



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA**

JORGE LUIS FERREIRA BATISTA

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO de *Palicourea nitidella* (MÜLL.ARG.) STANDL

**MANAUS
2022**

JORGE LUIS FERREIRA BATISTA

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO de *Palicourea nitidella* (MÜLL.ARG.) STANDL

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

**Dra. Cecilia Veronica Nunez
Orientadora**

**MANAUS
2022**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B333e Batista, Jorge Luis Ferreira
Estudo químico e biológico de *Palicourea nitidella* (Müll.Arg.)
Standl / Jorge Luis Ferreira Batista . 2022
79 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Cecilia Veronica Nunez
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

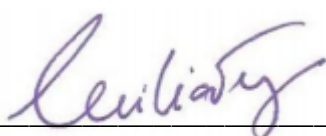
1. Metabólitos secundários. 2. Escopoletina. 3. Antimicrobiano. 4. Antioxidante. 5. Toxicidade. I. Nunez, Cecilia Veronica. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *PALICOUREA NITIDELLA* (MÜLL.ARG.) STANDL

JORGE LUIS FERREIRA BATISTA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre (a) em Química.

Aprovada em, 01 de junho de 2022.



CECILIA VERONICA NUNEZ (PPGQ/UFAM)

Presidente/Orientadora



ADRIAN MARTIN POHLIT (PPGQ/UFAM)

Membro Interno



GEONE MAIA CORREA (ICET/UFAM)

Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas

Manaus, 01 de junho de 2022.

A química é necessariamente uma ciência experimental:
as conclusões são extraídas de dados e seus princípios
são apoiados pela evidência dos fatos.

Michael Faraday

Dedico esta dissertação à minha esposa Ionara, minha eterna companheira, pelo apoio incondicional e constante incentivo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu confidente e melhor amigo em todos os momentos da minha vida.

A minha esposa Ionara, ao meu pai José e aos meus filhos, Giovanna e Matheus, ao meu sogro Francisco e a minha sogra Zarita, que sempre me apoiaram quando eu mais precisei.

Em especial a minha orientadora Dra. Cecília Veronica Nunez, um exemplo de mulher na ciência e conhecedora ímpar da química de produtos naturais. Sou extremamente grato por ter sido aceito em seu grupo de pesquisa e por todos os ensinamentos.

Aos meus amigos Weison e David, pelo apoio e constante disposição que foram primordiais para o desenvolvimento desse trabalho. Perdi as contas de quantas vezes importunei vocês com meus questionamentos. Foram pacientes, sempre me explicaram tudo de forma clara e objetiva, me ensinando coisas que vou levar para toda minha vida.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do INPA: Andrei, Lana, Luana, Júlio (peruano), Kalynne, Wendel, Laisley, Leislle, Bel, Fran, Amanda, Allana, Vitor, Ana Cris, Priscila, Fabiele, Gabriel, Mayte, Ana Alice, Caio, Roziane, Taiza. Obrigado por se dedicarem a compartilhar comigo seus conhecimentos.

Aos meus colegas da turma de química orgânica avançada pelas nossas conversas, momentos de alegria e pela amizade.

Aos técnicos da Central Analítica do INPA, Sabrina e em particular, ao Magno por ser sempre paciente e prestativo.

À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade de realizar o mestrado e ao INPA pelo espaço físico de trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa, o que tornou possível a realização deste trabalho.

RESUMO

Espécies do gênero *Palicourea* Aubl. Rubiaceae são ricas em metabólitos secundários como iridoides, alcaloides indólicos, antraquinonas, terpenoides e compostos fenólicos, os quais são interessantes para bioprospecção por apresentarem atividades anticâncer, anti-inflamatória e antioxidante. O objetivo deste trabalho foi bioprospectar os extratos hexânicos e metanólicos das folhas e ramos de *Palicourea nitidella* (Müll.Arg.) Standl. para atividades antimicrobiana, antioxidante e tóxicas bem como componentes químicos de interesse. Para determinação da atividade antioxidante foram feitos testes com os métodos DPPH• e Fe³⁺/fenantrolina e extratos na concentração de 0,5 mg/mL. Para avaliação da atividade antimicrobiana foi aplicada a metodologia de microdiluição em caldo na concentração de 1000 µg/mL, frente a dez microrganismos e também determinada a concentração inibitória mínima. Para avaliação de toxicidade utilizou-se *Artemia salina* nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL. Como resultado no teste frente *A. salina*, os extratos não apresentaram mortalidade acima de 50%. Na atividade antioxidante frente aos métodos DPPH• e Fe³⁺/fenantrolina, os extratos metanólicos avaliados demonstraram inatividade. Os extratos hexânicos das folhas e ramos apresentaram atividade antibacteriana sobre *Pseudomonas fluorescens* e, *Staphylococcus aureus*, e o extrato hexânico dos ramos inibiu o crescimento de *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enteritidis*. Os extratos ativos foram submetidos ao fracionamento cromatográfico e as substâncias isoladas foram identificadas por meio das análises de RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais e espectrometria de massas. Assim, foi obtida a mistura de β-sitosterol e estigmasterol do extrato hexânico das folhas e do fracionamento do extrato metanólico de ramos foi obtida a escopoletina. Neste trabalho constatou-se que os extratos hexânicos foram ativos para seis bactérias gram-negativas e uma gram-positiva, como também, foram isoladas três substâncias: β-sitosterol, estigmasterol e escopoletina. Os resultados contribuíram para a caracterização química e o potencial biológico de *P. nitidella*.

Palavras-chave: Metabólitos secundários; escopoletina; antimicrobiano; antioxidante; toxicidade.

ABSTRACT

Species of the genus *Palicourea* Aubl. Rubiaceae are rich in secondary metabolites such as iridoids, indole alkaloids, anthraquinones, terpenoids and phenolic compounds, which are interesting for bioprospecting because they have anticancer, anti-inflammatory and antioxidant activities. The objective of this work was to bioprospect the hexane and methanolic extracts of leaves and branches of *Palicourea nitidella* (Müll.Arg.) Standl. for antimicrobial, antioxidant and toxic activities as well as chemical components of interest. To determine the antioxidant activity, tests were carried out with the DPPH• and Fe³⁺/phenanthroline methods and extracts at a concentration of 0.5 mg/mL. To evaluate the antimicrobial activity, the microdilution method was applied in broth at a concentration of 1000 µg/mL, against ten microorganisms and the minimum inhibitory concentration was also determined. For toxicity evaluation, *Artemia salina* was used at concentrations of 1000 and 500 µg/mL. As a result in the test against *A. salina*, the extracts did not show mortality above 50%. In the antioxidant activity against the DPPH• and Fe³⁺/phenanthroline methods, the evaluated methanolic extracts showed inactivity. The hexane extracts from the leaves and branches showed antibacterial activity against *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus aureus*, and the hexane extract from the branches inhibited the growth of *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enteritidis*. The active extracts were subjected to chromatographic fractionation and the isolated substances were identified by means of uni and two-dimensional ¹H and ¹³C NMR analysis and mass spectrometry. Thus, the mixture of β-sitosterol and stigmasterol from the hexane extract of leaves and the fractionation of the methanolic extract of branches was obtained to obtain scopoletin. In this work it was found that the hexane extracts were active for six gram-negative and one gram-positive bacteria, as well as three substances were isolated: β-sitosterol, stigmasterol and scopoletin. The results contributed to the chemical characterization and biological potential of *P. nitidella*.

Keywords: Secondary metabolites; scopoletin; antimicrobial; antioxidant; toxicity.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Alguns exemplos de metabólitos secundários | 18 |
| Figura 2: Radical DPPH• reduzido pelo antioxidante AH. | 20 |
| Figura 3: Fe ³⁺ complexado com 3 moléculas de 1,10-fenantrolina..... | 20 |
| Figura 4: Algumas substâncias isoladas da família Rubiaceae | 24 |
| Figura 5: Algumas substâncias isoladas do gênero <i>Palicourea</i> | 26 |
| Figura 6: Imagens da espécie <i>Palicourea nitidella</i> : (A) aspecto geral da árvore, (B) exsicata com flores, (C) ramos com folhas e inflorescências e (D) ramos com fruto. | 30 |
| Figura 7: Fluxograma do preparo dos extratos vegetais de <i>P. nitidella</i> | 31 |
| Figura 8: Fluxograma da partição líquido-líquido..... | 32 |
| Figura 9: Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico das folhas de <i>P. nitidella</i> | 37 |
| Figura 10: Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico dos ramos de <i>P. nitidella</i> | 40 |
| Figura 11: Fluxograma do fracionamento da fase DCM do extrato metanólico dos ramos de <i>P. nitidella</i> | 41 |
| Figura 12: Cromatoplasmas dos extratos hexânicos dos ramos e folhas..... | 45 |
| Figura 13: Cromatoplasmas dos extratos metanólicos dos ramos e folhas | 46 |
| Figura 14: Espectro de RMN de ¹ H do extrato hexânico de folhas, em CDCl ₃ (300 MHz). | 47 |
| Figura 15: Espectro de RMN de ¹ H do extrato hexânico de ramos, em CDCl ₃ (300 MHz). | 47 |
| Figura 16: Comparação dos espectros de RMN de ¹ H dos extratos hexânicos: a) de folhas e b) de ramos, ambos em CDCl ₃ (300 MHz)..... | 48 |
| Figura 17: Expansão entre δ _H 0 e 4,5 da comparação dos espectros de RMN de ¹ H dos extratos hexânicos: a) de folhas e b) de ramos, ambos em CDCl ₃ (300 MHz). | 48 |
| Figura 18: Expansão entre δ _H 3,5 e 11 da comparação dos espectros de RMN de ¹ H dos extratos hexânicos: a) de folhas e b) de ramos, ambos em CDCl ₃ (300 MHz). | 49 |
| Figura 19: Espectro de RMN de ¹ H do extrato metanólico de folhas, em DMSO- <i>d</i> ₆ (300 MHz). | 50 |
| Figura 20: Espectro de RMN de ¹ H do extrato metanólico de ramos, em DMSO- <i>d</i> ₆ (300 MHz). | 50 |
| Figura 21: Comparação dos espectros de RMN de ¹ H dos extratos metanólicos: a) de folhas e b) de ramos, ambos em DMSO- <i>d</i> ₆ (300 MHz)..... | 51 |
| Figura 22: Expansão da região entre δ _H 4 e 10 da comparação dos espectros de RMN de ¹ H dos extratos metanólicos: a) de folhas e b) de ramos, ambos em DMSO- <i>d</i> ₆ (300 MHz)..... | 51 |
| Figura 23: Estruturas química do β-sitosterol e estigmasterol | 52 |

| | |
|---|----|
| Figura 24: Espectro de RMN de ^1H da mistura do estigmasterol e β -sitosterol em CDCl_3 (300 MHz). | 53 |
| Figura 25: Expansão entre δ_{H} 1 e 6 do espectro de RMN de ^1H do estigmasterol e β -sitosterol em CDCl_3 (300 MHz). | 53 |
| Figura 26: Expansão entre δ_{H} 4 e 6 do espectro de RMN de ^1H do estigmasterol e β -sitosterol em CDCl_3 (300 MHz). | 54 |
| Figura 27: Estruturas química das moléculas identificadas de β -sitosterol e estigmasterol. | 55 |
| Figura 28: Estrutura química da escopoletina | 55 |
| Figura 29: Espectro de CL-EM da escopoletina em modo negativo $[\text{M-H}]^-$ | 56 |
| Figura 30 : Espectro de massas da escopoletina em modo negativo $[\text{M-H}]^-$ | 57 |
| Figura 31: Espectro de RMN de ^1H da escopoletina em $\text{DMSO}-d_6$, (300 MHz). | 58 |
| Figura 32: Expansão entre δ_{H} 6 a 8 do espectro de RMN de ^1H da escopoletina em $\text{DMSO}-d_6$ (300 MHz). | 58 |
| Figura 33: Espectro de RMN de ^{13}C da escopoletina em $\text{DMSO}-d_6$, (75 MHz). | 59 |
| Figura 34: Expansão entre δ_{H} 108,74 a 107,90 do espectro de RMN de ^{13}C da escopoletina em $\text{DMSO}-d_6$ (75 MHz). | 59 |
| Figura 35: Mapa de correlação bidimensional COSY do espectro de RMN ^1H da escopoletina em $\text{DMSO}-d_6$ (300 MHz). | 60 |
| Figura 36: Expansão das correlações COSY entre δ_{H} 7,80 a 5,99 do espectro de RMN de ^1H da escopoletina em $\text{DMSO}-d_6$ (300 MHz). | 60 |
| Figura 37: Mapa de correlação bidimensional HMBC do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da escopoletina em $\text{DMSO}-d_6$ (300 MHz e 75 MHz). | 61 |
| Figura 38: Expansão das correlações bidimensionais HMBC do H-4 com C-5, C-8a, C-2 do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C em $\text{DMSO}-d_6$ (300 MHz e 75 MHz). | 61 |
| Figura 39: Expansão das correlações bidimensionais HMBC do H-5 com C-8, C-4, C-6, C-8a, C-7 do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C em $\text{DMSO}-d_6$ (300 MHz e 75 MHz). | 62 |
| Figura 40: Expansão das correlações bidimensionais HMBC do H-8 com C-4a, C-6, C-8a, C-7 do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C em $\text{DMSO}-d_6$ (300 MHz e 75 MHz). | 62 |
| Figura 41: Expansão das correlações bidimensionais HMBC do H-3 com C-4a, C-2 e MeO com C-6 do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C em $\text{DMSO}-d_6$ (300 MHz e 75 MHz). | 63 |
| Figura 42: Correlações verificadas nos espectros bidimensionais da escopoletina. | 64 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Dados do fracionamento PnFo-EH do extrato hexânico das folhas | 34 |
| Tabela 2: Dados do fracionamento 2-7 PnFo-EH do extrato hexânico das folhas | 34 |
| Tabela 3: Dados do fracionamento 14-15 PnFo-EH do extrato hexânico das folhas | 35 |
| Tabela 4: Dados do fracionamento 2-4 PnFo-EH do extrato hexânico das folhas | 35 |
| Tabela 5: Dados do fracionamento PnRam-EH do extrato hexânico dos ramos..... | 38 |
| Tabela 6: Dados do fracionamento 28-30 PnRam-EH do extrato hexânico dos ramos..... | 39 |
| Tabela 7: Dados do fracionamento 32-38 PnRam-EH do extrato hexânico dos ramos..... | 39 |
| Tabela 8: Dados do fracionamento da fase DCM do extrato metanólico dos ramos..... | 41 |
| Tabela 9: Rendimentos dos extratos hexânicos e metanólicos | 44 |
| Tabela 10: Dados de RMN de ^1H do estigmasterol e β -sitosterol em CDCl_3 (300 MHz) comparação com a literatura (JEFFREYS & NUNEZ, 2016). | 54 |
| Tabela 11: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da escopoletina em $\text{DMSO-}d_6$, comparação com a literatura (^a COSTA 1999; ^b BAYOUMI et al., 2010) | 64 |
| Tabela 12: Porcentagens de inibição dos extratos frente as bactérias testadas..... | 65 |
| Tabela 13: Análise da concentração letal frente A. salina dos extratos hexânicos e metanólicos..... | 66 |
| Tabela 14: valores de equivalência dos extratos metanólicos frente a atividade antioxidante..... | 67 |
| Tabela 15: Interpretação dos resultados da atividade antioxidante..... | 67 |

Lista de Abreviações e Siglas

| | |
|-----------------------------|--|
| ACN | Acetonitrila |
| AcOEt | Acetato de etila |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| CA | Cromatografia em coluna aberta |
| CCDC | Cromatografia em camada delgada comparativa |
| CL ₅₀ | Concentração letal média |
| COSY | espectroscopia de correlação homonuclear ¹ H x ¹ H |
| DCM | Diclorometano |
| DMSO- <i>d</i> ₆ | Dimetilsulfóxido deuterado |
| DPPH | 1,1-difenil-2-picril-hidrazila |
| Fol | Folhas |
| Hex | Hexano |
| HMBC | Correlação heteronuclear múltiplo-quântica |
| HSQC | Correlação heteronuclear singular-quântica |
| INPA | Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia |
| LC/MS | Liquid chromatography/mass spectrometry |
| <i>m/z</i> | Razão massa/carga |
| MeOH | Metanol |
| NP/PEG | difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol |
| Ram | Ramos |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| UV | Ultravioleta |
| λ | Comprimento de onda |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 2.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS | 17 |
| 2.2 Atividades biológicas dos metabólitos secundários | 19 |
| 2.3 Substâncias antioxidantes | 19 |
| 2.4 Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> | 20 |
| 2.5 Atividade antimicrobiana | 21 |
| 2.6 Família Rubiaceae | 22 |
| 2.7 <i>Palicourea nitidella</i> (Müll.Arg.) Standl. | 24 |
| 3 OBJETIVOS | 29 |
| 3.1 Objetivo geral | 29 |
| 3.2 Objetivos específicos | 29 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 4.1 Equipamentos e materiais utilizados | 29 |
| 4.2 Coleta do material vegetal | 30 |
| 4.3 Preparo dos extratos vegetais | 30 |
| 4.4 Extratos metanólicos | 32 |
| 4.5 Análise dos extratos hexânicos e metanólicos por cromatografia em camada delgada comparativa | 33 |
| 4.5.1 Isolamento dos constituintes químicos das folhas e ramos de <i>Palicourea nitidella</i> | 33 |
| 4.5.2 Análise dos extratos hexânicos e metanólicos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio | 33 |
| 4.5.3 Fracionamento do extrato hexânico das folhas de <i>Palicourea nitidella</i> | 34 |
| 4.5.4 Fracionamento da fração 2-7 | 34 |
| 4.5.5 Fracionamento do extrato hexânico dos ramos de <i>P. nitidella</i> | 38 |
| 4.5.6 Fracionamento da fração 28-30 | 38 |
| 4.5.7 Fracionamento da fase DCM do extrato metanólico dos ramos | 40 |
| 4.6 Ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo <i>A. salina</i> | 41 |
| 4.7 Atividade antioxidante | 42 |
| 4.7.1 Ensaio com o radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) | 42 |
| 4.8 Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição | 42 |

| | |
|--|----|
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 43 |
| 5.1 Análises químicas de cromatografia em camada delgada comparativa dos extratos hexânicos | 44 |
| 5.2 Análises químicas de cromatografia em camada delgada comparativa dos extratos metanólicos | 45 |
| 5.3 Análise dos extratos hexânicos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio | 46 |
| 5.4 Análise dos extratos metanólicos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio | 49 |
| 5.5 Identificação das substâncias isoladas do extrato hexânico das folhas | 52 |
| 5.6 Identificação da substância isolada da fase DCM do extrato metanólico dos ramos | 55 |
| 5.7 Atividade antibacteriana por microdiluição | 65 |
| 5.8 Ensaio de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> | 66 |
| 5.9 Atividade antioxidante | 66 |
| 6 CONCLUSÃO | 68 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 69 |

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais fazem parte da vida do ser humano desde o princípio, como fonte de alimentos, utilidades domésticas, defesa e ataque; e como meio para restaurar a saúde. Atualmente representa uma das alternativas entre as várias fontes de matérias-primas fundamentais à existência da sociedade, sua principal vantagem é de ser uma fonte renovável, na maioria das vezes controlado pelo homem (MACIEL et al., 2002; LORENZI & MATOS, 2002, SIMÕES et al., 2017).

A química de produtos naturais investiga principalmente, metabólitos com potenciais biológicos. A significância do estudo contribui mais no momento em que a espécie vegetal investigada não apresenta relatos na literatura sobre estudos químicos, conduzindo à obtenção de substâncias inéditas que sejam capazes de demonstrar um potencial biológico mais efetivo que as exploradas anteriormente (VERPOORTE, 2000; DEWICK, 2002).

Na química, há diversas técnicas comparativas que avaliam os extratos vegetais quanto ao potencial antioxidante ao serem correlacionados com o agente redutor de referência. Além disso, os resultados favoráveis servirão para o desenvolvimento de produtos que amenizem os efeitos produzidos pelo estresse oxidativo que afeta o corpo humano, bem como poderão ser aplicados externamente na forma de cosméticos e internamente através da produção de fármacos (SIMÕES et al., 2003).

Nos últimos anos, com o aumento da resistência de microrganismos patogênicos a diversos fármacos, constatou-se uma dedicação maior no estudo de produtos naturais, para a identificação de novas substâncias ativas que pudessem ser usadas como referências para o desenvolvimento de novos fármacos (SHU, 1998; NEWMAN et al., 2003).

Os trabalhos referentes aos produtos naturais vêm buscando determinar o potencial de extratos em combate à micro-organismos patógenos, através de ensaios biológicos. Os extratos de muitas espécies apresentaram resultados excelentes. Dentre os metabólitos secundários que demonstraram maior potencial biológico, tem-se os alcaloides e flavonoides. Com características marcantes para os alcaloides que apresentaram toxicidade em boa parte das moléculas isoladas, enquanto os flavonoides se evidenciam por seus potenciais antioxidantes (CHARLES, 2013). Da espécie *Palicourea nitidella*, tem um relato na literatura, no qual, foram isolados metabólitos secundários, que apresentaram potencial farmacológico (COSTA, 1999).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

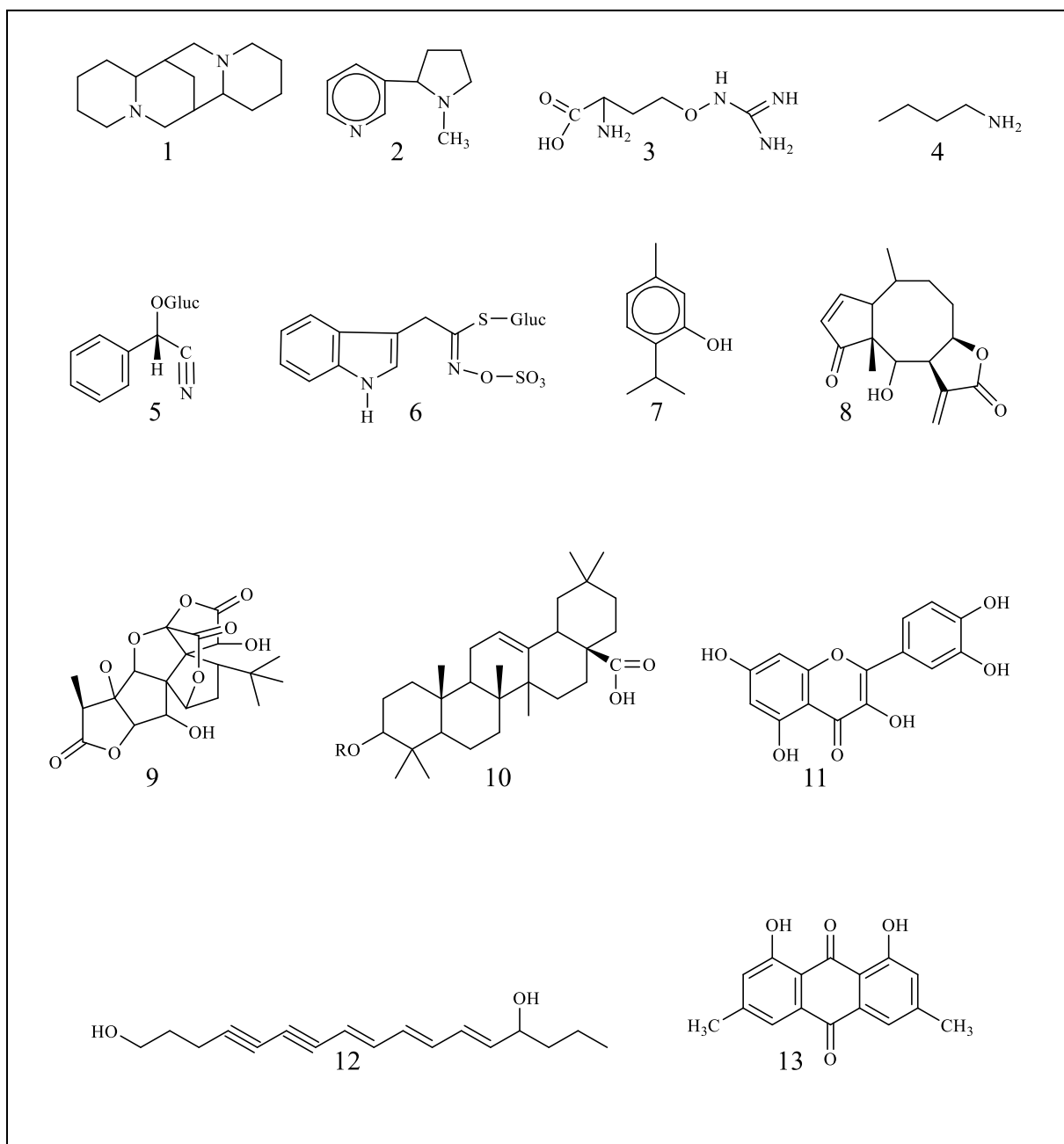
A química de produtos naturais sempre teve papel relevante para o desenvolvimento de fármacos, cosméticos, fragrâncias, e outros bioprodutos, dado a diversidade estrutural e grupos funcionais presentes em milhares de substâncias que compõem a biodiversidade terrestre. Este imenso laboratório químico altamente sofisticado também desempenha um papel importante na conservação e no uso sustentável da diversidade biológica, especialmente porque são essas substâncias essenciais aos processos biológicos de regulação celular, comunicação química e defesa. Sob este aspecto, a biodiversidade brasileira, incluída entre as maiores do planeta é ainda pouco explorada, sendo que bioprodutos de grande impacto, capazes de gerar riqueza e contribuir para a balança econômica nacional ainda estão no plano dos desejos (BOLZANI, 2016).

As plantas produzem uma larga e diversa ordem de metabólitos secundários extasiando os pesquisadores, atualmente existem registros próximo de 100.000 dessas substâncias identificadas (KESSLER, 2015). No passado acreditava-se que eram subprodutos do metabolismo primário o qual está associado aos processos vitais como: divisão, crescimento, respiração, armazenamento de energia e reprodução, entretanto, os metabólitos secundários possuem diversas funções ecológicas ligadas ao sistema de defesa em resposta a diversas causas externas, ou seja, poluição, seca, exposição aos raios UV, competição e ataques de patógenos (WINK, 2011; FRANÇA, 2017; NARAYANI e SRIVASTAVA, 2017, JAMSHIDI-KIA et al., 2018), ainda mais, como atrativos para polinizadores e dispersores de sementes, por exemplo, estão relacionados as ações da planta com o meio ambiente, planta-inseto, planta-microrganismo e planta-planta (WINK, 2011; KESSLER, 2015; MACHADO et al., 2017).

Os metabólitos secundários nas plantas podem ser divididos quimicamente em três grupos distintos: terpenos, fenólicos e alcaloides (figura 1) (SHAHIDI, 1997; CROTEAU et al., 2000; SHAHIDI; NACZK, 2003; SHAHIDI; HO, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2006), além disso, são sintetizados em baixas concentrações de carbono total inferior a 1% (BERG e LUBERT, 2008; FUMAGALI, 2008), apresentando baixo peso molecular, derivando das vias do chiquimato e mevalonato (DIXON, 2001; WINK, 2011). Como também, classificam-se segundo sua origem biossintética mostrando diferentes atividades biológicas e são utilizados como produtos farmacêuticos, agroquímicos, aromatizantes, fragrâncias, corantes e biopesticidas (MURTHY et al., 2014; FRANÇA, 2017; NARAYANI e SRIVASTAVA, 2017). Diante disso, os estudos do metabolismo secundário de plantas têm atraído um crescente interesse para o desenvolvimento de

técnicas fitoquímicas para separação, purificação e identificação de tais moléculas (SASIDHARAN et al., 2011; NARAYANI e SRIVASTAVA, 2017; JAMSHIDI-KIA et al., 2018).

Figura 1: Alguns exemplos de metabólitos secundários



Legenda: alcaloides (1 e 2), aminoácidos não proteicos (3), aminas (4), glicosídeos cianogênicos (5), glucosinolatos (6), monoterpenos (7), sesquiterpenos (8), diterpenos (9), triterpenos (10), flavonoides (11), poliacetilenos (12), policetídeos (13) (Wink, 2003).

2.2 Atividades biológicas dos metabólitos secundários

2.3 Substâncias antioxidantes

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são substâncias instáveis, formadas a partir do metabolismo aeróbico, resultando superóxidos, peróxidos de hidrogênio e radicais hidroxila (SILVA e GONÇALVES, 2010; SCHIEBER & CHANDEL, 2014).

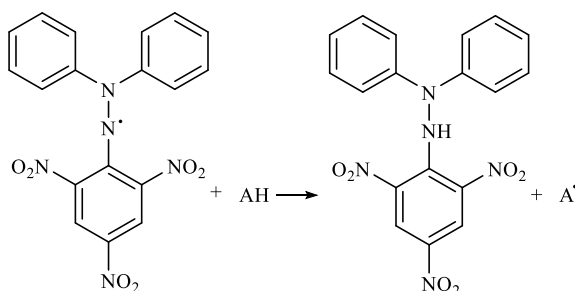
A reatividade dessas espécies é conferida devido ao número ímpar de elétrons, que para atingir a estabilidade, oxidam moléculas susceptíveis (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Estas espécies reativas exercem uma função significativa no organismo, no entanto, o excesso é tido como o principal motivo do estresse oxidativo, resultando em inúmeros efeitos adversos, como a oxidação de proteínas e lipídios, tal qual danos ao DNA. As células exibem um sistema de defesa antioxidante para conservar a estabilização entre a produção e a eliminação destas espécies reativas, apesar disso, a instabilidade normalmente acontece levando ao excesso de espécies reativas (MENG et al., 2017).

A produção desequilibrada acarreta danos oxidativos em macromoléculas promovendo mutações que podem ser relacionadas a patologias neurodegenerativas e ao câncer. A oxidação de lipoproteínas é a responsável por doenças no coração e aterosclerose, e o estresse oxidativo é o maior responsável pela isquemia cerebral (AMES et al., 1995; EINBOND et al., 2004; BANERJEE et al., 2005; ROESLER et al., 2007; VALKO et al., 2007; PASCUAL TERESA e SANCHEZ - BALLESTA, 2008), e o uso de antioxidantes exógenos é recomendado para reduzir o excesso de ERO (ABOUL-ENEIN et al., 2013).

Os estudos químicos para classificação da atividade antioxidante têm como objetivo analisar a eficácia dos extratos ou substâncias em reagirem com espécies reativas do oxigênio (ERO), e equiparar com a atividade de um antioxidante padrão. Para quantificar a concentração de substâncias com potencial antioxidante, muitos ensaios são realizados e utilizados como parâmetro para início de estudo e fracionamento de extratos vegetais (GANGOPADHYAY et al., 2016; KANESHIMA et al., 2016; SEONG et al., 2016).

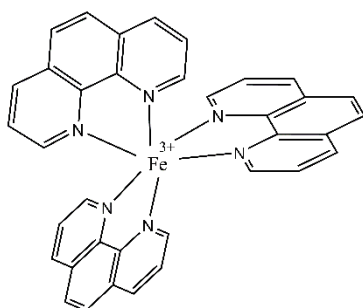
Um dos métodos aplicado é a captura do radical DPPH• (figura 2), que é solvatado em solvente orgânico e medido o comprimento de onda a 517 nm, porém quando capturado, sua absorvância diminui e sua coloração também, desse modo, indica a concentração de agentes antioxidantes presente no substrato em relação ao ácido ascórbico (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

Figura 2: Radical DPPH• reduzido pelo antioxidante AH.



Outra prática utilizada regularmente é o método de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} , em que as substâncias farão com que o ferro complexado com algum grupo ligante (figura 3), mude a coloração no instante que é reduzido. Vários métodos com diversos ligantes são aplicados, conforme a literatura, porém nesse estudo foi aplicada a fenantrolina como grupo complexante, seguindo a metodologia de Novais 2007.

Figura 3: Fe^{3+} complexado com 3 moléculas de 1,10-fenantrolina



2.4 Toxicidade frente à *Artemia salina*

Artemia salina é um micro crustáceo que vive em regiões de água salgada cuja taxonomia pertence ao filo Arthropoda, possui aplicabilidade na aquicultura, podendo ser usada para alimentar peixes, crustáceos, também pássaros e outros seres vivos (MILHEM et al., 2008; PEREZ e LAZO, 2010; LIBRALATO et al., 2016).

O ensaio envolvendo *Artemia salina* é um bioensaio preliminar sobre a atividade dos extratos de produtos naturais. Sendo apontado como um substituto por ser mais barato e simples, para o

ensaio de citotoxicidade com células (MEYER et al., 1982). O ensaio de toxicidade é determinado pela concentração letal de 50% (CL₅₀) dos extratos de plantas em solução salina, é considerado um dos ensaios mais aplicados para avaliar preliminarmente a toxicidade (KANWAR, 2007; AMARANTE et al., 2011).

Ensaio realizados com *A. salina* esclarecem que a toxicidade obtida exibe ligação com a atividade citotóxica contra tumores humanos, e também uma equiparação com testes de toxicidade oral em camundongos (McLAUGHLIN et al., 1991; PARRA et al., 2001). Extratos vegetais que exibem toxicidade contra *A. salina* apresentam potencial para diferentes atividades biológicas. Além de ser uma investigação preliminar de toxicidade geral e pode ser utilizada como premissa para atividade pesticida (LUNA et al., 2005; LIBRALATO et al., 2016).

A utilização deste teste é apoiada pelos benefícios que possibilitam: facilidade de manuseio, um rápido e simples acompanhamento da resposta biológica, onde se observa apenas um parâmetro: morte ou vida. Outros aspectos que contribuem para seu uso são: custo, disponibilidade e mínima quantidade de amostra, é uma técnica segura, econômica e prática para verificar a bioatividade de extratos e substâncias naturais (CAVALCANTE et al., 2000; PARRA et al., 2001; LUNA et al., 2005; KANWAR, 2007; SILVA et al., 2007; LIBRALATO et al., 2016).

2.5 Atividade antimicrobiana

A investigação de novos agentes antimicrobianos está se tornando um campo de estudo muito desenvolvido e importante, pelo fato do surgimento de patógenos cada vez mais resistentes aos antibióticos na atualidade. Esta resistência aos antibióticos é mundial comprometendo a capacidade de tratar doenças infecciosas comuns. O crescente número de infecções como pneumonia, tuberculose, septicemia, gonorreia ou doenças transmitidas por alimentos, estão se tornando cada vez mais difíceis e às vezes impossíveis de tratá-las, já que os antibióticos perdem sua eficácia (OMS, 2017).

Bactérias patogênicas são responsáveis por causar inúmeros malefícios ao ser humano. Esse problema é discutido desde antes dos avanços científicos entenderem a fundo esses microorganismos na sua forma física e em detalhes. Desse modo, procura-se maneiras de eliminar tais bactérias patogênicas ao ser humano, fazendo o uso de novas drogas que possam extingui-las do corpo, buscando prevenir as novas gerações, de bactérias que venham a se tornar multirresistentes às drogas comercialmente conhecidas (PEIRANO et al., 2006).

É estimado que se a resistência aos remédios permanecer crescendo, 10 milhões de mortes são previstas no mundo até 2050 (LUEPKE et al., 2017). Os metabólitos secundários apresentam

uma abundância estrutural nas plantas que os tornam uma fonte promissora de novos agentes antimicrobianos (SILVA et al., 2007; COUTINHO et al., 2008; SILVA et al., 2008; PEREIRA et al., 2019).

Muitos estudos com produtos naturais buscam nas plantas substâncias que apresentem atividades para eliminar esses patógenos. As investigações dos extratos ativos contra esses microrganismos podem ser realizadas utilizando-se a metodologia *in vitro*. Assim sendo, a microdiluição é aplicada em meio líquido ou sólido para multiplicação do patógeno simultaneamente com uma concentração do extrato. Testam-se concentrações variadas até encontrar a concentração inibitória mínima, menor concentração que será capaz de inibir o crescimento bacteriano (SOUZA et al., 2003).

As bactérias Gram-negativas estão diretamente relacionadas a diversas patologias infectocontagiosas que acometem humanos e animais sendo de extrema importância, que não só causam problemas gastrointestinal, como também estão envolvidas com outras doenças nocivas, como infecções do trato respiratório, rinite, otite, patologias da córnea e septicemia, quer como agentes patogênicos ou como oportunistas (LINZITTO e TUNES, 2019), enquanto que, as bactérias Gram-positivas, são patógenos isolados com maior frequência em amostras biológicas humanas. As infecções causadas por este grupo bacteriano, tem maior incidência em infecções do trato urinário, osteomielite e endocardite, podem ocorrer a partir de multiplicação local ou sistêmica, sendo que alguns microorganismos apresentam multiplicação em sítio localizado, exercendo ações patogênicas por produção de exotoxinas e enzimas, o principal gênero pertencente a esta família, o *Staphylococcus*, é constituído por 33 espécies, segundo a capacidade de produção da enzima coagulase, sendo o agente de grande importância o *S. aureus* (KONEMAN et al., 1997).

2.6 Família Rubiaceae

A família Rubiaceae ocupa a quarta posição na diversidade de espécies entre as angiospermas, tem aproximadamente 609 gêneros, 13.673 espécies, 65 tribos e três subfamílias (BREMER e ERIKSSON, 2009; RYDIN et al., 2009; KAINULAINEN et al., 2013; MOULY et al., 2014; RYDIN et al., 2017). Apresenta distribuição cosmopolita e as espécies podem ser encontradas em todas as regiões do País, mas a maior parte é detectada em áreas tropicais ou subtropicais (SOUZA e LORENZI, 2012). No Brasil são encontradas 1.439 espécies, distribuídas em aproximadamente 129 gêneros, na floresta amazônica é considerada a segunda maior família em números de espécies (CARDOSO et al., 2017).

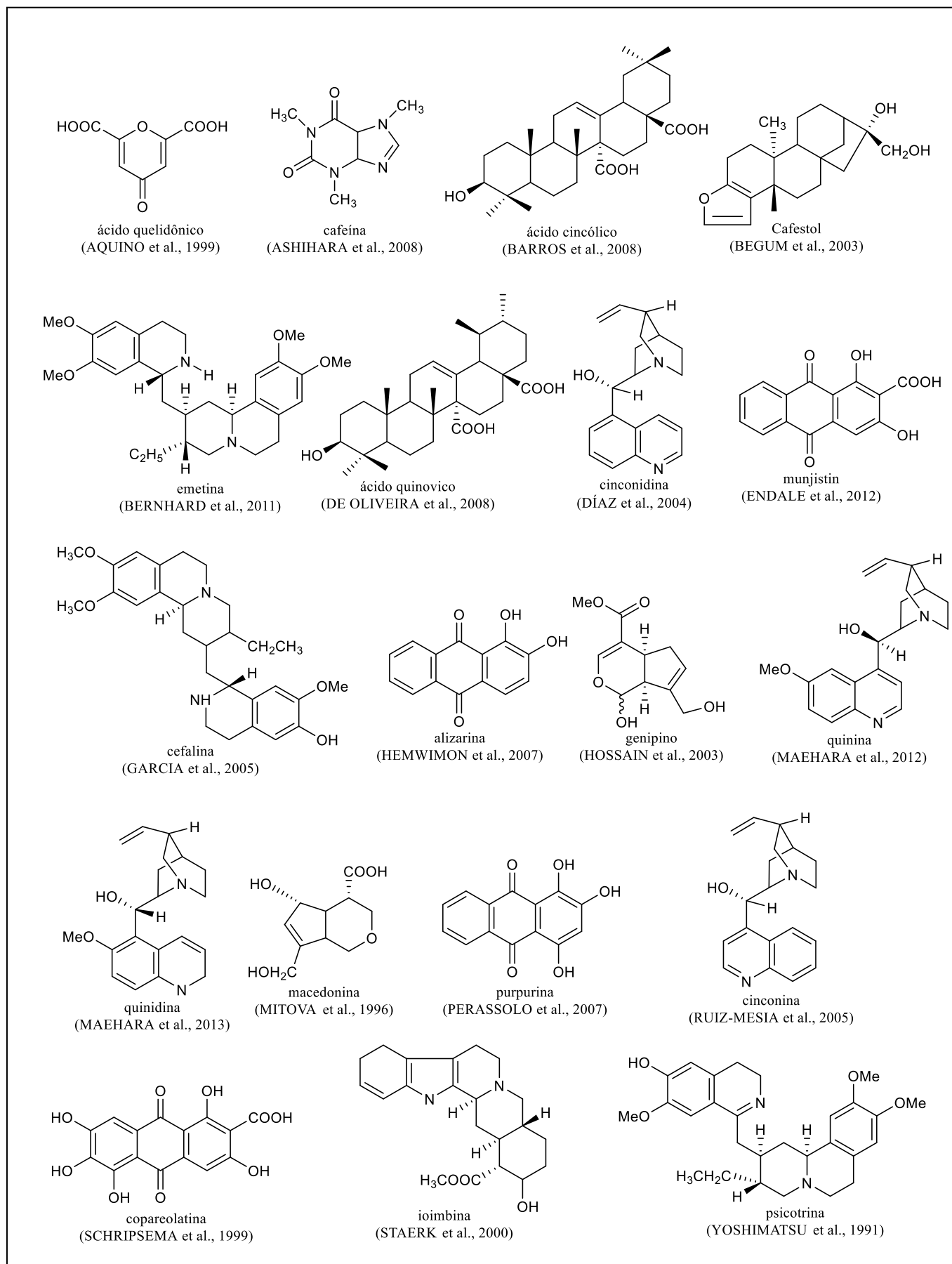
As espécies de Rubiaceae apresentam-se como arbustos, subarbustos e árvores. Tem peculiaridades e características distintas como folhas simples, opostas, raramente verticiladas, nem

sempre com estípulas interpeciolares e raramente espinhos ou foliosas. As inflorescências são normalmente cimosas, reduzidas ou uma única flor. Frequentemente suas flores são vistosas, bissexuais, actinomórficas e diclamídea. Identifica-se o fruto como uma cápsula, esquizocarpo, drupa ou baya (HUTCHINSON 1973; SCHUMANN 1891; SOUZA e LORENZI, 2012).

Nas últimas décadas a classificação botânica da família Rubiaceae sofreu várias alterações, pois faz parte de um grupo monofilético, em função da influência de trabalhos que citaram evidências moleculares. A Rubiaceae está dividida atualmente em três subfamílias, Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae (BREMER e ERIKSSON, 2009; RYDIN et al., 2009; KAINULAINEN et al., 2013; MOULY et al., 2014; MARTINS & NUNEZ, 2015; RYDIN et al., 2017). Bremer e Eriksson 2009, embasados nos estudos filogenéticos sugeriram 44 tribos, contudo trabalhos seguintes caracterizaram um total de 65 novas tribos (RYDIN et al., 2009; KAINULAINEN et al., 2013; MOULY et al., 2014; RYDIN et al., 2017).

A família Rubiaceae é produtora de uma variedade de metabolismo secundário, dentre os quais destacam-se: iridoides, alcaloides indólicos, antraquinonas, terpenoides (diterpenos e triterpenos), flavonoides e substâncias fenólicas (MARTINS & NUNEZ, 2015). São ilustradas na figura 4 algumas classes químicas encontradas na família Rubiaceae.

Figura 4: Algumas substâncias isoladas da família Rubiaceae

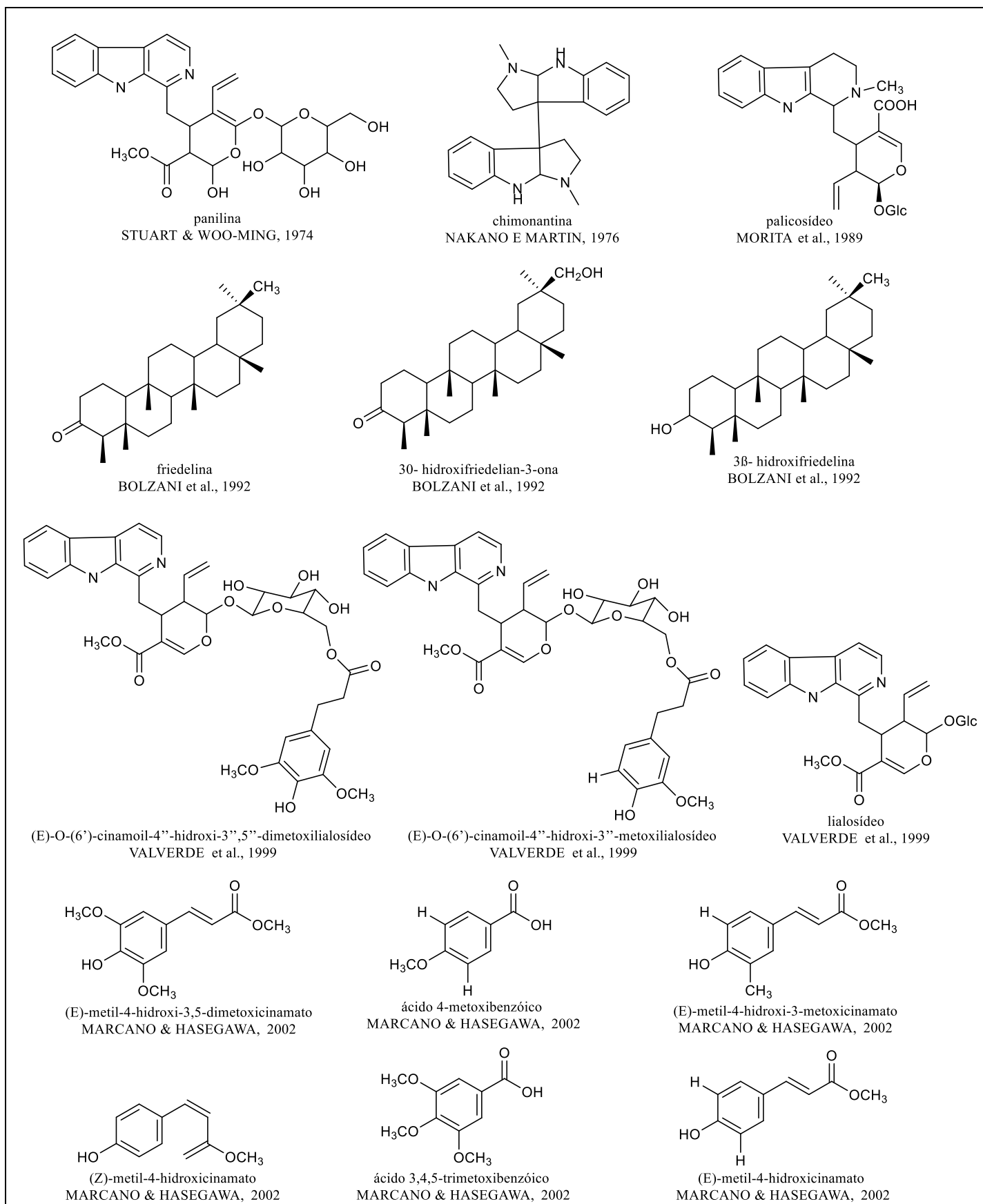


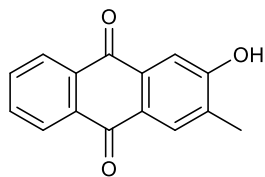
2.7 *Palicourea nitidella* (Müll.Arg.) Standl

O gênero *Palicourea* Aubl., faz parte da família Rubiaceae e, contém aproximadamente 340 espécies de arbustos, sua ocorrência abrange desde o sul do México, América Central e América do Sul. No Brasil até o presente estudo tem um quantitativo de 171 espécies, destas 47 são endêmicas, podendo ser encontradas em todas as regiões do País (FLORA DO BRASIL, 2020).

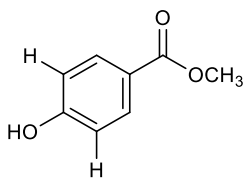
Na literatura estudos relatam que algumas espécies do gênero *Palicourea*, dentre as quais citam-se: *Palicourea marcgravii* A.St.-Hil.; *P. longiflora* DC.; *P. barraensis* (Müll.Arg.) Standl. e *P. hoffmannseggiana* (Schult.) Borhidi, possuem propriedades tóxicas frente a animais, devido à presença de uma substância conhecida como monofluoroacetato (NOGUEIRA VA, et al., 2011). Além disso, das folhas de *P. adusta* Standl, foram isolados três alcaloides glucoindol monoterpênicos (VALVERDE et al., 1999); das folhas de *P. crocea* (Sw.) Roem. & Schult. foram isolados dois novos alcaloides indólicos monoterpênicos, identificados como croceaínas A e B (DÜSMAN et al., 2004); foram isolados das folhas e raízes de *P. coriacea* (Cham.) K. Schum. dois novos alcaloides β -carbolina e ácido epi-estritosidínico; como também, cetona estritosidínica e alcaloides conhecidos como, calicantina, ácido estritosidínico e ácido ursólico triterpênico (NASCIMENTO et al., 2006); da *P. crocea* (Sw.) Schult. foram isolados um alcaloide indólico monoterpênico, croceaína A e psicolatina (NARINE & MAXWELL, 2009); das folhas de *P. acuminata* (Benth.) Borhidi, foi isolado um alcaloide indólico monoterpênico do extrato metanólico (BERGER et al., 2012); da *P. rigida* Kunth, foi isolado um alcaloide indólico monoterpênico com atividades anticancerígenas, identificado como vallesiachotamina (SOARES et al., 2012). São mostradas na figura 5 algumas moléculas isoladas do gênero *Palicourea*.

Figura 5: Algumas substâncias isoladas do gênero *Palicourea*

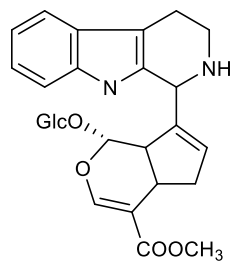




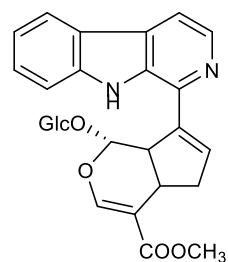
2-hidroxi-3-metilantraqüina
MARCANO & HASEGAWA, 2002



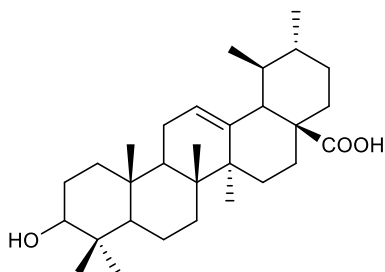
4-metilhidroxibenzoato
MARCANO & HASEGAWA, 2002



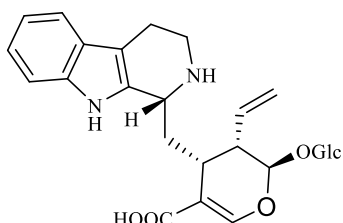
croceína A
DÜSMAN et al., 2004



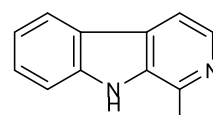
croceína B
DÜSMAN et al., 2004



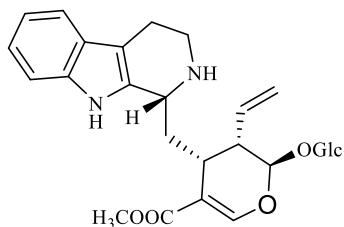
ácido ursólico
NASCIMENTO et al., 2006



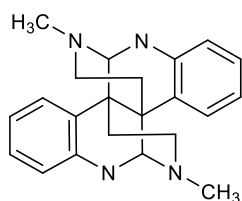
ácido epi-estrioidico
NASCIMENTO et al., 2006



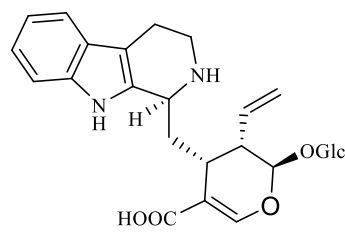
harmano
NASCIMENTO et al., 2006



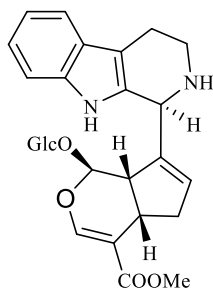
cetono estritoidica
NASCIMENTO et al., 2006



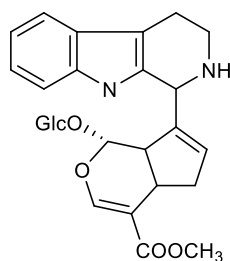
caliclatina
NASCIMENTO et al., 2006



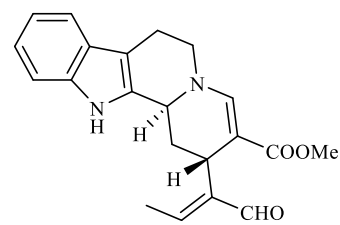
ácido estritoidico
NASCIMENTO et al., 2006



psicolatina
NARINE & MAXWELL, 2009



croceína A
NARINE & MAXWELL, 2009



vallesiachotamina
SOARES et al., 2012

Palicourea nitidella é uma das diversas espécies da Amazônia que apresenta escassez de estudo químico e resultados sobre a avaliação biológica dos seus constituintes citados na literatura. Entre os estudos feitos com outras espécies do gênero *Palicourea*, algumas apresentaram indicação para o tratamento da obesidade, rins e como calmante, além disso, para hipertensão, inflamação, infecção do trato urinário, órgão reprodutor feminino e hepatite (KATO L, et al., 2006; FREITAS PCM, et al., 2011). Diante disso, o presente estudo pretende explorar e complementar informações acerca da composição química de *P. nitidella*, visando principalmente o interesse biotecnológico voltado para obtenção de substâncias de interesse clínico. Além de somar com o conhecimento fitoquímico de espécies que ocorrem na Amazônia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar o estudo químico e biológico da espécie *Palicourea nitidella*.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar o estudo químico dos extratos de *P. nitidella*.
- Isolar as substâncias presentes nos extratos das folhas e ramos de *P. nitidella*.
- Identificar ou elucidar as substâncias isoladas, por meio de métodos espectroscópicos (RMN de ^1H e de ^{13}C , mono e bidimensionais) e espectrométricos (espectrometria de massas).
- Avaliar as atividades antioxidante, antibacteriana e toxicidade frente à *A. salina* dos extratos e das substâncias isoladas da *Palicourea nitidella*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos e materiais utilizados

Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN): Fabricante Bruker BioSpin AG, Modelo Fourier 300 UltraShield, com frequência de 300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C). Sonda EASYPROBE DUL 300MHz S1 5mm Z-GRADIENT.

Espectrômetro de massas: Fabricante Bruker Daltonics, Modelo Amazon Speed, analisador de massas: Ion Trap, Fonte: ESI em modo positivo e negativo.

Cromatógrafo líquido (hifenado ao Espectrômetro de Massas – UPLC/MS): Modelo Prominence UFLC (Shimadzu), equipado com bomba binária LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-20A e injetor automático SIL-20A.

Espectrofotômetro para leitura de placas de 96 poços: Thermo Scientific, Multiskan GO.

Espectrofotômetro: Femto, modelo Cirrus 80ST.

Banho de ultrassom: UNIQUE, modelo USC-2800, Frequência US: 40 MHz.

Balança analítica: Shimadzu, modelo: AUY220.

Rota evaporador: Fisatom®, modelo 550.

Estufa com circulação e renovação de ar: Tecnal, Modelo TE-394-2.

Solventes: Foram usados os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e acetona grau comercial, sendo estes destilados no laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Cromatoplasmas de sílica gel 60: MACHEREY-NAGEL-MN®. Com indicador de fluorescência 254 nm, espessura de 0,20 mm em folhas de alumínio.

Sílica para fase estacionária: Sílica gel 60, 230-400 Mesh (MERCK®)

Sephadex para fase estacionária: Sigma-Aldrich, Sephadex LH-20.

Florisil para fase estacionária: Sigma-Aldrich, Florisil® 100-200 Mesh.

ChemBioDraw 14.0: Usado para desenhar as estruturas.

4.2 Coleta do material vegetal

A coleta do material vegetal de *Palicourea nitidella* foi realizada em maio de 2020, no ramal da cachoeira do leão localizado no Km 35 da Estrada AM-010, Manaus-Itacoatiara/AM, (87°L; 2°49'41"S 59°58'10"W). A exsicata foi depositada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA sob o número 289.109. O estudo conta com o registro no SISGEN número: ADA0FB9. Imagens de *P. nitidella* (figura 6).

Figura 6: Imagens da espécie *Palicourea nitidella*: (A) aspecto geral da árvore, (B) exsicata com flores, (C) ramos com folhas e inflorescências e (D) ramos com fruto.



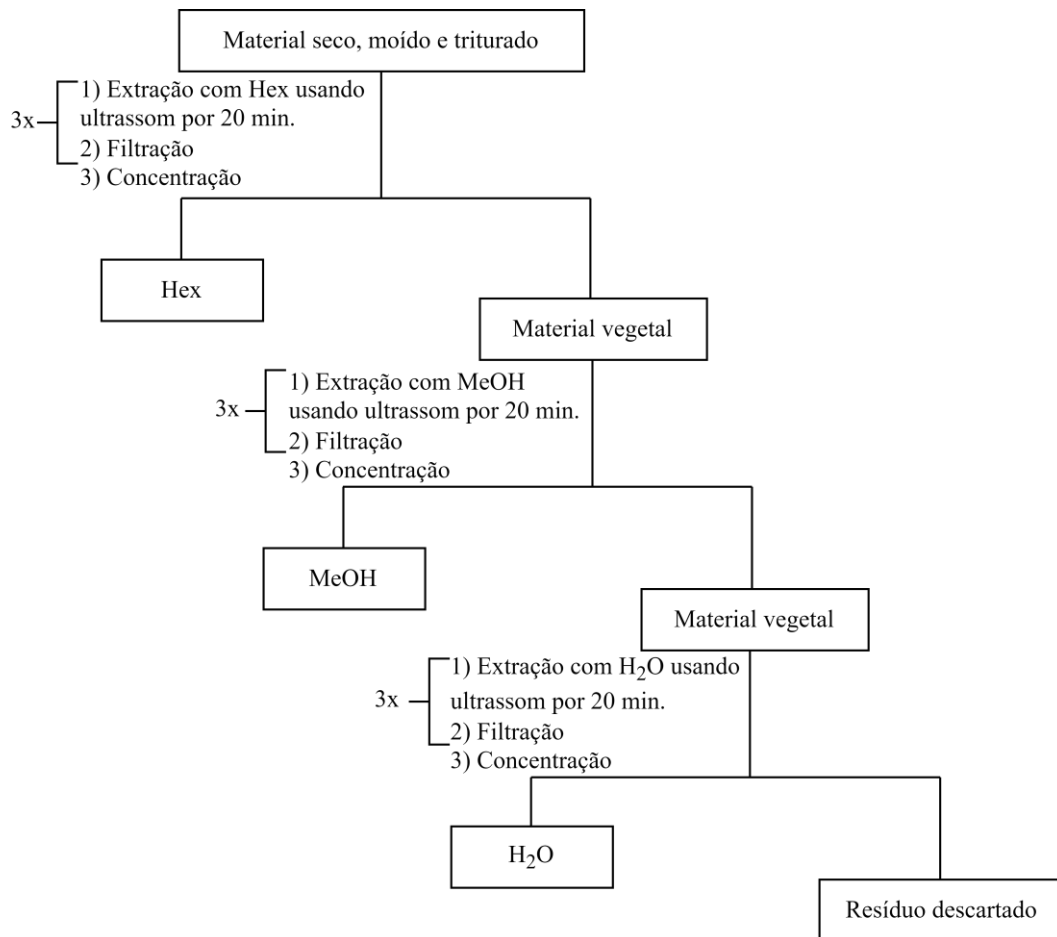
4.3 Preparo dos extratos vegetais

As partes da planta foram separadas em folhas e ramos e levadas à estufa em temperatura média de 50 °C para secar. As folhas ficaram na estufa por 72 horas, enquanto, os ramos permaneceram por 5 dias. Após o processo de secagem as folhas e ramos foram moídos em moinho de facas e de martelo respectivamente.

A extração dos metabólitos foi realizada com solventes em ordem de polaridade crescente, hexano, metanol e água (figura 7), utilizando a proporção de 1 g de material vegetal para 3 mL de solvente. Foram realizadas três extrações em banho ultrassom por 20 min. Posteriormente os extratos orgânicos obtidos foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo com pressão reduzida em temperatura ≤ 50 °C para os extratos hexano e metanol, e liofilizador para o extrato aquoso. Para determinar os rendimentos dos extratos (%) foi realizado o seguinte cálculo: o peso final do extrato seco, dividido pelo peso total do material seco e moído e multiplicado por 100. Conforme a fórmula.

$$\% = \frac{\text{extrato seco}}{\text{material seco e moído}} \times 100$$

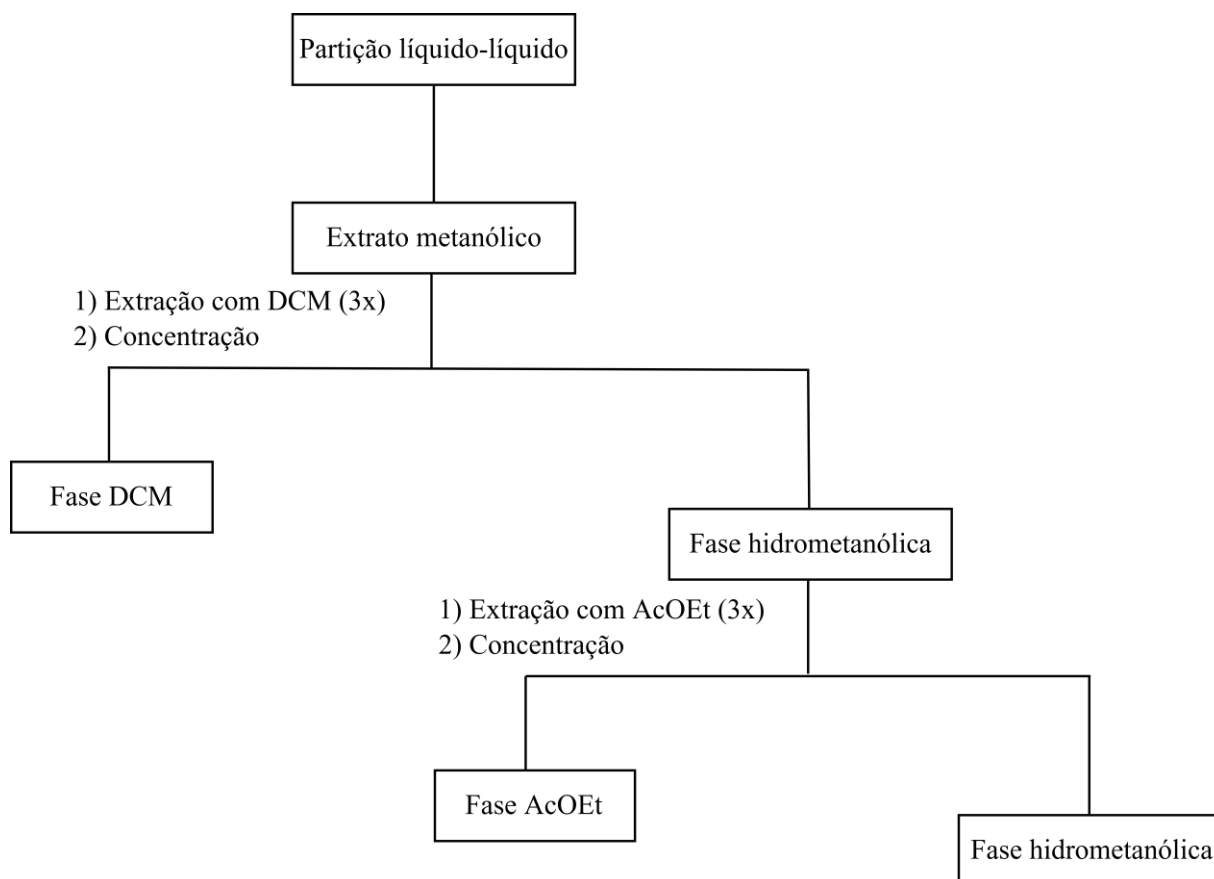
Figura 7: Fluxograma do preparo dos extratos vegetais de *P. nitidella*



4.4 Extratos metanólicos

Os extratos metanólicos foram submetidos às partições líquido-líquido (figura 8), onde utilizou-se como referência: 1 grama de extrato solubilizado em 50 mL de uma solução de MeOH/H₂O foram (1:1 v/v).

Figura 8: Fluxograma da partição líquido-líquido



O extrato solubilizado foi transferido para funil de separação com capacidade para 2000 mL, posteriormente foi realizada a extração com solventes orgânicos: diclorometano (DCM) e acetato de etila (AcOEt) na proporção de 1:1 v/v. as extrações foram repetidas três vezes para cada solvente.

Posteriormente os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo e levados a capela de exaustão para a retirada de solventes remanescentes.

4.5 Análise dos extratos hexânicos e metanólicos por cromatografia em camada delgada comparativa

Os extratos das folhas e ramos de *Palicourea nitidella* foram avaliados por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) para detectar as classes dos constituintes químicos existentes em cada extrato. As amostras foram solubilizadas e aplicadas em cromatoplasmas de sílica gel. A eluição aconteceu dentro de cuba cromatográfica com a fase móvel definida de acordo com as características das amostras.

Em seguida, as cromatofolhas foram reveladas em reveladores físicos: luz ultravioleta UV λ 254 e UV λ 365 nm, e em reveladores químicos: anisaldeído sulfúrico um revelador universal, sulfato cérico para detectar terpenos, reagente de Dragendorff para confirmação de alcaloides, cloreto férrico para detecção de substâncias fenólicas e NP/PEG para detectar flavonoides, (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

4.5.1 Isolamento dos constituintes químicos das folhas e ramos de *Palicourea nitidella*

Os extratos selecionados para os fracionamentos foram os hexânicos das folhas e ramos, assim como o metanólico. As frações coletadas e analisadas por CCDC, foram submetidas a diferentes sistemas de eluição e reunidas por apresentarem perfis químicos semelhantes, após análises com reveladores físicos e químicos.

Para purificação das substâncias foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.5.2 Análise dos extratos hexânicos e metanólicos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Os experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C uni e bidimensionais foram realizados em espectrômetro Bruker Fourier 300, operando em 300 MHz para o núcleo de ^1H e em 75 MHz para o núcleo de ^{13}C . Usando 20 mg de cada extrato bruto e 500 μL de clorofórmio deuterado (CDCl_3) para os hexânicos e dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) para os metanólicos. Como padrão interno foi utilizado tetrametilsilano (TMS). As análises foram realizadas na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN) do INPA.

4.5.3 Fracionamento do extrato hexânico das folhas de *Palicourea nitidella*

Visando o isolamento das substâncias, o extrato hexânico das folhas (476,4 mg) de *P. nitidella* da coleta PnFo-EH foi submetido a um fracionamento em cromatografia em coluna aberta (CCA) (h x Ø= 30 x 3cm) utilizando Sephadex LH-20 (47,6 g) como fase estacionária, e eluída com metanol, utilizando-se um volume de 100 mL (Tabela 1).

Tabela 1: Dados do fracionamento PnFo-EH do extrato hexânico das folhas

| Cromatografia em coluna aberta | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Massa da amostra: 476,4 mg | h x Ø: 30 x 3 cm |
| Massa da sephadex: 47,6 g | volume de eluente utilizado: 100 mL |
| Sistema de eluição | Frações coletadas |
| MeOH 100% | 1-13 |

Após analisar as 13 frações em CCDC, as que apresentaram perfis químicos semelhantes foram reunidas 2-7 (247,4 mg) para continuar o fracionamento por apresentarem características da presença de terpenos ao serem analisadas por CCDC e RMN de ¹H.

4.5.4 Fracionamento da fração 2-7

A fração 2-7 (247,4 mg) foi submetida à cromatografia em coluna aberta de sílica gel 60 (230-400 *mesh*), eluída com DCM, AcOEt e MeOH em diferentes gradientes, gerando 54 frações (Tabela 2).

Tabela 2: Dados do fracionamento 2-7 PnFo-EH do extrato hexânico das folhas

| Cromatografia em coluna aberta | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Massa da amostra: 247,4 mg | h x Ø: 30 x 1,4 cm |
| Massa da sílica gel: 24,7 g | volume de eluente utilizado: 100 mL |
| Sistema de eluição | Frações coletadas |
| DCM 100% | 1-9 |
| DCM/AcOEt 95:5 | 10-15 |
| DCM/AcOEt 9:1 | 16-22 |
| DCM/AcOEt 85:15 | 23-27 |
| DCM/AcOEt 8:2 | 28-32 |
| DCM/AcOEt 7:3 | 33-37 |
| DCM/AcOEt 1:1 | 38-42 |
| AcOEt 100 % | 43-47 |
| AcOEt/MeOH 1:1 | 48-54 |

Ao analisar as 54 frações em CCDC, as frações 1-15 apresentaram perfis químicos semelhantes e foram reunidas para dá continuidade ao fracionamento por apresentarem características da presença de terpenos.

Foram reunidas as frações 3-4 (12 mg), 5-7 (14,9 mg), 8-12 (42,8 mg), 14-15 (13 mg), e a fração 13 (14,4 mg), analisadas em CCDC, eluídas em Hex/AcOEt 8:2, reveladas em sulfato cérico, estas foram comparadas com os padrões de β -sitosterol e lupeol, sendo detectado as semelhanças químicas nas frações 14-15 (13 mg).

As frações 14-15 (13 mg) foram reunidas e fracionadas em cromatografia em coluna aberta de sílica gel 60 (230-400 *mesh*), sendo eluídas com misturas de solventes DCM, AcOEt e MeOH em diferentes gradientes, gerando 12 frações (Tabela 3).

Tabela 3: Dados do fracionamento 14-15 PnFo-EH do extrato hexânico das folhas

| Cromatografia em coluna aberta | |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| Massa da amostra: 13,0 mg | h x Ø: 10 x 0,7 cm |
| Massa da sílica gel: 1,3 g | volume de eluente utilizado: 20 mL |
| Sistema de eluição | Frações coletadas |
| DCM 100% | 1-2 |
| DCM/AcOEt 95:5 | 3-6 |
| DCM/AcOEt 1:1 | 7-9 |
| MeOH 100 % | 10-12 |

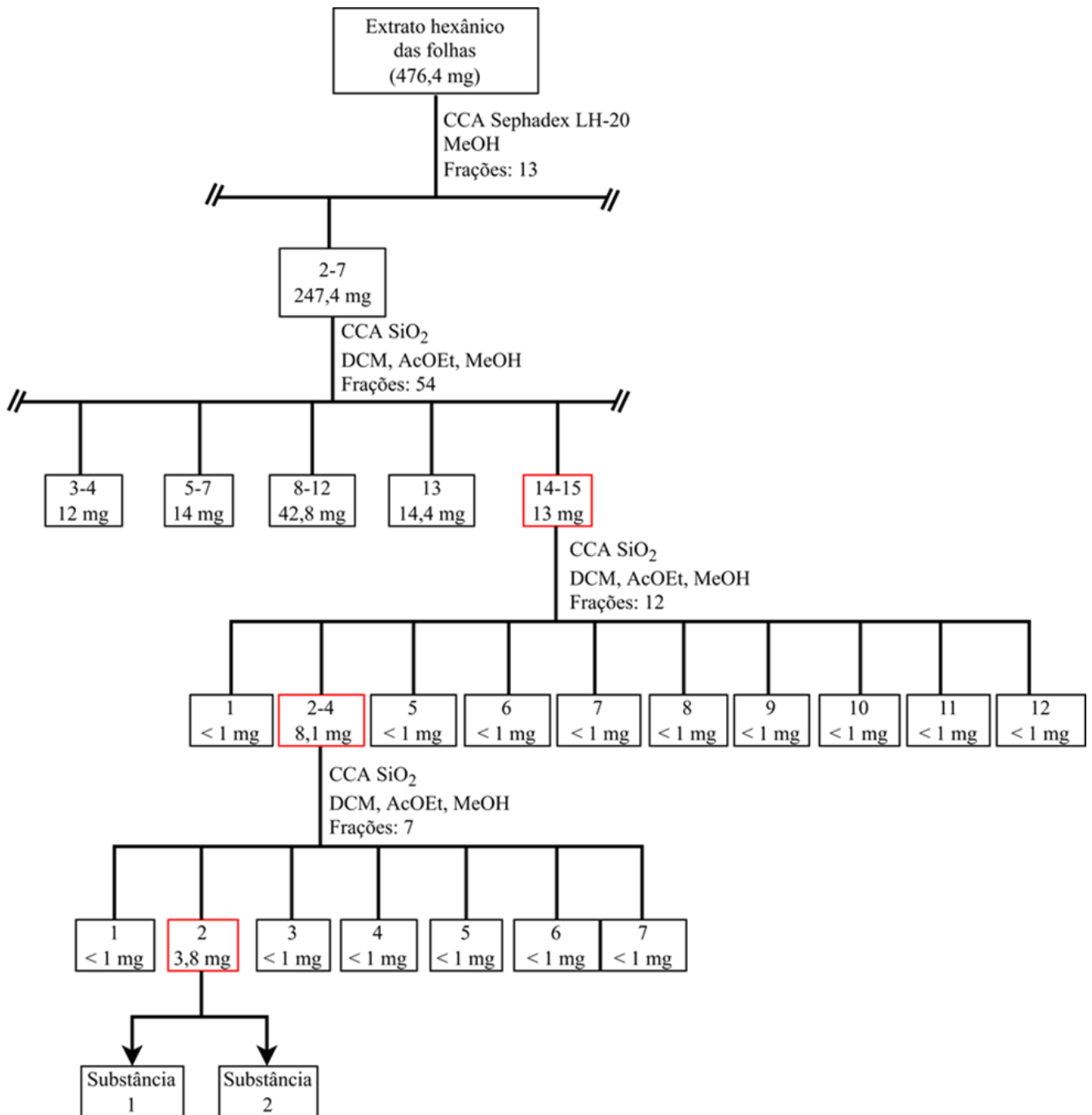
As frações obtidas foram analisadas por CCDC, as cromatoplasas eluídas em Hex/AcOEt 8:2, reveladas em anisaldeído sulfúrico e sulfato cérico. As frações 2, 3 e 4 (8,1 mg) apresentaram-se semelhantes, foram reunidas e fracionadas em cromatografia em coluna aberta de sílica gel 60 (230-400 *mesh*), eluída com misturas de solventes DCM, AcOEt e MeOH em diferentes gradientes (Tabela 4).

Tabela 4: Dados do fracionamento 2-4 PnFo-EH do extrato hexânico das folhas

| Cromatografia em coluna aberta | |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| Massa da amostra: 8,1 mg | h x Ø: 10 x 0,7 cm |
| Massa da sílica gel: 0,81 g | volume de eluente utilizado: 20 mL |
| Sistema de eluição | Frações coletadas |
| DCM/AcOEt 9:1 | 1-2 |
| DCM 100 % | 3-5 |
| MeOH 100 % | 6-7 |

Das 7 frações coletadas a fração 2 (3,8 mg) foi enviada à análise por RMN de ^1H , denominada de substâncias 1 e 2 (S-1 e S-2).

Figura 9: Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico das folhas de *P. nitidella*



4.5.5 Fracionamento do extrato hexânico dos ramos de *P. nitidella*

O extrato hexânicos dos ramos (643,1 mg) de *P. nitidella* da coleta PnRam-EH, foi submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna aberta (CCA) (h x Ø= 30 x 3cm) utilizando sílica gel 60 (230-400 *mesh*) como fase estacionária, e fase móvel Hex, AcOEt e MeOH, utilizando-se volume de 100 mL (Tabela 5).

Tabela 5: Dados do fracionamento PnRam-EH do extrato hexânico dos ramos

| Cromatografia em coluna aberta | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Massa da amostra: 643,1 mg | h x Ø: 30 x 3 cm |
| Massa de sílica gel: 64,31 g | volume de eluente utilizado: 100 mL |
| Sistema de eluição | Frações coletadas |
| Hex/AcOEt 95:5 | 0-4 |
| Hex/AcOEt 9:1 | 5-9 |
| Hex/AcOEt 85:15 | 10-12 |
| Hex/AcOEt 8:2 | 13-17 |
| Hex/AcOEt 7:3 | 18-20 |
| Hex/AcOEt 1:1 | 21-24 |
| AcOEt 100 % | 25-32 |
| MeOH 100% | 33-38 |

As frações obtidas foram analisadas por CCDC, eluídas em Hex/AcOEt 1:1, reveladas em UV λ 254 nm, anisaldeído sulfúrico e sulfato cérico, as que apresentaram perfis químicos semelhantes foram reunidas 28-30 (128,8 mg) para continuar o fracionamento por apresentarem características da presença de substâncias terpênicas.

4.5.6 Fracionamento da fração 28-30

A fração 28-30 (128,8 mg) foi submetida à cromatografia em coluna aberta de florisil (100-200 *Mesh*), eluída com DCM e acetona em diferentes gradientes (Tabela 6), gerando 86 frações.

Tabela 6: Dados do fracionamento 28-30 PnRam-EH do extrato hexânico dos ramos

| Cromatografia em coluna aberta | |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| Massa da amostra: 128,8 mg | h x Ø: 26 x 1 cm |
| Massa de florissil: 10,30 g | volume de eluente utilizado: 40 mL |
| Sistema de eluição | Frações coletadas |
| DCM 100 % | 0-16 |
| DCM/acetona 95:5 | 17-32 |
| DCM/acetona 9:1 | 33-41 |
| DCM/acetona 85:15 | 42-49 |
| DCM/acetona 8:2 | 50-56 |
| DCM/acetona 7:3 | 57-65 |
| DCM/acetona 1:1 | 66-74 |
| Acetona 100% | 75-86 |

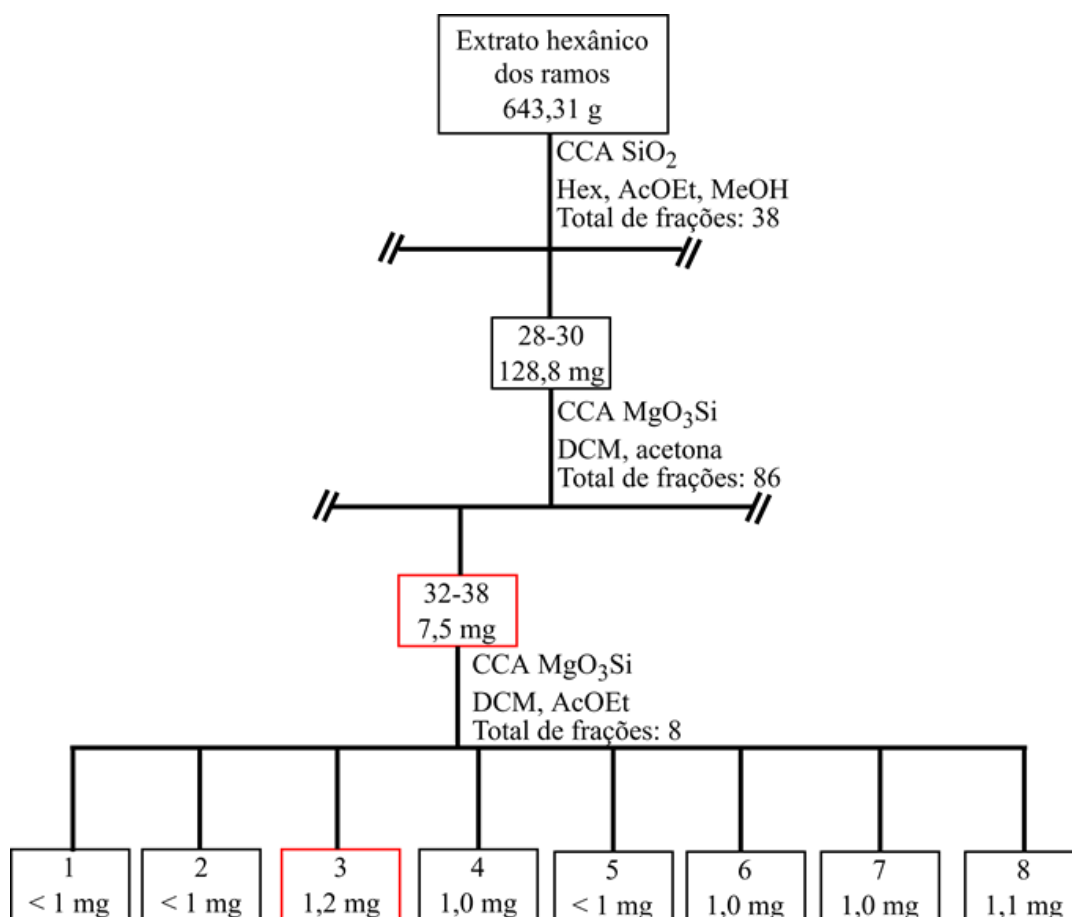
Ao analisar as 86 frações (Tabela 6) em CCDC, foi observado que as frações 32-38 (7,5 mg), eluídas em DCM/AcOEt 9:1, reveladas em anisaldeído sulfúrico e sulfato cérico, apresentaram indícios de substâncias terpênicas, foram reunidas e fracionadas em cromatografia em coluna aberta de florissil, eluída com misturas de solventes DCM e AcOEt em diferentes gradientes (Tabela 7), resultando em 8 frações.

Tabela 7: Dados do fracionamento 32-38 PnRam-EH do extrato hexânico dos ramos

| Cromatografia em coluna aberta | |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| Massa da amostra: 7,5 mg | h x Ø: 10 x 0,7 cm |
| Massa de florissil: 0,60 g | volume de eluente utilizado: 20 mL |
| Sistema de eluição | Frações coletadas |
| DCM 100 % | 1-2 |
| DCM/AcOEt 9:1 | 3-5 |
| DCM/AcOEt 8:2 | 6-7 |
| AcOEt 100% | 8 |

Após análise em CCDC, a fração 3 (1,2 mg), eluída em DCM/AcOEt 9:1, revelada em anisaldeído sulfúrico apresentou indícios de iridoide, sendo enviada à análise por RMN de ¹H, por apresentar pouca massa não foi possível prosseguir com as análises.

Figura 10: Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico dos ramos de *P. nitidella*



4.5.7 Fracionamento da fase DCM do extrato metanólico dos ramos

Visando o isolamento das substâncias, a fase DCM do extrato metanólico dos ramos (354,2 mg), foi submetida ao fracionamento em cromatografia em coluna aberta (CCA) (h x Ø= 37 x 1,7 cm) utilizando sílica gel 60 (28,33 g, 230-400 *mesh*) como fase estacionária, e eluída com DCM, AcOEt e MeOH, utilizando-se um volume de 100 mL (Tabela 8).

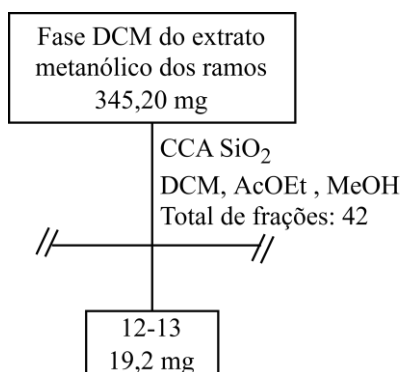
Tabela 8: Dados do fracionamento da fase DCM do extrato metanólico dos ramos

| Cromatografia em coluna aberta | |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| Massa da amostra: 354,2 mg | h x Ø: 37 x 1,7 cm |
| Massa de sílica gel: 28,33 g | volume de eluente utilizado: 100 mL |
| Sistema de eluição | Frações coletadas |
| DCM 100 % | 1-5 |
| DCM/AcOEt 95:5 | 6-10 |
| DCM/AcOEt 9:1 | 11-14 |
| DCM/AcOEt 85:15 | 15-18 |
| DCM/AcOEt 8:2 | 19-22 |
| DCM/AcOEt 7:3 | 23-26 |
| DCM/AcOEt 1:1 | 27-30 |
| AcOEt 100% | 31-34 |
| AcOEt/MeOH 1:1 | 35-38 |
| MeOH 100% | 39-42 |

Como resultado do fracionamento citado na tabela 8, as frações 12-13 (19,20 mg) foram reunidas por apresentarem perfis químicos semelhantes e características da presença de cumarina quando analisadas por CCDC e RMN de ^1H .

A fração 12-13 (19,20 mg) foi purificada por cromatografia líquidas de alta eficiência (CLAE), a mesma foi solubilizada em metanol e injetada em coluna semi preparativa de sílica C_{18} , com volume de injeção de 50 μL , sendo realizada 4 injeções, por método isocrático 80% de metanol. A purificação foi realizada nos comprimentos de onda 254 e 280 nm.

Figura 11: Fluxograma do fracionamento da fase DCM do extrato metanólico dos ramos de *P. nitidella*



4.6 Ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo *A. salina*

Este ensaio foi realizado no LABB pelo autor deste trabalho, segundo a metodologia de (MEYER et al., 1982), para o ensaio foi utilizado como meio de crescimento uma solução salina (sal marinho) 3,8%, e 10 mg de cistos de *Artemia salina*, foram adicionados para eclosão. As condições utilizadas para o crescimento foram: temperatura entre 27 a 30 °C e iluminação com lâmpadas

fluorescente durante 48 horas. Após esse período de eclosão, as larvas foram transferidas para microplacas de 24 poços, distribuindo-se 10 larvas de *A. salina* para cada poço.

Em cada placa, havia o controle da solução salina, do solvente utilizado e dos extratos em teste que foram adicionados aos poços, todos em triplicata. As placas com as larvas de *A. salina* foram mantidas por 24 horas sob iluminação de lâmpada fluorescente.

Após esse período, foi quantificado o número de larvas sobreviventes, tanto nos poços de controles quanto no teste. A análise foi realizada inicialmente na concentração de [1000 e 500 µg/mL] e quando o extrato apresenta toxicidade acima de 50%, realizam-se diluições seriadas até encontrar a Concentração Letal de 50% (CL₅₀).

4.7 Atividade antioxidante

4.7.1 Ensaio com o radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

Este ensaio foi realizado no LABB pela Dra. Maria Teresa Fachin-Espinar, os testes antioxidantes foram realizados conforme (NOVAES & NUNEZ, 2008), o teste foi feito em triplicatas. A solução foi preparada solubilizando 28 mg do DPPH• em 1 mL de DCM e avolumando com MeOH até 100 mL. O ácido ascórbico aplicado como parâmetro antioxidante, foi diluído em água deionizada nas seguintes concentrações: 100, 200, 400, 600 e 800 µg/mL. A solução de DPPH• foi utilizada na concentração de 2,8 mg/L.

Para a preparação da curva do DPPH•, adicionaram-se 990 µL da solução de DPPH• em seis microtubos e completaram-se com 10 µL da solução de ácido ascórbico. Decorridos 30 min., realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de 517 nm.

Após a verificação da curva de calibração e sua linearidade, foram adicionados 10 µL do extrato em teste na concentração de 500 µg/mL em 990 µL da solução de DPPH•. Foi feita a leitura da absorbância em 517 nm no espectrofotômetro, e após 30 minutos de reação foi realizada novamente a leitura. A variação da absorbância dos extratos foi comparada a do ácido ascórbico para a avaliação quantitativa do potencial antioxidante.

4.8 Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição

Este ensaio foi realizado no LABB pela Dra. Maria Teresa Fachin-Espinar, e com auxílio do autor deste trabalho. Os extratos brutos hexânicos e metanólicos de *P. nitidella*, foram avaliados por meio do método de microdiluição em caldo, com metodologia adaptada das normas da CLSI (2012). Para os ensaios foram utilizados os microrganismos: *Aeromonas hydrophila* (IOC/FDA 110-36), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Edwardsiella tarda* (ATCC 15947), *Escherichia coli* (ATCC

11775), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Serratia marcescens* (ATCC 13880), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600). As cepas foram cedidas pelo Laboratório de Micro-organismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz.

De acordo com a metodologia descrita por CLSI, 2012, foram realizadas leituras em espectrofotômetro do crescimento microbiano e a atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços, com absorbância de 0,08 em 625 nm, correspondente a escala 0,5 de McFarland, sendo diluídos 20 vezes e o volume final de bactéria em cada poço foi de aproximadamente 5×10^4 UFC/mL.

Os extratos foram solubilizados em DMSO a 5%, em seguida efetuam-se sucessivas diluições. Em cada poço foram colocados 10 µL do inóculo e 90 µL dos extratos brutos. A mesma metodologia será usada quando houver substâncias isoladas. Sendo usadas para avaliação dos extratos brutos as concentrações de 1000 µg/mL e as concentrações 125 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,2 µg/mL para substâncias isoladas.

Os testes foram feitos em triplicatas. Utilizando-se como controle positivo 90 µL do antibiótico oxitetraciclina na concentração de 125 µg/mL e 10 µL de inóculo. Como controle negativo utiliza-se 90 µL de caldo Müeller Hinton contendo 5% de DMSO e 10 µL de inóculo. Uma leitura inicial das placas foi feita em espectrofotômetro a 625 nm, em seguida a placa ficou em temperatura entre 30 a 37 °C em Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD). Após 24 horas avaliou-se mais uma vez cada microplaca por meio da leitura espectrofotométrica em 625 nm. Pelo programa estatístico Origin 8 foram verificados os resultados obtidos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do material vegetal coletado se obteve os extratos hexânicos das folhas e ramos, os quais, apresentaram massas de 4,15 g e 0,64 g com rendimentos de 1,36% e 0,21% respectivamente. Além disso, as massas das folhas e ramos dos extratos metanólicos foram de 18,14 g e 13,63 g com rendimentos de 6,04% e 4,54% nessa ordem (tabela 9). No extrato hexânico é possível identificar substâncias terpênicas e possivelmente alcaloides, flavonoides e substâncias fenólicas no extrato metanólico (COLLINS, BRAGA, BONATO, 1990).

Tabela 9: Rendimentos dos extratos hexânicos e metanólicos

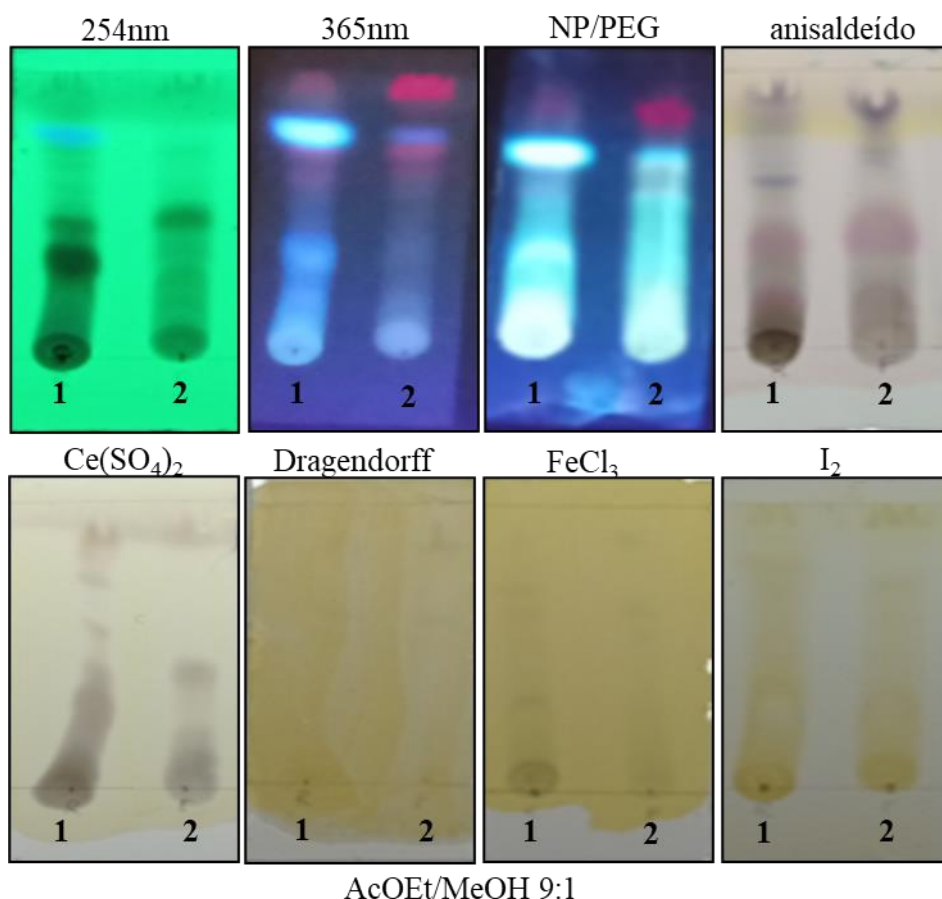
| Material vegetal | Massa do material seco (g) | Massa dos extratos Hex. (g) | Rendimentos dos extratos Hex. (%) | Massa dos extratos MeOH (g) | Rendimentos dos extratos MeOH (%) |
|-------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--|------------------------------------|--|
| Ramos | 300 | 0,64 | 0,21 | 13,63 | 4,54 |
| Folhas | 300 | 4,15 | 1,36 | 18,14 | 6,04 |

Legenda: Hex= hexano; MeOH= metanol

5.1 Análises químicas de cromatografia em camada delgada comparativa dos extratos hexânicos

A análise em CCDC dos extratos hexânicos de ramos e folhas (figura 12) mostraram indícios da presença de substâncias com ligações duplas quando reveladas com iodo, e as cromatoplasmas quando reveladas em luz ultravioleta em λ 365 e 254 nm deram indícios da presença ligações duplas conjugadas. Os reveladores oxidantes anisaldeído e sulfato cérico indicaram a possível presença de substâncias terpênicas e esteroidais, apresentando coloração lilás e rosa. Quando reveladas com reagente de Drangendorff não foi observado a presença de moléculas nitrogenadas. Entretanto foi indicada a presença de substâncias fenólicas quando reveladas NP/PEG e cloreto férrico, neste último apresentando coloração escura de forma pouco intensa.

Figura 12: Cromatoplasas dos extratos hexânicos dos ramos e folhas

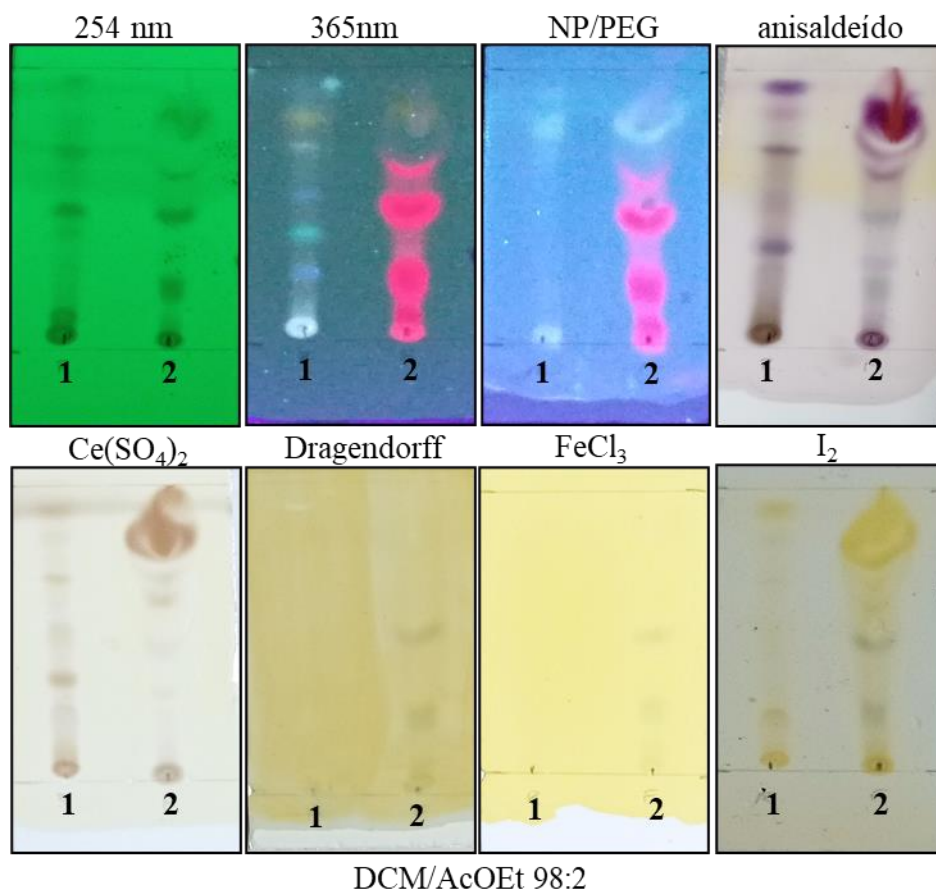


Legenda: 1= ramos; 2= folhas; DCM= diclorometano; AcOEt= acetato de etila

5.2 Análises químicas de cromatografia em camada delgada comparativa dos extratos metanólicos

A análise em CCDC dos extratos metanólicos de ramos e folhas (figura 13) mostrou indícios da presença de substâncias com ligações duplas quando reveladas com iodo, ao serem reveladas em luz ultravioleta em λ 365 e 254 nm indicaram a presença de substâncias com ligações duplas conjugadas. Os reveladores anisaldeído e sulfato cérico indicaram a presença de substâncias passíveis de oxidação. Quando reveladas com reagente de Dragendorff não foi observado a presença de moléculas nitrogenadas, sendo ausente a coloração alaranjada característica dessa classe química. Entretanto foi observado a presença de substâncias fenólicas quando reveladas com NP/PEG e cloreto férrico, neste último apresentando coloração escura de forma pouco intensa.

Figura 13: Cromatoplasas dos extratos metanólicos dos ramos e folhas



Legenda: 1= ramos; 2= folhas; AcOEt= acetato de etila; MeOH= metanol

5.3 Análise dos extratos hexânicos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Nas análises de RMN dos extratos de folhas e de ramos (figuras 14 e 15) e nas comparações entre eles (figuras 16 a 18) foram observados vários sinais com deslocamentos químicos entre δ_H 0,6 e 1,0 característicos de hidrogênios metílicos de substâncias alifáticas, em δ_H 1,25 o sinal bem intenso característico de CH₂ de substâncias alifáticas de cadeia linear longa (“graxa”), em δ_H 4,3 um sinal do tipo “duplo dubleto” característico de triglicerídeos. Também se observa sinais referentes a ligações duplas isoladas entre δ_H 5 e 6.

Figura 14: Espectro de RMN de ^1H do extrato hexânico de folhas, em CDCl_3 (300 MHz).

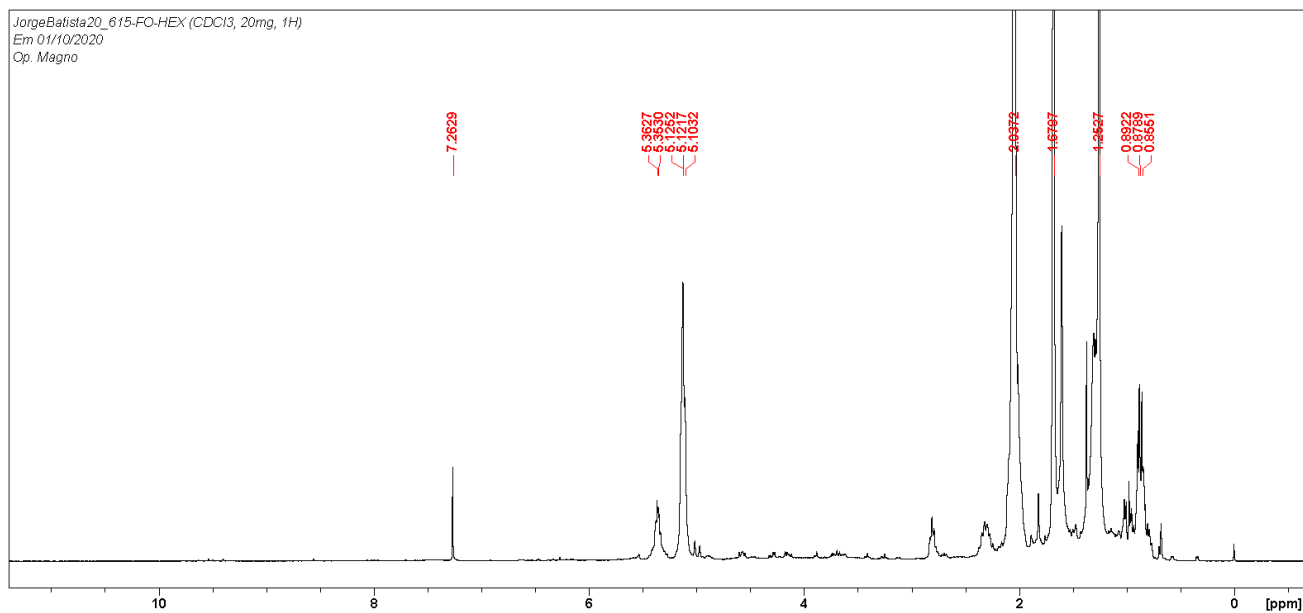


Figura 15: Espectro de RMN de ^1H do extrato hexânico de ramos, em CDCl_3 (300 MHz).

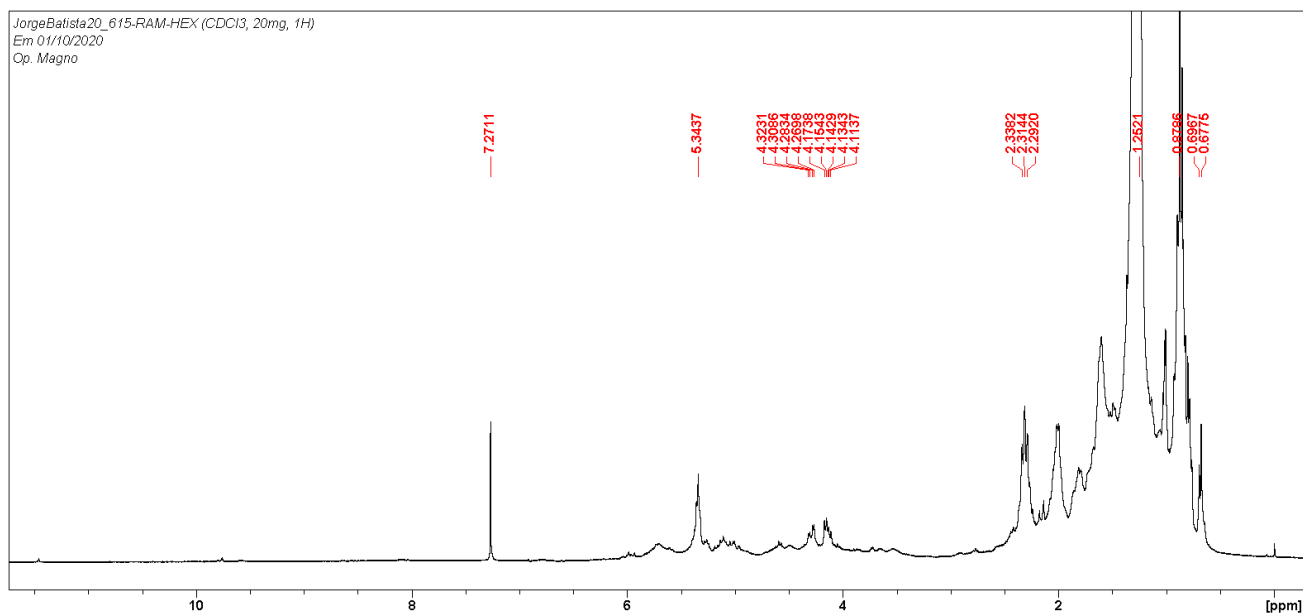


Figura 16: Comparação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos hexânicos: a) de folhas e b) de ramos, ambos em CDCl_3 (300 MHz).

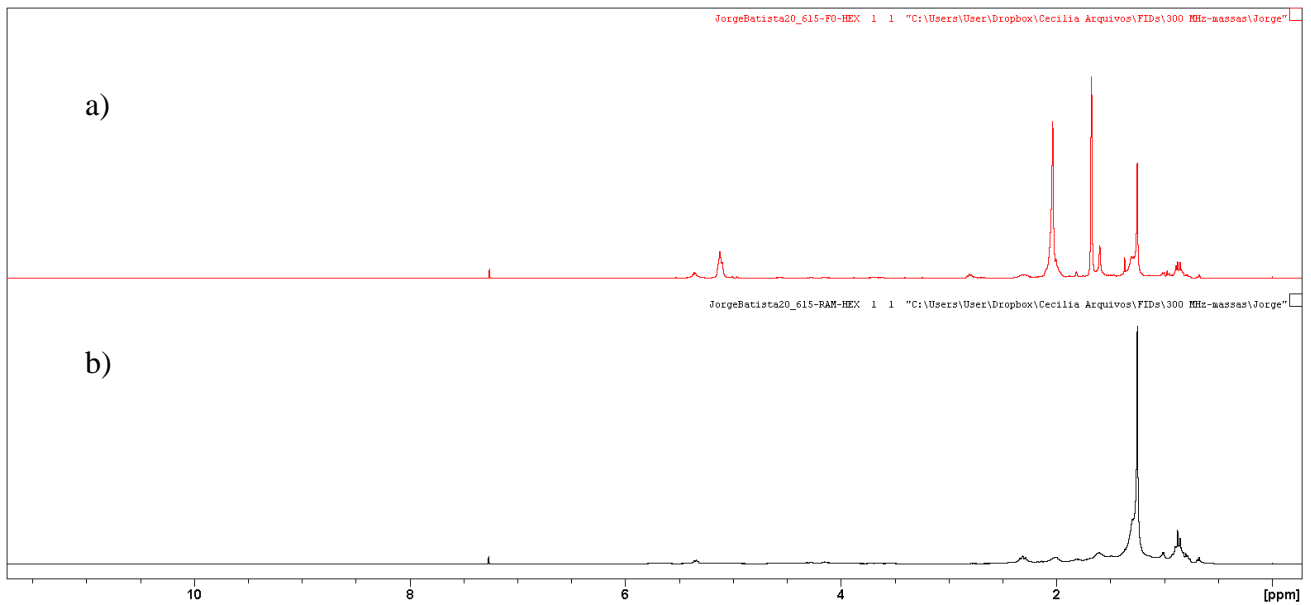


Figura 17: Expansão entre δ_{H} 0 e 4,5 da comparação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos hexânicos: a) de folhas e b) de ramos, ambos em CDCl_3 (300 MHz).

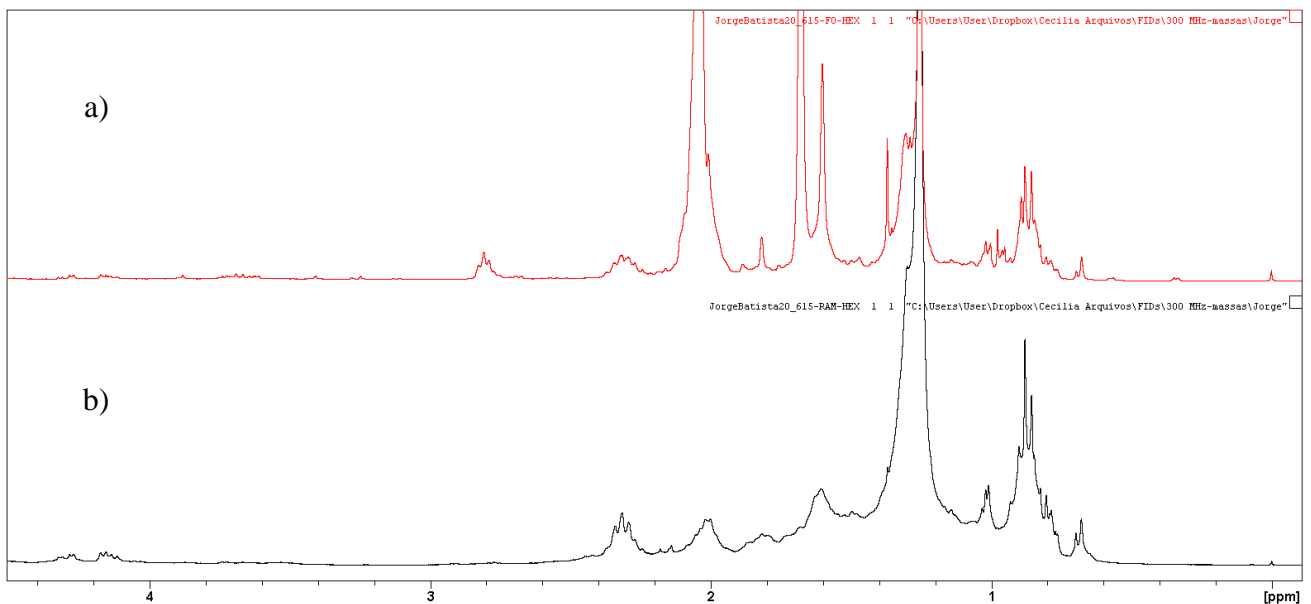
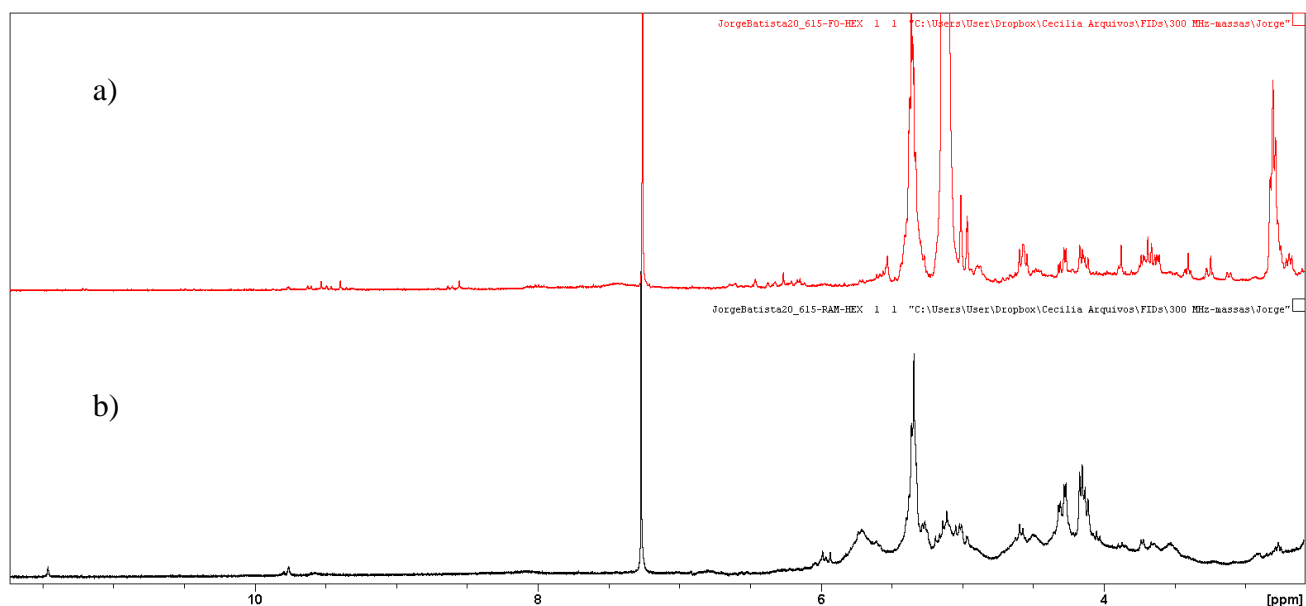


Figura 18: Expansão entre δ_H 3,5 e 11 da comparação dos espectros de RMN de 1H dos extratos hexânicos: a) de folhas e b) de ramos, ambos em $CDCl_3$ (300 MHz).



5.4 Análise dos extratos metanólicos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio

No geral as análises de RMN de 1H dos extratos metanólicos de folhas (figura 19) e ramos (figura 20) apresentaram deslocamentos químicos semelhantes, conforme pode ser visto nas comparações (figuras 21 e 22), como também foi possível observar sinais com deslocamentos químicos entre δ_H 0,6 e 1,0 característicos de hidrogênios metílicos de substâncias alifáticas, em δ_H 1,23 o sinal bem intenso característico de CH_2 de substâncias alifáticas de cadeia linear longa (“graxa”). Já os sinais entre δ_H 5 e 6 são característicos de ligações duplas isoladas. Nestes espectros os vários sinais entre δ_H 6 e 8, referem-se a hidrogênios de substâncias aromáticas. Em ambos os espectros se observa sinais em δ_H 9,6 que provavelmente são indicativos da presença de aldeídos (figuras 19, 20 e 22).

Figura 19: Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico de folhas, em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).

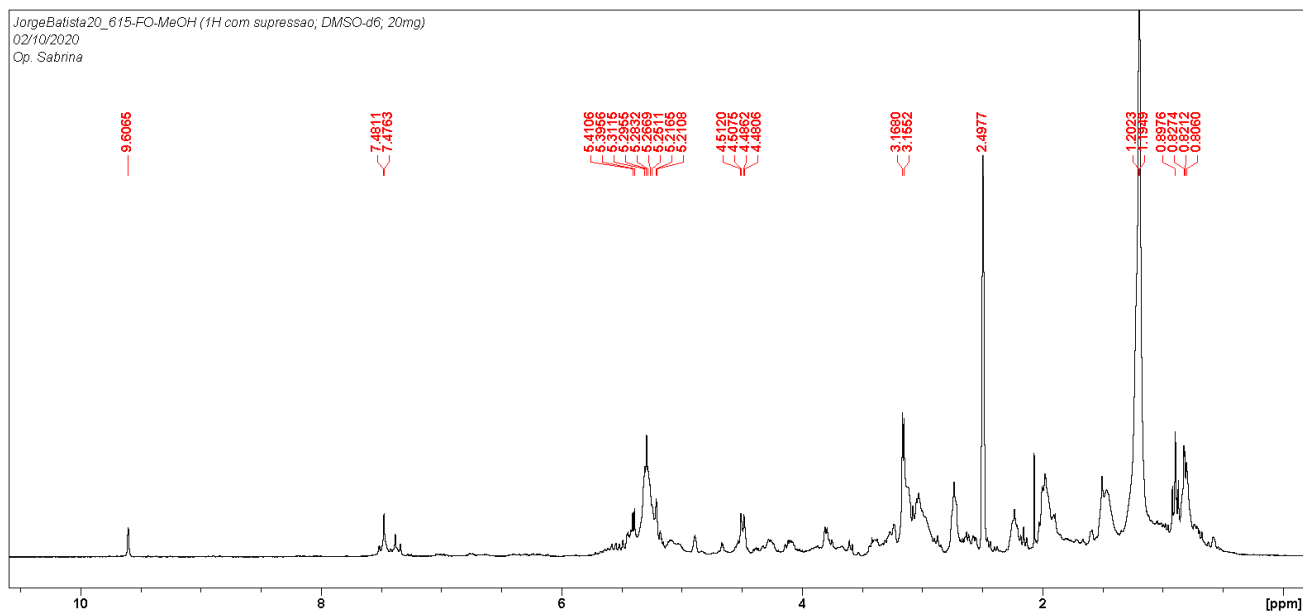


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico de ramos, em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).

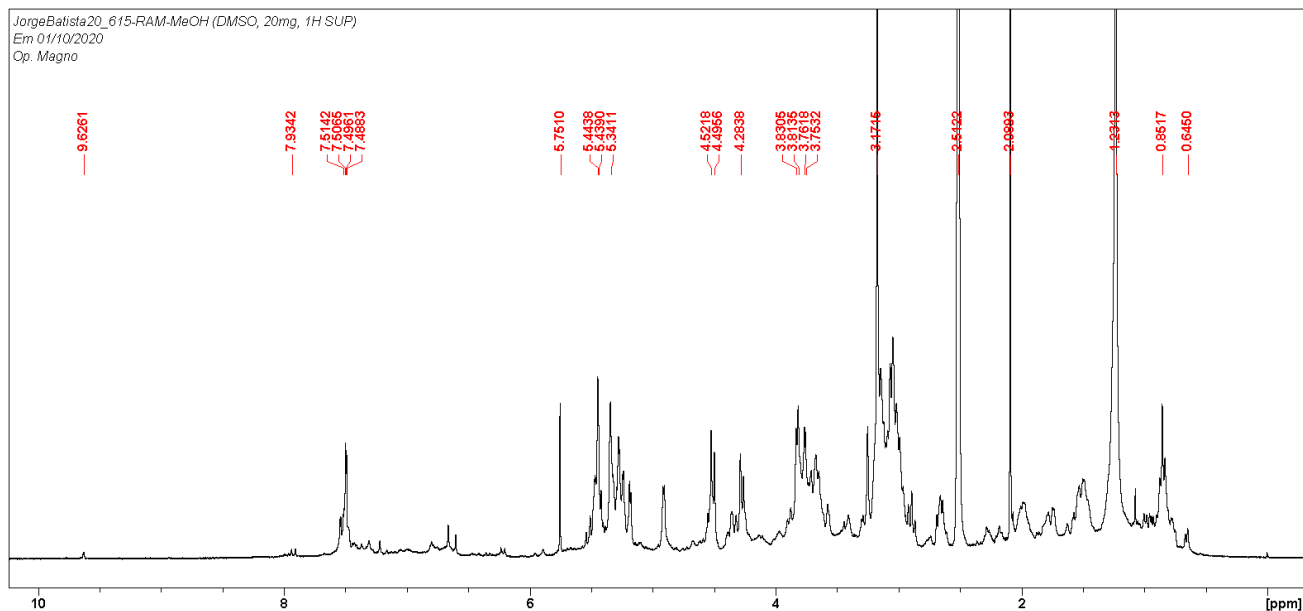


Figura 21: Comparação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos: a) de folhas e b) de ramos, ambos em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).

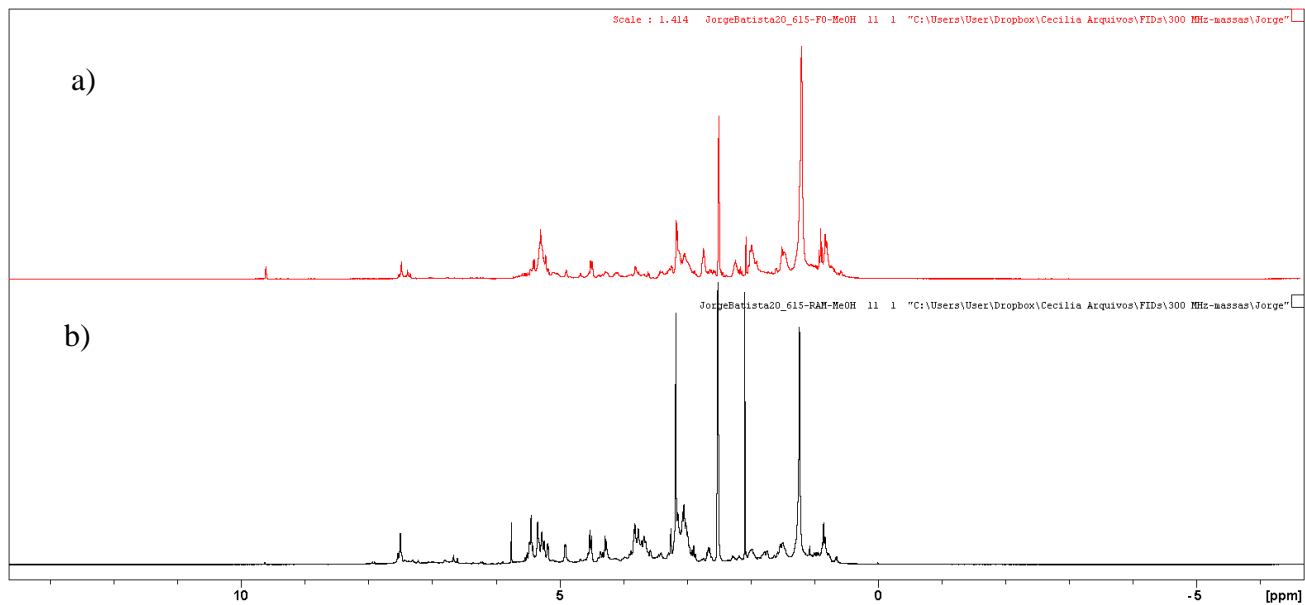
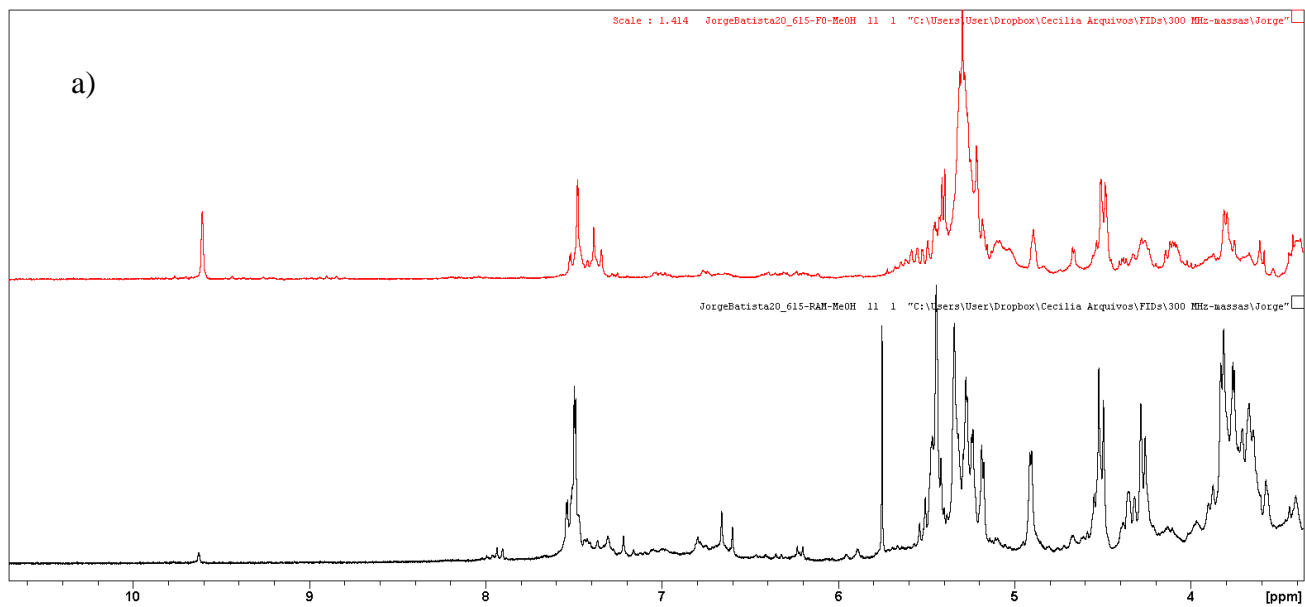


Figura 22: Expansão da região entre δ_{H} 4 e 10 da comparação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos: a) de folhas e b) de ramos, ambos em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).

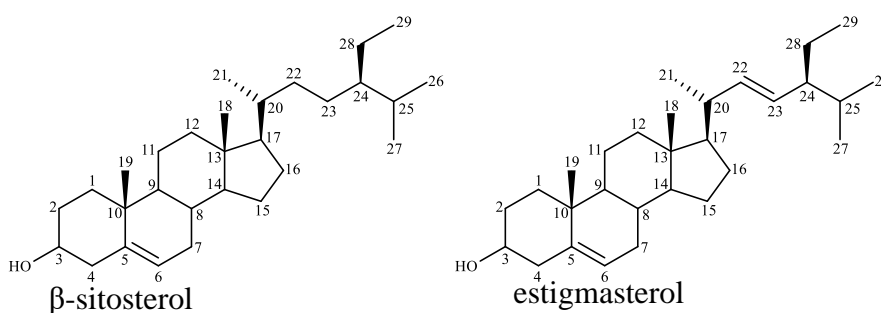


5.5 Identificação das substâncias isoladas do extrato hexânico das folhas

A fração [PnFo-EH] com 3,8 mg foi obtida e se apresentou como um sólido de cor branca em forma de cristais, com R_f de 0,37, quando eluída em DCM/AcOEt 9:1 e apresentou cor lilás ao ser revelada com anisaldeído sulfúrico.

Ao analisar o espectro de RMN de ^1H da fração observaram-se sinais específicos de uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol (**1** e **2**) (figuras 24 a 26). O dubleto em δ_{H} 5,35 é referente ao H-6 das duas substâncias. E os dois duplos dubletos em δ_{H} 5,15 e 5,01 são característicos dos H-22 e H-23 da substância estigmasterol. O sinal em δ_{H} 3,52 é do tipo multipeto sendo atribuído ao H-3 do estigmasterol e β -sitosterol (tabela 10). Bem como, os deslocamentos químicos entre δ_{H} 1 e 0,69 que são atribuídos aos hidrogênios característicos das metilas da mistura β -sitosterol e estigmasterol (figura 25), os quais foram comparados com a literatura (Pedroza et al., 2020).

Figura 23: Estruturas química do β -sitosterol e estigmasterol



Para determinar a porcentagem relativa de cada constituinte da mistura foi feita primeiro a integração do sinal em δ_{H} 5,3 relativo aos 2 “H-6” (do β -sitosterol e do estigmasterol) a qual apresentou valor de integral de 1,7244 (arredondado para 1,7) e foi obtida a integral dos sinais em δ_{H} 5,01 e 5,15 referentes aos “H-22” e “H-23” do estigmasterol, os quais apresentaram valor de integral de 1,00. Para saber a porcentagem relativa, subtraiu-se o valor do “H-22” do estigmasterol (1,00) do valor da integral dos “H-6” de ambas as substâncias (β -sitosterol e do estigmasterol), a integral 1,7. Ou seja, a proporção relativa é de 1:0,7 de estigmasterol/ β -sitosterol (Pedroza et al., 2020). Essa constatação é interessante, pois não é comum o estigmasterol estar em maior concentração quando em mistura com o β -sitosterol (Nunez, comunicação pessoal).

Figura 24: Espectro de RMN de ^1H da mistura do estigmasterol e β -sitosterol em CDCl_3 (300 MHz).

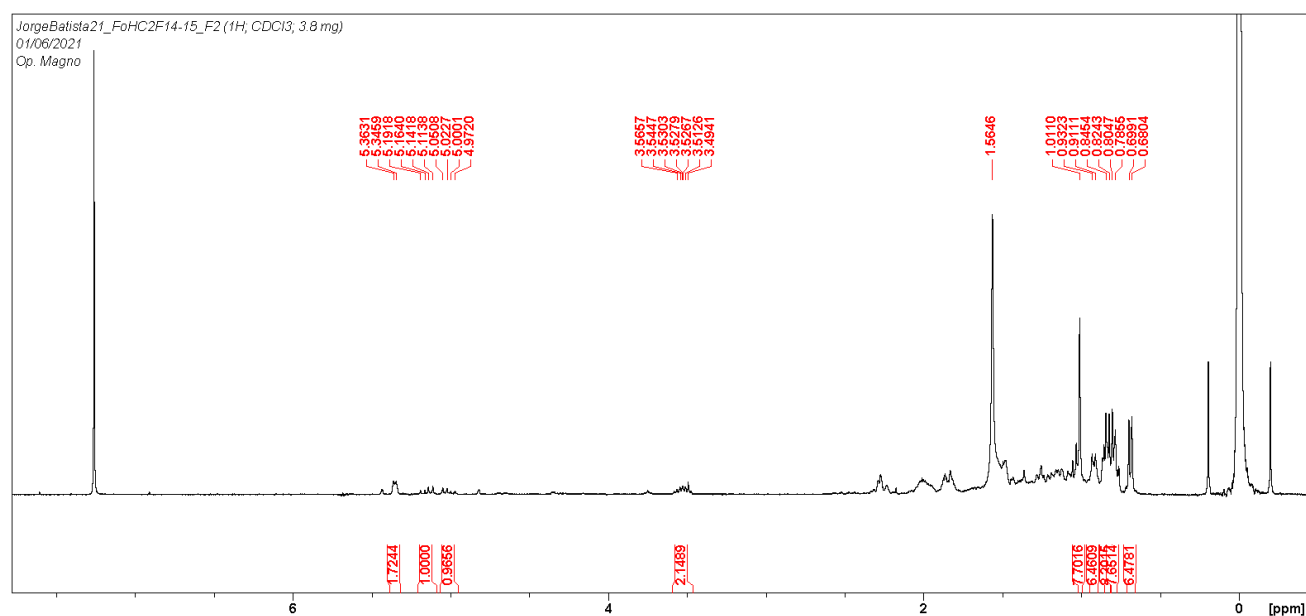


Figura 25: Expansão entre δ_{H} 1 e 6 do espectro de RMN de ^1H do estigmasterol e β -sitosterol em CDCl_3 (300 MHz).

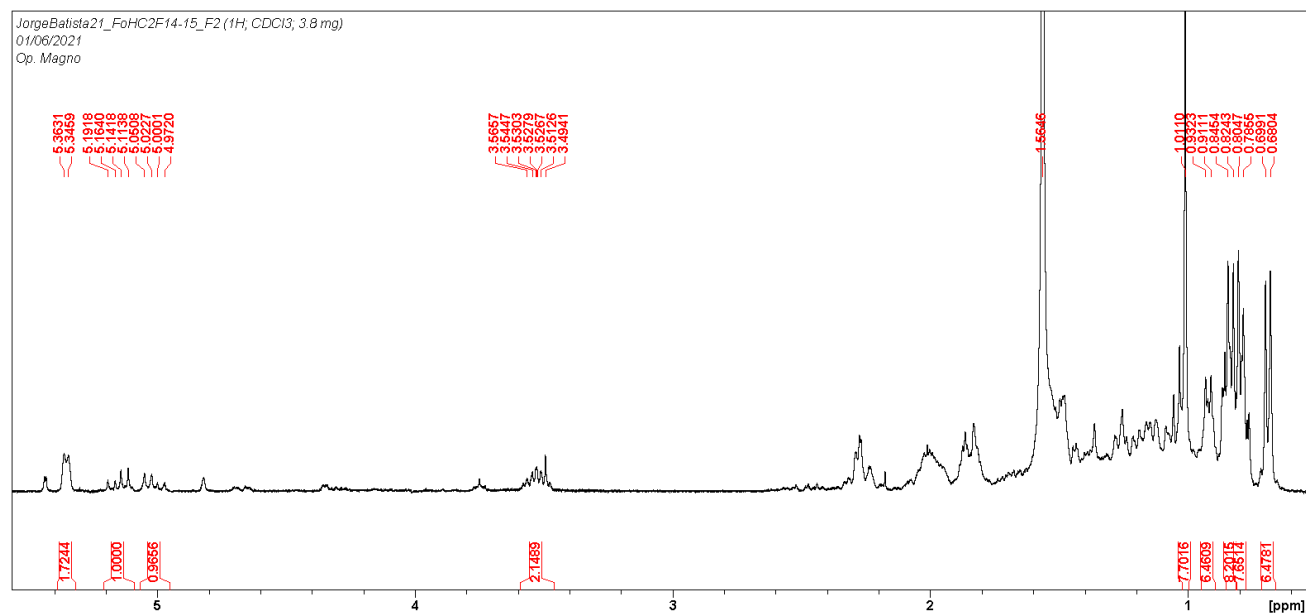
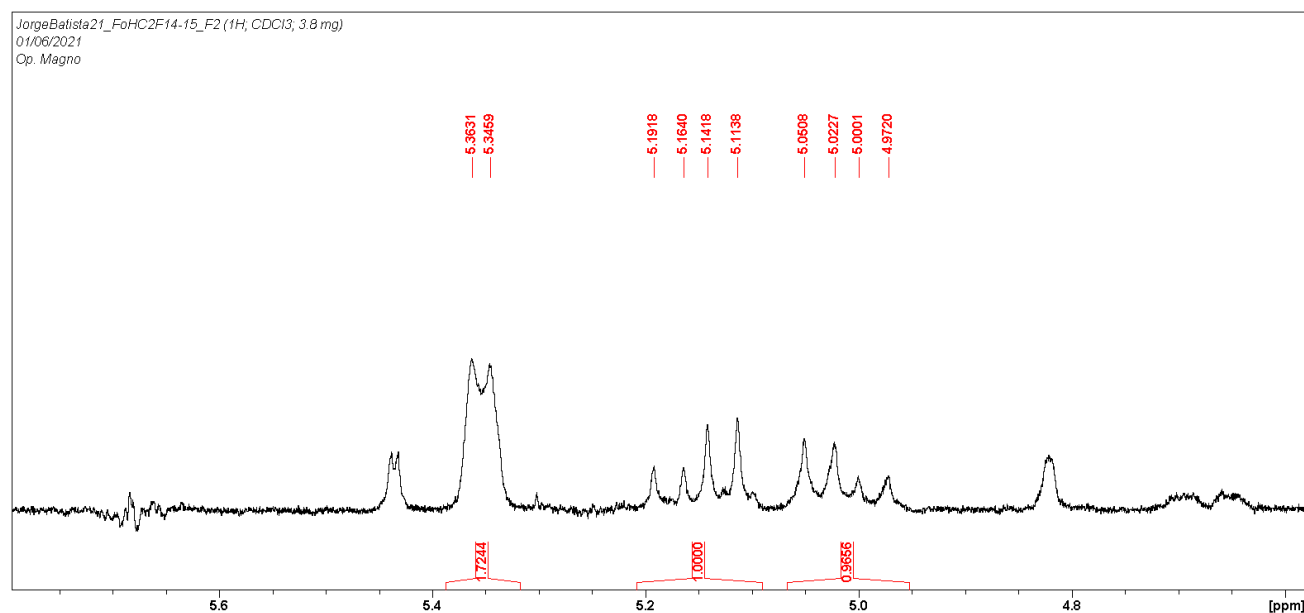


Figura 26: Expansão entre δ_H 4 e 6 do espectro de RMN de 1H do estigmasterol e β -sitosterol em $CDCl_3$ (300 MHz).

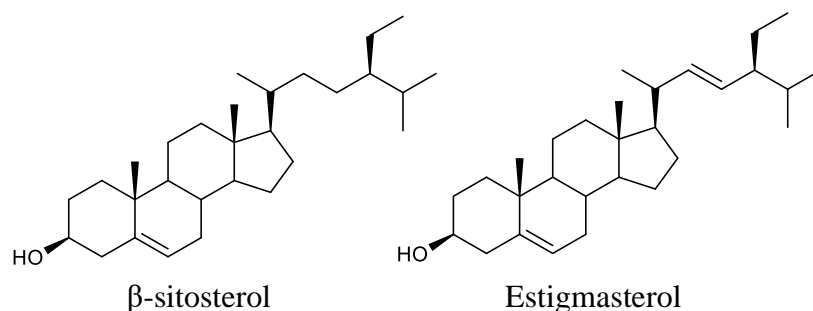


O β -sitosterol e estigmasterol são de grande importância biológica. Destacando suas atividades como: antibacteriana, anticancerígena e hipotensiva (BERGES et al., 1995; KANG et al., 1995; SENGE et al., 1995; OSAWA et al., 1997; AWAD et al., 1998; FAIZI et al., 1998; MOHANAN e DEVI, 1998; LOZANO et al., 2020). Além disso, vários estudos indicam que a sua atividade analgésica é bem aceita em relação a aspirina e ao paracetamol (SANTOS et al., 1995; MEYRE-SILVA et al., 1998; PERES et al., 1998). Na indústria alimentícia, essas duas substâncias são empregadas para aumentar a solubilidade de gorduras líquidas em meios aquosos, melhorando também a consistência de margarinas (SAFONOVA et al., 1993; JONES et al., 1997).

Tabela 10: Dados de RMN de 1H do estigmasterol e β -sitosterol em $CDCl_3$ (300 MHz) comparação com a literatura (JEFFREYS & NUNEZ, 2016).

| Hidrogênios | δ_H β -sitosterol | δ_H estigmasterol | δ_H |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------|
| | Observado | Observado | Literatura |
| Hidrogênios metílicos H-19 | 0,69 (<i>s</i>) | 0,69 (<i>s</i>) | 0,69 (<i>s</i>) |
| H-3 | 3,52 (<i>m</i>) | 3,52 (<i>m</i>) | 3,54 (<i>m</i>) |
| H-6 | 5,35 (<i>dl</i>) | 5,35 (<i>dl</i>) | 5,37 (<i>d</i>) |
| H-22 | 5,15 (<i>dd</i>) | - | 5,16 (<i>dd</i>) |
| H-23 | 5,01 (<i>dd</i>) | - | 5,01 (<i>dd</i>) |

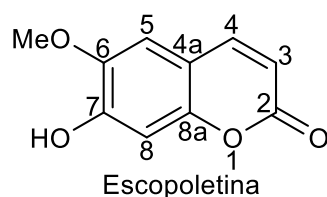
Figura 27: Estruturas química das moléculas identificadas de β -sitosterol e estigmasterol



5.6 Identificação da substância isolada da fase DCM do extrato metanólico dos ramos

A fração PnDCMRam-EM (5,9 mg) se mostrou como um sólido amarelo, com R_f de 0,51 eluída em DCM/AcOEt 9:1 apresentando intensa fluorescência na cor azul característica dessa classe química sob a luz ultravioleta λ 365 nm (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI; 1984) e ao ser revelada em sulfato cérico apresentou coloração lilás escuro antes do aquecimento da cromatofolha. A caracterização estrutural baseou-se nos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , aliada a dados da literatura (COSTA 1999; BAYOUMI et al., 2010) e análises de espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida (LC/MS), onde se concluiu tratar-se da substância escopoletina (**3**) (figura 28).

Figura 28: Estrutura química da escopoletina



Ao analisar o CL-EM foi observado um pico cromatográfico com tempo de retenção de 4,2 minutos (figura 29), e o espectro de EM correspondente desse pico, em modo negativo apresentou m/z de 191,0358 $[\text{M}-\text{H}]^-$ no qual foi confirmado a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$ com massa de 192,0436 u (figuras 30). No espectro de EM/EM da fragmentação do íon em m/z de 191,0358 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (figura 30) foram observados íons fragmentos em m/z 176,05 e 149,06 que correspondem à perda de CH_3 radicalar (15 u) e $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ (ceteno, 42 u), (COSTA, 1999).

Figura 29: Espectro de CL-EM da escopoletina em modo negativo [M-H]⁻

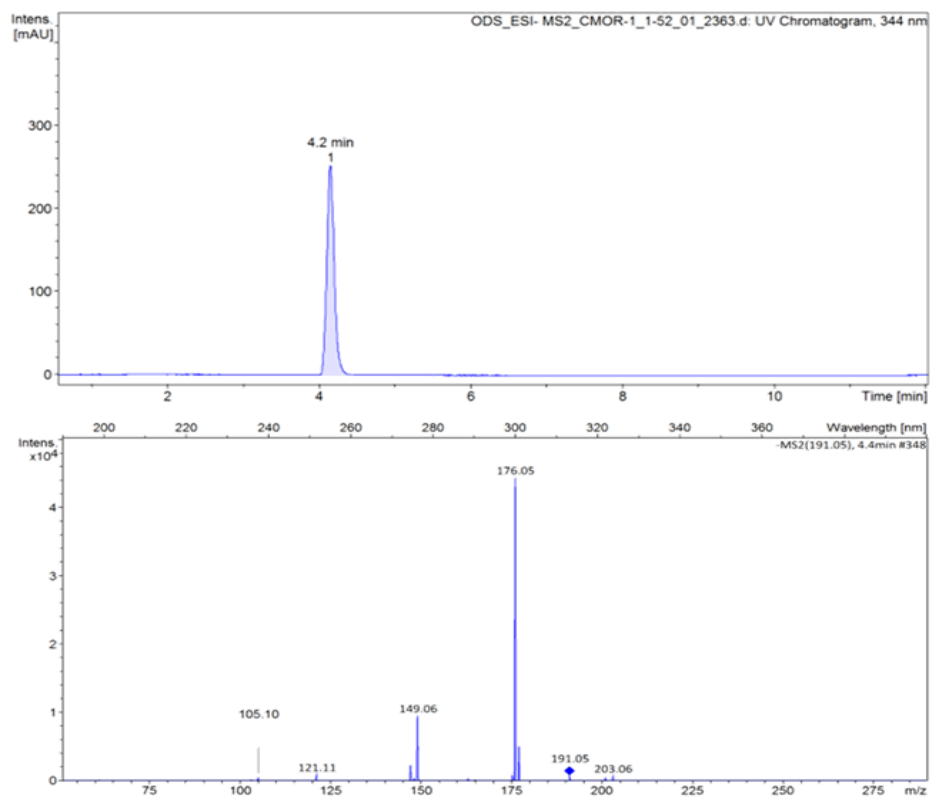
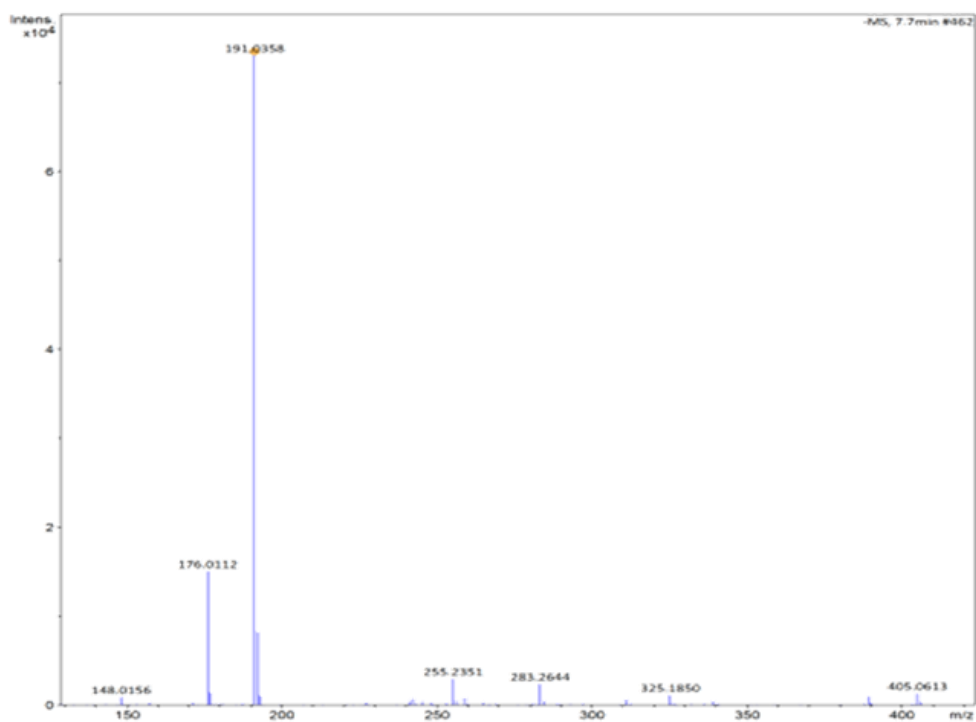


Figura 30 : Espectro de massas da escopoletina em modo negativo [M-H].



No espectro de RMN de ¹H (figura 31 e na expansão da região dos aromáticos figura 32) observou-se sinais característicos do anel de um esqueleto cumarínico, em δ_H 7,80 (1H, *d*, $J=9,3$ Hz) e em δ_H 5,99 (1H, *d*, $J=9,3$ Hz) dos δ_H de H-4 e H-3, respectivamente. Foram observados outros deslocamentos químicos de hidrogênios em δ_H 7,03 (1H, *s*) e δ_H 6,55 (1H, *s*) característicos dos δ_H de H-5 e H-8 nessa ordem e o sinal em δ_H 3,76 (3H, *s*) indicando a presença de uma metoxila.

Figura 31: Espectro de RMN de ^1H da escopoletina em $\text{DMSO-}d_6$, (300 MHz).

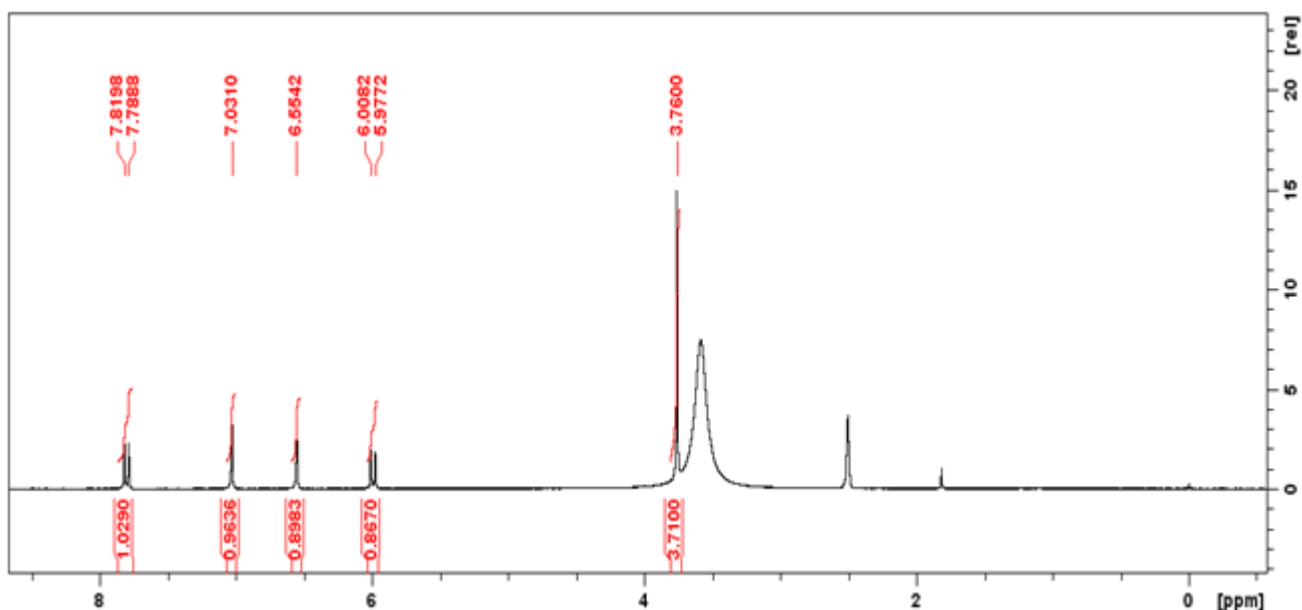
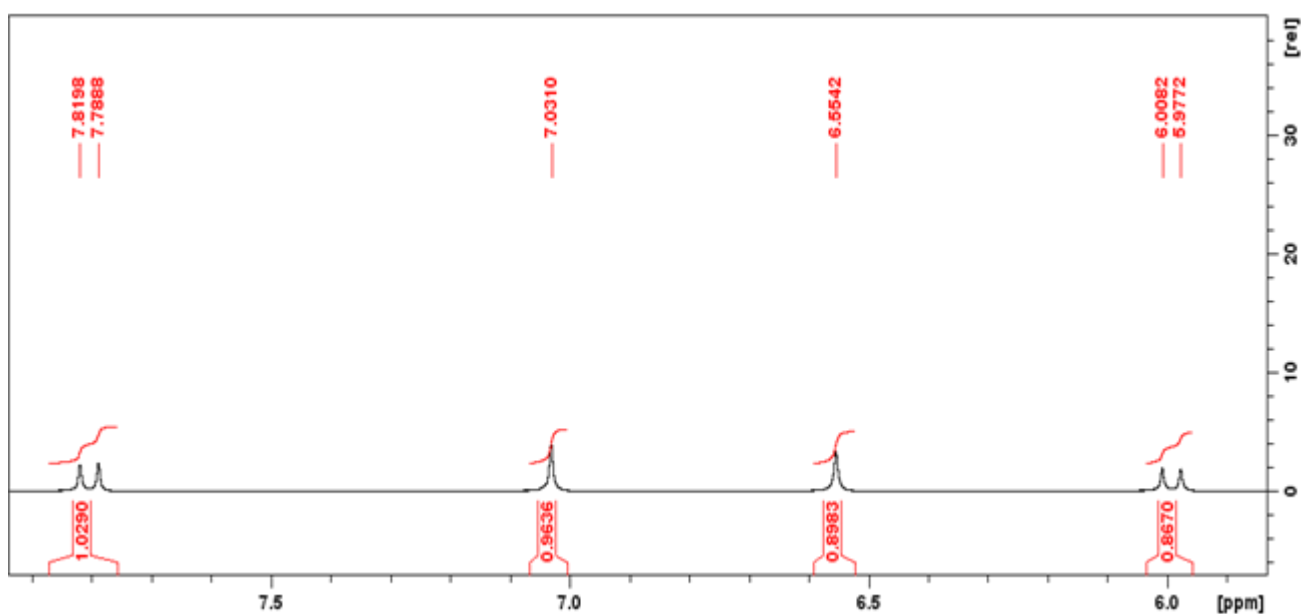


Figura 32: Expansão entre δ_{H} 6 a 8 do espectro de RMN de ^1H da escopoletina em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).



No espectro RMN de ^{13}C (figura 33 e na expansão entre δ_{C} 108,74 a 107,90 figura 34), se observou um total de dez carbonos, que se diferenciam por seus deslocamentos químicos, tendo quatro carbonos quaternários, dos quais três estão ligados a átomos de oxigênio em (δ_{C} 151,04; 156,61 e 146,73) e outro ligado a um carbono em (δ_{C} 107,90). Também são apresentados quatro sinais de carbono metínicos em (δ_{C} 102,64; 108,74; 108,19 e 144,53) e uma carbonila de um grupo éster (δ_{C} 161,22).

Figura 33: Espectro de RMN de ^{13}C da escopoletina em $\text{DMSO-}d_6$, (75 MHz).

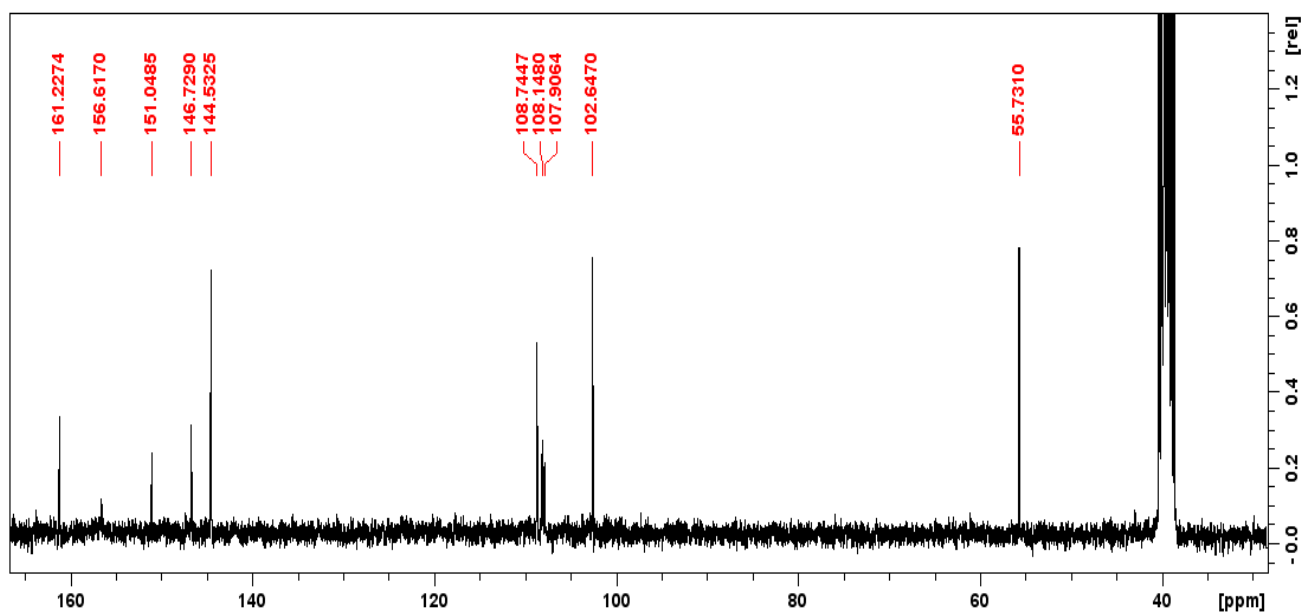
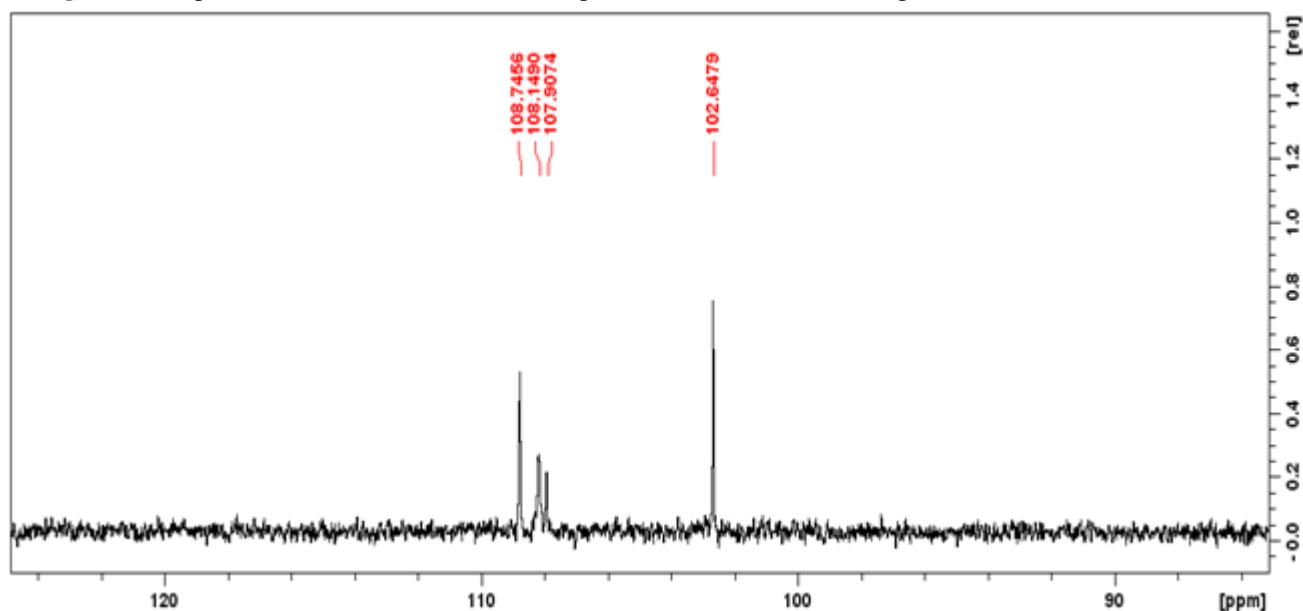


Figura 34: Expansão entre δ_{H} 108,74 a 107,90 do espectro de RMN de ^{13}C da escopoletina em $\text{DMSO-}d_6$ (75 MHz).



Analisando a estrutura através das correlações presentes no experimento COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$), (figura 35 e na expansão entre δ_{H} 7,80 a 5,99 figura 36). Foi observado que os hidrogênios (H-3 e H-4) com uma constante de acoplamento de $J= 9,30$ Hz, confirmando a presença de uma ligação dupla cis. Além disso o hidrogênio (H-5) se correlaciona com os hidrogênios da metoxila.

Figura 35: Mapa de correlação bidimensional COSY do espectro de RMN ^1H da escopoletina em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).

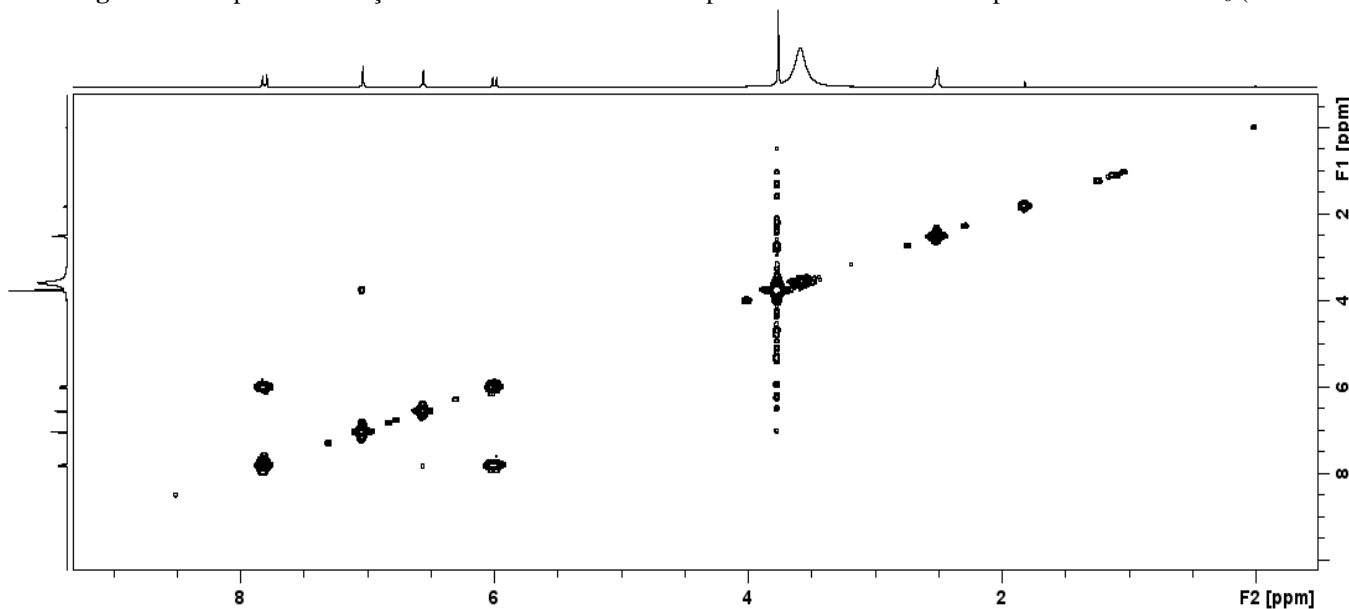
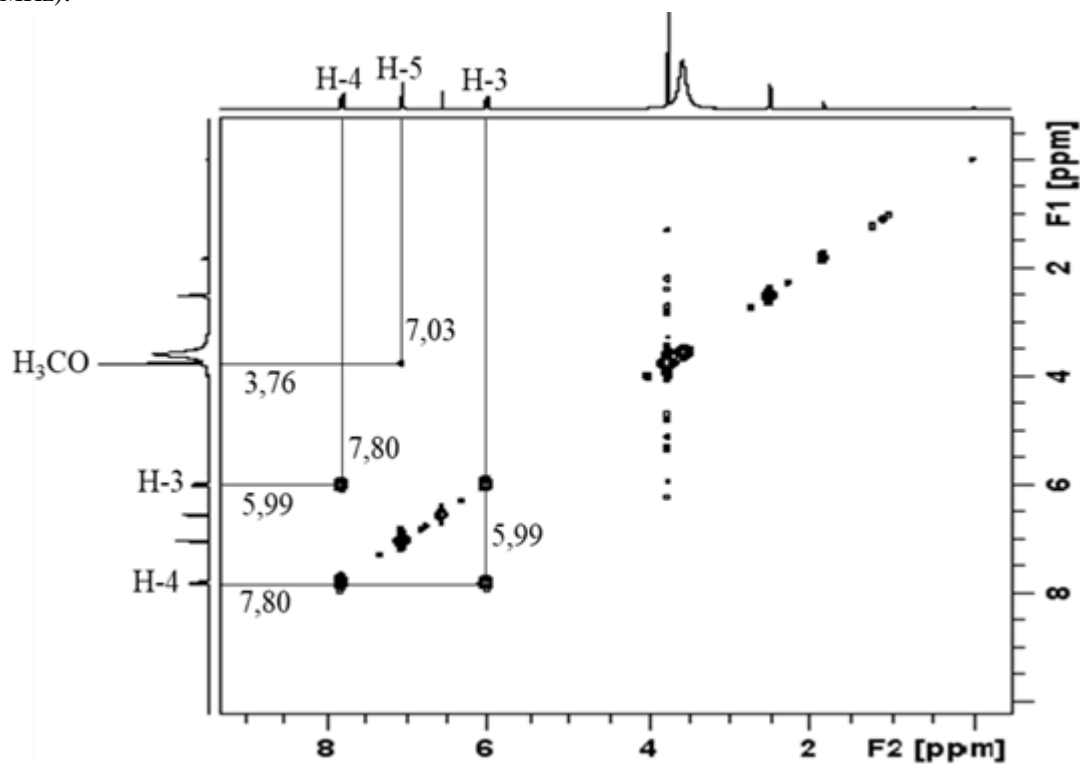


Figura 36: Expansão das correlações COSY entre δ_{H} 7,80 a 5,99 do espectro de RMN de ^1H da escopoletina em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).



No experimento HMBC (Figura 37 e nas expansões das figuras 38-41) observou-se que o sinal em δ_{C} 144,53 (C-4) se correlaciona com o sinal do hidrogênio localizado em δ_{H} 7,03 (s, H-5), que também se correlacionava com o carbono oxigenado quaternário em δ_{C} 156,61 (C-7). Outras correlações presentes nesse experimento são entre carbonos quaternários oxigenados em δ_{C} 146,73

(C-6) e hidrogênios aromáticos localizados a δ_H 6,55 (*s*, H-8) e 7,80 (*d*, $J=9,3$ Hz, H-4), e entre o carbono quaternário ligado a δ_C 107,90 (C-4a) e os hidrogênios localizados a δ_H 6,55 (*s*, H-8) e δ_H 5,99 (*d*, $J=9,3$ Hz, H-3). Além disso, a correlação entre o carbono oxigenado quaternário em δ_C 146,73 (C-6) e o hidrogênio da metila em δ_C 3,76 (H₃CO-) estabelecendo sua posição no carbono C-6.

Figura 37: Mapa de correlação bidimensional HMBC do espectro de RMN de ¹H e de ¹³C da escopoletina em DMSO-*d*₆ (300 MHz e 75 MHz).

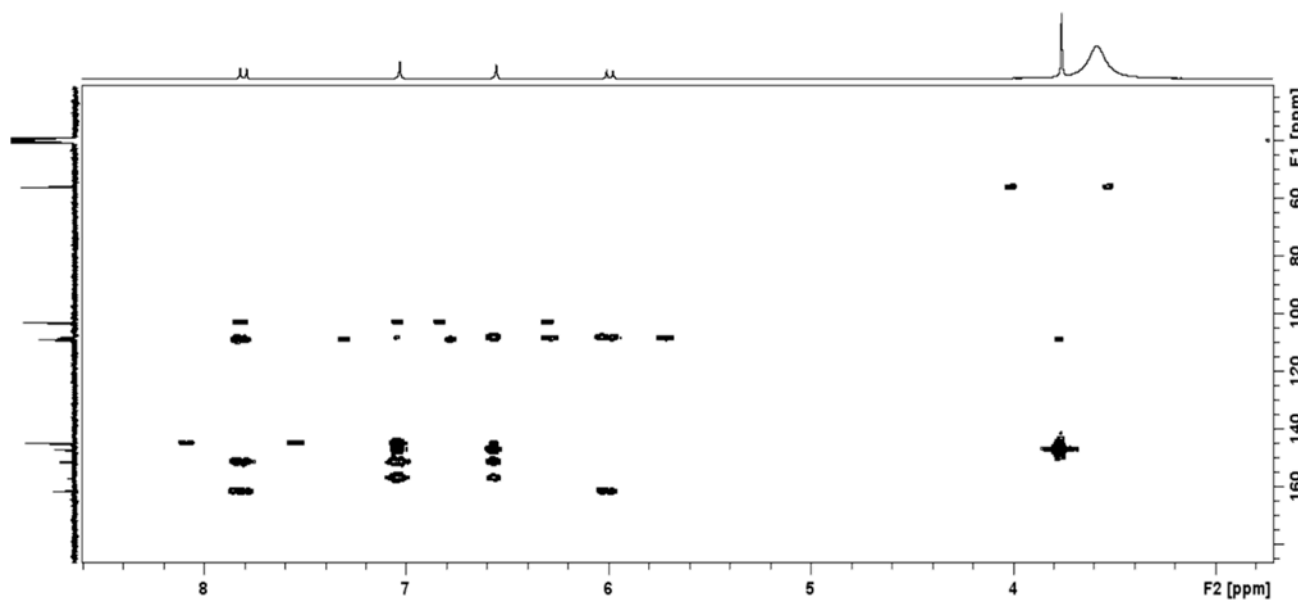


Figura 38: Expansão das correlações bidimensionais HMBC do H-4 com C-5, C-8a, C-2 do espectro de RMN de ¹H e de ¹³C em DMSO-*d*₆ (300 MHz e 75 MHz).

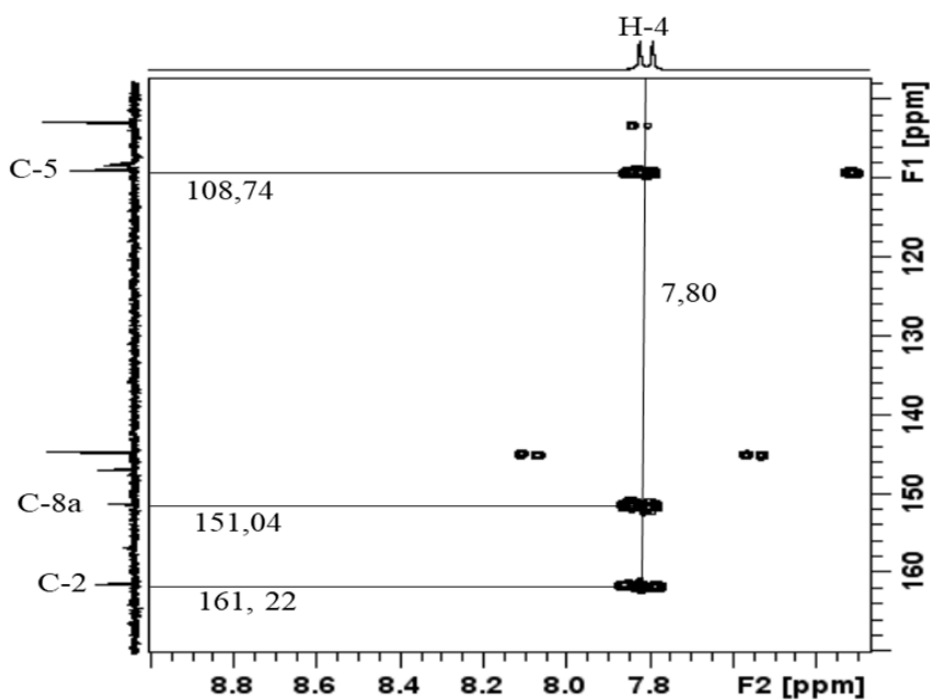


Figura 39: Expansão das correlações bidimensionais HMBC do H-5 com C-8, C-4, C-6, C-8a, C-7 do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz e 75 MHz).

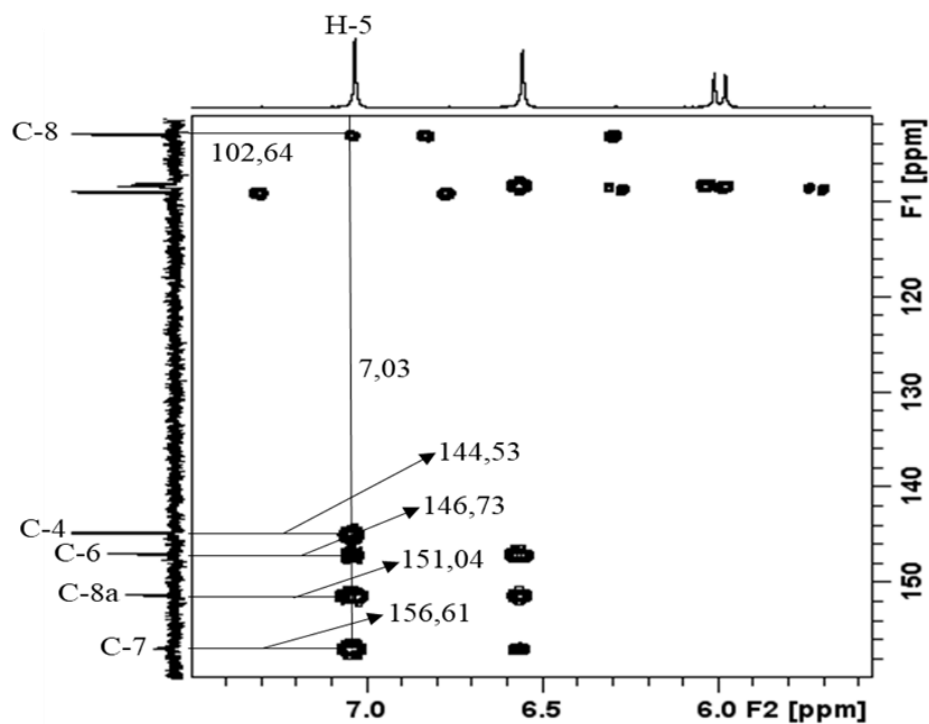


Figura 40: Expansão das correlações bidimensionais HMBC do H-8 com C-4a, C-6, C-8a, C-7 do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz e 75 MHz).

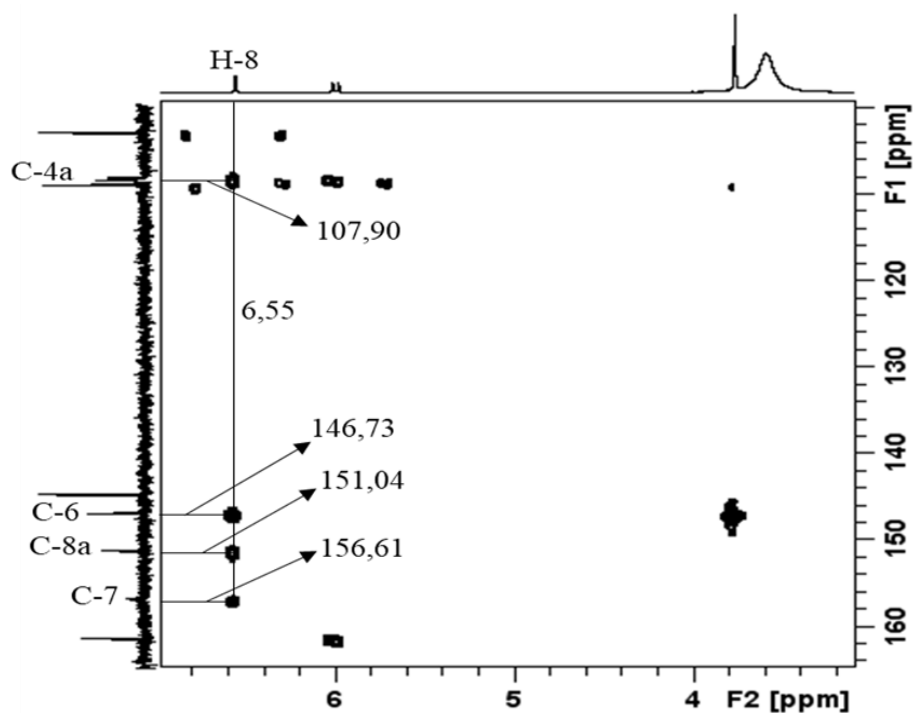
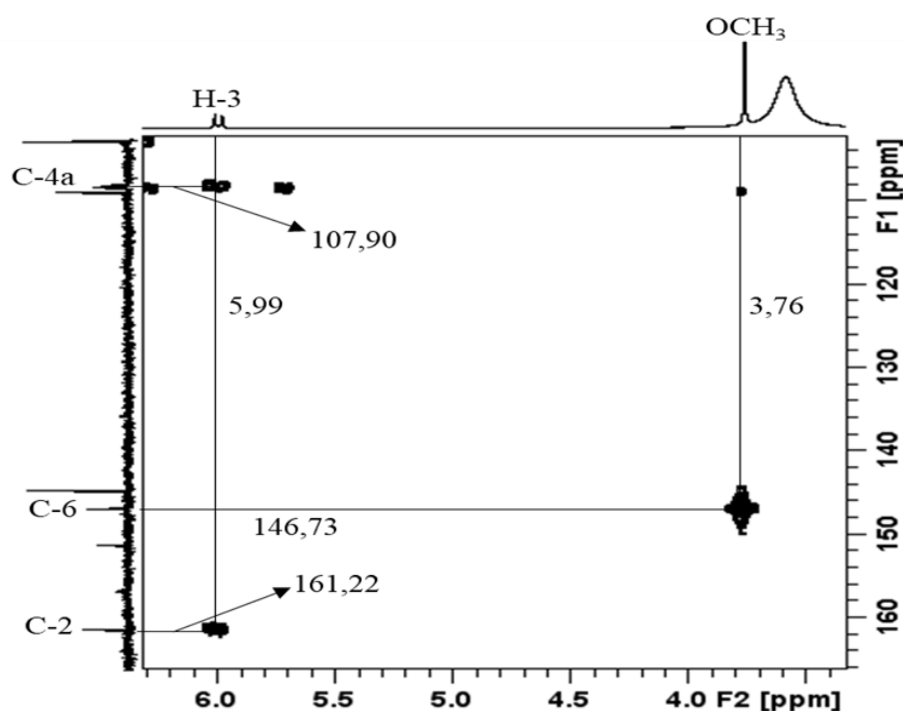


Figura 41: Expansão das correlações bidimensionais HMBC do H-3 com C-4a, C-2 e MeO com C-6 do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz e 75 MHz).



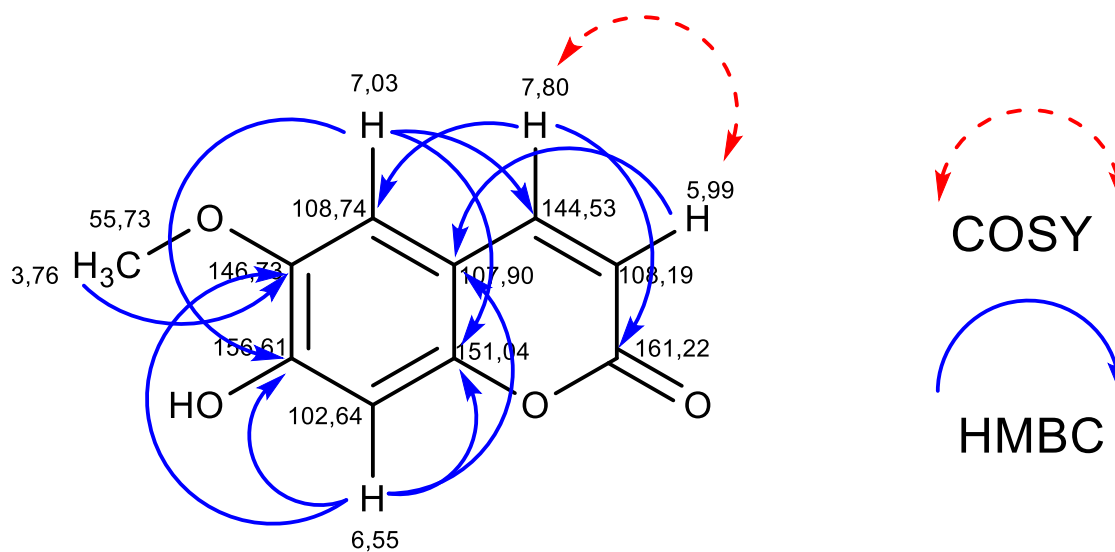
Todas as informações obtidas dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, além do que foi observado no espectro de massas, foi possível estabelecer através da fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$ que a substância possui uma deficiência de 7 hidrogênios, (COSTA 1999; BAYOUMI et al., 2010), permitindo determinar a substância 3 como escopoletina (figura 42). Para a espécie *Palicourea nitidella* este é o segundo relato de uma cumarina. Na atualidade se tem mais de 1.300 cumarinas identificadas de fontes naturais, principalmente de plantas verdes. As suas características farmacológicas, bioquímicas e aproveitamentos terapêuticos de cumarinas simples dependem de seus padrões de substituição (HOULT; PAYÁ 1996).

A escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicumarina) é uma cumarina fenólica isolada de várias partes das plantas (raízes, frutos, folhas, caules), apresentam propriedades medicinais. E suas aplicações farmacológicas foram observadas através de investigações, do qual resultaram em atividades biológicas específicas e possíveis implicações para a saúde humana em alimentos e medicamentos, como: atividades *in-vivo*, antitireoidiana, anti-hipertensiva, antiproliferativa, anti-inflamatória, neurológica, antidopaminérgica e antiadrenérgica, antidiabética e antihiperuricêmica. Segundo estudos *in-vitro*, a escopoletina possui atividades incluindo anti-hepatotoxicidade, antibacteriana, antifúngica, antitubercular e antioxidante (JOSHI et al., 2021).

Tabela 11: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da escopoletina em $\text{DMSO-}d_6$, comparação com a literatura (^aCOSTA 1999; ^bBAYOUMI et al., 2010)

| Posição | Observado | | ^a Literatura | | ^b Literatura | |
|---------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | δ ^1H | δ ^{13}C | δ ^1H | δ ^{13}C | δ ^1H | δ ^{13}C |
| MeO | 3,76 (3H, s) | 55,73 | 3,88 (3H, s) | 56,60 | 3,89 (3H, s) | 56,10 |
| 2 | - | 161,22 | - | 161,21 | - | 160,90 |
| 3 | 5,99 (1H, d, $J=9,30$ Hz) | 108,19 | 6,16 (1H, d, $J=9,7$ Hz) | 111,93 | 6,17 (1H, d, $J=8,0$ Hz) | 112,60 |
| 4 | 7,80 (1H, d, $J=9,30$ Hz) | 144,53 | 7,83 (1H, d, $J=9,6$ Hz) | 145,82 | 7,83 (1H, d, $J=8,0$ Hz) | 144,20 |
| 4a | - | 107,90 | - | 109,79 | - | 111,50 |
| 5 | 7,03 (1H, s) | 108,74 | 7,18 (1H, s) | 113,18 | 7,18 (1H, s) | 109,40 |
| 6 | - | 146,73 | - | 144,58 | - | 145,50 |
| 7 | - | 156,61 | - | 151,37 | - | 150,50 |
| 8 | 6,55 (1H, s) | 102,64 | 6,78 (1H, s) | 103,58 | 6,79 (1H, s) | 103,20 |
| 8a | - | 151,04 | - | 150,96 | - | 151,40 |

Figura 42: Correlações verificadas nos espectros bidimensionais da escopoletina



5.7 Atividade antibacteriana por microdiluição

Das dez bactérias avaliadas na concentração de 1000 µg/mL nenhuma demonstrou sensibilidade frente aos extratos metanólicos de ramos e folhas. Porém frente aos extratos hexânicos foram observados que seis bactérias apresentaram sensibilidade na concentração de 1000 µg/mL, destacando o extrato oriundo dos ramos, que inibiu acima de 50% o crescimento das cepas: *A. hydrophila*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *S. enteritidis*, *S. aureus*. O extrato hexânico das folhas inibiu somente o crescimento de duas cepas sendo elas: *P. fluorescens*, *S. aureus* ambas as inibições apresentaram valores acima de 50% conforme descrito na tabela 12.

Tabela 12: Porcentagens de inibição dos extratos frente as bactérias testadas

| Extratos | Concentrações (µg/mL) | Porcentagens de inibição (%) | | | | | | | | | |
|----------|--------------------------|------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | | AH | CF | EC | ET | KP | PA | PF | SE | SM | SA |
| Fol-Hex | 1000 | * | * | * | * | * | * | 54 | * | * | 60 |
| Ram- Hex | 1000 | 84 | 33 | * | * | * | 67 | 85 | 73 | * | 58 |
| Fol-MeOH | 1000 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| Ram-MeOH | 1000 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |

Legenda: (*) amostras que não apresentaram atividade, com valores de inibição menores que 20%. AH (*Aeromonas hydrophila*), CF (*Citrobacter freundii*), EC (*Escherichia coli*), ET (*Edwardsiella tarda*), KP (*Klebsiella pneumoniae*), PA (*Pseudomonas aeruginosa*), PF (*Pseudomonas fluorescens*), SA (*Staphylococcus aureus*), SE (*Salmonella enterica*), SM (*Serratia marcescens*); Ram: ramos, Fol: folhas; Hex: hexano; MeOH: metanol.

As substâncias isoladas das folhas de *Palicourea nitidella*, o estigmasterol e β-sitosterol, são citadas na literatura por apresentarem atividades antimicrobianas frente as cepas bacterianas (tabela 12) (CARDENAS et al., 2016; LOZANO et al., 2020). Essas duas substâncias, podem ser responsáveis pela atividade, bem como estarem agindo em união com outras, uma vez isoladas, são capazes de aumentar, diminuir ou perder sua atividade (PERRUCHON 2002; SIMÕES et al., 2017). Outros autores comparam a atividade antimicrobiana dos extratos brutos hexânicos com a presença de terpenos em sua constituição química (WENIGER et al., 2005; SUBRAMANIAM 2014).

5.8 Ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina*

No teste frente *Artemia salina* não foi verificada nenhuma toxicidade dos extratos avaliados, ou seja, nenhum dos extratos apresentou mortalidade acima de 50% nas concentrações avaliadas [1000 e 500 µg/mL]. Não foi observada a mortalidade de nenhum indivíduo, conforme apresentado na tabela 13. O bioensaio que apresenta 100% de mortalidade de *A. salina* significa elevada toxicidade e de 0% sem toxicidade. Uma baixa toxicidade pode ser considerada uma característica interessante para utilização de extratos vegetais com propriedades alelopáticas em ambientes naturais para controle de plantas daninhas (DE LIMA et al., 2011), uma vez que pode haver seletividade sobre o alvo biológico. Porém, outros estudos sobre espécies específicas são necessários.

Tabela 13: Análise da concentração letal frente *A. salina* dos extratos hexânicos e metanólicos

| Extratos | Concentração avaliada (µg/mL) | Mortalidade (%) |
|-----------|-------------------------------|-----------------|
| Fol- Hex | [1000 e 500] | 0 |
| Fol- MeOH | [1000 e 500] | 0 |
| Ram- Hex | [1000 e 500] | 0 |
| Ram- MeOH | [1000 e 500] | 0 |

Legenda: Ram= ramos; Fol= folhas; Hex= hexano; MeOH= metanol

5.9 Atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante os extratos metanólicos (0,5 mg/mL) foram avaliados frente a duas metodologias sendo elas: DPPH• e Fe³⁺/fenantrolina. Os valores são apresentados em termos de equivalência com ácido ascórbico onde, mais próximo de 1, mais ativo é o extrato (MARTINS et al., 2014). Na tabela 14 é possível verificar que os valores de equivalência são maiores que 10 demonstrando a inatividade dos extratos avaliados e na tabela 15 a interpretação dos resultados antioxidantes.

Tabela 14: valores de equivalência dos extratos metanólicos frente a atividade antioxidante

| Extratos Metanólicos | Método usando DPPH• | | | Método usando Fe ³⁺ | | |
|-------------------------|-----------------------------|--------------------|--|--------------------------------|--------------------|--|
| | Δ ABS ₅₁₇ | [AA] _{eq} | Equiv. (mg extrato/mg ácido ascórbico) | [Fe ²⁺] | [AA] _{eq} | Equiv. (mg extrato/mg ácido ascórbico) |
| Ramos | 0,002 | 0,202 | 24,869 | 0,184 | 0,478 | 11,27 |
| Folhas | 0,002 | 0,199 | 25,159 | 0,109 | 0,347 | 14,42 |

Tabela 15: Interpretação dos resultados da atividade antioxidante

| Análise da atividade antioxidante (mg de extrato/ mg de ácido ascórbico) | Escala de comparação |
|---|----------------------|
| Menor que 1,0 | Muito ativo |
| Entre 1,1 e 2,0 | Ativo |
| Entre 2,1 e 3,0 | Atividade moderada |
| Maior que 3,1 | Inativo |

Martins et al., 2014

No extrato metanólico dos ramos de *P. nitidella*, foi observado a presença de metabólitos secundários com anel aromático, ao ser analisado por CCDC e RMN de ¹H, indicou a existência de substâncias aromáticas, as quais geralmente apresentam atividade antioxidante (SILVA et al., 2010). O que se observa pelos resultados obtidos é que as substâncias aromáticas presentes não são substâncias fenólicas. O que determina se a substância apresenta alta ou baixa atividade antioxidante é o número de hidroxilas redutoras ligadas ao anel aromático (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

A cumarina escopoletina isolada contém apenas uma hidroxila ligada ao anel aromático, e essa classe química possui potencial redutor frente ao radical DPPH• (CHIN-YING et al., 2003; PANDA & KAR, 2006; ADAM et al., 2009; JEONG et al., 2011; MALIK et al., 2011; MOGANA et al., 2013; FIRMANSYAH et al., 2021; JOSHI et al., 2021), sendo que, a hidroxila sozinha não garante a atividade antioxidante no extrato. Além disso, as outras substâncias presentes podem ser apenas aromáticas sem conter hidroxilas ligadas aos anéis ou estas não estão livres, isto é, devem estar ligadas a metilas formando metoxilas.

6 CONCLUSÃO

Foi abordado nesta pesquisa o estudo químico e avaliação biológica dos extratos de *P. nitidella* do qual foi possível:

- Isolar e identificar a mistura dos triterpenos: β -sitosterol e estigmasterol do extrato hexânico das folhas.
- Isolamento de uma cumarina escopoletina do extrato metanólico dos ramos.
- Os extratos não apresentaram toxicidade frente a *A. salina*.
- Os extratos hexânicos das folhas e ramos apresentaram atividades antimicrobiana para seis bactérias gram-negativas e uma gram-positiva.
- Os extratos metanólicos não apresentaram atividades antioxidante frente os métodos DPPH• e Fe^{3+} /fenantrolina.

Os resultados alcançados neste trabalho sobre a *P. nitidella* reforçam a potencialidade dessa espécie vegetal e estimulam a realização de novas pesquisas para verificar outras atividades biológicas de seus extratos e o isolamento de outras substâncias dos extratos metanólicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUL-ENEIN, A. Y.; BERCZYNSKI, P.; KRUK, I. Phenolic Compounds: the Role of Redox Regulation in Neurodegenerative Disease and Cancer. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v.13, 385-398, 2013.
- AMARANTE, C. B.; MULLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amazonia*, vol. 41(3), 431-434, 2011.
- AMES, B. N.; GOLD, L. S.; WILET, W. C. The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* v. 92, n. 12, p. 5258-5265, 1995.
- AQUINO, R.; DE TOMMASI, N.; TAPIA, M.; LAURO, M.R.; RASTRELLI, L. New 3-methoxyflavones, an iridoid lactone and a flavonol from *Duroia hirsuta*. *J. Nat. Prod.* 62, 560–562, 1999.
- ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*, 69, 841–856, 2008.
- AWAD, A.; VON HOLTZ, R. L.; CONE, J. P.; FINK, C. S. & CHEN, Y. Beta-sitosterol inhibits the growth of HT-29 human colon câncer cells by activating the sphingomyelin cycle. *Anticancer Res.* 18 (1A): 471-473, 1998.
- BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*, v. 90, n. 4, p. 727-733, 2005.
- BARROS, M.P.D.; SANTIN, S.M.D.O.; COSTA, W.F.D.; VIDOTTI, G.J.; SARRAGIOTTO, M.H.; SOUZA, M.C.D.; BERSANI-AMADO, C.A. Chemical constituents and anti-inflammatory and antioxidant activities evaluation of the leaves extracts of *Chomelia obtusa* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae). *Quim. Nova*, 31, 1987–1989, 2008.
- BAYOUMI, S.; ROWAN, M.; BEECHING, J.; BLAGBROUGH, I. Constituents and secondary metabolite natural products in fresh and deteriorated cassava roots. *Phytochemistry*, 71: 598-604, 2010.
- BEGUM, B.; HASAN, C.M.; RASHID, M.A. Caffeine from the Mature Leaves of *Coffea bengalensis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 1219–1220, 2003.
- BERG, J.M.T.; LUBERT, J. *Bioquímica*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 545pp, 2008.
- BERGER, A.; FASSHUBER, H.; SCHINNERL, J.; BRECKER, L.; GREGER, H. Various types of tryptamine-iridoid alkaloids from *Palicourea acuminata* (*Psychotria acuminata*, Rubiaceae). *Phytochem. Lett.* 5, 558–562, 2012.
- BERGES, R. R.; WINDERLER, J.; TRAMPISCH, H. J.; SENGE, T.; AEIKENS, B.; ALBRECHT, J.; BECKER, C.; BRUNDIG, P. DREYER, D.; KALDEWEY, W.; LATKA, H.; REEK, A.;

- SCHNEIDER, H. J.; SCHOETER, P. & SCHUMACHER, C. Randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia. *Lancet (North American Edition)* 345 (8964): 1529-1532, 1995.
- BERNHARD, M.; FASSHUBER, H.; ROBIEN, W.; BRECKER, L.; GREGER, H. Dopamine-iridoid alkaloids in *Carapichea affinis* (*Psychotria borucana*) confirm close relationship to the vomiting root Ipecac. *Biochem. Syst. Ecol.* 39, 232–235, 2011.
- BOLZANI, Vanderlan da S.. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. *Cien. Culto.*, São Paulo, v. 68, n. 1, pág. 04-05, 2016.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. *Labensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, p. 25, 1995.
- BREMER, B., & ERIKSSON, T. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. *International Journal of Plant Sciences*, 170(6), 766-793, 2009.
- BUTLER, M. B. Natural products - The future scaffolds for novel antibiotics? In: *Biochemical Pharmacology*, p. 919-929, 2005.
- CARDENAS, A. V. C.; HERNÁNDEZ, L. R.; JUÁREZ, Z. N.; SÁNCHEZ-ARREOLA, E.; BACH, H. Antimicrobial, cytotoxic, and anti-inflammatory activities of *Pleopeltis polylepis*. *Journal of ethnopharmacology*. 194: 981-986, 2016.
- CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELENDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, v. 23, n. 1, p. 20-22, 2000.
- CHARLES, D. J. Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Others Sources. Iowa. Springer. p. 3-6, 2013.
- CHIN-YING, S.; CHEN-HUI, C.; CHIH-CHIEH, H.; CHIEN-CHIH, C and TSAI, Y. C.: Antioxidant properties of scopoletin isolated from *Sinomonium acutum*. *Phytotherapy Research: PTR*; 17: 823-25, 2003.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard M07-A8—Ninth Edition, 2012.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, p. 962, 2006.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S., Introdução a Métodos Cromatográficos, 4ª ed. revisada e ampl., Ed. da Unicamp, Campinas, 1990.
- COSTA, KÁTIA MARIA GUIMARÃES. Estudo Fitoquímico de *Palicourea nitidella* (Müll.Arg.) Standl. (Rubiaceae). Dissertação de Mestrado – Manaus – AM, 1999.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; LIMA, E. O. In vitro antistaphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant

Staphylococcus aureus: MRSA strains. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18:670-675. 2008.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

DE LIMA, C. P., CUNICO, M. M., TREVISAN, R. R., PHILIPPSSEN, A. F., MIGUEL, O. G., & MIGUEL, M. D. Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* leach dos extratos do fruto de *euterpe edulis martius*. *Acta Botanica Brasilica*, 25(2), 331–336, 2011.

DE OLIVEIRA, P.R.N.; TESTA, G.; DE SENA, S.B.; DA COSTA, W.F.; HELENA, M.; DE SOUZA, M.C. Saponinas triterpênicas das raízes de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Quim. Nova*, 31, 755–758, 2008.

DEWICK, P. M., *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. Chichester; 2ª ed. John Wiley & Sons, Ltda, 2002.

DÍAZ, J.G.; SAZATORNIL, J.G.; RODRÍGUEZ, M.L.; MESÍA, L.R.; ARANA, G.V. Five New Alkaloids from the Leaves of *Remijia peruviana*. *J. Nat. Prod.* 67, 1667–1671, 2004.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 411:843- 847, 2001.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J. dos; GENOVESE, M. I.; & LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(2), 446–452, 2006.

DÜSMAN, L.T.; MARINHO JORGE, T.C.; SOUZA, M.C.D.; EBERLIN, M.N.; MEURER, E.C.; BOCCA, C.C.; BASSO, E.A.; SARRAGIOTTO, M.H. Monoterpene Indole Alkaloids from *Palicourea crocea*. *J. Nat. Prod.* 67, 1886–1888, 2004.

EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry*, v. 84, n.1 p. 23 - 28, 2004.

ENDALE, M.; EKBERG, A.; ALAO, J.P.; AKALA, H.M.; NDAKALA, A.; SUNNERHAGEN, P.; ERDÉLYI, M.; YENESEW, A. Anthraquinones of the Roots of *Pentas micrantha*. *Molecules*, 18, 311–321, 2012.

FAIZI, S.; SIDDIQUI, B. S.; SALEEM, R.; AFTAB, K.; SHAHEEN, F. & GILANE, A. Hypotensive constituents from the pods of *Moringa oleífera*. *Planta Med.* 64 (3): 225-228, 1998.

FIRMANSYAH, A.; WININGSIH, W.; MANOBI, J.D.Y. Review of scopoletin: Isolation, analysis process and pharmacological activity. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 11: 12006–12019, 2021.

FRANÇA, S. C. *Bioprocessos inovadores para a produção de metabólitos ativos de plantas*. Em: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.M.; Mentz J. C. P.; Petrovick L. A.; Ros P. (Eds.). *Farmacognosia: do produto ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed. 39-52pp, 2017.

- FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. D. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(4): 627-641, 2008.
- GANGOPADHYAY, N.; RAI, D. K.; BRUNTON, N. P.; GALLAGHER, E.; HOSSAIN, M. B. Antioxidant-guided isolation and mass spectrometric identification of the major polyphenols in barley (*Hordeum vulgare*) grain. *Food Chemistry*, 210, p. 212, 2016.
- GARCIA, R.M.A.; OLIVEIRA, L.O.; MOREIRA, M.A.; BARROS, W.S. Variation in emetine and cephaeline contents in roots of wild Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 233–243, 2005.
- HEMWIMON, S.; PAVASANT, P.; SHOTIPRUK, A. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Sep. Purif. Technol.* 54, 44–50, 2007.
- HOSSAIN, C.F.; JACOB, M.R.; CLARK, A.M.; WALKER, L.A.; NAGLE, D.G. Genipatriol, a new cycloartane triterpene from *Genipa spruceana*. *J. Nat. Prod.* 66, 398–400, 2003.
- HOULT, J.R.S.; PAYÁ, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. *General Pharmacology*, v. 27, n.4, p. 713-722, 1996.
- JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of herbmed pharmacology*. 7(1):1-3, 2018.
- JEFFREYS MF, NUNEZ CV. Triterpenos das folhas de *Piranhea trifoliata* (Picrodendraceae). *Acta Amaz.* 46 (2): 189-194. ISSN 1809-4392, 2016.
- JONES, P. J. H.; MACDOUGALL, D. E.; NTANIOS, F. & VANSTONE, C. A. Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agentes in human. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 75 (3): 217-227, 1997.
- JOSHI, H.; GAJERA, V and KATARIYA, A.: Review on scopoletin: a phenolic coumarin with its medicinal properties. *Int. J. Pharm Sci & Res*; 12(7): 3567-80, 2021.
- KAINULAINEN, K., RAZAFIMANDIMBISON, S. G., & BREMER, B. Phylogenetic relationships and new tribal delimitations in subfamily Ixoroideae (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 173(3), 387-406, 2013.
- KANESHIMA, T.; MYODA, T.; NAKATA, M.; FUJIORI, T.; TOEDA, K.; NISHIZAWA, M. Antioxidant activity of C-glycosidic ellagitannins from the seeds and peel of camu-camu (*Myrciaria dubla*). *Food Science and Technology*, 69, p. 76, 2016.
- KANG, S. K.; CHUNG, D. O. & CHUNG, H. J. Purification and identification of antimicrobial substances in phenolic fraction of fig leaves. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 38 (4): 293-296, 1995.

- KANWAR, A. S. Brine shrimp (*Artemia salina*) – a marine animal for sample and rapid biological assays. *Journal of Chinese Clinical Medicine*, v. 2, n. 4, p. 236-240, 2007.
- KESSLER, A. The information landscape of plant constitutive and induced secondary metabolite production. *Current Opinion in Insect Science*. 8: 47-53, 2015.
- KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WM, SCHRECKENBERGER PC, WINN WC. Diagnóstico Microbiológico. Guanabara Koogan RJ. 5° ed. 142, 552, 553, 559, 590, 598, 608, 609, 1997.
- LIBRALATO, G.; PRATO, E.; MIGLIORE, L; CICERO, A. M.; MANFRA, L. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological Indicators*, v, 69, p. 35-49, 2016.
- LINZITTO, O. R., & TUNES, M. del L. Revision sobre bacterias gram negativas de importancia clinica. *Revista de Enfermedades Infecciosas Emergentes (REIE)*, 14, 28–31, 2019.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. eds. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum, p. 60-63, 2002.
- LOZANO, S. A.; BRILHANTE DE SOUSA, A. B.; SOUZA, JULIO CEZAR de; SILVA, D. R.; SALAZAR, M. G. M.; HALICKI, P. C. B.; CORRÊA, G. M.; SILVA, P. A; NUNEZ, C. V. Duroia saccifera: germinação in vitro, calos friáveis e identificação de β -sitosterol e estigmasterol do extrato ativo contra *Mycobacterium tuberculosis*. *Rodriguesia*, v. 71, 2020.
- LUEPKE, K. H.; SUDA, K. J.; BOUCHER, H.; RUSSO, R. L.; BONNEY, M. W.; HUNT, T. D.; MOHR, I. J. F. PAST, present, and future of antibacterial economics: increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 37(1):71-84, 2017.
- LUNA, J. S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal thnopharmacology*, v. 97 n. 2, p. 199-206, 2005.
- MACHADO, R. A.; BALDWIN, I. T.; Erb, M. Herbivory-induced jasmonates constrain plant sugar accumulation and growth by antagonizing gibberellin signaling and not by promoting secondary metabolite production. *New Phytologist*. 215(2): 803-812, 2017.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. E. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím. Nova*, 23, p. 429, 2002.
- MAEHARA, S.; SIMANJUNTAK, P.; KITAMURA, C.; OHASHI, K.; SHIBUYA, H. Bioproduction of Cinchona Alkaloids by the Endophytic Fungus *Diaporthe* sp. Associated with *Cinchona ledgeriana*. *Chem. Pharm. Bull.* 60, 1301–1304, 2012.
- MAEHARA, S.; SIMANJUNTAK, P.; MAETANI, Y.; KITAMURA, C.; OHASHI, K.; SHIBUYA, H. Ability of endophytic filamentous fungi associated with *Cinchona ledgeriana* to produce Cinchona alkaloids. *J. Nat. Med.* 67, 421–423, 2013.

- MALIK, A.; KUSHNOOR, A.; SAINI, V.; SINGHAL, S.; KUMAR, S and YADAV, Y. C.: *In-vitro* antioxidant properties of Scopoletin. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3: 659-665, 2011.
- MARTINS D, NUNEZ CV. Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. *Molecules*, 20:13422-13495, 2015.
- MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. —Bench-top bioassays for the Discovery of bioactive natural products: an update, p. 383-409. In: Rahman, A. (Org.). *Studies in Natural Product Chemistry*, 9th ed., Elsevier, Amsterdam, 1991.
- MENG, D.; ZHANG, P.; ZHANG, L.; WANG, H.; HO, C. T.; LI, S.; SHAHIDI, F. ZHAO, H. Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays. *Journal of Functional Foods*, v. 37, p. 467-479, 2017.
- MEYER, B.N.; FERRINGI, N. R.; PUTMAM, J. B.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J. L.; Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medical*, v. 45, p. 31-34, 1982.
- MEYRE-SILVA, C.; MORE, T. C.; BIAVATTI, M. W.; SANTOS, A. R.; DAL-MAGRO, J.; YUNES, R. A. & CECHINEL-FILHO. V. Preliminary phytochemical and Pharmacological studies of *Aleurites moluccana* leaves. *Phytomedicine*. 5 (2): 109-113, 1998.
- MILHEM, M. M.; AL-HIYASAT, A. S.; DARMANI, H. Toxicity Testing of Restorative Dental Materials Using Brine Shrimp Larvae (*Artemia salina*). *Journal of Applied Oral Science*, v. 16, n. 4, p. 297-301, 2008.
- MITOVA, M.; HANDJIEVA, N.; SPASSOV, S.; POPOV, S. Macedonine, a non-glycosidic iridoid from *Galium macedonicum*. *Phytochemistry*, 42, 1227–1229, 1996.
- MOGANA, R.; TENG-JIN, K and WIART, C.: Anti-Inflammatory, Anticholinesterase, and antioxidant potential of scopoletin isolated from *Canarium patentinervium* Miq. (Burseraceae Kunth). *Evid Based Complement Alternat Med*, 734824: 1-7, 2013.
- MOHANAN, P. V. & DEVI, K. S. Toxicological evaluation of sobatum. *Cancer Lett.* 127 (1,2): 135-140, 1998.
- MOULY, A., KAINULAINEN, K., PERSSON, C., DAVIS, A. P., WONG, K. M., RAZAFIMANDIMBISON, S. G., & BREMER, B. Phylogenetic structure and clade circumscriptions in the Gardenieae complex (Rubiaceae). *Taxon*, 63(4), 801–818, 2014.
- MURTHY, H. N.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118(1): 1-16, 2014.
- NARAYANI, M.; SRIVASTAVA, S. Elicitation: a stimulation of stress in *in vitro* plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochemistry reviews*, 16(6): 1227-1252, 2017.

- NARINE, L.L.; MAXWELL, A.R. Monoterpenoid indole alkaloids from *Palicourea crocea*. *Phytochem. Lett.* 2, 34–36, 2009.
- NASCIMENTO, C.A.; GOMES, M.S.; LIAO, L.M.; DE OLIVEIRA, C.; KATO, L.; DA SILVA, C.C.; TANAKA, C. Alkaloids from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. *Z. Naturforsch. B.*, 61, 1443–1446, 2006.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of natural products*, v. 66, n. 7, p. 1022–37, jul. 2003.
- NOGUEIRA VA, et al. Intoxicação por monofluoroacetato em animais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31 (10): 823-838, 2011.
- NOVAIS, J. A. P. Desenvolvimento e validação de método para quantificação da capacidade redutora de extratos vegetais secos. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2007.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Nota descritiva: Resistencia a los antibióticos, 2016.
- OSAWA, K.; YASUDA, H.; MORITA, H.; TAKEYA, K. & ITOKAWA, H. Antibacterial and anthelmolytic activity of triterpenes and β -sitosterol isolated from Chinese Quince (*Chaenomeles sinensis*). *Nat. Med. (Tokyo)*. 51 (4): 365-367, 1997.
- Palicourea* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14133>>. Acesso em: 17 set, 2020.
- PANDA, S and KAR, A.: Evaluation of the antithyroid, antioxidative and antihyperglycemic activity of scopoletin from *Aegle marmelos* leaves in hyperthyroid rats. *Phytother Res*; 20: 1103-105, 2006.
- PARRA, A. L; YHEBRA, R. S; SARDIÑAS, I.G; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine.*, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.
- PASCUAL-TERESA, S.; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. Anthocynins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews*, v. 7, n. 2, p. 281-299, 2008.
- PEDROZA L.S., SALAZAR M.G.M., OSORIO M.I.C., FACHIN-ESPINAR M.T., PAULA R.C., NASCIMENTO M.F.A., OLIVEIRA A.B., NUNEZ C.V. Estudo químico e avaliação da atividade antimalárica dos galhos de *Piranhea trifoliata*. *Revista Fitos*, 14(4): 476-491. 2020. DOI 10.32712/2446-4775.2020.905.
- PEIRANO G, SOUZA F.D.S. RODRIGUES, D.D.P. Frequency of serovars and antimicrobial resistance in *Shigella spp.* from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(3): 245-250, 2006.

- PERASSOLO, M.; QUEVEDO, C.; BUSTO, V.; IANONE, F.; GIULIETTI, A.M.; TALOU, J.R. Enhance of anthraquinone production by effect of proline and aminoindan-2-phosphonic acid in *Rubia tinctorum* suspension cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 181–185, 2007.
- PEREIRA, R.; SOUZA, E. B. D.; FONTENELLE, R. O. D. S.; VASCONCELOS, M. A. D.; SANTOS, H. S. D.; TEIXEIRA, E. H. Structural diversity and biological potential of secondary metabolites of species of *Myroxylon* Lf (Fabaceae): a review of the literature. *Hoehnea*. 46(1): 1-11, 2019.
- PERES, M. T.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J. B. & YUNES, R. A. Analgesic compounds of *Croton urucurama* Baillon. *Phytother. Res.* 12 (3): 209-211, 1998.
- PÉREZ, O. P.; LAZO, F. J. Ensayo de Artemia: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*. v. 22, n.1, p. 34-43, 2010.
- PERRUCHON, S. Estudo das propriedades dos flavonóides para cosméticos através dorelacionamento função-estrutura. *Cosmetics & Toiletries*. 14(6):74, 2002.
- ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Food Science and Technology*, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.
- Rubiaceae* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB210>>. Acesso em: 17 set, 2020.
- RUIZ-MESIA, L.; RUIZ-MESÍA, W.; REINA, M.; MARTÍNEZ-DIAZ, R.; DE INÉS, C.; GUADAÑO, A.; GONZÁLEZ-COLOMA, A. Bioactive cinchona alkaloids from *Remijia peruviana*. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1921–1926, 2005.
- RYDIN, C., & KAINULAINEN, Æ. K. *Deep divergences in the coffee family and the systematic position of Acranthera*. January, 2009.
- RYDIN, C., WIKSTRÖM, N., & BREMER, B. Conflicting results from mitochondrial genomic data challenge current views of Rubiaceae phylogeny. *American Journal of Botany*, 104(10), 1522–1532, 2017.
- SAFONOVA, I. G.; SVIRIDOV, D. D.; RAMPAL, P.; NANO, Z. L.; PAV LOV, M. Y. & REPIN, V. S. Regulation of cholesterol absorption in epithelial cells of human and rat small intestine. *Biokhimiya*. 58 (2): 274-284, 1993.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science & Technology*, v.8, n. 3, p. 121137, 2002.
- SANTOS, A. R. S.; NIERO, R.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; PIZZOLATTI, M. G.; DELLE-MONACHE, F. & CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of steroid isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. *Planta Medica*. 61 (4): 329-332, 1995.

- SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto Contexto Enferm*, v. 13, p. 64-70, 2004.
- SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K. M.; LATHA, L. Y. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 8(1): 1-10, 2011.
- SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Review Oxidative Stress. *Current Biology*, v. 24, p. 453-462, 2014.
- SCHRIPSEMA, J.; RAMOS-VALDIVIA, A.; VERPOORTE, R. Robustaquinones, novel anthraquinones from an elicited *Cinchona robusta* suspension culture. *Phytochemistry*, 51, 55-60, 1999.
- SENGE, T.; WINDELER, J.; BERGES, R. R. & TRAMPISCH, H. J. Efficacy of beta-sitosterol in treatment of BPH. *Urologe Ausgabe A*. 34 (2): 130-131, 1995.
- SEONG, G.; HWANG, I.; CHUNG, S. Antioxidant capacities and polyphenolics of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*) leaves. *Food Chemistry*, 199, p. 612, 2016.
- SHAHIDI, F. (Ed.). Antinutrients and phitochemicals in food. Washington, DC.: American Chemical Society, 344 p. ACS Symposium Series, 662, 1997.
- SHAHIDI, F.; HO, C-T. (Ed.). Phenolic compounds in foods and natural health products. Washington, DC.: American Chemical Society, 320 p. ACS Symposium Series, 909, 2005.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phenolics in foods and nutraceuticals. Boca Raton: CRC Press, 576 p, 2003.
- SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of natural products*, v. 61, n. 8, p. 1053-71, ago. 1998.
- SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. *Ciência Rural*, v. 40, n.4, p. 994-1002, 2010.
- SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn, em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 17(4):572-577, 2007.
- SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, J. V.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, M. S. V. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn, over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2): 209-212, 2008.
- SILVA, T. M. S.; NASCIMENTO, R. J. B.; BATISTA, M. M.; AGRA, M. F.; CAMARA C. A. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 35-38, 2007.

- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta do medicamento, 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p.576-614, 2003.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre/RS: Editora Artmed, 168 pp, 2017.
- SOARES, P.R.O.; OLIVEIRA, P.L.; OLIVEIRA, C.M.A.; KATO, L.; GUILLO, L.A. In vitro antiproliferative effects of the indole alkaloid vallesia chotamine on human melanoma cells. Arch. Pharm. Res. 35, 565–571, 2012.
- SOUZA, M. M.; BELLA CRUZ, A. SCHUHMACHER, M. B. KREUGER, M. R. O. FREITAS, R. A.; BELLA CRUZ, R. C. M. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B; CECHINEL, V. F. Ciências Farmacêuticas; Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí - SC: Univali, p. 107–166, 2003.
- STAERK, D.; LEMMICH, E.; CHRISTENSEN, J.; KHARAZMI, A.; OLSEN, C.E.; JAROSZEWSKI, J.W. Leishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of indole alkaloids from *Corynanthe pachyceras*. Planta Med. 66, 531–536, 2000.
- SUBRAMANIAM, S.; KEERTHIRAJA, M.; SIVASSUBRAMANIAN, A. Synergistic antibacterial action of β -sitosterol-D-glucopyranoside isolated from *Demostachya bipinnata* leaves with antibiotics against common human pathogens. Revista Brasileira de Farmacognosia. 24: 44-50, 2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology. 4. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2006.
- TOKARNIA CH, et al. Intoxicação experimental por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em caprinos. Pesquisa Veterinária Brasileira; 3: 209-215, 1991.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. v. 39, p. 44–84, 2007.
- VALVERDE, J.; TAMAYO, G.; HESSE, M. β -Carboline monoterpene glucosides from *Palicourea adusta*. Phytochemistry, 52, 1485–1489, 1999.
- VERPOORTE, R.; VEN DER HEIHDEN, R.; MEMLINK, J. General Strategies In: Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 2000.
- WAGNER, H.; BLADT. S.; ZGAINSKI, E. M. Plant Drug Analysis. Alemanha: Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 320p, 1984.
- WENIGER, B.; LOBSTEIN, A.; UM, B.; VONTHORON-SÉNÉCHAU, C.; ANTON, R.; USUGA, N. J.; BARAM, H.; LUGNIER, C. Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact

with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. *Phytotherapy Research*. 19:75-77, 2005.

WINK, M. *Annual plant reviews: biochemistry of plant secondary metabolism*. John Wiley & Sons. 424pp, 2011.

YOSHIMATSU, K.; SHIMOMURA, K. Emetic alkaloid formation in root culture of *Cephaelis ipecacuanha*. *Phytochemistry*, 30, 505–507, 1991.