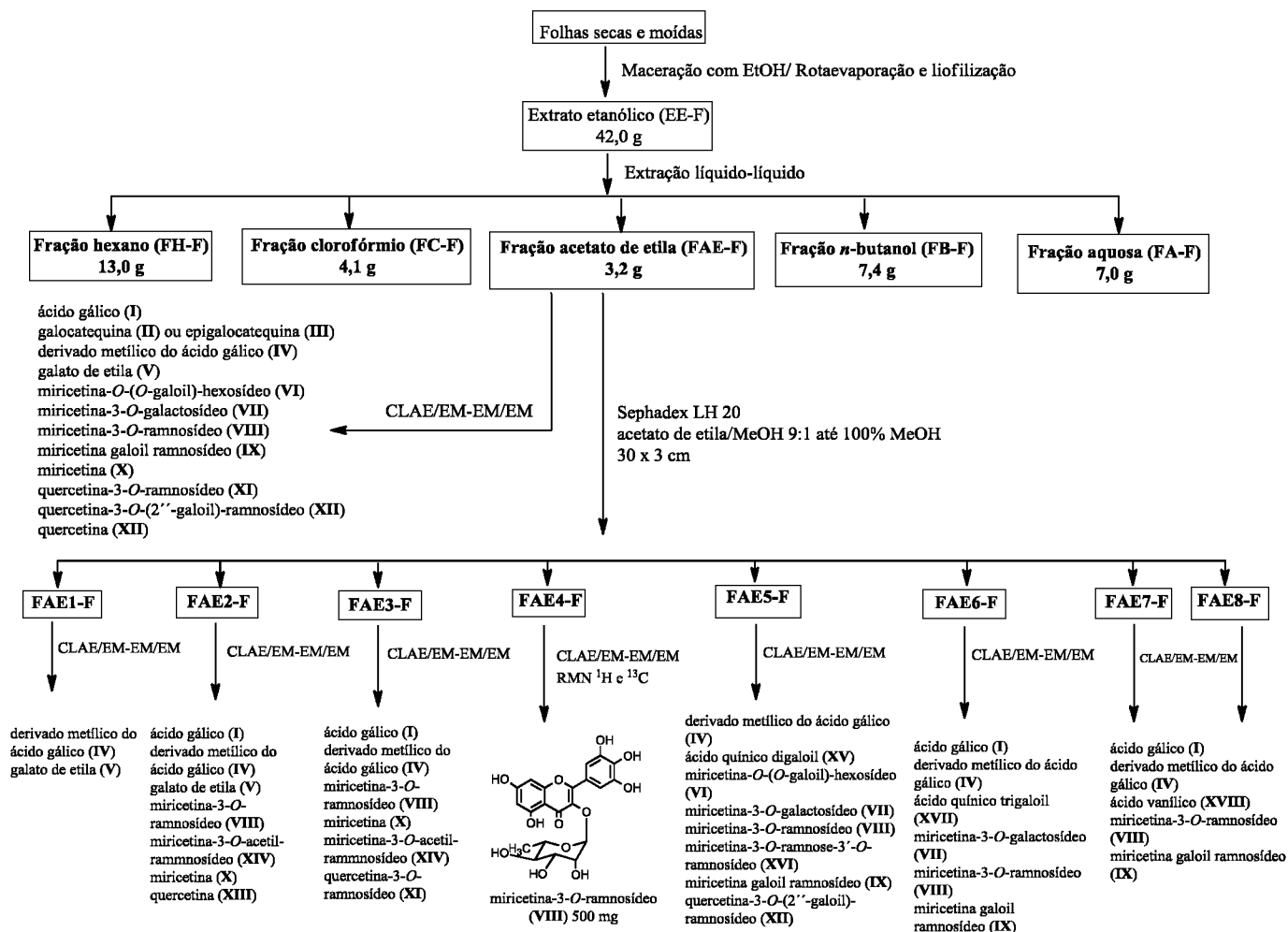
YUN, J.; LEE, H.; KO, H. J.; WOO, E.-R.; LEE, D. G. Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Amsterdam, v. 1848, n. 2, p. 695-701, Feb. 2015.

ZANG, X.; SHANG, M.; XU, F.; LIANG, J.; WANG, X.; MIKAGE, M.; CAI, S. A-Type Proanthocyanidins from the Stems of *Ephedra sinica* (Ephedraceae) and Their Antimicrobial Activities. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 5, p. 5172-5189, May. 2013.

ZHANG, D.; CHU, L.; LIU, Y.; WANG, A.; JI, B.; WU, W.; ZHOU, F.; WEI, Y.; CHENG, Q.; CAI, S.; XIE, L.; JIA, G. Analysis of the Antioxidant Capacities of Flavonoids under Different Spectrophotometric Assays Using Cyclic Voltammetry and Density Functional Theory. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 18, p. 10277-10285, Sep. 2011.



# **APÊNDICE A – Fluxograma de purificação, identificação e isolamento de compostos das folhas de *I. laurina***



# **APÊNDICE B – Fluxograma de purificação, identificação e isolamento de compostos das cascas de *I. laurina***

