



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARLOS MAURÍCIO NUNES DE SOUZA DA CONCEIÇÃO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE *Metrodorea*
flavida K. KRAUSE**

BELÉM - PA
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C744e Conceição, Carlos Mauricio Nunes de Souza da.
Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antimicrobiano e
antioxidante das folhas de *Metrodorea flavida* K. Krause / Carlos
Mauricio Nunes de Souza da Conceição. — 2023.
65 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva
Coorientador(a): Prof. Dr. Wandson Braamcamp de Souza
Pinheiro

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-
Graduação em Química, Belém, 2023.

1. Biodiversidade Amazônica. 2. Folhas de *Metrodorea
flavida*. 3. Diidrochalconas inéditas. 4. Antioxidante. 5.
Antimicrobiano. I. Título.

CDD 547

CARLOS MAURÍCIO NUNES DE SOUZA DA CONCEIÇÃO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE *Metrodorea
flavida* K. KRAUSE**

Defesa de dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química, pela Universidade Federal do Pará.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Wandson Braamcamp de S. Pinheiro

Coorientador: Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos

BELÉM - PA
2023

CARLOS MAURÍCIO NUNES DE SOUZA DA CONCEIÇÃO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE *Metrodorea
flavida* K. KRAUSE**

Defesa de dissertação de mestrado submetida ao Programa de pós-Graduação em Química como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química, pela Universidade Federal do Pará.

Área de concentração: Química Orgânica

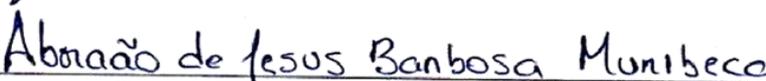
Orientador: Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Wandson Braamcamp de S. Pinheiro
Coorientador: Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos

Data da avaliação: 29/ 09/ 2023.

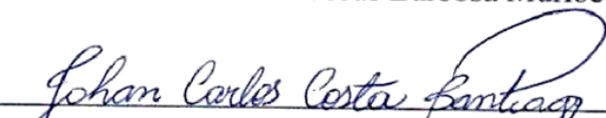
Belém, 29 de Setembro de 2023.



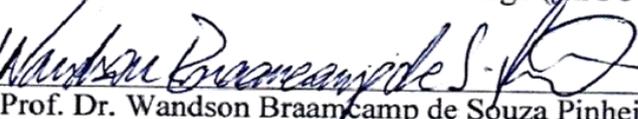
Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva (Presidente – UFPA)



Prof. Dr. Abraão de Jesus Barbosa Muribeca (UFPA)



Prof. Dr. Johan Carlos Costa Santiago (SECULT - CE)



Prof. Dr. Wandson Braamcamp de Souza Pinheiro (UFPA)

*Ao meu filho Carlos Miguel e minha esposa
Gláucia, por serem meus maiores
incentivadores e meus alicerces.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus Pai, Jesus Cristo e a Nossa Senhora de Nazaré, por me guiarem nesta vida.

Aos meus orientadores Prof. Milton e Prof. Lourivaldo, pelas orientações e recursos para a elaboração deste trabalho.

Ao meu filho Carlos Miguel e minha esposa Glaucia, pela compreensão dos momentos que perdi ao lado deles. Aos meus sogros Mário e Inês, que ajudam a cuidar do Miguel na minha ausência. A minha mãe Marilena e minha avó Nazeth, a minha irmã, ao meu padrasto, tios, cunhada, primos, sobrinhos e amigos de vida, por participarem desta caminhada.

Ao PPGQ, a secretaria Léia, aos professores, aos membros da banca avaliadora Abraão Muribeca e Johan Carlos Santiago, aos colegas de pós graduação e amigos de laboratório José Neto, Kyouk, Anderson, Renan, Soninha, Viviane, aos ICs e aos demais companheiros dos Laboratório de Bioensaios e Química de Microrganismos (LaBQuiM), Laboratórios de Síntese e Cromatografia (LabSic), de Cromatografia Líquida (Labcrol) e Central de Extração (CE), pelos auxílios na bancada, nas discussões e nos momentos de descontração que ajudaram muito no progresso deste trabalho e na minha formação como pesquisador.

A direção da Faculdade de Ciências Naturais UFPA/Cametá, ao técnico de Biologia Jazon, ao prof. Ricardo, ao conselho da FACIN, a coordenação do campus UFPA/Cametá e aos amigos professores Fabricio, José Junior, Manoel Lopes pelos incentivos e auxílio na busca pela qualificação, que servirá para melhor atender as demandas do laboratório de química.

Meu agradecimento especial ao professor, Coorientador e amigo Wandson Pinheiro que, mesmo antes do início do mestrado já acreditava no meu potencial e que durante essa jornada foi a pessoa que mais esteve ao meu lado durante o processo de pesquisa e que também abdicou de suas folgas para me ajudar no desenvolvimento de todas as etapas deste estudo. Aqui registro e o meu muito OBRIGADO e minha GRATIDÃO!

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

Michael Faraday

RESUMO

A espécie *Metrodorea flavida* K. Krause, conhecida popularmente como três folhas, pertence a família Rutaceae, é uma espécie endêmica do bioma Amazônico. Apesar de pertencer a um táxon de relevância econômica e medicinal, além de estar inserida em uma das regiões do planeta de maior relevância biotecnológica, observa-se ainda para esta espécie, uma escassez de trabalhos voltados a fitoquímica de *M. flavida*. Dessa forma, neste trabalho buscou-se contribuir para o estudo fitoquímico desta espécie, através da determinação dos perfis químico, cromatográfico e espectroscópico dos extratos de *M. flavida*, do isolamento e elucidação estrutural dos compostos majoritários, assim como, na avaliação dos potenciais antioxidante e antimicrobiano dos extratos das folhas de *M. flavida*. Primeiramente foram realizadas microextrações das folhas da planta com os solventes acetato de etila, etanol 96% e etanol 70%. Após análise dos perfis obtidos por Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), por Ressonância Magnética Nuclear e dos testes antioxidantes e antimicrobianos com os extratos, foi realizada uma extração por maceração utilizando etanol 70%, deste extrato ocorreu fracionamento com Extração por Fase Solida, resultando em 23 frações, destas, os constituintes da fração 60% V1 foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência, assim como, as substâncias isoladas foram elucidadas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 1D e 2D. Os perfis químicos dos extratos *M. flavida* indicaram a presença de substâncias das classes dos terpenos, flavonóides e cumarinas, os testes antioxidantes dos extratos demonstraram que o microextrato obtido com etanol 70%, apresentou maior eficiência no sequestro de radicais DPPH[•], além disso, para os testes antimicrobianos, o microextrato obtido com acetato de etila apresentou os melhores resultados para as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. O extrato macerado etanol 70% também foi testado para as mesmas cepas supracitadas e apresentou ação bactericida para *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. coli*, além da ação bacteriostática para *Salmonella typhimurium*. A partir da fração 60% V1, foram isoladas cinco substâncias (S1, S2, S3, S4 e S5), que após análises por Ressonância Magnética Nuclear e minuciosa pesquisa nas plataformas Scifinder e PubChem, constatou-se que as substâncias S2 e S4 tratam-se de duas diidrochalconas inéditas, isoladas pela primeira vez a partir de plantas. Dessa forma, os dados obtidos representam uma contribuição para o estudo fitoquímico e das propriedades biológicas da espécie *M. flavida*, assim como, para a química de produtos naturais, uma vez que dois novos compostos naturais foram descobertos.

Palavras-chave: Biodiversidade Amazônica. Folhas de *Metrodorea flavida*. Diidrochalconas inéditas. Antioxidante. Antimicrobiano.

ABSTRACT

The species *Metrodorea flavida* K. Krause, popularly known as three leaves, belongs to the Rutaceae family, and is an endemic species of the Amazon biome. Despite belonging to a taxon of economic and medicinal relevance, in addition to being located in one of the regions of the planet with the greatest biotechnological relevance, there is still a scarcity of studies focused on the phytochemistry of *M. flavida* for this species. Therefore, this work sought to contribute to the phytochemical study of this species, through the determination of the chemical, chromatographic and spectroscopic profiles of *M. flavida* extracts, the isolation and structural elucidation of the major compounds, as well as the evaluation of antioxidant potentials. and antimicrobial from *M. flavida* leaf extracts. Firstly, microextractions were carried out from the plant leaves with the solvents ethyl acetate, 96% ethanol and 70% ethanol. After analyzing the profiles obtained by High Efficiency Thin Layer Chromatography, High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC), by Nuclear Magnetic Resonance and antioxidant and antimicrobial tests with the extracts, an extraction was carried out by maceration using 70% ethanol, of this extract. fractionation occurred with Solid Phase Extraction, resulting in 23 fractions, of which the constituents of fraction 60% V1 were purified by high-performance liquid chromatography, as well as the isolated substances were elucidated by 1D Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy and 2D. The chemical profiles of the *M. flavida* extracts indicated the presence of substances from the classes of terpenes, flavonoids and coumarins, the antioxidant tests of the extracts demonstrated that the microextract obtained with 70% ethanol presented greater efficiency in scavenging DPPH[•] radicals, in addition, for antimicrobial tests, the microextract obtained with ethyl acetate showed the best results for strains of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. The 70% ethanol macerated extract was also tested for the same strains mentioned above and showed bactericidal action for *S. aureus*, *B. subtilis* and *E. coli*, in addition to bacteriostatic action for *Salmonella typhimurium*. From the 60% V1 fraction, five substances were isolated (S1, S2, S3, S4 and S5), which after analysis by NMR and thorough research on the Scifinder and PubChem platforms, it was found that substances S2 and S4 are treated of two new dihydrochalcones, isolated for the first time from plants. In this way, the data obtained represent a contribution to the study of phytochemistry and the biological properties of the species *M. flavida*, as well as to the natural product chemistry, since two new natural compounds were discovered.

Keywords: Amazon Biodiversity. Leaves of *Metrodorea flavida*. New dihydrochalcones. Antioxidant. Antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ocorrência do gênero <i>Metrodorea</i> na América do Sul.	20
Figura 2 – Folhas da espécie <i>M. flavida in natura</i>	21
Figura 3 – Mapa onde que indica os registros da <i>M. flavida</i>	21
Figura 4 – Quadro com estruturas químicas das substâncias isoladas da espécie <i>M. flavida</i>	22
Figura 5 – Curva de eluição em modo gradiente, com modificador orgânico variando de 5 a 100% em 60 min.	29
Figura 6 – Cromatograma do MFEBME70_SPE70 gradiente amplo de corrida cromatográfica de 30 min, fluxo de 1mL/min de ACN/H ₂ O com função de incremento do teor de orgânico de %B(t) = 3,17t +5.	33
Figura 7 – Cromatogramas dos fracionamentos MFEBME70_SPE70, gradiente econômico de corrida cromatográfica de 30 min, fluxo de 1mL/min de ACN/H ₂ O com função de incremento do teor de orgânico de %B(t) = 3,17t +5.	33
Figura 8 – Cromatograma do MFEBME70_SPE70_60% V1 obtido em modo isocrático, fluxo de 1mL/min de H ₂ O/ACN/THF na proporção de 45:44:11.	36
Figura 9 – Cromatoplaça eluída em CHCl ₃ 100%, derivatizada com solução VAS 10%..	38
Figura 10 – Cromatoplaças derivatizadas com a solução NP-PEG.....	39
Figura 11 – Cromatoplaça derivatizada com a solução KOH.	40
Figura 12 – Cromatoplaça derivatizada com a solução Dragendorff.	40
Figura 13 – Quadro com os cromatogramas obtidos por CLAE dos microextratos tratados.	42
Figura 14 – Quadro com o perfil espectroscópico obtidos por RMN ¹ H dos microextratos das folhas de <i>M. flavida</i>	44
Figura 15 – Triagem antioxidante direta por bioautografia de DDPH' em CCDAE.	45
Figura 16 – Espectro de RMN de ¹ H, da substância S2, obtido em acetona-d ₆	47
Figura 17 – Mapa de correlação HOMO-COSY, da substância S2, obtido em acetona-d ₆	48
Figura 18 – Espectro de RMN de ¹³ C, da substância S2, obtido em acetona-d ₆	49
Figura 19 – Mapa de correlação heteronuclear HSQC-Ed, da substância S2, obtido em acetona-d ₆	50
Figura 20 – Substância florentina, esqueleto base das diidrochalconas.	50
Figura 21 – Possíveis estruturas para o composto S2.	51
Figura 22 – Mapa de correlação heteronuclear HMBC, da substância S2, obtido em acetona-d ₆	52
Figura 23 – Correlações observadas no espectro HMBC, da substância S2, obtido em acetona-d ₆	52
Figura 24 – Estrutura química do composto S2.	53
Figura 25 – Espectro de RMN de ¹ H, da substância S4, obtido em acetona-d ₆	54
Figura 26 – Mapa de correlação HOMO-COSY, da substância S4, obtido em acetona-d ₆	55
Figura 27 – Espectro de RMN de ¹³ C, da substância S4, obtido em acetona-d ₆	55

Figura 28 – Mapa de correlação heteronuclear HSQC-Ed, da substância S4, obtido em acetona-d6.....	56
Figura 29 – Mapa de correlação heteronuclear HMBC, da substância S4, obtido em acetona-d6.	57
Figura 30 – Correlações observadas no espectro HMBC, da substância S4, obtido em acetona-d6.....	58
Figura 31 – Estrutura química do composto S4.	58

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Espécies do gênero <i>Metrodorea</i> e suas classes fitoquímicas.....	20
Tabela 2 — Padrões, reveladores e comprimento de onda para a comparação da coloração dos microextratos com coloração as classes de metabólitos avaliadas.	28
Tabela 3 – Rendimentos mássico dos extratos das folhas de <i>M. flavida</i>	37
Tabela 4 – Média das massas e dos rendimentos calculados partir de 180 mg de folhas de <i>M. flavida</i>	41
Tabela 5 – Caracterização dos microextratos das folhas de <i>M. flavida</i> por RMN ¹ H.....	43
Tabela 6 – Teste de atividade antimicrobiana com extratos das folhas de <i>M. flavida</i>	46
Tabela 7 – Dados espectrais de RMN ¹ H e ¹³ C do composto S2.	53
Tabela 8 – Dados espectrais de RMN 1H e 13C do composto S4.	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

UFPA	Universidade Federal do Pará
CCDAE	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EFS	Extração por Fase Sólida
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
HOMO-COSY	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
HSQC-Ed	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence - Editing</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Geral	18
2.2. Específicos	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1. Família Rutáceae	19
3.2. Gênero <i>Metrodorea</i> Saint-Hilaire.	19
3.3. Espécie <i>Metrodorea flavida</i> K. Krause.	20
3.4. Substâncias antioxidantes	24
3.5. Substâncias antimicrobianas	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. Coleta e processamento do material vegetal	26
4.2. Preparo dos extratos	26
4.2.1. Extração assistida por banho ultrassônico	26
4.2.2. Extração por maceração	26
4.3. Caracterização dos extratos	27
4.3.1. Perfil fitoquímico por CDDAE	27
4.3.2. Perfil cromatográfico por CLAE.....	28
4.3.3. Perfil espectroscópico por RMN	29
4.4. Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade antioxidante	30
4.4.1. Triagem antioxidante por bioautografia direta (CCDAE – BD)	30
4.5. Atividade antibacteriana	30
4.6. Fracionamento e isolamento	32
4.6.1. Fracionamento do extrato macerado	32
4.6.2. Isolamento por CLAE.....	35
4.7. Identificação estrutural por RMN	36

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. Extrações.....	37
5.2. Caracterização dos microextratos	37
5.3. Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade antioxidante bioautografia direta por CCDAE..	44
5.4. Avaliação antimicrobiana.....	45
5.5. Elucidação estrutural.....	46
5.5.1. Elucidação da substância S2.....	46
5.5.2. Elucidação da substância S4.....	54
6. CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

Relatos históricos apontam que em diferentes civilizações primitivas utilizavam de folhas, raízes, frutos, sementes e cascas de árvores em rituais religiosos e no tratamento de doenças, demonstrando, assim, que desde os tempos remotos os humanos utilizavam as plantas como recursos terapêuticos. Atualmente, a Química dos Produtos Naturais (QNP) é a área que pesquisa as substâncias geradas pelas reações metabólicas que ocorrem dentro de vegetais e microrganismos. Entre essas substâncias estão os metabólitos secundários. Esses compostos têm sua distribuição e concentração diferente em cada espécie, exercendo variadas funções para a sua sobrevivência e perpetuação no ecossistema. Com o avanço tecnológico, os métodos de obtenção e estudo dessas espécies fitoquímicas evoluíram, viabilizando a elaboração de perfis fitoquímicos e a descoberta de novos insumos, gerando assim, um maior interesse das indústrias farmacêuticas e alimentícia (Da Cruz Monteiro; Brandelli, 2017; Simões et al., 2016; Viegas Jr, Bolzani, Barreiro, 2006).

Neste cenário a família Rutaceae destaca-se por agrupar espécies que produzem substâncias de relevância medicinal, como compostos com ação antitumoral, anticolinesterásica, anti-inflamatória, antibacteriana, antiprotozoária, larvicida, fitotóxica e pesticida (De Freitas, Lima, 2021; Franco, Albieiro, 2018). Estudos realizados por Burger et al., (2014), Duarte (2017) e Madeiro (2016), apontam a ação antimicrobiana, de extratos e substâncias isoladas de espécies do táxon Rutaceae, pertencentes a subtribo Pilocarpinae, principalmente aquelas dos gêneros *Esenbeckia*, *Pilocarpus* e *Metrodorea*, frente as cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, dos protozoários *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi*, além disso verificou-se a ação inseticida frente a espécie de formigas *Atta sexdens rubropilosa*. Estudos realizados por Marin Severiche et al. (2016), com extratos das folhas e caule da espécie de *Esenbeckia litoralis*, buscou avaliar a sua capacidade em sequestrar os radicais livres DPPH* e sua relação direta com efeitos deletérios do estresse oxidativo, o que está intimamente relacionado a patologias como câncer, obesidade, mal de Parkinson, Alzheimer, inflamações e até mesmo o envelhecimento. Estas propriedades medicinais de espécies de Pilocarpinae, se deve a capacidade biossintética destes em metabolizar classes fitoquímicas de amplo espectro biológico, como alcalóides e compostos fenólicos pertencentes as classes dos flavonoides, antraquinonas, cumarinas e lignanas.

Dessa forma, a *Metrodorea flavida* K. Krause, além de pertencer a família botânica Rutaceae e subtribo Pilocarpinae, é uma espécie endêmica de um dos principais biomas do planeta, a Amazônia. Conhecida popularmente como carrapateira, pau d'arquinho ou café bravo (Pirani, Groppo, 2020), apesar do importante contexto em que a espécie está inserida, a biodiversidade

amazônica, em revisão a literatura, observa-se que até o momento poucos trabalhos científicos investigaram a composição fitoquímica de extratos de *M. flavida* e as propriedades medicinais da espécie. Sendo apenas nas pesquisas realizadas por Baetas et al. (1996; 1999) e Pernin et al. (1999), em que investigaram a composição química dos extratos do caule, raiz e folhas de *M. flavida*, através do isolamento e elucidação estrutural, relataram a presença de metabólitos secundários pertencentes as classes das lignanas, terpenos, cumarinas e alcalóides. Quanto ao aspecto biológico, apenas Mascarini et al. (2020) e Sanches et al. (2021), descreveram testes com extratos das folhas de *M. flavida* para controle biológico de formigas da espécie *Atta sexdens* e de fungos das espécies *Aspergillus flavus* e *Fusarium oxysporum*.

Portanto, a perspectiva deste trabalho é contribuir para o estudo fitoquímico da espécie *M. flavida*, obtendo seu perfil químico, cromatográfico e espectroscópico, isolando e elucidando metabólitos secundários das folhas de *M. flavida*, assim como, avaliar a atividade antimicrobiana contra as cepas das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Além disso, busca-se ainda avaliar a capacidade antioxidante dos extratos das folhas de *M. flavida* através da bioautografia direta e através de ensaios por espectroscopia de ultravioleta por meio dos radicais DPPH.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Realizar o estudo fitoquímico de extratos das folhas da espécie *M. flavida* e avaliar os seus potenciais antimicrobianos e antioxidantes.

2.2. Específicos

- Avaliar o perfil químico por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE), dos extratos das folhas de *M. flavida*.
- Avaliar o perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), dos extratos das folhas de *M. flavida*.
- Avaliar o perfil espectroscópico por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), dos extratos das folhas de *M. flavida*.
- Realizar o fracionamento e isolamento dos constituintes majoritários do extrato das folhas de *M. flavida*.
- Elucidar/Identificar as estruturas das substâncias isoladas através da espectroscopia de RMN.
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos contra as cepas das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos por bioautografia via sequestro de radicais DPPH[•].

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Família Rutáceas

A família Rutaceae pertence a ordem sapindales, suas espécies estão distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, sendo mais encontradas nos continentes americano e oceânico. Para este táxon já foram catalogadas cerca de 2100 espécies, agrupadas em aproximadamente 160 gêneros em todo planeta. No Brasil, são descritos aproximadamente 195 indivíduos de 33 gêneros, destas, um pouco mais de 100 espécies são consideradas endêmicas do território brasileiro, habitando principalmente nos biomas amazônico e de mata atlântica (Burger, 2014; Pirani, Groppo, 2020; Saraiva Filho et al., 2020).

Segundo Burger (2014), Groppo et al., (2008) e Saraiva Filho et al., (2020), esta família tem relevância na área da química dos produtos naturais por seus membros apresentarem metabolitos secundários de diferentes classes químicas como: terpenos, limonóides, alcalóides, lignanas, cumarinas e flavonoides. Essas classes químicas têm substâncias com ação antioxidante, inseticida, herbicida, antiparasitária, antifúngica, antiprotózoaria, antiviral e bactericida comprovada, fazendo aumentar o interesse pelos estudos de novos compostos bioativos de plantas desta família. Exemplos importantes das propriedades farmacológicas das rutáceas são as plantas *Pilocarpus microphyllus*, conhecida popularmente como jaborandi, é uma fonte natural da pilocarpina, utilizada para tratamento do glaucoma, a *Esenbeckia febrífuga*, popularmente conhecida como três-folhas-do-mato, é utilizada como febrífugo em geral e antimalárica, e a *Esenbeckia grandiflora*, conhecida como chupa-ferro que apresenta atividade antibacteriana, larvicida e no tratamento a psoríase (Franco, Albieiro, 2018; Muntoreanu et al., 2011; Saraiva Filho et al., 2020).

3.2. Gênero *Metrodorea* Saint-Hilaire.

O gênero *Metrodorea* é composto por seis espécies (*M. concinna* Pirani & P. Dias; *M. flavida* K. Krause; *M. maracasana* Kaastra; *M. mollis* Taubert; *M. nigra* Saint-Hilaire e *M. stipularis* Martius). As espécies de *Metrodorea* estão agrupadas com os gêneros *Esenbeckia* Kunth, *Raulinoa* R. S. Cowan e *Pilocarpus* Vahl constituindo a subtribo Pilocarpinae, da tribo Galipeae, (Cerqueira, 2011; Muntoreanu et al., 2011, Santana, 2012). Sendo que as espécies de *Metrodorea* são endêmicas do Brasil, exceto a *M. flavida* que pode ser encontrada em outros países que compartilham o bioma amazônico (figura 1), (Burger, 2014; Cruz et al., 2017; Dias et al., 2013; Duarte, 2017; Sanches, 2021; Santana, 2012).

Figura 1 – Ocorrência do gênero *Metrodorea* na América do Sul.

Fonte: Adaptado GBIF Backbone Taxonomy, 2023.

Apesar de escassos os estudos fitoquímicos realizados com espécies do gênero *Metrodorea*, aqueles desenvolvidos por Baetas et al., (1996; 1999), Burguer (2014), Madeiro (2016), Müller et al., (1995), Pernin et al., (1999), Sanches (2021) e Santana (2012), relatam a presença de metabólitos secundários de classes fitoquímicas importantes, como terpenos, alcaloides, flavonoides, antraquinonas, taninos e cumarinas (tabela 1).

Tabela 1 – Espécies do gênero *Metrodorea* e suas classes fitoquímicas.

Espécie	Classe fitoquímica	Autor
<i>M. flavida</i> K. Krause	Cumarinas; alcaloides; terpenos; lignanas.	Baetas et al, 1996: 1999; Pernin et al, 1999.
<i>M. mollis</i> Taub.	Cumarinas; lignanas; terpenos.	Madeiro, 2016.
<i>M. maracasana</i> Kaastra.	Cumarinas	Santana, 2012.
<i>M. stipularis</i> Mart.	Cumarinas; alcaloides; flavonoides.	Burger et al., 2014.
<i>M. nigra</i> St.-Hill.	Cumarinas; alcaloides; lignanas; terpenos; flavonoides.	Muller, 1995.

Fonte: dados da pesquisa (2023).

3.3. Espécie *Metrodorea flavida* K. Krause.

A espécie *M. flavida* de sinóníma *Esenbeckia coriacea*, é uma árvore de grande porte, podendo chegar a aproximadamente 25 metros de altura, possui caule com casca cinza claro, suas folhas apresentam ramificações que combinam até três unidades em um mesmo ramo – o que origina um de seus nomes vernaculares “três folhas”, além disso, suas flores são pequenas e brancas, seus frutos têm coloração castanha e geram cerca de 10 sementes cada (figura 2), (Pirani, Groppo, 2020).

Figura 2 – Folhas da espécie *M. flavida* in natura.



Fonte: Pirani, Groppo, 2020.

No Brasil a espécie *M. flavida* apresenta diversos nomes vernaculares, variando desde pau d'arquinho (no Pará), pirarara branca (no Acre), três folhas ou carrapateira (no Mato Grosso) e café-bravo (no Maranhão). É uma espécie encontrada em florestas de terra firme ou em matas secundárias, normalmente floresce entre outubro e janeiro. Dentre as espécies do gênero *Metrodorea* é a única que pode ser encontrada fora do Brasil, sendo relatada no bioma Amazônico da Bolívia, Peru e Suriname, (figura 3), (Pirani, Groppo, 2020).

Figura 3 – Mapa onde indica os registros da *M. flavida*.

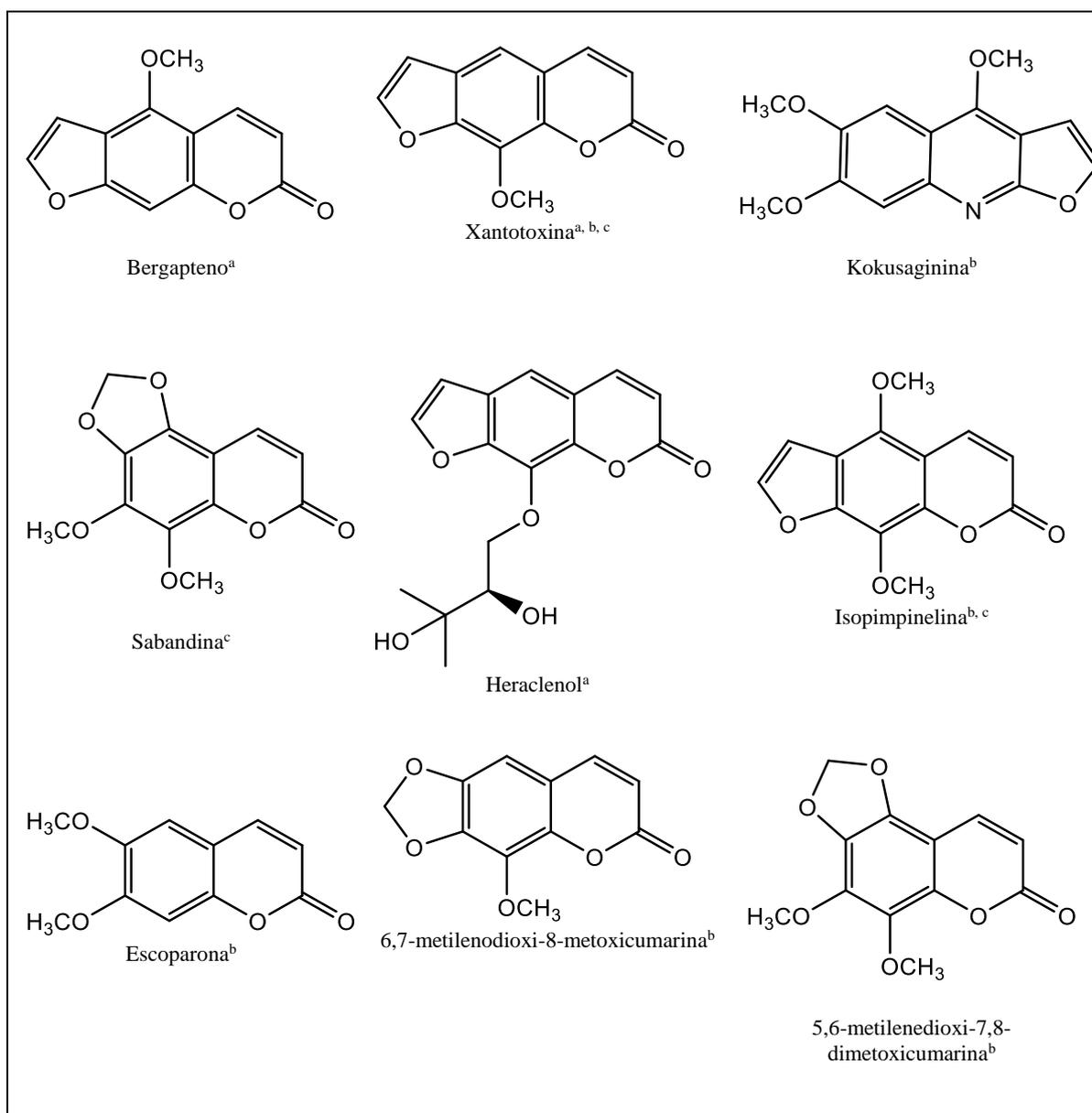


Fonte: Adaptado de GBIF Backbone Taxonomy, 2023.

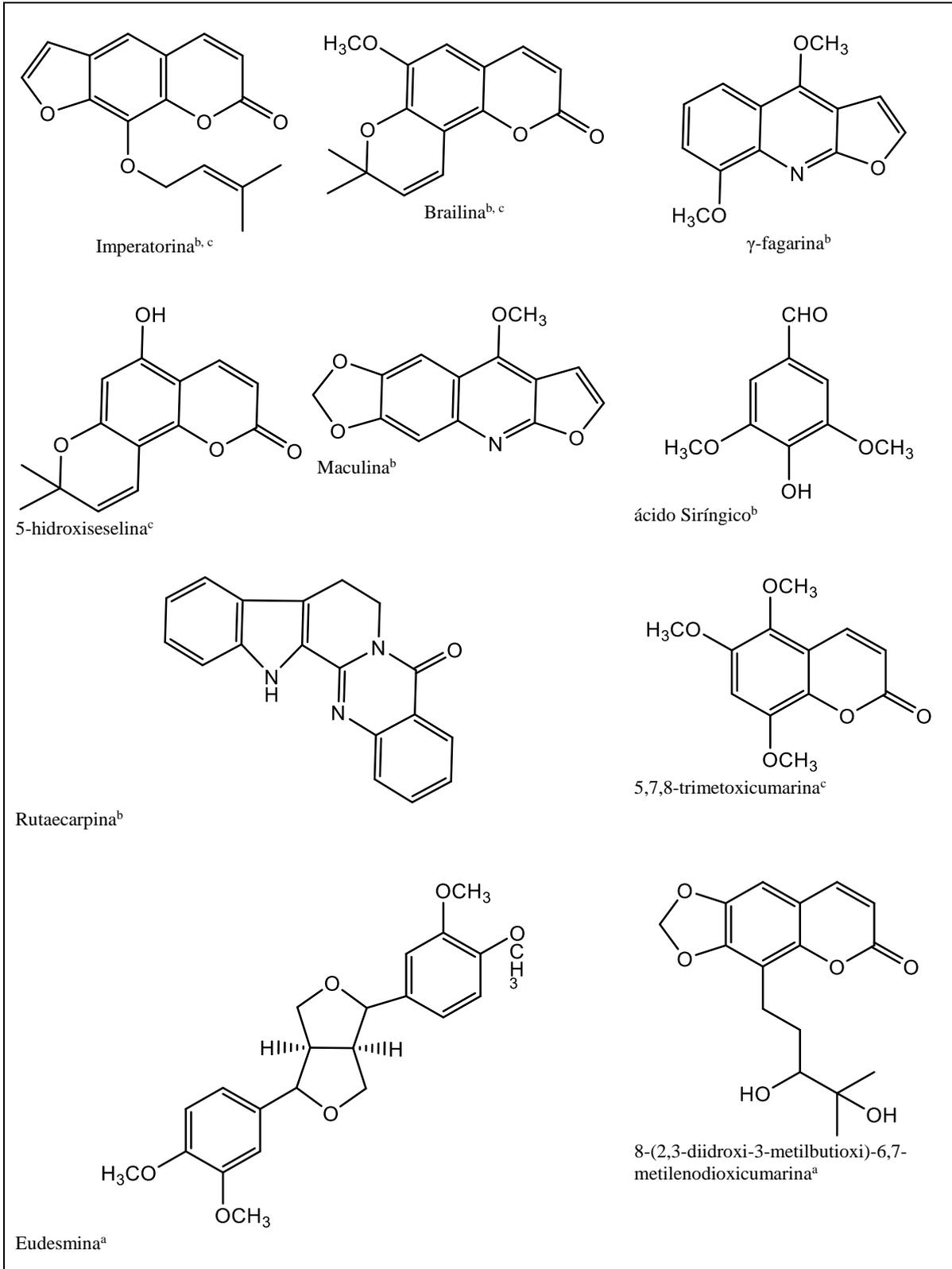
Para essa espécie Baetas et al. (1996), pesquisaram a composição química do extrato diclorometânico obtidos pela percolação das folhas, resultando no isolamento das cumarinas bergapteno, xantotoxina, heraclenol e 8-(2,3-diidroxi-3-metilbutioxi)-6,7-metilenodioxicumarina, além da lignana eudesmina (figura 4). Em um outro trabalho, Baetas et al. (1999) obteve por percolação com hexano o extrato do caule *M. flavida*, em que a partir deste isolou e identificou oito cumarinas (5,6-metilenedioxi-7,8-dimetoxicumarina, escoparona, 6,7-metilenedioxi-8-metoxicumarina, isopimpinellina, imperatorina, brailina e novamente a xantotoxina), quatro alcaloides (γ -fagarina, kokusaginina, maculina e rutaecarpina), um ácido fenólico (ácido siríngico), um triterpeno (lupeol) e um esteroide (β -sitosterol) (figura 4).

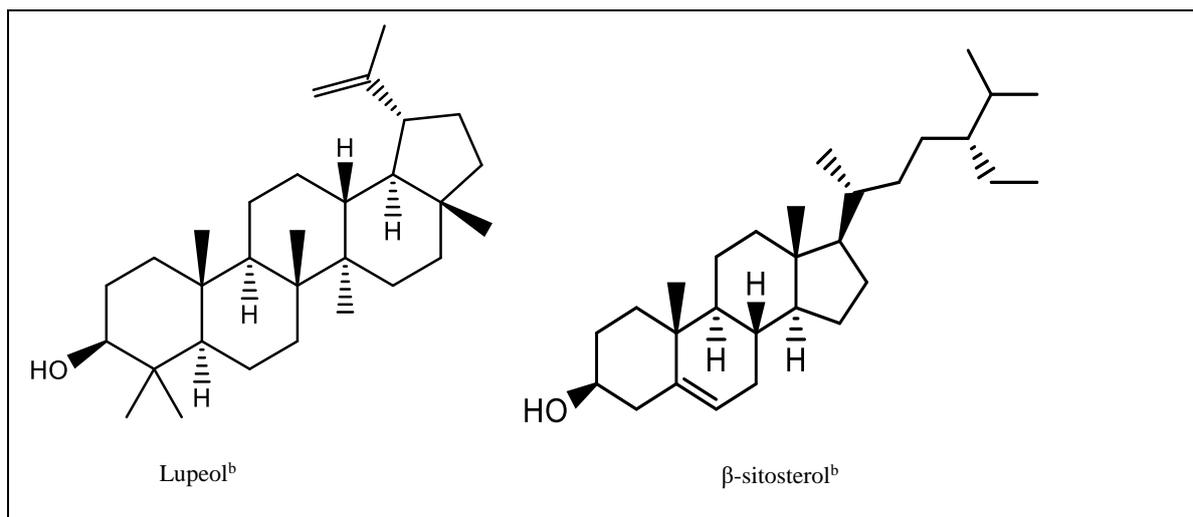
Em outra pesquisa, Pernin et al. (1999), estudaram a composição química do extrato obtido com éter de petróleo, das raízes de *M. flavida*, neste trabalho foram isoladas e identificadas sete cumarinas: 5,7,8-trimetoxicumarina, sabandina, 5-hidroxiseselinina, xantotoxina, isopimpinlina, imperatorina e brailina (figura 4).

Figura 4 – Quadro com estruturas químicas das substâncias isoladas da espécie *M. flavida*.



Continuação





Legenda: (a) Baetas et al. (1996); (b) Baetas et al. (1999); (c) Pernin et al. (1999).

Fonte: Adaptado de Baetas et al. (1996); (1999); Penin et al. (1999).

3.4. Substâncias antioxidantes

Os antioxidantes, são um amplo grupo de substâncias que exercem a função de atrasar, prevenir, diminuir ou eliminar o efeito danoso dos radicais livres, sintetizados ou decompostos nas reações metabólicas ou por fatores externos, ao organismo. Os radicais livres são substâncias que tem elétrons não pareados em sua camada de valência, tornando suas estruturas instáveis e reativas, que se multiplicam em modo cascata. Quando em proporções adequadas, exercem a mediação para a transferência de elétrons em inúmeras reações bioquímicas, entre as quais, as reações que auxiliam os mecanismos de defesa do organismo e o processo de respiração. Porém, a produção excessiva gera estresse oxidativo, podendo causar danos ao organismo como o envelhecimento celular precoce, transtornos neurodegenerativos, obesidade etc. (Barbosa et al., 2010; Pereira, Das Graças Cardoso, 2012; Vasconcelos et al., 2014).

Os antioxidantes são primordiais para controlar as atividades dos radicais livres no corpo mantendo o bom funcionamento das funções intracelulares, sendo produzidos em pequenas quantidades pelo organismo animal e introduzidos na dieta por meio de suplementos alimentares sintéticos ou de maneira natural principalmente sendo ingeridos com o consumo de frutas, legumes entre outros vegetais, em frutas cítricas e os complexos vitamínicos comercializado em cápsulas (Botelho et al., 2022; Dos Santos et al., 2021; Flambó, 2013; Santos, 2020).

Entre os antioxidantes que existem, os flavonóides são os principais, além das cumarinas, alcaloides, lignanas, taninos e estilbenos. Isso é possível, devido as características de inibição dos efeitos da cascata oxidativa, que protegem o organismo dos efeitos danosos dos radicais livres. Isso gera uma ação protetora dos sistemas biológicos e prevenção contra doenças (diabetes, osteoporose,

diversos cânceres, hepatopatias, catarata e disfunções cerebrais). Por esses motivos, os antioxidantes naturais estão sendo cada vez mais inseridos nas dietas (Dos Santos et al., 2021; Pereira, Das Graças Cardoso, 2012; Pinheiro et al., 2022).

3.5. Substâncias antimicrobianas

Doenças causadas por microrganismos como bactérias, vírus e etc. são capaz de provocar crises de saúde em proporções mundiais, por isso é necessário buscar meios para combater tais patógenos. A partir da descoberta da penicilina, no início do século passado, foi possível realizar tratamentos com eficácia comprovada contra doenças causadas por microrganismos, revolucionando assim a maneira de combater essas enfermidades.

Contudo, o uso indiscriminado de antibióticos criou cepas de microrganismos super-resistentes a antimicrobianos comuns, como é o caso cepas das bactérias *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. typhimuriu* e *E. coli*. Estas cepas têm gerado preocupações a nível mundial, devido a estes microrganismos serem causadores de infecções com alto nível de mortalidade. Cerca de 700 mil mortes por ano são causadas por superbactérias e projeta-se que até metade deste século ocorrerão mais de 10 milhões de mortes/ano pela mesma causa (Anjos, 2020, Flambó, 2013; Muribeca et al., 2022).

Estudos realizados para obtenção de novas substâncias antimicrobianas a partir de extratos vegetais têm sido de suma importância para o desenvolvimento de novos fármacos. Este crescente interesse está relacionado a diversidade das estruturas químicas dos metabólitos secundários das classes de flavonoides, cumarinas, alcaloides, estilbenos, antraquinonas e etc. (Anjos, 2020; Madeiro et al., 2017; Muribeca et al., 2022).

Os antimicrobianos são substâncias de origem natural, semi ou totalmente sintética, que podem inibir ou matar bactérias ou fungos específicos. Sua classificação é de acordo com sua atividade: bacteriostáticos quando apenas inibem o metabolismo ou bactericidas quando matam. Essa atividade é mensurada através da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI), quantidade mínima para inibir o aumento da população do microrganismo-teste ou da Concentração Mínima Bactericida (CMB) quantidade mínima para matar a população do microrganismo-teste (Anjos, 2020; Oliveira et al., 2007; Osório, 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta e processamento do material vegetal

A coleta do material botânico ocorreu na comunidade de Vila Nova, município de Magalhães Barata – Pará, sendo coletados cerca de 1,500 kg de folhas da espécie *M. flavida*, além dos ramos férteis para a deposição da exsicata junto ao herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi (Herbário João Murça Pires), com o número de registro 211918.

Para o processamento do material *in natura*, inicialmente realizou-se a secagem em estufa com circulação de ar forçado, tendo a temperatura e umidade controladas ($T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$; $U = 20\%$) no analisador de umidade: GEHAKA – modelo IV2500, até atingir massa constante. Em seguida, as folhas secas foram cominuídas e peneiradas em moinho de martelo e facas utilizando peneira de 14 Mesh.

4.2. Preparo dos extratos

4.2.1. Extração assistida por banho ultrassônico

Para o estudo fitoquímico das folhas de *M. flavida* foram obtidos extratos por microextração da matéria-prima, em que inicialmente buscou-se avaliar a capacidade extratora e seletividade dos solventes acetato de etila (TEDIA[®] COMPANY – Fairfield, EUA), etanol hidratado 96° INPM (SANTA CRUZ – Guarulhos, SP, Brasil) e etanol hidratado 70° INPM (SANTA CRUZ – Guarulhos, SP, Brasil). Para a extração utilizou-se um banho ultrassônico (BRANSON 2510 – Danbury, CT, EUA), sendo o equipamento ajustado para operar na frequência de 42 KHz, potência de 100 W e temperatura de 27 °C. Os microextratos (ME) foram obtidos em triplicata, adotando a relação massa de amostra por volume de solvente extrator 1: 10 (5,00 g de biomassa para 50 mL), com tempo de extração de 30 minutos, sendo para cada solvente realizadas duas bateladas. Após esta etapa, as soluções extratoras foram concentradas em estufa com circulação de ar, com temperatura controlada a 45°C (QUIMIS[®]), em seguida os microextratos acetato de etila (MFMEA), etanol 96° (MFMEE96) e etanol 70° (MFMEE70) foram armazenados em frascos âmbar e condicionado em *freezer*.

4.2.2. Extração por maceração

Para a continuidade do estudo fitoquímico, após a análise prévia dos microextratos (Seção 5.1.1 e 5.2), optou-se para o escalonamento do método a técnica de extração por maceração, adotando como solução extratora o solvente etanol 70° INPM. O Extrato Bruto Macerado

(MFEBME70), foi obtido adotando a relação massa de amostra por volume de solvente extrator 1:10 (100 g de biomassa para 1L) do solvente mencionado, por 72 horas por batelada, sendo feitas 5 bateladas. Após esta etapa, a solução resultante foi concentrada em sistema de destilação a vácuo, utilizando evaporador rotativo *Syncore*, em seguida o MFEBME70 foi armazenado em frasco âmbar e condicionado em *freezer*.

4.3. Caracterização dos extratos

Os microextratos foram caracterizados a partir da adaptação da metodologia descrita por Pinheiro et al. (2022), tendo sido utilizadas diferentes técnicas analíticas para a identificação de compostos orgânicos – Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Para a realização dos perfis químico, cromatográfico e espectroscópico, foi realizado um pré-tratamento dos microextratos por Extração em Fase Sólida (EFS), para a retirada de substâncias interferentes, especialmente clorofila, em que esta prejudica a leitura das cromatoplas no UV 366 nm, gera interferência espectral no RMN ^1H , assim como, pode danificar a coluna C-18 do HPLC. Dessa forma, alíquotas de 180 mg de cada extrato foi tratado por EFS, onde utilizou-se cartuchos SPE Strata C18-E de 1 g / 6 mL (55 μm , 70 Å) (PHENOMENEX – Torrance, EUA). Inicialmente limpou-se o leito dos cartuchos com 100% de ACN, além da ativação deste com H_2O ultrapura 100%. Em seguida a amostra foi preparada, através da diluição de 180 mg dos respectivos microextratos, em 6 mL de ACN/ H_2O (70 : 30), com homogeneização da solução em banho ultrassônica por um minuto. Após o condicionamento do cartucho e o preparo da amostra, a solução foi injetada com o auxílio de ar comprimido e injetado mais um volume de ACN/ H_2O (70:30).

4.3.1. Perfil fitoquímico por CDDAE

Os perfis fitoquímicos dos microextratos foram desenvolvidos em sistema automatizado, composto pelos módulos de aplicação (*Automatic TLC Sample 4*), fotodocumentador (*TLC Visualizer*) e cuba de eluição (dimensão 10x10 cm) com calha dupla, todos da marca CAMAG[®] (Muttentz, Suíça).

Adotou-se como fase estacionária cromatoplas de sílica gel F-254 60 Å com suporte em alumínio (SILICYCLE, Quebec, Canadá) e como fase móvel solventes de grau HPLC (TEDIA[®] COMPANY – Fairfield, EUA).

Alíquotas dos microextratos tratados, foram aplicadas em cromatoplasmas de dimensões 5x10 cm, em modo *spray band* com 8 mm de comprimento, foram inoculados 25 µg de cada microextrato por banda. Além destes, para fins de comparação, foram inoculados 0,1 µg dos padrões: β-amirina (terpeno), kaempferol (flavonoide), miricetina (flavonoide), rutina (flavonoide), brucina (alcaloide) e esculina (cumarina) (tabela 2). Para a determinação das classes fitoquímicas presentes, foram utilizadas soluções de reveladores seletivos para terpenos e esteroides (VAS 10%), NP/PEG (flavonoides), KOH 10% (cumarinas) e dragendorff (alcaloides). Em decorrência do alto caráter hidrofóbico das classes dos terpenos e esteroides, para o revelador VAS foram utilizadas alíquotas dos microextratos brutos, sem o pré-tratamento de amostra.

Tabela 2 — Padrões, reveladores e comprimento de onda para a comparação da coloração dos microextratos com coloração as classes de metabólitos avaliadas.

Classes	Padrão	Revelador	Visualização	Coloração
Terpenos/ fitoesteróis	β-amirina	VAS 10%	Visível	Violeta
Flavonóides	Kaempferol, Rutina e Miricetina	NP/PEG	366 nm	Amarelo/ Verde/ Alaranjado
Cumarinas	Esculina	KOH	366 nm	Azul cintilante
Alcaloides	Brucina	Dragendorff	Visível	Alaranjado-marrom

Fonte: Adaptado de Salazar et al., (2018) e Wagner e Bladt (2001).

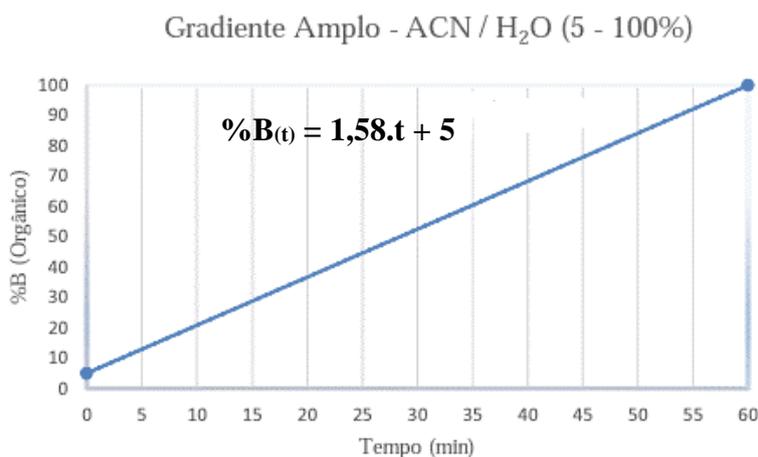
Após as aplicações, as cromatoplasmas foram eluídas em sistemas isocráticos para a análise dos componentes de baixa polaridade (*i*) clorofórmio (CHCl₃) 100%, assim como, para compostos de média polaridade (*ii*) diclorometano (DCM) : metanol/ 1% ácido fórmico (MeOH/ 1% HFO) na proporção de 96 : 4, assim como, para compostos de alta polaridade (*iii*) DCM : MeOH/1% HFO na proporção de 85 : 15, (*iv*) DCM : MeOH/1% HFO na proporção de 80 : 20. Em todas as eluições foram utilizados percursos cromatográficos de 80 mm. Após esta etapa as cromatoplasmas foram derivatizadas com soluções de reveladores seletivos para indicação da presença de terpenos/fitoesteróis, flavonóides alcaloides e cumarinas, por fim foram fotodocumentadas no tipo de radiação indicada (UV366 ou Luz visível).

4.3.2. Perfil cromatográfico por CLAE

As análises cromatográficas por CLAE foram obtidas a partir da adaptação do método desenvolvido por Pinheiro (2021), utilizando um cromatógrafo líquido modelo *Prominence* LC-20A, acoplado a bomba de válvula quaternária (LC-20AT), detector de arranjo de diodo – DAD (SPD-M20A), degaseificador de membrana (DGU-20A), autoinjeter de amostra (SIL-20A) e interface de comunicação (CBM-20A), todos da marca Shimadzu (Tóquio, Japão). No tratamento e processamentos de dados, utilizou-se o *software LC Solution* 1.20.

Na separação cromatográfica foi utilizado como fase estacionária, a coluna analítica de fase reversa *Gemini C18* (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) (PHENOMENEX – Torrance, EUA), e como fase móvel, o gradiente amplo com função linear de aumento do solvente orgânico, dado pela equação: $\%B(t) = 1,58.t + 5$, (em que: %B = porcentagem de solvente orgânico; t = tempo de retenção do pico no cromatograma), e variação de água ultrapura (H₂O – Linha A) : acetonitrila grau HPLC (TEDIA® COMPANY – Fairfield, EUA) (ACN – linha B) de 5 a 100 % (v/v) em 60 minutos com fluxo constante de 1,0 mL/min (figura 5). Nas análises foram injetados 20 μ L de cada extrato padronizado a 1000 ppm (massa injetada de 20 μ g/injeção), tendo ainda, o *DAD* ajustado para a absorvância na janela de 200 a 400 nm e os cromatogramas analisados a partir da capacidade dos compostos cromofóricos no comprimento de onda de 280 nm.

Figura 5 – Curva de eluição em modo gradiente, com modificador orgânico variando de 5 a 100% em 60 min.



Legenda: Cromatograma obtido em modo gradiente amplo de ACN/H₂O, com modificador orgânico variando linearmente de 5 a 100%, em 60 minutos e fluxo de 1,0 mL/min. Visualizado comprimento de onda de 280 nm.

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

4.3.3. Perfil espectroscópico por RMN

Os perfis espectroscópicos dos microextratos foram obtidos por Ressonância Magnética Nuclear – RMN de ¹H, em espectrômetro *Bruker*, modelo *Ascend™* (Rheinstetten, Alemanha), operando a 400 MHz. As amostras foram preparadas utilizando alíquotas de 30 mg de cada microextrato tratado e solubilizadas em 600 μ L de acetona deuterada (ACETONA-d₆). Para o controle e tratamento de dados, utilizou-se o *software TopSpin 3.6.0*, e os *FIDs* (sigla em inglês – *Free Induction Decay*) ou Decaimento de Indução Livre, foram submetidos a transformada de Fourier, com LB = 0,3 Hz e sequências de pré-saturação com irradiação seletiva de baixa potência foram utilizadas para suprimir o sinal residual de H₂O. Os espectros foram tratados manualmente,

corrigidos na linha de base e calibrados, tendo como referência interna o sinal residual do solvente, acetona-d₆, $\delta_{\text{H}} = 2,05$ ppm.

No processamento dos FIDs foram realizados ainda, a investigação da abundância de grupos funcionais presentes nas classes fitoquímicas de interesse, agrupando-as em regiões específicas ($\delta = 0,5 - 1,5 / 1,5 - 3,0 / 3,0 - 4,5 / 4,5 - 6,0 / 6,0 - 9,0 / 9,0 - 10,0$), e a normalização das integrais das respectivas regiões (Pinheiro et al., 2022). Para o assinalamento dos picos selecionados, utilizou-se os dados de deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (j) dos espectros unidimensionais ¹H e ¹³C. Os dados experimentais foram comparados com os respectivos sinais da literatura para os flavonóides dos gêneros *Metrodorea* (Burger et al., 2014; Muller et al., 1995) e *Esenbeckia* (Marin et al., 2016), além dos sinais dos átomos de hidrogênio, carbono e suas correlações sugeridas por Pavia et al. (2021).

4.4. Avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante

4.4.1. Triagem antioxidante por bioautografia direta (CCDAE – BD)

Na cromatoplasmas foram inoculados com 10 µg/banda de cada microextrato tratado (MFMEA – E1, MFMEE96 – E2, MFMEE70 – E3), além de 1 µg/banda do controle positivo Kaempferol. Em seguida, pulverizada com solução a 0,5% de DPPH* (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) em metanol e armazenada por 60 minutos ao abrigo de luz e oxigênio. A cromatoplasma foi fotodocumentada no *Visualizer* sob radiação no visível, tendo os compostos bioativos surgido com coloração amarelo-branca (Pinheiro, et al., 2022).

4.5. Atividade antibacteriana

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Bioensaios e Química de Microrganismos (LaBQuiM) na UFPA, utilizando os extratos tratados das folhas de *M. flavida*, microextratos acetato de etila (MFMEA), etanol 96 (MFMEE96) e etanol 70 (MFMEE70), além extrato obtido por maceração com etanol 70 (MFEBME70), para o controle positivo foram utilizados os antibióticos Amoxicilina (MULTILAB[®]) e Terramicina (TETRAMED[®]) para servirem de controle frente as cepas das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) cedidas pela Dra. Daniela Cristiane da Cruz Rocha do Instituto Evandro Chagas (IEC).

Para o preparo do meio de cultura utilizou-se o BHI (*Brain Heart Infusion*) na proporção de 37 g de meio para 1,0 L de caldo. Para o meio de cultura sólido foi utilizado 5 g de ágar bacteriológico (HIMEDIA[®]) em 100 mL de caldo BHI.

As bactérias testadas foram ativadas em meio de cultura sólido, BHI Ágar, em placas de Petri, com 9 cm de diâmetro devidamente esterilizadas. As placas inoculadas foram armazenadas em estufa de incubação bacteriológica (QUIMIS[®]) por 24 h. Aproximadamente três colônias de cada bactéria foram transferidas, com auxílio de um palito estéril, para um tubo de ensaio contendo 3 mL de caldo BHI sendo incubadas por mais um período de 24 h. Suas concentrações foram padronizadas para se obter uma cultura com aproximadamente $1,0 \times 10^8$ Unidade Formadora de Colônias (UFC). Após atingir essa concentração foram realizadas diluições até alcançar a concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC.

Preparou-se uma solução de sulfato de bário (BaSO_4) a uma concentração 1%. Para obtenção dessa concentração, foi realizado a mistura das soluções de ácido sulfúrico, H_2SO_4 , 1% (9,95 mL) e cloreto de bário, BaCl_2 , 1% (0,05 mL). Em seguida comparou-se o grau de turvação do tubo de ensaio contendo a bactéria com o padrão de BaSO_4 . Essa padronização indica que o tubo contendo a bactéria apresentará uma concentração aproximada de $1,0 \times 10^8$ UFC.

Para o preparo dos extratos e dos antibióticos controle utilizou-se 0,5 mg de cada amostra dissolvidas em 100 μL de DMSO, armazenados em tubos de Eppendorf. Em seguida adicionou-se 900 μL de caldo BHI esterilizado, e as amostras foram agitadas em agitador do tipo Vortex (100 rpm, IKA[®]) para melhor homogeneização.

Foram utilizados como controle dois medicamentos antimicrobianos, a Amoxicilina (MULTILAB[®]) e Terramicina (TETRAMED[®]). Pesou-se 0,5 mg de cada amostra de controle e dissolveu-se em 1 mL de água destilada. Da solução obtida pipetou-se 5 μL e dilui-se em 995 μL de caldo BHI, contido em um tubo de Eppendorf, formando uma concentração de 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Em placas de Elisa, contendo 96 poços, foram adicionados 100 μL de caldo BHI em cada cavidade. Acrescentou-se na primeira cavidade de cada coluna 100 μL da solução contendo as amostras. Em seguida foram realizadas diluições sucessivas, retirando-se 100 μL da primeira cavidade transferindo esse volume para a próxima, homogeneizando, repetindo o processo até a penúltima cavidade da placa, onde foram retirados 100 μL e descartados. A última linha da placa é utilizada como controle do meio usado, não sendo acrescentado amostra. Ao final do processo de homogeneização das amostras adicionou-se em cada cavidade 5 μL da suspensão bacteriana e

incubou-se as placas a 37 °C por 24 h. A avaliação foi realizada adicionando-se 10 µL do TTC 2% (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico) em cada cavidade da placa de Elisa.

A leitura foi feita avaliando os poços onde ocorreu a mudança de coloração. Se ocorreu a troca de cor para vermelho o resultado foi negativo (houve crescimento bacteriano) e os poços que a coloração permaneceu inalterada o resultado foi positivo (não houve crescimento bacteriano). As cavidades que não apresentaram coloração vermelha, as amostras foram (re)inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura ágar BHI e incubadas a 37 °C por 24 h. Onde ocorreu crescimento da bactéria, indicou-se que a amostra apresentou efeito bacteriostático, sendo nomeada de concentração mínima inibitória (CMI) para atividade bacteriostática, quando apenas inibem o crescimento das bactérias, e onde não ocorreu crescimento da bactéria nomenclatura usada foi concentração mínima bactericida (CMB), para atividade bactericida.

4.6. Fracionamento e isolamento

4.6.1. Fracionamento do extrato macerado

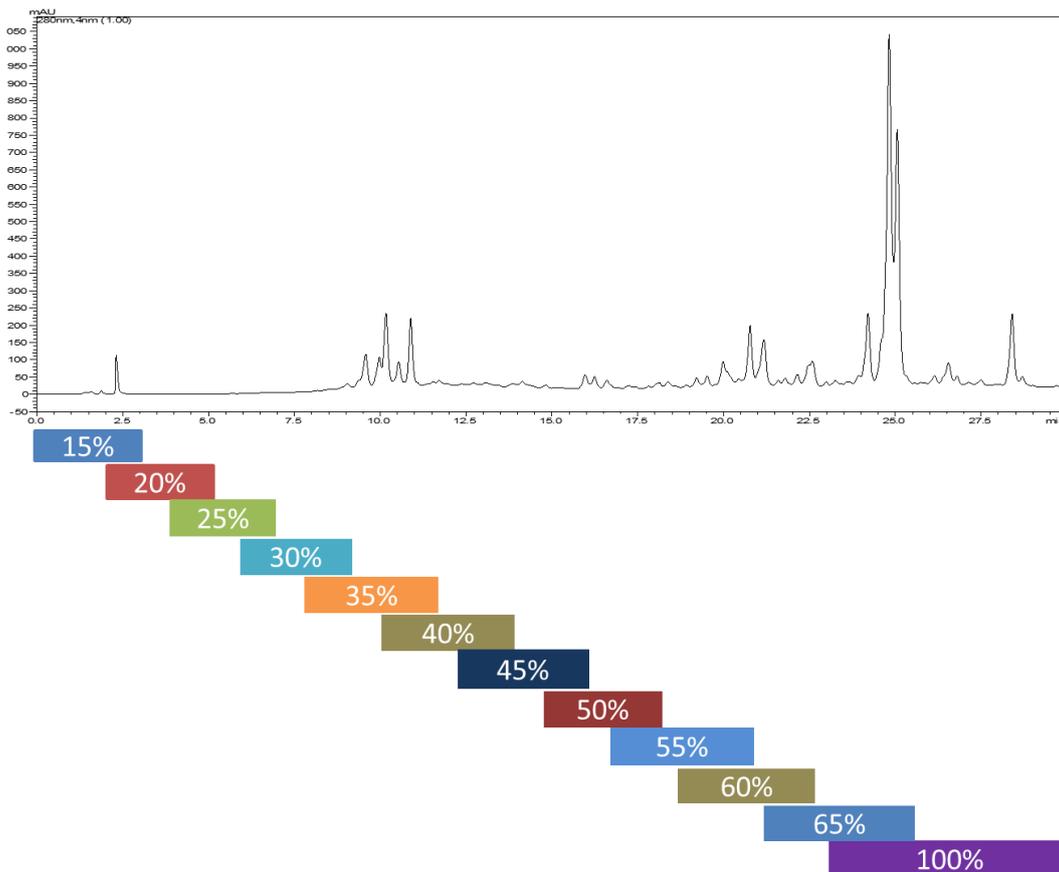
Para o fracionamento do extrato macerado realizou-se inicialmente a remoção dos interferentes hidrofóbicos, como os constituintes lipofílicos e clorofilas, adotando o tratamento de amostra por Extração em Fase Sólida (EFS), realizando a retenção dos interferentes por meio do alto caráter hidrofóbico dos lipídios e clorofila presentes (*Clean-up*).

Para essa finalidade, de forma semelhante ao método descrito na seção 4.3, foi utilizado cartucho SPE Strata C18-E de 1 g/20 mL (55 µm, 70 Å) (PHENOMENEX – Torrance, EUA), em que utilizou-se para cada injeção a massa de 500 mg do extrato macerado e solução extratora a relação de ACN/H₂O (70:30), ao término de cada injeção os cartuchos foram limpos com cinco volumes de acetonitrila, metanol e isopropanol. Após a limpeza dos cartuchos, a etapa de injeção foi repetida até a totalização 10 g de extrato injetado. Para a amostra do extrato, resultante do *clean-up*, nomeou-se como MFEBME70_SPE70.

Para o fracionamento de MFEBME70_SPE70, foi realizada uma adaptação da metodologia descrita por Pinheiro (2021), em que iniciou-se a partir da análise do perfil cromatográfico obtido por CLAE (figura 6), onde foi avaliado o caráter hidrofóbico dos constituintes da fração MFEBME70_SPE70, através da relação do tempo de retenção (tr) de cada um dos picos com o respectivo teor de ACN. Dessa forma, a MFEBME70_SPE70 foi submetida ao fracionamento por EFS, com um gradiente crescente de ACN/H₂O em doze sistemas com teor orgânico diferentes (15% ACN, 20% ACN, 25% ACN, 30% ACN, 35% ACN, 40% ACN, 45% ACN, 50% ACN, 55% ACN,

60% ACN, 65% ACN e 100% ACN), em que os sistemas entre 15% e 65%, tiveram os seus volumes duplicados, totalizando assim vinte e três frações (figura de 6). Após a obtenção das frações, estas foram comparadas por CLAE, em modo gradiente e avaliado as semelhanças e complexidade (figura 7).

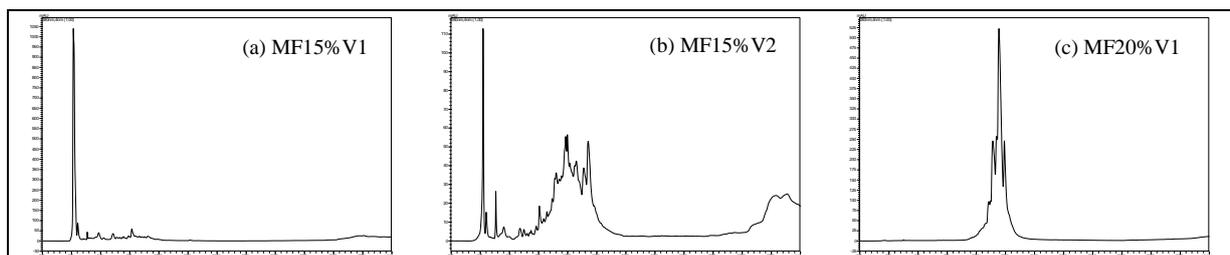
Figura 6 – Cromatograma do MFEBME70_SPE70 gradiente amplo de corrida cromatográfica de 30 min, fluxo de 1mL/min de ACN/H₂O com função de incremento do teor de orgânico de $%B(t) = 3,17t + 5$.



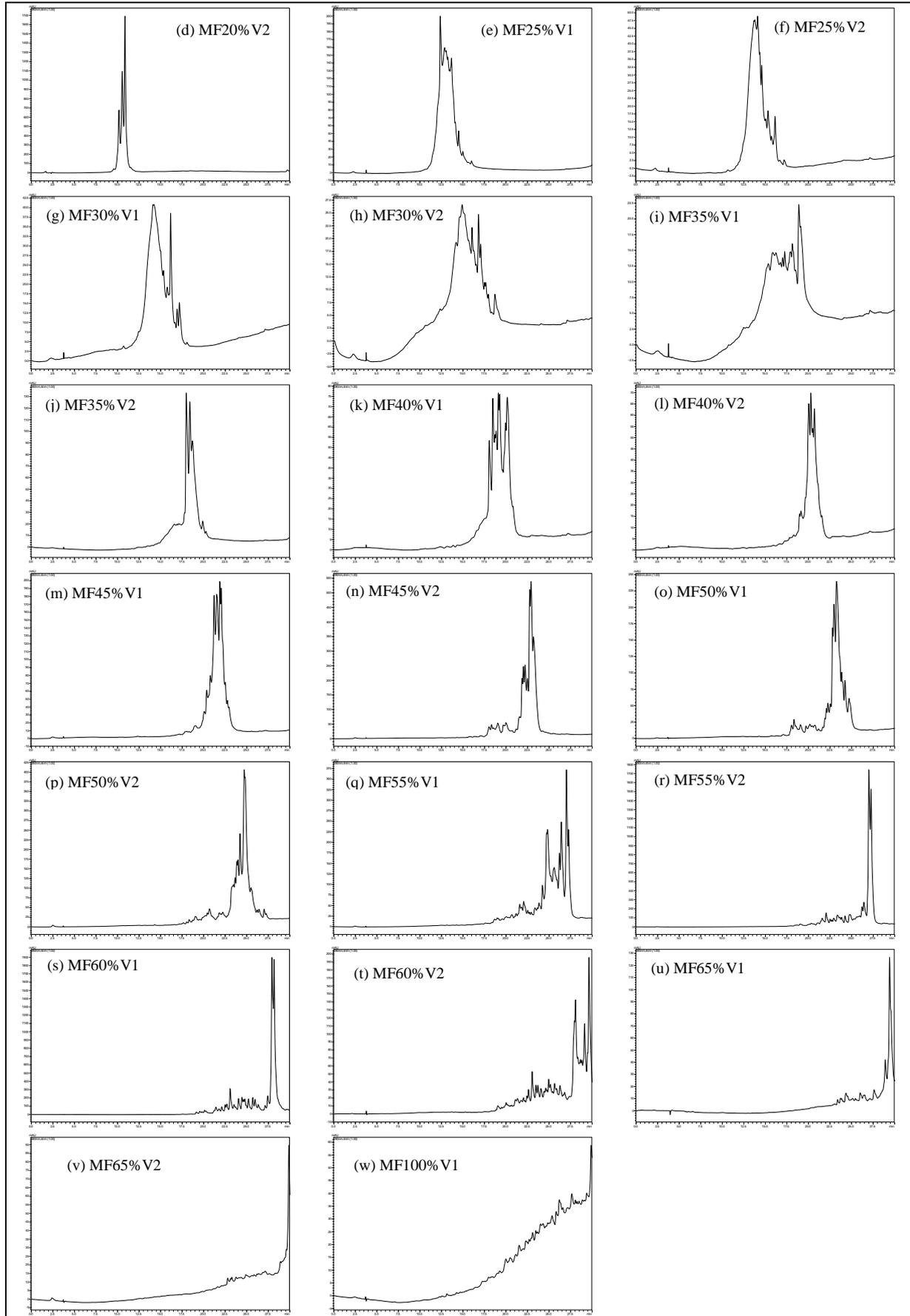
Legenda: MFEBME70_SPE70, com variação gradiente de ACN/H₂O, com modificador orgânico variando linearmente de 5 a 100%, visualizado sob radiação UV 280 nm.

Fonte: Dados do autor (2023).

Figura 7 – Cromatogramas dos fracionamentos MFEBME70_SPE70, gradiente econômico de corrida cromatográfica de 30 min, fluxo de 1mL/min de ACN/H₂O com função de incremento do teor de orgânico de $%B(t) = 3,17t + 5$.



Continuação



Legenda: MFEBME70_SPE70 de 15% V1 a 100% V1, com variação gradiente de ACN/H₂O, com modificador orgânico variando linearmente de 5 a 100%, visualizado sob radiação UV 280 nm.

Fonte: Dados do autor (2023).

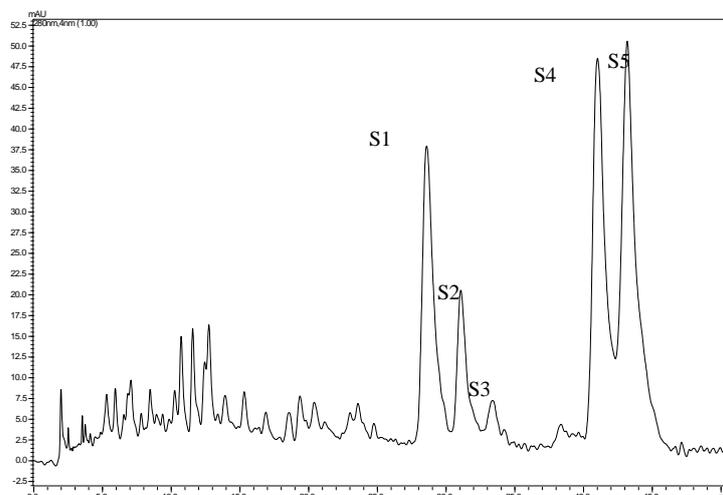
4.6.2. Isolamento por CLAE

Após análise das frações, por meio dos cromatogramas obtidos por CLAE, optou-se pela fração de 60% ACN volume 1 (MFEBME70_SPE70_60%V1), para dar continuidade ao estudo, uma vez que, essa fração apresentou baixa complexidade cromatográfica, além de ser a fração mais representativa do extrato, constituída pelos picos de maior absorção do extrato macerado (figuras 6 e 7 (s)).

Para o desenvolvimento do método de isolamento da fração MFEBME70_SPE70_60%V1, utilizou-se como ponto de partida o tr do último pico de interesse observado no cromatograma obtido por gradiente (figura 7 (s)), em que adotou-se a tabela de conversão da estimativa do percentual de orgânico, em eluição gradiente para o modo isocrático, para isto, considerou-se o $k = 20$ (fator de retenção), conforme proposto por Cass e Degani (2019). Dessa forma, buscou-se a otimização da separação cromatográfica, por meio do ajuste do fator de separação ($\alpha > 1,25$), em que através do ajuste da porcentagem do solvente modificador (%B – acetonitrila), ou seja, diminuição da força cromatográfica, assim como, na avaliação da seletividade dos solventes acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e tetraidrofurano (THF) para com os constituintes da fração MFEBME70_SPE70_60%V1. Deste modo, obteve-se como método de separação a eluição em modo isocrático constituído por H₂O: ACN: THF, na proporção de 45: 44: 11.

Em seguida o método de separação dos constituintes da fração MFEBME70_SPE70_60%V1, foi escalonado para o modo semipreparativo utilizando o cromatógrafo modelo LC-6AD (Shimadzu, Tokyo, Japão), composto por bomba binária, detector com duplo canal de absorbância na região do ultravioleta e do visível modelo SPD 10 AV UV/VIS, injetor de amostras Rheodyne 7752i, com alça de amostragem de 200 μ L e coluna cromatográficas Gemini C18 (250 mm x 10 mm, 5 μ m de diâmetro interno) da marca Phenomenex, resultando assim, no isolamento das substâncias S1, S2, S3, S4 e S5 (figura 8).

Figura 8 – Cromatograma do MFEBME70_SPE70_60%V1 obtido em modo isocrático, fluxo de 1mL/min de H₂O/ACN/THF na proporção de 45:44:11.



Legenda: MFEBME70_SPE70_60%V1, visualizado sob radiação UV 280 nm.

Fonte: Dados do autor (2023).

4.7. Identificação estrutural por RMN

A identificação estrutural dos compostos S1, S2, S3, S4 e S5, ocorreu por espectroscopia de RMN unidimensional – ^1H , ^{13}C , e através dos mapas de correlações bidimensionais HOMO-COSY, HSQC-Ed e HMBC, com espectrômetro operando em condições semelhantes as descritas para o perfil espectroscópico por RMN (item 4.3.3). As amostras foram solubilizadas em acetona- d_6 e os espectros calibrados a partir do sinal de referência dos solventes acetona – $\delta_{\text{H}} = 2,05$ ppm para ^1H e $\delta_{\text{C}} = 206,0$ ppm para ^{13}C . As estruturas químicas dos compostos isolados foram determinadas a partir da interpretação dos sinais dos espectros obtidos seguindo as proposições de Pavia et al., (2021), em associação com a comparação dos dados espectrais relatados na literatura para sinais semelhantes (Zhou et al., 2015), além de sinais característicos de flavonóides em espécie do gênero *Metrodorea* (Burger et al., 2014; Muller et al., 1995).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extrações

Para a microextração, optou-se pela técnica extração por banho ultrassônico, esta microextração visou a avaliar de rendimento de solventes extratores de média e alta polaridade em modo isocrático, assim um solvente não iria interferir na extração dos outros, tornando a porcentagem dos rendimentos real para cada extrator, gerando assim, dados para otimização dos processos de fracionamento e isolamentos futuros. Os microextratos apresentaram rendimentos médios de 8,3% MFMEA, 8,6 MFMEE96 e 9,7% MFMEE70, ou seja, em condições similares para as extrações, o solvente etanol 70, teve a capacidade de extrair mais massa. Estes dados são significativos, pois comprovam que há uma grande massa de substâncias de média e alta polaridade nas folhas de *M. flavida*. (Tabela 3).

Para o escalonamento da extração, os compostos da biomassa foram extraídos por maceração com o solvente etanol 70. Esta extração apresentou um rendimento de 22,7%, esse resultado foi mais que o dobro da microextração com o mesmo extrator, esse valor pode ser explicado pelo modo exaustivo que a maceração ocorreu, foram cinco bateladas, com troca de solvente a cada 72 h.

Tabela 3 – Rendimentos mássico dos extratos das folhas de *M. flavida*.

Método	Solvente	Rendimento médio	Código
Microextração por Ultrassom	Acetato de etila	8,3 %	MFMEA
	Etanol 96%	8,6 %	MFMEE96
	Etanol 70%	9,7 %	MFMEE70
Maceração	Etanol 70%	22,7%	MFEBME70

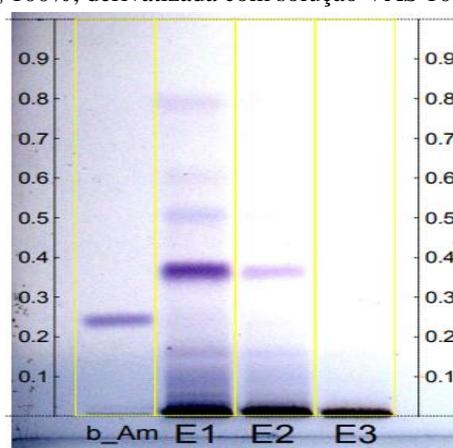
Fonte: Dados da pesquisa (2023).

5.2. Caracterização dos microextratos

O perfil fitoquímico por CCDAE dos microextratos (MFMEA, MFMEE96, MFMEE70), possibilitou avaliar a composição química destes quanto as classes fitoquímicas presentes, tendo os três sistemas de eluição desenvolvidos para compostos de baixa, média e alta polaridade, em que estes promoveram separação dos componentes químicos em bandas ao longo do percurso cromatográfico. A fotodocumetação das cromatoplas derivatizadas com padrões específicos para as classes químicas citadas na metodologia, sob radiação UV 366 nm e luz visível, permitiu visualizar compostos pertencentes as classes dos terpenos, flavonoides e cumarinas (figuras 9 a 11) e também a não visualização de compostos das classes dos alcaloides (figura 12).

Para o indicativo da presença de compostos terpenicos, utilizou-se a reação de referência do padrão β -Amirina (triterpeno) com o revelador VAS, em que a formação de bandas cromatográficas de coloração roxa é o indicativo positivo para a presenças destes compostos (tabela 2). Após a derivatização da cromatoplaça observou-se a formação de bandas roxas no percurso cromatográfico dos microextratos obtidos com acetato de etila (MFMEA) e etanol 96 (MFMEE96), diferindo apenas ao aspecto da intensidade destas bandas, o que sugere uma maior concentração destes compostos no microextrato MFMEA (figura 9). Para o microextrato MFMEE70, não foi possível observar a formação de bandas terpênicas, o que pode ser justificado pelo caráter hidrofóbico da classe e sua incompatibilidade com o teor de água contido na solução de etanol 70%.

Figura 9 – Cromatoplaça eluída em CHCl_3 100%, derivatizada com solução VAS 10%.

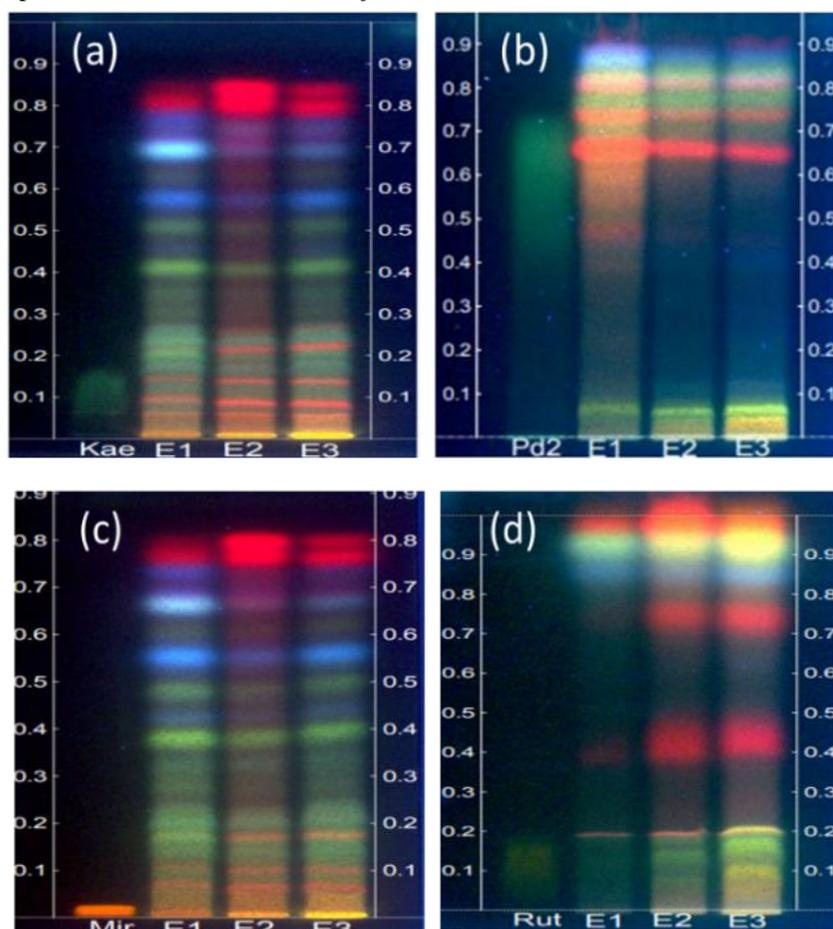


Legenda: b_Am: β -Amirina; E1: MFMEA; E2: MFMEE96; E3: MFMEE70

Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Para analisar a possível presença de substâncias da classe dos flavonoides utilizou-se como referências os padrões de flavonóis Kaempferol, Miricetina e Rutina com o revelador NP-PEG expostos a radiação UV 366, em que a formação de bandas cromatográficas de colorações verde, laranja e amarela, são indicações positivas para a presenças destes compostos (tabela 2). Após a derivatização das cromatoplaças observou-se a formação de bandas nas cores verde, laranja e amarela no percurso cromatográfico das amostras, sendo a intensidade das cores das bandas a maior diferença entre os microextratos, sugerindo uma maior concentração de compostos flavonoídicos no MFMEE70 (figura 10).

Figura 10 – Cromatoplasas derivatizadas com a solução NP-PEG.

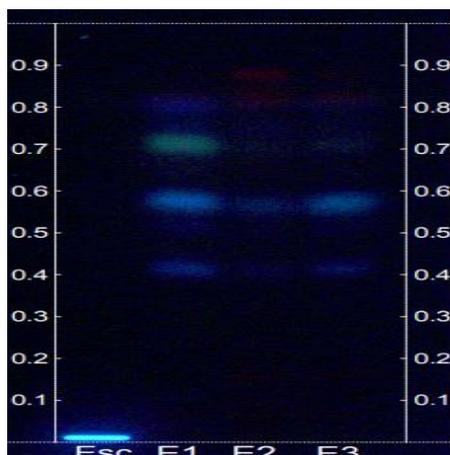


Legenda: (a) Sistema de eluição DCM;MeOH/HFo (96:4), Kae: Kaempferol; E1: MFMEA; E2: MFMEE96; E3: MFMEE70; (b) Sistema de eluição DCM;MeOH/HFo (85:15), Pd2: Kaempferol; E1: MFMEA; E2: MFMEE96; E3: MFMEE70; (c) Sistema de eluição DCM;MeOH/HFo (96:4), Mir: Miricetina; E1: MFMEA; E2: MFMEE96; E3: MFMEE70; (d) Sistema de eluição DCM;MeOH/HFo (80:20), Rut: Rutina; E1: MFMEA; E2: MFMEE96; E3: MFMEE70 e fotodocumentada radiação UV 366 nm.

Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

Para o indicativo da presença de compostos da classe das cumarinas utilizou-se a reação de referência do padrão Esculina com a solução reveladora de KOH, que a formação de bandas cromatográficas de colorações azul ou verde, que indicam a possível presença de compostos pertencentes a classe. Após a derivatização da cromatoplasa observou-se a formação de bandas azuis em todos os microextratos, com maior intensidade no extrato acetato de etila. O que sugere uma maior concentração destes compostos no microextrato MFMEA (figura 11).

Figura 11 – Cromatoplaça derivatizada com a solução KOH.

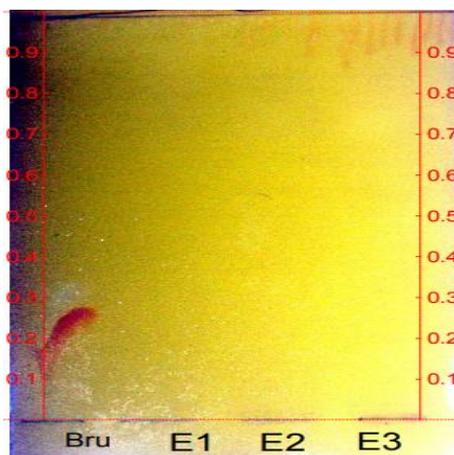


Legenda: Esc: Esculina; E1: MFMEA; E2: MFMEB96; E3: MFMEE70, derivatizada com solução de KOH e fotodocumentada luz UV 366 nm.

Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

Para o indicativo da presença de compostos da classe dos alcaloides, utilizou-se a reação de referência do padrão Brucina com o revelador Dragendorff, em que a formação de bandas cromatográficas de coloração alaranjado-marrom. Deste modo, diferentemente do padrão brucina, os extratos não apresentaram tais colorações, indicando que esses microextratos possivelmente não contêm substâncias das classes dos alcaloides (figura 12).

Figura 12 – Cromatoplaça derivatizada com a solução Dragendorff.



Legenda: Bru: Brucina; E1: MFMEA; E2: MFMEB96; E3: MFMEE70, derivatizada com solução de Dragendorff e fotodocumentada luz visível.

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Para a realização dos perfis cromatográficos por CLAE, utilizou-se os microextratos tratados de acetato de etila (MFMEA), etanol 96% (MFMEB96) e etanol 70% (MFMEE70), obtidos a partir de 150 mg dos seus respectivos extratos brutos, como descrito na seção 4.3.

Após o cálculo do rendimento dos *clean ups*, foi possível observar o baixo rendimento do extrato acetato de etila (MFMEA), com aproximadamente 30,0% de rendimento, seguido do extrato etanólico 96 (MFMEE96) com 73,3% e do hidroalcolólico com 86,7% (tabela 4). Este baixo rendimento é condizente com as análises observadas por CCDAE, em que se observou várias bandas de substâncias hidrofóbicas, como terpenos e/ou esteroides.

Tabela 4 – Média das massas e dos rendimentos calculados partir de 180 mg de folhas de *M. flavida*.

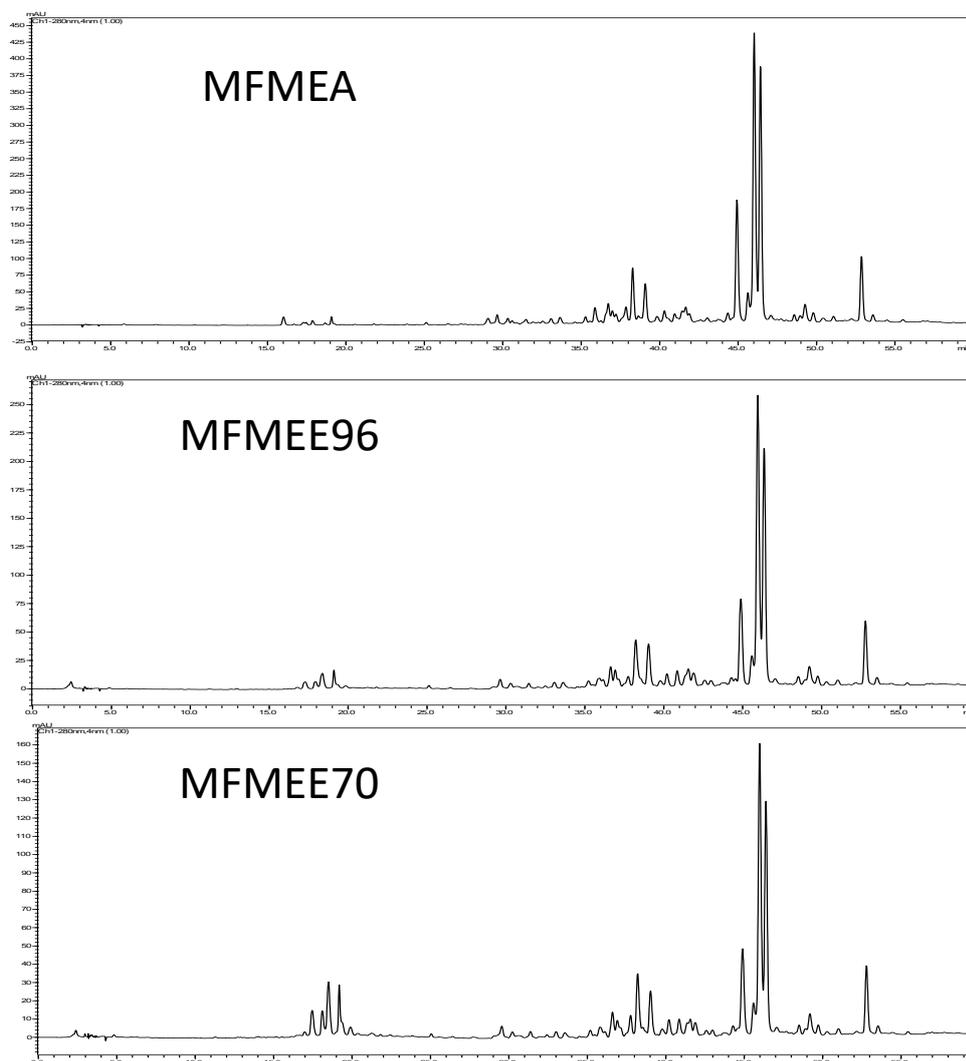
Extrato	Rendimento pós <i>Clean up</i>
MFMEA	30,0%
MFMEE96	73,3%
MFMEE70	86,7%

Legenda: MFMEA: Extrato acetato de etila das folhas de *M. flavida*; MFMEE96: Extrato etanol 96% das folhas de *M. flavida*; MFMEE70: Extrato etanol 70% das folhas de *M. flavida*.

Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

Após as análises dos perfis cromatográficos por CLAE, dos microextratos MFMEA, MFMEE96 e MFMEE70, foi possível identificar a semelhança qualitativa dos três extratos, em que todos apresentaram basicamente os mesmos picos cromatográficos, diferindo apenas quanto ao aspecto quantitativo, ou seja, na intensidade dos sinais, especialmente aqueles mais hidrofílicos, entre os tempos de retenção 15 e 20 min (figura 13). Dessa forma, as análises dos perfis cromatográficos corroboram com aquelas obtidas por CCDAE, em que se observou a semelhança qualitativa dos extratos.

Figura 13 – Quadro com os cromatogramas obtidos por CLAE dos microextratos tratados.



Legenda: MFMEA = microextrato acetato de etila; MFMEE96 = microextrato etanol 96°; MFMEE70 = microextrato etanol 70°. Com variação gradiente de ACN/H₂O, com modificador orgânico variando linearmente de 5 a 100%, em 60 minutos e fluxo de 1,0 mL/min, visualizado sob radiação UV 280 nm.

Fonte: Dados do autor (2023).

A análise dos espectros de RMN ¹H dos microextratos, permitiu confirmar a semelhança qualitativa entre os extratos obtidos com acetato de etila, etanol 96% e etanol 70%, em que observou-se a ocorrência dos mesmos sinais para os três espectros (figura 14). No entanto, os dados espectrais diferiram um do outro, quando avaliado o aspecto quantitativo destes, ou abundância (integral da área do sinal) dos hidrogênios de grupos funcionais e seus respectivos deslocamentos químicos, sendo que através da normatização de todos os sinais (tabela 5), foi possível verificar que na região de δ_H 0,5 a 1,5, que compreende os sinais de hidrogênios de grupos metílicos (-CH₃), metilênicos (-CH₂) e metínicos (-CH), típicos de grupos alquilas, o microextrato obtido com acetato de etila, apresentou a maior área percentual, com aproximadamente 33,73%, frente a 28,76% e 24,02% dos microextratos etanol 96 e etanol 70, respectivamente (tabela 5, figura 14).

A região dos espectros de δ_H 1,5 a 3,0, típica de hidrogênios de $-\text{CH}_3 / -\text{CH}_2 / -\text{CH}$, ligados a carbono insaturado ($\text{CH}_3-\text{C}=\text{C} / \text{CH}_2-\text{C}=\text{C} / \text{CH}-\text{C}=\text{C}$), a carbonila de cetona ou aldeído ($\text{CH}_3-\text{COR} / \text{CH}_2-\text{COR} / \text{CH}-\text{COR}$), a carboxila ($\text{CH}_3-\text{COOR} / \text{CH}_2-\text{COOR} / \text{CH}-\text{COOR}$), a átomos de nitrogênio ($\text{CH}_3-\text{N} / \text{CH}_2-\text{N} / \text{CH}-\text{N}$) ou ligados diretamente a anel aromático ($\text{CH}_3-\text{Ar} / \text{CH}_2-\text{Ar} / \text{CH}-\text{Ar}$), foi outro ponto de diferenciação, pois, o microextrato acetato de etila apresentou área integrada para 34,46%, enquanto que, o etanol 96 e etanol 70 apresentaram respectivamente 31,96% e 25,67% (tabela 5, figura 14).

Para a região de δ_H 3,0 a 4,5 correspondente aos sinais de hidrogênios ligados a carbonos oxidados ($\text{CH}_2-\text{OH} / \text{CH}-\text{OH}$) ou a grupos alcóxi, fenóxi e acilatos ($\text{ArO}-\text{CH}_3 / \text{ArO}-\text{CH}_2 / \text{RCOO}-\text{CH}_3 / \text{RCOO}-\text{CH}_2 / \text{RCOO}-\text{CH}$), o extrato etanol 70 apresentou maior intensidade de sinais com aproximadamente 24,18%, frente aos 18,46% encontrados para o extrato etanol 96 e 12,81% acetato etila.

Para a região de hidrogênios de grupos olefínicos δ_H 4,5 a 6,0 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{R} / \text{R}-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}$) os microextratos apresentaram valores de integrais próximos, onde o extrato hidro alcóolico teve um teor 5,85%, o extrato etanólico teve um teor de 3,51% e o extrato acetato de etila teve um teor de 4,44%.

Outra região de grande diferenciação entre os extratos, corresponde aos sinais de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos ($\text{Ar}-\text{H}$) ou a carbonos olefínicos vicinais a anel aromático ($\text{Ar}-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}$), região dos espectros de δ_H 6,0 a 9,0, a qual mostrou maior teor de hidrogênios aromáticos para o microextrato etanol 70 (20,28%), do que para os microextratos acetato de etila (14,55%) e etanólico (14,65%), o que indica assim, um maior teor de compostos fenólicos no microextrato etanol 70 (tabela 5, figura 14).

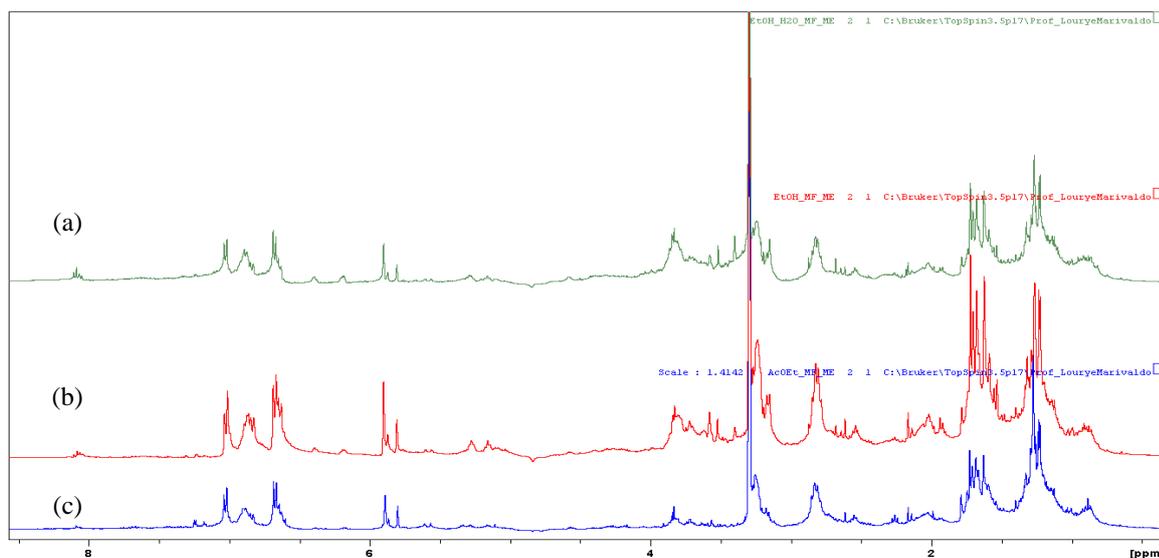
Tabela 5 – Caracterização dos microextratos das folhas de *M. flavida* por RMN ^1H

Desl. Químico (ppm)*	Grupos Funcionais	Área (%) E ₁	Área (%) E ₂	Área (%) E ₃
0,5 – 1,5	C- CH_n	33,74	31,42	24,02
1,5 – 3,0	$\text{CH}_n-\text{C}=\text{C}$; CH_n-COR ; CH_n-COOR ; CH_n-N ; CH_n-Ar	34,46	31,96	25,67
3,0 – 4,5	CH_n-OH ; $\text{ArO}-\text{CH}_n$; $\text{RCOO}-\text{CH}_n$; CH_2-NHCOR	12,81	18,46	24,18
4,5 – 6,0	$\text{CH}_n=\text{CH}$	4,44	3,51	5,85
6,0 – 9,0	$\text{Ar}-\text{H}$; $\text{Ar}-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}$	14,55	14,65	20,28

Legenda: Legenda: Microextrato acetato de etila (E₁); Microextrato etanólico (E₂); Microextrato etanol 70 (E₃); n = número de hidrogênios, onde $1 \leq n \leq 3$.

Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

Figura 14 – Quadro com o perfil espectroscópico obtidos por RMN ^1H dos microextratos das folhas de *M. flavida*.



Legenda: (a) microextrato etanol 70 (MFMEE70); (b) microextrato etanólico 96 (MFMEE96); (c) microextrato acetato de etila (MFMEA).

Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

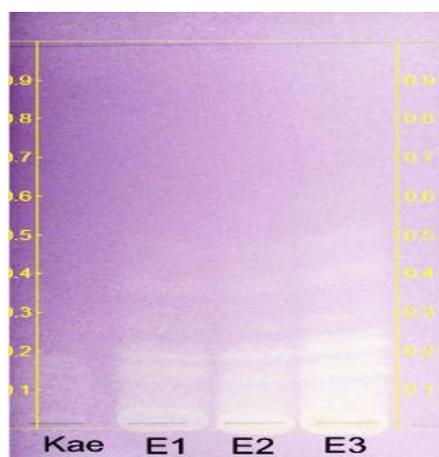
Dessa forma, as análises dos perfis químicos (por CCDAE), cromatográfico (por CLAE) e espectroscópico (por RMN), permitiu determinar a semelhança qualitativa entre os três microextratos estudados, em que o extrato obtido com acetato de etila diferiu dos demais, por apresentar um elevador teor de terpenos e esteroides, assim como, o extrato obtido em etanol 70%, destacou-se por apresentar uma maior concentração de compostos fenólicos.

5.3. Avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante bioautografia direta por CCDAE

O ensaio antioxidante dos extratos das folhas de *M. flavida* por bioautografia, possibilitou avaliar *in situ* a capacidade dos constituintes dos extratos acetato de etila, etanol 96 e etanol 70 em sequestrar os radicais livres DDPH^{\bullet} (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (cor roxa) tornando estes, moléculas estáveis de 2,2-difenil-picril-hidrazina (cor amarela, indicativo de atividade antioxidante). O uso dos mesmos parâmetros cromatográficos adotados no perfil químico por CCDAE, item 4.3.1, tornou possível correlacionar as classes fitoquímicas identificadas, com as suas respectivas capacidades antioxidantes, como observado nos padrões utilizados de flavonoides. O tom amarelado das bandas cromatográficas formadas é proporcional a quantidade de radicais livres sequestrados, dessa forma, pode-se perceber que após a derivatização da cromatoplaça com solução de DDPH^{\bullet} e sua fotodocumetação em luz visível, o extrato etanol 70% apresentou capacidade antioxidante superior ao padrão Kaempferol, ao acetato de etila e ao etanol 96%, resultado este, em conformidade com aqueles obtidos na normatização da área dos sinais do espectro de RMN ^1H e no

perfil fitoquímico por CCDAE, tendo o extrato etanólico 70% apresentado maior abundância de compostos fenólicos em comparação ao acetato de etila e ao etanol 96 (figura 15).

Figura 15 – Triagem antioxidante direta por bioautografia de DDPH* em CCDAE.



Legenda: Eluição Kae: Kaempferol; E1: MFMEA; E2: MFMEE96; E3: MFMEE70, cromatoplaça eluída em DCM: MeOH/HFo (96%:4%) e fotodocumentada no UV 366 nm.

Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

5.4. Avaliação antimicrobiana

Os extratos das folhas de *M. flavida* (MFMEA; MFMEE96; MFMEE70, MFEBME70) e os antibióticos de referência tetraciclina e Amoxicilina foram testados frente as bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (tabela 6).

Os resultados antimicrobianos frente as bactérias *B. subtilis*, mostraram que o extrato MFMEA, foi o que apresentou o menor CMB, tendo a concentração 62,50 µg/mL, para o extrato MFMEE96 o CMB foi de 125 µg/mL e para os extratos MFMEE70, MFEBME70 o valor de CMB foi de 250 µg/mL. Os extratos MFMEA e MFEBME70 apresentaram atividade do tipo bacteriostático, até o CMI 15,62 µg/mL e 62,5 µg/mL respectivamente. Já os antibióticos de referência (tetraciclina e Amoxicilina), apresentaram CMB de 3,91 µg/mL.

Os extratos quando testados frente a cepa de *S. aureus*, apresentaram atividade do tipo bactericida com CMB na concentração 15 µg/mL para o extrato MFMEA, 62,5 µg/mL para o extrato MFMEE96, 125 µg/mL para o extrato MFMEE70 e 31,25 µg/mL para o extrato MFEBME70. Já os antibióticos de referência (tetraciclina e Amoxicilina), apresentaram CMI de 3,91 µg/mL.

Para a cepa *E. coli* o extrato MFMEA foi observada uma atividade bacteriostática de CMI de 250 µg/mL, os extratos MFMEE96 e MFMEE70 não apresentaram atividade não concentrações

testadas e o extrato MFEBME70 apresentou atividade bacteriostática de CMI de 250 µg/mL. Já os antibióticos de referência (tetraciclina e Amoxicilina), apresentaram CMI de 3,91 µg/mL.

Para a cepa *S. typhimurium*, o extrato MFMEA, FMFEE96 e FMFEE70 não apresentaram atividades biológicas nas concentrações testadas e o extrato MFEBME70 apresentou atividade bacteriostática de CMI de 250 µg/mL. Já os antibióticos de referência (tetraciclina e Amoxicilina), apresentaram CMI de 3,91 µg/mL.

Tabela 6 – Teste de atividade antimicrobiana com extratos das folhas de *M. flavida*.

Substâncias	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
MFMEA	62,50 (=)	15,62 (=)	250 (-)	>250
FMFEE96	125 (-)	62,50 (=)	>250	>250
FMFEE70	250 (=)	125 (=)	>250	>250
MFEBME70	250 (=)	31,25 (=)	250 (-)	250 (-)
Tetraciclina	3,91 (=)	3,91 (-)	3,91 (-)	3,91 (-)
Amoxicilina	3,91 (=)	3,91 (-)	3,91 (-)	3,91 (-)
DMSO	>250	>250	>250	>250

Legenda: (>) Sem atividade; (-) Bacteriostático; (=) Bactericida.

Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

5.5. Elucidação estrutural

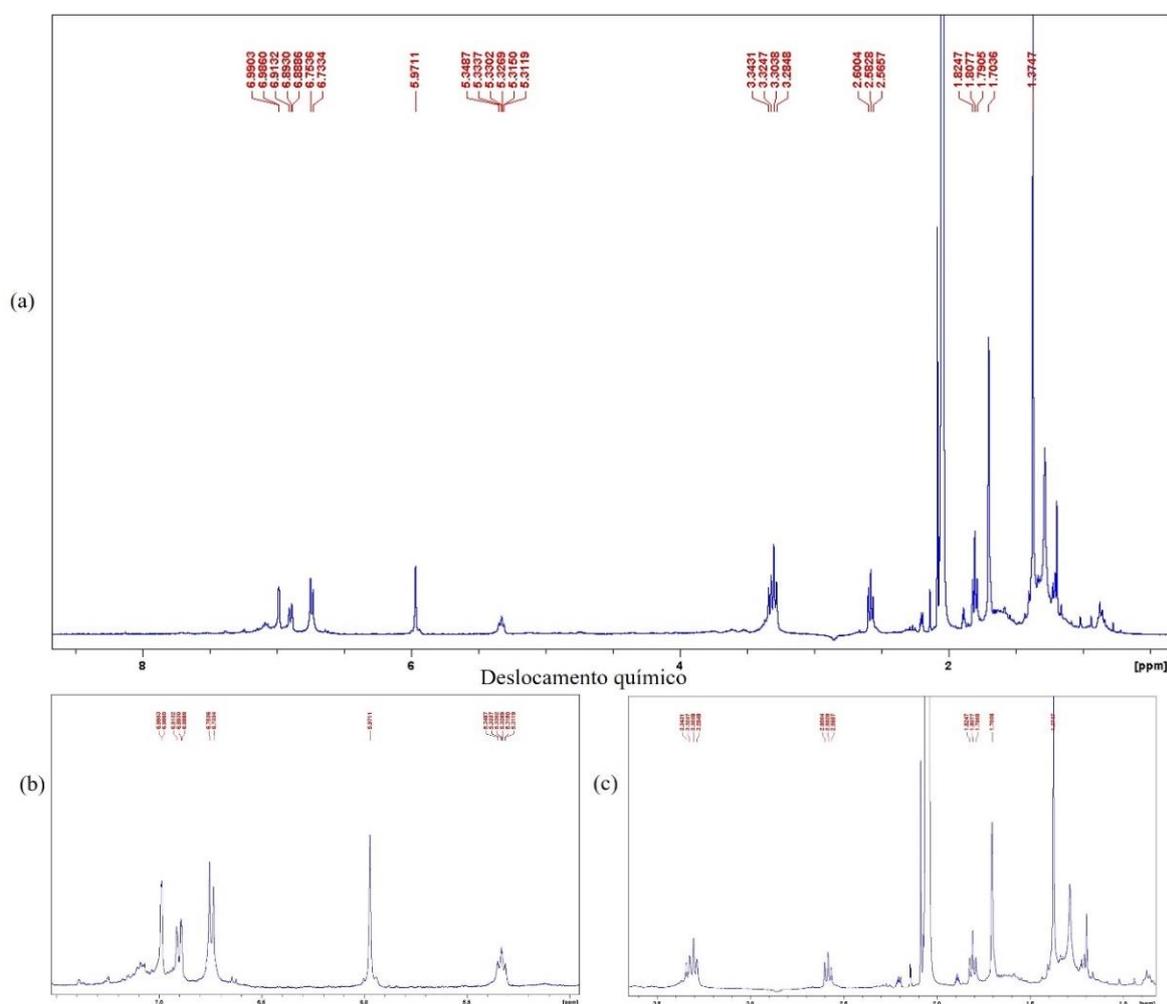
O estudo fitoquímico do extrato obtido por maceração com etanol 70%, das folhas de *M. flavida*, resultou no isolamento de cinco compostos, em que as estruturas moleculares foram determinadas por espectroscopia de RMN de ^1H , ^{13}C , os mapas de correlação HOMO-COSY, HSQC-Ed e HMBC, assim como, através da comparação com os dados espectrais da literatura, de estruturas semelhantes da classe das diidrochalconas (Zhou et al., 2015). Após a análise minuciosa dos espectros dos compostos S2 e S4, verificou-se tratarem-se respectivamente das diidrochalconas: 3-(4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)-1-(2,4,6-triidroxi-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)fenil)propan-1-ona e 3-(4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)-1-(2,4,6-triidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)propan-1-ona, que após buscas por suas respectivas estruturas nas plataformas Scifinder[®] e PubChem[®], foi verificado o ineditismo dos compostos para a química dos produtos naturais.

5.5.1. Elucidação da substância S2

A substância S2 apresentou-se como um sólido amarelo, foi isolada na purificação por CLAE, da fração MFEBME70_SPE70_60% V1 (figura 8) e teve sua estrutura molecular elucidada a partir das análises dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C , HOMO-COSY, HSQC-Ed e HMBC (figuras 16 a 23, tabela 7), além da comparação dos dados espectrais de substâncias semelhantes relatadas na literatura (Zhou et al., 2015).

Na análise do espectro de RMN ^1H e do mapa de correlação homonuclear COSY (figura 16 e 17, tabela 7), observou-se na região de hidrogênios aromáticos – 5,8 a 8,0 ppm, um singlete em δ_{H} 5,97 (*s*), típico de anel aromático 1,2,3,4,5-pentassubstituído, dois dupletos em δ_{H} 6,99 (*d* 1,7 Hz) e 6,74 (*d* 8,1 Hz) em correlação com o sinal em δ_{H} 6,90 (*dd* 1,7 e 8,1 Hz) típicos de anel aromático 1,3,4-trissubstituído (figuras 16b e 17b). Na região entre o deslocamento químico 2,0 e 4,0 ppm, observou-se a presença de dois sinais tripletos em acoplamento, δ_{H} 2,87 (*t* 7,7 Hz) e 3,32 (*t* 7,7 Hz) (figuras 16c e 17c), além destes, observou-se no espectro de RMN ^{13}C , uma linha espectral em δ_{C} 204,8 (figura 18). Este conjunto de sinais, em associação tipificam o esqueleto base de uma diidrochalcona (figura 19).

Figura 16 – Espectro de RMN de ^1H , da substância S2, obtido em acetona- d_6 .



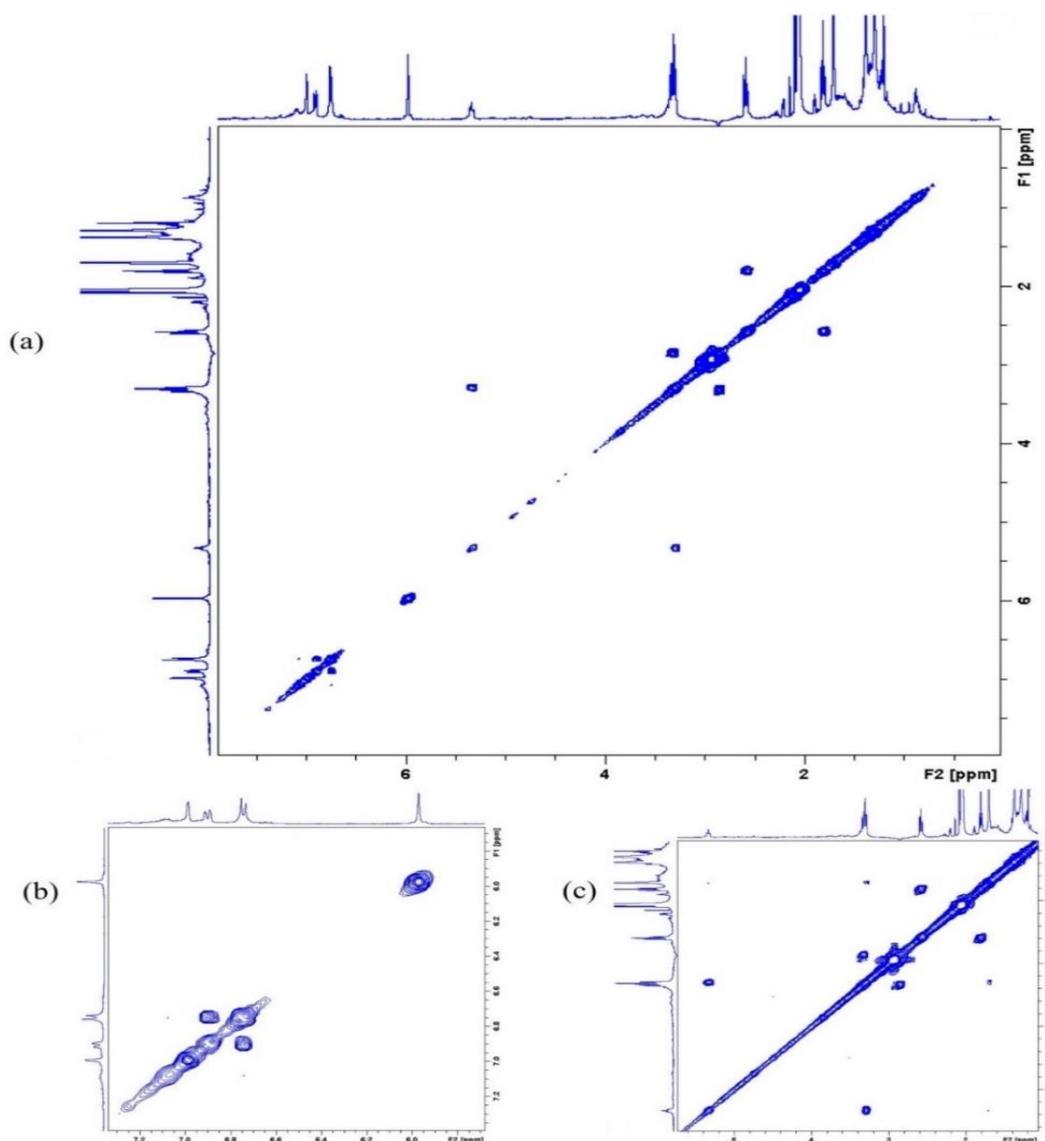
Legenda: (a) espectro de RMN ^1H ; (b) expansão de 5,0 a 7,5 ppm; (c) expansão de 1,0 a 3,5 ppm

Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

Outros sinais observados no espectro de RMN ^1H e no mapa de correlação HOMO-COSY, como o multipletto em δ_{H} 5,33 (*m*), em δ_{H} 3,29 (*d* 7,2 Hz) e um singlete intenso, em δ_{H} 1,69 (*s*), característico de dois grupos de hidrogênios metílicos equivalentes, o que sugere a presença de um

substituinte *C*-prenila. Além destes, observou-se na região de hidrogênios ligados a carbonos alifáticos, $C\text{-sp}^3$, como o singlete com integral para seis hidrogênios, em δ_H 1,38 (*s*), dois tripletos em δ_H 1,81 (*t* 6,9 Hz) e 2,58 (*t* 6,9 Hz) de hidrogênios metilênicos de cadeia aberta e vicinais, (figuras 18c e 19c), tendo ainda, no espectro de RMN ^{13}C , sido observado a presença do sinal em δ_C 75,9, típico de $C\text{-sp}^3$ oxidado (figura 18), indicando assim, a presença do substituinte derivado do grupo *C*-prenila, 3-hidroxi-3-metil-butil.

Figura 17 – Mapa de correlação HOMO-COSY, da substância S2, obtido em acetona- d_6 .

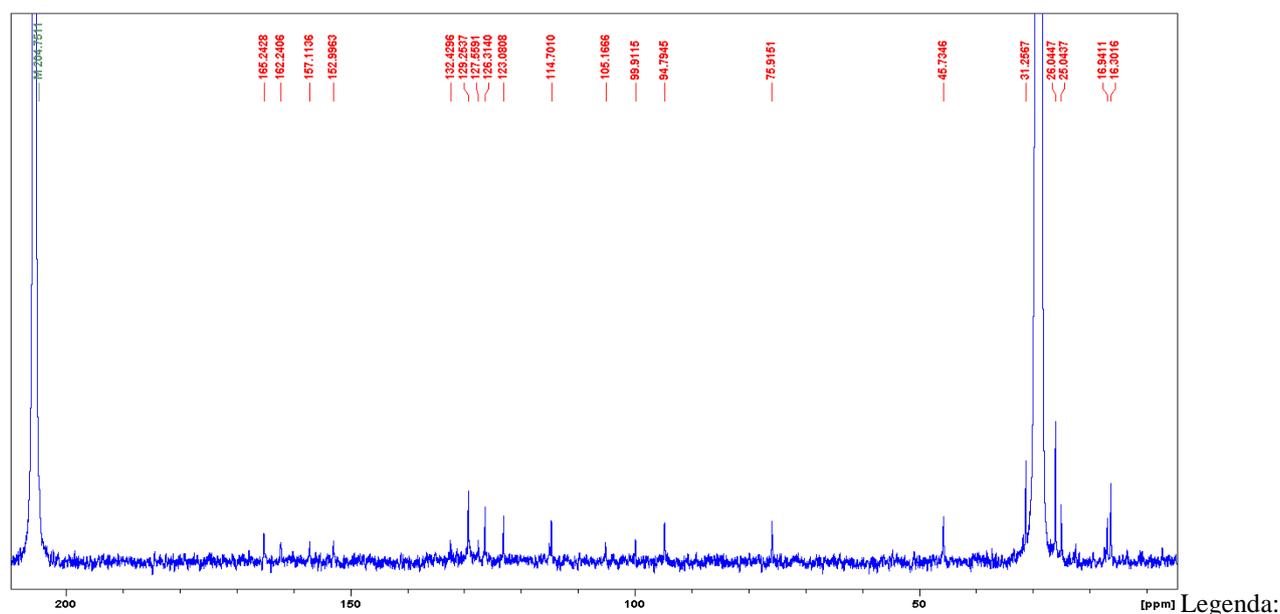


Legenda: (a) espectro de RMN 1H ; (b) expansão de 5,0 a 7,5 ppm; (c) expansão de 1,0 a 3,5 ppm
 Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

O espectro de RMN ^{13}C (figura 18) e o mapa de correlação HSQC-Ed (figura 19), permitiram a identificação de 24 linhas espectrais, atribuídas a vinte e cinco átomos de carbono, pois, observou-se que o sinal, em δ_C 26,0 por apresentar a intensidade muito superior aos demais

sinais, indicam que estes são referentes a dois carbonos equivalentes. Após a análise do espectro de ^{13}C e da identificação das correlações no mapa de correlação heteronuclear HSQC-Ed, foi possível determinar a forma com que os carbonos estão distribuídos no composto S2, tendo assim apresentado quatro carbonos aromáticos hidrogenados (δ_{C} 94,8; 114,7; 126,3 e 129,3), quatro carbonos aromáticos oxidados (δ_{C} 153,0; 157,1; 162,2 e 165,2), quatro carbonos aromáticos totalmente substituídos (δ_{C} 99,9; 105,2; 127,6 e 132,4), um carbono olefínico hidrogenado (δ_{C} 123,1), um carbono olefínico totalmente substituído (δ_{C} 131,3), cinco carbonos metilênicos (δ_{C} 16,3; 28,2; 30,0; 31,3; 45,7), quatro carbonos metílicos (δ_{C} 16,9; 25,0; 26,0; 26,0), um carbono alifático oxidado e totalmente substituído (δ_{C} 75,9), além de uma carbonila de cetona (δ_{C} 204,7) (figuras 18 e 19, tabela 7).

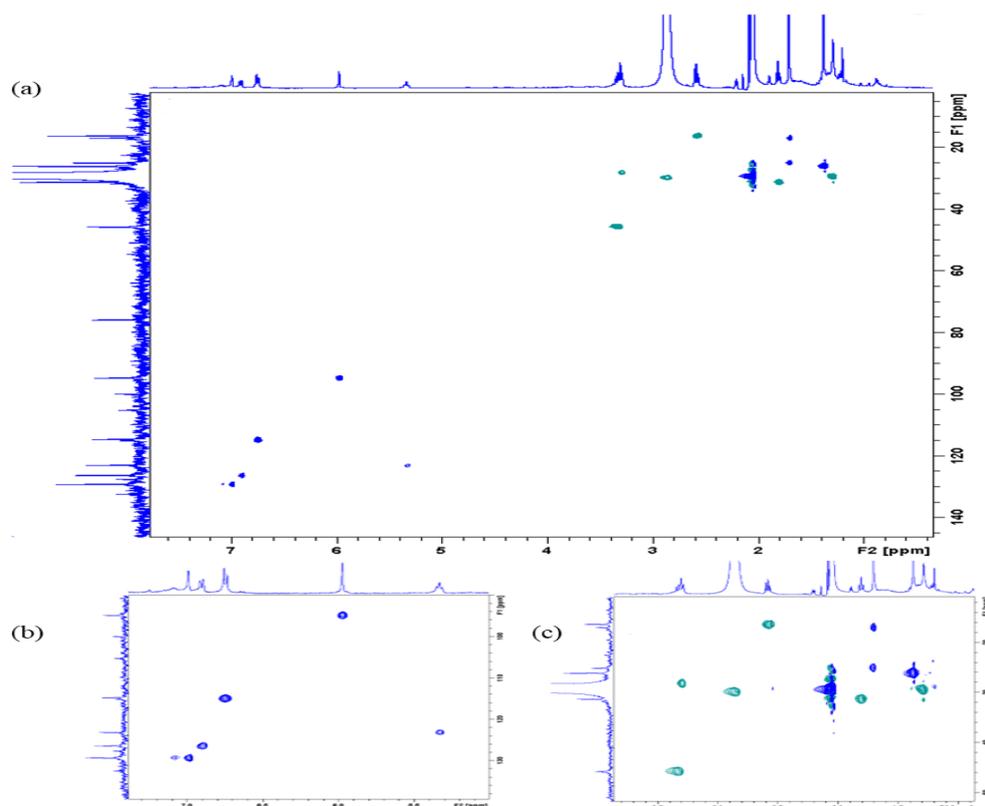
Figura 18 – Espectro de RMN de ^{13}C , da substância S2, obtido em acetona- d_6 .



Espectro de RMN ^{13}C , substância S2.

Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

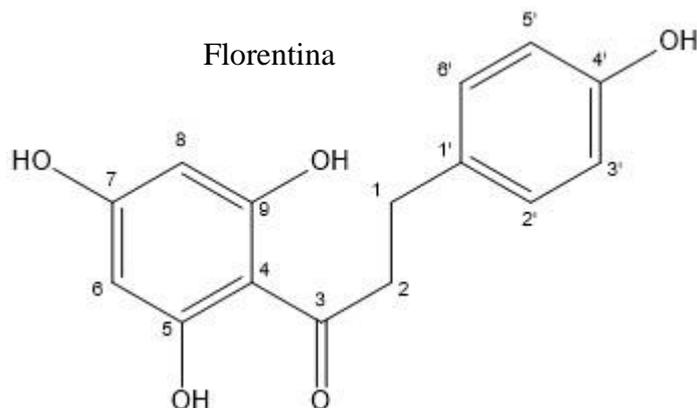
Figura 19 – Mapa de correlação heteronuclear HSQC-Ed, da substância S2, obtido em acetona-d₆.



Legenda: (a) Mapa de correlação HSQC-Ed; (b) expansão de 5,0 a 7,5 ppm; (c) expansão de 1,0 a 3,5 ppm
 Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

Os dados espectrais de RMN ¹H, ¹³C, HOMO-COSY e HSQC-Ed de S2, corroboraram para a elucidação de uma diidrochalcona (Ar-C3-Ar') com um anel aromático 1,3,4-trissubstituído e o outro 1,2,3,4,5-pentassubstituído, tendo sido apontado ainda, a presença do substituinte 3-hidroxi 3-metil-butil (derivado oxidado *C*-prenil) e de um outro substituinte 3-

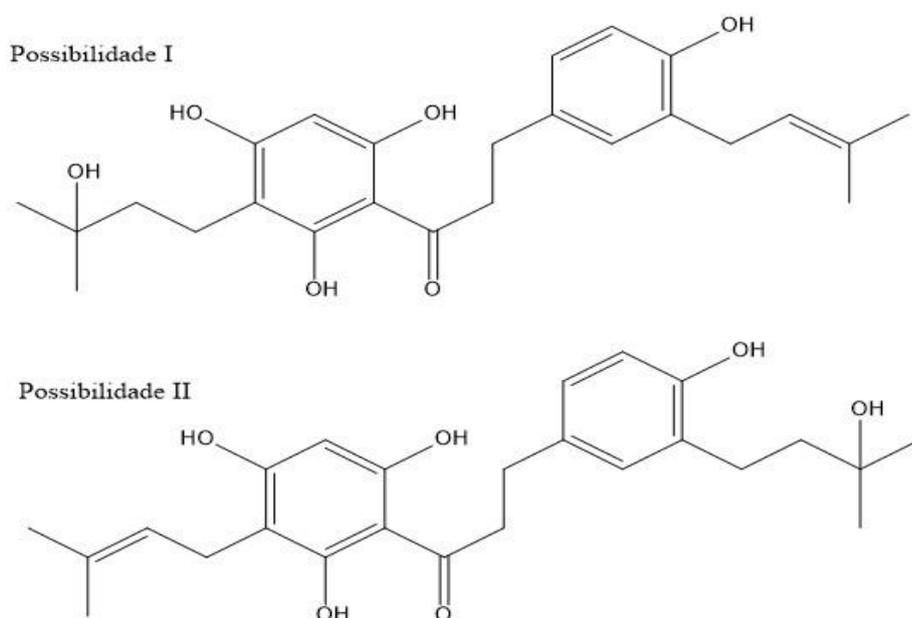
Figura 20 – Substância florentina, esqueleto base das diidrochalconas.



Fonte Dados da pesquisa, (2023).

As diidrochalconas apresentam origem biossintética mista (chiquimato/acetato), através da transferência do grupo acetato do malonil-CoA (3 vezes) para o 4-hidroxicinamoil-CoA e a perda da insaturação. Por ação da chalcona sintase ocorre a enolização e consequente formação do chamado de anel A dos flavonoides (anel aromático 1,2,4,6-tetrassubstituído), gerando assim, a diidrochalcona mais primitiva – florentina (figura 20), ou seja, normalmente encontram-se diidrochalconas (flavonoides) com carbonos aromáticos oxidados nas posições C-5, C-7 e C-9 (anel A), C-4 (anel B) (DEWICK, 2009). Portanto, levando em consideração a biossíntese das chalconas, evidenciam-se duas possibilidades para a substituição dos grupos C-prenílico no composto S2, no carbono C-6 do anel A e no carbono C-3' do anel B (figura 21).

Figura 21 – Possíveis estruturas para o composto S2.

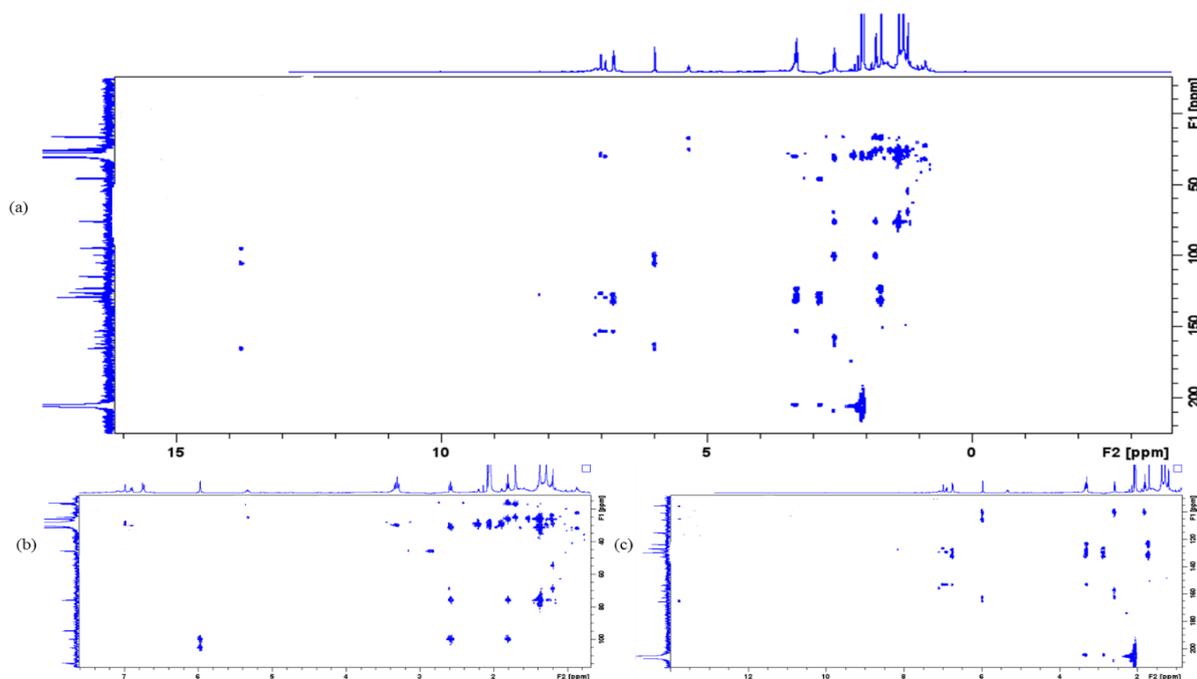


Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

No mapa de correlação heteronuclear HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ($^{2,3}J_{\text{C,H}}$) (figura 22) observou-se as correlações dos hidrogênios metilênicos do derivado C-prenílico modificado (oxidado), δ_{H} 1,81 e 2,58 com o carbono aromático totalmente substituído, em δ_{C} 99,9 (C-6), assim como, dos

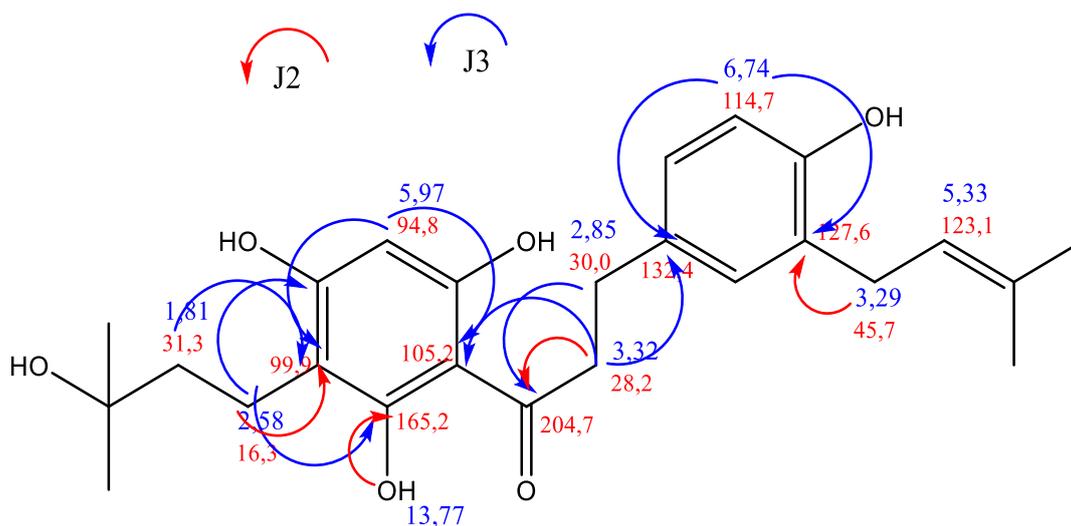
hidrogênios metilênicos do grupo *C*-prenila δ_H 3,29 com o carbono aromático totalmente substituído, em δ_C 127,6 (C-3').

Figura 22 – Mapa de correlação heteronuclear HMBC, da substância S2, obtido em acetona-d6.



Legenda: (a) Mapa de correlação HMBC; (b) expansão de 5,0 a 7,5 ppm; (c) expansão de 1,0 a 3,5 ppm
Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

Figura 23 – Correlações observadas no espectro HMBC, da substância S2, obtido em acetona-d6.

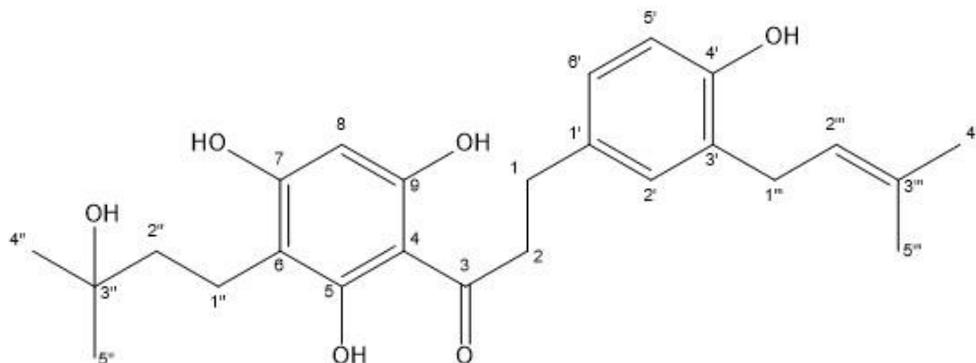


Legenda: δ_C : sinais de Carbono, δ_H : sinais de Hidrogênio.
Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

Isto confirma a posição do substituinte 3-hidroxi-metil-butil no carbono C-6 (anel A) e do substituinte 3-metilbut-2-en-1-il (*C*-prenil) no carbono C-3' (anel B) (figuras 23 e 24, tabela 7).

Sendo assim, as análises dos dados espectrais de RMN do composto S2, permitiram identificá-lo como sendo um novo composto natural, denominado pela IUPAC por 3-(4-idroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)-1-(2,4,6-triidroxi-3-(3-hidroxi-3-metilbutil)fenil)propan-1-ona.

Figura 24 – Estrutura química do composto S2.



1-(4-idroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)-3-(5,7,9-triidroxi-6-(3-idroxi-3-metilbutil)fenil)propan-3-ona

Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

Tabela 7 – Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C do composto S2.

H/C	$\delta^1\text{H}$ (J/Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	COSY	HMBC
1	2,85 (<i>t</i> 7,7 Hz)	30,0	3,32	6,90; 3,32; 6,97
2	3,32 (<i>t</i> 7,7 Hz)	28,2	2,85	2,85
3	-	204,8	-	2,85; 3,32
4	-	105,2	-	3,32; 5,97; 13,77
5	-	165,2	-	13,77; 2,58
6	-	99,9	-	2,58; 1,81; 5,97; 13,77
7	-	157,1	-	2,58; 5,97
8	5,97 (<i>s</i>)	94,8	-	-
9	-	162,2	-	5,97
1'	-	132,4	-	6,90; 3,32; 6,97; 2,85; 6,74
2'	6,97 (<i>d</i> , 2,0 Hz)	129,3	6,90	6,90; 3,29; 2,85
3'	-	127,6	-	6,97; 3,29; 6,74; 5,33
4'	-	153,0	-	6,90; 6,74; 6,97; 3,29
5'	6,74 (<i>d</i> , 8,2 Hz)	114,7	6,90	6,90;
6'	6,90 (<i>dd</i> , 8,2 e 2,1 Hz)	126,3	6,74; 6,97	6,74; 6,97; 2,85;
1''	2,58 (<i>t</i> , 6,9 Hz)	16,3	1,81	1,81
2''	1,81 (<i>t</i> , 6,9 Hz)	31,3	2,58	2,58; 1,38
3''	-	75,9	-	1,81; 2,58; 1,38
4''	1,38 (<i>s</i>)	26,0	-	1,38; 1,81
5''	1,38 (<i>s</i>)	26,0	-	1,38; 1,81
1'''	3,29 (<i>d</i> , 7,2 Hz)	28,2	5,33	5,33; 6,97
2'''	5,33 (<i>t</i> , 7,2 3 0,9 Hz)	123,1	1,69; 3,29	3,29; 1,69
3'''	-	131,3	-	5,33; 3,29; 1,69
4'''	1,69 (<i>s</i>)	25,0	5,33	5,33; 1,69
5'''	1,69 (<i>s</i>)	16,9	5,33	5,33; 1,69
OH	13,77 (<i>s</i>)	-	-	-

Legenda: dados espectrais obtidos em acetona, d_6 .

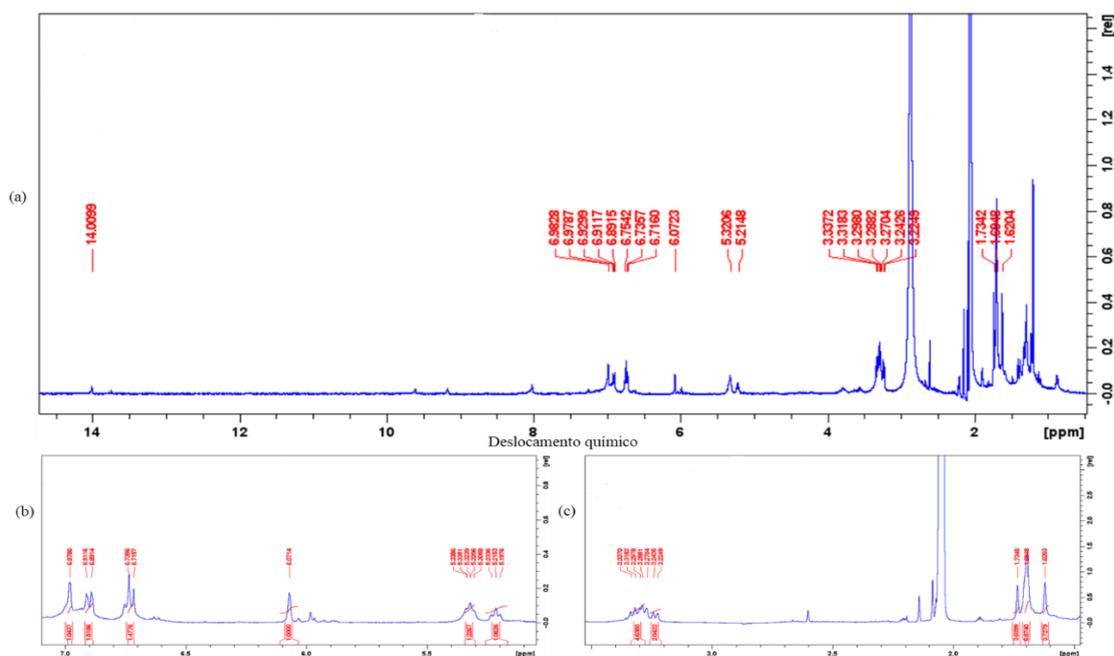
Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

5.5.2. Elucidação da substância S4

A substância S4 apresentou coloração similar a S2, um sólido amarelo, que também foi isolada na purificação por CLAE da fração MFEBME70_SPE70_60%V1 (figura 8). Teve a sua estrutura molecular elucidada a partir das análises dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C , HOMO-COSY, HSQC-Ed e HMBC (figuras 25 a 29, tabela 8), além da comparação dos dados espectrais da substância S2, assim como, de estruturas semelhantes relatadas na literatura (Zhou et al., 2015).

A partir da análise do espectro de RMN ^1H e do mapa de correlação HOMO-COSY, foi possível identificar conjuntos de sinais na região de hidrogênios aromáticos – 6,0 a 8,0 ppm, um singleto em δ_{H} 6,07 (s), típico de anel aromático 1,2,3,4,5-pentassubstituído, dois dupletos em δ_{H} 6,98 (*d* 1,9 Hz) e 6,73 (*d* 8,0 Hz) em correlação com o sinal de um duplo-duplete em δ_{H} 6,90 (*dd* 1,9 e 8,0 Hz), típico de anel aromático 1,3,4-trissubstituído (figuras 25b e 26b). Na região entre o deslocamento químico 2,0 e 4,0 ppm, também foi possível observar a presença de dois sinais de tripletos em acoplamento δ_{H} 2,88 (*t* 7,8 Hz) e 3,32 (*t* 7,8 Hz), típicos de hidrogênios metilênicos (figura 25c e 26c), além desses sinais e correlações observados, foi verificado no espectro de ^{13}C , uma linha espectral em δ_{C} 204,5, típica de carbonila de cetona (figura 27). Esses conjuntos de sinais tipificam o composto químico florentina, esqueleto básico de diidrochalconas, similar ao identificado para substância S2 (figura 20).

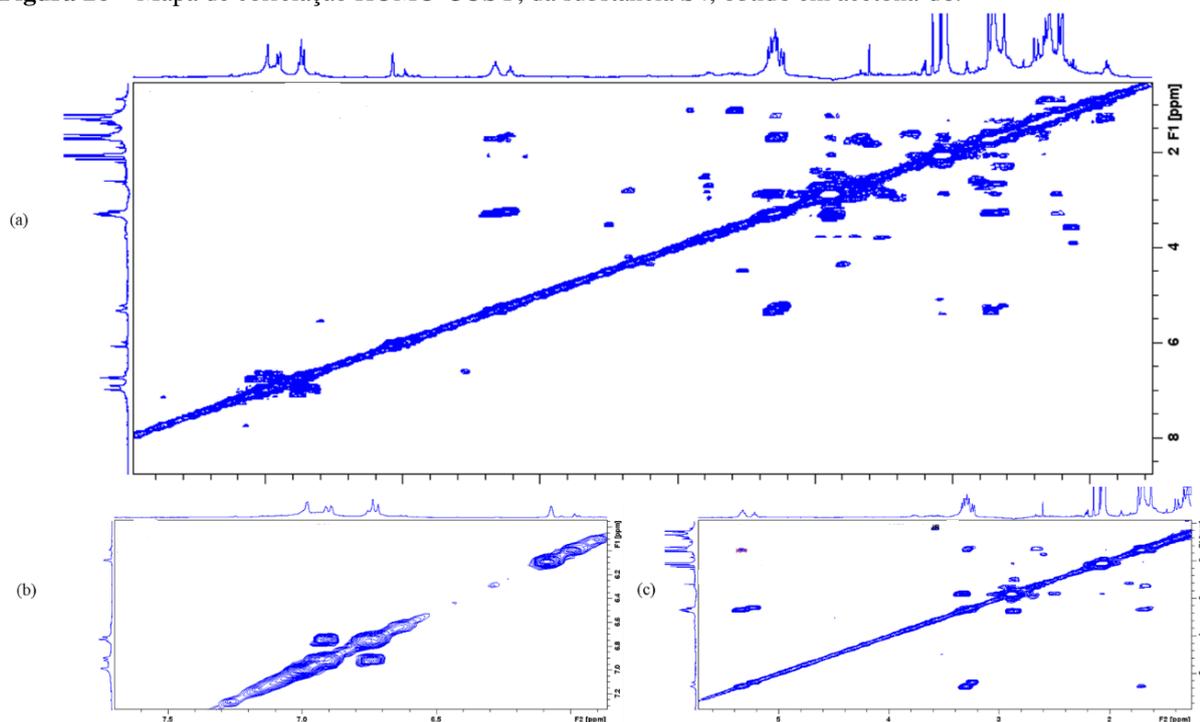
Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H , da substância S4, obtido em acetona- d_6 .



Legenda: (a) espectro de RMN ^1H ; (b) expansão de 5,0 a 7,0 ppm; (c) expansão de 1,0 a 3,5 ppm

Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

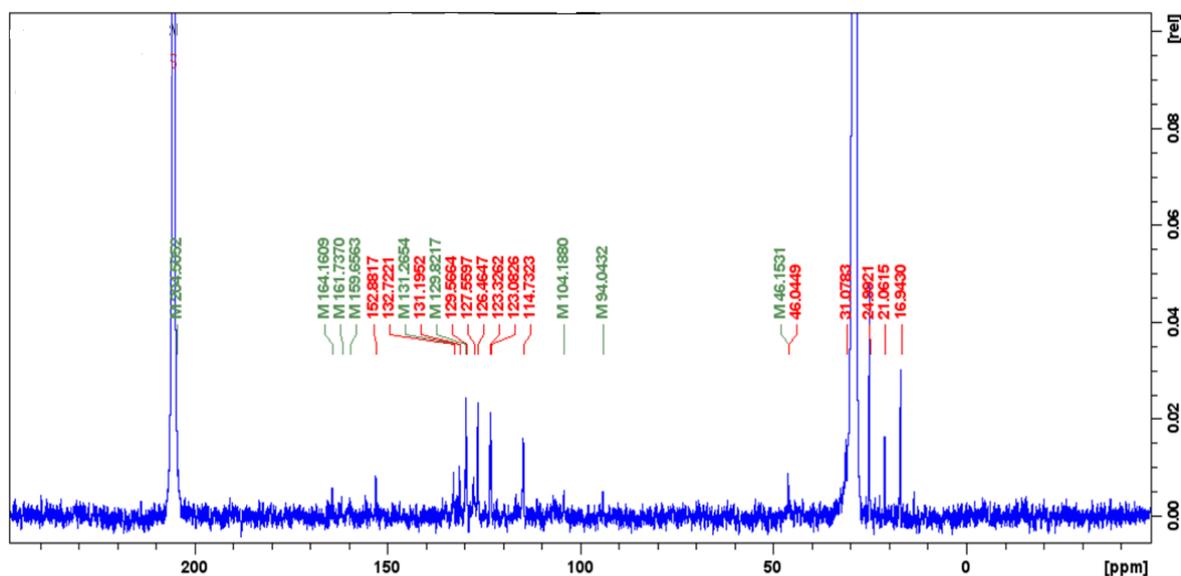
Figura 26 – Mapa de correlação HOMO-COSY, da substância S4, obtido em acetona-d6.



Legenda: (a) espectro de RMN ^1H ; (b) expansão de 5,0 a 8,0 ppm; (c) expansão de 1,0 a 3,5 ppm.

Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

Figura 27 – Espectro de RMN de ^{13}C , da substância S4, obtido em acetona-d6.



Legenda: Espectro de RMN ^{13}C , substância S4.

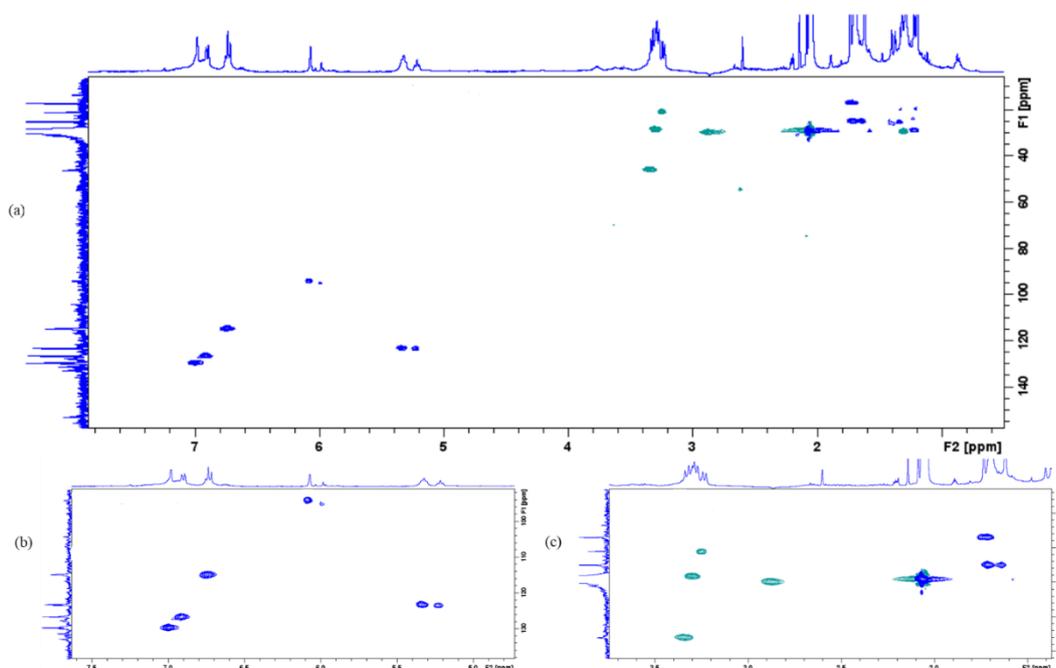
Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

Outros sinais observados no espectro de RMN ^1H e no mapa de correlação HOMO-COSY, indicam a presença de dois substituintes do tipo C-prenila, como os multipletos em δ_{H} 5,22 (*m*), em δ_{H} 3,29 (*m*), além destes, observou-se na região de hidrogênios ligados a carbonos alifáticos, C-sp³, sinais de três singletos, em δ_{H} 1,62 (*s*), δ_{H} 1,69 (*s*) e δ_{H} 1,73 (*s*), sendo que o singlete em δ_{H} 1,69 é um sinal intenso integrando para seis hidrogênios, característico de dois grupos de hidrogênios

metílicos equivalentes. Além destes, observou-se na região de hidrogênios ligados a carbonos oxidados ou grupos alcóxi, fenóxi e acilatos – 3,0 a 4,5 ppm, a presença de dois dupletos em δ_H 3,23 (d 7,1 Hz) e 3,28 (d 7,1 Hz) de hidrogênios metilênicos de cadeia aberta e vicinais, (figuras 25c e 26c).

O espectro de RMN ^{13}C (figura 27) e o mapa de correlação HSQC-Ed (figura 28), permitiram a identificação de 23 linhas espectrais, atribuídas a vinte e cinco átomos de carbono, pois, observou-se que o sinal, em δ_C 25,0 por apresentar a intensidade muito superior aos demais sinais, indicam que estes são referentes a três carbonos equivalentes. Após a análise do espectro de ^{13}C e da identificação das interações no mapa de correlação heteronuclear HSQC-Ed, foi possível determinar a forma com que os carbonos estão dispostos no composto S4, tendo assim apresentado quatro carbonos aromáticos hidrogenados (δ_C 94,0; 114,7; 126,5 e 129,6), quatro carbonos aromáticos oxidados (δ_C 152,9; 159,7; 161,7 e 164,2), quatro carbonos aromáticos totalmente substituídos (δ_C 104,2; 127,6; 132,3; e 132,7), dois carbonos olefínicos hidrogenados (δ_C 123,1 e 123,3), dois carbonos olefínicos totalmente substituídos (δ_C 131,2 e 129,8), quatro carbono metilênicos vicinais de cadeia aberta (δ_C 21,1; 28,2; 28,2; 31,1), quatro carbonos metílicos (δ_C 16,9; 25,0; 25,0; 25,0), além de uma carbonila de cetona (δ_C 204,5) (figuras 27 e 28, tabela 8).

Figura 28 – Mapa de correlação heteronuclear HSQC-Ed, da substância S4, obtido em acetona- d_6 .



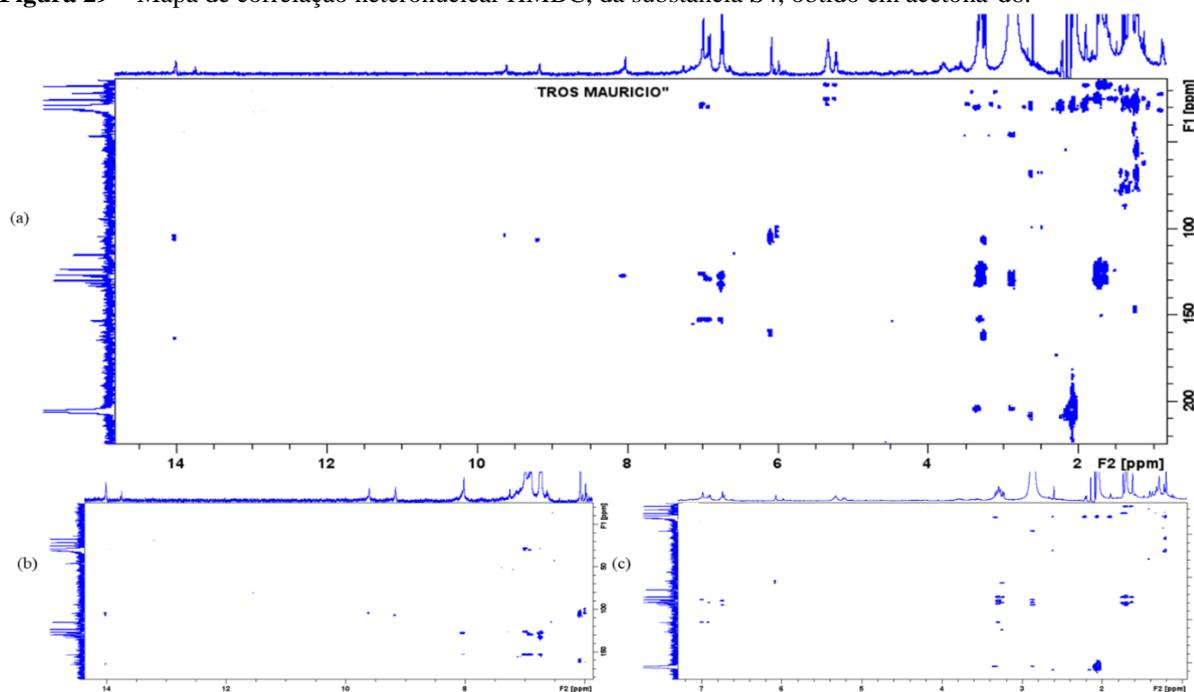
Legenda: (a) espectro de RMN 1H ; (b) expansão de 5,0 a 7,5 ppm; (c) expansão de 1,0 a 3,5 ppm.

Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

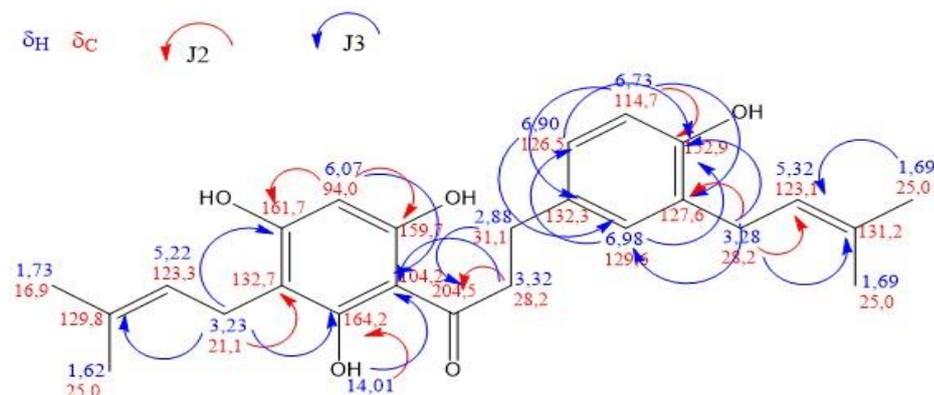
No mapa de correlação heteronuclear HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ($^{2,3}J_{\text{C,H}}$) (figuras 29) observou-se as correlações dos hidrogênios metilênicos de um dos substituintes *C*-prenílico, em δ_{H} 3,23 com os carbonos aromáticos oxidados em δ_{C} 164,2 (C-5) e 161,7 (C-7), além da correlação com o carbono aromático totalmente substituído, em δ_{C} 132,7 (C-6), o que permite determinar que um dos substituintes *C*-prenila está localizado no carbono C-6 do anel A da diidrochalcona. Da mesma forma, verificou-se para o segundo substituinte *C*-prenila as correlações dos hidrogênios metilênicos, em δ_{H} 3,28 com o carbono aromático oxidado, em δ_{C} 152,9 (C-4'), com o carbono aromático totalmente substituído, em δ_{C} 127,6 (C-3'), assim como, com o carbono aromático hidrogenado, em δ_{C} 129,6 (C-2'), o que permitiu determinar que o segundo substituinte *C*-prenila está localizado no carbono C-3' do anel B da diidrochalcona (figura 30).

Sendo assim, as análises dos dados espectrais de RMN do composto S4, permitiram identificá-lo como sendo um novo composto natural, denominado pela IUPAC por 1-(4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)-3-(5,7,9-triidroxi-6-(3-hidroxi-3-metilbutil)fenil)propan -3-ona (figura 31; tabela 8).

Figura 29 – Mapa de correlação heteronuclear HMBC, da substância S4, obtido em acetona- d_6 .

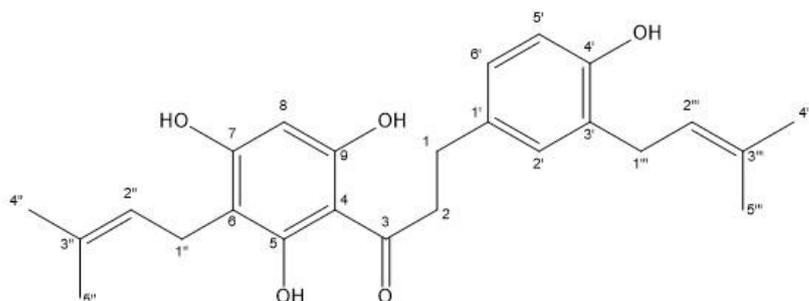


Legenda: (a) espectro de RMN ^1H ; (b) expansão de 5,0 a 7,5 ppm; (c) expansão de 1,0 a 3,5 ppm.
Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

Figura 30 – Correlações observadas no espectro HMBC, da substância S4, obtido em acetona-d₆.

Legenda: δ_C : sinais de Carbono, δ_H : sinais de Hidrogênio.

Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

Figura 31 – Estrutura química do composto S4.

1-(4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)-3-(5,7,9-triidroxi-6-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)propan-3-ona

Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

Tabela 8 – Dados espectrais de RMN ¹H e ¹³C do composto S4.

H/C	$\delta^1\text{H}$ (J/Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	COSY	HMBC
1	2,88 (<i>t</i> 7,8 Hz)	31,1	3,32	3,32; 6,90; 6,98
2	3,32 (<i>t</i> 7,8 Hz)	28,2	2,88	2,88
3	-	204,5	-	2,88; 3,32
4	-	104,2	-	3,32; 14,01; 6,07
5	-	164,2	-	14,01; 3,23
6	-	132,7	-	14,01; 3,23; 5,22; 6,07
7	-	161,7	-	6,07; 3,23
8	6,07 (<i>s</i>)	94,0	-	-
9	-	159,7	-	6,07
1'	-	132,3	-	2,88; 3,32; 6,90; 6,98; 6,73
2'	6,98 (<i>d</i> , 1,9 Hz)	129,6	6,90	6,90; 2,88; 3,28
3'	-	127,6	-	6,98; 3,28; 6,73; 5,32
4'	-	152,9	-	3,28; 6,73; 6,98; 6,90
5'	6,73 (<i>d</i> , 8,0 Hz)	114,7	6,90	6,90
6'	6,90 (<i>dd</i> , 8,0 e 1,9 Hz)	126,5	6,73; 6,98	6,73; 6,98; 2,88
1''	3,23 (<i>d</i> , 7,1 Hz)	21,1	5,22	5,22
2''	5,22 (<i>m</i>)	123,3	1,62; 1,73; 3,23	1,62; 1,73; 3,23
3''	-	129,8	-	5,22; 1,62; 1,73; 3,23
4''	1,73 (<i>sl</i>)	16,9	-	5,22; 1,62
5''	1,62 (<i>sl</i>)	25,0	-	5,22; 1,73
1'''	3,28 (<i>d</i> , 7,1 Hz)	28,2	5,32	6,98; 5,32
2'''	5,32 (<i>m</i>)	123,1	1,69; 3,28	1,69; 3,28
3'''	-	131,2	-	1,69; 5,32; 3,28
4'''	1,69 (<i>s</i>)	25,0	5,32	5,32; 1,69
5'''	1,69 (<i>s</i>)	25,0	5,32	5,32; 1,69
OH	14,01 (<i>s</i>)	-	-	-

Legenda: dados espectrais obtidos em acetona, d₆.

Fonte: Dados da pesquisa, (2023).

6. CONCLUSÃO

As análises preliminares dos perfis químico, cromatográfico e espectroscópico dos microextratos, obtidos com acetato de etila, etanol 96% e etanol 70%, das folhas de *M. flavida*, tendo, os cromatogramas obtidos por CLAE, bem como, os cromatogramas e perfil químico por CCDAE, indicaram aspectos qualitativos semelhantes, em que foi possível identificar em ambos os extratos a presença de classes fitoquímicas já relatadas para a espécie como terpenos e cumarinas, assim como indicou a presença de substâncias da classe dos flavonóides, fato este, inédito para a espécie. Os microextratos apresentaram semelhanças de substâncias, que foi confirmada pela análise do perfil espectroscópico por RMN ^1H , em que estes extratos diferiram apenas pelo aspecto quantitativo destes, ou abundância (integral na área dos sinais).

A análise da capacidade antioxidante dos microextratos por bioautografia através do perfil químico por CCDAE, com solução de radicais DPPH $^{\bullet}$, permitiu identificar qualitativamente através da observação da intensidade da cor das reações de sequestro de radicais DPPH $^{\bullet}$, que todos os microextratos apresentaram atividade antioxidante, sendo, o microextrato etanol 70% o que apresentou maior intensidade da cor indicativa d o sequestro dos radicais livres.

Os microextratos (acetato de etila, etanol 96% e etanol 70%) e o extrato macerado de etanol 70%, também foram submetidos ao teste antimicrobiano frente as cepas *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, permitindo dizer que os extratos têm potencial antimicrobiano, sendo o microextrato acetato de etila e o extrato macerado etanol 70% apresentaram as melhores Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) para ação bacteriostática e Concentrações Mínimas Bactericida (CMB) entre os extratos testados.

O fracionamento por SPE do extrato etanólico 70% macerado, resultou em 23 frações bem distintas, dentre as quais a fração 60% V1 foi selecionada para continuidade do trabalho, pois, era compreendida pelos principais picos do extrato estudado. O desenvolvimento do método cromatográfico por CLAE, para a purificação das substâncias da fração 60% V1, resultou no isolamento de cinco substâncias (S1 a S5). Após a análise minuciosa dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e das correlações bidimensionais HOMO-COSY, HSQC-Ed e HMBC, foi possível elucidar as estruturas químicas dos compostos S2 e S4, como sendo, das diidrochalconas: (S2) 3-(4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)-1-(2,4,6-triidroxi-3-(3-hidroxi-3-tilbutil)fenil)propana1-ona e (S4) 3-(4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)-1-(2,4,6-triidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)propan-1-ona. Após a investigação minuciosa da literatura, através das plataformas Scifinder e PubChem, foi

possível concluir que as substâncias S2 e S4 tratam-se de dois novos compostos naturais, isolados pela primeira de plantas.

Portanto, a presente pesquisa com as folhas de *Metrodorea flavida*, contribui com os aspectos importantes para o estudo fitoquímico da espécie, em que foi relatada a presença de classes químicas importantes, como flavonoides, assim como, traz a contribuição para a química de produtos naturais, onde foram identificados dois novos metabólitos secundários de plantas.

REFERÊNCIAS

ANJOS, Maricelia Lopes et al. Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana e antiproliferativa de chalconas e derivados-in vitro. 2020.

BAETAS, Ana Cristina S. et al. Coumarins from *Metrodorea flavida*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 2, p. 491-493, 1996.

BAETAS, Ana Cristina S. et al. Coumarins and Alkaloids from the Stems of *Metrodorea flavida*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, p. 181-183, 1999.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BOTELHO, Anderson de Santana et al. First report of phenolic compounds isolated from *Inga stipularis* DC. (fabaceae) leaves. **Natural Product Research**, p. 1-4, 2022.

BURGER, Marcela C. de Melo et al. Structures and Bioactivities of Dihydrochalcones from *Metrodorea stipularis*. **Journal of natural products**, v. 77, n. 11, p. 2418-2422, 2014.

CASS, Quezia B.; DEGANI, Ana Luiza Gusmão. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. EdUFSCar, 2019.

CERQUEIRA, Cristovam do Nascimento. Estudo fitoquímico e quimiosistemático de *Galipea*, *Swinglea* (Rutaceae) e avaliação do potencial biológico dos compostos isolados. 2011.

CRUZ, Rafael et al. Phylogenetic analysis and evolution of morphological characters in *Metrodorea* and related species in Rutoideae (Rutaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 303, p. 927-943, 2017.

DA CRUZ MONTEIRO, Siomara; BRANDELLI, Clara Lia Costa. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. Artmed Editora, 2017.

DE FREITAS, Felipe Augusto Marques; LIMA, Renato Abreu. Um estudo bibliográfico sobre a *Ruta graveolens* L. (RUTACEAE). **Biodiversidade**, v. 20, n. 3, 2021.

DEWICK, Paul M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002.

DIAS, Pedro et al. A new species of *Metrodorea* (Rutaceae) from Brazil: morphology, molecular phylogenetics, and distribution. **Phytotaxa**, v. 117, n. 2, p. 35-41, 2013.

DOS SANTOS, Kyouk Isabel Portilho et al. Metabolomics techniques applied in the investigation of phenolic acids from the agro-industrial by-product of *Carapa guianensis* Aubl. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 103421, 2021.

DUARTE, Geane Karla Gonçalves Ferreira et al. Potencial tóxico das folhas de *esenbeckia pumila* Pohl (Rutaceae). 2017.

FLAMBÓ, Diana Filipa Afonso Lopes Peres. **Atividades biológicas dos flavonoides: Atividade antimicrobiana**. 2013. Tese de Doutorado.

FRANCO, Maria Júlia Camillo Silva; ALBIERO, Adriana Lenita Meyer. Estruturas secretoras em folha e caule de *Esenbeckia febrifuga* (A. St.-Hil.) A. Juss. ex Mart. e *Esenbeckia grandiflora* Mart.(Rutaceae). **Hoehnea**, v. 45, p. 468-483, 2018.

GROPPO, Milton et al. Phylogeny of Rutaceae based on twononcoding regions from cpDNA. **American Journal of Botany**, v. 95, n. 8, p. 985-1005, 2008.

MADEIRO, Sara Alves Lucena. Contribuição ao conhecimento fitoquímico e biológico de duas espécies de rutaceae da flora paraibana. 2016. 187 f. Tese Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

MARIN, Fernis J. et al. Estudio fitoquímico y evaluación del potencial leishmanicida de la especie *Esenbeckia litoralis* (Rutaceae). **Información tecnológica**, v. 27, n. 1, p. 159-168, 2016.

MARIN SEVERICHE, Fernis José et al. Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante de *Esenbeckia litoralis* Donn. Sm. (Loro grande). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 4, p. 1-12, 2016.

MASCARINI, Eloisa Salvador; GARLET, Juliana; FOLLI-PEREIRA, Muriel Da Silva. *Metrodorea flavida* (K. Krause) Extracts in Pathogen Control of *Senegalia polliphyla* (Dc.) Seeds. **International Journal of Plant & Soil Science**, v. 32, n. 15, p. 1-7, 2020.

Metrodorea A.St.-Hil. No Secretariado do GBIF (2022). GBIF Backbone Taxonomia. Conjunto de dados da lista de verificação <https://doi.org/10.15468/39omei> acessado via GBIF.org em 29.07.2023.

MÜLLER, Adolfo H. et al. Dihydrochalcones, coumarins and alkaloids from *Metrodorea nigra*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1797-1800, 1995.

MUNTOREANU, Thais Gomes; DA SILVA CRUZ, Rafael; MELO-DE-PINNA, Gladys Flávia. Comparative leaf anatomy and morphology of some neotropical Rutaceae: *Pilocarpus* Vahl and related genera. **Plant systematics and evolution**, v. 296, p. 87-99, 2011.

MURIBECA, Abraão de Jesus B. Et al. Antibacterial activity from *Momordica charantia* L. leaves and flavones enriched phase. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 9, p. 1796, 2022.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard**. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2003.

OLIVEIRA, T. de F. et al. Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da **Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia**. 2009.

OSÓRIO, Thaís Moreira et al. Atividade antimicrobiana de chalconas e hidrazonas frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina. 2012.

PAVIA, Donald L. et al. Introdução à espectroscopia: Tradução da 5ª edição norte-americana. São Paulo: **Cengage Learning**, 2021.

PEREIRA, Renata Junqueira; DAS GRAÇAS CARDOSO, Maria. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PERNIN, Renaud et al. Coumarins from the roots and stem bark of *Metrodorea flavida*. **Biochemical systematics and ecology**, v. 27, n. 5, p. 531-533, 1999.

PINHEIRO, W. B. S. Estudo do potencial de aproveitamento do resíduo madeireiro da espécie *Bagassa guaaaianensis* aubl. Tese Doutorado em Química Orgânica - Universidade Federal do Pará, Belém, 2021.

PINHEIRO, W. B. S. et al. The use of *Bagassa guianensis* aubl. forestry waste as an alternative for obtaining bioproducts and bioactive compounds. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 6, p. 103813, 2022.

PIRANI, José Rubens; GROPPPO, Milton. Rutaceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB814>>. Acesso em: 29 jul. 2023.

SALAZAR, M. A. R. et al. Chemical composition, antioxidant activity, neuroprotective and anti-inflammatory effects of cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) extracts obtained from supercritical extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 138, p. 36-45, 2018.

SANCHES, Laura Araujo et al. Extracts of native forest species of the southern amazon in the control of *Aphis craccivora* koch (Hemiptera: aphididae). **Bioscience Journal**, v. 37, n. e37018, p. 1981-3163, 2021.

SANTANA, Ana Maura Lago. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia–UESB Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação–PPGGBC. 2012.

SANTOS, D. Y. A. C. Biossíntese, Funções e Aplicações dos Metabólitos Secundários de Plantas. 1. ed. Curitiba: **Editora e Livraria Appris**, 2020. v. 1. 401p.

SARAIVA FILHO, Daniel Eugenio et al. Compostos químicos isolados de extratos e óleos essenciais do gênero *Zanthoxylum Linnaeus* (Rutaceae) e seu potencial antimicrobiano. **Hoehnea**, v. 47, 2020.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016.

VASCONCELOS, Thiago Brasileiro et al. Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo? **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 3, 2014.

VIEGAS JR, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan da Silva; BARREIRO, Eliezer J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drugs Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2ª Ed. Munique, Alemanha: Springer. 2001.

ZHOU, Kang et al. Complementary flavonoid prenylations by fungal indole prenyltransferases. **Journal of natural products**, v. 78, n. 9, p. 2229-2235, 2015.