



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE - UERN  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS - FANAT  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS - PPGCN  
MESTRADO EM CIÊNCIAS NATURAIS – MCN



IVANILMA SOARES DA SILVA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DA ESPÉCIE *Marsdenia  
megalantha* GOYDER & MORILLO**

MOSSORÓ - RN

2019

IVANILMA SOARES DA SILVA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DA ESPÉCIE *Marsdenia  
megalantha* GOYDER & MORILLO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais (PPGCN) da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais.

Área de Concentração: Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Di Souza.

MOSSORÓ – RN

2019

© Todos os direitos estão reservados a Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do(a) autor(a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu(a) respectivo(a) autor(a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

**Catálogo da Publicação na Fonte.**  
**Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.**

S586e Silva, Ivanilma Soares da  
ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DA ESPÉCIE  
Marsdenia megalantha Goyder & Morillo. / Ivanilma Soares  
da Silva. - Mossoró - RN, 2019.  
91p.

Orientador(a): Prof. Dr. Luiz di Souza.  
Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Naturais). Universidade do  
Estado do Rio Grande do Norte.

1. Marsdenia megalantha. 2. prospecção fitoquímica.  
3. atividades biológicas. 4. isolamento. I. Souza, Luiz di. II.  
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. III.  
Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pela Diretoria de Informatização (DINF), sob orientação dos bibliotecários do SIB-UERN, para ser adaptado às necessidades da comunidade acadêmica UERN.

**IVANILMA SOARES DA SILVA**

**Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais - PPGCN, da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte - UERN, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais.**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DA ESPÉCIE *Marsdenia megalantha* GOYDER & MORILLO**

**Aprovada em: 31/05/2019**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Luiz di Souza  
Departamento de Química – UERN  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Zilvam Melo dos Santos  
Departamento de Engenharia e Tecnologia – UFERSA  
(1º Examinador)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Guymmann Clay da Silva  
Departamento de Ciência e Tecnologia – UFERSA  
(2º Examinador)

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter guiado este trabalho, pela proteção divina em todos os meus caminhos, por ter colocado em minha vida pessoas tão especiais, e por todas as bênçãos concedidas.

À minha princesa linda e amada filha, **Lara Mirelle**, por todo amor! Você é o motivo pelo qual me torno forte. É por você e sempre será por você que lutarei para conquistar muito além!

Aos meus pais, **Ivanilda** e **Antonio Francisco**, por me apoiarem neste sonho. Pela torcida para que eu conseguisse conquistá-lo e pelo amor de sempre! Especialmente a minha mãe por me ajudar cuidando da minha filha durante minha ausência.

À minha irmã, **Ivoneide** por está sempre do meu lado torcendo por mim, e por seu amor, carinho e amizade. E ainda por ter ajudado cuidando da minha filha.

Ao meu esposo **Bekyman** por todo apoio, amor, incentivo e compreensão a minha ausência em nossa casa durante muito tempo nestes dois últimos anos.

Ao professor **Francisco Arnaldo Viana**, pela valiosa orientação, pela gentileza e paciência com que me trata sempre, pela oportunidade de ter sido sua aluna e pelos ensinamentos e motivação.

Ao professor **Jaécio Carlos Diniz**, a quem agradeço de todo meu coração! Por ter coletado a planta, me ajudado na pesquisa bibliográfica que fundamentou este trabalho e no delineamento de toda a parte experimental. Por ter abdicado de seu tempo para me ensinar, indo para a bancada comigo inúmeras vezes para me orientar e ajudar na parte experimental. Foram grandes ensinamentos! És um educador admirável!

À minha amiga, técnica de laboratório de Química Orgânica, e colaboradora deste trabalho, **Simone Alves Serafim Rocha**, por ser tão boa comigo, compreensível, atenciosa e amável. Por ter me orientado na parte experimental de preparação e fracionamento dos extratos, também por ter conseguido a parceria com o laboratório da UFRN para a realização das análises de RMN.

A minha amiga **Williane**, técnica de laboratório de Química, por todo incentivo, amizade e contribuições em minha formação desde a graduação até hoje. És uma pessoa encantadora, gentil, e uma amiga muito especial.

Aos colegas de laboratório e parceiros de trabalho, **Lucas Costa** e **Lucas Hilário**, pela ajuda na parte experimental, pelas conversas e momentos de descontração em meio ao trabalho árduo.

Ao técnico de laboratório de Biologia, **Francisco Fábio Mesquita**, por ter coletado a planta juntamente com o professor Jaécio. Pelos registros fotográficos da espécie *M. megalantha*, assim como, pela contribuição na preparação da exsicata da espécie coletada.

Ao professor **Alessandro Rapini** da Universidade Estadual de Feira de Santana - BA pela identificação da planta.

À professora **Renata Mendonça Araújo** e a técnica de laboratório **Elania**, da Central Analítica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), por realizarem a análise de RMN de alguns compostos isolados.

À Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, e do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), da Universidade Federal do Ceará, pela realização da análise de RMN de alguns compostos isolados.

Ao professor **Francisco Marlon Carneiro Feijó** e ao técnico **Caio Sérgio Santos**, pelo ensaio de atividade antimicrobiana realizado no Laboratório de Microbiologia Veterinária – UFERSA. E à professora **Gardênia Silvana de Oliveira Rodrigues**, deste mesmo laboratório, pela ajuda no tratamento estatístico dos dados.

À professora **Silvana Saker-Sampaio** do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará e a suas alunas **Karolina Costa de Sousa** e **Márcia Barbosa de Sousa**, pela realização dos ensaios antioxidantes.

Ao **programa de Pós-graduação em Ciências Naturais (PPGCN)** e a **Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN)** pela oferta do curso de mestrado e oportunidade de alcançar maiores conhecimentos.

À **Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo financiamento da bolsa e incentivo à Ciência.

*Obrigada!*

*“Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível”.*

Charles Chaplin.

## RESUMO

Este trabalho apresenta uma investigação química e biológica sobre a espécie *Marsdenia megalantha*, realizada a partir da identificação e isolamento de alguns dos constituintes químicos dos seus extratos hidroalcoólicos, assim como pela avaliação de algumas das suas atividades biológicas. Neste propósito, o vegetal foi coletado e os extratos hidroalcoólicos de suas folhas, caules e raízes foram preparados. Realizou-se, posteriormente, a prospecção fitoquímica destes extratos vegetais a fim de se estimar os principais grupos de constituintes químicos que os compõem. Os extratos obtidos das folhas, galhos, e raízes, foram submetidos a ensaios de atividade antioxidante e o extrato das raízes submetido ainda a uma avaliação de sua atividade antimicrobiana. Logo após, realizou-se o fracionamento cromatográfico dos extratos das raízes e galhos, o monitoramento cromatográfico de suas frações por CCD, o isolamento de alguns constituintes químicos por CC e CLAE, a verificação da pureza destes constituintes por análise em CCD e CLAE, e a análise estrutural dos compostos isolados a partir dos dados espectrais de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) uni e bidimensionais. A prospecção fitoquímica revelou à presença de grupos esteróides e saponinas em todos os extratos, a presença de taninos somente no extrato proveniente das folhas, e de fenóis, triterpenóides, antocianinas, antociadinas e flavonóides exclusivamente no extrato obtido das raízes. O extrato hidroalcoólico obtido das raízes apresentou atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, sendo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) determinada como 3,4 mg/mL, e atividade contra *Enterococos faecalis* e *Shigella flexneri* estimadas como inferiores a 1,7 mg/mL para ambas as espécies. Os ensaios de atividade antioxidante indicaram que estes extratos apresentam diferentes atividades antioxidantes em diferentes sistemas de avaliação, tendo apresentado os melhores resultados na capacidade de inibição da oxidação lipídica no teste com o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Foram isoladas dois compostos do extrato das raízes (*C01RMM* e *C02RMM*) e três a partir do extrato dos galhos (*C01GMM*, *C02GMM* e *C03GMM*). Os compostos *C01RMM* e *C01GMM* tratando-se de dois triterpenóides ausentes de unidades osídicas, e os compostos *C02RMM*, *C02GMM* e *C03GMM* sendo três glicosídeos esteroidais com o grupo cinanoil ligado à suas estruturas.

**Palavras-chaves:** *Marsdenia megalantha*, prospecção fitoquímica, atividades biológicas, isolamento.

## ABSTRACT

This paper presents a chemical and biological investigation of the species *Marsdenia Megalantha*, carried out from the identification and isolation of some of the chemical constituents of its hydroalcoholic extracts, as well as by the evaluation of some of their biological activities. In this purpose, the plant was collected and the hydroalcoholic extracts of its leaves, stems and roots were prepared. The phytochemical prospecting of these plant extracts was subsequently carried out in order to estimate the main groups of chemical constituents that compose them. The extracts obtained from leaves, twigs, and roots were subjected to antioxidant activity assays and the root extract was also submitted to an evaluation of its antimicrobial activity. Soon after, the chromatographic fractioning of the extracts of the roots and branches was performed, the chromatographic monitoring of its fractions by TLC, the isolation of some chemical constituents by CC and HPLC, the verification of the purity of these constituents by analysis in TLC and HPLC, and the structural analysis of the compounds isolated from the spectral data of hydrogen ( $^1\text{H}$  NMR) and carbon 13 ( $^{13}\text{C}$  NMR) uni and two-dimensional. The phytochemical prospecting revealed the presence of steroid and saponin groups in all extracts, the presence of tannins only in the extract from the leaves, and of phenols, triterpenoids, anthocyanins, antociadines and flavonoids exclusively in the extract obtained from the roots. The hydroalcoholic extract obtained from the roots showed antimicrobial activity on *Staphylococcus aureus*, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as 3,4 mg/mL, and activity against *Enterococci faecalis* and *Shigella Flexneri* estimated as lower than 1,7 mg/mL for both species. The antioxidant activity tests indicated that these extracts present different antioxidant activities in different evaluation systems, having presented the best results in the ability to inhibit the lipid oxidation in the test with the  $\beta$ -Caroteno/linoleic acid system. Two compounds were isolated from the root extract (*C01RMM* and *C02RMM*) and three from the branches extract (*C01GMM*, *C02GMM* and *C03GMM*). The compounds *C01RMM* and *C01GMM* were two triterpenoids absent from osidic units, and the compounds *C02RMM*, *C02GMM* and *C03GMM* being three steroidal glycosides with the Cinanoil group attached to their structures.

**Keywords:** *Marsdenia megalantha*, phytochemical prospecting, biological activities, isolation.

## LISTA DE SIGLAS/ABREVIACÕES

**CCD** – Cromatografia em Camada Delgada

**HPLC** - High performance liquid chromatography

**C01RMM** – Composto 01 isolado das raízes da *M. megalantha*

**C02RMM** – Composto 02 isolado das raízes da *M. megalantha*

**C01GMM** - Composto 01 isolado dos galhos da *M. megalantha*

**S02GMM** - Composto 03 isolado dos galhos da *M. megalantha*

**S03GMM** - Composto 03 isolado dos galhos da *M. megalantha*

**RMN <sup>1</sup>H** – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

**RMN <sup>13</sup>C** - Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13

**DEPT** - Distortionless Enhancement of Polarization Transfer

**FTIR** - Fourier-transform infrared spectroscopy

**EM** - Espectrometria de Massa

**CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**EFMM** - Extrato obtido das folhas da *M. megalantha*

**ERMM** – Extrato obtido das raízes da *M. megalantha*

**EGMM** - Extrato obtido dos galhos da *M. megalantha*

**HCl** – Ácido Clorídrico

**NaOH** – Hidróxido de Amônio

**pH** - Potencial Hidrogeniônico

**NH<sub>4</sub>OH** – Hidróxido de amônio

**KOH** – Hidróxido de Potássio

**UV** – Radiação Ultravioleta

**ATCC** - American Type Culture Collection

**LD<sub>50</sub>** - Median lethal dose

**PTFE** - Politetrafluoretileno

**TFA** - Ácido trifluoroacético

**FHEX 100 %** – Fração obtida com hexano

**FDCM 100 %** - Fração obtida com diclorometano

**FDCM/MeOH 1 %** - Fração obtida com diclorometano/metanol 1 %

**FDCM/MeOH 2 %** - Fração obtida com diclorometano/metanol 2 %

**FDCM/MeOH 3 %** - Fração obtida com diclorometano/metanol 3 %

**FDCM/MeOH 5 %** - Fração obtida com diclorometano/metanol 5 %

**FDCM/MeOH 10 %** - Fração obtida com diclorometano/metanol 10 %

**FDCM/MeOH 20 %** - Fração obtida com diclorometano/metanol 20 %

**FDCM/MeOH 50 %** - Fração obtida com diclorometano/metanol 50 %

**FMeOH 100 %** - Fração obtida com metanol

**FH<sub>2</sub>O 100 %** - Fração obtida com água

**CC** – Cromatografia em coluna

**F(DCM100-DCM/MeOH1e2)** – Fração obtida da reunião de FDCM 100 % e das frações FDCM/MeOH 1 e 2 %

**F5-11(H)** – Fração de 5-11 obtida da percolação com Hexano

**F12-15 (A)** - Fração de 12-15 obtida da percolação com Acetonitrila

**F1P1** – Fração 1 da placa 1

**F2P1** – Fração 2 da placa 1

**F3P1** – Fração 3 da placa 1

**F1P2** – Fração 1 da placa 2

**F2P2** – Fração 2 da placa 2

**F3P2** – Fração 3 da placa 2

**F1P3** – Fração 1 da placa 3

**F2P3** – Fração 2 da placa 3

**F3P3** - Fração 3 da placa 3

**FIP<sub>1,2,3</sub>** - Fração obtida da junção das frações “1” das placas 1, 2 e 3.

***F2P<sub>1,2,3</sub>*** - Fração obtida da junção das frações “2” das placas 1, 2 e 3.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Marsdenia</i> encontradas no Brasil .....	22
Tabela 2 - Levantamento de metabólitos presentes em espécies de <i>Marsdenia</i> . .....	26
Tabela 3 - Avaliação de antocianinas, antocianidinas e flavonóis. ....	32
Tabela 4 - Avaliação de leucoantrocianidinas, catequinas e flavanonas. ....	33
Tabela 5 - Diluições seriadas do <i>ERMM</i> para técnica de avaliação antimicrobiana por microdiluição em caldo .....	36
Tabela 6 - Dados das frações obtidas da coluna filtrante do <i>ERMM</i> . ....	43
Tabela 7 - Reunião das frações obtidas do fracionamento de <i>F(Dcm100-Dcm/MeOH1e2)</i> ....	44
<b>3.3</b> Tabela 8 - Frações obtidas após percolação com Hexano/Acetonitrila .....	45
Tabela 9 - Frações obtidas da <i>F12-15(A)</i> por CCD preparativa .....	48
Tabela 10 - Dados das frações obtidas da coluna filtrante do <i>EGMM</i> .....	50
Tabela 11 - Frações obtidas a partir da fração <i>DCM 100%</i> do <i>EGMM</i> .....	51
Tabela 12 - Reunião das frações obtidas do fracionamento de <i>FDCM/MeOH 2%</i> .....	53
Tabela 13 - Massas e rendimentos obtidos para os extratos hidroalcoólicos da <i>M. megalantha</i> <b>3.4</b> .....	58
Tabela 14 - Metabólitos identificados nos extratos hidroalcoólicos das folhas, galhos e raízes da <i>M. megalantha</i> . ....	59
Tabela 15 – Comparação estatística entre as leituras das absorvâncias nos diferentes tratamentos nos tempos 0 e 24h ..	63
Tabela 16 – Sinais característicos de carbono Aromático/Oleifinico obtidos no espectro RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) para o <i>C02RMM</i> . ....	75
Tabela 17 – Sinais característicos de carbono Aromático/Oleifinico obtidos no espectro RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) para o <i>C02GMM</i> . ....	81
Tabela 18 – Comparação entre os sinais espectrais característicos de diferentes tipos de carbono exibidos nos espectros de RMN <sup>13</sup> C para o <i>C02GMM</i> e <i>C03GMM</i> com encontrados na literatura. ....	84

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia ilustrando flor (a), folhas (b), raízes (c) e galhos (d) da espécie <i>M. megalantha</i> .....	24
Figura 2 - Espécie <i>M. megalantha</i> separada para confecção da Exsicata .....	29
Figura 3 - Esquema geral de obtenção dos extratos hidroalcoólicos da <i>M. Megalantha</i> .....	30
Figura 4 - Rota do fracionamento cromatográfico do <i>ERMM</i> .....	43
Figura 5 - Rota esquemática do fracionamento da <i>F(Dcm100-Dcm/MeOH1e2)</i> seguida de percolação com Hexano/acetonitrila. ....	45
Figura 6 - Rota de isolamento de <i>C01RMM</i> a partir do fracionamento de <i>F5-11(H)</i> . ....	47
Figura 7 - Rota de isolamento de <i>C02RMM</i> a partir do fracionamento da <i>F12-15(A)</i> .....	49
Figura 8 - Rota de fracionamento cromatográfico do <i>EGMM</i> .....	50
Figura 9 - Rota de isolamento de <i>C01GMM</i> a partir da <i>FDCM 100%</i> do <i>EGMM</i> .....	52
Figura 10 - Cromatograma da fração <i>F14-16</i> obtida da <i>FDCM/MeOH 2%</i> do <i>EGMM</i> .....	54
Figura 11 - Rota esquemática do isolamento de <i>C02GMM</i> e <i>C03GMM</i> a partir do fracionamento de <i>FDCM/MeOH 2%</i> obtida do <i>EGMM</i> .....	55
Figura 12 - Cromatograma da substância <i>C02GMM</i> isolada a partir da <i>F14-16</i> .....	56
Figura 13 - Cromatograma da substância <i>C03GMM</i> isolada a partir da <i>F14-16</i> .....	56
Figura 14 - Resultados dos testes fitoquímicos para o <i>ERMM</i> .....	60
Figura 15 - Capacidade de sequestro do radical DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazila) do ácido ascórbico e dos extratos <i>EMMF</i> , <i>EMMG</i> e <i>EMMR</i> , em diferentes concentrações .....	65
Figura 16 - Poder de quelação de íons ferroso (FIC) do EDTA e dos extratos <i>EMMF</i> , <i>EMMG</i> e <i>EMMR</i> em diferentes concentrações .....	66
Figura 17 -Poder de redução de íons férricos (FRAP) do BHA e dos extratos <i>EMMF</i> , <i>EMMG</i> e <i>EMMR</i> em diferentes concentrações.....	67
Figura 18 - Atividade inibitória do branqueamento do $\beta$ -caroteno (BCB) do BHA e dos extratos <i>EMMF</i> , <i>EGMM</i> e <i>EMMR</i> em diferentes concentrações. ....	68

Figura 19 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto <i>C01RMM</i> . .....	70
Figura 20 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (DEPT 135, 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto <i>C01RMM</i> ....	70
Figura 21 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto <i>C01RMM</i> .....	71
Figura 22 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto <i>C02RMM</i> .....	72
Figura 23 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ [COSY, 300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ] do composto <i>C02RMM</i> .....	73
Figura 24 - Estrutura do grupo Cinamoil. ....	73
Figura 25 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto ou <i>C02RMM</i> .....	74
Figura 26 - Ressonância do grupo cinamoil .....	76
Figura 27 - Teste para terpenoides do <i>C01GMM</i> (Lieberman-Burchard).....	77
Figura 28 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (APT, 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto <i>C01GMM</i> .....	78
Figura 29 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto <i>C01GMM</i> .....	78
Figura 30 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto <i>C02GMM</i> .....	79
Figura 31 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (COSY, 300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto <i>C02GMM</i> .....	80
Figura 32 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto <i>C02GMM</i> .....	81
Figura 33 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto <i>C03GMM</i> .....	83
Figura 34 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto <i>C03GMM</i> .....	83

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	Geral.....	20
2.2	Específicos.....	20
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3.1	Aspectos Botânicos.....	21
3.1.1	Considerações sobre a família Apocynaceae.....	21
3.1.2	Considerações sobre o gênero <i>Marsdenia</i> .....	22
3.1.3	Considerações sobre a espécie <i>M. megalantha</i> .....	23
3.2	Estudos sobre a química do gênero <i>Marsdenia</i> .....	25
3.5	Estudos biológicos sobre o gênero <i>Marsdenia</i> .....	27
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	29
4.1	Coleta e identificação botânica do material vegetal.....	29
4.2	Processamento do material vegetal e obtenção dos extratos hidroalcoólicos.....	30
4.3	Análise fitoquímica preliminar dos extratos brutos.....	31
4.3.1	Teste para fenóis e taninos.....	31
4.3.2	Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.....	32
4.3.3	Teste para leucoantrocianidinas, catequinas e flavanonas.....	32
4.3.4	Teste para flavonóis, flavononas, flavanonóis e xantonas.....	33
4.3.5	Teste para esteróides e triterpenóides (Lieberman-Burchard).....	33
4.3.6	Teste para saponinas (Espuma).....	34
4.3.7	Teste para alcalóides.....	34
4.3.8	Teste para quinonas.....	34
4.3.9	Teste para cumarinas.....	35
4.4	Estudo biológico dos extratos hidroalcoólicos <i>EFMM</i> , <i>EGMM</i> e <i>ERMM</i> .....	35
4.4.1	Atividade antimicrobiana.....	35
4.4.2	Atividade Antioxidante.....	37
4.4.2.1	Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....	37
4.4.2.2	Habilidade de quelação de íons ferrosos (FIC).....	38
4.4.2.3	Poder de redução de íons férricos (FRAP).....	39
4.4.2.4	Branqueamento do $\beta$ -caroteno (BCB).....	39
4.4.2.5	Análises estatísticas.....	40

4.5 Métodos Cromatográficos.....	40
4.5.1 Cromatografia de adsorção em coluna (CC).....	41
4.5.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) .....	41
4.5.3 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa .....	41
4.5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	42
4.6 Fracionamento cromatográfico do extrato hidroalcoólico <i>ERMM</i> .....	42
4.6.1 Fracionamento cromatográfico da fração <i>F(DCM100-DCM/MeOH1e2)</i> e percolação das frações <i>F5-8, F9-11, F12-15</i> e <i>F16-26</i> obtidas. ....	44
4.6.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração <i>F5-11(H)</i> .....	46
4.6.1.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração <i>F13-15</i> e isolamento da substância <i>C01RMM</i> .....	46
4.6.1.2 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa da fração <i>F12-15 (A)</i> .....	47
4.6.1.2.1 Fracionamento cromatográfico da fração <i>FIP<sub>1,2,3</sub></i> e isolamento da substância <i>C02RMM</i> .....	48
4.7 Fracionamento cromatográfico do extrato hidroalcoólico dos galhos .....	49
4.7.1 Fracionamento cromatográfico da fração <i>FDCM 100%</i> e isolamento de <i>C01GMM</i> .....	51
4.7.2 Fracionamento cromatográfico da fração <i>FDCM/MeOH 2%</i> e isolamento de <i>C02GMM</i> e <i>C03GMM</i> .....	52
4.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
5.1 Preparação da exsicata e obtenção dos extratos hidroalcoólicos .....	58
5.2 Prospecção fitoquímica dos extratos.....	58
5.3 Ensaio de Atividades Biológicas.....	61
5.3.1 Atividade antimicrobiana .....	61
5.3.2 Atividade antioxidante .....	65
5.4 Considerações estruturais dos compostos isolados da <i>Marsdenia megalantha</i> . ....	69
5.4.1 Considerações estruturais dos compostos isolados das raízes .....	69
5.4.1.1 Considerações estruturais do composto <i>C01RMM</i> .....	69
5.4.1.2 Considerações estruturais do composto <i>C02RMM</i> .....	71
5.4.2 Considerações estruturais dos compostos isolados dos galhos.....	76
5.4.2.1 Considerações estruturais do composto <i>C01GMM</i> .....	76
5.4.2.2 Considerações estruturais do composto <i>C02GMM</i> .....	79
5.4.2.3 Considerações estruturais do composto <i>C03GMM</i> .....	82

<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A busca pelo conhecimento sobre a natureza e seus recursos tem sido o interesse incansável das ciências, especialmente nas áreas de pesquisas ambientais. A própria curiosidade humana foi a principal e primeira precursora para o despertar científico a cerca das possibilidades de utilização dos recursos naturais com o propósito de beneficiar a vida humana (MACDOWELL, 1988).

A utilização dos recursos naturais pelo homem exclusivamente para a sua subsistência e necessidades datam-se dos primórdios da existência humana. Dessa forma, o profundo conhecimento do arsenal químico da natureza, construído pelos povos primitivos e pelos indígenas ao longo da história, fundamentou o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas extraídas a partir da própria natureza, inicialmente tendo como finalidade a cura de enfermidades. Assim, o conhecimento construído por meio da convivência com os mais diferentes grupos étnicos teve extrema importância para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais, uma vez que contribuiu para o conhecimento da relação íntima entre a estrutura química de um determinado composto e suas propriedades biológicas, e para a inter-relação animais/insetos-planta. Neste sentido, o conhecimento etnofarmacológico inspirou o desenvolvimento da síntese orgânica clássica (BARREIRO, et al., 2006).

As plantas fornecem substâncias orgânicas denominadas metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às mais variadas aplicações nos setores alimentícios, agrônomo, de perfumaria e principalmente como medicamentos (BUFFON, 2005; CHAVES, 2012). As plantas são exemplos de recursos naturais de representatividade significativa no território brasileiro, o que é resultado de suas condições climáticas e da grande extensão territorial disponível (RAPINI, et al., 2009).

O Brasil abrange seis tipos de cobertura vegetal: Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Pampa e Caatinga. Cada uma com suas características, espécies e peculiaridades. A Caatinga, por exemplo, com predominância de um aspecto vegetativo seco com fisionomias vegetais de cactos e arbustos, é possuidora de uma grande diversidade de plantas (LEAL, et al., 2003). A subfamília Asclepiadoideae (Apocynaceae), apresenta pequena representatividade nas caatingas (GOES; PEREIRA, 2009). Um dos seus gêneros com maior número de espécies conhecidas no Brasil é o *Marsdenia* (RAPINI, 2012).

Espécies de *Marsdenia* são usadas na medicina tradicional de vários países, como: China, Coréia, Índia e Tailândia (OLIVEIRA, 2011). Estudos fitoquímicos realizados em

diferentes espécies do gênero tem chamado a atenção pela capacidade de isolamento de uma série de compostos bioativos a partir dessas espécies. Entre estes compostos, têm se destacado alcalóides, esteróides, saponinas, flavonóides, pregnanas, pregnanas glicosiladas, triterpenos, ciclitóis, glicosídeos, diglicosídeos, glicosídeos esteróides, conduritóis, entre outros (SHENG-XIANG, et al., 1993; ABE, et al., 1998; KUMAR, 1999; GUPTA, et al., 2003; DENG, et al., 2005; HAN, et al., 2012; MALDONADO e JUÁREZ-JAIMES, 2013; UDOIDONG, et al., 2014; VAN KHANG, et al., 2015).

A espécie *Marsdenia megalantha* é endêmica da Caatinga do Nordeste brasileiro (FLORA DO BRASIL 2020; LUCENA, et al., 2015; FORZZA, et al., 2010). Estudos sobre esta espécie demonstraram sua toxicidade para ruminantes na região semiárida do Brasil, causando alterações no sistema nervoso dos animais estudados (BEZERRA, 2011; PESSOA, 2013; GERALDO NETO, et al., 2013). Pesquisas sobre suas atividades biológicas evidenciaram o efeito antifúngico do seu látex e o potencial dos extratos de seus caules e folhas para serem utilizados como fármacos antioxidantes e anticâncer (OLIVEIRA, 2009; OLIVEIRA, 2011; OLIVEIRA, et al., 2017).

De modo geral estudos fitoquímicos e biológicos sobre o gênero *Marsdenia* são relativamente escassos. Sobre a própria espécie *M. megalantha* a literatura não registra estudos que revelem sua constituição química, e suas atividades biológicas ainda são pouco conhecidas. Diante disso, este trabalho propõe uma investigação química e biológica sobre a espécie *Marsdenia megalantha*, considerando necessário o desencadeamento de pesquisas neste propósito, em busca de desvendar novos conhecimentos sobre esta planta pertencente à Caatinga.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Investigar a química da espécie *Marsdenia megalantha* através da realização da prospecção fitoquímica dos extratos de suas folhas, galhos e raízes, e isolamento de alguns de seus constituintes químicos, assim como contribuir com o seu estudo biológico por meio da realização de ensaios de atividades antioxidante e antimicrobiana de seus extratos hidroalcoólicos.

### 2.2 Específicos

- Coletar, identificar e registrar a espécie vegetal *Marsdenia megalantha*;
- Preparar os extratos de suas folhas, caules e raízes;
- Realizar a prospecção fitoquímica dos extratos da planta;
- Submeter os extratos aos testes de atividade antioxidante e antimicrobiana;
- Realizar o fracionamento cromatográfico dos extratos e a investigação fitoquímica das frações obtidas;
- Isolar e purificar os constituintes químicos majoritários da espécie através de técnicas cromatográficas;
- Propor algumas considerações sobre as estruturas dos compostos isolados por meio da análise espectral de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  uni e bidimensional.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Aspectos botânicos

##### 3.1.1 Considerações sobre a família Apocynaceae

A família Apocynaceae filogeneticamente pertence à ordem Gentianales, subclasse Asteridae, inclui-se em um dos grupos mais evoluídos de dicotiledôneas (ROCHA, et al., 1982). É formada por plantas angiospermas de grande porte e herbáceas. Consistem em lianas, árvores, arbustos ou ervas, com látex presente nos tecidos (SIMPSON, 2010; BARTH; LUZ, 2008). Sua distribuição é predominantemente pantropical, entretanto, possui representantes na região temperada (GERALDO NETO, et al., 2016). De acordo com Simpson (2010) compreende entre 380 a 415 gêneros e de 4.555 a 4.700 espécies. No Brasil, são cerca de 41 gêneros e 376 espécies, espelhadas em Florestas Pluviais Amazônica, Atlântica e de Tabuleiro, Floresta Seca, Restinga, Cerrado e Caatinga (QUINET; ANDREATA, 2005).

Apocynaceae encontra-se distribuída em cinco subfamílias: Ravolfioideae, Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae (RAPINI, 2012). Asclepiadoideae é a maior delas, apresentando aproximadamente 250 gêneros e em torno de 2.000 a mais de 3.000 espécies (RAPINI, 2012; VALENTE; COSTA, 2005). Todavia, segundo Rapini (2000, p.34) “apenas cerca de 50 espécies podem ser consideradas comuns e de ampla distribuição; a grande maioria é representada por espécies raras pela distribuição esparsa ou restrita.” Ainda de acordo com o autor, há ocorrência de espécies nos mais variados ambientes, desde desertos e regiões abertas até locais paludosos e sombreados em regiões tropicais e subtropicais, e possui presença menos significativa nas regiões temperadas.

Há espécies de Asclepiadoideae nos cinco continentes, sendo a América do Sul um dos principais quanto à diversidade. O Brasil é um dos países com maior número de espécies no Neotrópico, abrangendo 392 espécies nativas as quais encontram-se distribuídas em 32 gêneros. Os maiores gêneros em número de espécies são: *Oxypetalum* com 91 espécies, *Ditassa* com 57, *Matelea* registrando 43 e *Marsdenia* com 37 espécies (ESPERITO SANTO, et al., 2018; RAPINI, 2012).

### 3.1.2 Considerações sobre o gênero *Marsdenia*

O gênero *Marsdenia* possui aproximadamente 300 espécies distribuídas mundialmente, todavia suas espécies são encontradas com predominância em regiões tropicais (RAPINI; PEREIRA, 2011). No Brasil estima-se um contingente de 37 espécies (ESPIRITO SANTO, et al. 2018), estando estas relacionadas no quadro 1.

Quadro 1 - Espécies de *Marsdenia* encontradas no Brasil

Espécies
<i>Marsdenia altissima</i> (Jacq.) Dugand*
<i>Marsdenia amorimii</i> Morillo*
<i>Marsdenia amylacea</i> (Barb.Rodr.) Malme
<i>Marsdenia bergii</i> Morillo
<i>Marsdenia brasiliensis</i> Decne.
<i>Marsdenia breviramosa</i> Rapini & Fontella
<i>Marsdenia caatingae</i> Morillo*
<i>Marsdenia carvalhoi</i> Morillo & Carnevali*
<i>Marsdenia dorothyae</i> Fontella & Morillo
<i>Marsdenia fontellana</i> Morillo & Carnevali
<i>Marsdenia glaziovii</i> (E.Fourn.) Spellman & Morillo*
<i>Marsdenia hassleriana</i> Malme
<i>Marsdenia hatschbachii</i> Morillo
<i>Marsdenia heringeri</i> Fontella*
<i>Marsdenia hilariana</i> E.Fourn.
<i>Marsdenia loniceroides</i> (Hook.) E.Fourn.
<i>Marsdenia macrophylla</i> (Humb. & Bonpl.) E.Fourn.*
<i>Marsdenia malmeana</i> Rothe
<i>Marsdenia megalantha</i> Goyder & Morillo*
<i>Marsdenia montana</i> Malme
<i>Marsdenia nana</i> Rapini & Fontella
<i>Marsdenia neomanarae</i> Morillo
<i>Marsdenia paganuccii</i> F.Esp.Santo & A.P.B.Santos sp. nov.*

(Continua) Tabela 1 - Espécies de *Marsdenia* encontradas no Brasil

Espécies
<i>Marsdenia paraibana</i> F.Esp.Santo & A.P.B.Santos sp. nov.*
<i>Marsdenia pickelii</i> Fontella & Morillo*
<i>Marsdenia queirozii</i> Fontella*
<i>Marsdenia riparia</i> Morillo & Spellman
<i>Marsdenia rubrofusca</i> E. Fourn.
<i>Marsdenia sessilifolia</i> (E.Fourn.) Fontella
<i>Marsdenia sprucei</i> Rothe
<i>Marsdenia suberosa</i> (E.Fourn.) Malme*
<i>Marsdenia thomasii</i> Morillo
<i>Marsdenia trisegmentata</i> F.Esp.Santo & A.P.B.Santos sp. nov.*
<i>Marsdenia ulei</i> Schltr. & Rothe*
<i>Marsdenia virgultorum</i> (E.Fourn.) Malme
<i>Marsdenia weddellii</i> (E. Fourn.) Malme
<i>Marsdenia zehntneri</i> Fontella*

\* Espécies encontradas na região Nordeste.

Fonte: Adaptada de ESPIRITO SANTO, et al., (2018); GERALDO NETO, et al., (2016). MEZABARBA, et al. (2000).

Em países como China, Índia, Coréia e Tailândia espécies deste gênero são utilizadas na medicina popular (OLIVEIRA, 2011). Em contrapartida, na região semiárida do Nordeste brasileiro espécies de *Marsdenia* são popularmente conhecidas como “mata-calado”. Esta denominação se deve ao fato destas espécies serem comprovadamente responsáveis pela morte de ruminantes naquela localidade, em especial nos períodos de escassez de chuvas, uma vez que sua estrutura externa pouco se altera com o estresse hídrico e dessa forma acabam atraindo estes animais e sendo consumidas por eles. Suas raízes e folhas foram citadas sendo utilizadas por agricultores como veneno para matar animais como cães, gatos e ratos na região (PESSOA, et al., 2011; SILVA, 2013).

### 3.1.3 Considerações sobre a espécie *M. megalantha*

De acordo com a base de dados de botânica, *Tropicos*, a classificação taxinômica da espécie *M. megalantha* é representada como descrito abaixo:

**Reino:** Plantae

**Classe:** Equisetopsida C. Agardh.

**Subclasse:** Magnoliidae Novák ex Takht.

**Subordem:** Asteranae Takht.

**Ordem:** Gentianales Juss. Ex Bercht. & J. Presl.

**Família:** *Apocynaceae* Juss.

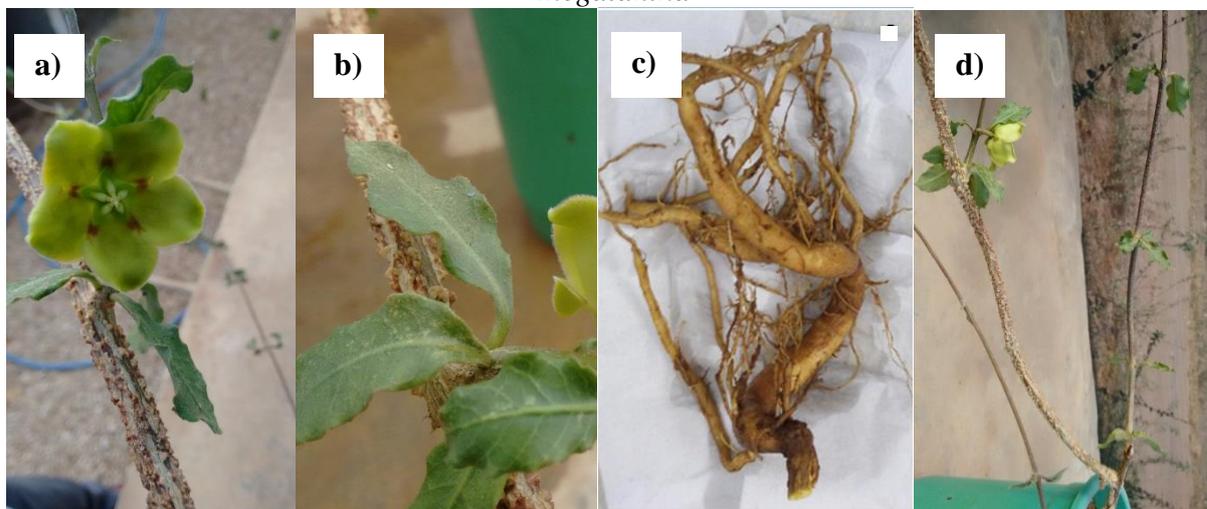
**Gênero:** *Marsdenia* R. Br.

**Espécie:** *Marsdenia megalantha*.

A *M. megalantha* é encontrada sobre rochas graníticas no interior do Nordeste brasileiro (OLIVEIRA, 2009). Endêmica da caatinga (LUCENA, et al., 2015), com ocorrências confirmadas na Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe (FLORA DO BRASIL, 2020; FORZZA, et al., 2010). Dentre as três espécies de *Marsdenia* encontradas no clima semiárido esta é a única espécie arbustiva (OLIVEIRA, 2011).

Esta planta é característica de ambientes com estacionalidade de chuvas. Sua estrutura é um subarbusto perene, semi-suculento, que produz látex leitoso em vários de seus órgãos. Atinge cerca de 60 cm de altura e apresenta raízes espessas e carnosas, que se espalham lateralmente sobre a superfície de rochas em pequenas porções de terras (OLIVEIRA, 2009). A Figura 1 ilustra alguns órgãos constituintes da *M. megalantha*.

Figura 1 – Fotografia ilustrando flor (a), folhas (b), raízes (c) e galhos (d) da espécie *M. megalantha*



Fonte: MESQUITA, F. F.; NASCIMENTO, L. C. Patu- RN, Brasil, 2017.

### 3.2 Estudos sobre a química do gênero *Marsdenia*

Diferentes espécies do gênero *Marsdenia* têm sido estudadas continuamente por cientistas de diferentes países. A constituição química do gênero aos poucos tem sido revelada e isso tem se intensificado especialmente nos últimos anos, através de estudos fitoquímicos e/ou de isolamento dos metabólitos majoritários. A seguir, encontram-se descritos alguns dos principais trabalhos publicados a este respeito:

Sheng-Xiang, et al. (1993) conseguiram isolar a partir da hidrólise ácida do extrato etanólico dos caules de *Marsdenia globifera*, um triterpeno designado marsglobiferina (p-amirina-3-acetato).

Abe et al. (1998) em seu trabalho com as folhas frescas da *Marsdenia tomentosa* obtiveram cinco ciclitóis (conduritol A, conduritol F, viburnitol, bornesitol e mioinositol) e ainda quatro glicosídeos foram isolados juntamente com glucose, frutose, sacarose, D-hamamelose e leucose.

Gupta et al. (2003) isolaram a partir do extrato solúvel em clorofórmio do caule seco da *Marsdenia roylei*, dois pregnanos designados dessacil-condurangogenina C e deniagenina, e dois novos glicosídeos de pregnano designados como: Denin e marsin. Estudo anterior sobre esta espécie fora feito por Kumar et al. (1999), ocasião em que estes autores realizaram uma análise fitoquímica preliminar de seus galhos, e em seguida o isolamento do trissacarídeo marial e do diglicosídeo rolinose.

Maldonado e Juárez-Jaimes (2013) realizaram no México um estudo da composição Química da *Marsdenia Callosa*, a partir das suas partes aéreas e terracias isolaram quatro triterpenos, juntamente com o conduritol A, e uma mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.

Van Khang e colaboradores (2015) isolaram do extrato etanólico de caules de *Marsdenia tenacissima*, três novos compostos glicosídicos esteróides C<sub>21</sub> de derivados diéster de tenacigenina B. Deng et al. (2005) também haviam realizado um trabalho com essa espécie, onde obtiveram da fração solúvel em clorofórmio do extrato etanólico dos seus caules, oito glicosídios de polioxipregnano, marsdenósídeos, juntamente com seis glicosídios conhecidos e duas agliconas conhecidas de polioxipregnano. Três polioxipregnanos, 12 $\beta$ -O-2-metilbutiril-tenacigenina A, 12 $\beta$ -di-O-acetiltenacigenina B e 11a-O-tigloiltenacigenina B foram também obtidos. Han e colaboradores (2012) também descreveram a presença de pelo menos 13 esteróides C<sub>21</sub> nessa espécie de *Marsdenia*.

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, até o presente momento nenhum trabalho se deteve ao estudo da constituição química da espécie *M. megalantha*, reforçando assim a importância do presente trabalho.

A Tabela 2 mostra as principais classes de compostos bioativos encontrados em diferentes espécies de *Marsdenia*.

Tabela 2 - Levantamento de metabólitos presentes em espécies de *Marsdenia*.

<b>Espécies</b>	<b>Classe de metabólitos</b>	<b>Referências</b>
<i>M. roylei</i> (Parte aérea)	Pregnanos, pregnanos glicosilados	GUPTA, et al., 2003. KUMAR, et al., 1999;
<i>M. latifolia</i> (Folhas)	Esteróides, alcalóides e flavonóides	UDOIDONG, et al., 2014.
<i>M. altíssima</i> (Galhos)	Triterpenos pentacíclicos, Flavononas, flavonas, flavonóides e xantonas, leucoantrocianidinas	De S. LUNA, et al., 2005.
<i>M. tenacissima</i> (Galhos)	Esteróides	DENG, et al., 2005; LI, et al., 2007; LIU, et al., 2008.
<i>M. callosa</i> (Folhas e Galhos)	Triterpenos e conduritol A	MALDONADO; JUÁREZ-JAIMES, 2013.
<i>M. globifera</i> (Galhos)	Triterpenos	SHENG-XIANG, et al., 1993.
<i>M. tinctoria</i>	Flavona	MOHD NASUHA; CHOO, 2015
<i>M. flavescens</i>	Esteróides	DUFF; et al., 1973.
<i>M. Koi</i> (Galhos)	Pregnanos glicosilados	JIN-LAN, et al.,1992.
<i>M. rostrata</i>	Alcalóides esteroidais	SUMMONS, et al, 1972.
<i>M. hainanensis</i> (Galhos)	Saponinas esteroidais	MA, et al.,1997.

(Continua) Tabela 2 - Levantamento de metabólitos presentes em espécies de *Marsdenia*

Espécies	Clase de metabólitos	Referências
<i>M. formosana</i> (Folhas)	Triterpenos	ITO; LAI, 1978.

Fonte: A autora.

### 3.3 Estudos biológicos sobre o gênero *Marsdenia*

O metabolismo secundário das plantas é responsável pela produção de substâncias das quais muitas estão diretamente envolvidas nos mecanismos de defesa do vegetal permitindo sua adequação ao meio natural. Estes metabólitos secundários possuem importantes atividades biológicas e estruturas químicas complexas de baixos pesos moleculares. Estão presentes em baixas concentrações e geralmente em exclusivos grupos de plantas, diferindo assim do metabolismo primário caracterizado por grande produção (síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais) e distribuição universal nas plantas (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

O interesse em torno do metabolismo secundário das plantas vai muito além das atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente. Estes metabólitos secundários destacam-se pela imensa atividade farmacológica que possuem, sobretudo, devido a seus efeitos biológicos sobre a saúde da espécie humana. Sua importância estende-se ainda nas áreas alimentar, agrônômica, de perfumaria e outras (BUFFON, 2005; CHAVES, 2012).

De acordo com Simões, et al. (2007), todos os metabólitos secundários origina-se na planta a partir do metabolismo da glicose, sendo derivados, portanto, do ácido chiquímico e do acetato. Admitindo-se ao ácido chiquímico a produção de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanóides; E o acetato responsável pelos aminoácidos alifáticos e seus derivados alcalóides; terpenóides, esteróides, ácidos graxos e triglicerídeos.

As plantas do gênero *Marsdenia* são detentoras de uma série de compostos bioativos que possuem propriedades farmacológicas. Um grande contingente de pesquisas tem viabilizado o conhecimento da medicina popular para embasar esses estudos. Espécies de *Marsdenia* são utilizadas pela medicina popular de vários países, como: China, Índia, Coreia e

Tailândia (OLIVEIRA, 2011), sendo usadas para tratar a dor reumática, inflamação, asma, sífilis e câncer (MALDONADO; JUÁREZ-JAIMES, 2013). Encontram-se dispostos a seguir alguns trabalhos nessa perspectiva:

Fan et al. (2015) sugeriram que o extrato da *M. tenacissima* inibe a proliferação celular de câncer de esôfago humano. Liu et al. (2008) através da purificação de um polissacarídeo desta mesma espécie de *Marsdenia*, denominado MTP, com 93,8% de carboidratos, 5,6% de proteínas e 21,3% de ácido urônico, confirmaram que o MTP pode aumentar a função imunitária em ratos normais e que tem uma inibição boa no crescimento do tumor em ratos portadores de H22, e sua atividade antitumoral pode estar relacionada com os seus efeitos antioxidantes e imunomoduladores. Ye et al., (2014) revelaram que o extrato etanólico da *M. tenacissima* possui ação antitumorais contra células neoplásicas hematológicas e poderia induzir a apoptose de células tumorais *in vitro* e *in vivo*, e também ter um efeito antiangiogênico significativo *in vivo* contra a apoptose de células tumorais.

De S. Luna, et al. (2005) em seu trabalho com a *M. altissima* determinaram que a mesma possui atividade significativa moluscida contra o caracol *Biomphalaria glabrata* e Parcialmente ativo contra *aedes aygispte* e contra *artemia salina*

Estudos sobre a espécie *M. megalantha* no Brasil demonstram sua toxicidade para ruminantes na região semiárida, causando alterações no sistema nervoso destes animais (BEZERRA, 2011; GERALDO NETO, et al., 2016; PESSOA, 2013). Um trabalho anterior havia revelado que seu látex é uma fonte de proteínas antifúngicas e apresenta atividades quitinásicas, peroxidásica e proteásica que em conjunto propiciam o efeito antifúngico do seu látex (OLIVEIRA, 2009). Fora realizado ainda um trabalho sobre suas propriedades farmacológicas, consistindo-se em uma análise sobre as atividades antioxidante, anticoagulante e antiproliferativa, avaliadas a partir dos extratos do caule, folha e raiz da *M. megalantha*, a qual indicou que os extratos de caule e folha possuem potencial para serem utilizados como fármacos antioxidantes e anticâncer (OLIVEIRA, 2011). Recentemente fora isolada uma enzima denominada Mm-POX a partir desta espécie, uma peroxidase de classe III, e determinaram sua atividade antifúngica, indicando seu papel na defesa contra patógenos e a importância do látex neste processo. E, além disso, que a mesma possui potencial biotecnológico para o controle de doenças de plantas causadas por *F. oxysporum* e *F. Solani*, importantes fungos fitopatogênicos (OLIVEIRA, et al., 2017).

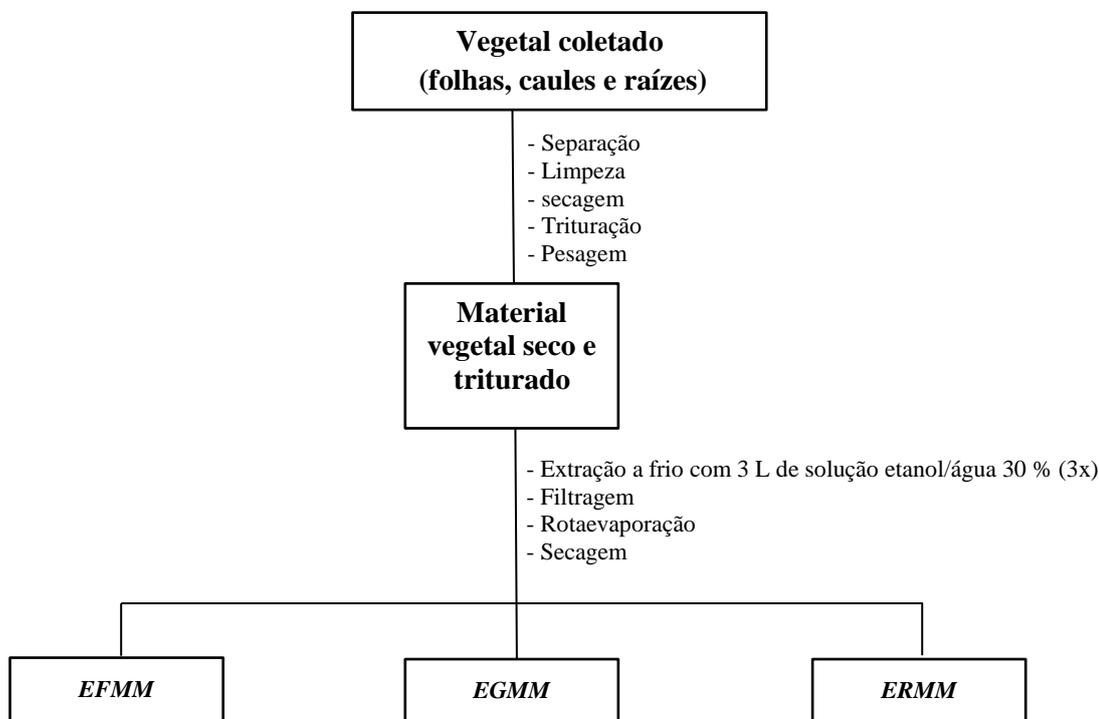


## 4.2 Processamento do material vegetal e obtenção dos extratos hidroalcoólicos

As folhas, raízes e galhos da *M. megalantha* foram lavados com água, e, em seguida, postos para secar durante 5 dias em estufa a 45 °C. Posteriormente foram triturados mecanicamente (cada parte da planta em separado) e logo após pesados.

O material vegetal seco foi submetido à extração a frio com 3 L de uma solução etanol/água (70:30 v/v). Um total de três extrações fora realizado para cada parte da planta. As soluções resultantes das extrações foram filtradas, e, em seguida, concentradas a pressão reduzida em evaporador rotativo, para a remoção da maior do solvente utilizado. Logo após submeteu-as à evaporação a 45 °C em banho-maria, até a completa secagem do material. Os extratos hidroalcoólicos secos resultantes foram pesados e codificados, sendo denominados: *EFMM* para o obtido a partir das folhas, *ERMM* para o obtido das raízes e *EGMM* para o proveniente dos galhos. Uma síntese da rota seguida para obtenção destes extratos pode ser acompanhada na Figura 3.

Figura 3 - Esquema geral de obtenção dos extratos hidroalcoólicos da *M. megalantha*



Fonte: A autora.

O rendimento percentual de cada extrato pôde ser calculado a partir da Equação 1.

$$R = \frac{ME}{MV} \times 100 \quad (1)$$

Em que:  $R$  = percentual de rendimento

$ME$  = massa do extrato

$MV$  = massa do órgão vegetal triturado e seco (folha, galho ou raiz)

Esta etapa, referente ao processamento do vegetal e preparação de seus extratos hidroalcoólicos, assim como as de prospecção fitoquímica, fracionamento dos extratos, isolamento dos metabólitos secundários, purificação e de avaliação dos compostos isolados por CCD e HPLC descritas a seguir, foram executadas no laboratório de cromatografia, do Departamento de Química da UERN.

### 4.3 Análise fitoquímica preliminar dos extratos brutos

600 mg dos extratos hidroalcoólicos secos (*EFMM*, *ERMM* e *EGMM*) foram dissolvidos separadamente em três soluções (100 mL cada) de etanol/água (70:30 v/v). Na sequência foram submetidos a uma série de reações de caracterização fitoquímica conforme a metodologia de Matos (1997), com pequenas modificações. O rastreio fitoquímico preliminar fora realizado para grupos de metabólitos secundários de interesse e a metodologia seguida encontra-se resumida nos itens a seguir:

#### 4.3.1 Teste para fenóis e taninos

3 mL de cada extrato hidroalcoólico foram utilizados neste teste. A cada extrato adicionou-se 3 gotas de solução alcoólica de Cloreto Férrico ( $\text{FeCl}_3$ ). Preparou-se um teste branco a partir de 3mL de água destilada. Após agitação manual dos extratos/branco, seguida de repouso a temperatura ambiente, fora observado se houve ocorrência mudança de coloração indicativa da presença de fenóis (aparecimento de coloração variável entre o azul e o vermelho, quando o teste “branco” for negativo) e taninos (precipitado escuro de tonalidade

azul = taninos pirogálicos (taninos hidrolizáveis); e verde = taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos)).

#### 4.3.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Separou-se 3 alíquotas de 3 mL de cada extrato hidroalcoólico e adicionou-as em diferentes tubos de ensaio. As primeiras alíquotas dos extratos foram aciduladas com HCl a pH 3. As segundas e terceiras foram alcalinizadas com NaOH até pH 8.5 e pH 11, respectivamente. Em seguida fora observado se houve mudança de coloração, comparando os resultados com a Tabela 3.

Tabela 3 - Avaliação de antocianinas, antocianidinas e flavonóis.

Constituintes	Cor do meio		
	Ácido (pH 3)	Alcalino (pH 8,5)	Alcalino (pH 11)
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chaconas e Auronas	Vermelha	-	Vermelha púrpura
Flavonóis	-	-	Vermelha laranja

Fonte: Matos, 1997.

#### 4.3.3 Teste para leucoantrocianidinas, catequinas e flavanonas

Duas alíquotas de 3 mL de cada extrato foram adicionadas em separado a dois diferentes tubos de ensaio. Para cada extrato um dos tubos fora acidulado por adição de HCl até pH entre 1-3 e o outro, alcalinizado a pH 11 com NaOH. Aqueceu-se os tubos em banho maria durante 3 min. E observou qualquer modificação por comparação com as especificações da Tabela 4.

Tabela 4 - Avaliação de leucoantrocianidinas, catequinas e flavanonas.

Constituintes	Cor do meio	
	Ácido	Alcalino
Leococantrocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavanonas	-	Verm. Laranja

Fonte: Matos, 1997.

#### 4.3.4 Teste para flavonóis, flavononas, flavanonóis e xantonas

3 mL de cada extrato hidroalcolóico foram adicionados a diferentes tubos de ensaio, e, a estes foram acrescentados raspas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. Ao término da reação, indicada pelo fim da efervescência, observou-se os tubos comparando a mudança de cor com o tubo acidulado do teste para leucoantrocianidinas, catequinas e flavanonas.

O aparecimento ou intensificação de cor vermelha é indicativa da presença de flavonóis, flavononas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos (MATOS, 1997).

#### 4.3.5 Teste para esteróides e triterpenóides (Lieberman-Burchard)

Para a realização do teste 10 mL de cada extrato hidroalcolóico foram submetidos à secura em banho-maria a 60 °C. Cada resíduo seco fora extraído com 5 mL de clorofórmio. As partes solúveis em clorofórmio foram filtradas para diferentes tubos de ensaio, utilizando um pequeno chumaço de algodão coberto com alguns centigramas de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, para remoção de qualquer vestígio de água. Foi adicionado 1 mL de anidrido acético a cada tubo e em seguida 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Observou-se então se houve mudança de coloração.

A coloração azul esvanescente seguida de verde permanente, indica a presença de esteróides livres, e o aparecimento de coloração parda até vermelha, indica a presença de triterpenóides pentacíclicos livres (MATOS, 1997).

#### 4.3.6 Teste para saponinas (Espuma)

Tomou-se os resíduos dos extratos hidroalcoólicos insolúveis em clorofórmio, do ensaio para esteróides e triterpenóides, e adicionou-se 5 mL de água destilada a cada um, seguido de filtração das soluções com um pequeno chumaço de algodão. Agitou-se os filtrados vigorosamente, e observou-se se houve ocorrência de formação de espuma persistente e abundante (colarinho) indicativa da presença de saponinas.

#### 4.3.7 Teste para alcalóides

Evaporou-se 20 mL de cada extrato hidroalcoólico até a metade, os 10 mL resultantes de cada extrato foram acidulados com HCl a pH 4 e filtrados em algodão. Juntou-se  $\text{NH}_4\text{OH}$  a cada extrato até a obtenção de pH 11 e extraiu-se as bases orgânicas com três porções sucessivas de 30, 20 e 10 mL de uma solução éter-clorofórmio (3:1). As partes extraídas na solução éter-clorofórmio foram filtradas com um chumaço de algodão e utilizando  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro para eliminar o resíduo de água presentes nos extratos. Tomou-se metade destas soluções e reextraiu-se as bases orgânicas, agora com três porções de 5, 10 e 15 mL de HCL diluído (0,1N), respectivamente. As partes aquosas ácidas resultantes foram divididas em três tubos de ensaio (três tubos para cada extrato). A cada tubo foi adicionado, respectivamente, 3 gotas dos reagentes de precipitação de alcalóides: reagente de Wagner, Hager e Dragendorff. Observou-se se houve formação de precipitado floculoso, pesado em pelo menos dois tubos, indicando a presença de alcalóides.

#### 4.3.8 Teste para quinonas

Evaporou-se 40 mL de cada extrato hidroalcoólico até a metade, acidulou-os com HCl a pH 4 e os filtrou em algodão. Em seguida, tomou-se mais 10 mL de cada extrato hidroalcoólico e secaram-os em banho maria a 60 °C. Os resíduos de cada extrato foram então extraídos com 2 mL de etanol. As partes etanólicas foram filtradas em algodão e logo depois adicionadas aos 20 mL dos respectivos extratos concentrados descrito anteriormente. HCl concentrado foi adicionado a cada extrato de modo a obter uma solução de aproximadamente 6 M. Então cada mistura foi submetida a aquecimento sob refluxo durante 2 horas. Após esfriar, cada uma foi extraída com três porções sucessivas de éter (40, 30, 20 mL) por meio de forte agitação em um funil de separação. Sendo a primeira extração

realizada após 24 horas de contato da mistura com os 40 mL de éter. As três porções etéreas de cada extrato foram juntas após o final das extrações. As soluções etéreas finais foram filtradas em algodão e utilizando  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para a eliminação do resíduo de água presente.

Adicionou-se 5 mL de cada solução etérea em diferentes tubos de ensaio. Acrescentou-se 2 mL de uma solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  6 M a cada tubo. Agitou-se intensamente os tubos, e deixou-se esfriar e formar duas fases. Observou-se então se houve aparecimento de cor vermelha na camada aquosa alcalina a qual seria indicativa da presença de quinona, especialmente antraquinonas hidroxiladas na solução e seus heterosídeos no extrato hidroalcoólico.

#### 4.3.9 Teste para cumarinas

Utilizando um capilar, foram feitas duas fortes manchas de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro de cada extrato hidroalcoólico em um pedaço de papel de filtro não fluorescente. Aplicou-se sobre cada uma das manchas uma gota de solução alcoólica 1 N de KOH. Cobriu-se parcialmente as manchas com um cartão opaco não-fluorescente e, em seguida, as manchas foram expostas à ação da luz UV por cerca de 3 minutos, descobrindo-se a parte encoberta, ainda sob luz UV. Observou-se se ocorreu modificação na fluorescência da mancha que foi alcalinizada, e desenvolvimento de fluorescência azulada progressiva e forte, bem visível na metade não encoberta da mancha alcalinizada, a qual indicaria a presença de cumarina.

### 5.6 Estudo biológico dos extratos hidroalcoólicos *EFMM*, *EGMM* e *ERMM*

#### 4.4.1 Atividade antimicrobiana

O bioensaio foi executado no Laboratório de Microbiologia Veterinária do campus central da UFERSA em Mossoró-RN.

A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando-se o método de microdiluição em caldo de acordo com o CLSI (2015), o qual é capaz de revelar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou seja, a menor concentração em que o extrato consegue inibir o crescimento do microorganismo testado.

Para a execução do ensaio foram utilizadas as seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC

25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022). Estes microrganismos foram semeados em estufa bacteriológica a 37 °C em caldo Brain Heart Infusion (BHI) no tempo de 24 horas.

Foram utilizadas placas de microdiluição, contendo 96 poços dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Realizou-se o controle negativo utilizando caldo BHI e o controle de positivo utilizando gentamicina.

O *ERMM* fora diluído em água destilada estéril a uma concentração de 27 mg/mL. Em cada um dos poços das placas de microdiluição foram inseridos 95 µL de caldo BHI duplamente concentrado. Em seguida, realizou-se a diluição seriada do extrato partindo-se pela inserção de 100 µL do extrato vegetal na concentração 27 mg/mL ao primeiro poço, e após homogeneização do conteúdo com o auxílio de um micropipetador, transferiu-se 100 µL deste conteúdo ao poço subsequente resultando numa concentração inicial de 13,5 mg/mL e em uma concentração final de 1,7 mg/mL no último poço. Deste último poço foram desprezados 100 µL do conteúdo, de modo a igualar o volume total de cada poço. As concentrações do extrato analisado após a diluição seriada estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Diluições seriadas do *ERMM* para técnica de avaliação antimicrobiana por microdiluição em caldo

Diluição	Concentração do extrato (mg/mL)
1 <sup>a</sup>	13,5
2 <sup>a</sup>	6,8
3 <sup>a</sup>	3,4
4 <sup>a</sup>	1,7

Fonte: A autora.

Em seguida foram inseridos 5 µL da suspensão dos diferentes microrganismos em cada série de poços contendo as diferentes concentrações do extrato, com exceção dos poços correspondente ao controle de esterilidade. Buscou-se dessa forma submeter todas as concentrações do extrato à mesma quantidade de microrganismos. O ensaio foi realizado em triplicata.

As placas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro de microplaca (URIT 660 – MICROPLATE READER) em comprimento de onda de 450 nm. Logo após, as placas

contendo as bactérias foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Após o tempo de incubação das placas, fora realizada novamente a leitura de absorvância do conteúdo das microplacas em espectrofotômetro.

Os valores das absorvâncias resultantes das leituras nos tempos 0 h e 24 h foram submetidas à análise estatística (*in vitro*), utilizando o delineamento inteiramente casualizado, considerando-se como tratamentos as diferentes concentrações do extrato, a gentamicina como controle positivo e o caldo BHI como controle negativo. Sequencialmente foram submetidas a análise de variância (ANOVA) no programa Sisvar e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

#### 4.4.2 Atividade antioxidante

Os bioensaios de determinação da atividade antioxidante foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais Marinhos da Universidade Federal do Ceará – UFC. Para a condução do estudo, os extratos (*EFMM*, *EGMM* e *ERMM*) foram diluídos em metanol de modo a obter as concentrações: 1.000, 500, 250, 100 e 50 µg/mL. As atividades antioxidantes foram determinadas através de 4 testes, os quais encontram-se descritos a seguir:

##### 4.4.2.1 Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A atividade antioxidante medida pela capacidade de sequestro do radical DPPH foi determinada de acordo com o método original de Blois (1958) com algumas modificações. A amostra consistiu na mistura de 10 µL dos extratos (*EFMM*, *EGMM* e *ERMM* nas concentrações de 50, 100, 250, 500 e 1.000 µg/mL) e 190 µL da solução metanólica de DPPH (D9132, Sigma) a 78 µM. O branco da amostra consistiu em 10 µL dos extratos (*EMMF*, *EMMG* e *EMMR* nas concentrações de 50, 100, 250, 500 e 1.000 µg/mL) e 190 µL de metanol. Para o controle negativo utilizou-se 10 µL de metanol + 190 µL da solução metanólica de DPPH a 78 µM e para o controle positivo utilizou-se ácido ascórbico (A5960, Sigma) nas mesmas concentrações dos extratos, tendo sido tratado de forma idêntica à amostra.

O teste fora realizado em microplaca de 96 poços. A microplaca foi agitada e incubada à temperatura ambiente por 30 min no escuro. As absorvâncias foram lidas em leitor

de microplaca (Biochrom Asys UVM 340), a um comprimento de onda de 517 nm. Todas as análises foram feitas com quatro repetições cada.

A capacidade de sequestro do radical DPPH dos extratos (*EFMM*, *EGMM* e *ERMM* nas concentrações de 50, 100, 250, 500 e 1.000 µg/mL) e do controle positivo, expressa em porcentagem, foi calculada pela Equação 2:

$$\text{Capacidade de sequestro do radical DPPH (\%)} = \left[ 1 - \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right] \times 100\% \quad (2)$$

#### 4.4.2.2 Habilidade de quelação de íons ferrosos (FIC)

A capacidade de quelação de íons ferrosos (FIC) foi baseada no método de Carter (1971), descrito por Dinis, Madeira e Almeida (1994), sendo determinada de acordo com Khatua, Roy e Acharya (2013).

A amostra foi composta por 100 µL dos extratos (*EFMM*, *EGMM* e *ERMM* nas concentrações de 50, 100, 250, 500 e 1.000 µg/mL), 10 µL de cloreto ferroso (FeCl<sub>2</sub>) a 2 mM, e 20 µL de ferrozina a 5 mM. Preparou-se um teste branco da amostra onde a ferrozina foi substituída por metanol. O controle negativo foi preparado com o extrato sendo substituído por metanol. E no controle positivo utilizou-se Etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.2H<sub>2</sub>O – E5134, Sigma) nas mesmas concentrações dos extratos, e portanto tratado de forma idêntica à amostra.

Este bioensaio fora realizado em microplaca de 96 poços. A microplaca contendo a amostra, branco e controles, foi incubada por 10 min à temperatura ambiente, e as absorbâncias lidas em 562 nm em leitor de microplaca (Biochrom Asys UV340). Este teste fora realizado em quadruplicata.

O poder de quelação de íons ferrosos dos extratos (*EMMF*, *EMMG* e *EMMR* nas concentrações de 50, 100, 250, 500 e 1.000 µg/mL) e do controle positivo, expresso em porcentagem, foi calculado pela Equação 3.

$$\text{Habilidade de quelação do íon ferroso (\%)} = \frac{[\text{Abs}_{\text{controle}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})]}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100\% \quad (3)$$

#### 4.4.2.3 Poder de redução de íons férricos (FRAP)

O FRAP foi determinado baseando-se no método de Oyaizu (1986) e está descrita em Khatua, Roy e Acharya (2013), com algumas modificações.

Em microtubos tipo Eppendorf de 2 mL, foram colocados 100 µL dos extratos (*EFMM*, *EGMM* e *ERMM* nas concentrações de 50, 100, 250, 500 e 1.000 µg/mL), 250 µL de tampão fosfato a 0,2 M (pH 6,6) e 250 µL de ferricianeto de potássio a 1 %. Os microtubos foram incubados em banho-maria a 50 °C por 20 min, logo após resfriados em água gelada e, então, foram acrescentados 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10 % para parar a reação. Em seguida, eles foram submetidos à agitação vigorosa e centrifugação por 10 min a 4.000 rpm.

Da camada superior da mistura reacional foram retirados 250 µL e, em seguida, adicionados 250 µL de água destilada e 50 µL de cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>) a 0,1%. Os microtubos foram agitados e alíquotas de 200 µL foram transferidas para microplacas com 96 poços. Como controle positivo utilizou-se butil hidroxianisol (BHA - Sigma B1253), nas mesmas concentrações dos extratos (*EFMM*, *EGMM* e *ERMM* nas concentrações de 50, 100, 250, 500 e 1.000 µg/mL), e tratado de forma idêntica à amostra. As absorbâncias foram lidas em 700 nm em leitor de microplaca (Biochrom Asys UVM 340). Quanto maior a absorbância dos extratos (*EFMM*, *EGMM* e *ERMM* nas concentrações de 50, 100, 250, 500 e 1.000 µg/mL) e do controle positivo, maior o poder de redução de íons férricos (FRAP). O teste fora realizado com quatro repetições

#### 4.4.2.4 Branqueamento do β-caroteno (BCB)

A atividade antioxidante medida por meio do branqueamento β-caroteno, usando o sistema β-caroteno - ácido linoleico, foi determinada pelo método descrito por Duan et al. (2006) e calculada de acordo com Dhongade e Chandewar (2013).

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 4 mL de solução de β-caroteno solubilizado em clorofórmio (1 mg/mL), 40 mg de ácido linoleico e 400 mg do emulsificador Tween 40. Evaporou-se o clorofórmio em evaporador rotativo a 45 °C por 4 min. Adicionou-se lentamente ao resíduo semissólido 100 mL de água destilada aerada com agitação vigorosa verificando-se a formação de emulsão. Essa emulsão foi denominada emulsão com β-caroteno (ECβ).

Em outro balão de fundo redondo, foram adicionados 4 mL de clorofórmio, 40 mg de ácido linoleico e 400 mg do emulsificador Tween 40. Igualmente, evaporou-se o clorofórmio em evaporador rotatório a 45°C por 4 min. Em seguida, adicionou-se lentamente ao resíduo semissólido 100 mL de água destilada aerada com agitação vigorosa observando-se a formar uma emulsão. Essa emulsão foi denominada emulsão sem  $\beta$ -caroteno (ES $\beta$ ).

Em microplaca de 96 poços, foram adicionado a amostra composta de 50  $\mu$ L dos extratos (EFMM, EGMM e ERMM nas concentrações de 50, 100, 250, 500 e 1.000  $\mu$ g/mL) e 200  $\mu$ L da emulsão contendo  $\beta$ -caroteno (EC $\beta$ ). O branco consistiu na mistura de 50  $\mu$ L dos extratos (EMMF, EMMG e EMMR nas concentrações de 50, 100, 250, 500 e 1.000  $\mu$ g/mL) e 200  $\mu$ L da emulsão sem  $\beta$ -caroteno (ES $\beta$ ). Como controle positivo utilizou-se butil hidroxianisol (BHA - Sigma B1253), nas mesmas concentrações dos extratos e tratado de forma idêntica à amostra.

A microplaca fora submetida à leitura de absorvâncias em espectrofotômetro em 450 nm no tempo zero contra o branco. Logo após, a microplaca foi deixada sobre a bancada à temperatura ambiente (20-23°C) e, a cada 30 min de intervalo, as absorvâncias foram lidas até completar 300 min (5 horas). A atividade antioxidante foi calculada pela Equação 4:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \left[ 1 - \frac{\text{Abs}_{5h}}{\text{Abs}_{\text{inicial}}} \right] \times 100\% \quad (4)$$

#### 4.4.2.5 Análises estatísticas

Os valores das triplicatas das absorvâncias obtidas em cada um dos ensaios descritos anteriormente foram tratados a partir das médias as quais foram submetidas à análise de variância unifatorial, seguida pelo teste de Tukey com nível de 5% de significância ( $p > 0,05$ ).

### 4.5 Métodos cromatográficos

Sucessivas combinações entre técnicas cromatográficas foram realizadas neste trabalho a fim de se isolar os metabólitos secundários majoritários constituintes das raízes e galhos da espécie *Marsdenia megalantha*. A seguir encontram-se descritos os materiais, instrumentação e métodos cromatográficos empregados.

#### 4.5.1 Cromatografia de Adsorção em Coluna (CC)

Todas as cromatografias de adsorção foram realizadas em coluna de vidro (cromatografia gravitacional), utilizando gel de sílica 60, de 70-230 Mesh de granulométrica, da marca Vetec. O comprimento e diâmetro das colunas utilizadas variaram de acordo com a massa das alíquotas das amostras a serem cromatografadas e com a quantidade de gel de sílica empregada como fase estacionária.

Os solventes utilizados como eluentes foram: Hexano, diclorometano, acetato de etila, acetonitrila, metanol e água destilada, puros ou em misturas binárias ou ternárias. Estes solventes, eram de qualidade P.A., destilados ou grau HPLC.

#### 4.5.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em Camada delgada fora utilizada para a análise do perfil das frações resultantes dos fracionamentos cromatográficos em coluna. Utilizou-se placas de poliéster e alumínio nas dimensões 6,5 x 4 cm, com camada de sílica 60, 5-40  $\mu\text{m}$ , com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm (F254), MERCK.

As amostras foram aplicadas nas placas (spots) com o auxílio de capilares previamente limpos e secos. Como eluentes foram usados hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água destilada, puros ou como misturas binárias ou ternárias.

As revelações das cromatoplasmas foram feitas por meio da exposição destas em lâmpada de irradiação modelo UVSL-25 (Mineral Light) com dois comprimentos de onda (254 e 366 nm), com iodo, e seguida, pela pulverização com uma solução de *p*-anisaldeído e por fim, por aquecimento em chapa aquecedora na temperatura de 105 °C.

#### 4.5.3 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

Para realização do método foram utilizadas placas de vidro recobertas com uma suspensão de sílica gel 60 G Merck em água destilada: 0,5 mm de espessura ativada a 100 °C em estufa. A amostra fora depositada nas placas com o auxílio de uma pipeta de pasteur. O sistema de eluição utilizado fora: Hexano/Acetato de etila 50 % e 30  $\mu\text{L}$  de água destilada.

#### 4.5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência foi usada como método de isolamento e para confirmação de pureza das substâncias isoladas.

O cromatógrafo utilizado é um equipamento da marca SHIMAZDU, constituído de três bombas de alta pressão modelo LC-10ATvp, detector SPD-M10Avp com sistema DAD, degasificador em linha e um forno termostático para acomodação da coluna. A coluna utilizada fora uma semi-preparativa em fase reversa Supercosil LC-18 (partículas de 5 µm, dimensão 250 x 10 mm). Como fase móvel utilizou-se os solventes acetonitrila, grau HPLC, e água deionizada filtradas em membrana de nylon com poros de PTFE de 0,45 µm. Após diversas injeções, variando as condições de análise, a melhor resolução para separação das substâncias presentes na fração foi obtida com as seguintes condições:

- ✓ Coluna semipreparativa Supercosil LC18;
- ✓ Sistema isocrático Acetonitrila/(água com TFA 0,05 %) 32 %;
- ✓ Fluxo de 2,6 mL/min;
- ✓ Pressão de 736 psi;
- ✓ Comprimento de onda de 254 nm e
- ✓ Volume de injeção = 70 µL.

#### 4.6 Fracionamento cromatográfico do extrato hidroalcoólico das raízes

Uma amostra de 68 g do extrato *ERMM* fora misturada a 10 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionados sobre 73,9 g de gel de sílica em coluna de vidro de 500 mL. O fracionamento cromatográfico foi realizado por eluições sucessivas com eluições sucessivas com hexano (250 mL), diclorometano (350 mL), diclorometano/metanol 1 % (250 mL), diclorometano/metanol 2 % (250 mL), diclorometano/metanol 3 % (250 mL), diclorometano/metanol 5% (250 mL), diclorometano/metanol 10 % (250 mL), diclorometano/metanol 20 % (250 mL), diclorometano/metanol 50 % (250 mL), metanol (250 mL) e água (200 mL).

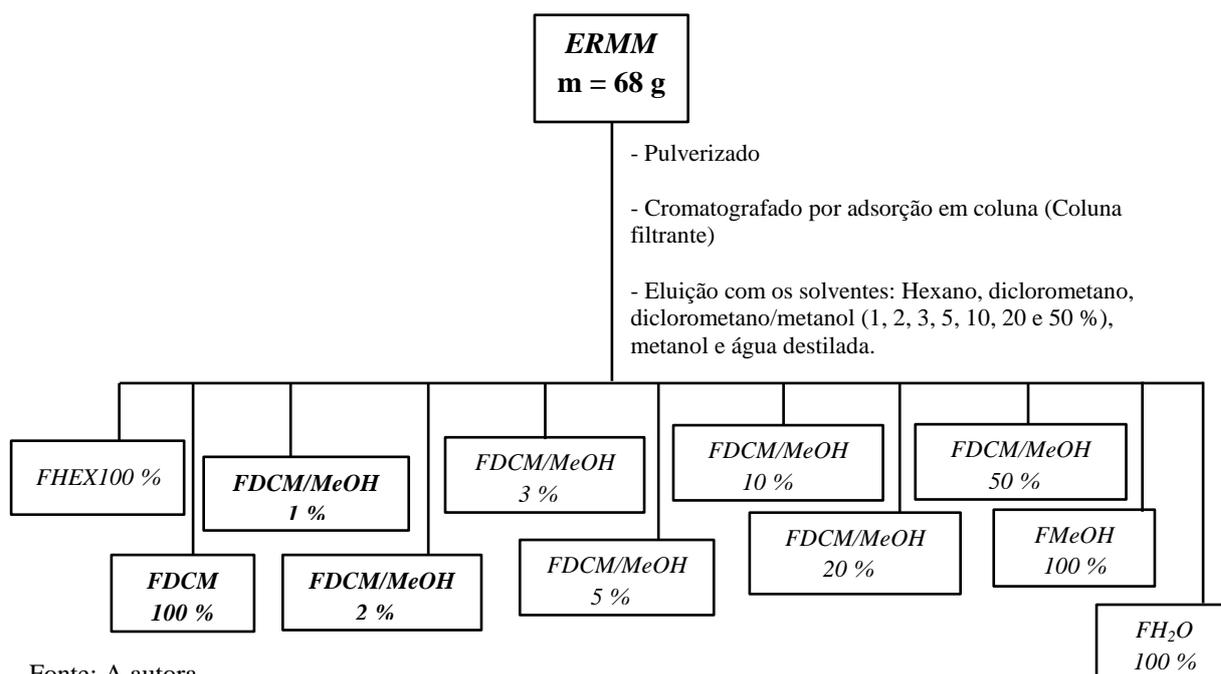
As frações oriundas da coluna de fracionamento do extrato hidroalcoólico *ERMM*, assim como suas respectivas massas e solventes usados para suas eluições estão dispostas na Tabela 6. A etapa de fracionamento do *ERMM* encontra-se resumida na Figura 4.

Tabela 6 - Dados das frações obtidas da coluna filtrante do *ERMM*.

Eluente	Fração	Massa (g)
Hexano	<i>FHEX 100 %</i>	0,4
Diclorometano/metanol	<i>FDCM 100 %</i>	12,5
Diclorometano/metanol 1%	<i>FDCM/MeOH 1 %</i>	1,0
Diclorometano/metanol 2%	<i>FDCM/MeOH 2 %</i>	1,2
Diclorometano/metanol 3%	<i>FDCM/MeOH 3 %</i>	1,6
Diclorometano/metanol 5%	<i>FDCM/MeOH 5 %</i>	1,0
Diclorometano/metanol 10 %	<i>FDCM/MeOH 10 %</i>	1,4
Diclorometano/metanol 20 %	<i>FDCM/MeOH 20 %</i>	2,5
Diclorometano/metanol 50 %	<i>FDCM/MeOH 50 %</i>	14,3
Metanol	<i>FMeOH 100 %</i>	13,3
Água	<i>FH<sub>2</sub>O 100 %</i>	17,5
<b>TOTAL</b>		<b>66,7</b>

Fonte: A autora.

Figura 4 - Rota do fracionamento cromatográfico do *ERMM*



Fonte: A autora.

As frações advindas da filtrante foram analisadas por CCD para a determinação das frações a serem trabalhadas. Logo após as frações escolhidas (*FDCM100 %*, *FDCM/MeOH 1 %* e *FDCM/MeOH 2%*) foram submetidas a uma avaliação fitoquímica para os metabólitos predominantes no extrato bruto das raízes, e em seguida reuniu-se 6,2345 g da fração *FDCM100 %*, 1,2240 g da fração *FDCM/MeOH 1 %* e 1,0040 g da fração *FDCM/MeOH 2 %*. A nova fração *F(DCM100-DCM/MeOH1e2)* foi então fracionada por CC.

#### 4.6.1 Fracionamento cromatográfico da *F(DCM100-DCM/MeOH1e2)* e percolação das frações *F5-8*, *F9-11*, *F12-15* e *F16-26* obtidas.

Misturou-se 8,2345 g da fração *F(DCM100-DCM/MeOH1e2)* a 2 g de gel de sílica, sendo esta mistura pulverizada em grau de porcelana e aplicada a uma coluna de 300 mL previamente acondicionada com 65,3924 g de gel de sílica. A eluição foi realizada com um sistema isocrático formado por acetato de etila / metanol 0,5 %. Foram coletadas 59 frações de 10 mL. As frações que obtiveram massa foram analisadas por CCD e então reunidas conforme mostrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Reunião das frações obtidas do fracionamento de *F(Dcm100-Dcm/MeOH1e2)*

Frações reunidas	Massa (g)
<i>F5-8</i>	1,0533
<i>F9-11</i>	0,7676
<i>F12-15</i>	0,9929
<i>F16-26</i>	4,0358
<i>F27-31</i>	0,2095
<i>F32-59</i>	0,3229
<b>TOTAL</b>	<b>7,3820</b>

Fonte: A autora.

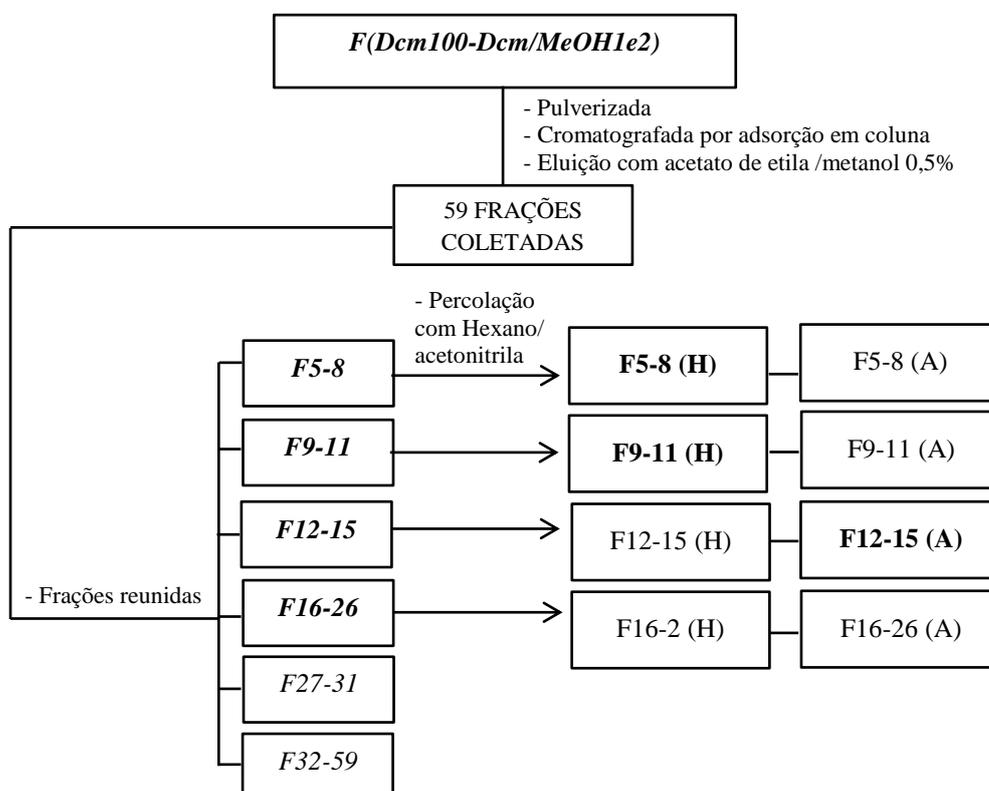
As frações *F5-8*, *F9-11*, *F12-15* e *F16-26* resultantes, foram submetidas a uma percolação com os solventes Hexano e Acetonitrila. Dessa forma obteve-se 8 novas frações (Tabela 8), as quais foram secas a temperatura ambiente.

Tabela 8 - Frações obtidas após percolação com Hexano/Acetonitrila

Frações	Massa (g)
<i>F5-8 (H)</i>	0,8830
<i>F5-8 (A)</i>	0,1703
<i>F9-11 (H)</i>	0,5697
<i>F9-11(A)</i>	0,1979
<i>F12-15 (H)</i>	0,2279
<i>F12-15 (A)</i>	0,7650
<i>F16-26 (H)</i>	0,4868
<i>F16-26 (A)</i>	3,5490
<b>TOTAL</b>	<b>6,8496</b>

Fonte: A autora.

Um resumo das etapas de fracionamento cromatográfico seguida de percolação de algumas das frações provenientes deste fracionamento pode ser acompanhado na Figura 5.

Figura 5 - Rota esquemática do fracionamento da *F(Dcm100-Dcm/MeOH1e2)* seguida de percolação com Hexano/acetoneitrila.

Fonte: A autora.

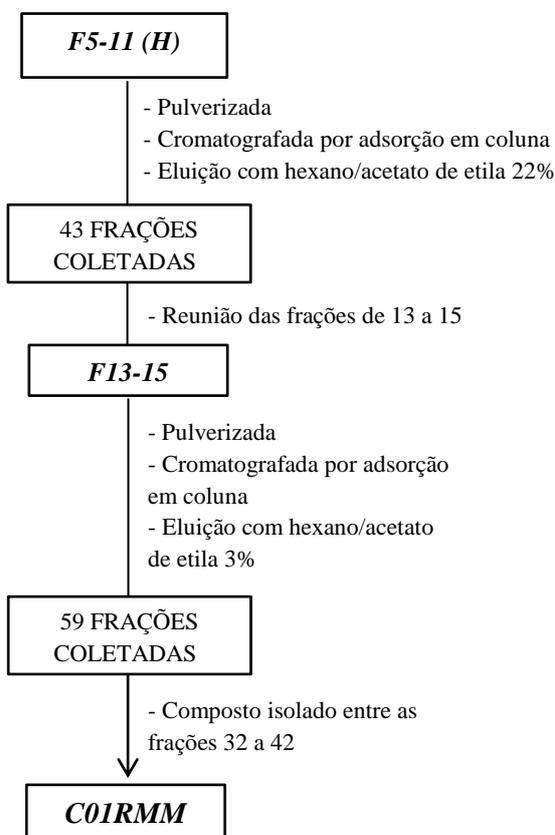
Após uma análise por CCD as frações *F5-8* e *F9-11* obtidas na porção hexânica durante a percolação foram agrupadas, passando a ser denominada *F5-11(H)*, e, então, cromatografada. A fração *F12-15* proveniente da porção acetonitrílica, fora denominada *F12-15(A)* e submetida à CCD preparativa.

#### **4.6.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração *F5-11(H)***

A fração *F5-11(H)* perfazendo 1,4527 g de amostra fora misturada a uma pequena porção de gel de sílica, pulverizadas em gral de porcelana e cromatografada em uma coluna condicionada com 34,4 g de gel de sílica utilizando como sistema de eluição a mistura binária hexano/acetato de etila 22 %. Coletou-se 43 frações de 10 mL, as quais foram posteriormente analisadas por CCD. As frações de 13 a 15 por terem apresentado o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas, denominada de *F13-15* e submetidas a um novo fracionamento.

##### **4.6.1.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração *F13-15* e isolamento do composto *C01RMM*.**

A massa total desta fração resultou em 0,2828 g, sendo esta quantidade misturada a uma pequena porção de gel de sílica, e pulverizada logo em seguida. Submetendo-se então a amostra preparada a uma coluna cromatográfica condicionada com 18,4466 g de gel de sílica e eluindo-se com o sistema Hexano/acetato de etila 3 %. Deste processo resultaram-se 59 frações de 10 mL. Uma análise em cromatoplasmas fora realizada em seguida e a mesma demonstrou o isolamento de um composto puro entre as frações 32-42. Este composto fora denominado *C01RMM*. A Figura 6 mostra um resumo para o seu isolamento.

Figura 6 - Rota de isolamento de *COIRMM* a partir do fracionamento de *F5-11(H)*.

Fonte: A autora.

#### 4.6.1.2 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa da fração *F12-15 (A)*

Aproximadamente 350 mg da amostra *F12-15 (A)* foram aplicadas sobre três placas preparativas, e após a eluição utilizando o sistema Hexano/Acetato de etila 50 % e 30 µL de água destilada. As placas foram divididas em três partes, que então foram raspadas separadamente e as substâncias contidas nesse material foram extraídas com diclorometano. As frações obtidas nessa etapa encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Frações obtidas da *F12-15 (A)* por CCD preparativa

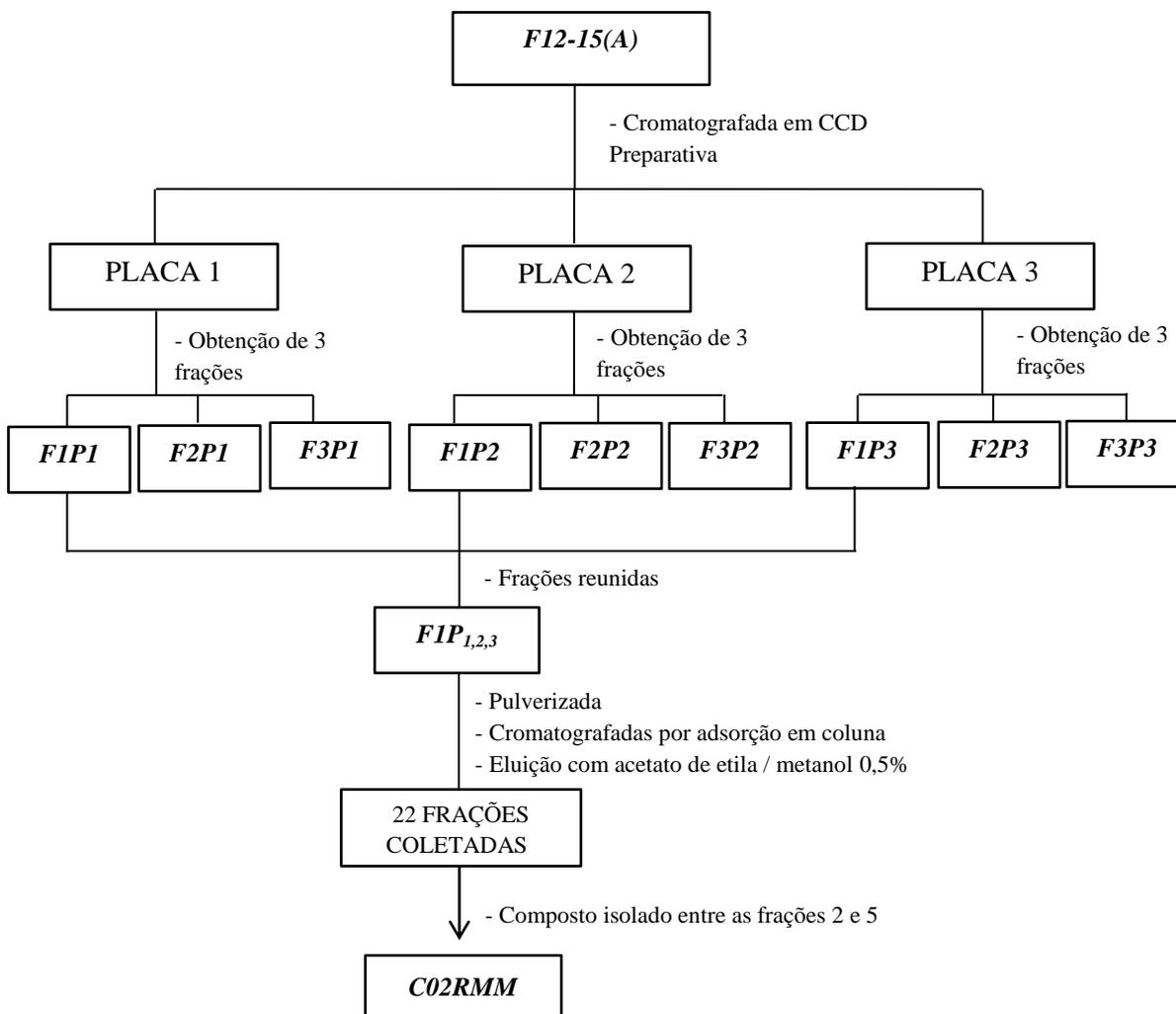
Frações	Massa (g)
<i>F1P1</i>	0,0121
<i>F2P1</i>	0,0583
<i>F3P1</i>	0,0267
<i>F1P2</i>	0,0269
<i>F2P2</i>	0,0281
<i>F3P2</i>	0,0087
<i>F1P3</i>	0,0217
<i>F2P3</i>	0,0252
<i>F3P3</i>	0,0085
<b>TOTAL</b>	<b>0,2143</b>

Fonte: A autora.

Estas frações foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico, desse modo, foram agrupadas as frações *F1P1*, *F1P2* e *F1P3* e as frações *F2P1*, *F2P2* e *F2P3*. As duas frações resultantes foram denominadas *F1P<sub>1,2,3</sub>* e *F2P<sub>1,2,3</sub>* respectivamente, *F1P<sub>1,2,3</sub>* foi submetidas a um novo fracionamento cromatográfico.

#### 4.6.1.2.1 Fracionamento cromatográfico da fração *F1P<sub>1,2,3</sub>* e isolamento do composto *C02RMM*

A fração *F1P<sub>1,2,3</sub>* (0,0607 g) foi cromatografada em coluna de vidro acondicionada com 6,2237 g de gel de sílica e eluída com o sistema acetato de etila/metanol 0,5 %. Foram recolhidas 22 frações de 10 mL, as quais foram analisadas por CCD onde foi possível a verificação do isolamento do composto denominado *C02RMM* entres as frações de 2 a 5. A Figura 7 apresenta um resumo das etapas de seu isolamento.

Figura 7 - Rota de isolamento de *C02RMM* a partir do fracionamento de *F12-15(A)*

Fonte: A autora.

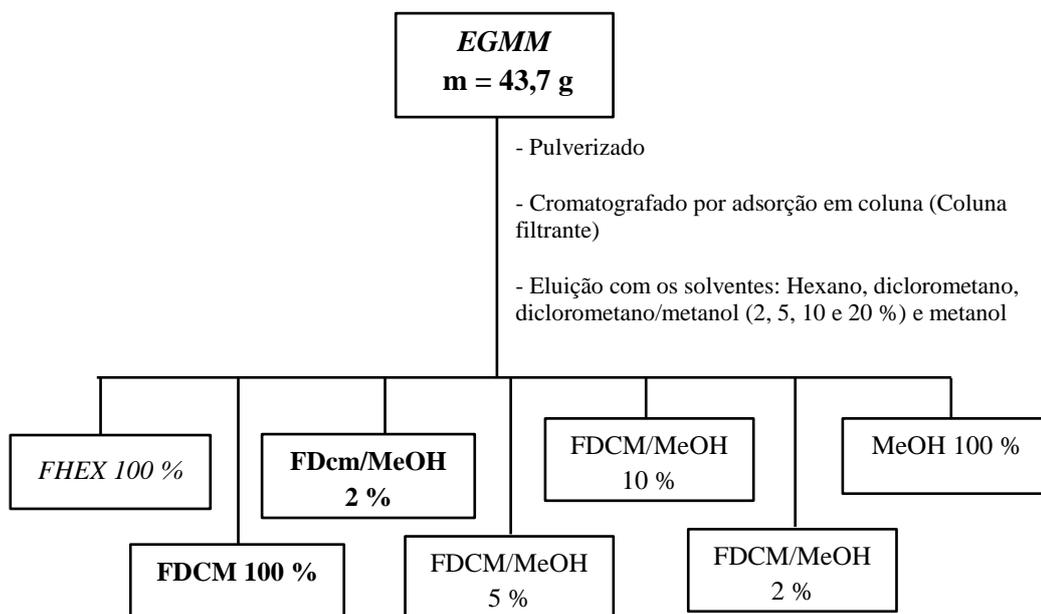
#### 4.7 Fracionamento cromatográfico do extrato hidroalcoólico dos galhos

Misturou-se 43,7 g do *EGMM* a 10 g de gel de sílica, pulverizou-as em gral de porcelana e por meio de cromatografia por absorção em coluna de 500 mL, preenchida com 18,1 g de gel de sílica, foi realizado o fracionamento cromatográfico do extrato por eluições sucessivas com hexano (700 mL), seguido de diclorometano (700 mL), diclorometano/metanol 2 % (500 mL), diclorometano/metanol 5 % (500 mL), diclorometano/metanol 10 % (300 mL), diclorometano/metanol 20 % (300 mL) e metanol (300 mL). As frações resultantes encontram-se detalhadas na tabela 10. A sequência deste fracionamento encontra-se resumida na Figura 8.

Tabela 10 - Dados das frações obtidas da coluna filtrante do *EGMM*

<b>Eluente</b>	<b>Fração</b>	<b>Massa (g)</b>
Hexano	<i>FHEX 100 %</i>	-
Diclorometano	<i>FDCM 100 %</i>	2,5
Diclorometano/metanol 2 %	<i>FDCM/MeOH 2 %</i>	3,7
Diclorometano/metanol 5 %	<i>FDCM/MeOH 5 %</i>	4,6
Diclorometano/metanol 10 %	<i>FDCM/MeOH 10 %</i>	1,1
Diclorometano/metanol 20 %	<i>FDCM/MeOH 20 %</i>	2,9
Metanol	<i>FMeOH 100 %</i>	10,5
<b>TOTAL</b>		<b>25,3</b>

Fonte: A autora.

Figura 8 - Rota do fracionamento cromatográfico do *EGMM*

Fonte: A autora.

#### 4.7.1 Fracionamento cromatográfico da fração *DCM100 %* e isolamento de *C01GMM*

Uma alíquota de 2,3 g da fração *DCM100 %*, retirada do extrato *EGMM*, foi misturada em gel de sílica, pulverizada em grau de porcelana e acondicionada sobre 19,05 g de sílica, numa coluna de 500 mL. Em seguida, a amostra foi cromatografada utilizando como fase móvel hexano/acetato de etila a 20 % obtendo 102 frações de 10 mL, e mais 14 frações com o sistema acetato de etila 100 %. As frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada, após revelação com iodo e *p*-anizaldeído, sendo em seguida reunidas de acordo com as semelhanças do seu perfil cromatográfico, como descrito na Tabela 11.

Tabela 11 - Frações obtidas a partir da fração *DCM 100%* do *EGMM*

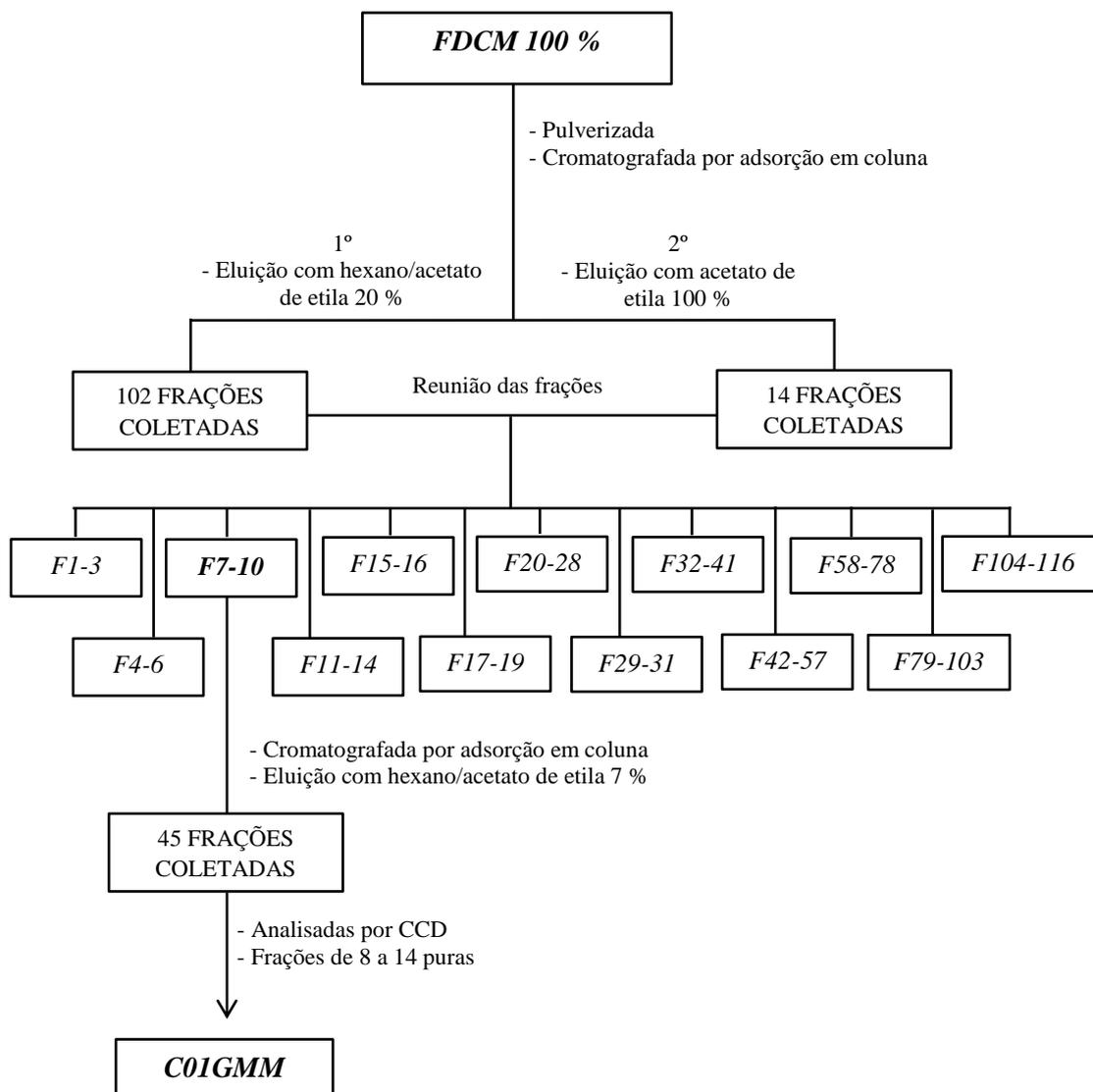
Frações Reunidas	Massa (mg)
<i>F1-3</i>	268,9
<i>F4-6</i>	236,9
<i>F7-10</i>	627,3
<i>F11-14</i>	408,9
<i>F15-16</i>	111,4
<i>F17-19</i>	164,4
<i>F20-28</i>	297,3
<i>F29-31</i>	78,7
<i>F32-41</i>	22,1
<i>F42-57</i>	20,8
<i>F58-78</i>	19,5
<i>F79-103</i>	14,4
<i>F104-116</i>	8,4

Fonte: A autora.

A fração *F7-10* (627 mg) foi cromatografada em coluna aberta utilizando gel de sílica como fase estacionária e hexano/acetato 7% como fase móvel, obtendo 45 frações de 10 mL, que foram reunidas de acordo com seu perfil cromatográfico a partir da análise por CCD. As frações de 8 a 14 apresentaram apenas um spot e o mesmo fator de retenção *RF*, indicando que as frações se encontravam puras. As frações de 11 a 14 foram reunidas e após secagem e

pesagem foi denominada de *C01GMM*. A Figura 9 mostra a rota seguida para o seu isolamento.

Figura 9 - Rota de isolamento de *C01GMM* a partir da FDCM 100 % do *EGMM*



Fonte: A autora.

#### 4.7.2 Fracionamento cromatográfico da fração *FDCM/MeOH 2%* e isolamento de *C02GMM* e *C03GMM*.

3,65 g de *FDCM/MeOH 2 %* foi misturada com gel de sílica, pulverizada em grau de porcelana e submetidas a cromatografia em uma coluna de 300 mL, previamente preparada

com 33,80 g de gel de sílica. A eluição fora processada em sistema gradiente, iniciando-se com Diclorometano/Metanol 2 %, do qual foram coletadas 31 frações de 10 mL, seguindo com Diclorometano/Metanol 5 % que resultou em 10 frações de 10 mL. As 41 frações obtidas foram analisadas por CCD, e de acordo com a semelhança de seus perfis cromatográficos estas foram reunidas. A Tabela 12 mostra estas frações após a junção.

Tabela 12 - Reunião das frações obtidas do fracionamento de *FDCM/MeOH 2%*

Frações	Massa (mg)
<i>F8-13</i>	575,4
<i>F14-16</i>	569,2
<i>F17-22</i>	630,7
<i>F23-30</i>	204,3
<i>F31-33</i>	163,4
<i>F34-41</i>	432,2

Fonte: A autora.

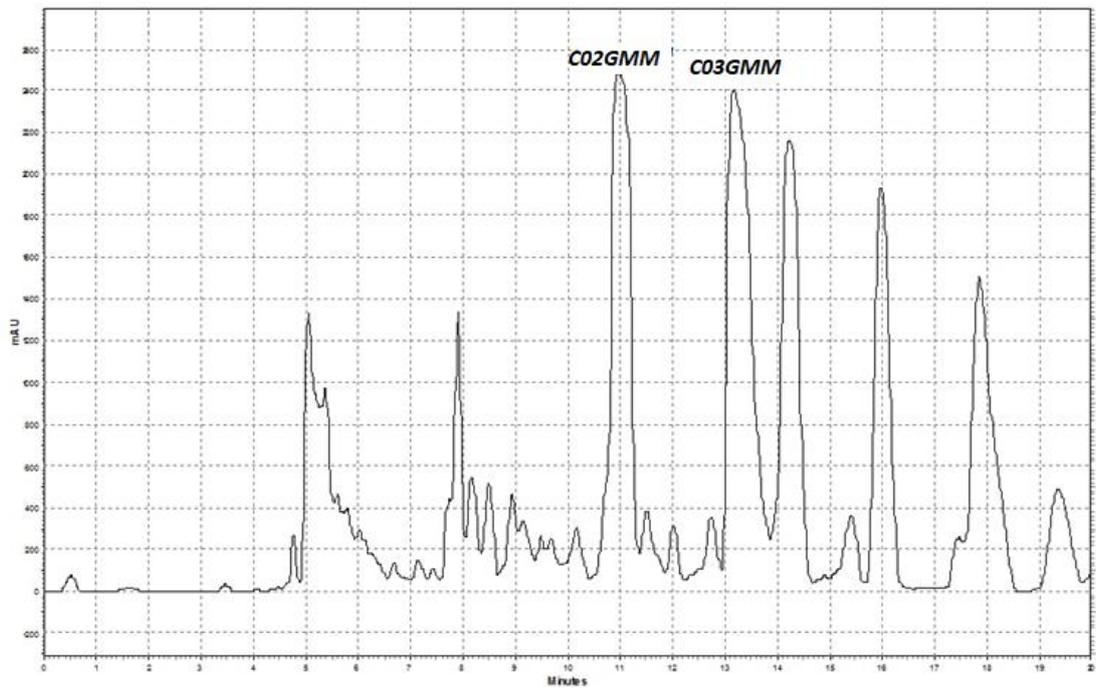
Uma alíquota de 150 mg da fração *F14-16* foi dissolvida em 7 mL de acetonitrila, grau espectroscópico, e em seguida a amostra foi submetida a HPLC. Após diversas injeções da amostra, variando as condições de análise, conseguiu-se a melhor resolução para separação das substâncias presentes na fração com as seguintes condições:

- ✓ Coluna semipreparativa Supercosil LC18;
- ✓ Sistema isocrático Acetonitrila/(água com TFA 0,05%) 32 %;
- ✓ Fluxo de 2,6 mL/min;
- ✓ Pressão 736 psi;
- ✓ Comprimento de onda 254 nm e
- ✓ Volume de injeção 70 µL.

Seis compostos foram coletados (1° (4,2 mg), 2° (26,4 mg), 3° (20,1 mg), 4° (10,4 mg) 5° (7,0 mg) e 6° (7,5 mg)) como pode ser visto no cromatograma representado na Figura 10, mas somente o 2° e 3° compostos coletados, denominados *C02GMM* e *C03GMM* respectivamente, foram novamente injetados no cromatógrafo para análise de pureza. O

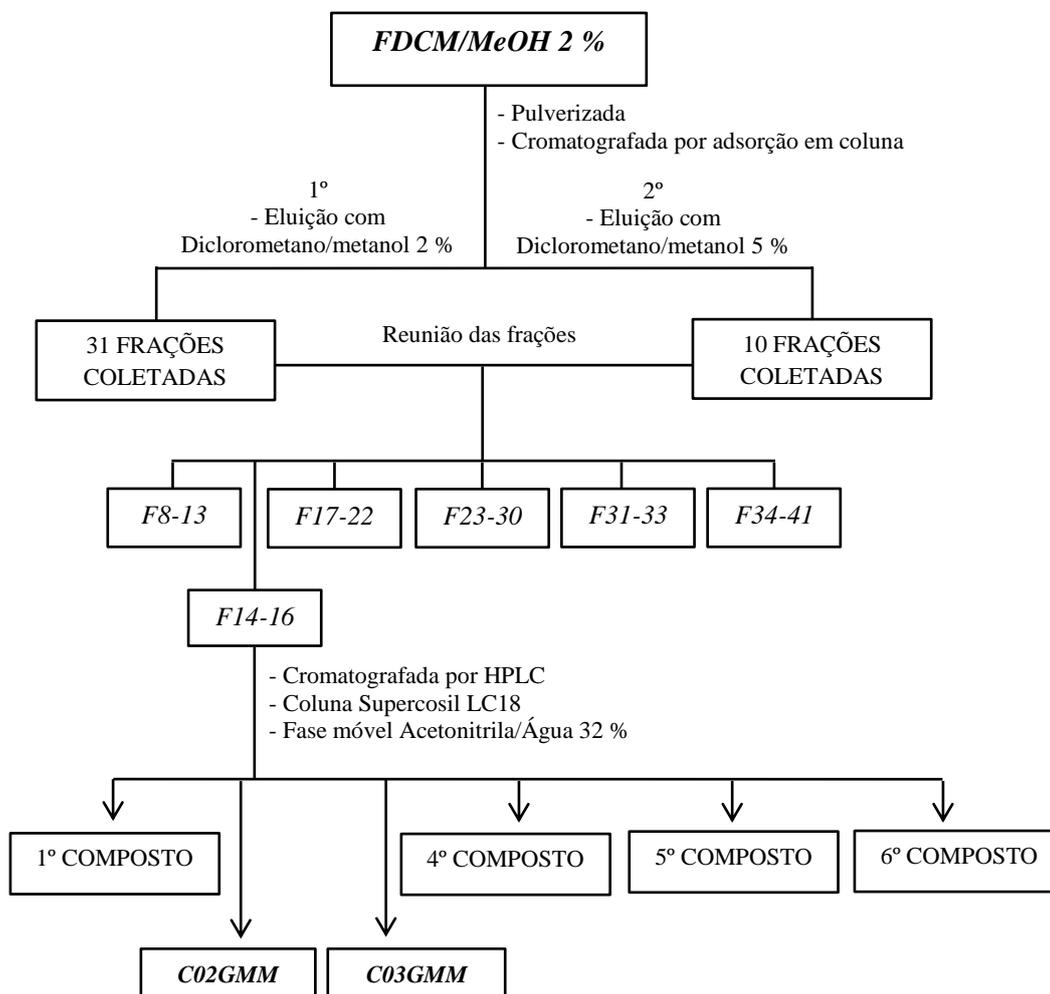
esquema da Figura 11 mostra as etapas para o isolamento destes compostos e o cromatogramas, representando a análise da pureza de *C02GMM* e *C03GMM*, apresentados nas figuras 12 e 13, respectivamente.

Figura 10 - Cromatograma da fração *F14-16* obtida da *FDCM/MeOH 2 %* do *EGMM*

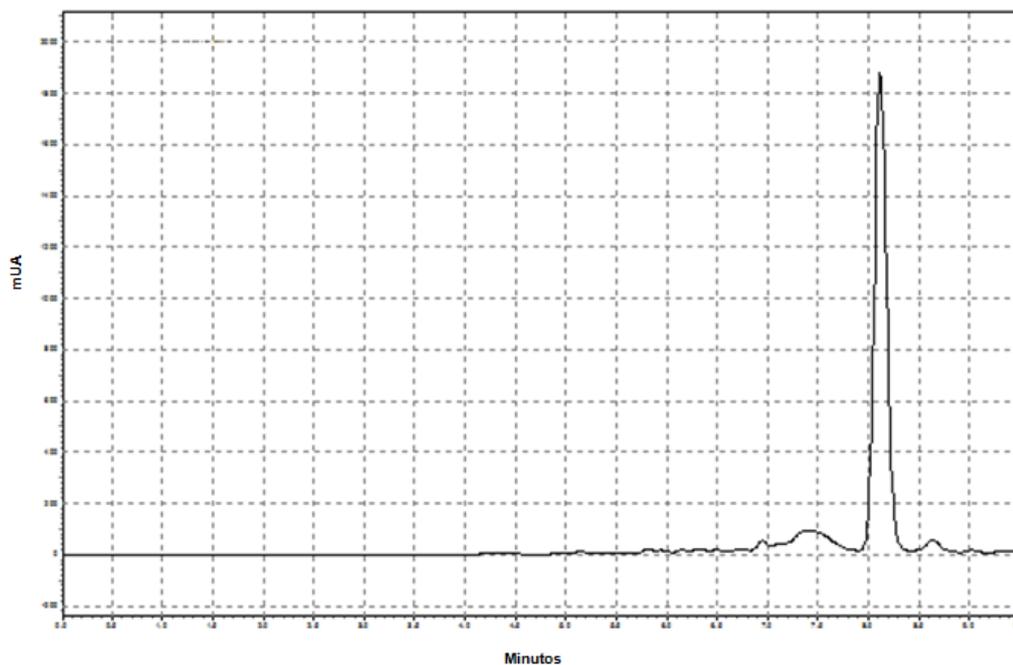


Fonte: A autora.

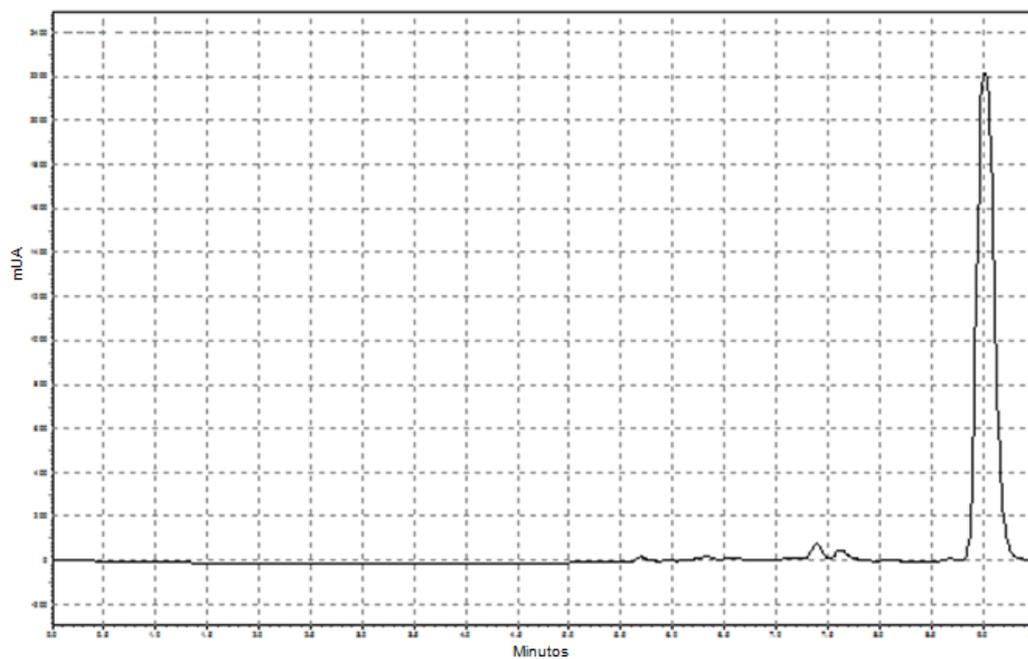
Figura 11 - Rota esquemática do isolamento de *C02GMM* e *C03GMM* a partir do fracionamento de *FDCM/MeOH 2 %* obtida do *EGMM*



Os critérios de pureza adotados para as substâncias isoladas foram: visualização de uma única mancha nas cromatoplacas com variação de eluentes e aparição de apenas um pico bem evidenciado no cromatograma para as substâncias que foram isoladas e analisadas por HPLC.

Figura 12 - Cromatograma da substância *C02GMM* isolada a partir da *F14-16*

Fonte: A autora.

Figura 13 - Cromatograma da substância *C03GMM* isolada a partir da *F14-16*

Fonte: A autora.

#### 4.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelos DRX-500 e Spect 75 e 300 MHz Onebay, o primeiro pertencente à Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, e do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), da Universidade Federal do Ceará, e o segundo, à Central Analítica da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte - UFRN. Operando na frequência de 500 e 300 MHz para hidrogênio e 125 e 75 MHz para carbono-13, respectivamente.

O solvente deuterado utilizado na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foi clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  pelo pico de hidrogênio pertencente à fração não deuterada do solvente clorofórmio e para os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  pelo pico de carbono-13 do solvente clorofórmio.

As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), sl (singleto largo) d (dubleto), dd (duplo dubleto), dl (dubleto largo), dt (dubleto triplo), td (tripleto duplo), t (tripleto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogênio dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT  $135^\circ$  e segundo convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico),  $\text{CH}_2$  (carbono metilênico) e  $\text{CH}_3$  (carbono metílico).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção dos extratos hidroalcoólicos

Os extratos hidroalcoólicos obtidos (*ERMM*, *EFMM* e *EGMM*) caracterizaram-se como materiais resinosos, de alta viscosidade, de coloração escura e odor característico de açúcares. Suas massas e rendimentos estão descritos na tabela 13.

Tabela 13 - Massas e rendimentos obtidos para os extratos hidroalcoólicos da *M. megalantha*

Extrato	Massa do Vegetal seco (g)	Massa do Extrato (g)	% Rendimento
<i>ERMM</i>	453	132,1	29,16
<i>EGMM</i>	433	71,21	16,45
<i>EFMM</i>	708	72,69	10,27

Fonte: A autora.

Rendimentos semelhantes foram encontrados na literatura para os extratos preparados com outras espécies do gênero *Marsdenia*. Da parte aérea da espécie *Marsdenia callosa*, por exemplo, o rendimento do extrato metanólico foi de 23 % (MALDONADO; JUÁREZ-JAIMES, 2013). O extrato etanólico obtido a partir dos galhos da *Marsdenia tenacíssima* teve um rendimento de 15 % (VAN KHANG, et al., 2015). Já o extrato hidroalcoólico (Etanol/água 95:5) preparado a partir dos galhos desta última espécie teve um rendimento de 8,72 % (DENG, et al., 2005).

### 5.2 Prospecção fitoquímica dos extratos

A prospecção fitoquímica realizada para os três extratos hidroalcoólicos revelou a presença dos grupos esteróides e saponínicos em todos os extratos, e ainda a presença de fenóis, triterpenóides, antocianinas, antociadinas e flavonóides no *ERMM*, e taninos no *EFMM*. A Tabela 14 mostra uma visão geral dos resultados da prospecção fitoquímica realizada.

Tabela 14 - Metabólitos identificados nos extratos hidroalcoólicos das folhas, galhos e raízes da *M. megalantha*.

Constituintes	EFMM	EGMM	ERMM
Fenóis	0	0	++
Taninos	++	0	0
Antocianinas, antociadinas e Flavonóides	0	0	+
Leucoantocianidinas, catequinas e flavonas	0	0	0
Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas	0	0	0
Esteróides	+++	+++	+++
Triterpenóides	0	0	0
Saponinas	+++	++	+++
Alcalóides	0	0	0
Quinonas	0	0	0
Cumarinas	0	-	0

(+++)= Forte; (++)= Médio; (+)= Fraco; (0)= Ausente; (-)= Não Feito.

Fonte: A autora.

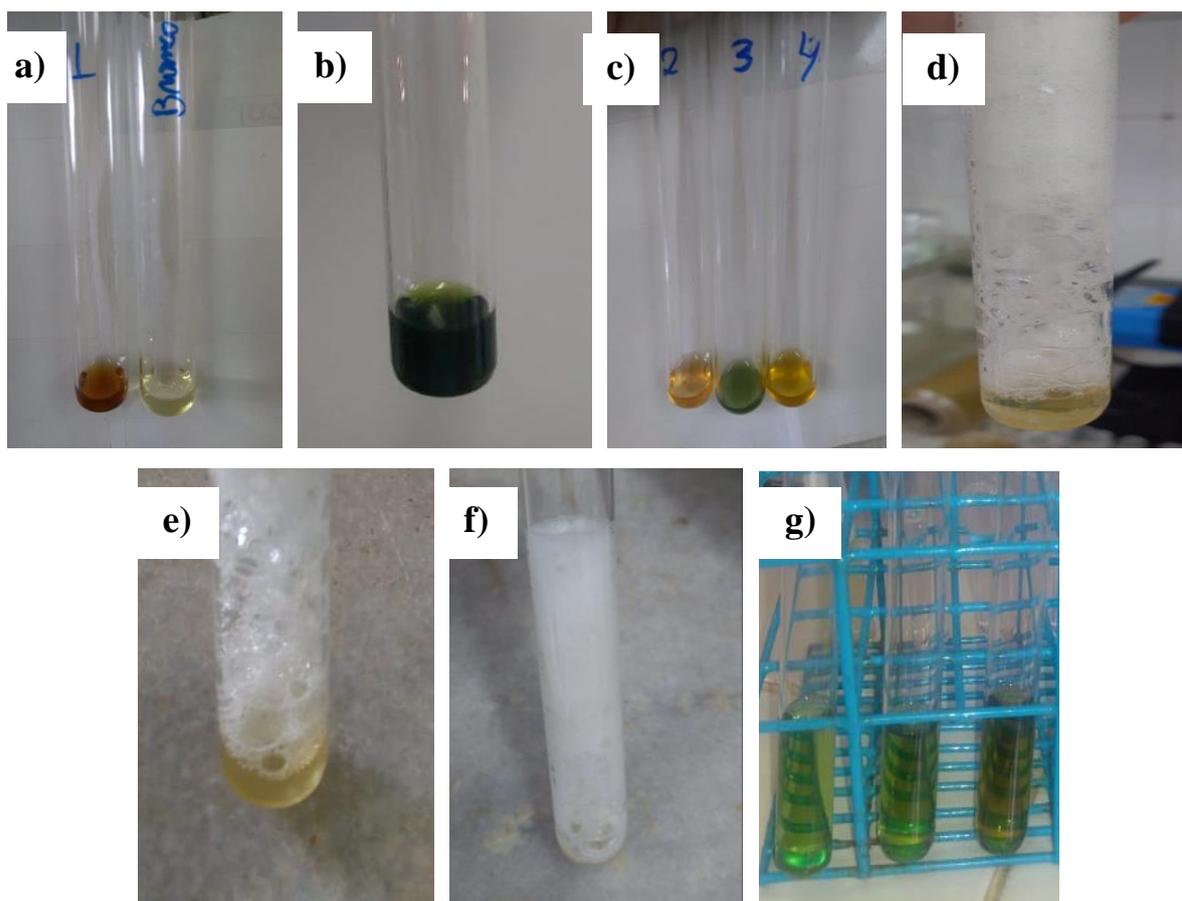
A Figura 14 ilustra os resultados positivos desta prospecção. Tendo sido a presença de fenóis no *ERMM* evidenciada pelo aparecimento de coloração vermelha no tubo 1 contendo o extrato e a solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$  e por comparação com o teste “branco” negativo (Figura 14-a). Já a presença de precipitado escuro de tonalidade verde no tubo contendo o *EFMM* (Figura 14-b) caracterizando a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos).

A identificação de antocianinas e antocianidina no *ERMM* deu-se pela aparição da cor vermelha (pouco intensa) no tubo 2 (pH 3). Já a coloração amarela intensificada no tubo 4 (pH 11) revelou a presença de flavonóides no extrato. A Figura 14-c ilustra esses resultados.

A formação de espuma abundante e permanente no teste para saponinas evidenciou que esta é uma classe de metabólitos predominante na espécie *M. megalantha*. No 3º tubo (Figura 14-f) contendo o *ERMM* assim como no 1º tubo (Figura 14-d) com o *EFMM*, percebeu-se a formação de uma espuma bem intensificada. Já no 2º tubo (Figura 14-e) contendo o *EGMM* a espuma foi um pouco menos abundante, entretanto, fora notavelmente persistente.

Os testes para esteróides e triterpenóides dos *EFMM*, *EGMM* e *ERMM*, apresentaram uma coloração esverdeada acentuada, logo, mais condizente com a coloração característica para esteróides (azul esverdeada). A Figura 14-g ilustra a coloração resultante para os três extratos (tubo 1= *EFMM*, tubo 2= *EGMM* e tubo 3= *ERMM*).

Figura 14 - Resultados positivos dos testes fitoquímicos para os extratos brutos.



Fonte: A autora.

Estas classes de metabólitos já foram encontradas em outras espécies do gênero *Marsdenia*, como já detalhado anteriormente, destacando-se esteróides nas *M. tenacíssima*, *M. latifoliae* e *M. flavescens* (DUFF, et al., 1973; LI, et al., 2007; LIU, et al., 2008; UDOIDONG, et al., 2014). Saponinas na *M. hainanensis* (MA, et al., 1997). Triterpenos nas *M. altíssima*, *M. globifera*, *M. callosa*, e *M. Formosana* (ITO; LAI, 1978; DE S. LUNA, et al., 2005; MALDONADO; JUÁREZ-JAIMES, 2013; SHENG-XIANG, et al., 1993). E flavonóides nas *Marsdenias latifoliae* e *altíssima* (DE S. LUNA, et al., 2005; UDOIDONG, et al., 2014).

### 5.3 Ensaios de Atividades Biológicas

#### 5.3.1 Atividade Antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana pôde ser realizada a partir da leitura das placas no espectrofotômetro de microplacas. Os valores médios das leituras das absorbâncias obtidos a partir das triplicatas em 0 e 24 h para todas as concentrações testadas encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15 – Comparação estatística entre as leituras das absorvâncias para diferentes concentrações do *ERMM* e controles.

Tratamento (Conc. do extrato (mg/mL) / Controle)	Microorganismos									
	<i>Staphylococcus Aureus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia Coli</i>		<i>Enterococos Faecalis</i>		<i>Shigella Flexneri</i>	
	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h
13,5	0,35 aA	0,44 bcA	0,69 aB	1,22 aA	0,62 aB	1,07 aA	0,67 aB	0,81 aA	0,58 aB	0,75 aA
6,8	0,36 aA	0,43 bcA	0,44 bB	1,01 bA	0,40 bB	0,71 bA	0,44 bB	0,59 bA	0,43 bA	0,47 bA
3,4	0,34 aA	0,49 bcA	0,37 bcB	0,88 cA	0,36 bcB	0,68 bcA	0,38 bcA	0,45 cA	0,36 bcA	0,40 bA
1,7	0,32 aB	0,61 abA	0,33bcdB	0,84 cA	0,33 bcB	0,54 cdA	0,34 bcA	0,40 cdA	0,28 cdA	0,36 bA
Controle (+)	0,27 aA	0,32 cA	0,25 cdA	0,27 dA	0,23 cA	0,26 eA	0,29 cA	0,29 cdA	0,19 dA	0,20 cA
Controle (-)	0,29 aB	0,64 aA	0,24 dB	0,64 eA	0,29 bcB	0,50 dA	0,31cB	0,39 dA	0,26 cdB	0,40 bA

Médias seguidas de mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade; Médias seguida da mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Fonte: A autora.

Considerando os resultados da análise estatística a partir dos valores das absorbâncias das leituras no espectrofotômetro, inferiu-se que o *ERMM* apresentou atividade contra *S. aureus* uma vez que houve inibição de crescimento desta bactéria nos poços contendo o extrato nas concentrações 13,5 mg/mL, 6,8 mg/mL e 3,4 mg/mL. Os valores medianos das absorbâncias não diferiram estatisticamente quando comparados entre os tempos 0 e 24 horas para o extrato nestas concentrações. Já na concentração 1,7 mg/mL o crescimento bacteriano é comprovado pelo aumento da absorbância na leitura após 24 horas, e por comparação com o controle negativo. Fora possível determinar a MIC como sendo 3,4 mg/mL, uma vez que ao comparar-se com o valor de absorbância do controle positivo na leitura após 24 horas, nota-se que houve inibição, pois as absorbâncias não diferiram estatisticamente.

O *ERMM* não se mostrou eficiente na inibição de crescimento de *P. aeruginosa* e *E. coli* uma vez que ao se comparar os valores das leituras de absorbâncias nos tempos 0 e 24 h, houve diferenças estatísticas significativas entre os valores em todas as concentrações de extrato testadas. A mesma relação de crescimento fora evidenciada no controle negativo. Em contrapartida este crescimento foi inibido no controle positivo, assim como esperado. De acordo com os resultados obtidos a concentração mínima inibitória do *ERMM* contra estas espécies microbianas deve ser maior que 13,5 mg/mL.

O *ERMM* apresentou atividade contra a *E. faecalis*, uma vez que a avaliação do extrato demonstrou efetiva inibição de crescimento bacteriano desta espécie nas concentrações 1,7 mg/mL e 3,4 mg/mL, tendo em vista que os valores das absorbâncias não diferiram estatisticamente entre os tempos 0 h e 24 h para ambas as bactérias, coincidindo com o comportamento do controle positivo. Todavia, não se pôde determinar a MIC, pois ao se comparar o valor da leitura após 24 h para a concentração 1,7 mg/mL com o valor do controle negativo, estes se mostraram estatisticamente semelhantes porém o valor da concentração 1,7 mg/L fora numericamente maior. Dessa forma estima-se que a MIC seja inferior a 1,7 mg/L. Já com relação ao aumento do número de células bacterianas nas duas maiores concentrações (6,8 e 13,5 mg/mL) é provável que tenha ocorrido o efeito de antagonismo entre os princípios ativos presentes no extrato, o qual resulta na diminuição da atividade de um princípio ativo por ação de um outro.

O *ERMM* apresentou atividade antimicrobiana sobre *S. fleneri* nas concentrações 1,7 mg/mL, 3,4 mg/mL e 6,8 mg/mL, uma vez que os valores médios de absorbância não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados nos tempos 0 e 24 horas, tendo

seguido o mesmo comportamento do controle positivo e diferido do comportamento do controle negativo ao comparar-se as leituras das placas em 0 e 24 h, assim como era esperado. Contudo a MIC não pôde ser determinada, pois apesar da menor concentração testada (1,7 mg/mL) ter conseguido inibir o crescimento desta bactéria, e de seu valor de absorbância após a leitura de 24 h ser numericamente menor que o valor do controle negativo, não há diferença estatística entre eles. Dessa forma, estima-se que a MIC para o *ERMM* frente a esta bactéria seja inferior a 1,7 mg/mL. O fato da ocorrência do crescimento de *S. fleneri* na maior concentração do *ERMM* testada, provavelmente deve-se a possível existência de antagonismo entre substâncias biologicamente ativas presentes no extrato.

O nível de inibição aceitável para produtos naturais ao ser comparado com antibióticos padrões ainda não é consensual entre os autores, alguns consideram, portanto, com um bom potencial antimicrobiano os que conseguem inibir de forma similar aos antibióticos, enquanto outros consideram somente com bom potencial aqueles com níveis de inibições superiores (DOMINGUES, et al., 2015).

A este respeito, com base nos resultados da MIC, seguindo os critérios propostos por Sartoratto et al. (2004), para materiais vegetais a atividade antimicrobiana é considerada baixa (7000 a 3500 µg/mL), moderada (1700 a 875 µg/mL), alta (437,5 a 218.75 µg/mL) ou muito alta (<109.375 µg/mL). Dessa forma, de acordo com esta classificação o resultado da MIC do *ERMM* apresentou atividade baixa contra *S. aureus* (MIC = 3,375 mg/mL).

Apesar das plantas com maior atividade antimicrobiana serem as que apresentam como metabólitos secundários compostos fenólicos, flavonóides, taninos, terpenóides, alcalóides, lectinas, polipeptídeos, e cumarinas (ALIGIANIS, et al., 2001), a fraca atividade evidenciada no presente ensaio pode ser explicada, por exemplo, devido à suposta presença de quantidades insuficientes de metabólitos detentores do potencial antimicrobiano. Ou ainda, pelo fato da atividade antimicrobiana de extratos vegetais ser resultado da ação conjunta de diferentes compostos químicos presentes na planta.

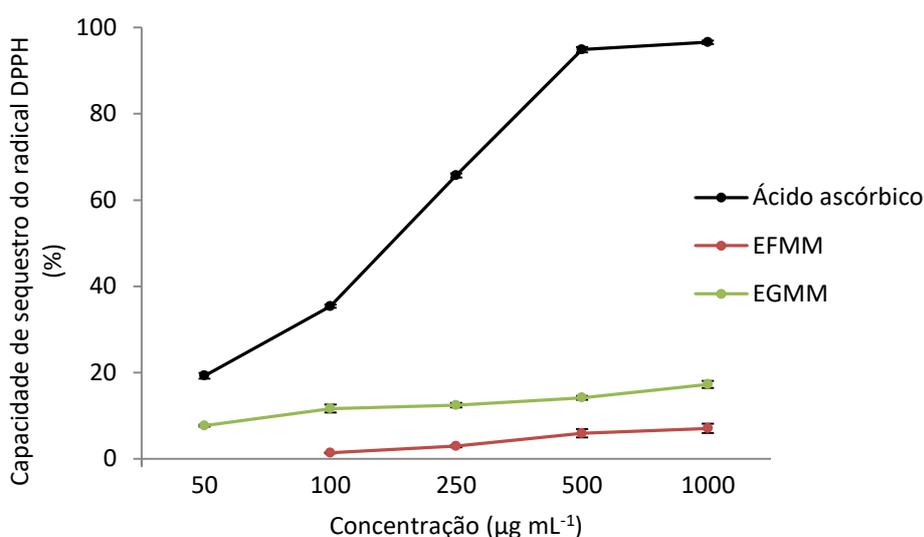
De acordo com Sartori (2005) a síntese de flavonóides por plantas ocorre em resposta a infecções microbianas sofridas por estas e isto justifica sua ação antimicrobiana frente a vários organismos. Sua atividade ocorrendo provavelmente em razão da sua habilidade em complexar a parede celular bacteriana, causando sua lise no caso da ação de flavonóide mais lipofílicos.

### 5.3.2 Atividade antioxidante

Os metabólitos secundários presentes nas plantas são responsáveis por várias de suas propriedades biológicas, a atividade antioxidante, por exemplo, é associada ao conteúdo fenólico (MEDEIROS; BEZERRA, 2018). A atividade dos antioxidantes é dependente de sua estrutura química, dessa forma a mesma pode ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais) (NEVES, et al., 2009).

Os resultados da capacidade de sequestro do radical DPPH estável pelos extratos *EFMM* e *EGMM* encontram-se ilustrados na Figura 15. De acordo com estes, os extratos *EFMM* e *EGMM* apresentaram baixa capacidade de sequestro do radical DPPH em todas as concentrações testadas, considerando que nenhum dos extratos apresentou atividade similar à do ácido ascórbico, tendo ambos os extratos apresentado uma atividade inferior a 20 %, o qual é um valor inferior ao da atividade do controle positivo (ácido ascórbico) na menor concentração analisada (50  $\mu\text{g/mL}$ ). As absorbâncias para o extrato *ERMM* não foram detectadas.

Figura 15 - Capacidade de sequestro do radical DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazila) do ácido ascórbico e dos extratos *EMMF*, *EMMG* e *EMMR*, em diferentes concentrações

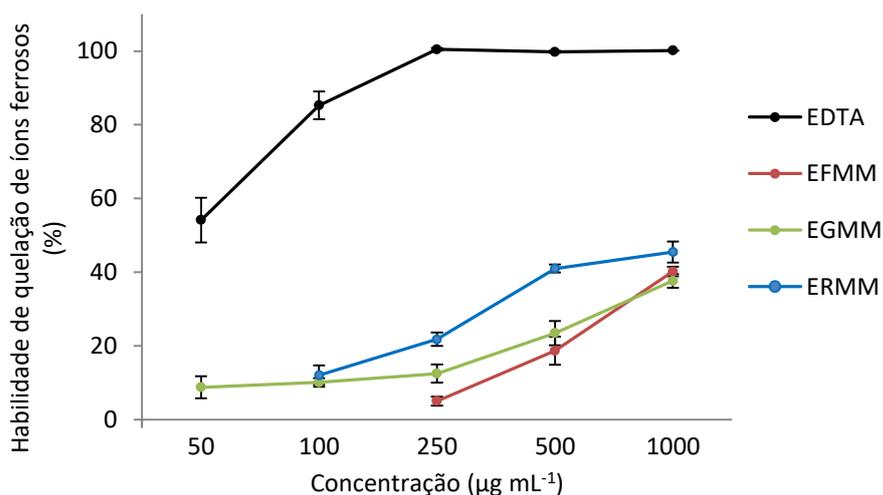


Fonte: A autora.

Os resultados do FIC (Figura 16) indicaram que nenhum dos extratos mostrou atividade semelhante ao EDTA. Todavia, o extrato hidroalcoólico das raízes da *M. megalantha* apresentou uma atividade crescente de acordo com o aumento das concentrações, 100 $\mu\text{g/mL}$  ( $12,05 \pm 2,64$  %), 250 $\mu\text{g/mL}$  ( $21,79 \pm 1,82$  %), 500 $\mu\text{g/mL}$  ( $40,99 \pm 1,08$ %) e 1000 $\mu\text{g/mL}$  ( $45,48 \pm 2,88$ %) quando comparado aos demais extratos analisados. Na concentração 50 $\mu\text{g/mL}$  a habilidade de quelação de íons ferrosos não fora detectada pelo método. Da mesma forma ocorreu para o extrato *EFMM* nas concentrações 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Na concentração 1000 $\mu\text{g/mL}$  o *EFMM* exibiu uma habilidade de quelação ligeiramente maior ( $40,15 \pm 1,30$  %) que o extrato *EGMM* ( $37,63 \pm 1,88$  %). Já ao se comparar as concentrações 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$  para os *EFMM* e o *EGMM*, verificou-se que apesar das habilidades de quelação dos extratos serem muito baixas, o *EGMM* ( $12,48 \pm 2,47$  % para 200  $\mu\text{g/mL}$  e  $23,46 \pm 3,31$  % para a concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ ) apresenta maior atividade que o *EFMM* ( $5,01 \pm 1,21$  % para 200  $\mu\text{g/mL}$  e  $18,69 \pm 3,85$  % para a concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ ).

Figura 16 - Poder de quelação de íons ferroso (FIC) do EDTA e dos extratos *EMMF*, *EMMG* e *EMMR* em diferentes concentrações

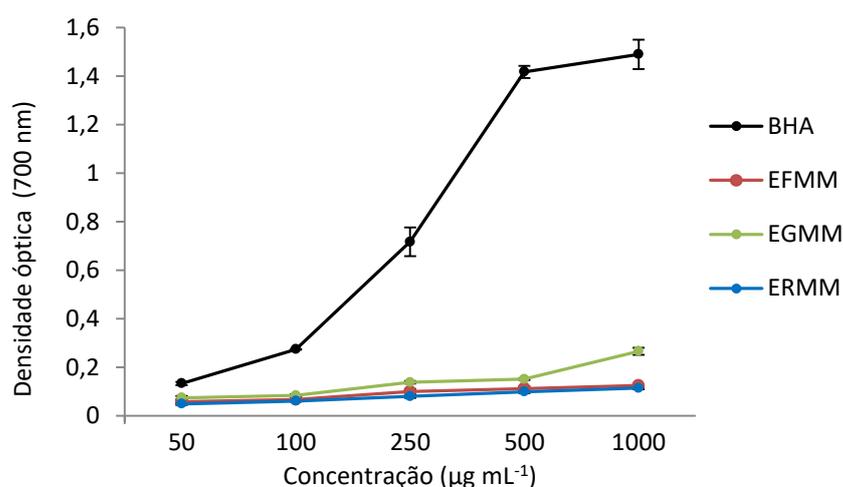


Fonte: A autora.

Os resultados para o FRAP (figura 17) mostraram que o aumento na absorbância acompanhou o aumento na concentração dos extratos de 50 para 1.000  $\mu\text{g/mL}$ . Somente na

concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  os extratos apresentaram um FRAP semelhante ao do controle positivo. A maior FRAP foi observada no extrato *EGMM* na concentração 1000  $\mu\text{g/mL}$ , no entanto, seu valor fora consideravelmente baixo.

Figura 17 - Poder de redução de íons férricos (FRAP) do BHA e dos extratos *EMMF*, *EMMG* e *EMMR* em diferentes concentrações.



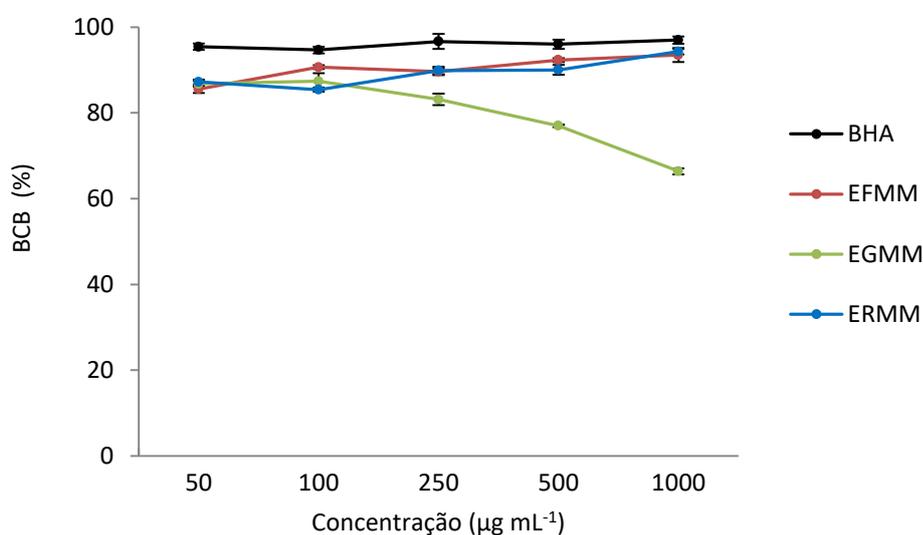
Fonte: A autora.

O método de branqueamento do  $\beta$ -caroteno/ ácido linoleico permite verificar a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. Neste ensaio a avaliação da atividade antioxidante é feita por meio espectrofotométrico baseando-se na descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA, et al., 2006).

Os resultados para a atividade inibitória do branqueamento do  $\beta$ -caroteno (BCB) (Figura 18) indicaram que o aumento da concentração dos extratos não é um fator que implica em sua ação inibitória. O que pôde ser visto, por exemplo, pela observação de que para o *EGMM* ao aumentar-se a concentração do extrato de 50 para 100  $\mu\text{g/mL}$  houve um aumento em sua atividade, contudo, partindo-se da concentração 100 à 1000  $\mu\text{g/mL}$  o declínio da atividade do extrato fora perceptível. Um comportamento variável da ação inibitória do BCB pôde ser acompanhado para os extratos *ERMM* e *EFMM* ao passo que as concentrações destes extratos cresceram.

De acordo com os resultados na concentração 1000  $\mu\text{g/mL}$  o *ERMM* apresentou a melhor inibição ( $94,31 \pm 0,62 \%$ ) seguido pelo *EFMM* ( $93,49 \pm 1,65 \%$ ) apresentando a menor inibição o *EGMM* ( $66,40 \pm 0,71 \%$ ). Na concentração 500  $\mu\text{g/mL}$  o *EFMM* apresentou a melhor inibição do BCB ( $92,33 \pm 0,43 \%$ ) seguido pelo *ERMM* ( $90,03 \pm 1,15 \%$ ) e novamente dentre os extratos testados o *EGMM* apresentou a menor inibição ( $77,01 \pm 0,29 \%$ ) para esta concentração. Na concentração 250  $\mu\text{g/mL}$  o *ERMM* conseguiu inibir  $89,90 \pm 0,86 \%$  e continuou exibindo a maior inibição do BCB, seguido pelo *EFMM* ( $89,61 \pm 0,75 \%$ ) e a menor inibição sendo novamente do *EGMM* ( $83,16 \pm 1,32 \%$ ). Já na concentração 100  $\mu\text{g/mL}$  o comportamento inibitório se deu com o *EFMM* apresentando a maior atividade ( $90,68 \pm 0,45 \%$ ), seguido pelo *EGMM* ( $87,38 \pm 1,89 \%$ ) e a menor atividade tendo sido apresentada pelo *ERMM* ( $85,24 \pm 0,56 \%$ ). Na concentração 50  $\mu\text{g/mL}$  o *ERMM* inibiu  $87,24 \pm 0,56 \%$ , o *EGMM* exibiu uma inibição inferior ( $86,79 \pm 0,66 \%$ ) ao *ERMM*, seguido pelo *EFMM* ( $85,56 \pm 0,92 \%$ ).

Figura 18 - Atividade inibitória do branqueamento do  $\beta$ -caroteno (BCB) do BHA e dos extratos *EMMF*, *EGMM* e *EMMR* em diferentes concentrações.



Fonte: A autora.

Os extratos *EFMM* e *ERMM* apresentaram uma atividade semelhante a do controle positivo no teste do BCB, evidenciando assim o potencial dos extratos como antioxidante neste teste.

Oliveira (2011) avaliou a atividade antioxidante dos extratos aquosos das folhas, caules e raízes da espécie *M. megalantha* a partir dos ensaios de sua capacidade antioxidante total (CAT), poder redutor através do monitoramento da formação do azul de prussian, quelação férrica, sequestro do radical hidroxila e sequestro do radical superóxido, onde de maneira geral, os resultados obtidos indicaram que estes extratos apresentam diferentes atividades antioxidantes em diferentes sistemas de avaliação, corroborando assim com os resultados deste trabalho. O autor ainda concluiu que os compostos fenólicos contribuem significativamente para a atividade antioxidante destes extratos.

#### 5.4 Considerações estruturais dos compostos isolados da *Marsdenia megalantha*

##### 5.4.1 Considerações estruturais dos compostos isolados das Raízes

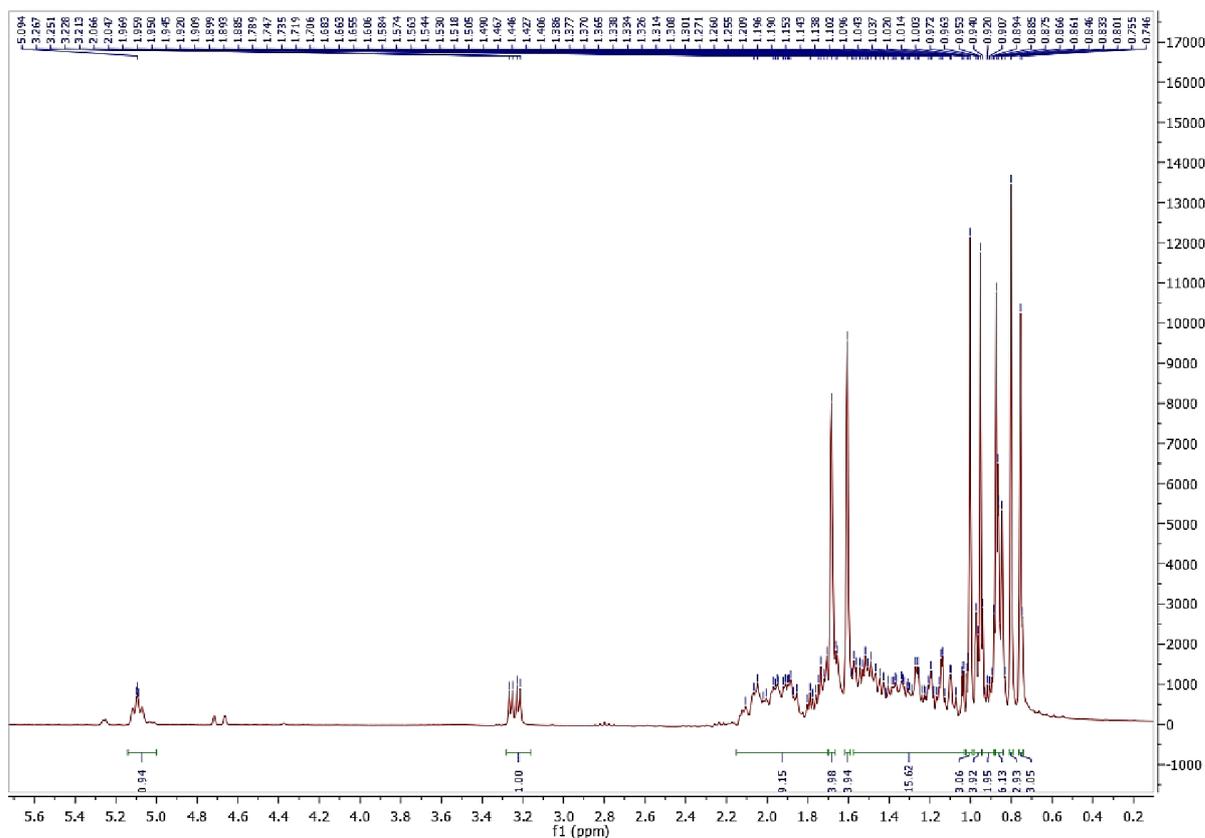
###### 5.4.1.1 Considerações estruturais do composto *C01RMM*

O composto denominado *C01RMM* isolado a partir das frações *DCM 100%*, *DCM/MeOH 1 e 2 %*, das raízes da *Marsdenia megalantha*, foi obtido como um sólido cristalino incolor solúvel em diclorometano.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), figura 19, apresentou trinta e uma linhas espectrais que quando comparado ao espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPT 135, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), figura 20, é possível identificar treze sinais em região positiva do espectro ( $\delta_{\text{C}}$  125,42; 79,23; 51,15; 49,81; 36,08; 28,25; 25,96; 24,67; 20,34; 19,12; 17,90; 15,81 e 15,75) característico de carbonos metílicos e/ou metínicos mais onze sinais na região negativa ( $\delta_{\text{C}}$  53,64, 35,60; 35,44; 31,08; 29,95; 28,35; 28,10; 27,86; 24,95; 21,73 e 19,1) qualificados como metilênicos e ( $\delta_{\text{C}}$  134,21; 133,79; 50,26; 44,36; 39,16; 37,50 e 34,01) caracterizados como carbono quaternário.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), Figura 21, não apresentou sinais na região de hidrogênio aromático e apenas um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,24 (dd  $J$  4,8 e 11,7 Hz) característico para hidrogênio H-COH, em conjunto com o teste negativo de espuma realizado para o composto confirmou a ausência de unidades osídicas na estrutura. Outro fator que colabora com esta afirmação é a ausência de sinais de carbonos na região característica para açúcares.



Figura 21 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto *C01RMM*

Fonte: A autora.

#### 5.4.1.2 Considerações estruturais do composto *C02RMM*

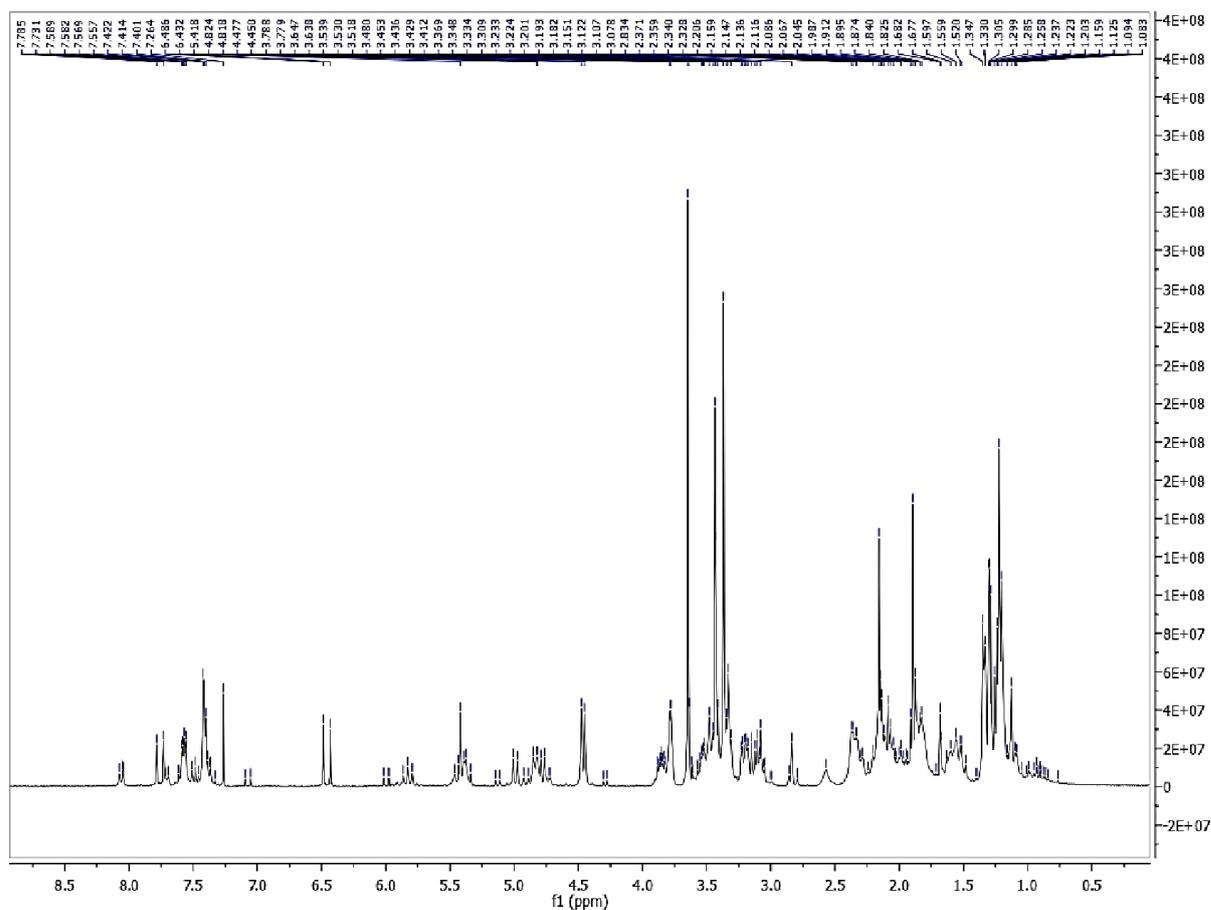
O composto denominado *C02RMM* isolado a partir da mistura das frações *DCM* 100%, *DCM/MeOH* 1 e 2 %, das raízes da *Marsdenia megalantha* foi obtido como um material resinoso, solúvel em clorofórmio e em metanol. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), figura 22, apresentou na região característica de hidrogênio aromáticos os sinais descritos abaixo:

$\delta_{\text{H}}$  7,76 ppm (d,  $J=16,2$  Hz) 1H

$\delta_{\text{H}}$  7,58 ppm (m) 2H

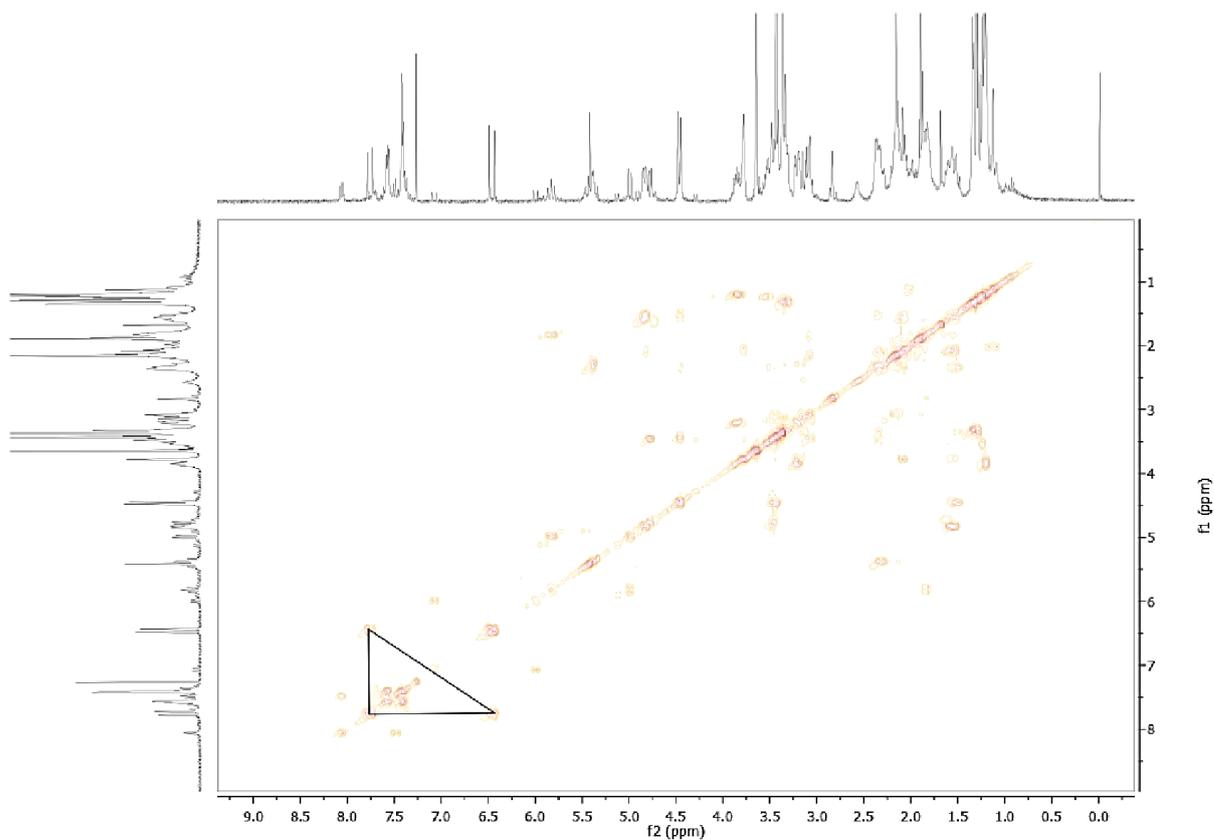
$\delta_{\text{H}}$  7,41 ppm (m) 3H

$\delta_{\text{H}}$  6,46 ppm (d,  $J=16,2$  Hz) 1H

Figura 22 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto *C02RMM*

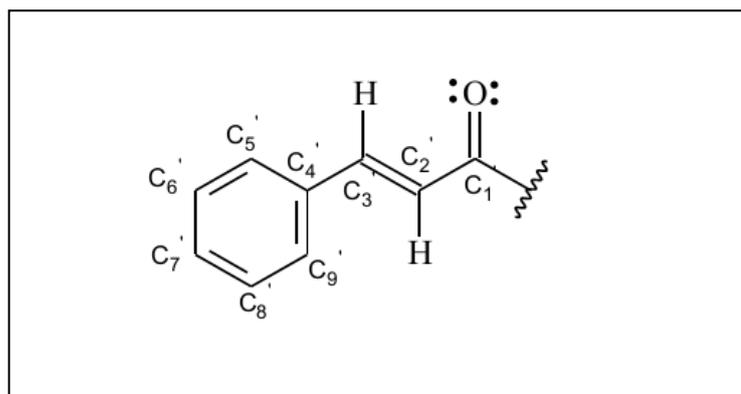
Fonte: A autora.

Essa sequência de sinais, em conjunto com o espectro RMN  $^1\text{H}$  (COSY, 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), Figura 23, claramente se observa um acoplamento entre os hidrogênios  $\delta_H$  7,76 e  $\delta_H$  6,46 com  $J$  16,2 Hz indicando a presença do grupo cinamoil (Figura 24) que é comum em substâncias isoladas de espécies de *Marsdenia* (ZHANG, et al., 2010), ligado na estrutura.

Figura 23 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [COSY, 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] do composto *C02RMM*

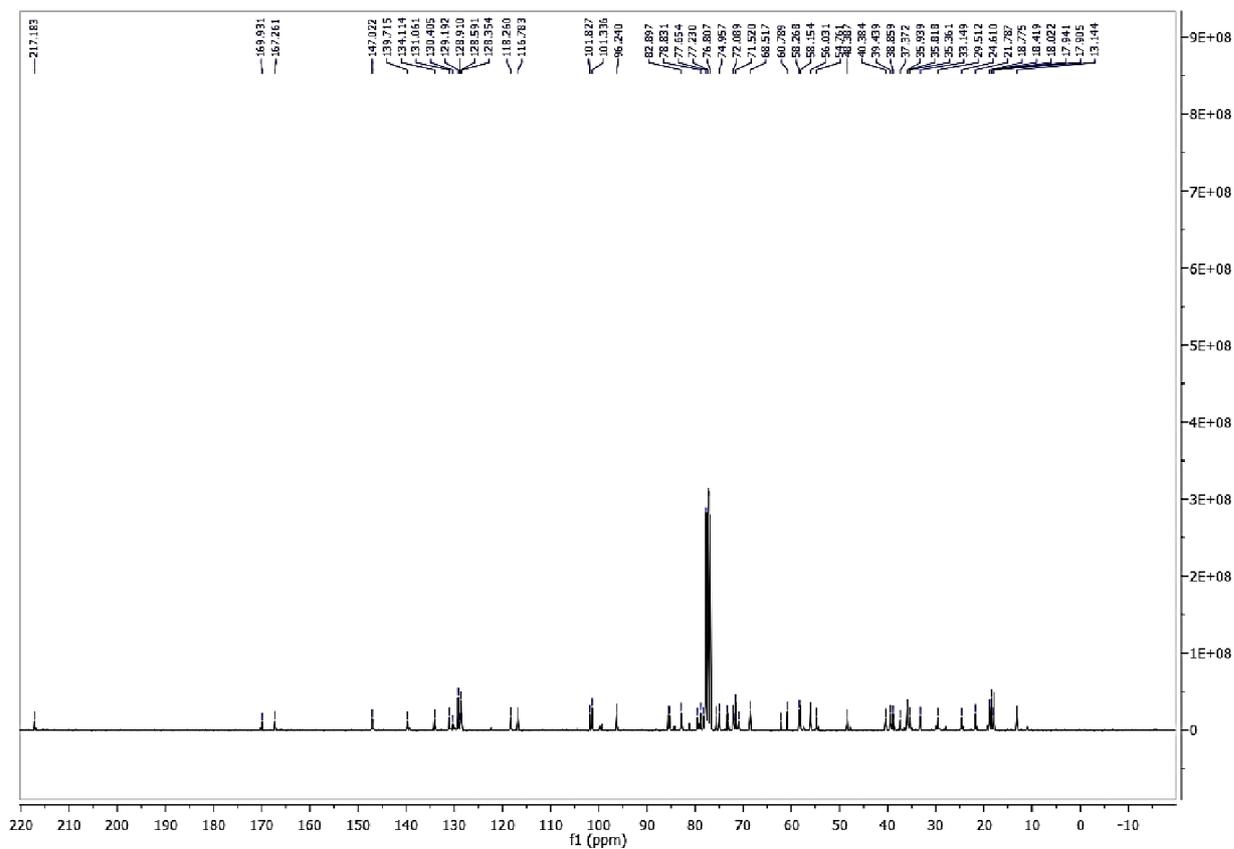
Fonte: A autora.

Figura 24 - Estrutura do grupo Cinamoil.



Fonte: A autora.

O espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), figura 25, apresentou quarenta e sete linhas espectrais, dos quais os sinais em  $\delta_C$  217,18  $\delta_C$  169,93 e  $\delta_C$  167,26 foram assinalados como de carbonos carbonílicos dos quais o  $\delta_C$  167,26 corresponde a carbonila do grupo cinamoil.

Figura 25 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto ou *C02RMM*

Fonte: A autora.

No espectro também é observado a presença de sinais na região de carbono aromático correspondentes ao grupo cinanoil e oleifínico como pode ser visto na Tabela 16.

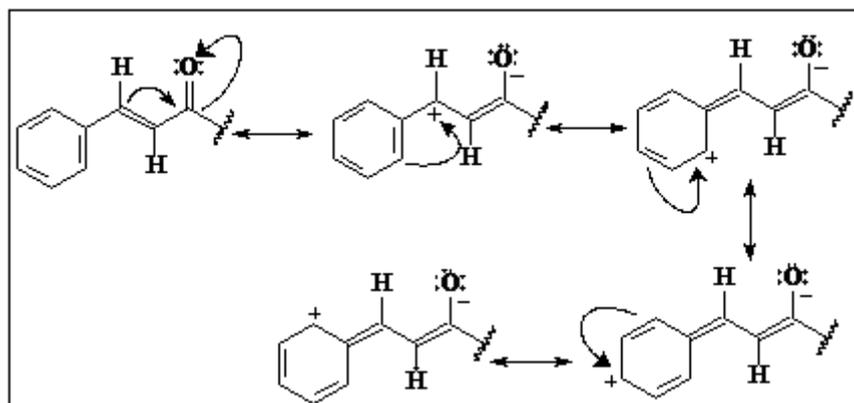
Tabela 16 – Sinais característicos de carbono Aromático/Oleifinico obtidos no espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do *C02RMM*

Sinais espectrais nas regiões de Aromático/Oleifinico $\delta_C$
116,78
118,26
128,35
128,59 x 2C
129,19 x 2C
130,40
131,06
134,11
139,72
147,02

Fonte: A autora.

Oito dos carbonos descritos acima fazem parte do grupo cinamoil, dentre estes os carbonos  $\text{C}_3'$ ,  $\text{C}_5'$ ,  $\text{C}_7'$  e  $\text{C}_9'$  são os mais desprotegidos, como pode ser observado a partir da deslocalização dos elétrons nas estruturas de ressonância. Observou-se ainda que os sinais  $\delta_C$  128,59 e  $\delta_C$  129,19 possuem intensidade maior que os demais carbonos  $sp^2$ , indicando que mais de um carbono absorvem nessa frequência. Essas observações estão de acordo com os resultados apresentados por (ZHANG, et al., 2010), apontando inequivocamente a existência de um grupo cinamoil na estrutura do composto. As formas de ressonância apresentadas pelo grupo cinamoil está apresentado na figura 26.

Figura 26 - Ressonância do grupo cinamoil.



Fonte: A autora.

Outro aspecto importante existente que merece ser destacado é a presença dos sinais  $\delta_C$  96,24,  $\delta_C$  101,34 e  $\delta_C$  101,83 no espectro RMN  $^{13}\text{C}$  e os sinais em  $\delta_H$  4,83 1H e  $\delta_H$  4,46 2H no espectro RMN  $^1\text{H}$  característicos de carbonos anoméricos e hidrogênios anoméricos respectivamente. Estes sinais indicam a presença de três unidades osídicas ligadas na estrutura de *C02RMM*. A indicação da presença dessas unidades de açúcares ligadas na estrutura é reforçada pelos sinais de 15 carbonos que se encontram dentro da faixa de 65 a 85 ppm no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , notoriamente característica da presença de carbono ligado a oxigênio.

A combinação de todas essas informações obtidas nos espectros RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  em conjunto com o teste positivo de Lieberman-Burchard para esqueleto esteroidal e de espuma apresentado pelo composto, nos permite concluir que *C02RMM*, trata-se de um glicosídeo esteroidal com o grupo cinamoil ligado na estrutura.

#### 5.4.2 Considerações estruturais dos compostos isolados dos galhos

##### 5.4.2.1 Considerações estruturais do composto *C01GMM*

O composto denominado de *C01GMM* isolado a partir do extrato DCM 100 %, dos galhos da *Marsdenia megalantha*, foi obtido como um sólido cristalino incolor solúvel em diclorometano. O composto apresentou teste positivo Lieberman-Burchard (figura 27) e negativo para formação de espuma, indicando que o esqueleto carbônico é de um triterpenóide ausente de unidades osídicas.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (APT, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), figura 28, apresentou vinte e nove linhas espectrais, dos quais treze sinais em região positiva do espectro ( $\delta_C$  125,44; 79,24;

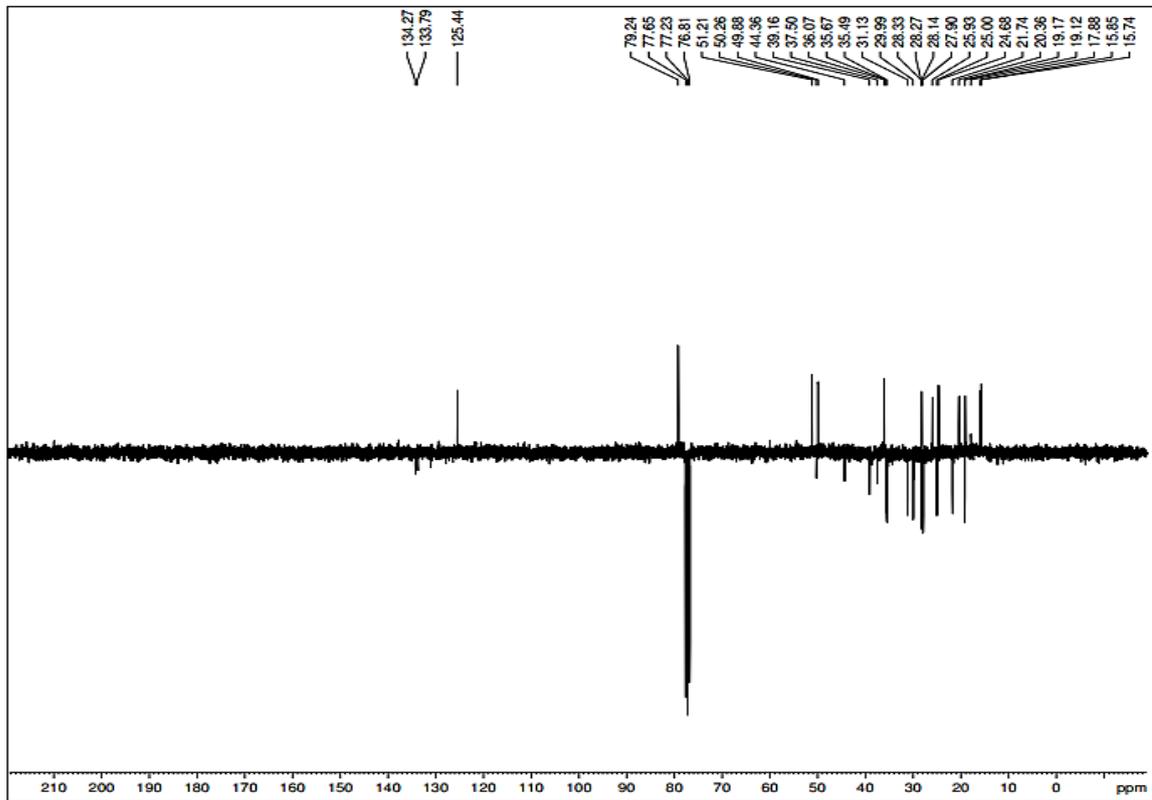
51,21; 49,88; 36,07; 28,27; 25,93; 24,68; 20,36; 19,12; 17,88; 15,85 e 15,74) característico de carbonos metílicos e/ou metínicos mais dezesseis sinais na região negativa ( $\delta_C$  134,27; 133,79; 50,26; 44,36; 39,16; 37,50; 35,67; 35,49; 31,13; 29,99; 28,33; 28,14; 27,90; 25,00; 21,74 e 19,17) qualificados como metilênicos e/ou quaternários.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), figura 29, não apresentou sinais na região de hidrogênio aromático e apenas um sinal em  $\delta_H$  3,24 (dd J 4,71 e 11,4 Hz) característico para hidrogênio H-COH, confirmando a ausência de unidades osídicas indicado no teste negativo para espuma. Outro fator que colabora com este resultado é a ausência de hidrogênios anoméricos que absorve na faixa de 4 a 5,5 ppm.

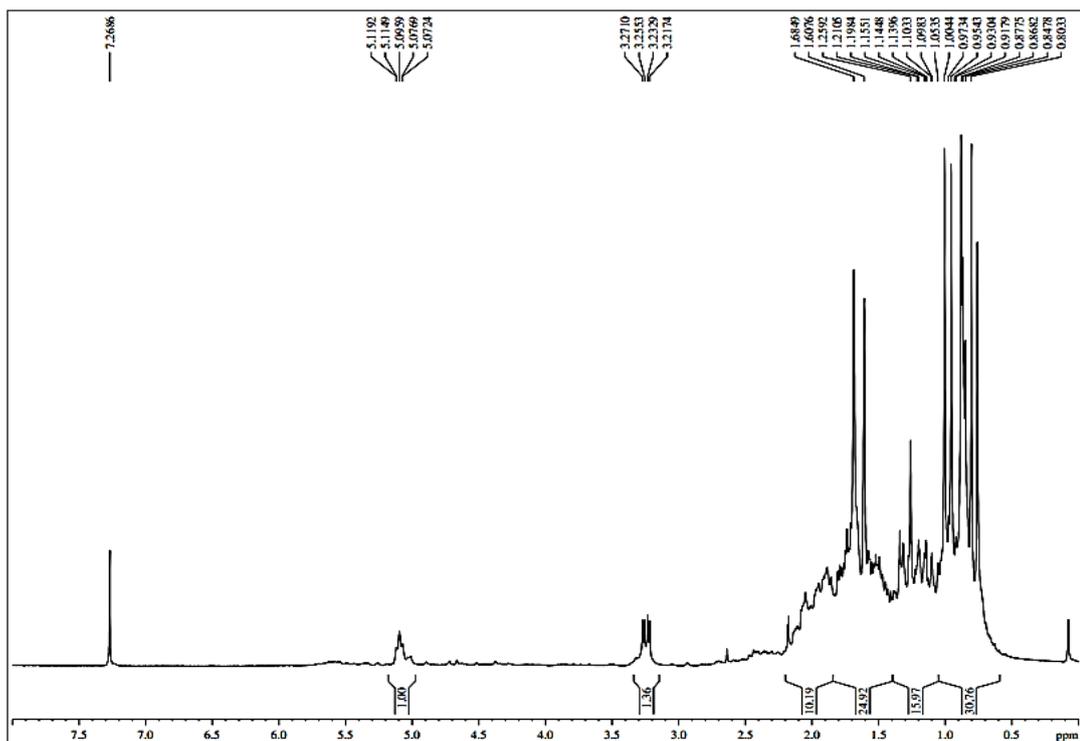
Figura 27 - Teste para terpenoides do *COIGMM* (Lieberman-Burchard)



Fonte: A autora.

Figura 28 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (APT, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto *COIGMM*

Fonte: A autora.

Figura 29 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto *COIGMM*

Fonte: A autora.

### 5.4.2.2 Considerações estruturais do composto *C02GMM*

O composto denominado *C02GMM* isolado a partir do extrato DCM/MeOH 2 % dos galhos da *Marsdenia megalantha* foi obtido como um sólido branco, solúvel em clorofórmio. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), Figura 30, apresentou na região característica de hidrogênio aromáticos os sinais descritos abaixo:

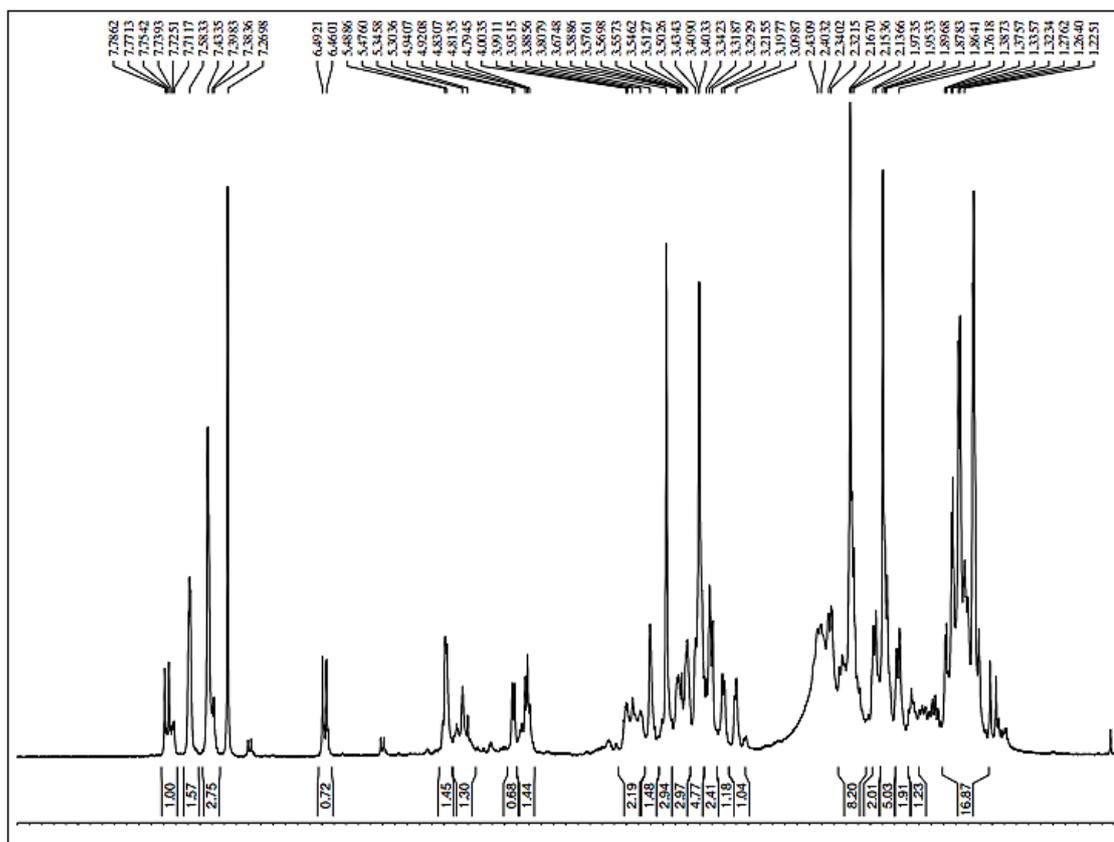
$\delta_{\text{H}}$  7,77 ppm (d,  $J=16$  Hz) 1H

$\delta_{\text{H}}$  7,58 ppm 2H

$\delta_{\text{H}}$  7,41 ppm 3H

$\delta_{\text{H}}$  6,47 ppm (d,  $J=16$  Hz) 1H

Figura 30 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto *C02GMM*

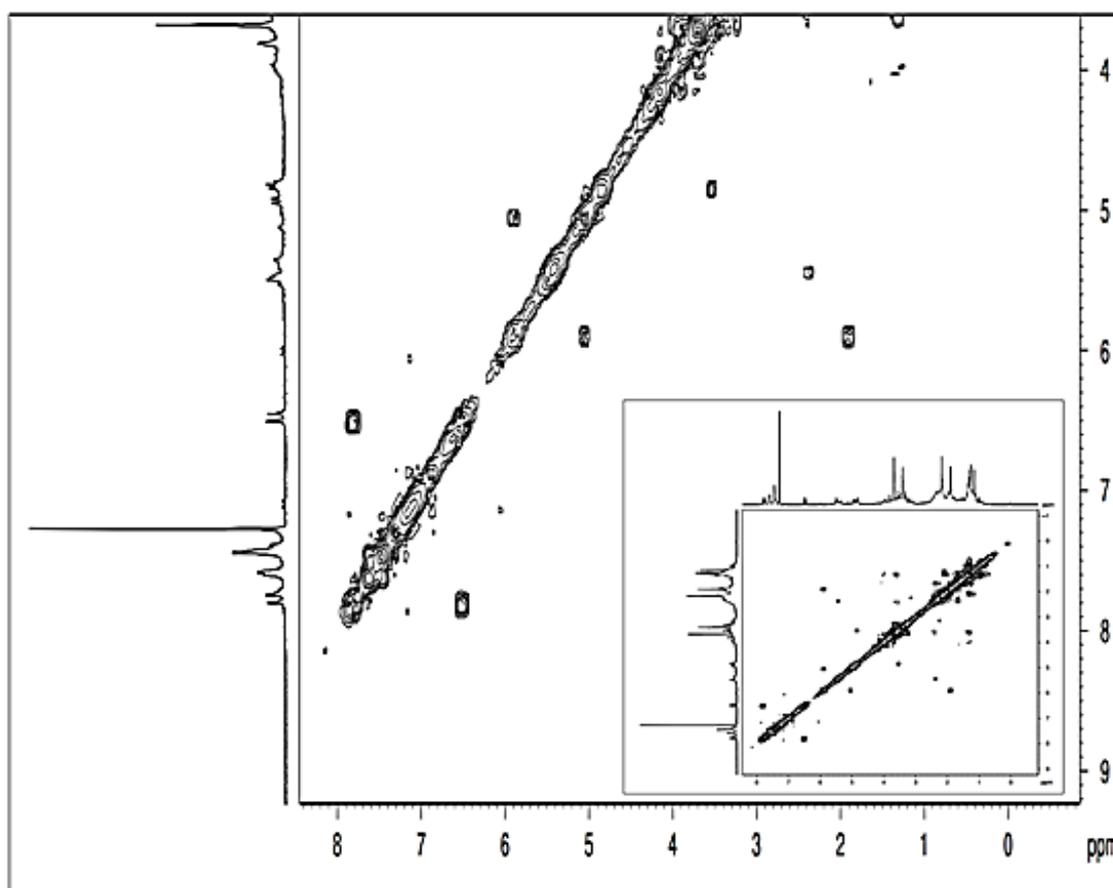


Fonte: A autora.

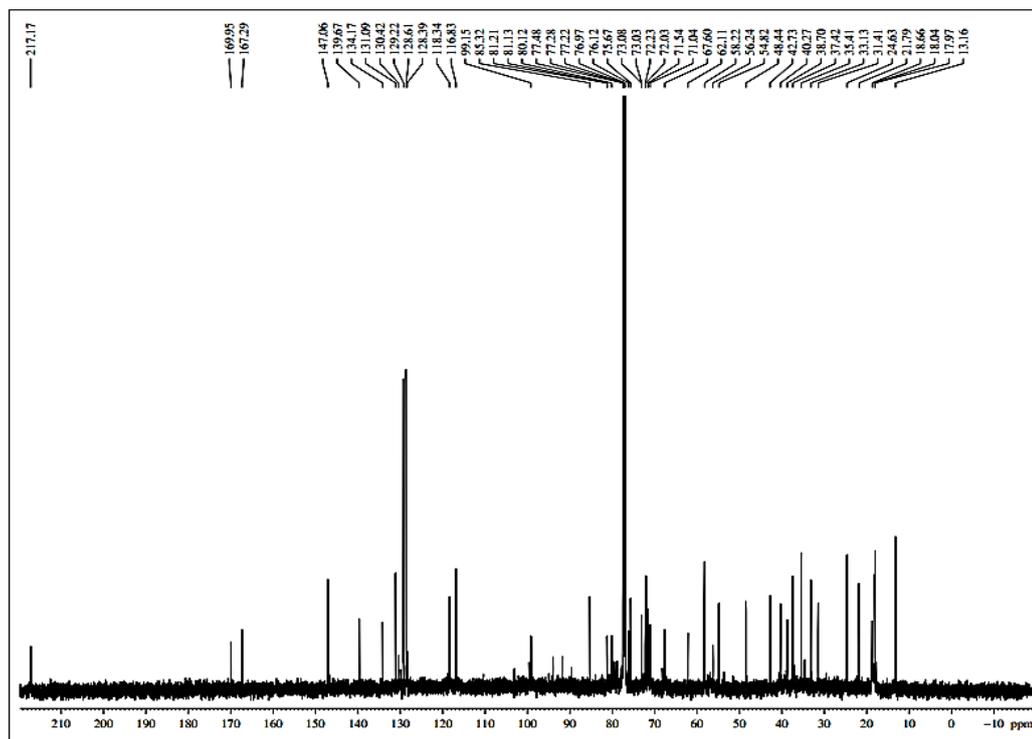
Nessa sequência de sinais, em conjunto com o espectro bidimensional COSY, figura 31, claramente se observa um acoplamento entre os hidrogênios  $\delta_H$  7,77 e  $\delta_H$  6,47 com  $J$  16 Hz indicando a presença do grupo cinamoil.

O espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), Figura 32, apresentou quarenta e sete linhas espectrais, dos quais os sinais em  $\delta_C$  217,17  $\delta_C$  169,95 e 167,29 foram assinalados como de carbonos carbonílicos, destacando-se o sinal em 167,29 como pertencente ao grupo cinamoil.

Figura 31 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (COSY, 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto *C02GMM*



Fonte: Autora.

Figura 32 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] do composto *C02GMM*

Fonte: A autora.

No espectro também é observado a presença de sinais na região de carbono aromático e oleifínico, pode ser visto na Tabela 17.

Tabela 17 - Sinais característicos de carbono Aromático/Oleifínico obtidos no espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do *C02GMM*

Sinais espectrais nas regiões de aromático/oleifínico $\delta_C$
116,83
118,34
128,39
128,61 x 2C
129,22 x 2C
130,42
131,09
134,17
139,67
147,06

Fonte: A autora.

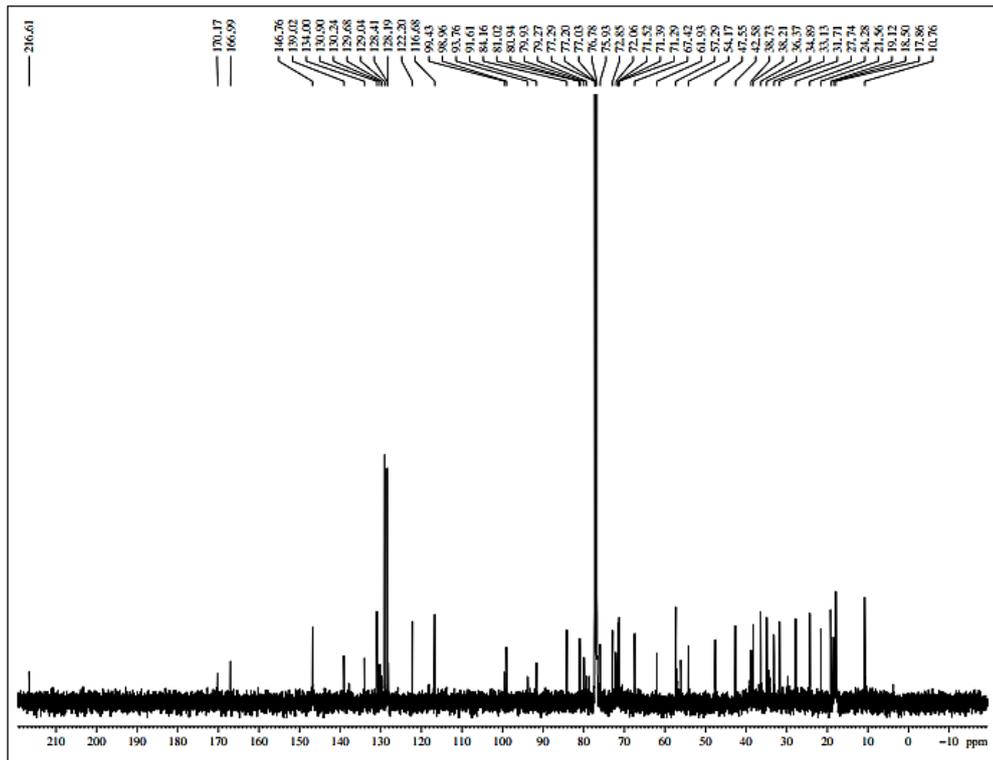
Oito dos carbonos descritos acima fazem parte do grupo cinamoil, dentre estes os carbonos  $C_3'$ ,  $C_5'$ ,  $C_7'$  e  $C_9'$  são os mais desprotegidos em função da ressonância existente no grupo, como demonstrado na figura 26. Observou-se ainda que os sinais  $\delta_C$  128,61 e  $\delta_C$  129,22 possuem intensidade maior que os demais carbonos  $sp^2$ , indicando que mais de um carbono absorvem nessa frequência.

Outro aspecto importante que merece ser destacado é a presença dos sinais  $\delta_C$  103 e  $\delta_C$  99,15 no espectro RMN  $^{13}C$  e os sinais em  $\delta_H$  5,10 e  $\delta_H$  4,81 no espectro RMN  $^1H$  característicos de carbonos anoméricos e hidrogênios anoméricos respectivamente. Estes sinais indicam a presença de duas unidades osídicas ligadas na estrutura de S02GMM. A indicação da presença dessas unidades de açúcares ligadas na estrutura é reforçada pelos sinais de 14 carbonos que se encontram dentro da faixa de 65 a 85 ppm no espectro de RMN  $^{13}C$ , notoriamente característica da presença de carbono ligado a oxigênio.

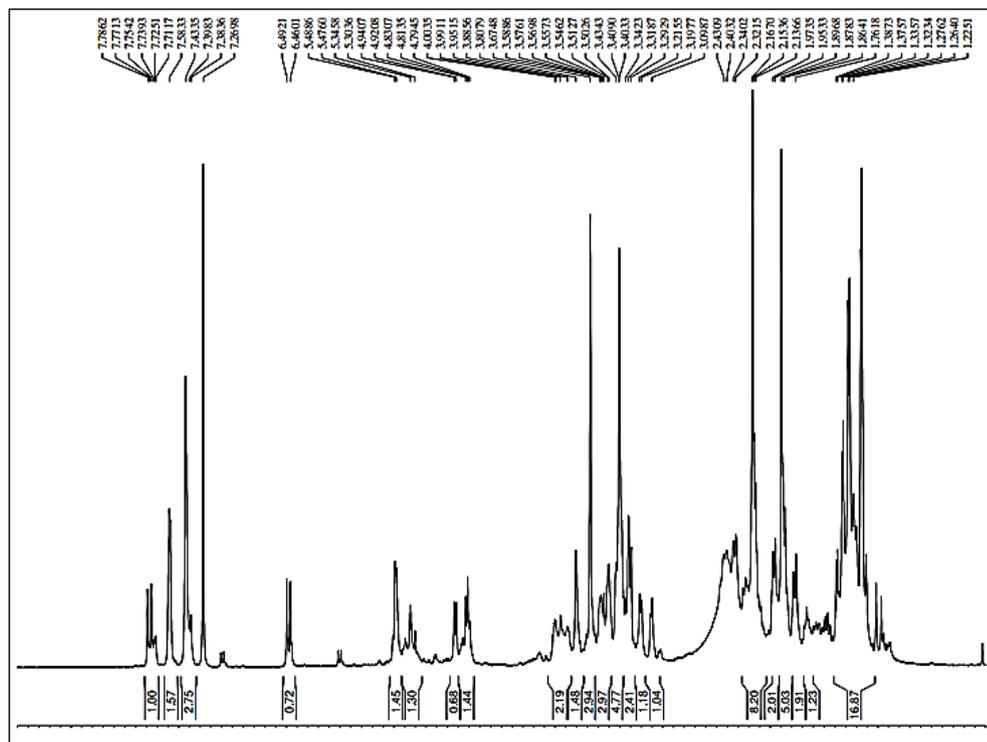
A combinação de todas essas informações obtidas nos espectros RMN  $^{13}C$  e  $^1H$  em conjunto com o teste positivo de Lieberman-Burchard para esqueleto esteroidal e de espuma, nos permite concluir que C02GMM, trata-se de um glicosídeo esteroidal com o grupo cinamoil ligado na estrutura.

#### 5.4.2.3 Considerações estruturais do composto C03GMM

O composto C03GMM isolado a partir do extrato DCM/MeOH 2 % dos galhos da *Marsdenia megalantha*, apresentou no espectro de RMN  $^{13}C$  (125 MHz,  $CDCl_3$ ) 50 linhas espectrais com dois sinais em  $\delta_c$  98,96 e 99,43 na região características de carbono anomérico, Figura 33, que em conjunto com os sinais em  $\delta_H$  4,93 e 4,82 presentes no espectro de RMN  $^1H$  (500 MHz,  $CDCl_3$ ), Figura 34, indica a presença de duas unidades osídicas.

Figura 33 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto *C03GMM*

Fonte: A autora.

Figura 34 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  [500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ] do composto *C03GMM*

Fonte: A autora.

No espectro RMN  $^{13}\text{C}$  foi observado três sinais em  $\delta_{\text{C}}$  216,61, 170,17 e 166,69 ppm característico de carbonilas e ainda dez sinais na região de carbonos aromáticos e ou oleifínicos, que em conjuntos com os dados discutidos para a amostra do composto *C02GMM*, e em comparação com resultados apresentados no trabalho de (ZHANG, et al., 2010), assim como os sinais apresentados no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , descritos na Tabela 18, nos mostra uma semelhança dos grupos ligados no composto *C03GMM* com os atribuídos ao composto *C02GMM*.

Tabela 18 - Comparação entre os sinais espectrais de carbono exibidos nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  para o *C02GMM* e *C03GMM* com encontrados na literatura.

<i>C03GMM</i>	<i>C02GMM</i>	<i>ZHANG, et al., 2010</i>
Carbonilas		
216,61	217,17	-
170,17	169,95	170,2 (Acetil)
Grupo cinamoil		
166,69 (Carbonila)	167,29 (Carbonila)	166,12 (Carbonila)
116,68	116,83	117,49 (C <sub>2</sub> ' )
146,76	147,06	146,18 (C <sub>3</sub> ' )
134,00	134,17	134,12 (C <sub>4</sub> ' )
128,41	128,61	128,97(C <sub>5</sub> ' -C <sub>9</sub> ' )
128,19	128,39	128,34(C <sub>6</sub> ' -C <sub>8</sub> ' )
129,68	130,42	130,72 (C <sub>7</sub> ' )
Carbonos não aromáticos e/ou oleifínicos não assinalados		
139,02	139,67	-
130,90	131,09	-
129,04	129,22	-
122,20	118,34	-
Carbonos anoméricos (unidades osídicas)		
99,43	103,00	-
98,96	99,15	-

Fonte: A autora.

## 6 CONCLUSÕES

Este trabalho constituiu-se como o primeiro estudo fitoquímico da espécie *M. megalantha*. Por sua vez mostrou-se eficaz, tendo em vista que a prospecção fitoquímica realizada permitiu a identificação da presença de classes de metabólitos secundários anteriormente identificados em outras espécies de *Marsdenia*, corroborando, desta forma, com a constituição química característica do gênero, a qual é amplamente conhecida na literatura.

O ensaio de atividade antimicrobiana realizado para o extrato das raízes da *Marsdenia megalantha* demonstrou que nas concentrações testadas o mesmo não inibe significativamente o crescimento das cepas bacterianas utilizadas no teste. Sendo possível determinar apenas a MIC contra a *Staphylococcus Aureus*, a qual revelou uma baixa atividade inibitória do extrato frente a esta bactéria.

Os testes antioxidantes apontaram, de modo geral, uma variação no comportamento dos extratos (*EFMM*, *EGMM*, *ERMM*) frente às análises realizadas. Todavia, o teste do BCB revelou que os extratos possuem excelentes propriedades para impedir ou diminuir o desencadeamento de reações oxidativas. E apesar de não haverem estudos anteriores que avaliaram a atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos da espécie *M. megalantha*, um estudo prévio com extratos aquosos desta espécie já havia evidenciado seu potencial antioxidante para ser usado como fármaco anticâncer.

Este trabalho permitiu ainda o isolamento de dois triterpenóides e três glicosídeos esteroidais, compostos majoritários na espécie, de acordo com os testes fitoquímicos realizados. As sucintas considerações estruturais feitas aqui mostraram que estes compostos possuem estruturas químicas complexas.

Por fim, conclui-se que são necessários estudos posteriores que venham confirmar os resultados obtidos aqui, ou mesmo desvendar novos conhecimentos químicos e/ou sobre as atividades biológicas da espécie *M. megalantha*, uma vez considerada a importância desta espécie tendo em vista as suas peculiaridades enquanto um recurso natural promissor devido a sua constituição química.

## REFERÊNCIAS

- ABE, F.; YAMAUCHI, T.; HONDA, K.; HAYASHI, N. Cyclitols and their glycosides from leaves of *Marsdenia tomentosa*. *Phytochemistry*, v. 47, n. 7, p.1297-1301, 1998.
- ALIGIANIS, N.; Kalpoutzakis, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *Journal agricultural and food chemistry*. v.49, p.4168-4170, 2001.
- BARREIRO, E. J.; VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a Química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, n.2, p.326-337, 2006.
- BARTH, O. M.; LUZ, C. F. P. Morfologia polínica das espécies arbóreas de Apocynaceae do Estado de Santa Catarina, Brasil. *Hoehnea*, v. 35, n.4, p.577-582, 2008.
- BEZERRA, C. W. C.; Plantas tóxicas do Nordeste e plantas tóxicas para ruminantes e equídeos da microrregião do Cariri cearense. 2011, 71f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Universidade Federal de Campina Grande. Patos, 2011.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.
- BUFFON, D. E. Isolamento e identificação de princípios ativos de *Calophyllum brasiliense camb.* (CLUSIACEAE). 2005, 84f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências da Saúde – Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, 2005.
- CARTER, P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical Biochemistry*, v. 40, p. 450-458, 1971.
- CHAVES, T. P. Variação sazonal na produção de metabólitos secundários e na atividade antimicrobiana de espécies vegetais do semiárido brasileiro. 2012, 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Centro de Ciências e Tecnologias - Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 2012.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2015) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically 10th Ed: M07-A10. USA.
- DENG, J.; LIAO, Z.; CHEN, D. Marsdenosides A-H, polyoxypregnane glycosides from *Marsdenia tenacissima*. *Phytochemistry*, v. 66, n. 9, p. 1040-1051, 2005.
- DE S. LUNA, J.; DOS SANTOS, A. F.; DE LIMA, M. R. F.; DE OMENA, M. C.; DE MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G.. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v.97, n.2, p.199–206, 2005.

DHONGADE, H. J.; CHANDEWAR, A. V. An *in-vitro* investigation of the antioxidant activity of *Phyllanthus amarus*. *International Journal of Biomedical and Advance Research*, v, 4, n. 6, p. 435-439, 2013.

DINIS, T. C. P.; MADEIRA, V. M. C.; ALMEIDA L. M. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.315, n.1, p.161-169, 1994.

DOMINGUES, K.; GONÇALVES, A.; OLIVEIRA, C. P.; PERIM, C. M.; GONÇALVES F. B. Avaliação de extratos de quebra-pedra (*Phyllanthus* sp) frente à patógenos causadores de infecções no trato urinário. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, Campinas, v.17, n.3, p.427-435, 2015.

DUAN, X.-J.; ZHANG, W.-W.; LI, X.-M.; WANG, B.-G. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*, v. 95, p. 37-43, 2006.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.2, p.446-452, 2006.

DUFF, A. G.; GELLERT, E; RUDZATS, R. Flavescin: a new i-ketopolyhydroxypregnene from *Marsdenia flavescens*. *Phytochemistry*, v.12, p. 2943-2945, 1973.

ESPIRITO SANTO, F. S. A.; SANTOS, A. P. B.; RIBEIRO, P. L.; RAPINI, A. Three new species of *Marsdenia* (Apocynaceae) from Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, v.32, n.2, p.247-253, 2018.

FAN, W.; SUN, L., ZHOU, J.-Q., ZHANG, C., QIN, S., TANG, Y., YUAN, S.-T. *Marsdenia tenacissima* extract induces G0/G1 cell cycle arrest in human esophageal carcinoma cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 13, n. 6, p. 428-437, 2015.

FORZZA, R.C., et al. (Org.). *Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]*. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. 871 p. V. 1.

GERALDO NETO, S. A.; LIMA, J. M.; CÂMARA, A. C. L.; GADELHA, I. C. N.; OLINDA, R. G.; BATISTA, J. S.; SOTO-BLANCO, B. Spontaneous and experimental poisoning by *Marsdenia megalantha* Goyder & Morillo in ruminants and a pig. *Toxicon*, v. 63, n. 1, p. 116-119, 2013.

GERALDO NETO, S. A.; MELO, M. M.; SOTO-BLANCO, B. Efeitos farmacológicos e toxicidade das plantas do gênero *Marsdenia*. Uma Revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v.10, n.4, p. 809 – 819, 2016.

- GOES, M. B.; PEREIRA, J. F. Asclepiadoideae (Apocynaceae) no município de Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil. *Rodriguésia*, v.3, n.60, p.509 – 529, 2009.
- GUPTA, V. S.; KUMAR, A.; DEEPAK, D.; KHARE, A.; KHARE, N. K. Pregnanes and pregnane glycosides from *Marsdenia roylei*. *Phytochemistry*, v. 64, n. 8, p.1327-1333, 2003.
- HAN, S.Y.; HAN, S.-Y.; ZHAO, M.-B.; ZHUANG, G.-B.; LI, P.-P. *Marsdenia tenacissima* extract restored gefitinib sensitivity in resistant non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer*, v. 75, n. 1, p. 30-37, 2012.
- ITO, K.; LAI, J. Studies on the constituents of *Marsdenia formosana* Masamune. II. Structures of marsformoxide A and marsformoxide B. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.26, n.6, p.1908–1911, 1978.
- JIN-LAN, Y.; ZHI-ZHEN, L.; GUI-XIAN, C.; WEI-PEI, D.; BING-NAN, Z.; ERDELMEIER, C. A. J.; ... CORDELL, G. A. The pregnane glycoside marsdekoiside a from *Marsdenia koi*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 3, p. 1058-1060, 1992.
- KHATUA, S.; ROY, T.; ACHARYA, K. Antioxidant and free radical scavenging capacity of phenolic extract from *Russula laurocerasi*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 6, n. 4, p. 156-160, 2013.
- KUMAR, A.; KHARE, A.; KHARE, N. K. Two oligosaccharides from *Marsdenia roylei*. *Phytochemistry*, v.50, n. 8, p. 1353-1357, 1999.
- LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M.C. Ecologia e conservação da Caatinga. Recife, *Editora Universitária da UFPE*. 822p. 2003.
- LI, Q. F.; WANG, X. L.; DING, L. S.; ZHANG, C. Polyoxypregnanes from the stems of *Marsdenia tenacissima*. *Chinese Chemical Letters*, v.18, p.831–834, 2007.
- LIU, J.; YU, Z. B.; YE, Y. H.; ZHOU, Y. W. A new C21 steroid glycoside from *Marsdenia tenacissima*. *Chinese Chemical Letters*, v.19, n.4, p.444-446, 2008.
- LUCENA, D. S.; LUCENA, M. F. A.; SOUSA, J. M.; SILVA, R. F. L.; SOUZA, P. F. Flora Vascular de um inselbergue na mesorregião do sertão paraibano, nordeste do Brasil. *Scientia Plena*, v.11, n. 01, p. 1-11, 2015.
- MA, B.; FANG, T.; MA, K.; NI, J.; WU, H.; DING, W.-P.; JIANG, C. Novel Saponins Hainaneosides A and B Isolated from *Marsdenia hainanensis*. *Journal of Natural Products*, v.60, n.2, p.134–138, 1997.
- MACDOWELL, S. Responsabilidade social dos cientistas - Natureza das Ciências Exatas. *Estudos Avançados*, v.2, n.3, 1988.
- MALDONADO, M.; JUÁREZ-JAIMES, V. Chemical constituents from *Marsdenia calosa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.48, p. 219-221, 2013.

*Marsdenia* in *Flora do Brasil 2020* em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB25145>>. Acesso em: 15 Abr. 2017.

TRÓPICOS. *Marsdenia megalantha* Goyder & Morillo. Disponível em <[www.tropicos.org/Name/50091209](http://www.tropicos.org/Name/50091209)>. Acesso em: 19 de maio de 2019.

MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 2. ed. Fortaleza: **Edições UFC**, 1997, 141p.

MEDEIROS, C. A. C.; BEZERRA, J. J. L. Efeitos tóxicos e propriedades medicinais de *Solanum paniculatum* L. (SOLANACEAE): Uma revisão. In: Anais do III Congresso Nacional de Pesquisa em Ensino de Ciências. **Editora Realize**, v.1. 2018.

MEZABARBA, V. P. et al (Org.). Aclepiadaceae. In: *Checklist das Plantas do Nordeste Brasileiro: Angiospermae e Gymnospermae*, 219f. Banco de dados de plantas do Nordeste. 2000.

MOHD NASUHA, N. A.; CHOO, Y. M. A new flavone from Malaysia Borneo *Marsdenia tinctoria*. *Natural Product Research*, v.30, n.13, p.1532–1536. 2015.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. *Brazilian Journal of Food technology*, 2009.

OLIVEIRA, P. H. Proteínas Antifúngicas do Látex de *Marsdenia megalantha* [Goyder & Morillo, 1994] – caracterização bioquímica e mecanismos de ação. Dissertação de mestrado submetida à coordenação do programa de pós-graduação em Bioquímica. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2009.

OLIVEIRA, P. H. et al. Novel peroxidase purified from *Marsdenia megalantha* latex inhibits phytopathogenic fungi mediated by cell membrane. *International Journal of Biological Macromolecules*, V.96, p 743–753, 2017.

OLIVEIRA, R. M. Avaliação das atividades antioxidante, anticoagulante e antiproliferativa de extratos aquosos de *Marsdenia megalantha*. 2011, 76f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Centro de Biociências – Departamento de Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2011.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction – Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, v. 44, n. 6, p. 307-315, 1986.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos vegetais e benefícios antioxidantes. *Journal Biotechnology and Biodiversity*. v. 3, n.4, p. 146-152. 2012.

PESSOA, C. R. M. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Brasil. 2013, p.70. Tese (Doutorado em medicina veterinária) - Centro de Saúde e Tecnologia Rural - Universidade Federal de Campina Grande. Patos-PB, 2013.

PESSOA, C. R. M.; Pessoa, C. R. M.; Riet-Correa, F.; Medeiros, R. M. T.; Simões, S. V. D.; Rapini, A. Poisoning by *Marsdenia hilariana* and *Marsdenia megalantha* (Apocynaceae) in ruminants. *Toxicon*, v. 58, p. 610–613, 2011.

QUINET, C. G. P.; ANDREATA, R. H. P. Estudo taxonômico e morfológico das espécies de apocynaceae adans. na reserva Rio das Pedras, município de Mangaratiba, rio de Janeiro, Brasil. São Leopoldo: Instituto Anchieta de Pesquisas. *Pesquisas, botânica*, v.56, p. 13-74, 2005.

RAPINI, A. Asclepiadaceae ou Asclepiadoideae (Apocynaceae). Conceitos distintos de agrupamento taxonômico. *Hoehnea*, v. 27, n. 2, p. 121-130, 2000

RAPINI, A.; PEREIRA, J.F. Two new species of *Marsdenia* R. Br. (Apocynaceae: Asclepiadoideae) from the semi-arid region of Brazil. *Kew Bulletin*, v. 66, n. 1, 137-142, 2011.

RAPINI, A.; SOUZA-SILVA, R. F.; SAMPAIO, L.N.P. Apocynaceae. In: GIULIETTI, A.M.; RAPINI, A.; ANDRADE, M.J.G.; QUEIROZ, L.P.; SILVA, J.M.C. (Orgs.). **Plantas Raras do Brasil**. Belo Horizonte: Conservação Internacional do Brasil; Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, p. 54-64. 2009.

RAPINI, A. Taxonomy “under construction”: advances in the systematics of Apocynaceae, with emphasis on the Brazilian Asclepiadoideae. *Rodriguésia*, v. 63, n.1, p.75–88, 2012.

ROCHA, A. I.; REIS LUZ, A. I.; RODRIGUES, W. A. A presença de alcaloides em espécies botânicas da Amazônia. VII – Apocynaceae (1). *Acta Amazonica*, v. 12, n.2, p.381-387, 1982.

SARTORI, M. R. K. Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* SPRENG (*Wdelia paludosa*) (ASTERACEAE). Itajaí, 2005. Dissertação. 81 f. Universidade do vale do Itajaí- Centro de Ciências da Saúde – Programa de mestrado acadêmico em Ciências farmacêuticas.

SARTORATTO, A. et al. Activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 35, no. 4, p.275-280, 2004.

SHENG-XIANG, Q.; YONG, G.; CHEUNG, H. T. A. A triterpene from *Marsdenia globifera*. *Phytochemistry*, v.34, n.5, p.1385–1387, 1993.

SILVA, T. C. E. Intoxicação espontânea e experimental por frutos de *Eugenia uvalha cambess.* (myrtaceae) em ovinos. 2013, 41f. Dissertação (Mestrado em CIÊNCIA ANIMAL). Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV. Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC. Lajes-SC, 2013.

SIMPSON, M. G. Plant Systematics. 2ª ed Academic Press, 752p, 2010.

SIMÕES, C. M. O. (Org.). Farmacognosia: da planta a medicamento. Florianópolis: *Editora da UFSC*, 1102p. 2007.

SUMMONS, R. E.; ELLIS, J.; GELLERT. Steroidal alkaloids of *Marsdenia rostrata*. **Phytochemistry**, v.11, p.3335-3339, 1972.

UDOIDONG, A. A.; ETUK, B. A.; UDO, I. E. Phytochemical and chromatographic analysis of chloroform extract of *Marsdenia latifolia*. **Advances in Applied Science Research**, v.5, n.1 p. 53-58, 2014.

VALENTE, M. C.; COSTA, C.G. Estudo anatômico da flor de *Marsdenia loniceroides* E. Fournier (Asclepiadoideae– Apocynaceae). Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v.56 n. 87 p.51-66, 2005.

VAN KHANG, P.; XU, T.; XU, L.; ZHOU, N.; HU, L.; WANG, R.; MA, L. Steroidal glycosides from *Marsdenia tenacissima*. **Phytochemistry Letters**, v. 12, p. 54-58, 2015.

YE, B.; LI, J.; LI, Z.; YANG, J.; NIU, T.; WANG, S. Anti-tumor activity and relative mechanism of ethanolic extract of *Marsdenia tenacissima* (Asclepiadaceae) against human hematologic neoplasm *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, n. 1, p. 258-267, 2014.

ZHANG, H. et al. Five new C<sub>12</sub> steroidal glycosides from the stems of *Marsdenia tenacissima*. **Steroids**, v.75, p.176-183, 2010.