

IORRANA VIEIRA SALUSTIANO

**BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S181b
2019 Salustiano, Iorrana Vieira, 1994-
Bioprospecção de compostos com atividade antimicrobiana de
extratos de *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud / Iorrana Vieira
Salustiano. - Viçosa, MG, 2019.
xix, 101 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: João Paulo Viana Leite.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 58-65.

1. Extratos vegetais. 2. Bioprospecção. 3. Agentes anti-
infecciosos. 4. Flavonoides. 5. Extratos vegetais - Purificação. I.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 615.321

IORRANA VIEIRA SALUSTIANO

**BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2019.



André de Oliveira Carvalho



Eduardo Vinícius Vieira Varejão



Andrea de Oliveira Barros Ribon
(Coorientadora)



João Paulo Viana Leite
(Orientador)

*Aos meus pais, Fernanda e Fernando, meu irmão, Romulo,
Vovó Nina e ao Tio Nando, minhas fontes eternas
de inspiração. A vocês, todo amor do
mundo e gratidão infinita.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À Deus por me guiar e por Ele ter colocado pessoas tão especiais na minha vida sem as quais não teria vencido.

Aos meus pais, Fernanda e Fernando, e meu irmão, Romulo, por sempre estarem presentes, me incentivando e aplaudindo de pé cada vitória.

À minha vó e ao meu tio, pelo reencontro recente após longos anos que me deu força e me fez acreditar ainda mais na importância dessa caminhada.

À Universidade Federal de Viçosa e à Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada pela infraestrutura que possibilitou a realização desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

Ao Prof. João Paulo Viana Leite pela valorosa orientação, acompanhamento e conhecimentos compartilhados durante toda a pesquisa.

À Prof. Andréa de Oliveira Barros Ribon pela disponibilidade de orientação desse trabalho e pelas sugestões feitas nas realizações dos ensaios com as bactérias.

Ao Prof. André de Oliveira Carvalho e à Júlia Ribeiro Soares, por conduzirem os ensaios com os fungos e por sempre responder prontamente a todos meus questionamentos.

Ao Jefferson Viktor de Paula Barros Baêta por me acompanhar nas análises de HPLC semi-preparativo.

Ao Prof. Wagner Vilegas e a doutoranda Ana Zanatta do Campus Experimental de São Vicente, UNESP, Universidade do Estado de São Paulo, São Vicente - SP pela obtenção dos dados de análise de LC-MS.

Ao Prof. Geraldo Célio Brandão da Universidade Federal de Ouro Preto pela obtenção de todos os espectros de RMN.

Ao Alisson de Andrade Almeida pelo auxílio na coleta das folhas, pelas análises de citotoxicidade e por sempre se mostrar disponível a ajudar quando preciso.

À Ana Paula Agrizzi por “pensar fora da caixinha”, ajudando sempre que preciso, por vibrar com cada conquista do trabalho e pela amizade.

À Laís de Azevedo Rodrigues pela ajuda com a quantificação, por me salvar quando precisei e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Biodiversidade pelo companheirismo e bom ambiente de trabalho.

Aos amigos, em especial “as bananas” e as “tingueleiras”, por tornarem a caminhada mais leve, divertida e por sempre estarem na torcida.

Aos membros da banca, Prof. Eduardo Vinícius Vieira Varejão, Prof. André de Oliveira Carvalho e a Prof. Andrea de Oliveira Barros Ribon pela disponibilidade e sugestões que muito acrescentaram ao trabalho.

Por fim, a todos que de alguma forma colaboraram e se fizeram presentes, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARES	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE SIGLAS	xiv
RESUMO	xvii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1. Objetivo Geral.....	2
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1. Biodiversidade brasileira e o bioma Mata Atlântica	3
3.2. Bioprospecção de produtos naturais com atividade antimicrobiana	5
3.3. Flavonoides prenilados	8
3.4. <i>Maclura tinctoria</i> (L.) D. Don ex Steud	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1. Coleta do material vegetal	12
4.2. Produção dos extratos vegetais	13
4.2.1. Secagem do material vegetal.....	13
4.2.2. Pulverização do material vegetal seco.....	13
4.2.3. Obtenção dos extratos vegetais.....	14
4.3. Testes microbiológicos.....	15
4.3.1. Avaliação da atividade antibacteriana.....	15
4.3.1.1. Bactérias e condições de cultivo	15
4.3.1.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos	15
4.3.2. Avaliação da atividade antifúngica	16
4.3.2.1. Leveduras e condições de cultivo	16
4.3.2.2. Obtenção das células das leveduras	16
4.3.2.3. Triagem inicial dos extratos para inibição do crescimento das células das leveduras em meio líquido	17
4.3.2.4. Determinação da concentração inibitória mínima.....	17
4.3.2.5. Determinação do efeito fungistático ou fungicida	18
4.4. Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i> para células Vero.....	18

4.4.1	Análise estatística.....	19
4.5.	Análise fitoquímica do extrato ativo de <i>M. tinctoria</i>	19
4.5.1.	Prospecção fitoquímica por CCD.....	19
4.5.2.	<i>Fingerprint</i> por HPLC-DAD analítico.....	20
4.5.3.	Análise por FIA-ESI-IT-MS/MS ⁿ	21
4.5.3.1.	Etapa de clean up em SPE do extrato ativo.....	22
4.5.4.	Quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais.....	22
4.5.4.1.	Preparação da solução mãe do extrato.....	22
4.5.4.2.	Reação colorimétrica.....	22
4.5.4.3.	Curva de calibração para flavonoides totais.....	23
4.6.	Isolamento e purificação de metabólitos secundários do extrato ativo de <i>M. tinctoria</i>	23
4.6.1.	Purificação dos compostos por HPLC semi-preparativo.....	24
4.7.	Identificação estrutural por Ressonância Magnética Nuclear.....	26
5.	RESULTADOS.....	26
5.1.	Coleta do material vegetal e produção dos extratos.....	26
5.2.	Análise de atividade antimicrobiana dos extratos de <i>M. tinctoria</i>	27
5.2.1.	Antibacteriano.....	27
5.2.1.1.	Concentração inibitória mínima.....	27
5.2.2.	Antifúngico.....	28
5.2.2.1.	Triagem inicial dos extratos para inibição do crescimento das células das leveduras em meio líquido.....	28
5.2.2.2.	Determinação da concentração inibitória mínima.....	29
5.2.2.3.	Diferenciação entre o efeito fungistático ou fungicida das amostras.....	30
5.3.	Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	31
5.4.	Análise fitoquímica do extrato ativo de <i>M. tinctoria</i>	31
5.4.1.	Prospecção fitoquímica dos extratos.....	31
5.4.2.	<i>Fingerprint</i> por HPLC dos extratos.....	32
5.4.3.	Análise do extrato ativo por FIA-ESI-IT-MS ⁿ	36
5.4.4.	Quantificação de flavonoides totais.....	38
5.5.	Fracionamento e purificação de compostos a partir do extrato ativo.....	38
5.6.	Dados físico-químicos das substâncias isoladas do extrato ativo de <i>M. tinctoria</i>	41
5.7.	Concentração inibitória mínima frente à <i>S. aureus</i> dos compostos puros.....	46
6.	DISCUSSÃO.....	46

6.1 Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Maclura tinctoria</i>	46
6.2. Análise fitoquímica do extrato ativo.....	49
6.3. Isolamento e purificação de compostos a partir do extrato ativo de <i>M. tinctoria</i>	52
7. CONCLUSÕES	56
8. REFERÊNCIAS.....	58
APÊNDICE A	66
APÊNDICE B	69
APÊNDICE C	74
.....	75
APÊNDICE D	79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Compostos com atividade antimicrobiana derivados de produtos naturais.
..... 6
- Figura 2** – Esqueleto C6-C3-C6 básico de um flavonoide, identificando os anéis A, B e C. 8
- Figura 3** - *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. A) Partes aéreas de *M. tinctoria*; B) Indivíduo de *M. tinctoria in situ* plaqueado da coleção BIOPROS. 10
- Figura 4** – Compostos isolados e identificados da espécie *Maclura tinctoria*. . 11
- Figura 5** – Placa de número de identificação de espécie ID MAPA, confeccionada pelo grupo BIOPROS. Foto retirada no momento da coleta das folhas de *Maclura tinctoria*.
..... 13
- Figura 6** – Processo de produção de HxMt, DcMt, EaMt e DcMt, solventes, massas e rendimento dos mesmos. 26
- Figura 7** - Porcentagem de inibição do crescimento de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida buinensis* para os quatro diferentes extratos e controle negativo (DMSO 5%). 28
- Figura 8** - Fotografia tirada dos poços das microplacas ao final do ensaio para a determinação da concentração inibitória mínima dos extratos selecionados. Imagem representativa de três experimentos. 30
- Figura 9** – Placas de petri contendo ágar Sabouraud e o volume dos poços correspondente ao CIM para os diferentes extratos e leveduras, bem como o controle de cada experimento constituído de DMSO 5%. 30
- Figura 10** – Fingerprint dos extratos HxMt, DcMt, EaMt e EtMt em HPLC-DAD Shimadzu Prominence em 264 nm. ** Fração ativa obtida no trabalho de Almeida (2017). 34
- Figura 11**– Fingerprint de DcMt em 264 nm com detalhes do espectro no UV para os principais picos eluídos no cromatograma 35

Figura 12 - Espectros de massas em modo <i>full-scan</i> do extrato ativo de <i>Maclura tinctoria</i> (DcMt), em modos: (A) positivo e (B) negativo.....	36
Figura 13 - Espectros de massas MS2 do íon precursor de m/z 339, obtido em modo positivo, com energia de colisão de 30%.	37
Figura 14 - Curva analítica padrão com rotina para quantificação de flavonoides.	38
Figura 15 – Etapas do estudo fitoquímico biomonitorado para atividade antimicrobiana de folhas de <i>Maclura tinctoria</i>	40
Figura 16 – Estrutura química da lupiwighteona (CMt_2) isolada de DcMt.	42
Figura 17 - Estrutura química da Wighteona (CMt_3) isolada de DcMt.	43
Figura 18 – Estrutura da isoflavona CMt_4 isolada de DcMt.	44
Figura 19 – Estrutura do flavonol CMt_5 isolado de DcMt.	45
Figura 20 - Esqueletos estruturais básicos de classes de flavonoides.	50
Figura 21 - Íon produto obtido por MS2 pela clivagem de uma unidade penila a partir do flavonoide C-prenilado.	52

LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARES

- Figura S 1** - *Fingerprint* dos grupos *GMt_6*, *GMt_8*, *GMt_12* e *GMt_16* positivos para flavonoides em CCD. Os picos numerados representam os mesmos identificados em *DcMt*. 66
- Figura S 2** - *Fingerprint* dos grupos *GMt_17*, *GMt_18*, *GMt_19* e *GMt_20* positivos para flavonoides em CCD. Os picos numerados representam os mesmos identificados em *DcMt*. 67
- Figura S 3** - *Fingerprint* dos grupos *GMt_6*, *GMt_8*, *GMt_12* e *GMt_16* positivos para flavonoides em CCD. Os picos numerados representam os mesmos identificados em *DcMt*. 68
- Figura S 4** – *Fingerprint* de: A) *GMt_6* antes do HPLC modo semi – preparativo; B) *DcMt*; C) pico coletado (*CMt_5*). D) Espectro UV de *CMt_5*. 69
- Figura S 5** - *Fingerprint* de: A) *GMt_16* antes do HPLC modo semi – preparativo; B) *DcMt*; C) pico coletado (*CMt_1*). D) Espectro UV de *CMt_1*. 70
- Figura S 6** - *Fingerprint* de: A) *GMt_16* antes do HPLC modo semi – preparativo; B) *DcMt*; C) pico coletado (*CMt_3*). D) Espectro UV de *CMt_3*. 71
- Figura S 7** - *Fingerprint* de: A) *GMt_16* antes do HPLC modo semi – preparativo; B) *DcMt*; C) pico coletado (*CMt_4*). D) Espectro UV de *CMt_4*. 72
- Figura S 8** - *Fingerprint* de: A) *GMt_16* antes do HPLC modo semi – preparativo; B) *DcMt*; C) pico coletado (*CMt_2*). D) Espectro UV de *CMt_2*. 73
- Figura S 9** - Espectros de massas MSn do íon precursor de m/z 339, obtido em modo positivo..... 74
- Figura S 10** - Espectros de massas MSn do íon precursor de m/z 355, obtido em modo positivo..... 75
- Figura S 11** - Espectros de massas MSn do íon precursor de m/z 407, obtido em modo positivo..... 76

Figura S 12 - Espectros de massas MSn do íon precursor de m/z 423, obtido em modo positivo.....	77
Figura S 13 - Espectros de massas MSn do íon precursor de m/z 367, obtido em modo negativo.	78
Figura S 14 - Espectro de RMN ¹ H de <i>CMt_1</i> (CDCl ₃ , 400 MHz)	79
Figura S 15 - Espectro de RMN ¹³ C de <i>CMt_1</i> (CDCl ₃ , 100 MHz).....	80
Figura S 16 - Subespectro DEPT-135 de <i>CMt_1</i> (CDCl ₃ , 100 MHz).....	81
Figura S 17 - Mapa de contorno HMBC de <i>CMt_1</i> (CDCl ₃ , 400 MHz)	82
Figura S 18 - Mapa de contorno HSQC de <i>CMt_1</i> (CDCl ₃ , 100 MHz para ¹³ C e 400 MHz para ¹ H)	83
Figura S 19 - Espectro de RMN ¹ H de <i>CMt_2</i> (CDCl ₃ , 400 MHz)	84
Figura S 20 - Espectro de RMN ¹³ C de <i>CMt_2</i> (CDCl ₃ , 100 MHz)	85
Figura S 21 - Subespectro DEPT-135 de <i>CMt_2</i> (CDCl ₃ , 100 MHz).....	86
Figura S 22 - Mapa de contorno HMBC de <i>CMt_2</i> (CDCl ₃ , 400 MHz), mostrando a correlação heteronuclear entre H-2'' (δ5,24) e C8 (δ106,9).....	87
Figura S 23 - Espectro de RMN ¹ H de <i>CMt_3</i> (CDCl ₃ , 400 MHz)	88
Figura S 24 - Espectro de RMN ¹³ C de <i>CMt_3</i> (CDCl ₃ , 100 MHz).....	89
Figura S 25 - Subespectro DEPT-135 de <i>CMt_3</i> (CDCl ₃ , 100 MHz).....	90
Figura S 26 - Mapa de contorno HMBC de <i>CMt_3</i> (CDCl ₃ , 400 MHz), mostrando as correlações heteronucleares entre H-2'' (δ5,27) e C6 (δ112,0); H-1'' (δ1,79) e C5 (δ159,0).	91
Figura S 27 - Espectro de RMN ¹ H de <i>CMt_4</i> (CDCl ₃ , 400 MHz)	92
Figura S 28 - Espectro de RMN ¹³ C de <i>CMt_4</i> (CDCl ₃ , 100 MHz).....	93
Figura S 29 - Subespectro DEPT-135 de <i>CMt_4</i> (CDCl ₃ , 100 MHz).....	94

Figura S 30 - Mapa de contorno HMBC de <i>CMt_4</i> (CDCl ₃ , 400 MHz), mostrando as correlações heteronucleares entre H-1'' (δ3,32) e C7 (δ157,3); H-1'' (δ3,32) e C9 (δ153,3)	95
Figura S 31 - Mapa de contorno HSQC de <i>CMt_4</i> (CDCl ₃ , 100 MHz para ¹³ C e 400 MHz para ¹ H)	96
Figura S 32 - Espectro de RMN ¹ H de <i>CMt_5</i> (CDCl ₃ , 400 MHz	97
Figura S 33 - Espectro de RMN ¹³ C de <i>CMt_5</i> (CDCl ₃ , 100 MHz)	98
Figura S 34 - Subespectro DEPT-135 de <i>CMt_5</i> (CDCl ₃ , 100 MHz).....	99
Figura S 35 - Mapa de contorno HMBC de <i>CMt_5</i> (CDCl ₃ , 400 MHz), , mostrando as correlações heteronucleares entre H-1'' (δ3,36) e C6 (δ109,5); H-1'' (δ3,36) e C2'' (δ121,15); H-1'' (δ3,36) e C6 (δ109,5); OCH ₂ - H (δ3,74) e C7 (δ161,6); H-1'' (δ3,36) e C5 (δ157,8); H-1'' (δ3,36) e C7 (δ161,6).....	100
Figura S 36 - Mapa de contorno HSQC de <i>CMt_5</i> (CDCl ₃ , 100 MHz para ¹³ C e 400 MHz para ¹ H), mostrando a correlação heteronuclear entre H-1'' (δ3,36) e C-1'' (δ161,6).	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relato de atividades biológicas apresentadas por extratos da espécie <i>Maclura tinctoria</i>	12
Tabela 2 - Padrões fitoquímicos e reagentes reveladores referentes aos metabólitos secundários prospectados	20
Tabela 3 - Gradiente de eluição empregado na técnica de HPLC-DAD analítico para os extratos de <i>Maclura tinctoria</i>	21
Tabela 4 - Informações sobre a massa de cada grupo, volume de ACN utilizado para diluição e número de aplicações no HPLC modo semi preparativo.	25
Tabela 5 - Gradiente de eluição para os grupos injetados para coleta dos picos no HPLC-UV semi preparativo.	25
Tabela 6 - Valores de CIM para todos os extratos e bactérias testadas	27
Tabela 7 - IC ₅₀ (µg/ml) para os quatro extratos das folhas de <i>Maclura tinctoria</i> .31	
Tabela 8 – Classe de metabólitos secundários presentes nos quatro diferentes extratos de folhas de <i>Maclura tinctoria</i>	32
Tabela 9 - Flavonoides identificados no extrato em diclorometano de <i>Maclura tinctoria</i> (DcMt) por FIA-ESI-IT-MS ⁿ (modos negativo e positivo).	37
Tabela 10 - Concentração inibitória mínima frente à <i>S. aureus</i> do extrato diclorometânico de <i>Maclura tinctoria</i> e dos compostos isolados	46

LISTA DE SIGLAS

%	Porcentagem
µL	Microlitro (s)
ACN	Acetonitrila
BEL	BIOPROS <i>Extracts Library</i>
C	Aborvância na presença do controle negativo
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDC	Centros para Controle e Prevenção de Doenças
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CID	Dissociação induzida por colisão
CLSI	Do inglês: <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMt_1 à CMt_5	Compostos isolados do extrato diclorometânico de folhas de <i>Maclura tinctoria</i> (DcMt)
d	Dupleto
DAD	Do inglês: <i>Diode Array Detector</i>
DcMt	Extrato diclorometânico de folhas de <i>Maclura tinctoria</i>
dd	Duplo dupleto
DEPT	Do Inglês: <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EaMt	Extrato em acetato de etila de folhas de <i>Maclura tinctoria</i>
ECDC	Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças
EPTEA	Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental
ESI	Ionização por eletrospray
EtMt	Extrato etanólico de folhas de <i>Maclura tinctoria</i>
eV	Elétrons-volt
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIA	Infusão por fluxo direto
FMt_1 à FMt_553	Frações provenientes do fracionamento do extrato diclorometânico de folhas de <i>Maclura tinctoria</i>
g	Gramas (s)
GMt_1 à GMt_30	Grupos produzidos à partir do fracionamento do extrato diclorometânico de folhas de <i>Maclura tinctoria</i> (DcMt)

H ₂ O	Água
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMBC	Do inglês: <i>Heteronuclear multiple-bond correlation</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HSQC	Do inglês: <i>Heteronuclear single-quantum coherence</i>
HxMt	Extrato hexânico de folhas de <i>Maclura tinctoria</i>
IC ₅₀	Concentração do extrato que causa 50% de inibição da viabilidade celular
INT	Cloreto de p-iodonitrotetrazolio
IT	Do inglês: <i>Ion Trap</i>
J	Constante de acoplamento escalar
L	Litro (s)
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LMCM	Laboratório Multiusuário de Caracterização de Moléculas
m	Multiplete
MeOH	Metanol
MH	Do Inglês: <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
MHz	Mega-hertz
mL	Mililitro (s)
MS	Espectrometria de massas
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A	Para análise
PBS	Tampão fosfato-salino
PTFE	Politetrafluoretileno
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
T	T – Absorvância na presença dos extratos
TMS	Tetrametilsilano
UENF	Universidade Estadual do Norte Fluminense
UFC	Unidades formadoras de colônia

UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UV	Ultravioleta
VC	Viabilidade celular
δ	Deslocamento químico

RESUMO

SALUSTIANO, Iorrana Vieira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Bioprospecção de compostos com atividade antimicrobiana de extratos de *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud.** Orientador: João Paulo Viana Leite. Coorientadora: Andréa de Oliveira Barros Ribon.

A resistência microbiana é um problema crescente de saúde pública e se torna urgente o desenvolvimento de novos fármacos que atuem como antimicrobianos. O bioma Mata Atlântica possui uma vasta biodiversidade e grande potencial para desenvolvimento de produtos para fins medicinais. No presente trabalho estudamos o potencial antimicrobiano da espécie *Maclura tinctoria* e alguns de seus compostos isolados. Foram produzidos a partir das folhas de *M. tinctoria*, por percolação seriada, quatro extratos empregando os solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol (HxMt, DcMt, EaMt e EtMt, respectivamente). Tais extratos foram testados contra bactérias Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC) e Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus intermedius*) e para quatro diferentes leveduras (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida buinensis*). O extrato com maior potencial antimicrobiano foi submetido a fracionamento e purificação cromatográfica. Foram empregadas técnicas espectroscópicas para a identificação estrutural dos compostos purificados, sendo os mesmos avaliados quanto a atividade antimicrobiana. DcMt e EaMt apresentaram forte atividade antibacteriana para as bactérias gram positivas. Não houve atividade antibacteriana para as bactérias Gram negativas. Frente às leveduras, DcMt também foi ativo para *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. buinensis*, com CIM de 125 µg/mL para as duas primeiras leveduras e de 62,5 µg/mL para *C. buinensis*. HxMt e EtMt não apresentaram atividade antimicrobiana relevante. Os extratos não apresentaram citotoxicidade (IC₅₀ maior que 30 µg/mL) quando avaliados frente a células Vero. DcMt após ser submetido às etapas de fracionamento e purificação, empregando técnicas cromatográficas, cinco compostos flavonoídicos foram obtidos. Esses compostos foram identificados como flavonoides prenilados, sendo quatro derivados de isoflavona e um de flavonol. Esses compostos foram testados contra *S. aureus*, observando-se que CMt_3 e CMt_4 causaram uma redução de 6,6 e 1,6 vezes

respectivamente na CIM. Portanto, o trabalho confirmou o forte potencial antimicrobiano *in vitro* da espécie *M. tinctoria*, bem como de seus compostos isolados. Elucidar o mecanismo de ação, verificar a citotoxicidade e efeito antifúngico dos compostos isolados precisam ainda serem investigados.

ABSTRACT

SALUSTIANO, Iorrana Vieira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Bioprospecting of compounds with antimicrobial activity from extracts of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud.** Advisor: João Paulo Viana Leite. Co-advisor: Andréa de Oliveira Barros Ribon.

Microbial resistance is a growing public health problem and it is urgent to develop new drugs that act as antimicrobials. The Atlantic Forest biome has a vast biodiversity and great potential for the development of products for medicinal purposes. In the present work, we studied the antimicrobial potential of the species *Maclura tinctoria* and some of its isolated compounds. Four extracts using the solvents were produced from the leaves of *M. tinctoria* using serial solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate and ethanol (HxMt, DcMt, EaMt and EtMt, respectively). The extracts were tested against Gram negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC) and Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus intermedius*) and for four different yeasts (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida buinensis*). The extract with the greatest antimicrobial potential was subjected to fractionation and chromatographic purification. Spectroscopic techniques were used to structurally identify the purified compounds, and they were evaluated for antimicrobial activity. DcMt and EaMt showed strong antibacterial activity for gram positive bacteria. There was no antibacterial activity for Gram negative bacteria. Against yeasts, DcMt was also active for *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. buinensis*, with MIC of 125 µg / mL for the first two yeasts and 62.5 µg / mL for *C. buinensis*. HxMt and EtMt showed no relevant antimicrobial activity. The extracts did not show cytotoxicity (IC₅₀ greater than 30 µg / mL) when evaluated against Vero cells. Five compounds were isolated from DcMt. These compounds were identified as prenylated flavonoids, with four derivatives of isoflavone and one of flavonol. These compounds were tested against *S. aureus*, noting that CMt_3 and CMt_4 caused a reduction of 6.6 and 1.6 times in MIC respectively. Therefore, the work confirmed the strong in vitro antimicrobial potential of the species *M. tinctoria*, as well as its isolated compounds. Elucidate the mechanism of action, verify the cytotoxicity and antifungal effect of the isolated compounds have yet to be investigated.

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa de produtos naturais biologicamente ativos tem se tornado uma tática de fomento à atividade econômica e a melhoria da qualidade de vida em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Patwardhan et al., 2004). O reino vegetal, diante da sua megadiversidade, aliado ao conhecimento da pluralidade química de seus compostos, podem trazer diversas possibilidades de compostos químicos ainda desconhecidos para a ciência, podendo resultar em importantes aplicações farmacológicas e gerando muitos benefícios (Soberón et al., 2007). Neste cenário, o estudo dessas espécies e a obtenção de substâncias com potencial biológico vêm despertando ainda mais o interesse das indústrias farmacêuticas e de grupos de pesquisa de diversos países. Entretanto, estima-se que apenas 6% das cerca de 300.000 espécies de plantas superiores teve seu potencial farmacológico estudado e apenas cerca de 15% foi investigada fitoquimicamente (Cragg e Newman, 2013).

A importância dos produtos naturais para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos é evidenciada através da variedade de classe de compostos ativos oriundos de fontes naturais usados clinicamente, como as penicilinas e tetraciclina (Moloney, 2016; Guimarães et al., 2010). Entretanto, no momento, observa-se uma lacuna nas descobertas desses agentes.

Além disso, nos últimos anos, observa-se um aumento acentuado do surgimento de patógenos que apresentam resistência a múltiplas drogas. Organizações como os Centros para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA, o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estão considerando infecções causadas por bactérias multirresistentes como um problema emergente global. e o principal problema de saúde pública mundial (Roca et al., 2015).

O surgimento desses microrganismos resistentes pode ocorrer através das mutações ou por recombinações que acabam acontecendo independente da presença de agentes antimicrobianos. Entretanto, a exposição indiscriminada à essas drogas favorece a pressão seletiva necessária para contribuir também com o aparecimento e seleção desses patógenos resistentes, auxiliando sua disseminação (Roca et al., 2015). O uso excessivo desses agentes para tratamento de humanos e animais

também causou o acúmulo desses compostos no ambiente (Wellington et al., 2013). Por conseguinte, para o combate dessa ameaça global à saúde, será necessária a ação conjunta de muitas partes (Roca et al., 2015).

Nesse contexto, uma linha de pesquisa de bioprospecção de produtos naturais antimicrobianos foi desenvolvida em parceria entre o Laboratório de Biodiversidade e o Laboratório de Biotecnologia Molecular localizados no Departamento de Bioquímica de Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, visando a busca de novos agentes antimicrobianos a partir de fontes vegetais. Inicialmente, Almeida (2017), a partir da biblioteca de extratos do grupo, BIOPROS Extracts Library (BEL), realizou uma triagem com 100 extratos vegetais oriundos da Mata Atlântica, indicando atividade altamente promissora do extrato orgânico de folhas da espécie *Maclura tinctoria* frente a estirpes de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Esse extrato apresentou uma concentração inibitória mínima de 80 µg/mL, considerado uma alta inibição. Ademais, ao ser submetido ao fracionamento biomonitorado, a fração diclorometânica ativa reduziu a CIM (Concentração inibitória mínima) para 40 µg/mL, reduzindo o valor inicial pela metade, apresentando efeito bactericida. A fração ativa apresentou a mesma CIM para bactérias isoladas de animais com mastite bovina.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo aprofundar o conhecimento químico e antimicrobiano da espécie *Maclura tinctoria*. Empregando método de rastreabilidade da extratoteca BIOPROS, foi possível retornar a espécime que se mostrou ativa no trabalho de Almeida (2017) e nova coleta foi realizada, fornecendo o material vegetal para a realização dessa pesquisa.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Bioprospectar os compostos com potencial atividade antimicrobiana do extrato orgânico de folhas de *M. tinctoria*.

2.2. Objetivos específicos

- Produzir, por percolação em série, extratos com solventes de diferentes polaridades;
- Determinar a concentração inibitória mínima frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas;
- Determinar a concentração inibitória mínima frente a leveduras do gênero *Candida*;
- Realizar o *fingerprint* por HPLC com detector por arranjo de diodos (DAD);
- Verificar a atividade citotóxica desses extratos frente a células de fígado de macaco verde africano (Vero);
- Fracionar o extrato ativo até a obtenção de compostos puros;
- Determinar a concentração mínima inibitória desses compostos frente à *S. aureus*;
- Identificar os compostos por técnicas como ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biodiversidade brasileira e o bioma Mata Atlântica

A biodiversidade é considerada um recurso natural e pode ser definida como: “a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte; compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas” (Brasil, 2000). Estima-se que exista cerca de 8,7 bilhões de espécies diferentes em todo o mundo, e que apenas 14% das espécies terrestres e 9% das marinhas sejam conhecidas, ou seja, ainda há muito a ser descoberto (Pimentel et.al, 2015).

Nos últimos anos, muito têm-se discutido acerca do reconhecimento da importância dos recursos naturais, sendo assunto de extremo interesse para países considerados megabiodiversos, o que traz a temática para o centro do desenvolvimento (Pimentel et.al, 2015).

O Brasil é detentor da maior cobertura de florestas tropicais do mundo. Aliando-se tal fator à grande extensão territorial, pluralidade geográfica e climática, torna-o protagonista entre os 17 países detentores de megadiversidade do planeta

(Lewinsohn et al., 2006), possuindo mais de 20% das espécies que já foram descritas (Valli et al., 2013). Entretanto, toda essa biodiversidade está distante de ser completamente explorada. Com toda essa riqueza descrita, o Brasil contribui com cerca de apenas 1,5% do total da produção científica mundial no que se refere à biodiversidade (Cadete et al., 2014; Joly et al., 2014).

Quando se fala da biodiversidade existente no Brasil, evidencia-se o bioma Mata Atlântica. Esse bioma é constituído por um agregado de ecossistemas e formações florestais como manguezais, restingas e campos de altitude. É considerada a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano e abriga uma diversidade de espécies por área superior à da Floresta Amazônica. Além disso, está classificada entre os 34 *hotspots* mundiais de biodiversidade, destacando-se entre os cinco principais, possuindo prioridade para a conservação (Joly et al., 2014; Eisenlohr et al., 2013, Myers et al., 2000). Seu território está distribuído ao longo de mais de 27 graus de latitude, apresentando altos índices pluviométricos e grandes variações no relevo, contribuindo para essa megadiversidade encontrada no bioma (Pinto et al., 1997; Oliveira-Filho et al., 2000; Silva et al., 2003).

Ao longo da história do Brasil, a Mata Atlântica sofreu muito com ações antrópicas, como a mineração, ciclo do café e extração do pau-brasil. Atualmente, ela vem sofrendo com a expansão dos centros urbanos e consequente ocupação demográfica. Estudos indicam que este bioma está reduzido a menos de 8% da sua extensão territorial original, sendo o segundo bioma mais ameaçado de extinção do planeta (Ribeiro et al., 2011; Eisenlohr et al., 2013). Estima-se que a Mata Atlântica possui cerca de 20 mil espécies vegetais, sendo 8 mil delas endêmicas (Myers et al., 2000). Acredita-se que a região abrigue de 1 a 8% da biodiversidade do planeta (Fundação SOS Mata Atlântica, 2005).

O apelo à conservação dessa biodiversidade é grande, utilizando diversas estratégias e requerendo competências científicas. Então, visando o aproveitamento sustentável do bioma, têm-se utilizado como importante estratégia a busca por compostos ativos provenientes da matéria-prima vegetal para obtenção de novos fármacos, visto que, extensas áreas são pouco conhecidas quando se analisa do ponto de vista químico e biológico.

A Lei Nº 13.123, de 20 de maio de 2015, Lei da Biodiversidade, fixa um novo marco regulatório que tem como um dos objetivos incentivar a geração de recursos a

partir da biodiversidade brasileira. A Lei dispõe regras de acesso ao patrimônio genético e repartição dos benefícios, além de definir infrações e sanções administrativas, gerando dessa forma, uma maior proteção ao conhecimento tradicional associado, além de tornar mais acessível às pesquisas com espécies vegetais (Brasil, 2015).

3.2. Bioprospecção de produtos naturais com atividade antimicrobiana

O papel da química de produtos naturais sempre foi relevante para a descoberta de novos fármacos, cosméticos e outros bioprodutos, devido à grande diversidade estrutural o que proporciona um largo espectro de atividades farmacológicas. Estudos avaliam que aproximadamente dois terços da população mundial são dependentes dos recursos vegetais como forma terapêutica para a atenção primária à saúde (Mcchesney et al., 2007).

Tal gama de substâncias classificadas como metabólitos secundários, são biossintetizados pelos organismos vivos a partir dos metabólitos primários como carboidratos, lipídeos, nucleotídeos e aminoácidos (Leite, 2009). Os metabólitos secundários são usualmente classificados de acordo com sua rota biossintética produzindo classes de compostos que incluem alcaloides, taninos, cumarinas, flavonoides, glicosídeos, terpenos e poliacetilenos, dentre outros. Além disso, sabe-se que o metabolismo secundário pode sofrer influência direta da relação de fatores bióticos e abióticos presentes no meio ambiente. Essa ocorrência promove uma grande diversidade na produção desses compostos naturais intra e interespecie (Arimura et al., 2005).

Os países desenvolvidos, mesmo que muitos não possuam uma grande biodiversidade em seu território, sempre acreditaram na riqueza molecular da natureza. Este fato pode ser confirmado através da quantidade de medicamentos no mercado mundial que são oriundos ou inspirados em biocompostos, como antibióticos, antitumorais, fármacos para o tratamento de doenças cardíacas ou da diabetes (Bolzani, 2016).

Entre 1981 a 2010, em um estudo analisou a origem de mais de 1000 novas moléculas bioativas aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos. A partir da pesquisa, observaram que 6% eram produtos naturais isolados de organismos vivos, 28% originados de produtos naturais e 5% eram correspondentes

a produtos sintéticos, cujos grupos farmacofóricos eram baseados em estruturas de produtos naturais. As substâncias sintéticas representavam 36% dessas novas drogas (Cragg e Newman, 2013).

O número de pesquisa que realiza triagem de produtos naturais na busca por agentes antimicrobianos vem aumentando desde o fim da metade do século XX. Diversos antibióticos como penicilinas, aminoglicosídeos, cefalosporinas e tetraciclina, além de antibióticos análogos aos compostos naturais foram descobertos (Guimarães et al., 2010). A **Figura 1** mostra alguns exemplos de compostos derivados de produtos naturais com atividade antimicrobiana. Entretanto, a década de 1960 ficou conhecida como a “Era de ouro” para o campo farmacêutico, pois foi quando quase todas as classes de antibióticos conhecida atualmente foram descobertas (Balouiri et al., 2015). Entretanto, a partir de 1980 inicia uma lacuna na descoberta de novos fármacos antimicrobianos (Awan et al., 2016). Tal ocorrência somada ao uso indiscriminado de antibióticos gera, conseqüentemente, maior resistência aos medicamentos já conhecidos.

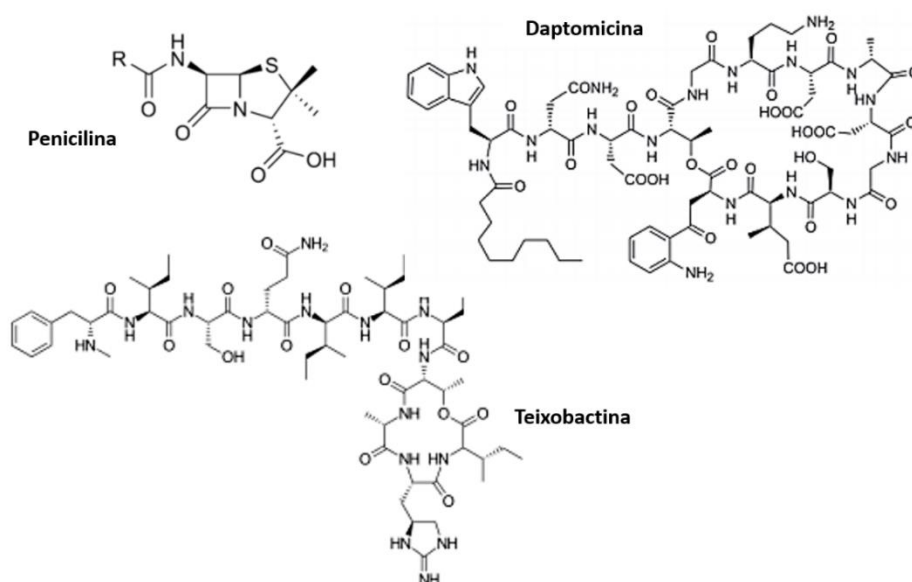


Figura 1 – Compostos com atividade antimicrobiana derivados de produtos naturais.

Atualmente, a resistência microbiana é um fator que gera preocupação global para a saúde pública (Balouiri, 2015). Segundo Blair e colaboradores (2015), na Europa, morrem a cada ano 25.000 pessoas devido a infecções por bactérias multirresistentes. Os prejuízos causados ao país chegam a 1,5 bilhões de euros por

ano. Já nos Estados Unidos, são infectadas por ano mais de dois milhões de pessoas por bactérias resistentes, chegando a 23.000 óbitos.

Além das bactérias, os fungos também desempenham importante papel nessa questão de preocupação com a saúde pública. As infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, por exemplo, vem aumentando ao longo dos anos (Safdar et al. 2001; Prado et al., 2009; Vieira et al., 2015). Tais leveduras são organismos que podem viver no sistema gastrointestinal, respiratório, urinário e reprodutivo sem causar prejuízos ao humano saudável (Eggimann et al., 2003; Vieira et al., 2015). Entretanto, quando há perturbações no sistema imune, as leveduras podem ocasionar desde infecções cutâneas a doenças invasivas que podem chegar a afetar órgãos internos (Safdar et al. 2001; Passos et al., 2005; Prado et al., 2009; Vieira et al., 2015). Ademais, já houve relatos de que em alguns casos, as leveduras não estão respondendo à tratamentos com os antifúngicos convencionais, como fluconazol e anfotericina B (Sanglard et al., 2003; Anderson, 2005; Vieira et al., 2015). Logo, se torna urgente a busca por novos compostos que possuam atividade contra esses microrganismos.

Existem diversos mecanismos através dos quais as bactérias se defendem dos antibióticos. Dentre eles os mais se destacam são: os sistemas de bombas de efluxo presentes na membrana plasmática que expulsam essas drogas da célula bacteriana; genes de resistência; enzimas que inativam os compostos, formação de biofilme, dentre outros. É de extrema importância uma melhor compreensão desses mecanismos para que seja possível um estudo que potencialize a ação dessas drogas, de modo a combater a resistência (Blair et al., 2015; Lin et al., 2015).

Estudos realizados com produtos naturais têm demonstrado que esses apresentam diferentes formas de ação contra os microrganismos patogênicos, podendo atuar driblando esses mecanismos citados anteriormente, como na ativação ou bloqueio de reações enzimáticas, seja em nível nuclear ou ribossomal e inclusive provocando alterações estruturas nas membranas desses patógenos (Sikkema et al., 1995; Burt, 2004; Gonçalves et al., 2005).

Existem inúmeros relatos de atividade antimicrobiana para diferentes classes de produtos naturais, como os óleos essenciais que são caracterizados por uma mistura complexa de compostos, ou de metabólitos secundários isolados, como as classes de alcaloides, triterpenos, diterpenos, cumarinas, chalconas, compostos

fenólicos, incluindo xantonas, chalconas e flavonoides prenilados (El-Sohly et al., 2001; Rios & Recio, 2005; Chen et al., 2014; Dastan et al, 2016; Genovese et al., 2016). Nesse sentido, a pesquisa em bioprospecção de produtos naturais torna-se uma excelente estratégia para essa busca, principalmente em países com uma vasta biodiversidade como o Brasil (Ostrosky et al., 2008).

3.3. Flavonoides prenilados

Os flavonoides podem ser biossintetizados e armazenados em diferentes compartimentos das células fotossintetizantes, logo, sua ocorrência é ampla no reino vegetal. São encontrados em uma ampla variedade de fontes como: legumes, frutas, folhas, nozes, sementes, caules, flores, bem como chá, vinho, própolis e mel. Dessa forma, essa classe de metabólitos secundários está presente de forma constante na dieta humana. Nas flores, os flavonoides possuem a função de proporcionar cores para a atração de agentes polinizadores. Nas folhas, estão relacionados com a sobrevivência fisiológica, protegendo-as de patógenos e da radiação UV-B. Ademais, esses compostos também estão relacionados com a transferência de energia na célula, envolvidos com o hormônio de crescimento, determinação sexual, dentre outros. Diversas atividades farmacológicas estão relacionadas aos flavonoides, como anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, dentre outras (Cushinie e Lamb, 2005).

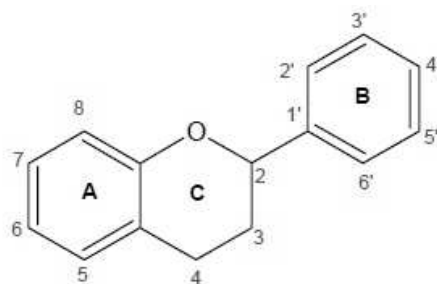


Figura 2 – Esqueleto C6-C3-C6 básico de um flavonoide, identificando os anéis A, B e C.

Os flavonoides constituem a classe primária de polifenóis com esqueleto C6-C3-C6, como mostra a **Figura 2**. Atualmente, existem mais de 8000 moléculas de flavonoides já descritas (Xie et al., 2015). Essa classe de metabólitos secundários

pode ser dividida em diferentes subclasses de acordo com seu estado oxidativo ou substituintes, como flavonas, flavanonas, flavonóis, flavanóis, isoflavonas.

Dentre esses metabólitos, destaca-se um grupo especial de compostos denominados por flavonoides prenilados. Eles constituem uma classe única de compostos que possuem, como exemplo, os grupos prenil ou geranil como substituição em seu esqueleto. Em geral, as ligações dos substituintes ocorrem entre carbonos, mas também existem os O-prenilados. Atualmente, a pesquisa com esse grupo específico de compostos se tornou um grande alvo devido às promissoras atividades biológicas relacionadas (Chen et al., 2014).

Diversas atividades biológicas já foram descritas para os flavonoides prenilados. O maior número de relatos é sobre atividade antimicrobiana, citotóxica, inibição enzimática e antioxidante. Entretanto, também há estudos sobre atividade larvicida, antialérgica, anti-inflamatória, dentre outras (Chen et al., 2014). Existem relatos de compostos prenilados na família Moraceae, especialmente em espécies do gênero *Maclura* (Grove et al., 2000; El-Sohly et al., 2001; Genovese et al., 2016).

Dentre os estudos das atividades dos flavonoides, grande parte tem sido dedicada à avaliação de atividade antimicrobiana. Estudos levam a acreditar que a prenilação acrescenta uma lipofilicidade à estrutura desses compostos, aumentando a afinidade dos mesmos com a membrana celular e aumentando interação dos mesmos com proteínas celulares (Hatano et al., 2000; Chen et al., 2014).

3.4. *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud

A espécie *M. tinctoria* (**Figura 3**), conhecida popularmente como amoreira, taiúva ou amarelinho, pertence à Família Moraceae e é predominantemente tropical, compreendendo 63 gêneros e 1500 espécies aproximadamente. O gênero *Maclura* é composto por onze espécies com uma distribuição exclusivamente tropical. No Brasil, apenas encontra-se as espécies *M. tinctoria* e *M. brasiliensis* (Lamounier et al., 2012).

M. tinctoria é uma espécie arbórea que possui de 10 a 20 metros de altura e entre 40 e 60 cm de diâmetro (Lamounier et al., 2012). A árvore produz uma fruta suculenta e saborosa que é consumida sozinha ou em sucos misturados com vinho. A fruta contém um grande número de sementes que rapidamente se tornam inviáveis.

Logo, as taxas de germinação são baixas (aproximadamente 30%) e as sementes não exibem latência (El-Sohly et al., 2001; Gomes, 2003).

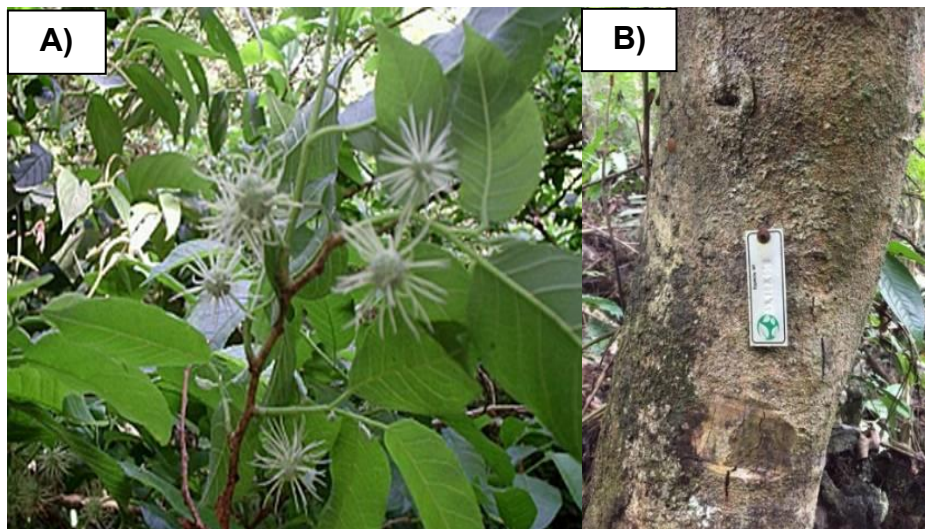


Figura 3 - *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. A) Partes aéreas de *M. tinctoria*; B) Individuo de *M. tinctoria* *in situ* plaqueado da coleção BIOPROS.

A literatura científica é bastante rica quando se trata de *Maclura pomifera* e os tipos de compostos isolados dessa espécie pertencem às classes de flavonoides, xantonas, triterpenos e estilbenos (Smith et al., 1981; El-Sohly et al., 1999).

Compostos flavonoídicos já identificados na espécie *M. tinctoria* estão mostrados na **Figura 4**. De um extrato etanólico da casca de *M. tinctoria* já foram isolados sete flavonoides, listados de 1 à 7 na **Figura 4**, mas não foram testados contra alvos biológicos (El-Sohly et al., 1999). Cinco compostos prenilados, listados de 8 à 12, incluindo flavonoides e chalconas foram isolados de um extrato etanólico das folhas de *M. tinctoria*. Todos os compostos isolados foram avaliados contra os agentes patogênicos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Um dos compostos encontrados, nomeado de isobavachalcona, foi ativo contra ambas as leveduras (El-Sohly et al., 2001). Os compostos 13 à 19 e 20 à 26 foram descritos por Groweiiis e colaboradores (2000) e Cioffi e colaboradores (2003), respectivamente.

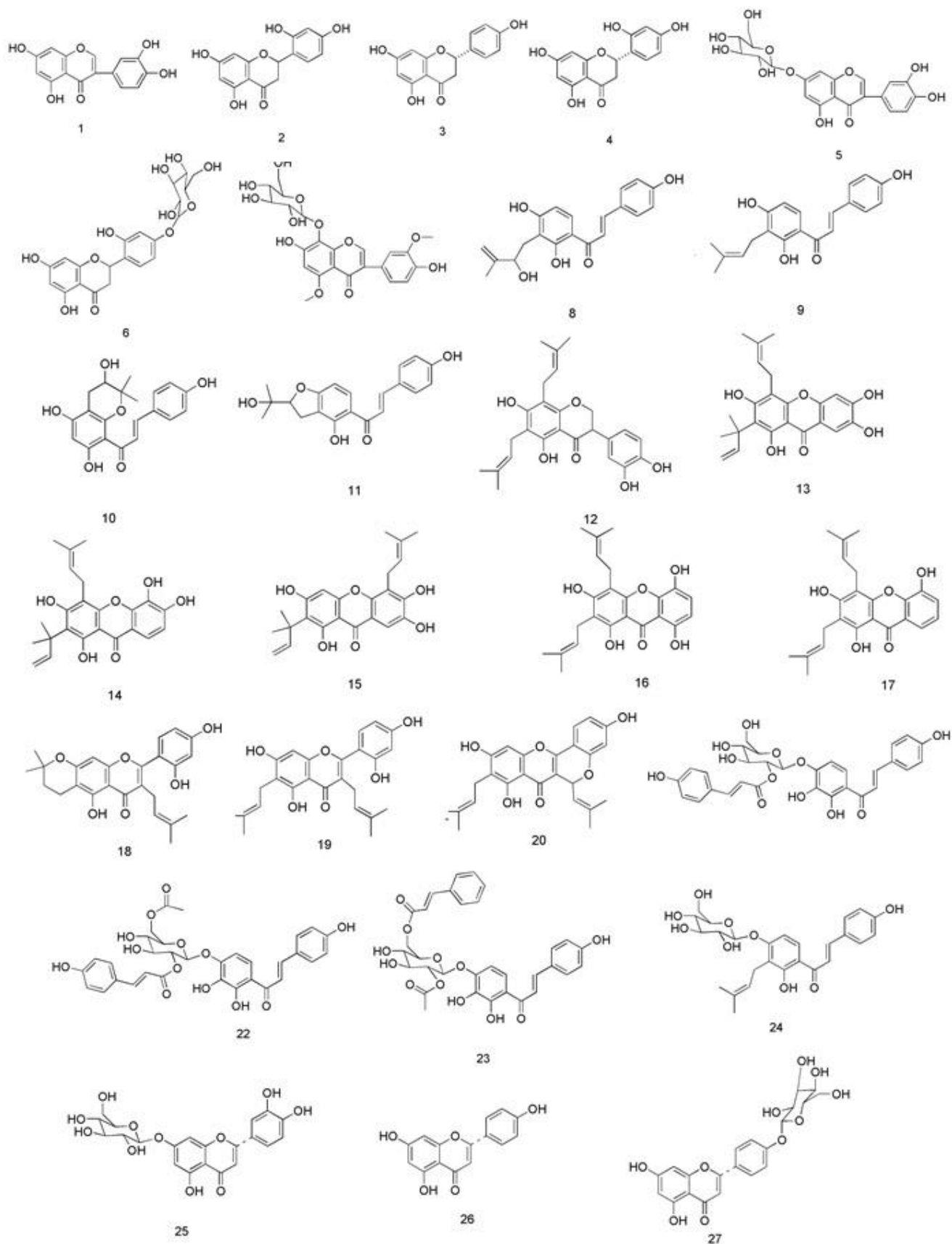


Figura 4 – Compostos isolados e identificados da espécie *Maclura tinctoria*.

A **Tabela 1** mostra as atividades biológicas que já foram descritas na literatura sobre a espécie *M. tinctoria*. Dentre essas atividades, destaca-se a atividade antifúngica e antibacteriana que são alvos do presente trabalho.

Tabela 1 - Relato de atividades biológicas apresentadas por extratos da espécie *Maclura tinctoria*.

Parte da planta	Solvente extrator	Atividade	Referência
Folha	Etanol	Antifúngica	El-Sohly et al., 2001.
Casca	Metanol – Diclorometano (1:1)	Anti-HIV	Groweiss et al., 2000.
Casca e madeira	Metanol	Antioxidante	Lamounier et al., 2012.
Casca	Diferentes solventes orgânicos utilizados	Antibacteriana	Lamounier et al., 2012.
Casca	Metanol	Antioxidante	Cioffi et al., 2003.
Folhas	Metanol – Diclorometano (1:1)	Antibacteriana	Almeida et al., 2017.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta do material vegetal

As folhas de *M. tinctoria* foram coletadas no fragmento de Mata Atlântica da Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental (EPTEA) Mata do Paraíso, que pertence à Universidade Federal de Viçosa (UFV) em junho de 2017. Através do georreferenciamento realizado para a construção da biblioteca de extratos “BIOPROS Extract Library”, tornou-se possível coletar as folhas do mesmo espécime utilizado no

estudo de Almeida (2017). A exsicata da espécie está depositada no herbário VIC e possui o *voucher* VIC40.267.

Foram coletados 1,8 kg de folhas frescas de *M. tinctoria*, que possui número de identificação ID MAPA 43.162.599 (**Figura 5**) na Mata do Paraíso



Figura 5 – Placa de número de identificação de espécie ID MAPA, confeccionada pelo grupo BIOPROS. Foto retirada no momento da coleta das folhas de *Maclura tinctoria*.

4.2. Produção dos extratos vegetais

4.2.1. Secagem do material vegetal

As folhas frescas foram processadas, de modo a separar folha e galho, e pesadas em laboratório imediatamente após a coleta. Realizou-se a secagem por 48h em uma estufa de secagem com ventilação circular à 40 °C.

4.2.2. Pulverização do material vegetal seco

Após a secagem, o material foi triturado em um moinho de facas de modo a reduzir o tamanho da partícula e aumentar a superfície de contato para otimização do processo de extração. Após a moagem, a droga vegetal foi pesada, totalizando 659g de material vegetal seco triturado.

4.2.3. Obtenção dos extratos vegetais

Os extratos foram produzidos no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. O processo de extração empregado foi o de percolação em série exaustiva, que consiste na utilização de solventes com ordem crescente de polaridade sobre o mesmo material. A ordem utilizada de solventes foi a seguinte: hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol. Todos os solventes foram de grau P.A.

Para a produção dos extratos foram utilizados 550 g do material vegetal triturado e o restante foi armazenado à 4°C em frasco hermeticamente fechado, para possíveis futuras análises. Iniciou-se a percolação inserindo o material vegetal seco ao percolador de aço inox, juntamente com 1,5 L de hexano. O mesmo ficou em maceração para que ocorresse a extração por aproximadamente 12 horas. Posteriormente, o extrato hexânico foi drenado e concentrado em evaporador rotatório. Realizou-se o processo diversas vezes até que a massa extraída fosse irrelevante, ou seja, não se observava mais extração significativa no solvente utilizado. Após cada ciclo empregando um solvente, dava-se início a um novo ciclo com o solvente de polaridade superior. Todos os extratos foram concentrados em evaporador rotatório e, posteriormente, submetidos a liofilização para completa eliminação do solvente. Após produção dos extratos secos, esses foram armazenados em frascos de vidro, fechados e mantidos a -20 °C protegidos da luz (Mccloud, 2010). Ao final foram obtidos os extratos hexânicos (HxMt), diclorometânico (DcMt), em acetato de etila (EaMt) e em etanol (EtMt).

Dessa forma, o rendimento (R) dos extratos pode ser calculado a partir da relação entre o peso seco da droga vegetal e o peso do extrato liofilizado produzido, seguindo a fórmula abaixo:

$$R(\%) = \frac{\text{massa do extrato (g)}}{\text{massa da droga pulverizada (g)}} \times 100$$

4.3. Testes microbiológicos

4.3.1. Avaliação da atividade antibacteriana

Os testes com as bactérias foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Molecular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. Os extratos orgânicos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO; Vetec®) na concentração de 100 mg/mL. Deixou-se os mesmos em banho ultrassônico por aproximadamente 10 minutos à 30°C até a completa diluição. Posteriormente, foram armazenados à -20°C até a realização dos testes.

4.3.1.1. Bactérias e condições de cultivo

As bactérias utilizadas para a realização dos testes foram as estirpes Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus epidermidis*, sendo as duas últimas doadas pela EMBRAPA. As bactérias Gram-negativas foram *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Echerichia coli* ATCC 25922. Todas as bactérias fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia Molecular. As bactérias foram estriadas em placas de BHI ágar (Kasvi®) um dia antes de cada experimento e as mesmas foram mantidas a 37°C.

Os ensaios para a determinação da concentração inibitória mínima foram realizados em caldo Mueller-Hinton (MH, Himedia®). Para isso, uma suspensão bacteriana foi ajustada para 0,5 na escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e um inoculo contendo 10^6 UFC/mL foi usado nos ensaios

4.3.1.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos

A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2012), sendo os extratos testados em concentrações que variam de 5.000 µg/mL até 4 µg/mL Na coluna 1, cada poço da microplaca foi preenchido com 100 µL de caldo MH e concentração de extrato de 10mg/mL. Nos outros poços, foram adicionados 100 µL de MH. Posteriormente, realizou-se a diluição seriada, passando 100 µL da

coluna 1 para a coluna 2, homogeneizando 10 vezes. Na última coluna, foram descartados 100 µL. Ao final, 100 µL da suspensão bacteriana equivalente a 10⁶ UFC/mL, foi adicionado aos poços. Para o controle negativo foram utilizados 100 µL de meio acrescidos de 100 µL da suspensão bacteriana. Para o positivo, utilizou-se gentamicina. Poços preenchidos com meio, DMSO e suspensão bacteriana, meio e solução salina ou apenas meio de cultura também foram usados como controle.

As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h. O crescimento bacteriano foi avaliado adicionando-se 5 µL de uma solução de 2 mg/mL de cloreto de *p*-iodonitrotetrazolio (INT, I8377, Sigma®) a cada poço e deixando reagir por 2h a 37°C. O resultado foi avaliado pela alteração da coloração do meio de amarelo para róseo-violeta, indicativo de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato no qual visualmente não se observou coloração rosa. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.2. Avaliação da atividade antifúngica

Os estudos com os fungos foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismo da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro.

4.3.2.1. Leveduras e condições de cultivo

As leveduras *Candida albicans* (CE022), *Candida tropicalis* (CE017), *Candida parapsilosis* (CE002) e *Candida guilliermondii* (3982) foram mantidas em ágar Sabouraud (peptona de carne 5 g/L, peptona de caseína 5 g/L, glicose 20 g/L e agar 15 g/L, Kasvi) a 30 °C e repicada para um novo meio trimestralmente.

4.3.2.2. Obtenção das células das leveduras

Inóculos das células das leveduras foram retirados das placas de Petri que possuíam colônias já estabelecidas e colocadas para crescer em uma nova placa

contendo ágar Sabouraud, por um período de 24 h a 30 °C. Após o crescimento, um inóculo de cada levedura foi transferido para um tubo de microcentrífuga contendo caldo Sabouraud (peptona de carne 5 g/L, peptona de caseína 5 g/L e glicose 20 g/L, Merck Milli-pore) e então as células foram quantificadas em câmara de Neubauer (LaborOptik) através de microscópio óptico (Axioplan.A2, Zeiss) e utilizadas nos ensaios.

4.3.2.3. Triagem inicial dos extratos para inibição do crescimento das células das leveduras em meio líquido

Após a quantificação, 2.000 células/mL das leveduras foram separadamente incubadas em 100 µL de caldo Sabouraud contendo as amostras (HxMt, DcMt, EaMt, EtMt). As amostras estavam liofilizadas na quantidade de 20 mg e foram ressuspensas em 1 mL de DMSO (Sigma Aldrich) puro ficando na concentração estoque de 20 mg/mL. A concentração final das amostras no poço foi de 1.000 µg/mL, o que corresponde a 5% de DMSO. Os ensaios foram realizados em placas de cultura de células de 96 poços (fundo chato de poliestireno, Kasvi), a temperatura de 30 °C por 42 h, em triplicata. A determinação da densidade óptica foi feita de 6 em 6 h em um leitor de microplacas (DV 990DV6, GDV) a 620 nm, excetuando o período da madrugada. O ensaio foi realizado em triplicata e todo o procedimento foi feito em condições de assepsia em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert et al. (1990). Como controles de crescimento foram utilizados 0,5 µg/mL de fluconazol (Sigma Aldrich) diluído em DMSO e 5% de DMSO, separadamente, ao meio contendo as células.

4.3.2.4. Determinação da concentração inibitória mínima

Aqueles extratos que apresentaram 100% inibição do crescimento de determinadas leveduras foram selecionados para a determinação da concentração inibitória mínima: EaMt e HxMt para *C. albicans*, DcMt e HxMt para *C. tropicalis*, EaMt e DcMt para *C. parapsilosis* e DcMt e HxMt para *C. buinenses*. Para determinação da CIM um novo ensaio de inibição do crescimento das leveduras foi realizado em triplicata, como descrito anteriormente no **item 4.3.2.3**, utilizando as amostras acima

nas concentrações de 1000, 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL segundo metodologia adaptada de Wiegand et al. (2008). A CIM foi definida como a menor concentração das amostras em µg/mL, na qual resultou na ausência de crescimento celular visível a olho nu no fundo do poço da placa de cultura ao final do período de incubação de 42 h.

4.3.2.5. Determinação do efeito fungistático ou fungicida

Após 48 h de incubação do ensaio para a determinação da CIM, foi feita uma leitura da densidade e em seguida, para cada levedura, a amostra apresentando a menor CIM, que foi confirmado visualmente, teve todo o volume dos poços ressuspensionado. Este volume correspondente a um poço foi então espalhado sobre placas de Petri contendo ágar Sabouraud. As placas foram mantidas em estufa a 30 °C por 48 h e então foram fotografadas. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.4. Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* para células Vero

Em placas de 96 poços (TPP®), células Vero (rim de macaco verde africano) foram semeadas em meio de cultivo RPMI suplementado com soro fetal bovino (10%) na quantidade de 5×10^4 células/poço. Após 24 h, tempo necessário para a formação de uma camada confluyente de células, adicionaram-se os extratos (HxMt, DcMt, EaMt e EtMt) em 8 concentrações diferentes (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562 µg/mL). O tempo de exposição das células aos extratos foi de 48 h. Os poços do controle negativo receberam meio de cultivo completo mais DMSO (0,4% v/v; Synth®). Ao término do tratamento foram adicionados em cada poço 20 µl de solução tampão fosfato-salino (PBS) contendo o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT; 5 mg/ml; Sigma-Aldrich®) por 3 h (Mosmann, 1983). Para lisar as células e solubilizar os cristais de formazan (coloração violeta) adicionou-se em cada poço 100 µl de DMSO. Quanto maior a intensidade desta coloração maior a viabilidade celular (VC), que foi calculada após leitura espectrofotométrica (540 nm) e utilizando a fórmula abaixo, onde T foi a absorvância na presença dos extratos e C foi a absorvância do controle negativo (Gao et al., 2011).

$$VC = T/C \times 100\%$$

4.4.1 Análise estatística

Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão. A partir da curva de proliferação celular realizou-se regressão não linear e o cálculo do IC50 (concentração do extrato que causa 50% de inibição da viabilidade celular) utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 6.0 (São Diego, CA, EUA).

4.5. Análise fitoquímica do extrato ativo de *M. tinctoria*

4.5.1. Prospecção fitoquímica por CCD

A prospecção fitoquímica dos extratos *HxMt*, *DcMt*, *EaMt* e *EtMt* foi realizada de acordo com Wagner e Bladt (1996) por cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel, empregando controles positivos padrões fitoquímicos das diferentes classes de compostos pesquisados e seus respectivos agentes reveladores, como descritos na **Tabela 2**.

As placas utilizadas foram de sílica gel 60 com suporte de alumínio e indicador UV (Macherey-Nagel®). Diferentes fases móveis foram testadas para os diferentes extratos, visando uma melhor separação das manchas. A fase móvel eleita foi composta por uma mistura de diclorometano, acetato de etila e ácido fórmico (90:10:1).

Por CCD também foi realizada a comparação entre o perfil fitoquímico do extrato orgânico de folhas de *M. tinctoria* produzido neste trabalho com o extrato anteriormente obtido no estudo de Almeida (2017). Como reveladores foram utilizados o ácido sulfúrico 50% e difenilaminoborato com polietilenoglicol (NP/PEG).

Tabela 2 - Padrões fitoquímicos e reagentes reveladores referentes aos metabólitos secundários prospectados

Classe de Metabólito secundário	Padrão	Reagente Revelador
Taninos	Ácido Pirogálico	Reagente de Barton
Flavonoides	Rutina	NP/PEG
Saponinas	Ácido 18- β -glicirretínico	Anisaldeído Sulfúrico
Cumarinas	Venalot®	Hidróxido de potássio a 5%
Antraquinona	1,8-diidroxiantraquinona	Hidróxido de potássio a 5%
Triterpenos/esteroides	β -sitosterol	Reagente de Lieberman-Burchard
Alcaloides	Quinina	Reagente de Dragendorff

Os reveladores foram preparados de acordo com Wagner e Bladt (1996).

4.5.2. *Fingerprint* por HPLC-DAD analítico

A impressão digital dos extratos e grupos foram determinadas por HPLC com detector por arranjo de diodos (DAD) Shimadzu Prominence (bomba LC - 20 AD, detector SPD - M 20 A, forno CTO - 20 A, software LabSolutions). A faixa de comprimento de onda monitorada foi de 200 à 400 nm.

O preparo das amostras foi realizado utilizando uma pequena quantidade de amostra solubilizadas em 2 mL de acetonitrila grau HPLC (Merck®) com auxílio de banho ultrassônico em temperatura de 30°C por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram filtradas em filtro milipore de 45 μ m, acondicionadas nos viles e levadas ao HPLC.

A coluna utilizada nas eluições (Shimpack®, 150 mm por 4,6 mm, com tamanho de partícula de 15 μ m, foi de fase reversa (C-18) e a temperatura do forno foi ajustada em 40°C. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min e o tempo de corrida usado foi de 11 minutos. A fase móvel consistiu de solvente A: água ultrapura e solvente B: acetonitrila (ACN). Após várias avaliações de fases móveis, foi selecionado um gradiente linear, variando de 65% a 95% de acetonitrila (ACN), em 10 minutos de

corrida. Após 10 minutos, o sistema voltou à concentração inicial de 65% de ACN, permanecendo por 1 min (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Gradiente de eluição empregado na técnica de HPLC-DAD analítico para os extratos de *Maclura tinctoria*

Tempo (min)	Concentração de ACN (%)
0	65
9	95
10	65
11	65

4.5.3. Análise por FIA-ESI-IT-MS/MSⁿ

Para a obtenção do perfil cromatográfico por espectrometria de massas para o extrato ativo de *M. tinctoria* foi empregado análise de infusão por fluxo direto (FIA), usando uma bomba-seringa com velocidade de fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, em espectrômetro de massa com fonte de ionização por electrospray (ESI), nos modos positivo e negativo (Thermo, San Jose, EUA), equipado com analisador ion trap (IT) linear (Thermo Scientific LTQ XL) e software Xcalibur. A tensão capilar foi -35 V, a tensão de pulverização de 5 kV e lente de tubo de -100 V. A temperatura do capilar foi de 280 °C. Nitrogênio foi usado como gás carreador do fluxo e como nebulizante. A análise completa de varredura foi registrada na faixa m/z 100-1.000. As fragmentações em vários estágios (ESI-MSⁿ) foram realizadas usando o método de dissociação induzida por colisão (CID) contra o gás hélio para ativação dos íons. Dois eventos foram realizados durante a análise no espectrômetro de massas, sendo primeiramente obtido o espectro de massa de varredura completa (“*full-scan*”), a fim de adquirir os dados dos compostos ionizados dentro da faixa estabelecida. No segundo evento foi realizado experimento MS/MS com energia de colisão de 30% e tempo de ativação de 30 ms., empregando dados de varredura dependente do full scan. A energia de colisão para MS/MS foi ajustada em 30 a 40eV. Aos íons produtos obtidos sucessivas fragmentações foram obtidas.

4.5.3.1. Etapa de clean up em SPE do extrato ativo

A preparação do extrato consistiu em uma etapa de *clean up* por extração em fase sólida empregando cartuchos de fase reversa Sep Pak RP18. O cartucho foi pré-condicionado com MeOH (4 mL) e equilibrado com MeOH/H₂O (85:15, v/v) (4 mL). O extrato (10 mg) a ser aplicado no suporte de SPE foi previamente solubilizado em 1,5 mL da solução MeOH/H₂O (90:10, v/v) e eluído com a mesma proporção de fase móvel. Posteriormente, o eluato foi seco em ar comprimido, pesado e ressuspendido em MeOH/H₂O (90:10, v/v) com quantidade necessária para fornecer uma solução com concentração de 1mg.mL⁻¹. Em seguida, a solução foi filtrada em filtro PTFE Millex® com tamanho de poro 0,22 µm. Ao final, 10 µl do extrato a 1 mg/mL foi transferido para um vial e o volume completado com 990 µl de metanol grau LC-MS, obtendo-se uma solução a 10 ppm que foi injetado no espectrômetro de massa.

4.5.4. Quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais

O procedimento de quantificação de flavonoides totais foi baseado na técnica espectrofotométrica empregando reagente de cloreto de alumínio.

4.5.4.1. Preparação da solução mãe do extrato

Pesaram-se 5 mg do extrato *DcMt* acrescentando, em seguida, 20 mL de metanol. A mistura foi deixada em banho ultrassônico por 5 minutos para completa solubilização do extrato. Após este procedimento, o extrato foi filtrado e transferido para um balão volumétrico, completando o volume para 25 mL.

4.5.4.2. Reação colorimétrica

Em tubo de ensaio, adicionou-se uma alíquota de 0,5 mL da solução-mãe e, em seguida, 0,5 mL de solução de cloreto de alumínio 2% em metanol.

Posteriormente, completou-se o volume com 2,5 mL de metanol. Após 60 min a absorbância foi lida em aparelho espectrofotômetro na região de 415 nm. Uma leitura do branco foi realizada, empregando como reagente AlCl_3 2% e metanol. A análise foi realizada em triplicata.

4.5.4.3. Curva de calibração para flavonoides totais

Em um balão volumétrico de 25 mL, uma solução de rutina a 5 mg/mL em metanol foi preparada. Em seguida, alíquotas de 4,0; 9,0; 18,0; 26,0 e 44,0 μL desta solução foram transferidas para o tubo de ensaio. Para cada tubo de ensaio, foi acrescentado 0,5 mL da solução de AlCl_3 e completado o volume para 3,5 mL com metanol. Para a leitura do branco, foram adicionados 3 mL de metanol e 0,5 mL de AlCl_3 2% p/v em metanol. Após exatos 60 minutos em repouso na ausência de luz, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 415 nm.

Os dados obtidos foram submetidos à análise da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, sendo calculada a equação da reta: $y = 0,0285x + 0,0189$ e o coeficiente de correlação (R^2) = 0,9994.

4.6. Isolamento e purificação de metabólitos secundários do extrato ativo de *M. tinctoria*

Para a purificação de compostos a partir do extrato ativo foi empregado cromatografia em coluna de sílica gel. A coluna de vidro (40cm x 10cm) foi empacotada com 200 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,2 mm/ 70 – 230 mesh, ASTM) com auxílio de 800 mL de hexano. A acomodação da sílica na coluna foi realizada com sucessiva passagem de hexano.

Uma alíquota de 10 g do extrato ativo foi misturada e homogeneizada com adição de hexano a sílica gel com auxílio de gral e um pistilo de porcelana. Esse material uniforme foi adicionado à coluna. Acima do material, também foi adicionado algodão para que a adição de solvente não tivesse impacto direto na coluna.

O gradiente de eluição ocorreu utilizando uma mistura binária de solventes com o crescimento gradual e lento de polaridade, sendo esses: hexano, diclorometano,

acetato de etila, etanol e metanol. Um total de 553 frações (*FMt_1* à *FMt_553*) de 50 mL cada foram retiradas da coluna e concentradas em evaporador rotatório (BUCHI, Switzerland) em uma temperatura de 45°C. O solvente recuperado era reaproveitado e sua concentração era ajustada através do índice de refração da mistura de solventes utilizada empregando um refratômetro.

O perfil cromatográfico das 553 frações eluídas da coluna foi monitorado por CCD, utilizando fases móveis de acordo com a polaridade dos compostos eluídos e como revelador o anisaldeído sulfúrico. Ao encontrar frações com perfis cromatográficos similares, as mesmas foram agrupadas, totalizando ao final 30 grupos de frações (*GMt_1* à *GMt_30*), como mostrado na **Figura 15**.

Os 30 grupos foram submetidos à análise por CCD utilizando como revelador o NP/PEG e a fase móvel variou de acordo com a polaridade dos grupos. Aqueles que apresentaram resultado positivo para a presença de flavonoides por CCD, foram avaliados por HPLC-DAD analítico nas condições citadas no **item 2.5**. A partir desses dados, foi possível confrontar o perfil dos grupos com o extrato ativo, verificando em qual deles os diferentes picos do extrato estavam presentes. Dessa forma, permitiu-se selecionar os grupos que possuíam melhor perfil para separação por HPLC semi preparativo.

4.6.1. Purificação dos compostos por HPLC semi-preparativo

Aqueles grupos que foram positivos para flavonoides e que apresentaram perfil cromatográfico menos complexos foram selecionados para serem submetidos a purificação por HPLC semi preparativo, sendo estes denominados de *GMt_6*, *GMt_8*, *GMt_16*, *GMt_17*, *GMt_19* e *GMt_20*. Os comprimentos de onda avaliados foram 254 e 264 nm.

Para o preparo das amostras, diferentes volumes de acetonitrila (Merck®) foram utilizados para solubilizar cada grupo, de acordo com a massa e intensidade de absorção dos picos nos comprimentos de onda analisados (**Tabela 4**). Em todas as análises foram injetadas 4 mL de amostra.

Tabela 4 - Informações sobre a massa de cada grupo, volume de ACN utilizado para diluição e número de aplicações no HPLC modo semi preparativo.

Grupo	Massa (mg)	Volume de ACN (μL)	Número de aplicações
GMt_6	115	16	4
GMt_8	308	16	4
GMt_16	642	40	10
GMt_17	355	60	15
GMt_19	595	48	12
GMt_20	146	24	6

Para a etapa de purificação dos compostos foi empregado HPLC semi preparativo com detector UV Shimadzu Prominence (bomba LC - 20 AR, detector SPD-20A, *software LabSolutions*). A coluna utilizada nas eluições (Shimpack®-PREP-ODS H, 250 mm por 20 mm) foi de fase reversa (C-18) com diâmetro de partícula de 15 μ m. O fluxo utilizado foi de 5 mL/min e o tempo de corrida foi de 30 minutos. O gradiente de eluição da fase móvel foi adaptado de acordo com o método determinado para o HPLC analítico citado anteriormente. Sendo que a fase móvel gradiente também variou de 65% a 95% de ACN (**Tabela 5**), sendo a fase A: água ultrapura e fase B: ACN. Inicia-se a análise com 65% e ocorre o aumento linear até atingir 95% em 24 minutos. Em 29 minutos de corrida, o sistema volta à concentração inicial de 65% de ACN e em 30 minutos está pronto para uma nova injeção.

Tabela 5 - Gradiente de eluição para os grupos injetados para coleta dos picos no HPLC-UV semi preparativo.

Tempo (min)	Concentração de ACN (%)
0	65
24	95
29	65
30	65

As frações coletadas foram concentradas em rotaevaporador até completa remoção do solvente. Todas as frações coletadas provenientes dos picos referentes a flavonoides foram reinjetadas no HPLC analítico de acordo com a metodologia citada no **item 4.6.** para verificar o grau de pureza dos compostos isolados.

4.7. Identificação estrutural por Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Moléculas (LMCM), Escola de Farmácia, UFOP, em equipamento Bruker Ascend™ 400, a 25 °C. Como referência interna foi empregado tetrametilsilano (TMS). Utilizou-se o solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3) para solubilizar as amostras. Os espectros de RMN estão mostrados no **Apêndice IV.**

5. RESULTADOS

5.1. Coleta do material vegetal e produção dos extratos

Após secagem, o material vegetal seco pulverizado foi de 659 g, o que corresponde a 36,6% do peso fresco inicial. O rendimento de cada extrato está representado na **Figura 6.**

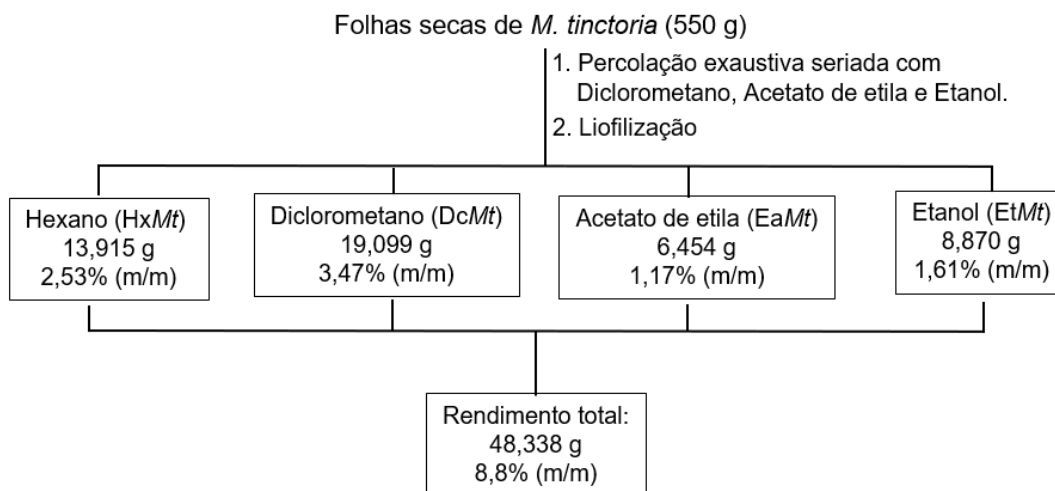


Figura 6 – Processo de produção de HxMt, DcMt, EaMt e DcMt, solventes, massas e rendimento dos mesmos.

O extrato com maior rendimento foi o diclorometânico (DcMt) com 3,47% (m/m), seguido pelo hexânico (HxMt) com 2,53% (m/m). O etanólico (EtMt) e o de acetato de etila (EaMt) possuíram os menores rendimentos com 1,61% (m/m) e 1,17% (m/m) respectivamente.

HxMt apresentou aspecto oleoso a temperatura ambiente, com coloração amarela escura. DcMt e EaMt apresentaram-se de forma amorfa, com coloração verde escura. Já EtMt ficou com aspecto viscoso e também verde escuro.

5.2. Análise de atividade antimicrobiana dos extratos de *M. tinctoria*

5.2.1. Antibacteriano

5.2.1.1. Concentração inibitória mínima

As bactérias gram positivas testadas foram do gênero *Staphylococcus* e apresentaram resultados similares como mostra a **Tabela 6**. Os extratos DcMt e EaMt mostraram-se mais promissores contra as bactérias Gram positivas pelo menor valor da CIM (CIM de 20 à 10 µg/mL), sendo menor que para o extrato bruto e fração diclorometânica mais ativa testada por Almeida (2017). HxMt e EtMt não apresentaram resultados significativos para nenhuma das bactérias. Todos os extratos possuíram alta CIM frente às bactérias Gram negativas testadas.

Tabela 6 - Valores de CIM para todos os extratos e bactérias testadas

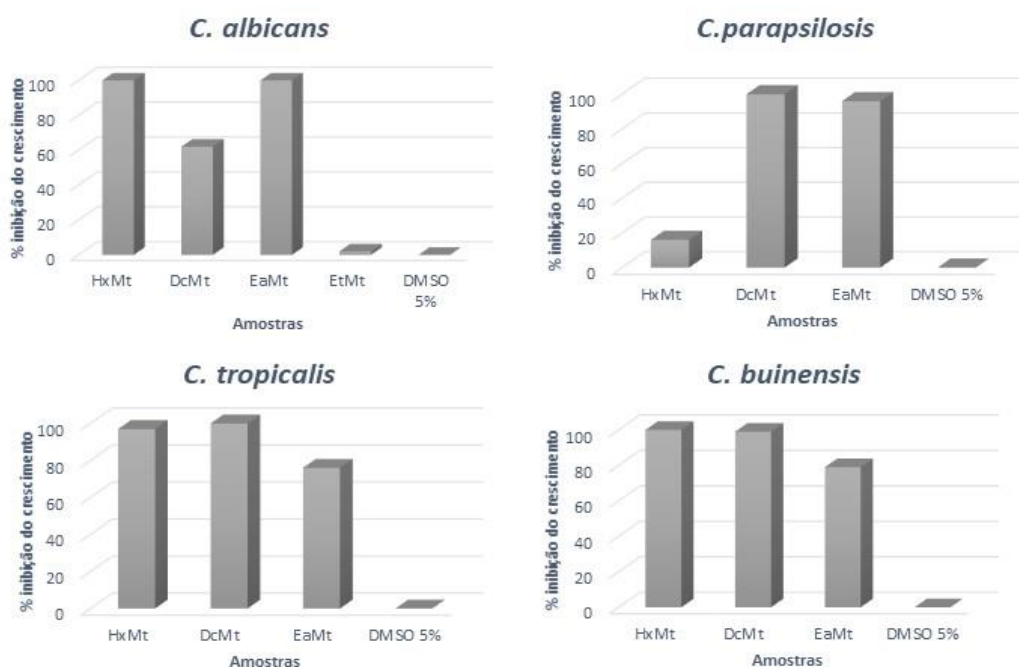
Extrato	CIM (µg/mL)				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus intermedius</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
HxMt	5.000	2.500	2.500	> 5.000	> 5.000
DcMt	20	20	10	> 5.000	> 5.000
EaMt	20	20	20	> 5.000	> 5.000
EtMt	5.000	5.000	2.500	> 5.000	> 5.000
Extrato bruto*	80	-	-	-	-
Fração ativa**	40	-	-	-	-

*Extrato orgânico de folhas de *M. tinctoria* da extratoteca produzido por Almeida (2015) e fração** mais ativa produzida e testada por Almeida (2017).

5.2.2. Antifúngico

5.2.2.1. Triagem inicial dos extratos para inibição do crescimento das células das leveduras em meio líquido

Com relação às leveduras, pela triagem inicial foram selecionados os extratos que na concentração de 1.000 µg/mL apresentaram 100% de inibição do crescimento para as quatro diferentes leveduras do gênero *Candida* testadas. Para *C. albicans*, foram selecionados HxMt e EaMt. Para *C. tropicalis* e *C. buinensis* selecionaram-se DcMt e HxMt. Já para *C. parapsilosis* elegeram-se EaMt e DcMt (Figura 7). O extrato etanólico, EtMt, não inibiu o crescimento de *C. albicans* e foi desconsiderado para o prosseguimento das análises.



* Todas os extratos foram testados à 1.000 µg/mL

Figura 7 - Porcentagem de inibição do crescimento de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida buinensis* para os quatro diferentes extratos e controle negativo (DMSO 5%).

5.2.2.2. Determinação da concentração inibitória mínima

A CIM dos extratos selecionados foi determinada e um valor de 125 $\mu\text{g/mL}$ foi obtido quando o extrato DcMt foi avaliado frente a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ contra *C. buinensis*. EaMt também mostrou resultados satisfatórios com CIM de 125 $\mu\text{g/mL}$ para *C. albicans* e *C. parapsilosis*. A **Figura 8** mostra os poços da microplaca, onde foi possível determinar a CIM através da visualização do crescimento celular no fundo do poço.

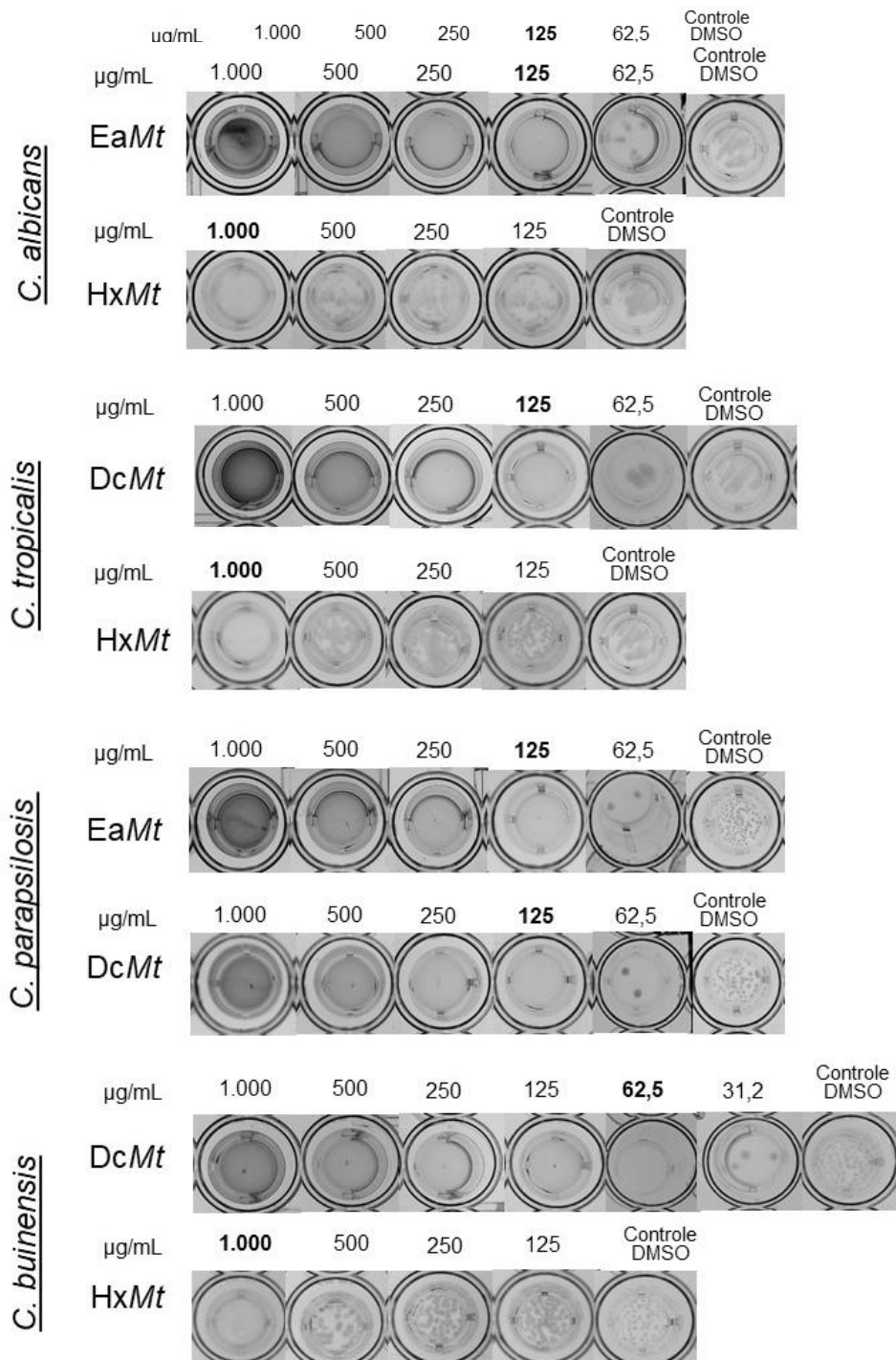


Figura 8 - Fotografia tirada dos poços das microplacas ao final do ensaio para a determinação da concentração inibitória mínima dos extratos selecionados. Imagem representativa de três experimentos.

5.2.2.3. Diferenciação entre o efeito fungistático ou fungicida das amostras

Para a diferenciação do efeito fungicida e fungistático, plaqueiou-se em ágar Sabouraud o volume do poço onde visualmente apresenta a menor CIM. A **Figura 9** mostra o resultado após 48h dos extratos nas concentrações identificadas como CIM no item anterior para as diferentes leveduras, bem como o controle (DMSO 5%).

Não foi possível observar crescimento das leveduras para nenhum dos extratos testados, diferentemente do que ocorre e era esperado para o DMSO 5%. Logo, é possível confirmar o efeito fungicida dos extratos para as quatro diferentes espécies de levedura do gênero *Candida*.

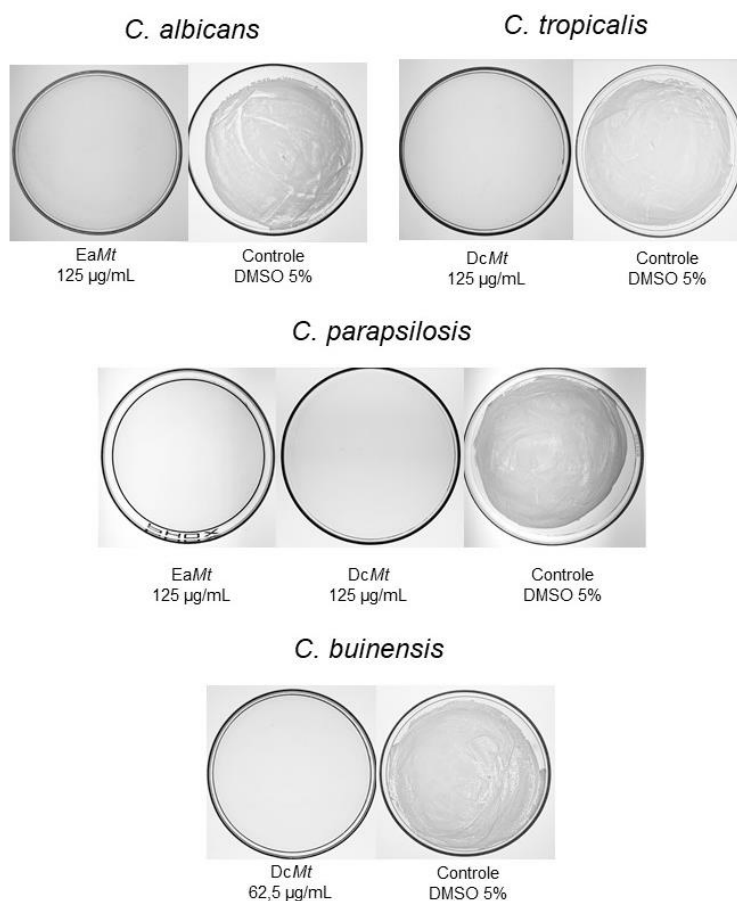


Figura 9 – Placas de petri contendo ágar Sabouraud e o volume dos poços correspondente à CIM para os diferentes extratos e leveduras, bem como o controle de cada experimento constituído de DMSO 5%.

5.3. Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

A atividade citotóxica *in vitro* foi testada contra células da linhagem *Vero* (fígado de macaco verde africano) e as concentrações de extrato testadas variaram de 200 à 1,562 µg/mL. O resultado foi expresso através do IC₅₀, concentração do extrato que é capaz de causar inibição da viabilidade celular em 50%. A **Tabela 7** mostra que o extrato com menor IC₅₀ foi *DcMt*, pois, na concentração de 57,45 ± 15,05 µg/mL, 50% das células *Vero* apresentaram viabilidade comprometida.

Tabela 7 - IC₅₀ (µg/ml) para os quatro extratos das folhas de *Maclura tinctoria*.

Extratos testados	Linhagem celular
	<i>Vero</i>
<i>HxMt</i>	> 200
<i>DcMt</i>	57,45 ± 15,05
<i>EaMt</i>	153,1 ± 10,23
<i>EtMt</i>	> 200

5.4. Análise fitoquímica do extrato ativo de *M. tinctoria*

5.4.1. Prospecção fitoquímica dos extratos

A análise fitoquímica por CCD mostrou que diversas classes de metabólitos secundários estão presentes nos diferentes extratos analisados e que há diferenças entre as classes de metabólitos presentes em cada um deles.

Os extratos *EaMt* e *EtMt* apresentaram perfis cromatográficos bem similares, possuindo flavonoides e saponinas (**Tabela 8**). Já em *DcMt*, além das classes citadas, também foi identificado tanino. Em *HxMt* observou-se a presença de flavonoides, cumarinas e triterpenos/esteroides. Não foi identificado nos extratos a presença de antraquinonas e alcaloides.

É importante ressaltar que a presença de flavonoides em *DcMt* e *EaMt* é muito marcante, pois a maioria das manchas que aparecem na CCD, ao serem revelados com NP/PEG, se tornam intensamente fluorescentes em 254 e 365 nm, característica de flavonoides.

Tabela 8 – Classe de metabólitos secundários presentes nos quatro diferentes extratos de folhas de *Maclura tinctoria*.

Classes	Extratos			
	HxMt	DcMt	EaMt	EtMt
Flavonoides	+	+	+	+
Saponinas	-	+	+	+
Cumarinas	+	-	-	-
Antraquinona	-	-	-	-
Triterpenos/esteroides	+	-	-	-
Taninos	-	+	-	-
Alcaloides	-	-	-	-

Além disso, foi realizada a comparação do perfil fitoquímico entre extrato bruto e a fração ativa produzida por Almeida (2017) por CCD para verificar qual dentre os quatro extratos produzidos no presente trabalho (HxMt, DcMt, EaMt e EtMt) apresentava maior similaridade às amostras de *M. tinctoria* anteriormente detectadas como bioativas (Almeida, 2017). O revelador utilizado foi o NP/PEG, específico para flavonoides que intensifica a fluorescência na luz UV₂₅₄ e UV₃₆₅, com cores que podem variar de amarela, azul ou verde.

5.4.2. *Fingerprint* por HPLC dos extratos

Os perfis cromatográficos dos extratos foram analisados empregando como parâmetros o tempo de retenção e a intensidade dos picos como mostram os cromatogramas apresentados abaixo (**Figura 10**). Foi selecionado o comprimento de onda de 264 nm devido à melhor apresentação e intensidade dos picos.

O *fingerprint* de DcMt se mostrou extremamente similar ao da fração ativa do trabalho anterior (Almeida, 2017), havendo variação dos tempos de retenção em decorrência a variação das condições cromatográficas empregadas. Este resultado corrobora com a CCD citada anteriormente. Diante do mesmo perfil, foi possível

confirmar a presença dos compostos bioativos nesse extrato. A partir disso, selecionou-se DcMt para o fracionamento. A **Figura 11** traz com mais detalhes o *fingerprint* de DcMt e os respectivos espectros no UV dos picos.

Dentre os quatro extratos produzidos, DcMt além de ter apresentado menor IC₅₀ foi o que apresentou impressão digital química mais similar à fração ativa de Almeida (2017). Essas características aliadas ao fato de ter apresentado maior rendimento entre os extratos obtidos foram decisivas para a seleção de DcMt para a continuidade do estudo de fracionamento biomonitorado.

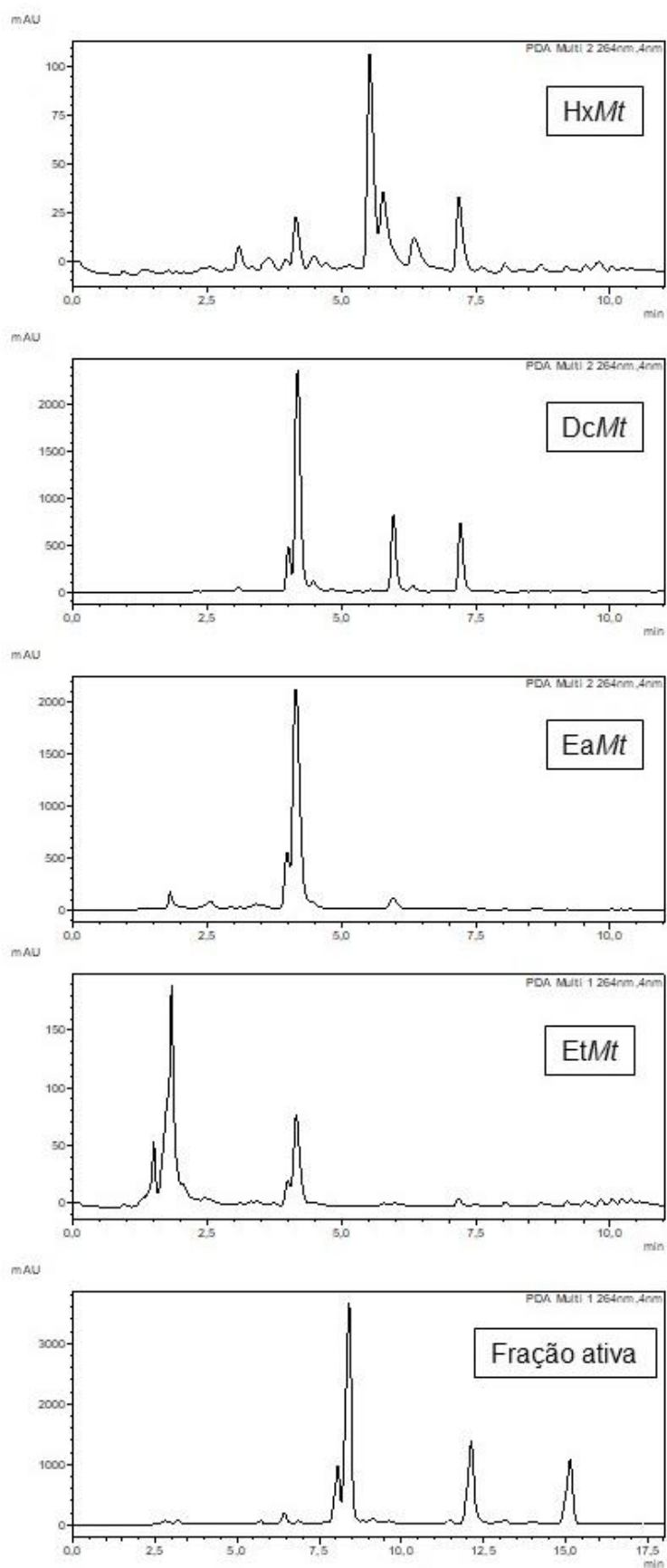


Figura 10 – Fingerprint dos extratos HxMt, DcMt, EaMt e EtMt em HPLC-DAD Shimadzu Prominence em 264 nm. ** Fração ativa obtida no trabalho de Almeida (2017).

mAU

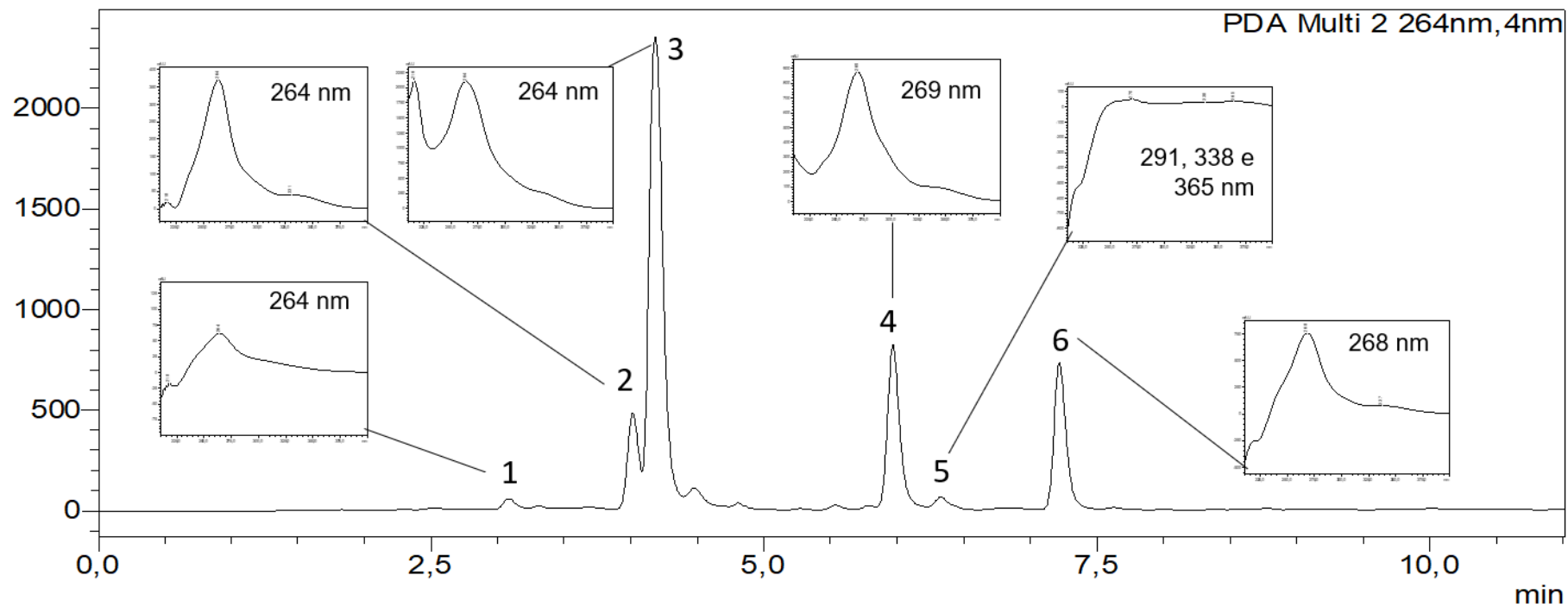


Figura 11– Fingerprint de DcMt em 264 nm com detalhes do espectro no UV para os principais picos eluídos no cromatograma

5.4.3 Análise do extrato ativo por FIA-ESI-IT-MSⁿ

Primeiramente foi realizada para o extrato uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa *m/z* estabelecida. A **Figura 12** mostra o espectro de massas em *full-scan* apresentando os íons moleculares correspondentes as moléculas protonadas $[M+H]^+$ (A) e desprotonadas $[M-H]^-$ (B) obtidos da infusão do extrato *DcMt*.

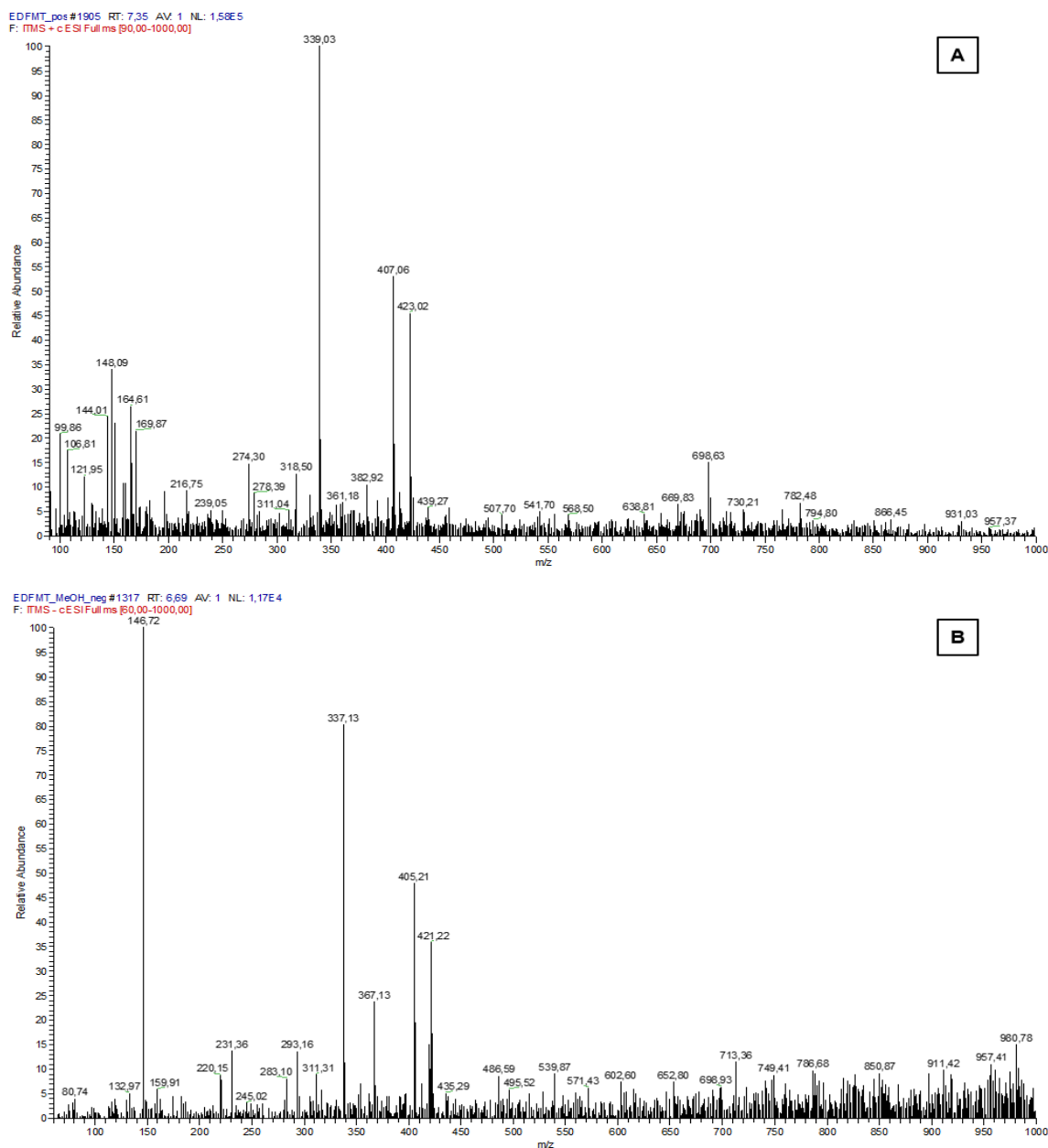


Figura 12 - Espectros de massas em modo *full-scan* do extrato ativo de *Maclura tinctoria* (*DcMt*), em modos: (A) positivo e (B) negativo.

A **Figura 13** mostra um padrão de fragmentação MS2, com perda de um fragmento de 56 u, indicativo da clivagem de um radical prenila ligado à aglicona, que foi recorrente para os compostos identificados no presente trabalho.

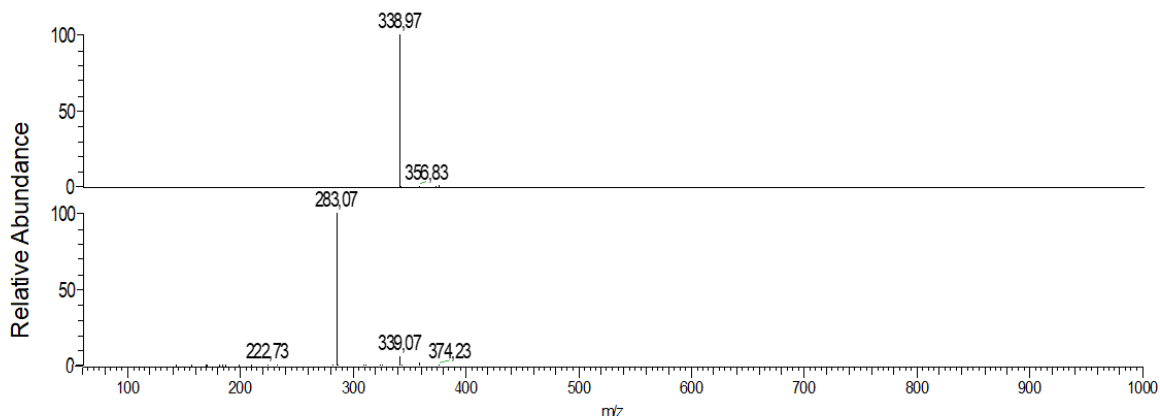


Figura 13 - Espectros de massas MS2 do íon precursor de m/z 339, obtido em modo positivo, com energia de colisão de 30%.

A **Tabela 9** sumariza os principais íons moleculares e íons produtos observados durante as análises por FIA-ESI-IT-MSⁿ de *DcMt*, com a proposta de identificação.

Tabela 9 - Flavonoides identificados no extrato em diclorometano de *Maclura tinctoria* (*DcMt*) por FIA-ESI-IT-MSⁿ (modos negativo e positivo).

Composto (MW)	[M+H] ⁺ (m/z)	Fragmentos MS/MS ⁺ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmentos MS/MS ⁻ (m/z)	Composto proposto
338	339	283 [M+H-56] ⁺ ; 165	337		Flavonoide prenilado
354	355	337 [M+H-18] ⁺ ; 299 [M+H-56] ⁺ ; 165			Flavonoide prenilado
368	-		367	352 [M-H-15] ⁻ ; 309 [M-H-56] ⁻	Flavonoide prenilado
406	407	351 [M+H-56] ⁺ ; 295 [M+H-56-56] ⁺	405		Flavonoide diprenilado
422	423	367 [M+H-56] ⁺ ; 311 [M+H-56-56] ⁺	421		Flavonoide diprenilado

5.4.4. Quantificação de flavonoides totais

O cálculo para o teor de flavonoides foi realizado de acordo com a curva de calibração usando rutina como padrão, mostrada na **Figura 14**. *DcMt* apresentou $431 \pm 8,12$ mg de flavonoides, expressos em rutina, para cada grama de extrato seco.

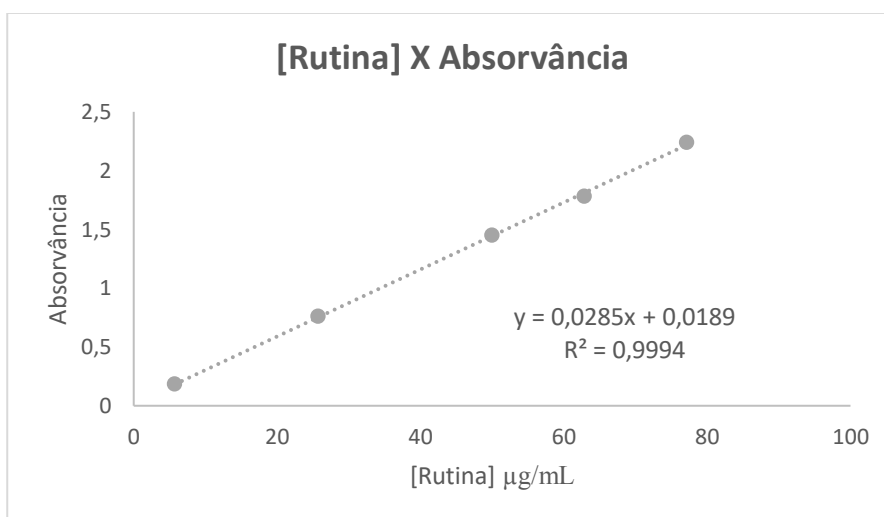


Figura 14 - Curva analítica padrão com rutina para quantificação de flavonoides.

Dessa forma, é possível afirmar que o teor de flavonoides no extrato *DcMt* é de 43%, evidenciando um enriquecimento dessa classe de compostos ao realizar um prévio desengorduramento com hexano e posterior extração com diclorometano. O estabelecimento dessa marcha de extração pode auxiliar em futuras pesquisas visando a obtenção de flavonoides prenilados purificados a partir das folhas de *M. tinctoria*. Levando em consideração todo o procedimento de extração empregado no presente trabalho, foi possível calcular a concentração dos flavonoides prenilados presentes em *DcMt* em relação a droga vegetal, sendo aproximadamente de 1,5%. É certo que este valor encontra-se subestimado, uma vez que foi possível verificar pelo perfil fitoquímico obtido por HPLC, a presença de alguns desses flavonoides em outros extratos obtidos da planta.

5.5. Fracionamento e purificação de compostos a partir do extrato ativo

O extrato *DcMt* foi selecionado para o fracionamento por se apresentar com maior atividade antimicrobiana. Pelo perfil cromatográfico observou-se também

similaridade com a fração ativa de *M. tinctoria* obtida por Almeida (2017). Todo o processo de fracionamento e purificação está resumido na **Figura 15**.

O fracionamento cromatográfico do extrato DcMt em coluna de sílica gel, resultou em 553 frações (FMt_1 à FMt_553) que foram agrupadas de acordo com os perfis em CCD em 30 grupos de frações (GMt_1 à GMt_30). Os 30 grupos foram submetidos à uma análise por CCD de forma a monitorar a presença de flavonoides, empregando como revelador o reagente NP/PEG. Os grupos que apresentaram resultados positivos para a presença de flavonoides foram GMt_6, GMt_8, GMt_12, GMt_16 à GMt_20, GMt_24, GMt_26, GMt_29 e GMt_30.

O **Apêndice A** mostra os *fingerprints* dos grupos citados. A partir desse resultado, foi realizada uma comparação entre os tempos de retenção e espectros no UV dos picos presentes nos grupos com os apresentados em DcMt (**Figura 11**).

Após a análise dos cromatogramas, selecionaram-se GMt_6, GMt_8, GMt_16, GMt_19 e GMt_20 para a purificação por HPLC semi-preparativo. A partir das coletas dos picos, foi possível isolar de GMt_6, o composto referente ao pico 5 (CMt_5). De GMt_16, foi possível isolar os compostos 1, 3 e 4 (CMt_1, CMt_3 e CMt_4). De GMt_17, isolou-se o composto 2 (CMt_2), como mostra a **Figura 15**.

O **Apêndice B** traz o *fingerprint* dos picos coletados em GMt_6, GMt_16 e GMt_17. A partir desses cromatogramas, foi possível confirmar a eficiência de separação pela técnica de HPLC semi preparativo.

Folhas secas de *M. tinctoria* (550 g)

1. Percolação exaustiva seriada com Diclorometano, Acetato de etila e Etanol.
2. Liofilização

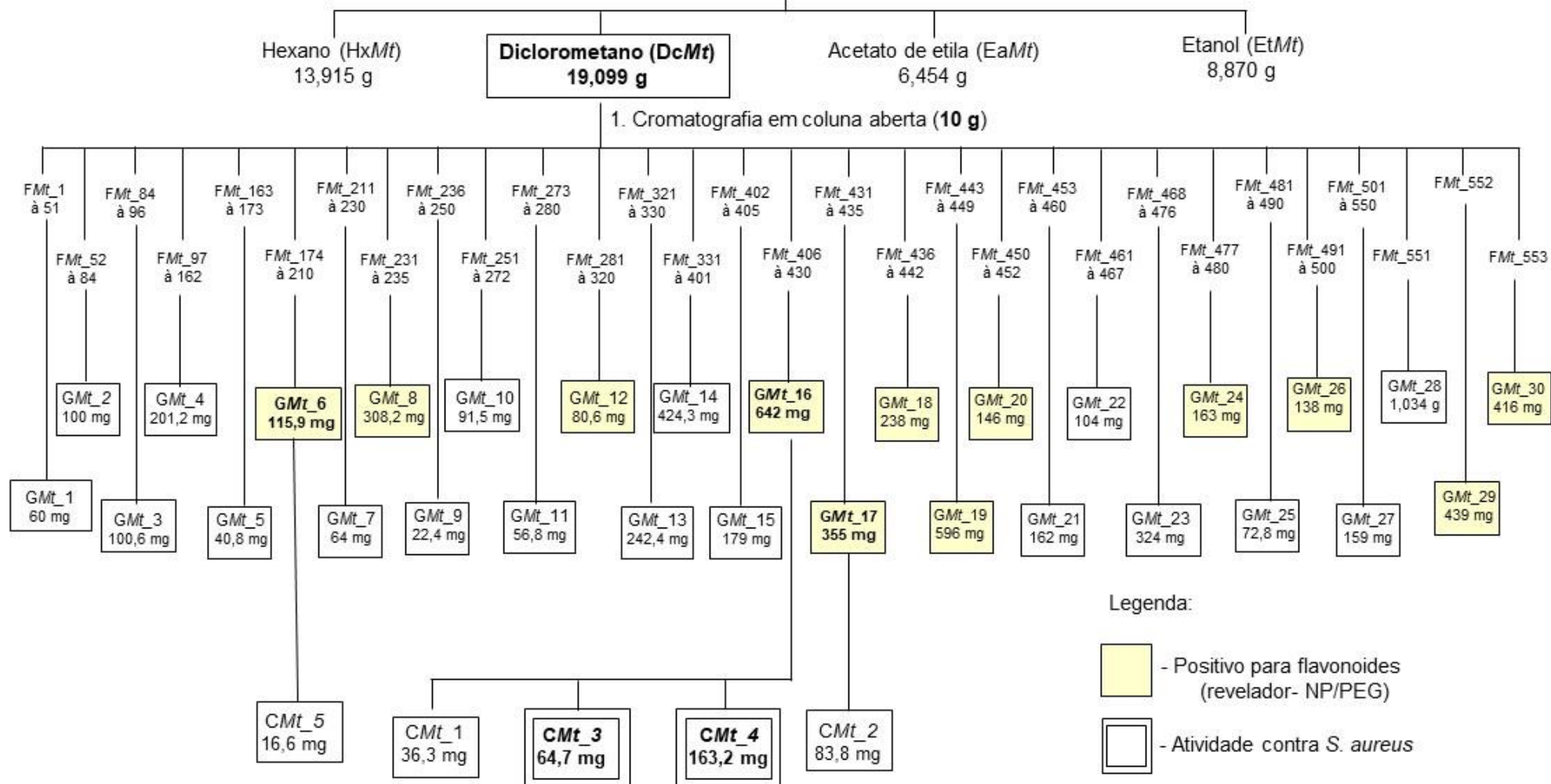


Figura 15 – Etapas do estudo fitoquímico biomonitorado para atividade antimicrobiana de folhas de *Maclura tinctoria*

5.6. Dados físico-químicos das substâncias isoladas do extrato ativo de *M. tinctoria*

- *Isoflavona (CMT-1)*

Elucidação estrutural em andamento

Fórmula molecular: C₂₀H₁₈O₅

Massa molecular: 422 g/mol

Aspecto: substância amorfa, amarela.

ESI-MS m/z (modo positivo, intensidade relativa): 423 [M+H]⁺, 367 [M+H-56]⁺, 311 [M+H-56-56]⁺

UV λ_{max} nm, (MeOH, DAD): 264;

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): -

RMN ¹³C e DEPT135 (100 MHz, CD₃OD): -

- 5,7,4'-trihidroxi-8-[3''-metilbut-2''-enil]-isoflavona (C*Mt*-2, lupiwighteona)

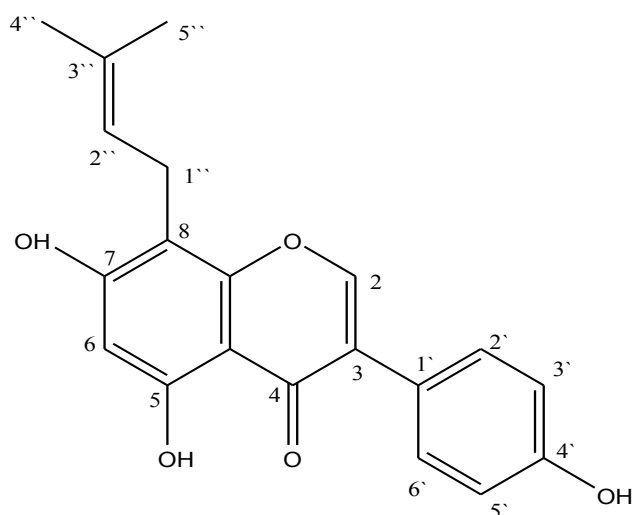


Figura 16 – Estrutura química da lupiwighteona (C*Mt*_2) isolada de Dc*Mt*.

Fórmula molecular: C₂₀H₁₈O₅

Massa molecular: 338 g/mol

Aspecto: substância amorfa, amarelada

ESIMS m/z (modo positivo): 339 [M+H]⁺, 283 [M+H-56]⁺.

UV λ_{max} nm, (DAD, MeOH): 264;

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 5,24 (1H, dd, J= ?Hz, H-2''),

RMN ¹³C e DEPT135 (100 MHz, CD₃OD): δ 152,9 (C-2, CH); 122,1 (C-3, C); 181,4 (C-4, C); 159,6 (C-5, C); 98,8 (C-6, CH); 161,8 (C-7, C); 105,4 (C-8, C); 155,5 (C-9, C); 107,0 (C-10, C); 123,2 (C-1', C); 130,2 (C-2' e C-6', CH); 115,5 (C-3' e C-5', CH); 157,09 (C-4', C); 21,4 (C-1'', CH₂); 122,0 (C-2'', CH); 132,0 (C-3''), 17,6 (C-4'', CH₃); 25,6 (C-5'', CH₃).

- 5,7,4'-trihidroxi-6-[3''-metilbut-2''-enil]-isoflavona (**CMt-3, wighteona**)

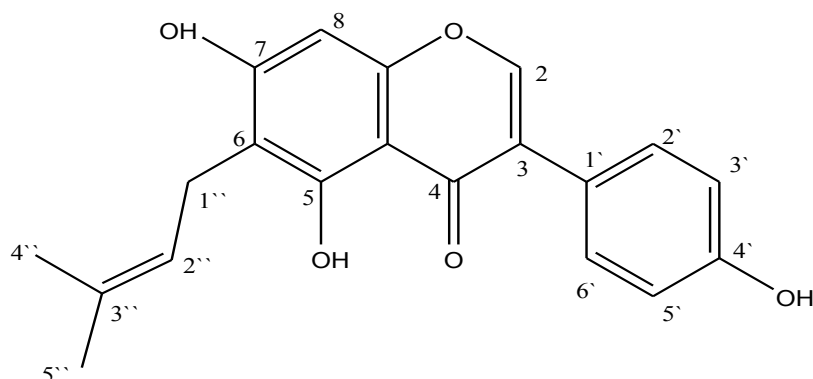


Figura 17 - Estrutura química da Wighteona (CMt_3) isolada de DcMt.

Fórmula molecular: C₂₀H₁₈O₅

Massa molecular: 338 g/mol

Aspecto: substância amorfa, amarelada

ESIMS m/z (modo positivo): 339 [M+H]⁺, 283 [M+H-56]⁺.

UV λ_{max} nm, (DAD): 264;

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 5,27 (1H, H-2''), 3,36 (2H, dd, H-1'').

RMN ¹³C e DEPT135 (100 MHz, CD₃OD): δ 152,4 (C-2, CH); 122,2 (C-3, C); 181,0 (C-4, C); 159,2 (C-5, C); 112,0 (C-6, C); 162,1 (C-7, C); 93,2 (C-8, CH); 156,1 (C-9, C); 105,3 (C-10, C); 123,5 (C-1', C); 130,2 (C-2' e C-6', CH), 115,5 (C-3' e C-5', CH), 157,0 (C-4'), 21,4 (C-1'', CH₂); 122,0 (C-2'', C); 132,1 (C-3'', C); 17,7 (C-4'', CH₃); 25,7 (C-5'', CH₃).

- 5,7,3',4'-tetraidroxi-6-[3''-metilbut-2''-enil]-2'-[3'''-metilbut-2''-enil]-isoflavona (CMt-4)

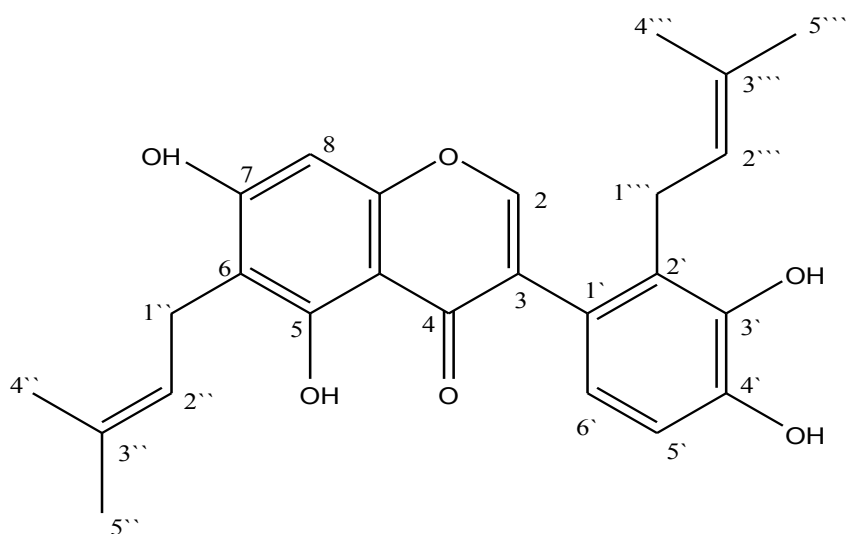


Figura 18 – Estrutura da isoflavona CMt₄ isolada de DcMt.

Fórmula molecular: C₂₅H₂₆O₅

Massa molecular: 406 g/mol

Aspecto: substância amorfa, amarelada

ESIMS m/z (modo positivo): 407 [M+H]⁺, 351 [M+H-56]⁺, 295 [M+H-56-56]⁺.

UV λ_{max} nm, (DAD): 269.

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,75 (1H, H-2), 6,84 (1H, H-2''), 6,67 (2H, H-5' e H-6'), 5,09 (2H, H-2'', H-2'''), 3,32 (4H, H-1''a, H-1''b; H-1'''a, H-1'''b).

RMN ¹³C e DEPT135 (100 MHz, CD₃OD): δ 153,3 (C-2, CH); 123,4 (C-3, C); 181,7 (C-4, C); 157,3 (C-5, C); 110,5 (C-6, C); 159,9 (C-7, C); 105,5 (C-8, C); 153,5 (C-9, C); 105,7 (C-10, C); 122,7' (C-1', C); 121,3 (C-2', CH); 144,0 (C-3', C); 144,7 (C-4', C); 115,5 (C-5', CH); 116,4 (C-6', CH); 21,7 (C-1'' e C-1''', CH₂); 121,2 (C-2'' e C-2''', CH), 135,5 (C-3'', C); 25,8 (C-4'', CH₃); 17,9 (C-5'', CH₃); 134,4 (C-3''', CH); 26,0 (C-4''', CH₃); 18,0 (C-5''', CH₃).

- 3,5,4'-trihidroxi-6-[3''-metilbut-2''-enil]-7-metoxi-flavonol (**CMt-5**)

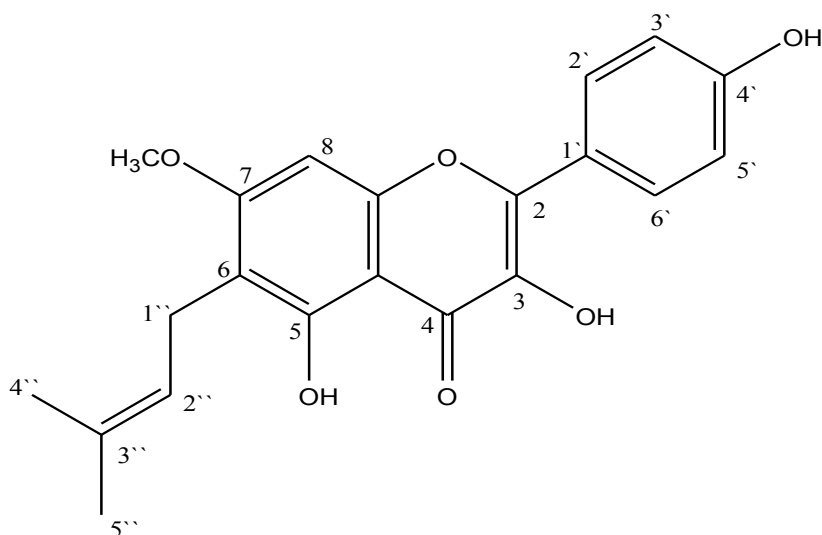


Figura 19 – Estrutura do flavonol **CMt₅** isolado de *DcMt*.

Fórmula molecular: C₂₁H₂₀O₅

Massa molecular: 368 g/mol

Aspecto: substância amorfa, amarela

ESIMS m/z (modo negativo): 367 [M-H]⁻, 352 [M-H-15 (CH₃)]⁻, 309 [M+H-56]⁻.

UV λ_{max} nm, (DAD): 291, 338, 365.

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 5,15 (1H, H-2''), 3,36 (2H, dd, H-1'')

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD): δ 145,5 (C-2, C); 135,4 (C-3, C); 175,2 (C-4, C); 157,7 (C-5, C); 109,5 (C-6, C); 161,6 (C-7, C); 94,2 (C-8, CH); 155,0 (C-9, C); 103,5 (C-10, C); 123,3 (C-1', C); 129,4 (C-2' e C-6', CH); 114,0 (C-3' e C-5', CH); 161,0 (C-4', C); 21,5 (C-1'', CH₂); 121,2 (C-2'', CH); 135,8 (C-3''), 18,0 (C-4''), 25,9 (C-5''), 55,4 (OCH₃).

5.7. Concentração inibitória mínima frente à *S. aureus* dos compostos puros

A **Tabela 10** traz os resultados de CIM para os compostos isolados de *DcMt*. Observa-se que *CMt_1*, *CMt_2* e *CMt_5*, não inibiram o crescimento bacteriano na maior concentração testada (100 µg/mL). *CMt_3* e *CMt_4* apresentaram uma forte atividade antibacteriana, reduzindo a CIM em 6,45 e 1,6 vezes, respectivamente. Portanto, é possível afirmar que os compostos responsáveis pela atividade antibacteriana do extrato são *CMt_3* e *CMt_4*.

Tabela 10 - Concentração inibitória mínima frente à *S. aureus* do extrato diclorometânico de *Maclura tinctoria* e dos compostos isolados

Amostra	CIM (µg/mL)
<i>DcMt</i>	20
<i>CMt_1</i>	>100
<i>CMt_2</i>	>100
<i>CMt_3</i>	3,1
<i>CMt_4</i>	12,5
<i>CMt_5</i>	>100

6. DISCUSSÃO

6.1 Atividade antimicrobiana dos extratos de *Maclura tinctoria*

No presente trabalho, foram utilizados quatro solventes extratores com diferentes polaridades objetivando extrair separadamente uma maior variedade possível de compostos. Dessa forma, cada solvente extraiu compostos com polaridades diferentes, proporcionando uma prévia separação de acordo com essa propriedade físico-química. O extrato que apresentou maior rendimento foi o produzido a partir de diclorometano (*DcMt*). Este fato pode ser justificado pela polaridade intermediária desse solvente que é capaz de extrair compostos com características anfipáticas ou polaridades medianas.

A obtenção de extratos de diferentes polaridades a partir das folhas de *M. tinctoria* com subsequente fracionamento cromatográfico, seguida de sua avaliação da atividade antimicrobiana, contribuíram para atribuição dos compostos bioativos presentes na planta. Assim, nesse trabalho, realizou-se o estudo do potencial antimicrobiano de diferentes extratos da espécie *M. tinctoria*, bem como, de seus compostos isolados.

Com relação a atividade antibacteriana dos extratos obtidos de *M. tinctoria*, *DcMt* e *EaMt* se destacaram com CIM de 20 µg/mL para as três bactérias gram positivas do gênero *Staphylococcus* testadas. De acordo com Lamounier e colaboradores (2012), extratos brutos de plantas com CIM abaixo de 1000 µg/mL são considerados relevantes e extratos com CIM abaixo de 100 µg/mL são considerados agentes antimicrobianos altamente promissores. No estudo de Almeida (2017), foi realizada a avaliação do efeito da fração ativa sobre *S. aureus* e foi verificado que a mesma possuía ação bactericida. Esse efeito é capaz de eliminar o microrganismo em maior velocidade, através da morte celular. Dessa forma, diminui a possibilidade de propagação da infecção e o surgimento de patógenos resistentes quando se compara com os bacteriostáticos (French, 2006).

Na literatura científica, já foi reportada atividade antibacteriana de extratos orgânicos da casca de *M. tinctoria* sobre *Streptococcus mutans*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* e *Actinomyces naeslundii* com CIM variando de 20 à 80 µg/mL (Lamounier et al., 2012). De acordo com o estudo desenvolvido por Alvaro e colaboradores (2015), o extrato etanólico de folhas de *M. tinctoria* também apresentou atividade contra as bactérias *S. mutans* e *P. gingivalis* com CIM de 120 e 500 µg/mL, respectivamente.

Para as bactérias gram negativas, *E. coli* e *P. aeruginosa*, os extratos não apresentaram atividade relevante, com CIM acima de 5.000 µg/mL. Essas bactérias possuem uma menor sensibilidade a variados agentes antimicrobianos devido à suas diferenças morfológicas, em especial, a presença de uma segunda membrana formada por lipopolissacarídeos. Essas estruturas formam uma barreira mecânica, que retarda a passagem de moléculas com características hidrofóbicas e impedem a entrada de moléculas hidrofílicas, sendo esse o provável motivo pela ausência de atividade dos extratos testados (Huwaitat et al., 2016; Silver, 2016).

As doenças infecciosas apresentam um grave problema mundial e são uma das principais causas de mortalidade no mundo (Organização Mundial da Saúde, 1998). Apesar dos avanços na medicina, as infecções causadas por fungos são cada vez mais reconhecidas como uma ameaça emergente à saúde pública. Nos últimos anos, observou-se o aumento na ocorrência de infecções fúngicas e isso deve-se ao crescimento da população imunocomprometida, como pacientes transplantados, com câncer e pacientes com HIV. Além disso, existe o quadro de resistência associada aos efeitos colaterais dos antifúngicos já conhecidos, que dificulta mais o tratamento e gera uma grande demanda para novos agentes antifúngicos no mercado (Aqil et al., 2010). No presente trabalho, potencial antifúngico dos quatro extratos produzidos a partir da espécie *M. tinctoria* foi investigado contra quatro leveduras patogênicas do gênero *Candida* para os.

Segundo Lamounier e colaboradores (2012), considera-se relevante CIM abaixo de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e altamente promissor abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$. Logo, para as leveduras, pode-se considerar *DcMt* e *EaMt*, extratos relevantes quando se estuda a ação antifúngica dos mesmos para *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Já para *C. buinensis*, *DcMt* se mostrou fortemente promissor com CIM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$. Todos os extratos apresentaram efeito fungicida quando plaqueados. Esse resultado é favorável quando se compara à compostos fungistáticos para futuras aplicações, porque a ação fungistática pode colaborar com o surgimento da resistência microbiana (Thevissen et al., 2007).

Um estudo realizado na Índia com 135 extratos diferentes, oriundos de 45 espécies de plantas, foram testados frente à 11 espécies de fungos, dentre eles *C. albicans* e a CIM variou entre 1.000 $\mu\text{g/mL}$ à 125 $\mu\text{g/mL}$ (Duraipandiyanm et al., 2011). No presente trabalho, temos resultados de CIM para as quatro leveduras nessa menor concentração, mostrando a importância do resultado obtido para esses microrganismos.

Quando comparamos o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos com antifúngicos, temos que esse último é um mais complexo. Essa complexidade se dá pelo fato de que fungos são organismos eucariotos e muitos alvos moleculares para a terapia são comuns ao ser humano, gerando um risco maior de toxicidade ao hospedeiro (Campoy, 2017). Nesse sentido, realizou-se o estudo de citotoxicidade em células Vero de (fígado de macaco verde africano) para verificar se os extratos seriam

prejudiciais à essa linhagem celular. O IC₅₀ para DcMt foi menor do que o de EaMt, com valores de 57,45 ± 15,05 e 153,1 ± 10,23 µg/mL, respectivamente. De acordo com Graça e colaboradores (2017), para um extrato bruto ser considerado citotóxico o IC₅₀ deve ser menor que 30 µg/mL. Logo, todos os extratos testados estão acima desse valor, não se encaixando no quadro de citotoxicidade. Ademais, extratos brutos são compostos por inúmeros compostos diferentes, portanto, no futuro, se faz necessário a análise da citotoxicidade e da ação antifúngica dos compostos ativos isolados.

6.2. Análise fitoquímica do extrato ativo

A prospecção fitoquímica realizada por Almeida (2017) para o extrato bruto e a fração ativa mostraram que ambos possuíam o mesmo perfil com as seguintes classes de metabólitos secundários: cumarinas, flavonoides, saponinas, taninos e triterpenos/esteroides. No presente trabalho, observamos a presença das mesmas classes de metabólitos na espécie *M. tinctoria*, entretanto, devido ao modo seriado de extração, as classes se dividiram entre os quatro diferentes extratos. Os compostos se separaram de acordo com a polaridade de cada solvente empregado na extração, os mais apolares se concentraram em HxMt, de polaridade intermediária em DcMt e EaMt, sendo que os mais polares ficaram em EtMt.

Foi analisado o perfil cromatográfico dos extratos por CCD utilizando dois diferentes reveladores: ácido sulfúrico 50% e NP/PEG. O primeiro foi utilizado por ser um revelador inespecífico e o segundo por ser um revelador específico para flavonoides. O perfil cromatográfico do extrato DcMt, foi o que mais se assimilou ao perfil da fração ativa obtida por Almeida (2017), indicando a presença majoritária de uma mistura de compostos identificados como flavonoides.

O perfil cromatográfico por HPLC-DAD foi realizado na faixa de comprimento de onda de 200 à 400 nm. Os flavonoides possuem bandas de absorção características, uma com um máximo de absorção entre 240-285 nm e outra entre 300-550 nm, sendo que a primeira é referente ao anel A e a segunda ao anel B (Ássimos, 2014). É possível observar através do *fingerprint* (**Figura 10**) a diferença entre os perfis de compostos de cada extrato. Mais uma vez observa-se a diferença de polaridade dos compostos extraídos por cada solvente. Em HxMt, os compostos

possuem maior tempo de retenção, possuindo características mais apolares. Já DcMt possui compostos com um tempo de retenção menor quando comparado à HxMt, e assim sucessivamente.

O *fingerprint* de DcMt se mostrou extremamente semelhante à fração ativa de Almeida (2017), corroborando com a análise por CCD. Os espectros no UV dos picos se mostraram dentro das características relacionadas à flavonoides (**Figura 11**). Por conseguinte, o mesmo foi selecionado para o fracionamento.

Dependendo da subclasse de flavonoides o espectro no UV pode apresentar variação do seu perfil. Assim, para flavonas e flavonóis o espectro na região UV obtido em solução metanólica apresenta comumente duas principais bandas de absorção caracterizadas pela Banda I (região de 300 a 380 nm) referente a absorção do sistema cinamoíla e pela Banda II (região de 240 a 280 nm) envolvendo a absorção do sistema benzoíla como mostra a **Figura 20** (Mabry et al., 1970).

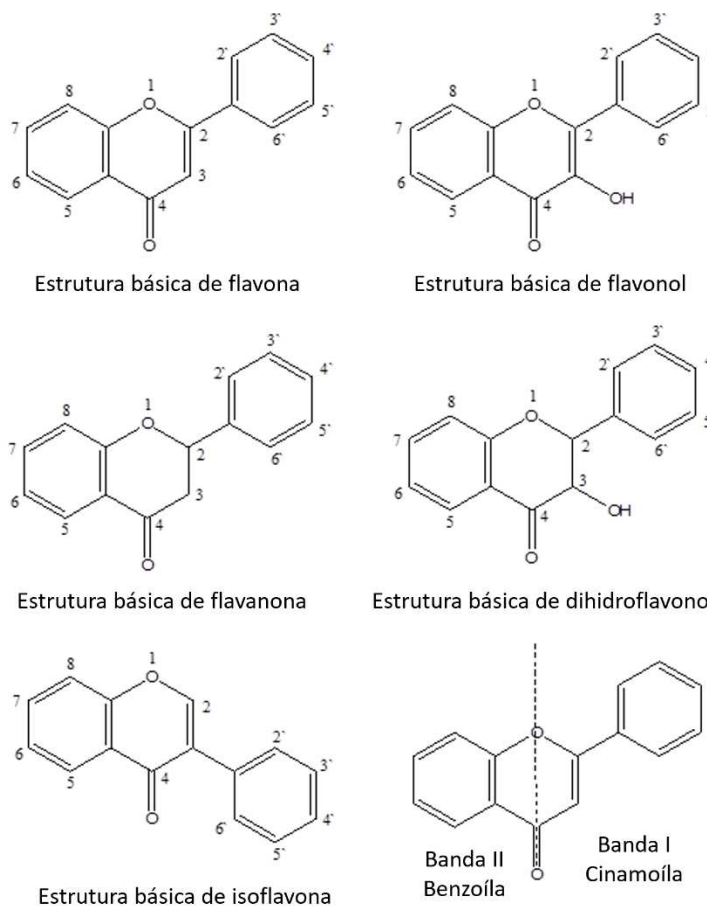


Figura 20 - Esqueletos estruturais básicos de classes de flavonoides.

Já as isoflavonas, flavanonas e dihidroflavonois, como não apresentam conjugação entre os anéis A e B, apresentam perfil similar entre seus espectros no UV, se diferenciando dos perfis de flavonas e flavonóis. No caso de isoflavonas, a absorção da Banda II usualmente ocorre na região de 245 a 270 nm, podendo haver pouca variação na região de absorção de acordo com o grau de hidroxilação, sendo 5,7-dihidroxiisoflavona (259 nm), 5,7,4'-trihidroxiisoflavona (261 nm) e 5,7,3',4'-tetrahidroxiisoflavona (262 nm).

Assim, pelos espectros de UV/DAD referentes aos picos obtidos pelo *fingerprint* de *DcMt*, observa-se que apenas o composto referente ao pico 5 apresenta espectro com absorções referentes às Bandas I e II, levando a suspeita de tratar-se de flavona ou flavonol. Já para os demais picos, o perfil do espectro no UV é característico de isoflavona ou de dihidroflavonol.

A obtenção de perfil fitoquímico de extratos vegetais empregando análises por MS usando inserção direta da amostra (FIA) tem como vantagem um resultado mais representativo sobre a composição química de uma determinada matriz.

Os espectros MS2 dos íons referentes a flavonoides, em modos positivo e negativo, apresentaram predominância de íons produtos com perda neutra de 56 unidades, $[M+H-56]^+$ e $[M-H-56]^-$, respectivamente. O fragmento referente a perda de 56 unidades foi o íon mais abundante em MS2 nos espectros dos compostos referentes a massas moleculares 338, 354, 368, 406 e 422. A perda de 56 u foi atribuída a clivagem de um fragmento neutro C_4H_8 , característico de grupos prenilas em flavonoides, como demonstrado na **Tabela 9**. No caso dos íons moleculares referentes às massas 406 e 422 observaram-se perdas de duas unidades de 56 Da, evidenciando a presença de compostos diprenilados. No entanto, pelos resultados obtidos até então, não foi possível especificar os sítios de ligação dessas unidades preniladas na aglicona dos flavonoides.

As fragmentações de segunda-ordem (MS2) para cada os picos referentes aos íons majoritários observados nos espectros confirmaram a presença de flavonoides. Adicionalmente, foi possível verificar que se tratava de flavonoides prenilados (**Figura 21**).

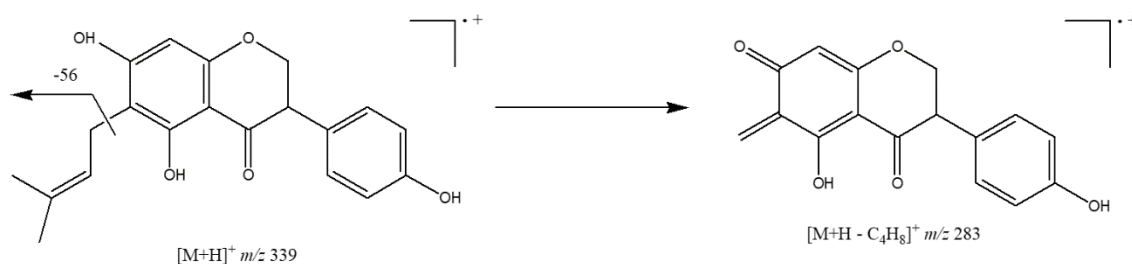


Figura 21 - Íon produto obtido por MS2 pela clivagem de uma unidade penila a partir do flavonoide C-prenilado.

A quantificação de flavonoides pôde mostrar o quão rico é o extrato nessa classe de metabólitos secundários. Os flavonoides correspondem à 43% do extrato seco e à 1,5% dos constituintes da droga vegetal, que são folhas de *M. tinctoria* secas e pulverizadas. Esse último valor está subestimado visto que foram produzidos outros extratos a partir da mesma droga vegetal que, pelos resultados da prospecção fitoquímica, também possuem flavonoides.

Com os resultados de prospecção fitoquímica por CCD, espectrofotometria no ultravioleta, quantificação e de espectrometria de massas foi possível definir que o extrato DcMt é composto majoritariamente por uma mistura de flavonoides prenilados, sendo que a maior parte são derivados de isoflavonas. A identificação inequívoca de cada composto será definida mais adiante neste trabalho após experimentos por ressonância magnética nuclear dos compostos purificados.

6.3. Isolamento e purificação de compostos a partir do extrato ativo de *M. tinctoria*

O fracionamento de DcMt foi realizado por coluna de sílica gel aberta, resultando em 553 frações e ao final, 30 diferentes grupos. Para a purificação dos compostos foram selecionados GMt_6, GMt_8, GMt_16, GMt_19 e GMt_20 de acordo com características observadas em suas impressões digitais (**Apêndice B**), como presença dos compostos majoritários, menor complexidade e boa separação entre os picos. Foi utilizado HPLC semi-preparativo com detector UV para esse processo. O HPLC semi-preparativo é uma tecnologia de separação e purificação de maior rendimento que possui algumas vantagens, tais como: alta resolução, automação, alta

eficiência. Consequentemente, tem sido muito utilizado para a separação e purificação de compostos bioativos de matrizes mais complexas, como extratos de plantas, acelerando o processo de purificação (Zhang et al., 2016).

O perfil cromatográfico de DcMt obtido pelo HPLC/DAD mostrou a presença majoritária de seis compostos flavonônicos neste extrato. No entanto, foram purificados cinco diferentes compostos (C*Mt*_1 à C*Mt*_5), uma vez que não foi possível o isolamento do composto referente ao pico 6. Quatro dos cinco flavonoides foram a princípio indicativo da presença da subclasse isoflavonas, uma vez que seus espectros no UV/DAD apresentaram uma única banda máxima na região de 265 nm. Um quinto flavonoide apresentou espectro no UV indicativo da presença de flavonol ($\lambda_{\text{máx.}}$ 260 e 365 nm). Pela técnica FIA-ESI-IT-MSⁿ foi possível verificar que os flavonoides apresentavam grupo prenila em suas estruturas, variando de uma a duas unidades. A natureza da genina e a posição de ligação do(s) grupo(s) prenila(s) na estrutura pode ser confirmadas pelos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C.

O FIA-ESI-IT-MSⁿ de DcMt forneceu picos referentes aos íons moleculares de *m/z* 337 [M-H]⁻ e *m/z* 339 [M+H]⁺, sendo estes compatíveis com a fórmula molecular C₂₀H₁₈O₅. A presença de fragmentos em ambos os espectros referente a perda de 56 u. é indicativo de clivagem de uma unidade prenila, como demonstrado na **Figura 21**.

Pelos dados de RMN dos compostos isolados verificou-se a presença de dois isômeros de flavonoides prenilados, C*Mt*-2 e C*Mt*-3, ambos de massa molecular 338 g/mol. Seus espectros no UV sugeriram a presença de isoflavona, mostrando absorção máxima em 265 nm. Os espectros de RMN de ¹H apresentam sinais referentes a hidrogênios aromáticos, característico da presença de um sistema AA`BB`, formado por dupletos com *J* cerca de 8,5Hz, em torno de δ 7,3 e 6,9 ppm, atribuídos aos hidrogênios do anel B, oxigenado em C-4`, e correspondentes H-2`, H-6` e H-3, H-5`, respectivamente. Um simpleto observado a δ 7,94 (H-2) confirmou o esqueleto estrutural de isoflavona. Para C*Mt*-2, a presença do grupo 3,3-dimetilalila [δ 1,6 e 1,8 (3H cada, simpleto), 3,4 (2H, multipletto) e 5,2 (1H, multipletto) pode ser detectado. Em adição, experimentos de RMN de ¹³C e DEPT indicaram a presença de 13 sinais referentes ao esqueleto de isoflavona e sinais referentes a um grupo prenila com dois carbonos olefínicos (δ 122,0 e 132,0), dois grupos metílicos (δ 25,6 e 17,6) e um carbono metilênico (δ 21,4).

A localização do grupo 3,3-dimetilalila ao C-8 do anel A pode ser atribuída pelas correlações dos mapas de contorno HMBC, como vista pela correlação de H-2" (δ 5,2) com C-8 (δ 105,4). Com base nos dados acima, a estrutura de *CMt-2* foi identificada como 5,7,4-trihidroxi-8-prenilisoflavona, (lupiwighteona). A lupiwighteona foi isolada de das espécies *Lupinus luteus* e *Glycyrrhiza glabra* (Al-Maharik, Botting, 2003), sendo relatada pela primeira vez para a espécie *M. tinctoria*.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto *CMt-3* mostrou tratar-se de um isômero de posição de *CMt-2*, em que o grupo 3,3-dimetilalila está ligado ao C-6. A confirmação da localização desse grupo foi possível pelos dados de correlações dos mapas de contorno. As correlações de H-2" (δ 5,27) com C-6 (δ 112,0) e de H-1'' (δ 1,79) com C-5 (δ 159,2) confirmaram a posição do grupo prenila. Assim, *CMt-3* foi identificada como 5,7,4-trihidroxi-6-prenilisoflavona, (wighteona), já identificada anteriormente nos frutos de *Maclura tinctoria* (Oyama et al., 2013).

Para *CMt-4* o espectro no UV apresentou banda na região de 269 nm, característico de isoflavona. Os experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C confirmaram o esqueleto estrutural de isoflavona com duas unidades prenilas, cujas localizações foram possíveis após análises de mapas de correlação obtidos por HSQC e HMBC. A presença de um grupo prenila ligado ao C-6 foi confirmada pelas correlações entre H-1'' (δ 3,32) com C-5 (δ 157,3) e entre o H-2'' (δ 5,09) e C-6 (δ 110,5). A posição do segundo grupo prenilado ligado ao C-2' pode ser confirmada pelas correlações entre o H-1''' (δ 3,32) e C-1' (δ 122,7). Estes dados estão de acordo com o pico referente a m/z 406 obtido por FIA-ESI-IT-MSⁿ, que após fragmentações MS2 e MS3 apresentou picos referentes a perda de dois grupos 3,3-dimetilalila, demonstrando tratar-se de um flavonoide diprenilado.

Com base nos dados espectroscópicos, *CMt-4* foi identificado como 5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-[3''-metilbut-2''-enil]-2'-[3'''-metilbut-2''-enil]-isoflavona. Trata-se de uma substância inédita para a espécie *M. tinctoria*.

CMt-5 apresentou espectro no UV indicativo da presença de flavonol com duas bandas de absorção máxima referentes aos cromóforos benzoíla e cinamoíla ($\lambda_{\text{máx}}$. 260 e 365 nm). Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto *CMt-3* confirmou a estrutura de flavonol apresentando também adicionalmente uma unidade prenila e um grupo metoxila. Os sinais referentes ao grupo metoxila pode ser observada em δ 3,7 no espectro de ^1H e em δ 55,4 (^{13}C). a presença do grupo 3,3-dimetilalila [δ 1,6 e 1,7

(3H cada, simpleto), 3,36 (2H, multipeto) e 5,15 (1H, multipeto) pode ser detectado. Os experimentos de HSQC e HMBC auxiliam na localização dos grupos metoxila e prenila. A ligação do grupo metoxila no C-7 pode ser atribuída pela correlação entre δ 3,7 dos prótons da metoxila com δ 161,6 referente ao C-7. Quanto ao grupo prenila foram observadas as correlações entre H-1'' (δ 3,36) com C-6 (δ 109,5) e C-5 (δ 157,8). Esta estrutura química está compatível com o pico de m/z 367 encontrado no experimento obtido por FIA-ESI-IT-MSⁿ, em modo negativo, para o extrato DCMt. Entre as fragmentações obtidas observaram-se as perdas referentes a um grupo CH₃ proveniente da clivagem da metoxila e também uma perda de 56 u. proveniente da clivagem do grupo prenila. Assim, este composto foi identificado como 3,5,4'-trihidroxi-6-[3''-metilbut-2''-enil]-7-metoxi-flavonol. Trata-se de um composto também relatado pela primeira vez na espécie *M. tinctoria*.

Foi comprovada forte atividade antibacteriana contra *S. aureus* dos compostos CMt_3 e CMt_4, com CIM de 3,1 e 12,5 μ g/mL, respectivamente. Quando comparamos esses valores com o do extrato bruto DcMt (20 μ g/mL), observamos uma redução de concentração de aproximadamente 6 vezes para CMt_3 e de 2 vezes para CMt_4.

As isoflavonas são uma subclasse de metabolitos que estão presente nas mais variadas fontes naturais e se diferem dos demais flavonoides pela posição do anel B. Eles se evidenciam de outros flavonoides pela maior variabilidade estrutural, sua presença constante na forma de aglicona e pela maior frequência de possuir um isoprenóide como substituinte (Mukne et al., 2010).

A atividade antimicrobiana de isoflavonas isoladas de plantas é bem documentada. De acordo com Mukne e colaboradores (2011) existe uma relação significativa entre a presença de certos grupos, como o prenil, em posições específicas e a atividade antibacteriana dos compostos. O estudo de Hatano e colaboradores (2000) mostrou que a presença do grupo prenil em C6 contribui significativamente para a atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *S. aureus* resistente a metilina (MRSA, do inglês: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). No entanto, a retirada desse grupamento ou a migração para outra posição contribui significativamente para a redução da atividade. É exatamente essa relação que observamos entre CMt_2, CMt_3 e CMt_4. O primeiro não possui atividade significativa, com CIM maior que 100 μ g/mL, possui a prenila apenas em C8. Em

seguida, temos *CMt_3* que é um isômero de posição de *CMt_2*, com a substituição migrando para C6. Essa mudança reflete significativamente na atividade antibacteriana sendo o composto mais ativo com CIM de 3,1 µg/mL. Em *CMt_4* também observamos o radical prenil em C6, entretanto, há também o mesmo radical em C2'. Essa substituição em C2' contribui significativamente para o aumento do CIM que sobe para 12 µg/mL. Dessa forma, podemos confirmar a relação estrutura-atividade (SAR, do inglês: structure-activity relationship) para as isoflavonas identificadas nesse estudo.

Estudos indicam que o mecanismo de ação dos flavonoides prenilados pode estar relacionado com o aumento da lipofilicidade dos compostos, o que facilita a interação com a membrana celular e contribui para um aumento da afinidade com proteínas (Chen et al., 2010). Acredita-se que a atividade antibacteriana de muitos dos agentes sintéticos e naturais seja mediada via interferência com a topoisomerase bacteriana. Foram identificadas duas topoisomerasas do tipo II bacteriana: topoisomerase IV (topo IV) e DNA girase. Diversos inibidores da DNA girase e/ou da topo IV foram desenvolvidos para uso clínico de antimicrobianos. Antibióticos sintéticos têm como alvo ambas as enzimas, que ao não funcionarem corretamente, afetam a divisão celular e introduzem lesões no DNA intracelular (Mukne et al, 2011).

Ainda de acordo com Mukne e colaboradores (2011), muitas isoflavonas possuem forte atividade contra bactérias gram positivas, incluindo os gêneros *Stafilococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces* e *Lactobacillus*, mas o mesmo não é observado contra bactérias gram negativas, como por exemplo *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Essa afirmação corrobora com os dados apresentados nesse trabalho. Esses resultados sugerem que a diferença morfológica entre as membranas, citadas anteriormente, contribuem de fato para a ausência de atividade.

7. CONCLUSÕES

Esse trabalho demonstrou o forte potencial antimicrobiano *in vitro* da espécie *M. tinctoria*, principalmente dos flavonoides prenilados. Também revelou a relação entre a posição da(s) prenila(s) e a atividade antibacteriana. Diversos estudos podem ser realizados para se obter mais informações sobre o tema, como o teste dos compostos puros contra as leveduras, avaliação da citotoxicidade dos mesmos e

ensaios *in vivo*. Além disso, podem ser realizadas testes para elucidar o mecanismo de ação desses compostos, bem como verificar a possibilidade de sinergismo com outros antibióticos já conhecidos.

8. REFERÊNCIAS

Almeida, A. A. Bioprospecção de produtos naturais antitumorais em coleção de extratos de espécies arbóreas da Mata Atlântica. **Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa-MG, 2015.

Al-Maharik, N., Botting, N.P. Synthesis of lupiwighteone via a para-Claisen-Cope rearrangement. **Tetrahedron**, v. 59, p.4177–81, 2003.

Almeida, A. C. Atividades antibacteriana e antivirulência de extratos de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica sobre *Staphylococcus aureus*. **Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Feral de Viçosa**, Viçosa-MG, 2017

Alvaro, M.; Herrera, A.; D, A. In vitro antibacterial activity of *Maclura tinctoria* and *Azadirachta indica* against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 4, p. 291-298, 2015.

Anderson, J. B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 547, 2005.

Aqil, F. et al. Antifungal activity of medicinal plant extracts and phytochemicals: A review. In: **Combating Fungal Infections**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 449-484, 2010.

Arimura, G.; Kost, C.; Boland, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1734, n. 2, p. 91-111, 2005.

Ássimos, A. A. Avaliação da concentração e dos tipos de flavonóides no própolis, utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração. **Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte-MG, 2014.

Awan, A. R.; Shaw, W. M.; Ellis, T. Biosynthesis of therapeutic natural products using synthetic biology. **Advanced drug delivery reviews**, v. 105, p. 96-106, 2016.

Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibnsouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.

Bolzani, V. D. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 68, n. 1, p. 04-05, 2016.

Blair, J. M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

Brandão, M. G. et al. Influence of Brazilian herbal regulations on the use and conservation of native medicinal plants. **Environmental monitoring and assessment**, v. 164, n. 1-4, p. 369-377, 2010.

Brasil. LEI Nº 13.123, DE 20 DE MAIO DE 2015. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. **Diário Oficial da União**, 20.05.15

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. A convenção sobre diversidade biológica – CDB. Cópia do Decreto Legislativo 2, de 5 de junho de 1992. **Brasília: Ministério do Meio Ambiente**, 2000.

Broekaert, W. F. et al. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69, n. 1-2, p. 55-59, 1990.

Burt, S. Essential oils: the antibacterial properties and potential applications in foods— a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

Cadete, R. M.; Fonseca, C.; Rosa, C. A. Novel yeast strains from Brazilian biodiversity: biotechnological applications in lignocellulose conversion into biofuels. In: **Biofuels in Brazil**. Springer, Cham, p. 255-279, 2014.

Campoy, S.; Adrio, J. L. Antifungals. **Biochemical pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2017..

Chen, X. et al. A systematic review on biological activities of prenylated flavonoids. **Pharmaceutical biology**, v. 52, n. 5, p. 655-660, 2014.

Cioffi, G. et al. Antioxidant Chalcone Glycosides and Flavanones from *Maclura (Chlorophora) tinctoria*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 8, p. 1061-1064, 2003.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standards. **CLSI Doc. M07-A9**. Wayne, PA, 9ed, 2012.

Cragg, G. M.; Newman, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

Dastan, D. et al. New coumarin derivatives from *Ferula pseudalliacea* with antibacterial activity. **Natural product research**, v. 30, n. 24, p. 2747-2753, 2016.

Duraipandiyan, V.; Ignacimuthu, S. Antifungal activity of traditional medicinal plants from Tamil Nadu, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. S204-S215, 2011.

Eggimann, P.; Garbino, J.; Pittet, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 11, p. 685-702, 2003.

Eisenlohr, P. V. et al. Disturbances, elevation, topography and spatial proximity drive vegetation patterns along an altitudinal gradient of a top biodiversity hotspot. **Biodiversity and conservation**, v. 22, n. 12, p. 2767-2783, 2013.

Elsohly, H. N. et al. Antifungal chalcones from *Maclura tinctoria*. **Planta medica**, v. 67, n. 01, p. 87-89, 2001.

El-sohly, H. N. et al. Flavonoids from *Maclura tinctoria*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 1, p. 141-145, 1999.

French, G. L. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections—the potential role of daptomycin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 1107-1117, 2006.

Fundação SOS Mata Atlântica. Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas. **Centro de Ciências Aplicadas à Biodiversidade**, Belo Horizonte, 2005

Gao, J. et al. The ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* and the active compounds induce cell cycle arrest and apoptosis including upregulation of p53 and Bax in human lung cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, n. 3, p. 221-228, 2011.

Genovese, S. et al. Recent developments in the pharmacology of prenylated xanthenes. **Drug discovery today**, v. 21, n. 11, p. 1814-1819, 2016.

Gomes, G. A. C. et al. Plant regeneration from callus cultures of *Maclura tinctoria*, an endangered woody species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 39, n. 3, p. 293-295, 2003.

Gonçalves, A. L.; Alves F. A.; Menezes, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

Graça, V. C. et al. Bio-guided fractionation of extracts of *Geranium robertianum* L.: Relationship between phenolic profile and biological activity. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 543-552, 2017.

Groweiss, A.; Cardellina, J. H.; Boyd, M. R. HIV-Inhibitory Prenylated Xanthenes and Flavones from *Maclura tinctoria*. **Journal of natural products**, v. 63, n. 11, p. 1537-1539, 2000.

Guimarães, D. O.; Momesso, L. S.; Pupo, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

Harvey, A. L.; Edrada-Ebel, R.; Quinn, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111, 2015.

Hatano, T. et al. Phenolic constituents of licorice. VIII. Structures of glicophenone and glicoisoflavanone, and effects of licorice phenolics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, n. 9, p. 1286-1292, 2000.

Huwaitat, R. et al. Potential strategies for the eradication of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Future Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 955-972, 2016.

Joly, C. A.; Metzger, J. P.; Tabarelli, M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological finding sand conservation initiatives. **New Phytologist**, v. 204, n. 3, p. 459-473, 2014.

Kim, G. S. et al. Biological and antibacterial activities of the natural herb *Houttuyni acordata* water extract against the intracellular bacterial pathogen salmonella with in the RAW 264.7 macrophage. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 11, p. 2012-2017, 2008.

Lamounier, K. C. et al. Chemical Analysis and Study of Phenolics, Antioxidant Activity, and Antibacterial Effect of the Wood and Bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2012, 2012.

Leite, J. P. V. et al. Plantas medicinais no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. **MG Biota**, v. 1, n. 4, p. 16-34, 2008.

Lewinsohn, T. M.; Prado, I. P. Síntese do conhecimento atual da biodiversidade brasileira. **Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira**, v. 1, p. 21-109, 2006.

Lin, J. et al. Mechanisms of antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 34, 2015.

Mabry, T.; Markham, K. R.; Thomas, M. B. The systematic identification of flavonoids. **Springer Science & Business Media**, 2012.

Mcchesney, J. D.; Venkataraman, S. K.; Henri, J. T. Plant natural products: back to the future or in to extinction? **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-2022, 2007.

Mccloud, T.G. High through put extraction of plant, marine and fungal specimens for preservation of biologically active molecules. **Molecules**, v. 15, n. 7, p. 4526-4563, 2010

Moloney, M. G. Natural products as a source for novel antibiotics. **Trends in pharmacological sciences**, v. 37, n. 8, p. 689-701, 2016.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

Mukne, A. P.; Viswanathan, V.; Phadatar, A. G. Structure pre-requisites for isoflavones as effective antibacterial agents. **Pharmacognosy reviews**, v. 5, n. 9, p. 13, 2011.

Myers, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

Oliveira-Filho, A. T.; Fontes, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in south eastern Brazil and the influence of Climate. **Biotropica**, v. 32, n. 4b, p. 793-810, 2000.

Passos, X. S. et al. Candida colonization in intensive care unit patients' urine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 925-928, 2005.

Patwardhan, B.; Vaidya, A. D. B; Chorghade, M. Ayurveda and natural products drug discovery. **Current Science-Bangalore**, v. 86, n. 6, p. 789-799, 2004.

Pimentel, V. P. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, n. 43, p. 41-89, 2015.

Pinto, L. P. S. et al. Mata Atlântica: ciência, conservação e políticas. **Workshop científico sobre a Mata Atlântica**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, 1997.

Prado, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009.

Ribeiro, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot. **Biodiversity hotspots**, p. 405-434, 2011.

Rios, J. L.; Recio, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 80-84, 2005.

Roca, I. et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New microbes and new infections**, v. 6, p. 22-29, 2015.

Safdar, A. et al. *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia after high-risk allogeneic marrow transplantation: no adverse effect of low-dose fluconazole prophylaxis on incidence and outcome. **Bone marrow transplantation**, v. 28, n. 9, p. 873, 2001.

Sanglard, D. et al. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 8, p. 2404-2412, 2003.

Sikkema, Jan; DeBont, J. A.; Poolman, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

Silva, J. M. C.; Casteleti, C. H. M. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. **The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook - CABS and Island Press**, p. 43-59, 2003.

Silver, L. L. A Gestalt approach to Gram-negative entry. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 24, p. 6379-6389, 2016.

Smith, J. L.; Perino, J. V. *Osage orange (Maclura pomifera): history and economic uses*. **Economic Botany**, v. 35, n. 1, p. 24-41, 1981.

Soberón, J. R. et al. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 6, p. 1450-1461, 2007.

Thevissen, K. et al. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. **Drug discovery today**, v. 12, n. 21-22, p. 966-971, 2007.

Valli, M. et al. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of natural products**, v. 76, n. 3, p. 439-444, 2013.

Vieira, M. E. B. et al. Isolation, characterization and mechanism of action of an antimicrobial peptide from *Lecythis pisonis* seeds with inhibitory activity against *Candida albicans*. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 47, n. 9, p. 716-729, 2015.

Wagner, Hildebert; Blatt, Sabine. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Springer Science & Business Media, 1996.

Wellington, E. M. H et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 2, p. 155-165, 2013.

Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature protocols**, v. 3, n. 2, p. 163, 2008.

Yang, X. et al. Prenylated flavonoids, promising nutraceuticals with impressive biological activities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 44, n. 1, p. 93-104, 2015.

Zhang, M. et al. Rapid screening, identification, and purification of neuraminidase inhibitors from *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. by ultrafiltration with HPLC–ESI-TOF-MS combined with semipreparative HPLC. **Journal of separation science**, v. 39, n. 11, p. 2097-2104, 2016.

APÊNDICE A

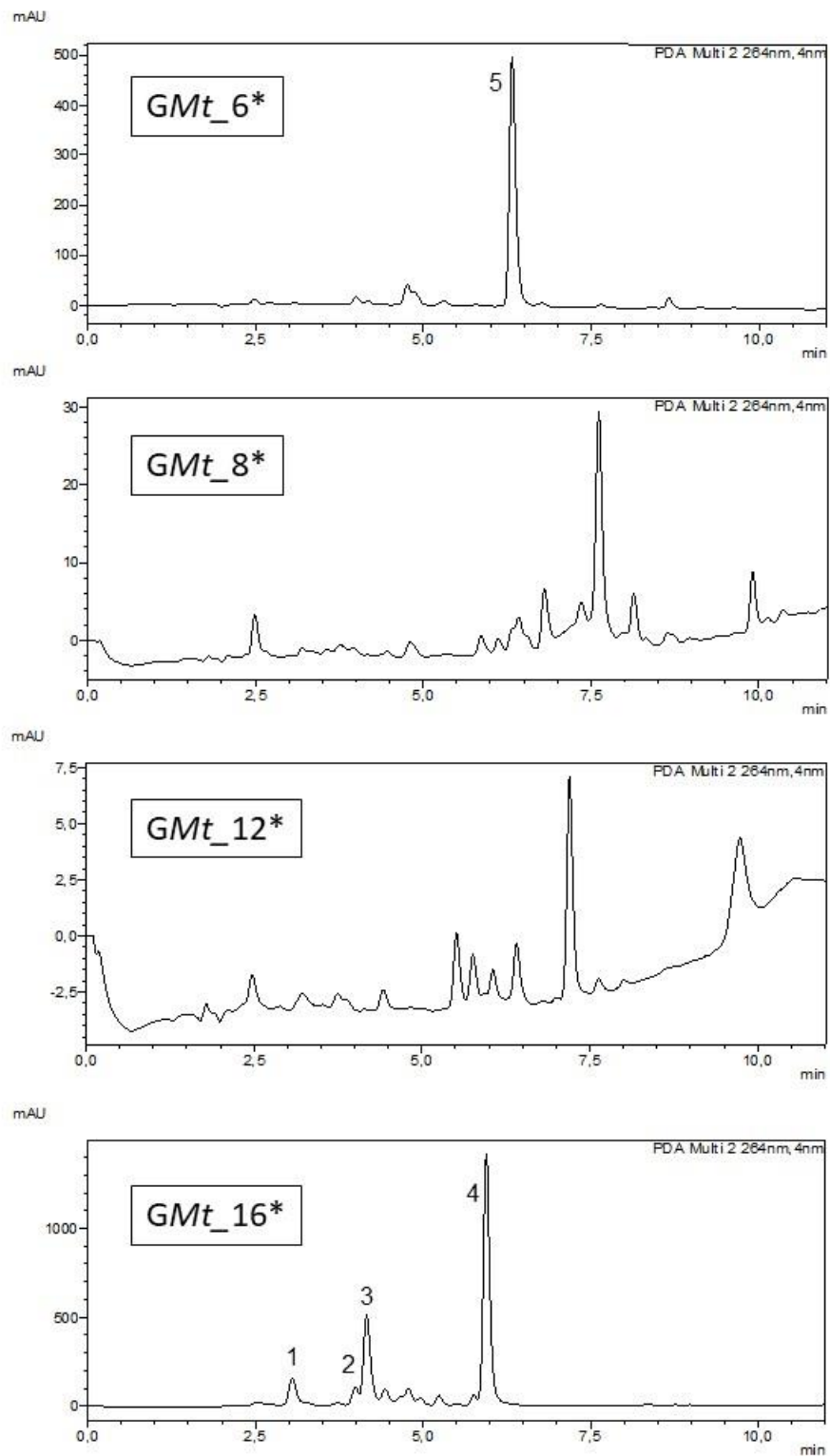


Figura S 1 - *Fingerprint* dos grupos GMt_6, GMt_8, GMt_12 e GMt_16 positivos para flavonoides em CCD. Os picos numerados representam os mesmos identificados em DcMt.

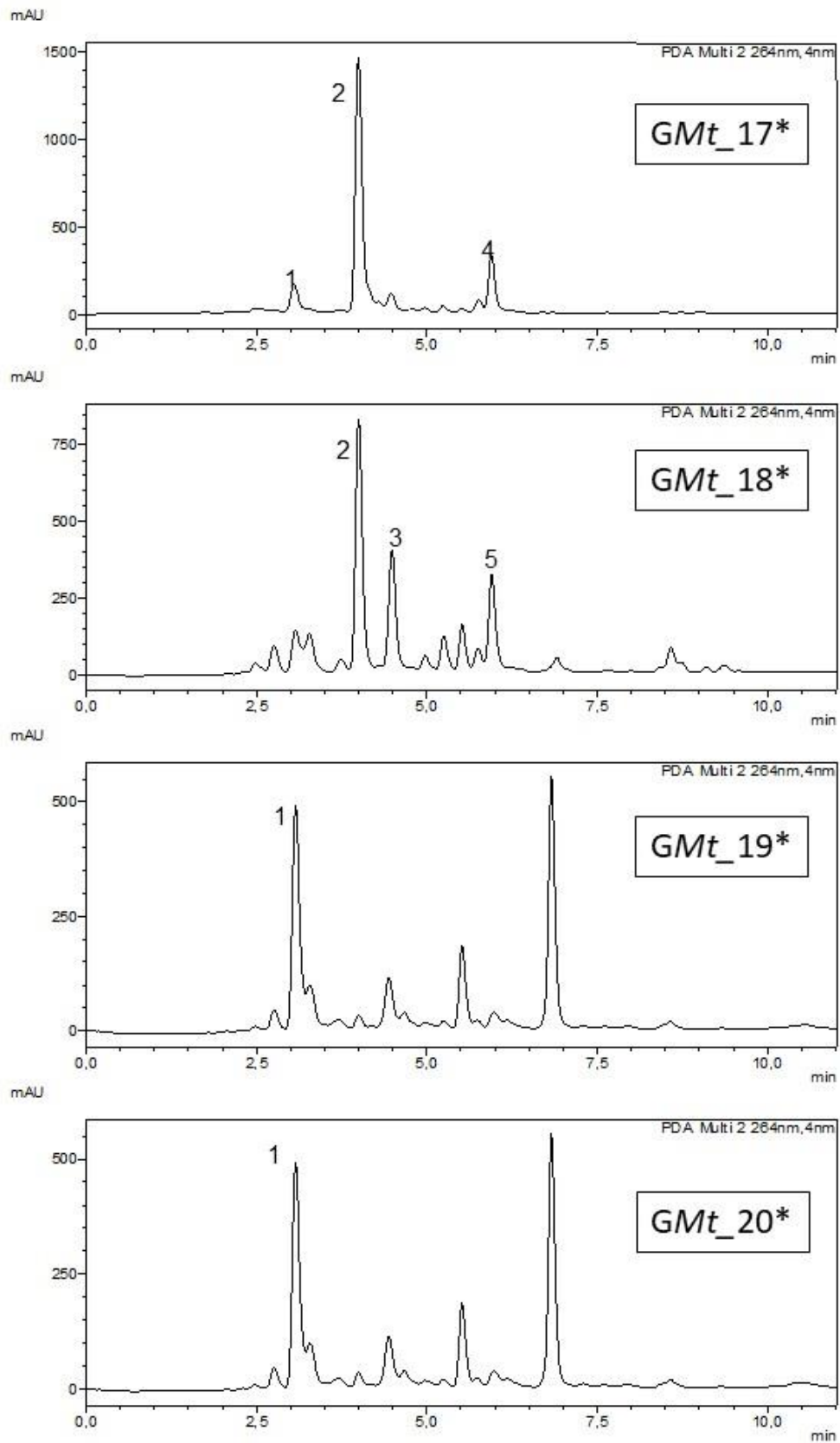


Figura S 2 - Fingerprint dos grupos *GMt_17*, *GMt_18*, *GMt_19* e *GMt_20* positivos para flavonoides em CCD. Os picos numerados representam os mesmos identificados em *DcMt*.

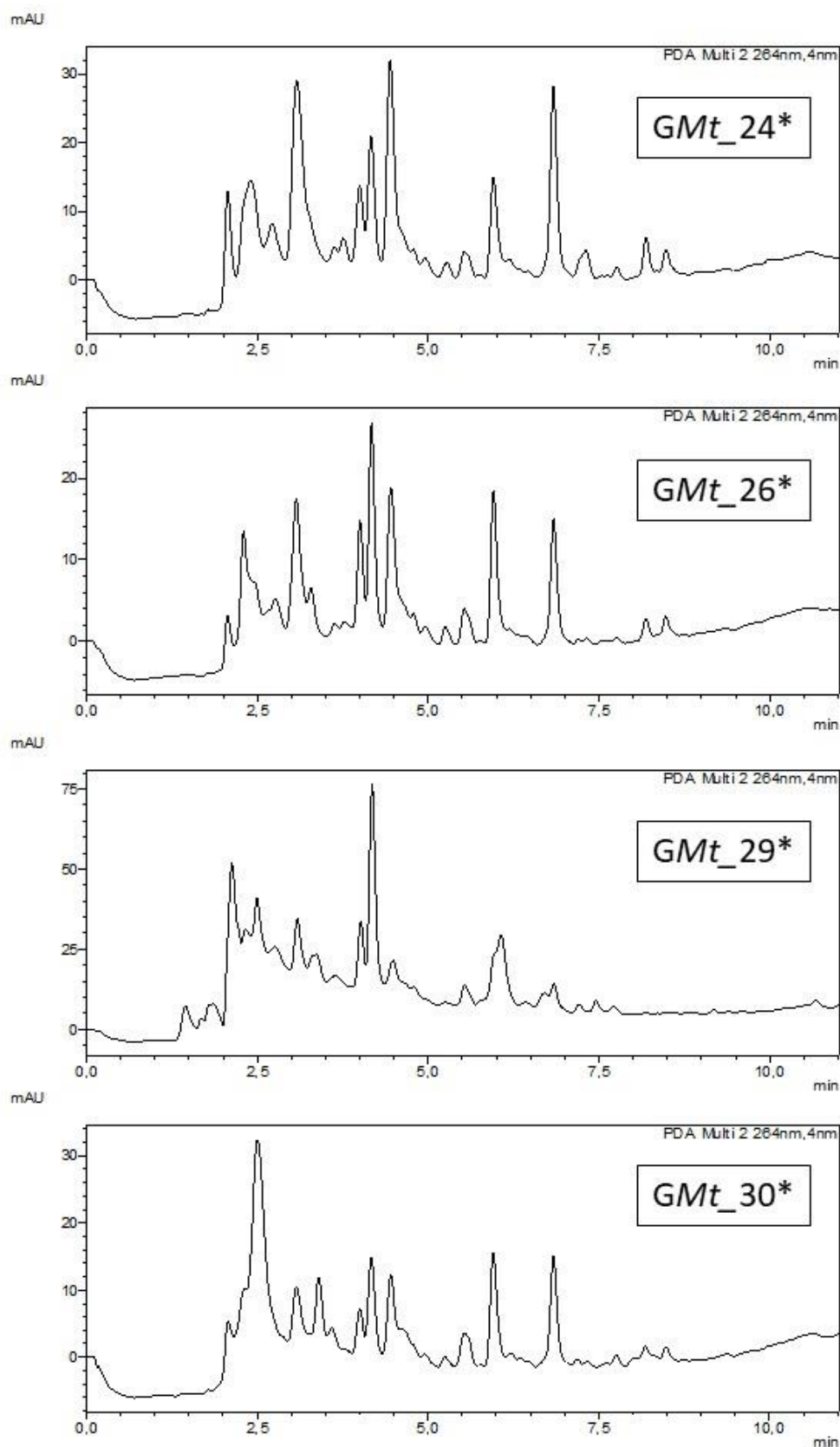


Figura S 3 - *Fingerprint* dos grupos GMt_6, GMt_8, GMt_12 e GMt_16 positivos para flavonoides em CCD. Os picos numerados representam os mesmos identificados em DcMt.

APÊNDICE B

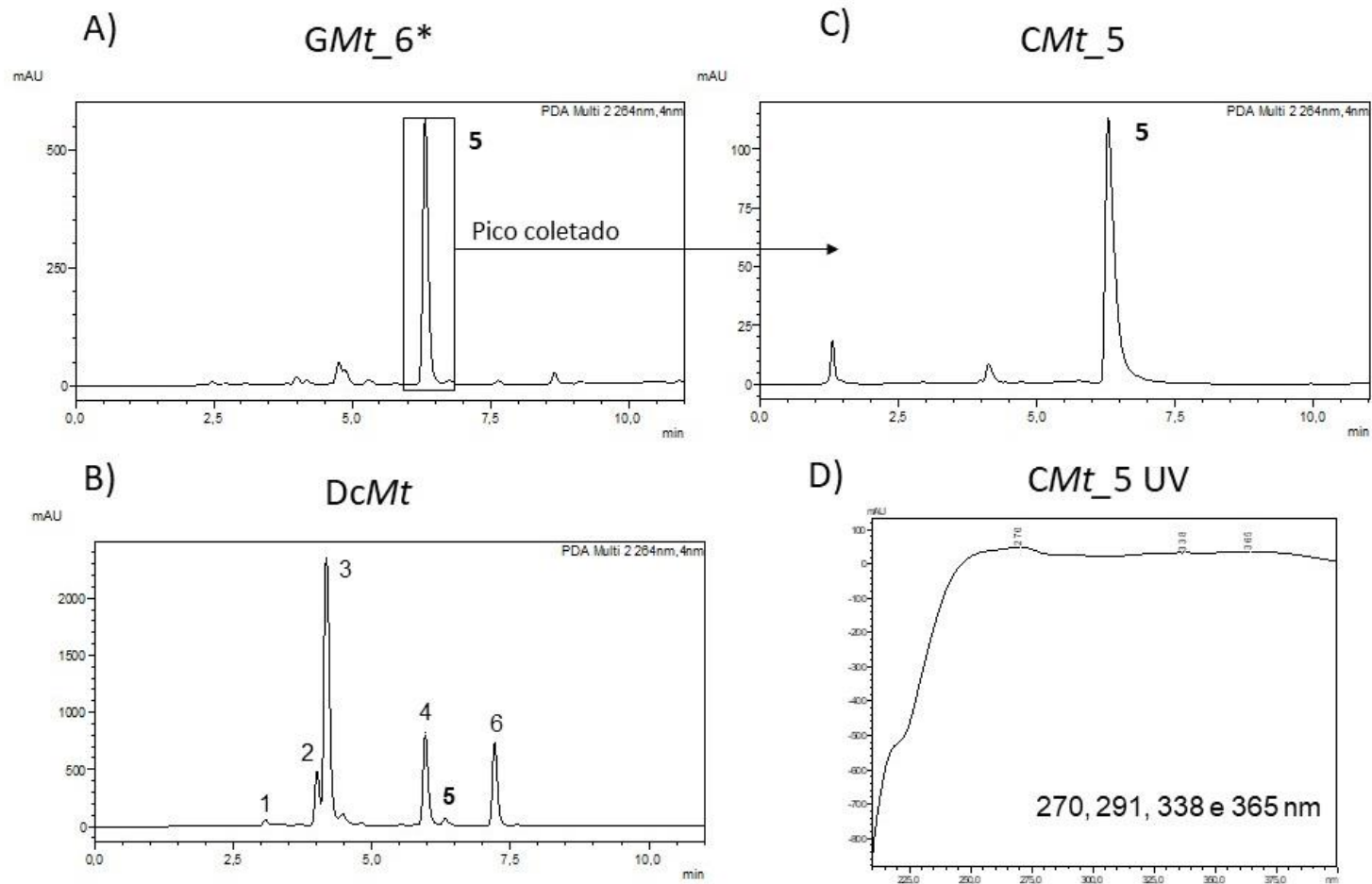


Figura S 4 – *Fingerprint* de: A) *GMt_6* antes do HPLC modo semi – preparativo; B) *DcMt*; C) pico coletado (*CMt_5*). D) Espectro UV de *CMt_5*.

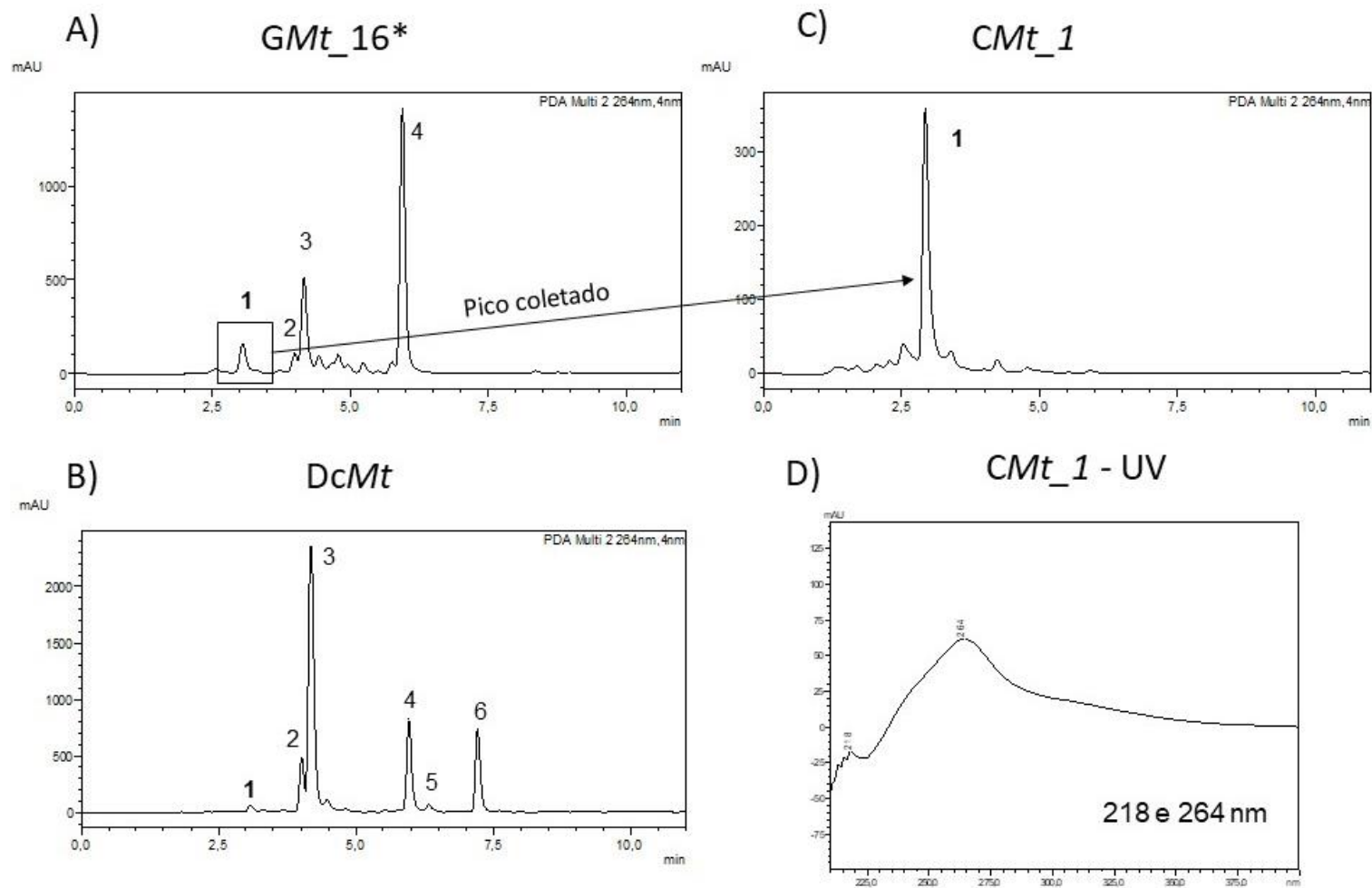


Figura S 5 - Fingerprint de: A) GMt_16 antes do HPLC modo semi – preparativo; B) DcMt; C) pico coletado (CMt_1). D) Espectro UV de CMt_1.

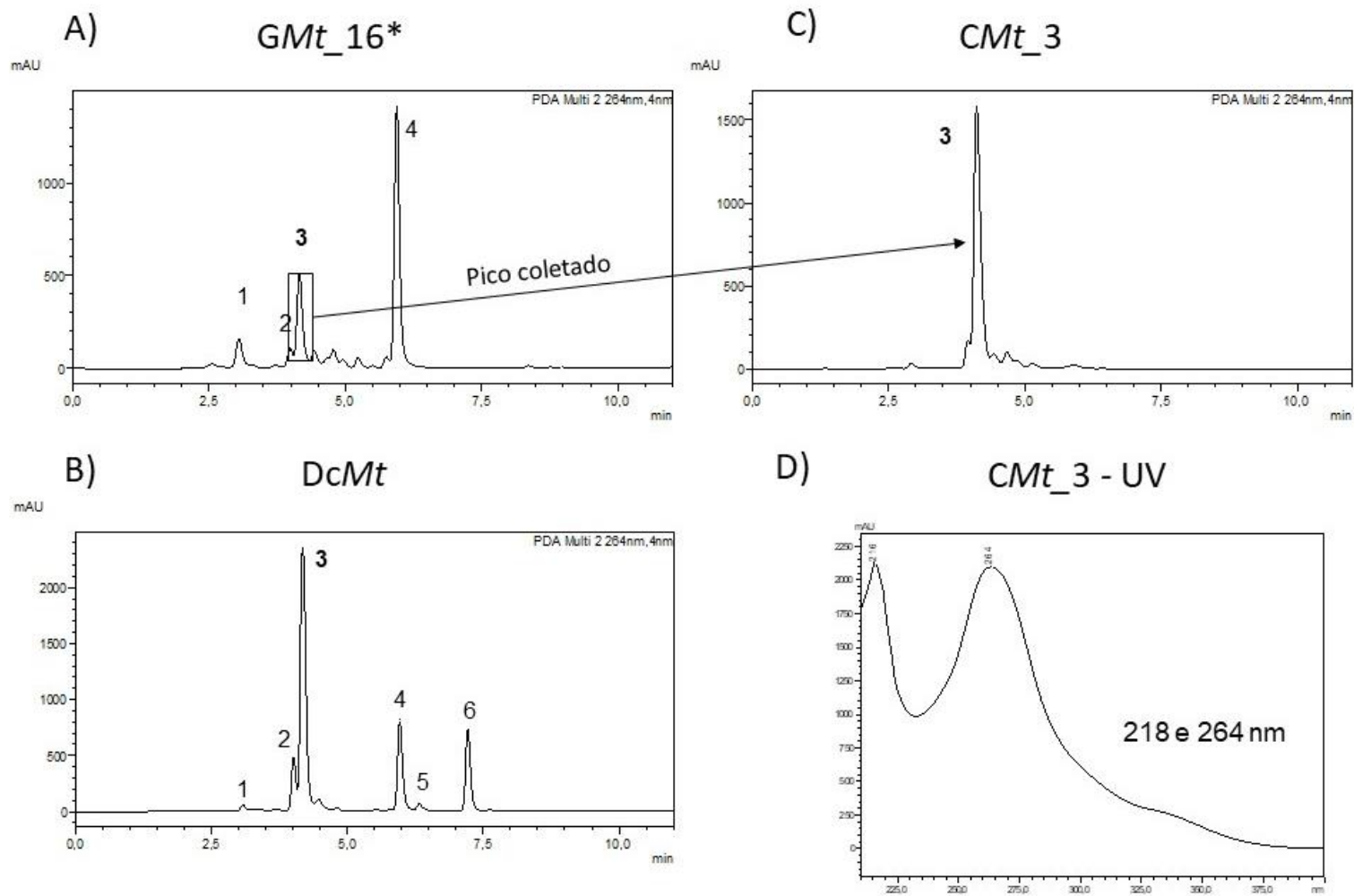


Figura S 6 - Fingerprint de: A) GMt_16 antes do HPLC modo semi – preparativo; B) DcMt; C) pico coletado (CMt_3). D) Espectro UV de CMt_3.

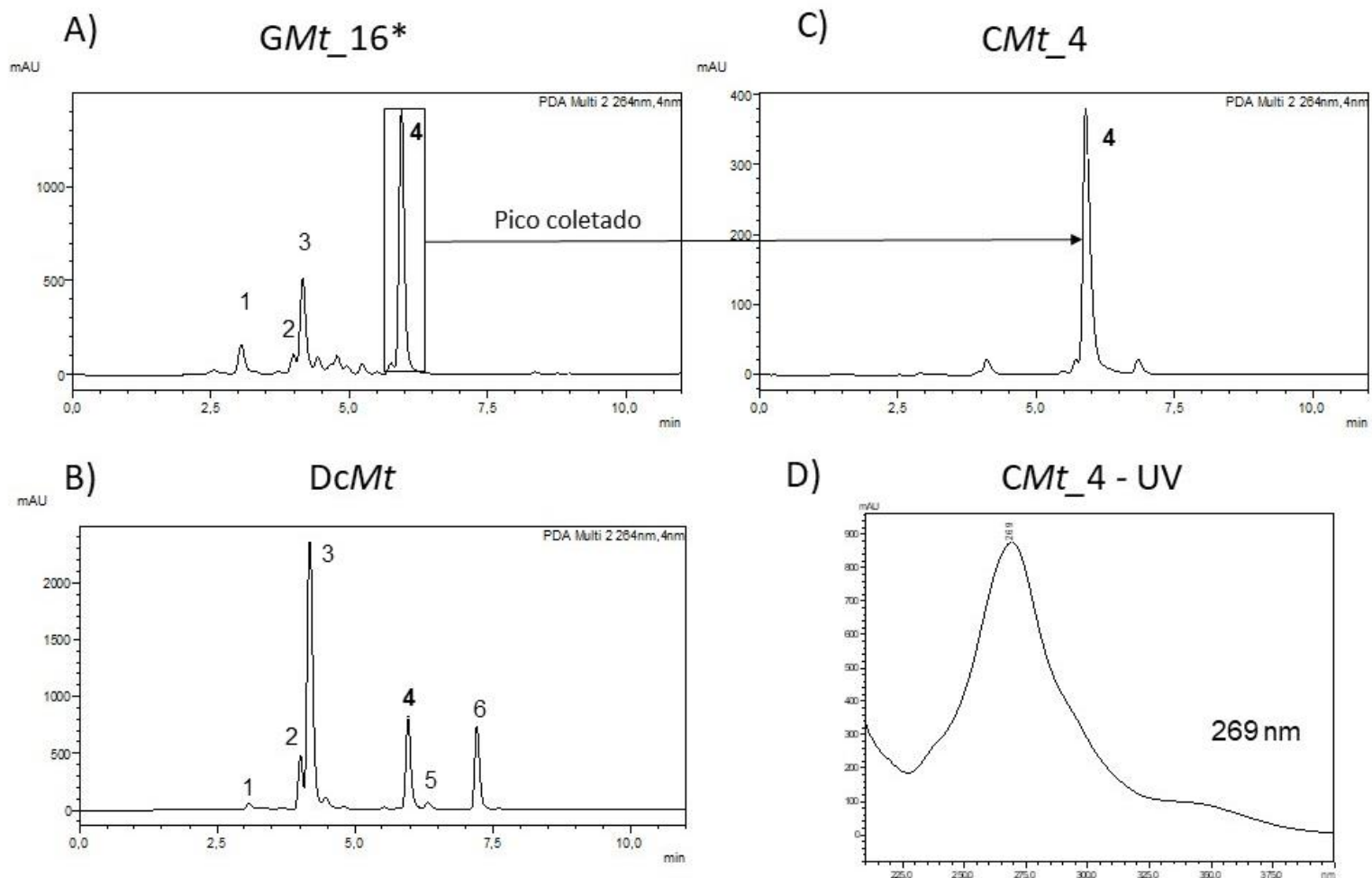


Figura S 7 - Fingerprint de: A) GMt₁₆ antes do HPLC modo semi – preparativo; B) DcMt; C) pico coletado (CMt₄). D) Espectro UV de CMt₄.

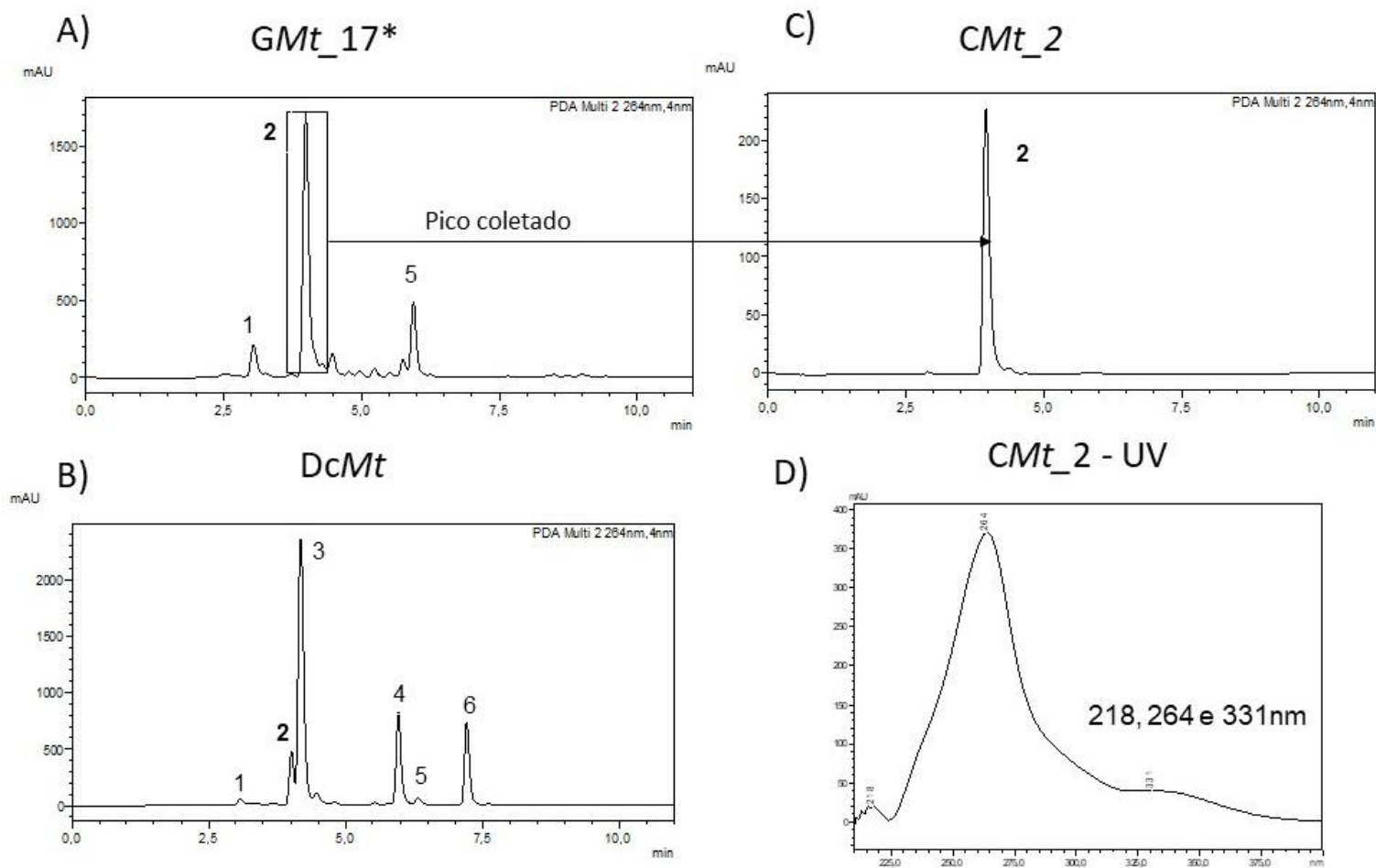


Figura S 8 - Fingerprint de: A) GMt_16 antes do HPLC modo semi – preparativo; B) DcMt; C) pico coletado (CMt_2). D) Espectro UV de CMt_2.

APÊNDICE C

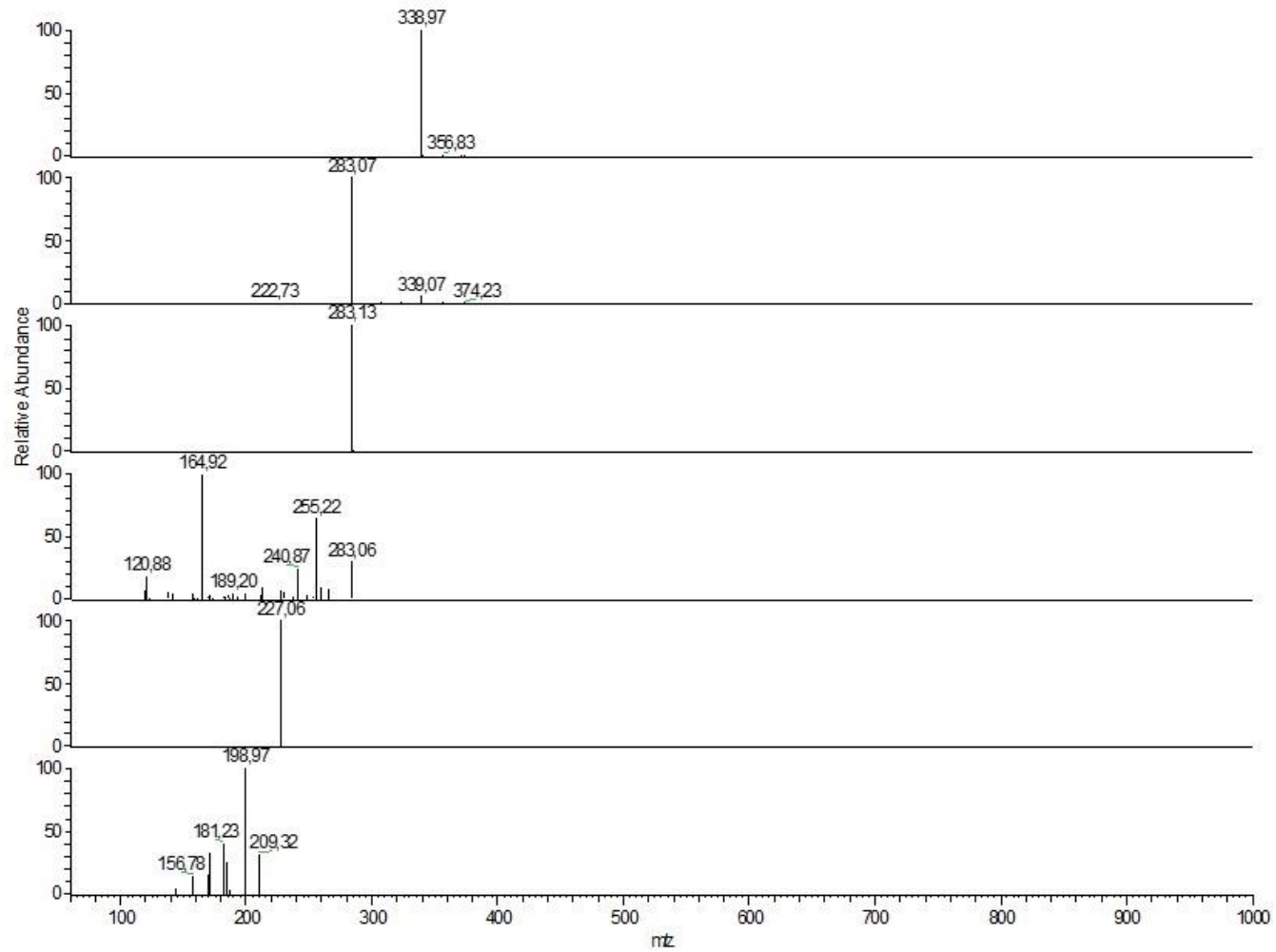


Figura S 9 - Espectros de massas MS_n do íon precursor de m/z 339, obtido em modo positivo.

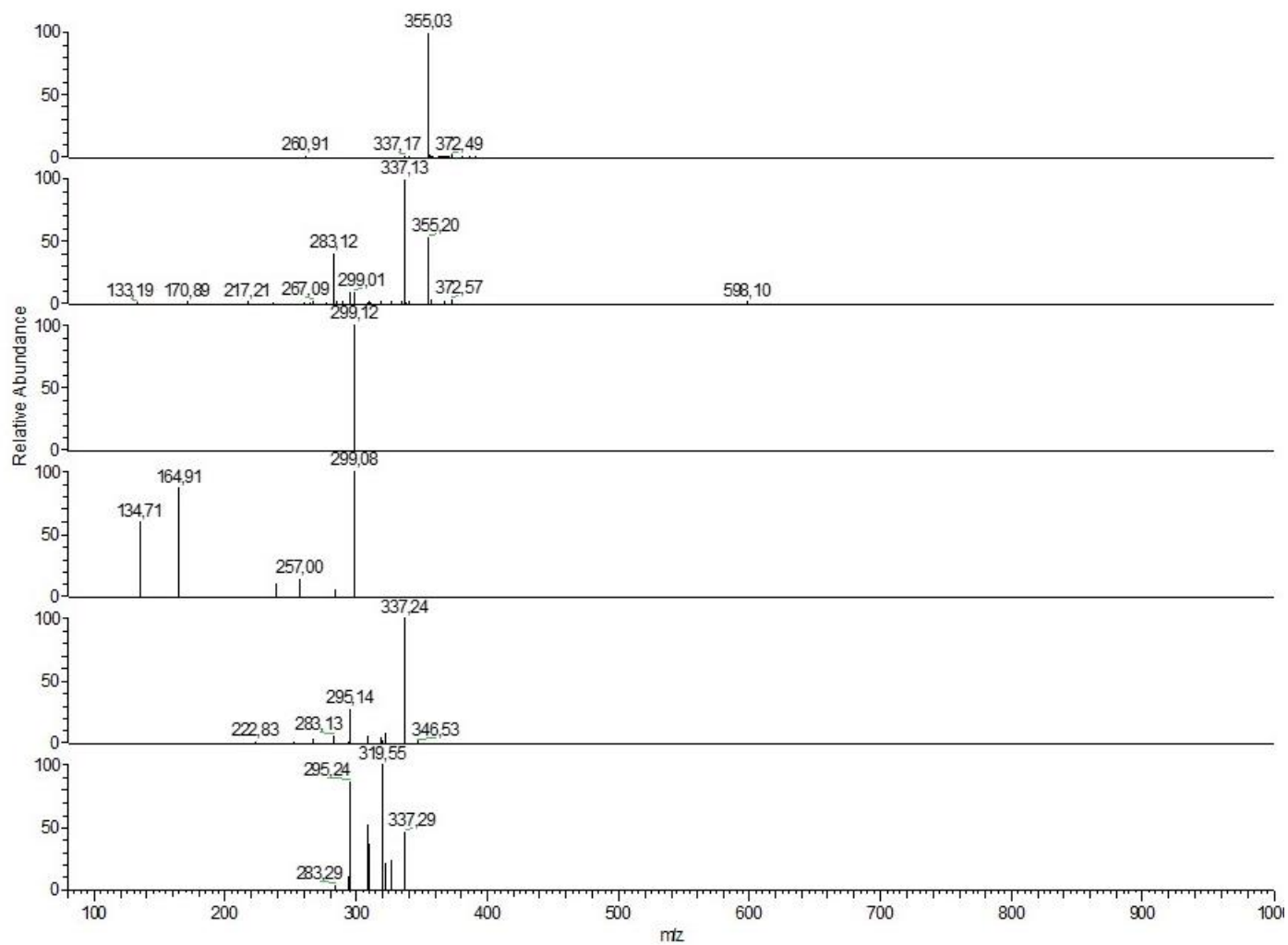


Figura S 10 - Espectros de massas MSn do íon precursor de m/z 355, obtido em modo positivo.

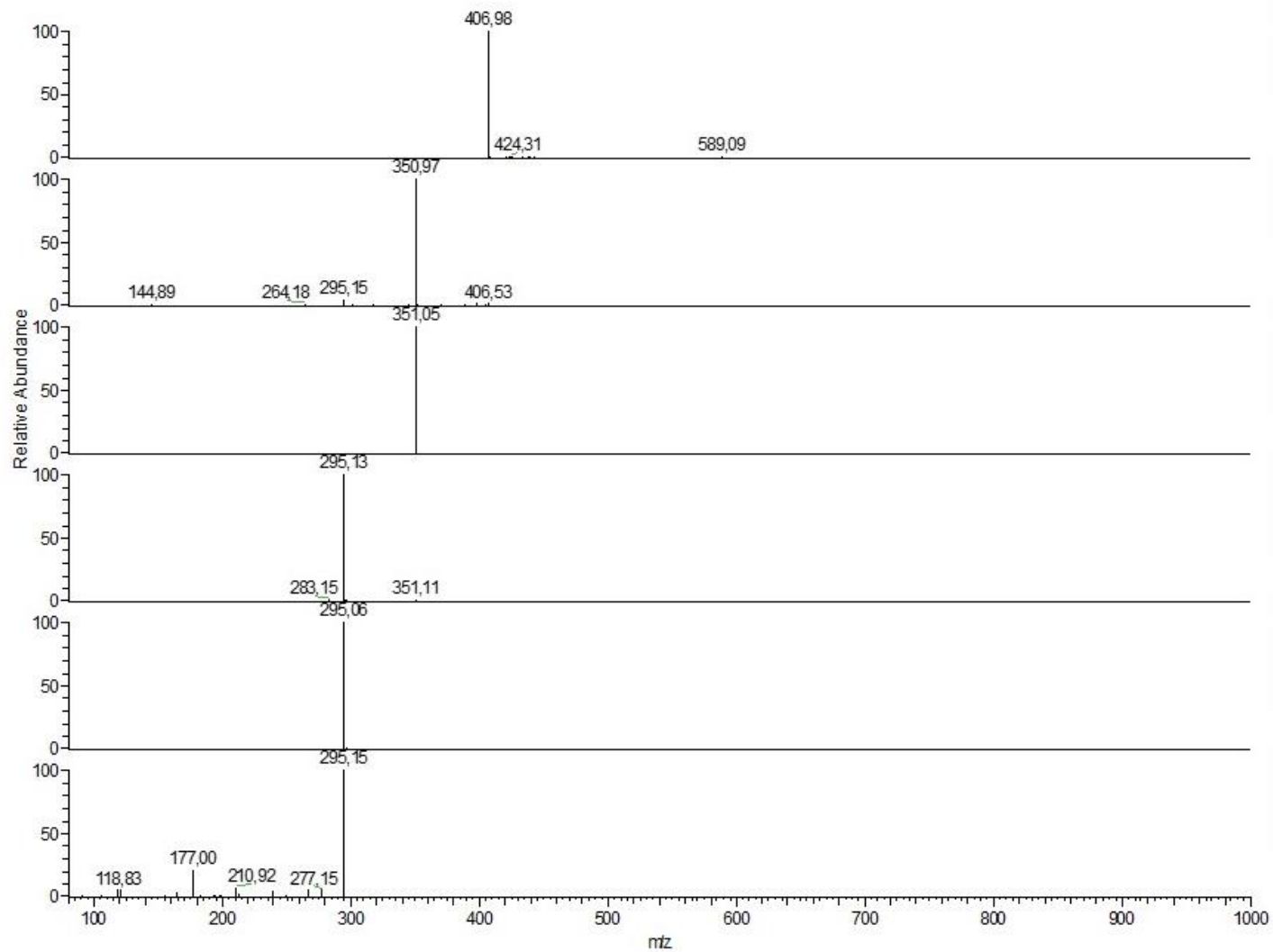


Figura S 11 - Espectros de massas MSn do íon precursor de m/z 407, obtido em modo positivo.

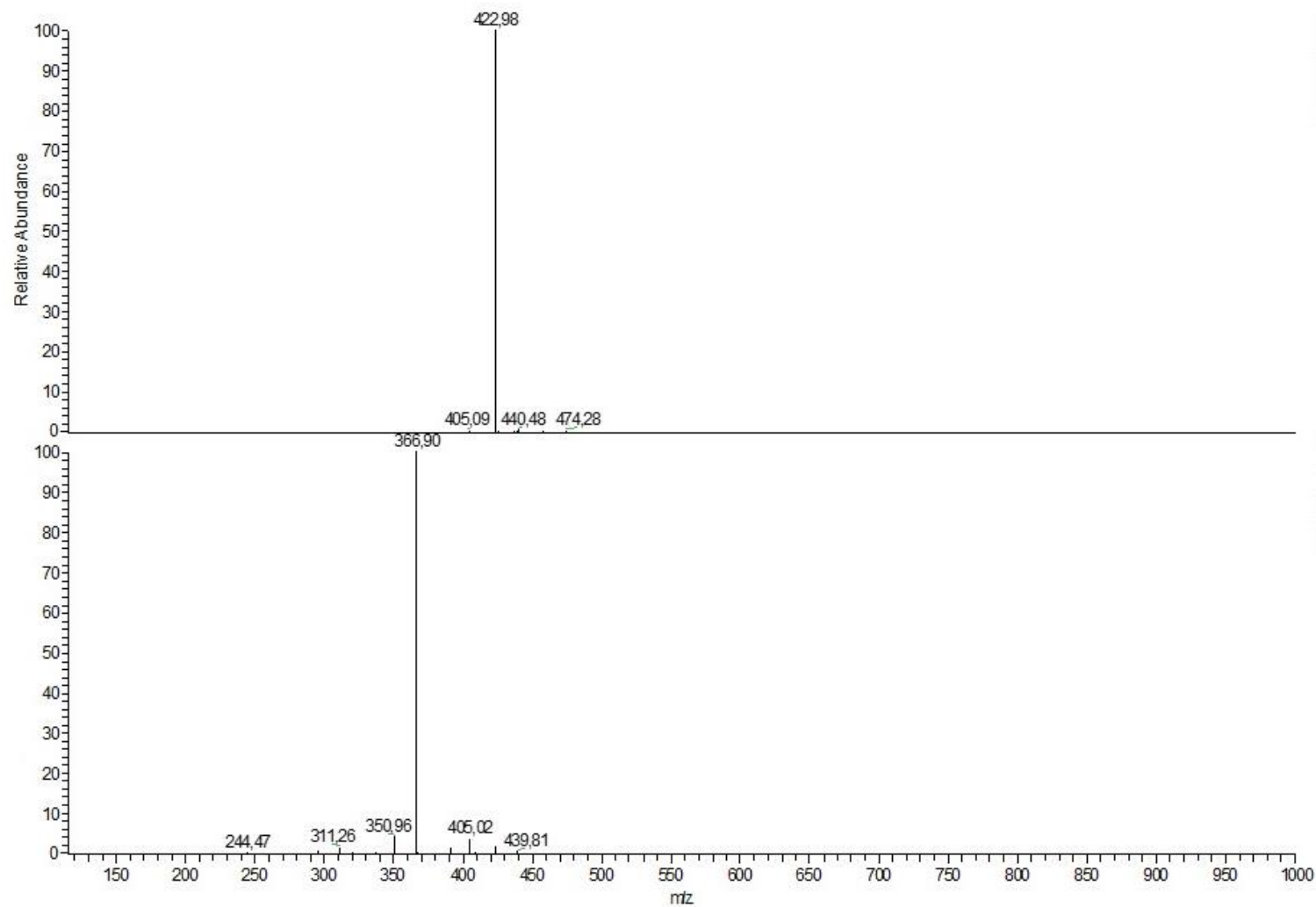


Figura S 12 - Espectros de massas MSn do íon precursor de m/z 423, obtido em modo positivo.

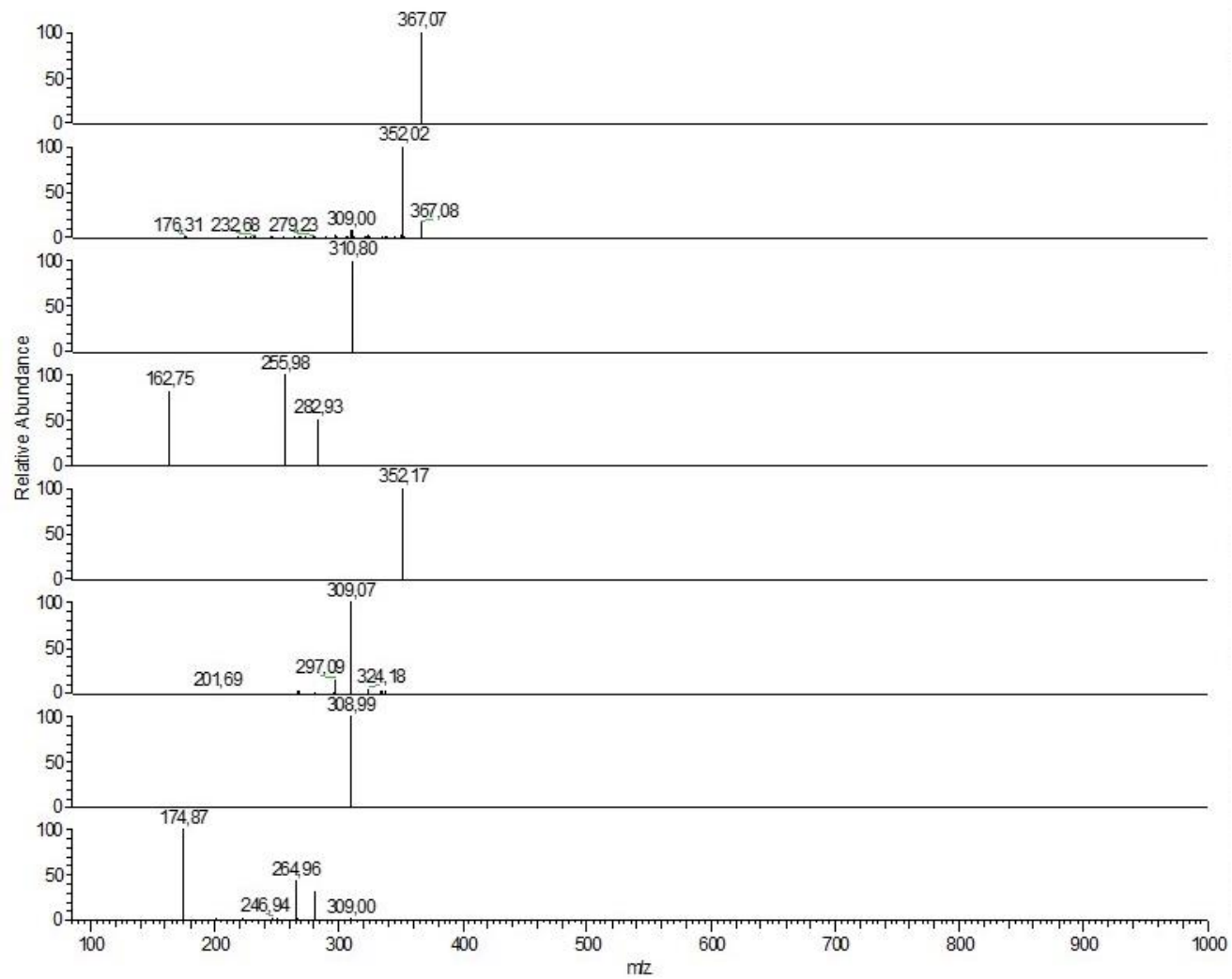


Figura S 13 - Espectros de massas MSn do íon precursor de m/z 367, obtido em modo negativo.

APÊNDICE D

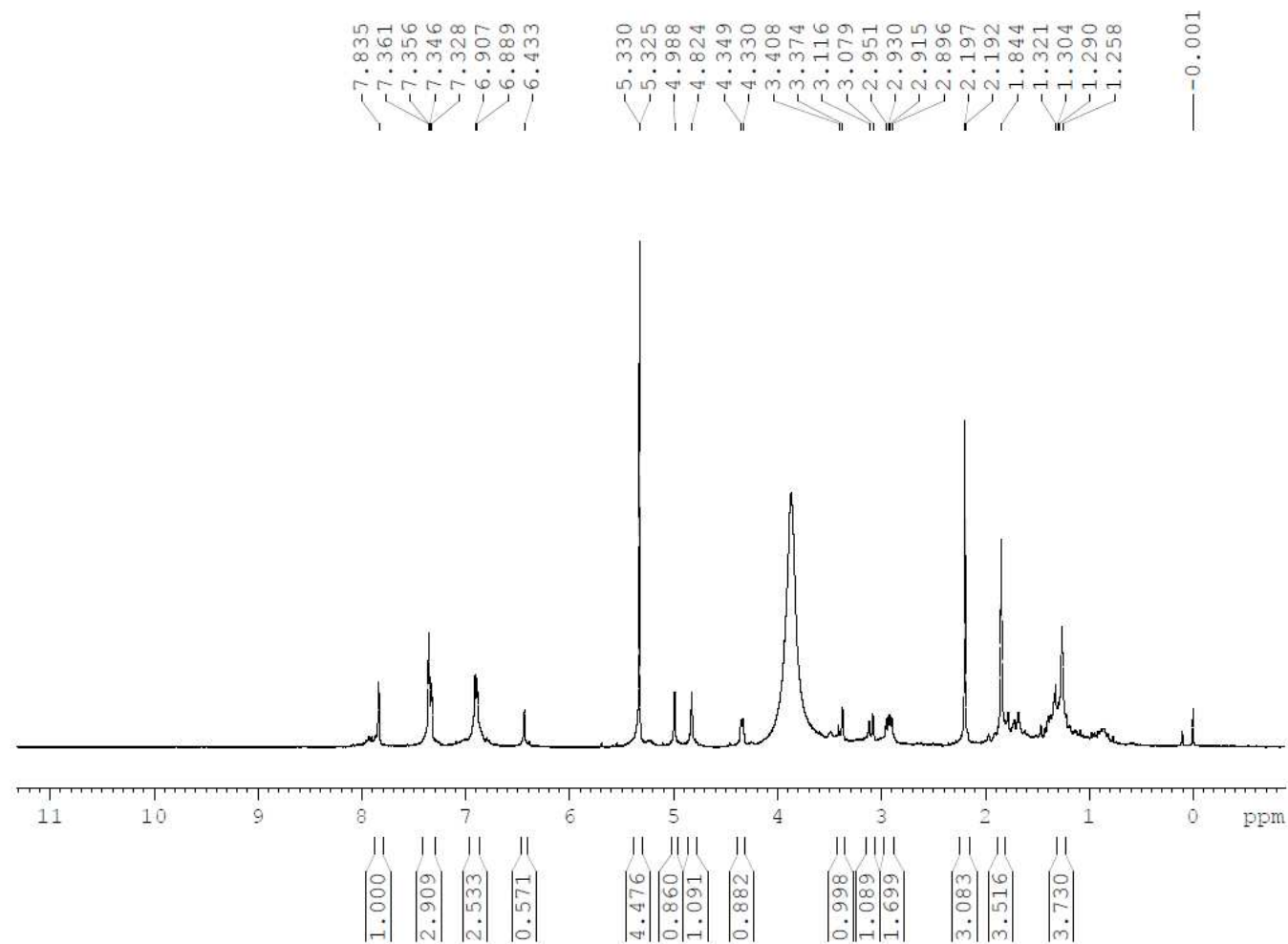


Figura S 14 - Espectro de RMN ¹H de Cmt_1 (CDCl₃, 400 MHz)

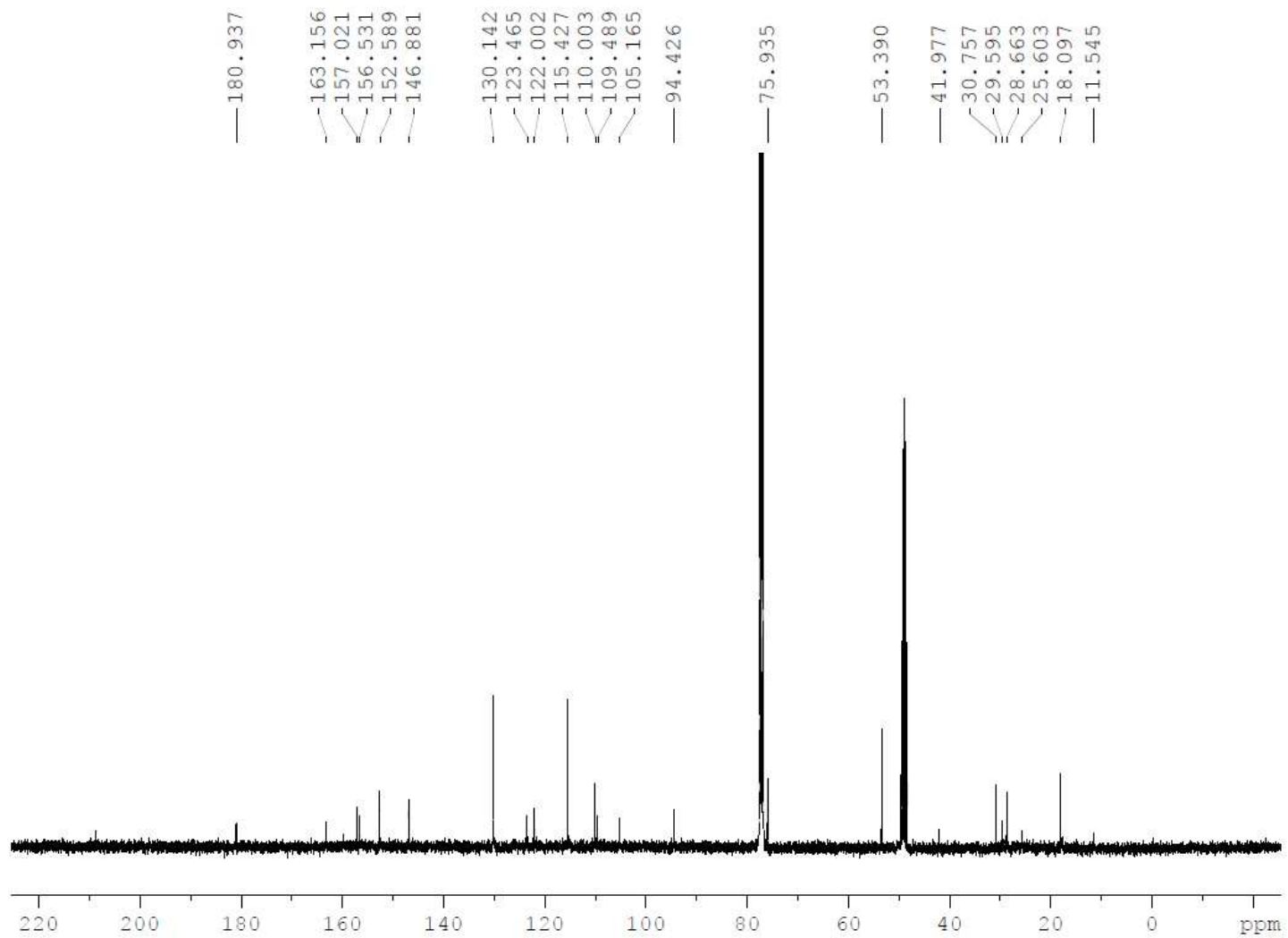


Figura S 15 - Espectro de RMN ^{13}C de *CMt_1* (CDCl_3 , 100 MHz)

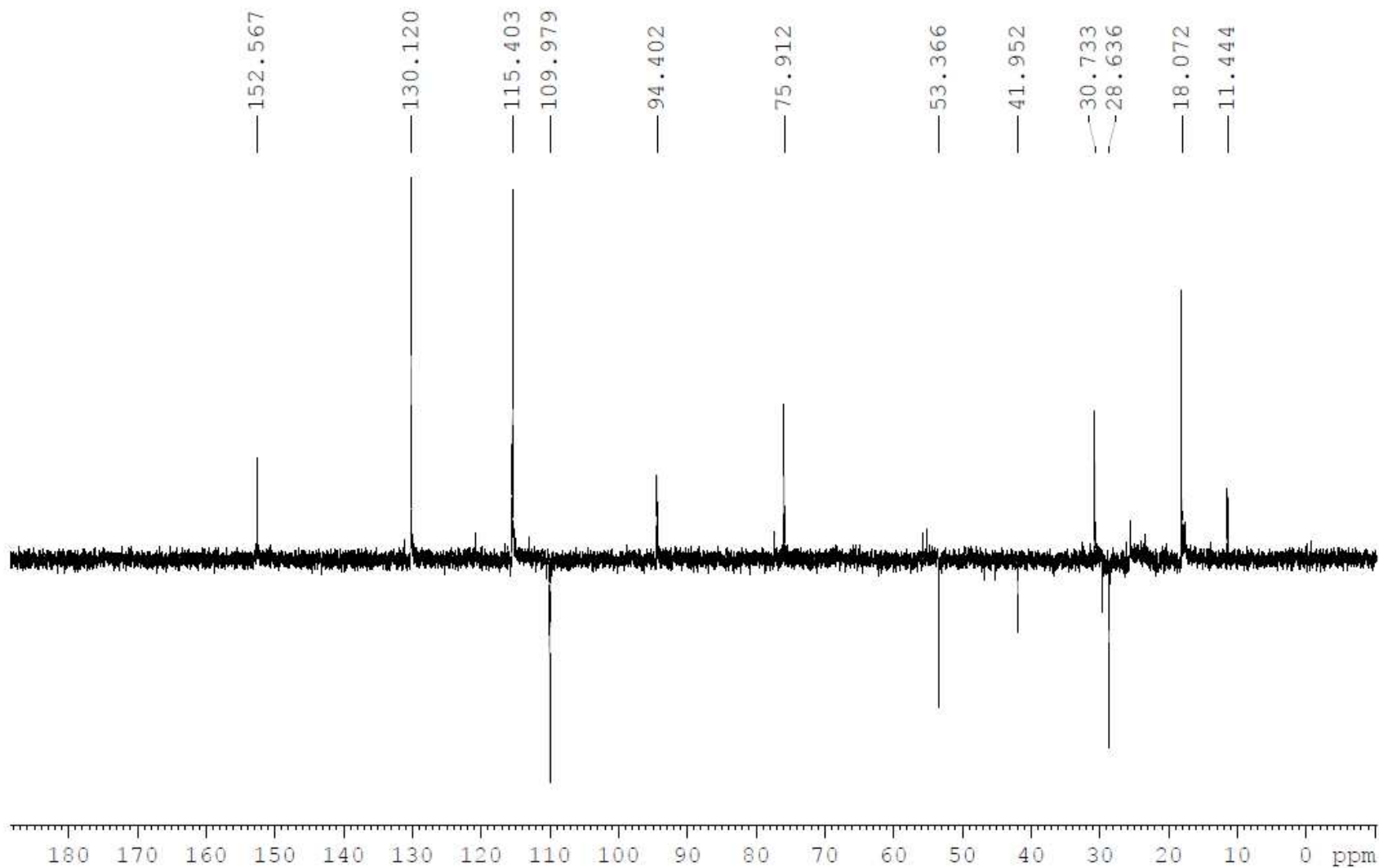


Figura S 16 - Subespectro DEPT-135 de *CMt*_1 (CDCl₃, 100 MHz)

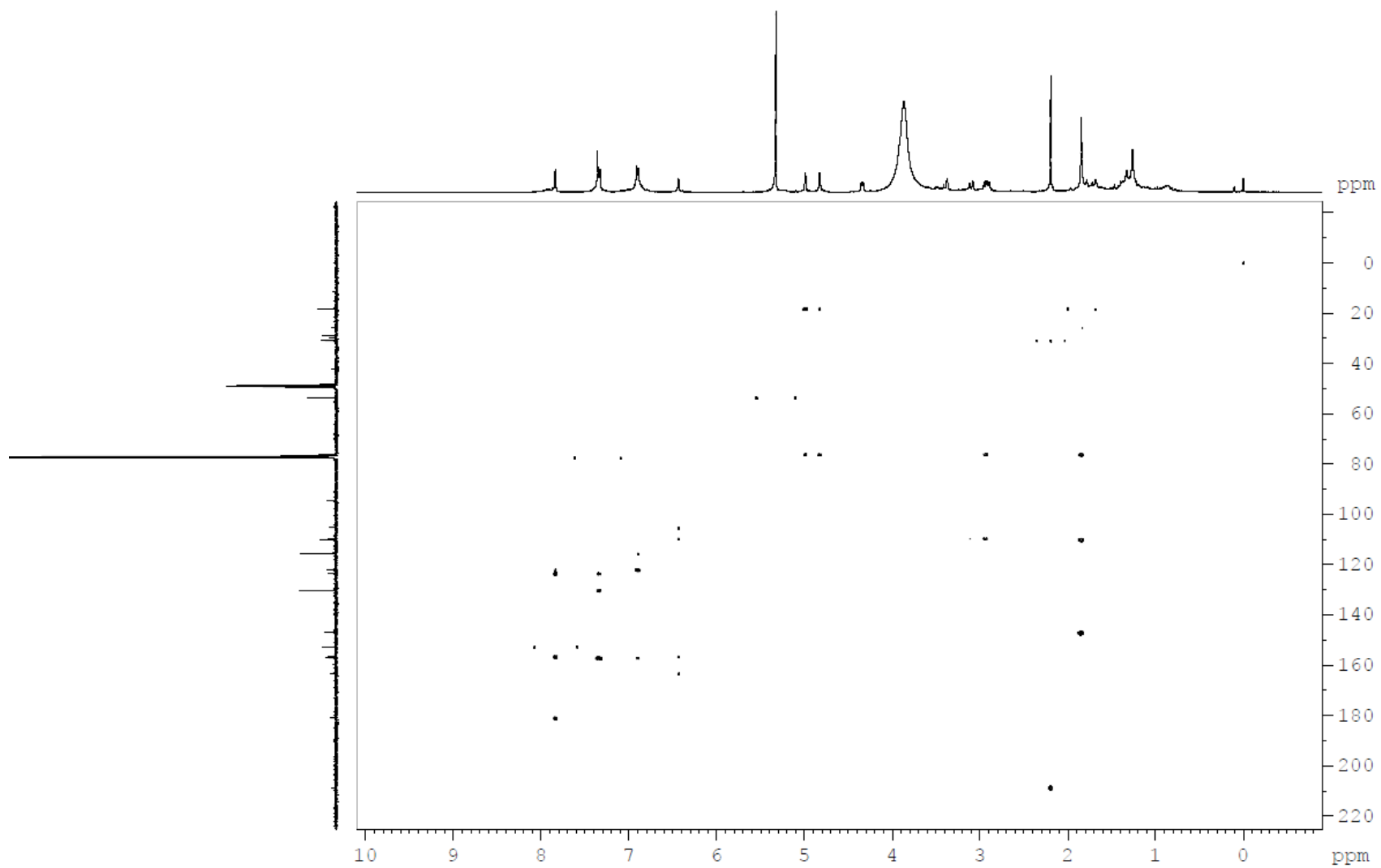


Figura S 17 - Mapa de contorno HMBC de *Cmt_1* (CDCl₃, 400 MHz)

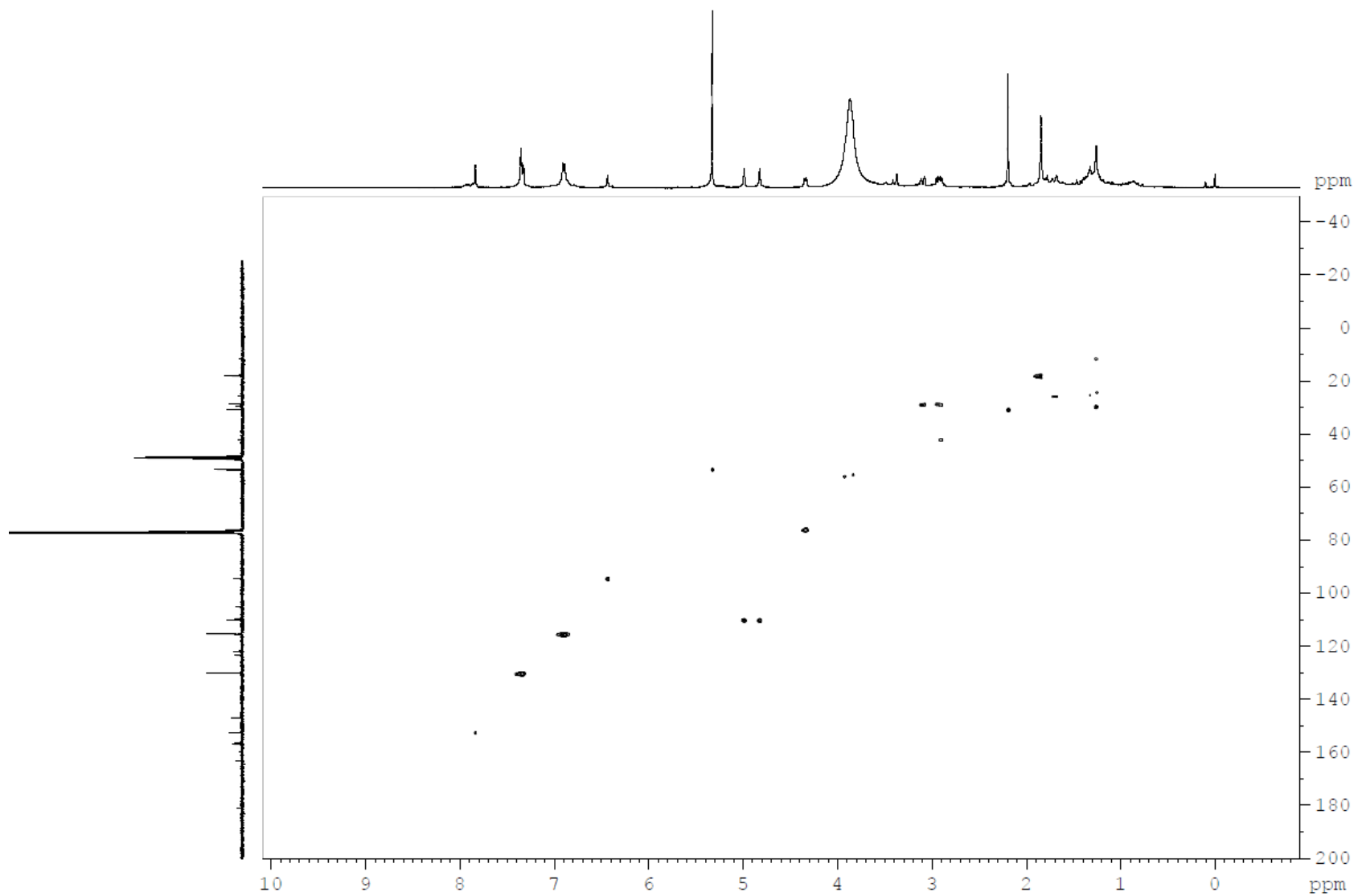


Figura S 18 - Mapa de contorno HSQC de *CMt_1* (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H)

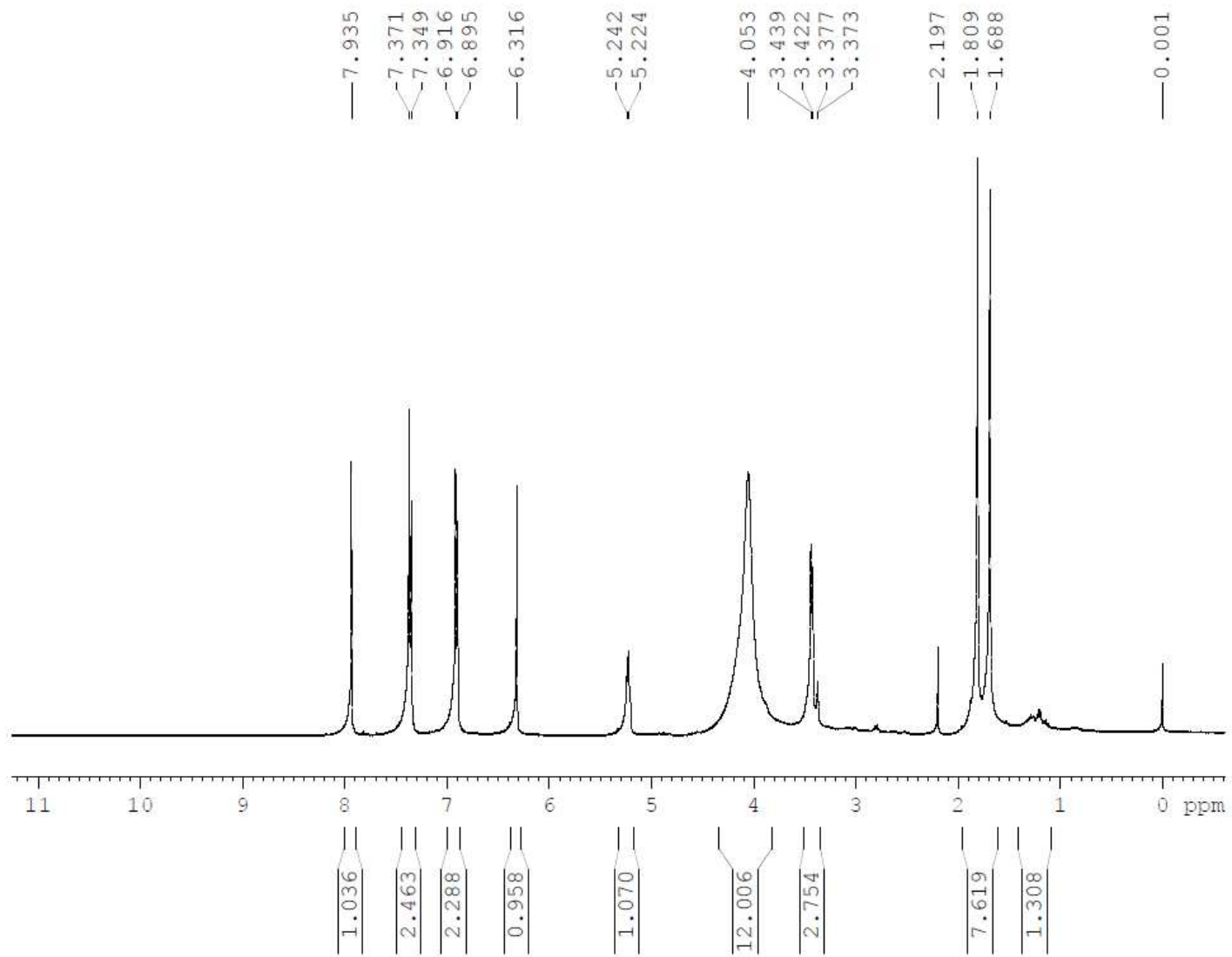


Figura S 19 - Espectro de RMN ^1H de *CMt_2* (CDCl_3 , 400 MHz)

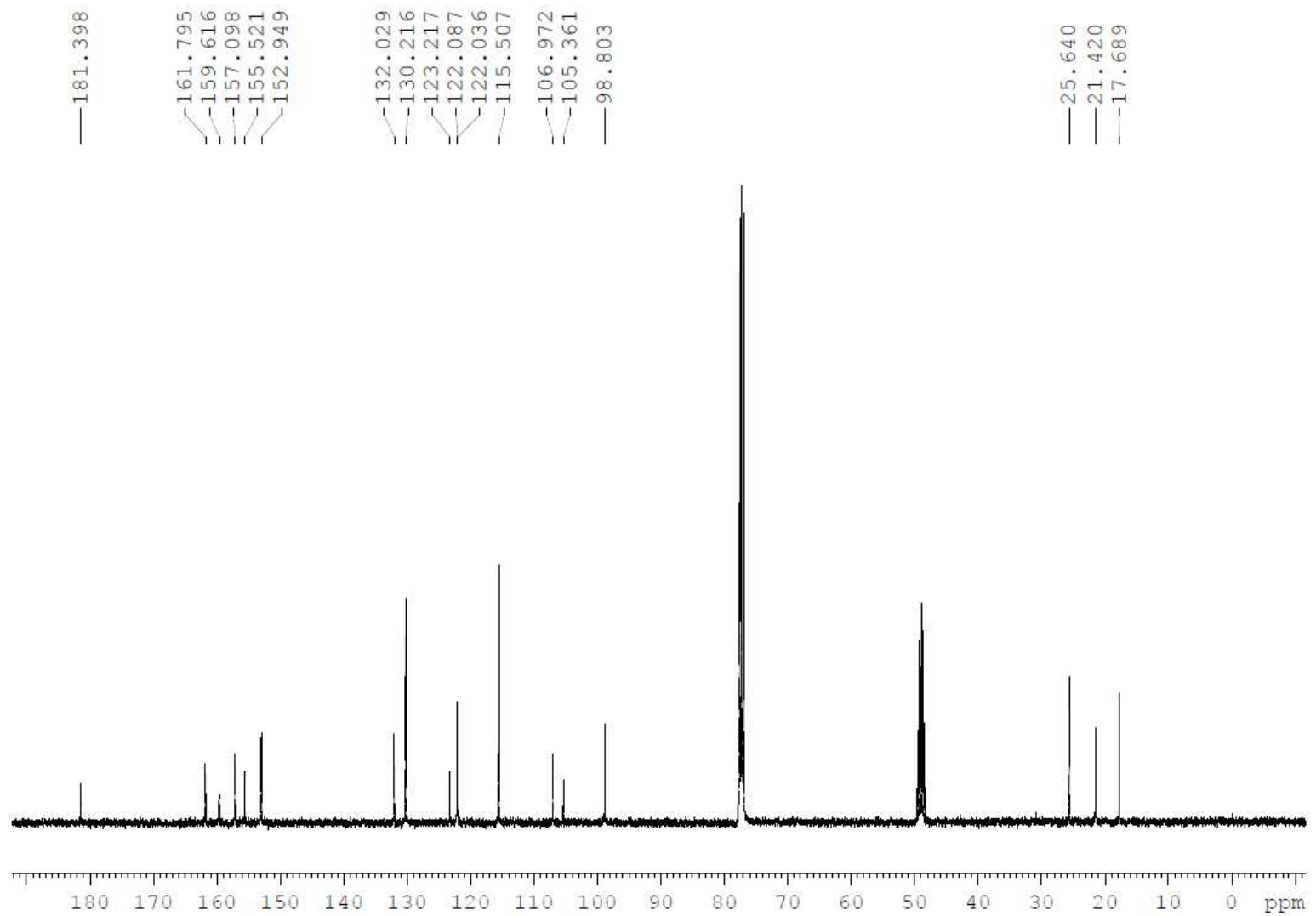


Figura S 20 – Espectro de RMN ^{13}C de *Cmt_2* (CDCl_3 , 100 MHz)

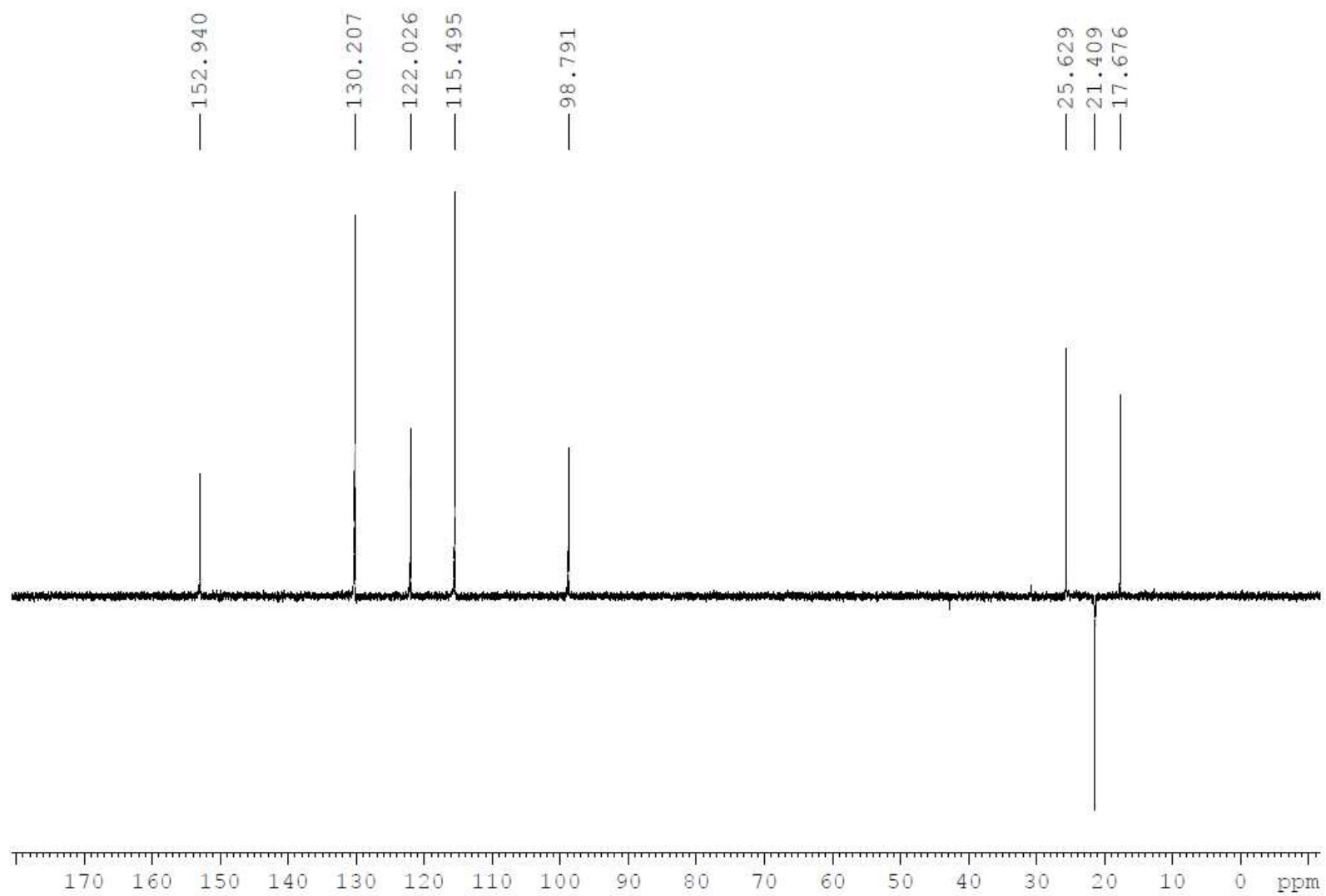


Figura S 21 - Subespectro DEPT-135 de *CMt_2* (CDCl₃, 100 MHz)

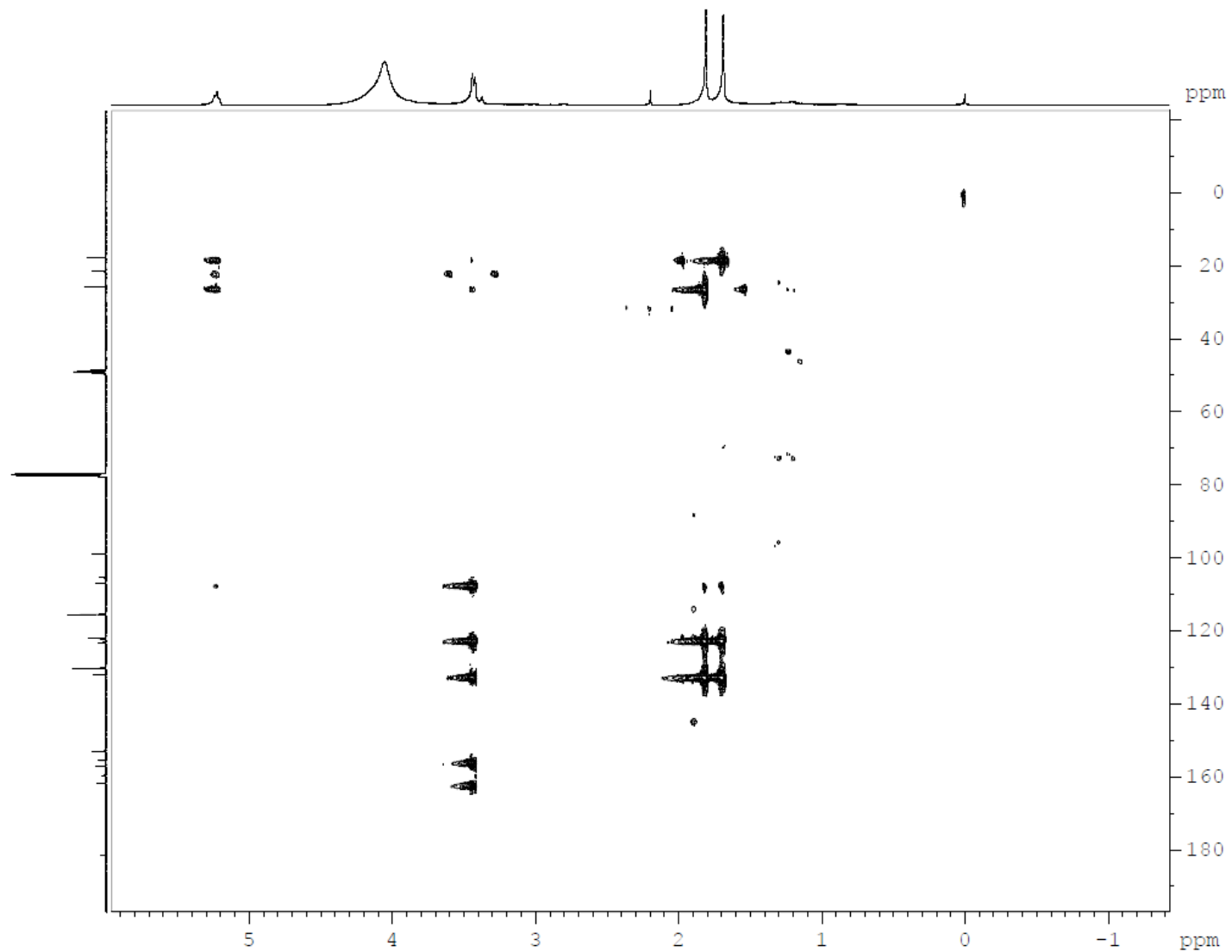


Figura S 22 - Mapa de contorno HMBC de *CMt_2* (CDCl₃, 400 MHz), mostrando a correlação heteronuclear entre H-2'' (δ 5,24) e C8 (δ 106,9).

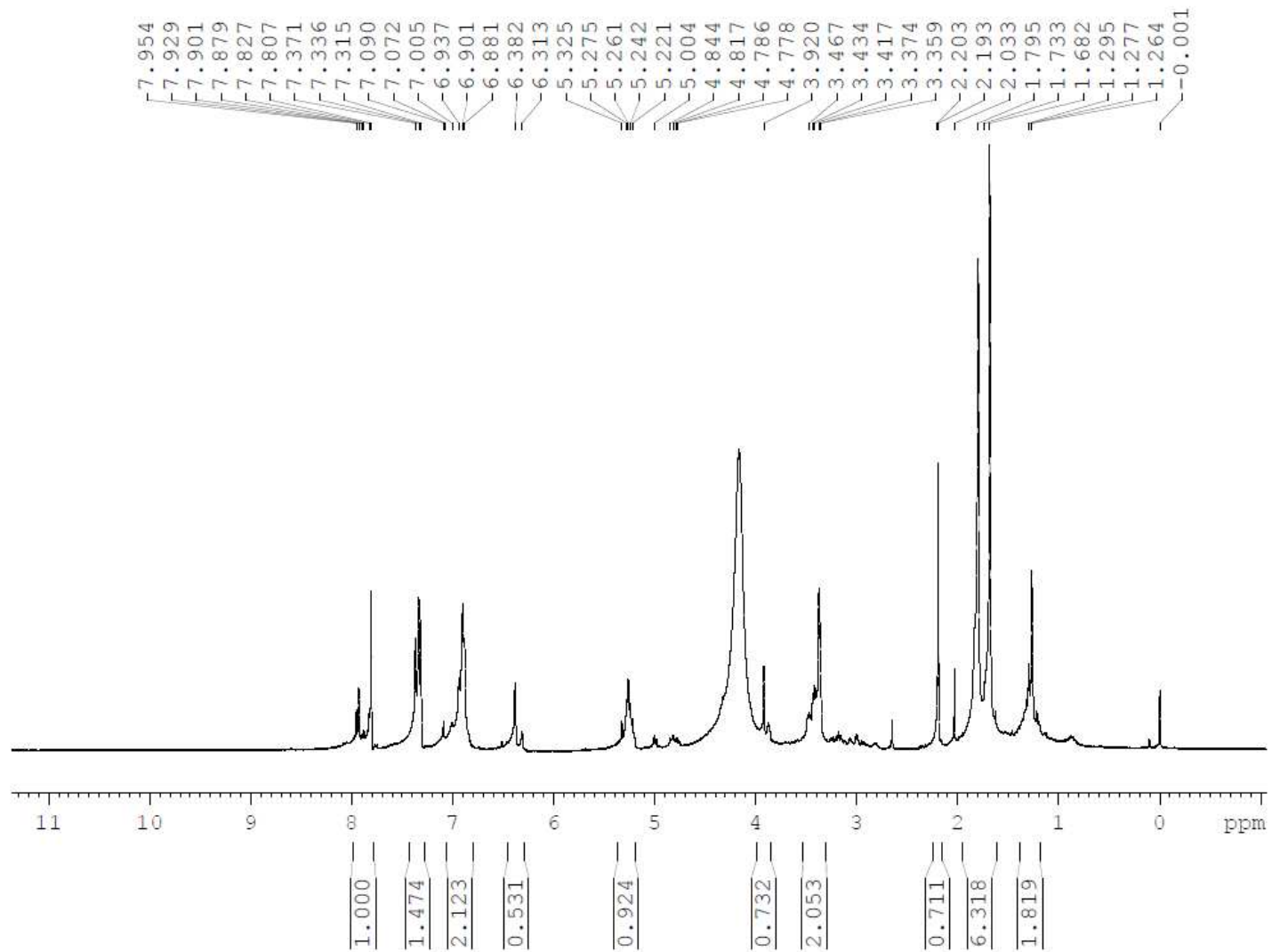


Figura S 23 - Espectro de RMN ¹H de CMt₃ (CDCl₃, 400 MHz)

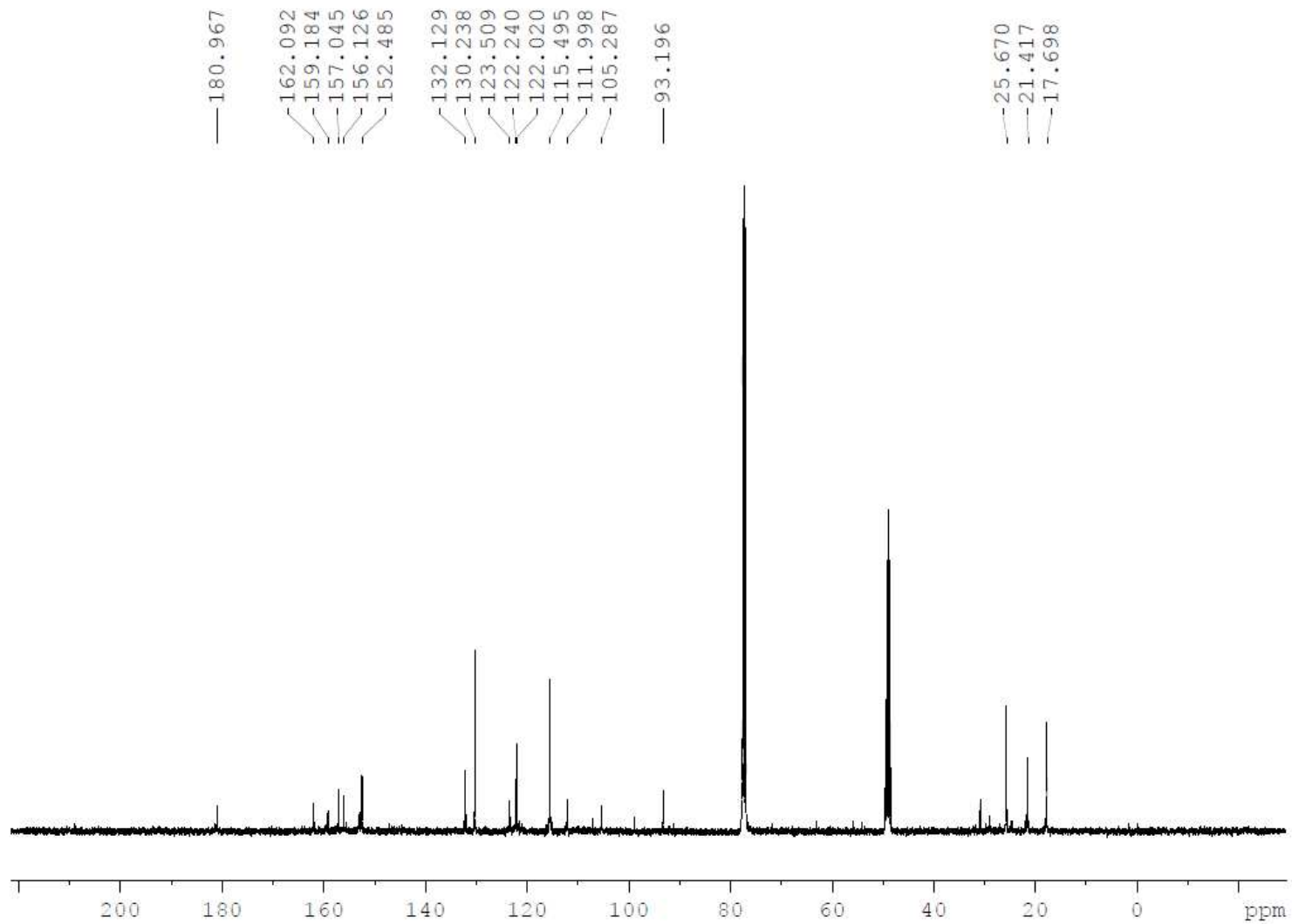


Figura S 24 - Espectro de RMN ^{13}C de *CMt_3* (CDCl_3 , 100 MHz)

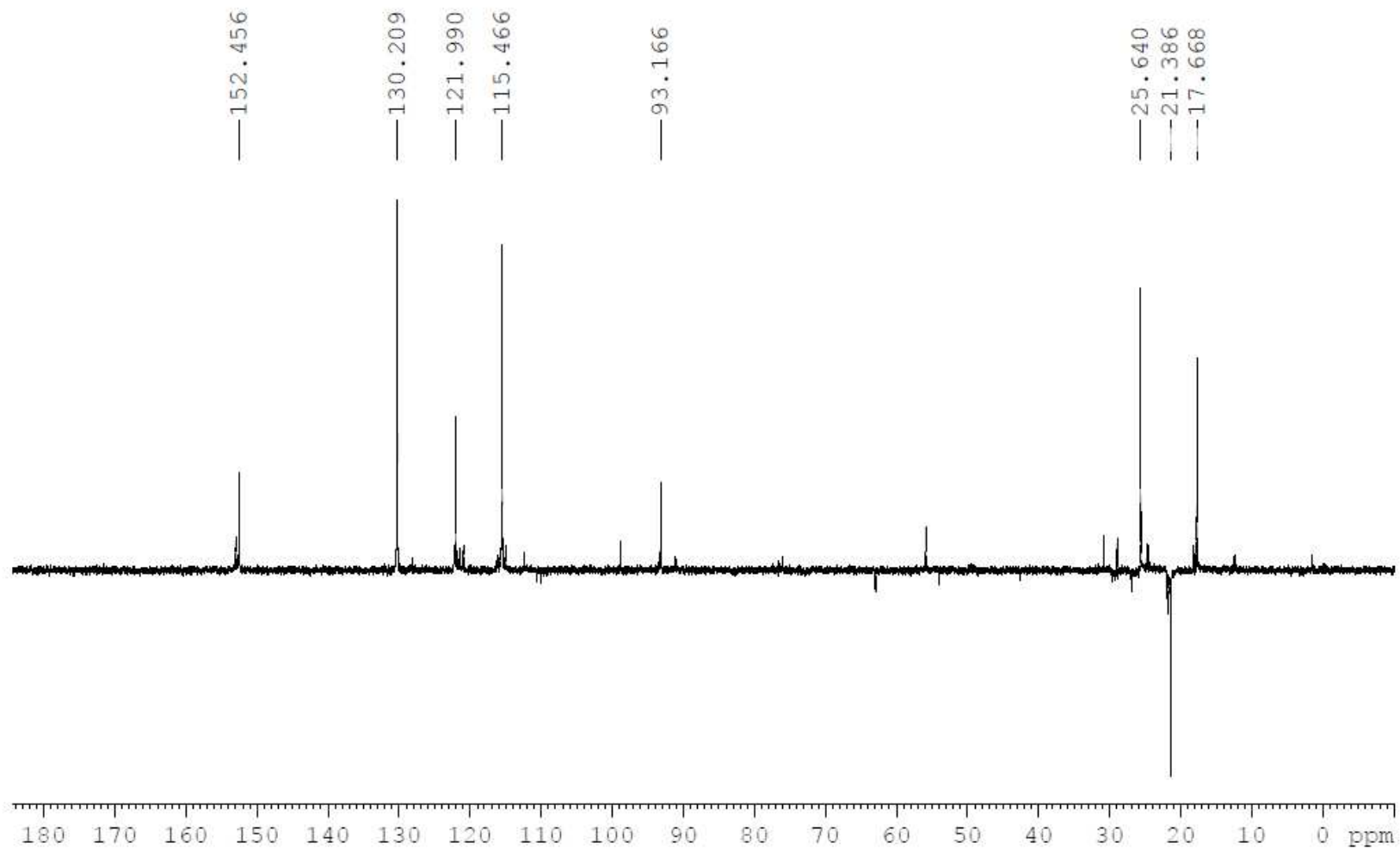


Figura S 25 - Subespectro DEPT-135 de *CMt_3* (CDCl_3 , 100 MHz).

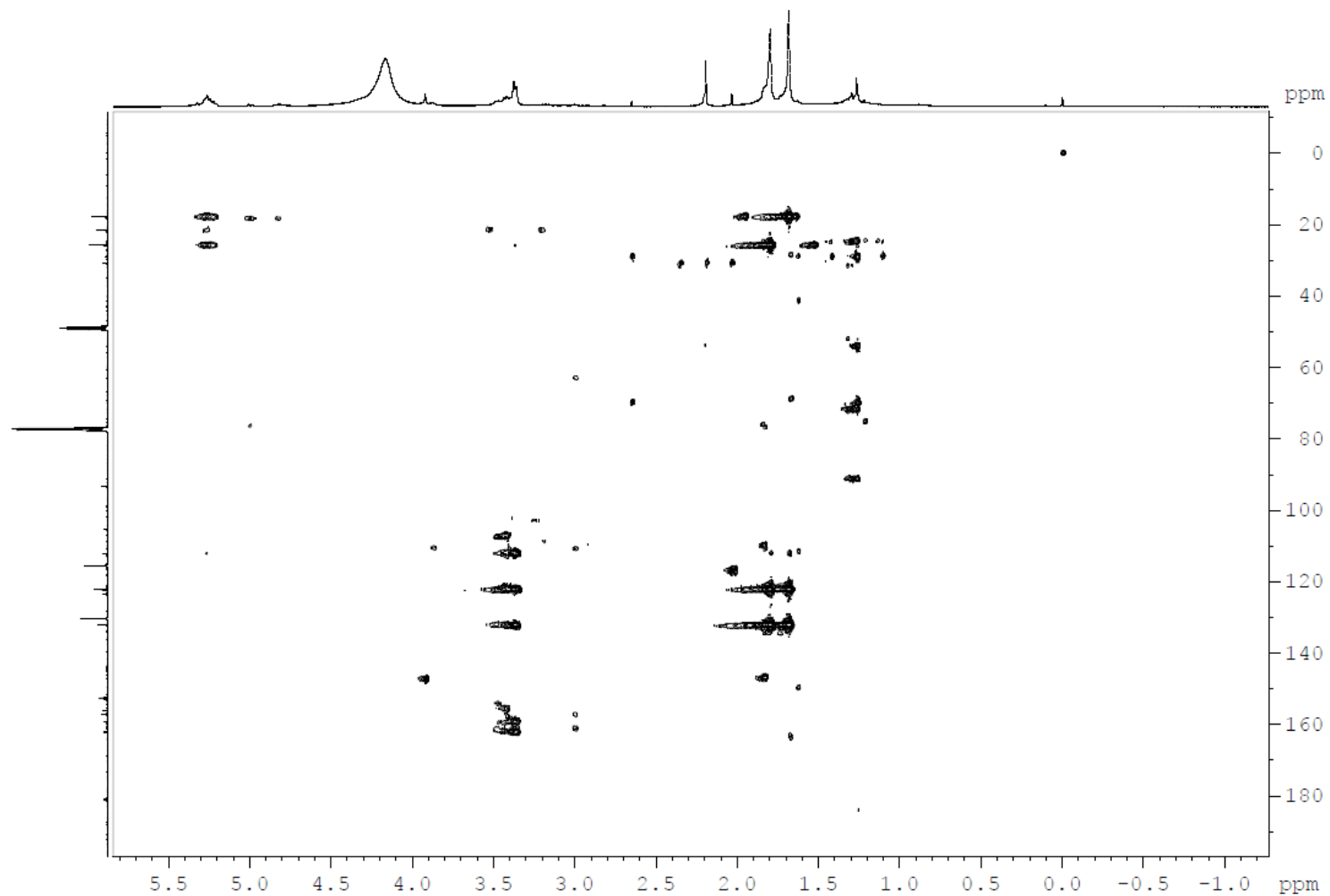


Figura S 26 - Mapa de contorno HMBC de *CMt_3* (CDCl_3 , 400 MHz), mostrando as correlações heteronucleares entre H-2'' (δ 5,27) e C6 (δ 112,0); H-1'' (δ 1,79) e C5 (δ 159,0).

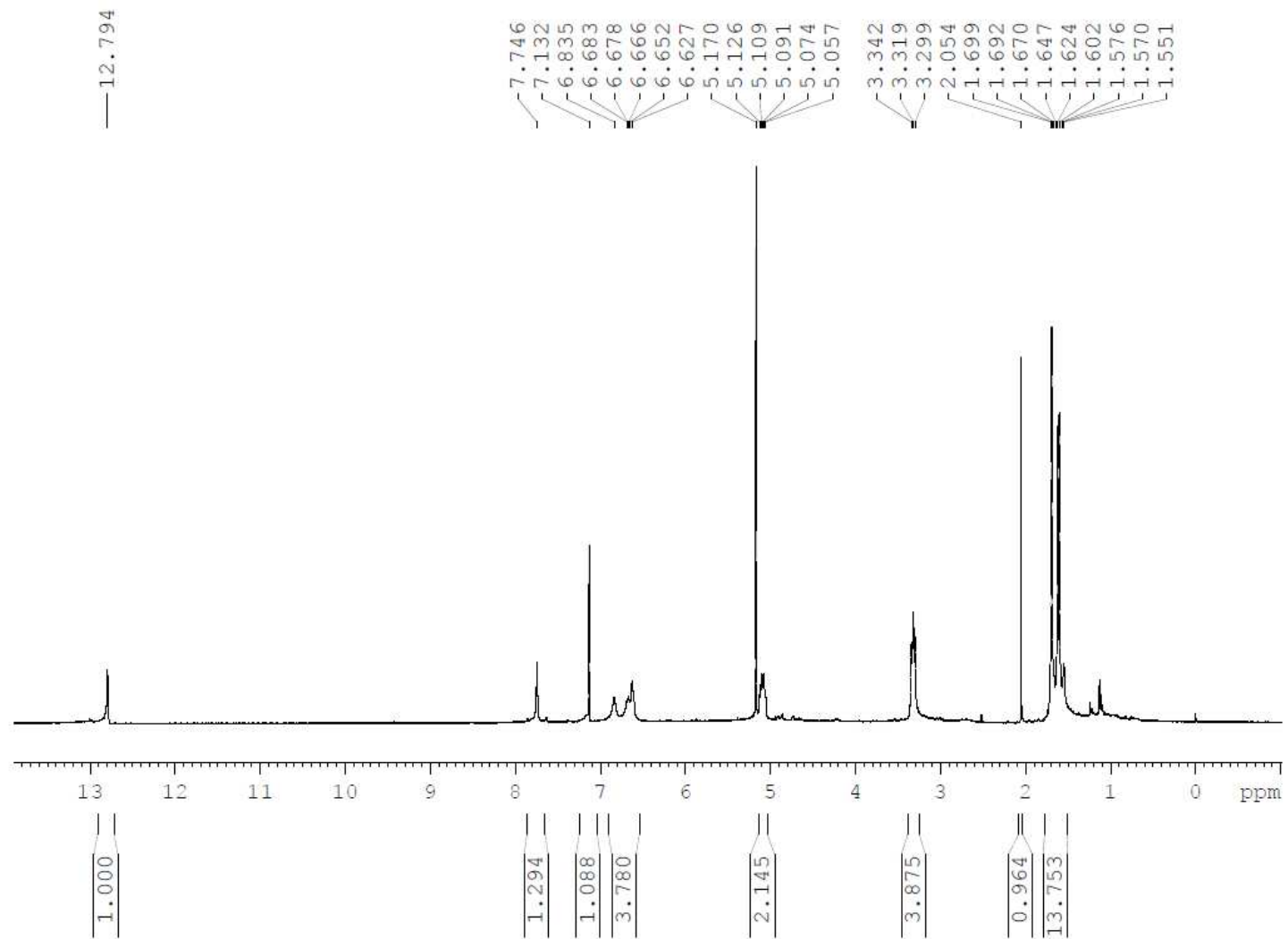


Figura S 27 - Espectro de RMN ^1H de *Cmt_4* (CDCl_3 , 400 MHz)

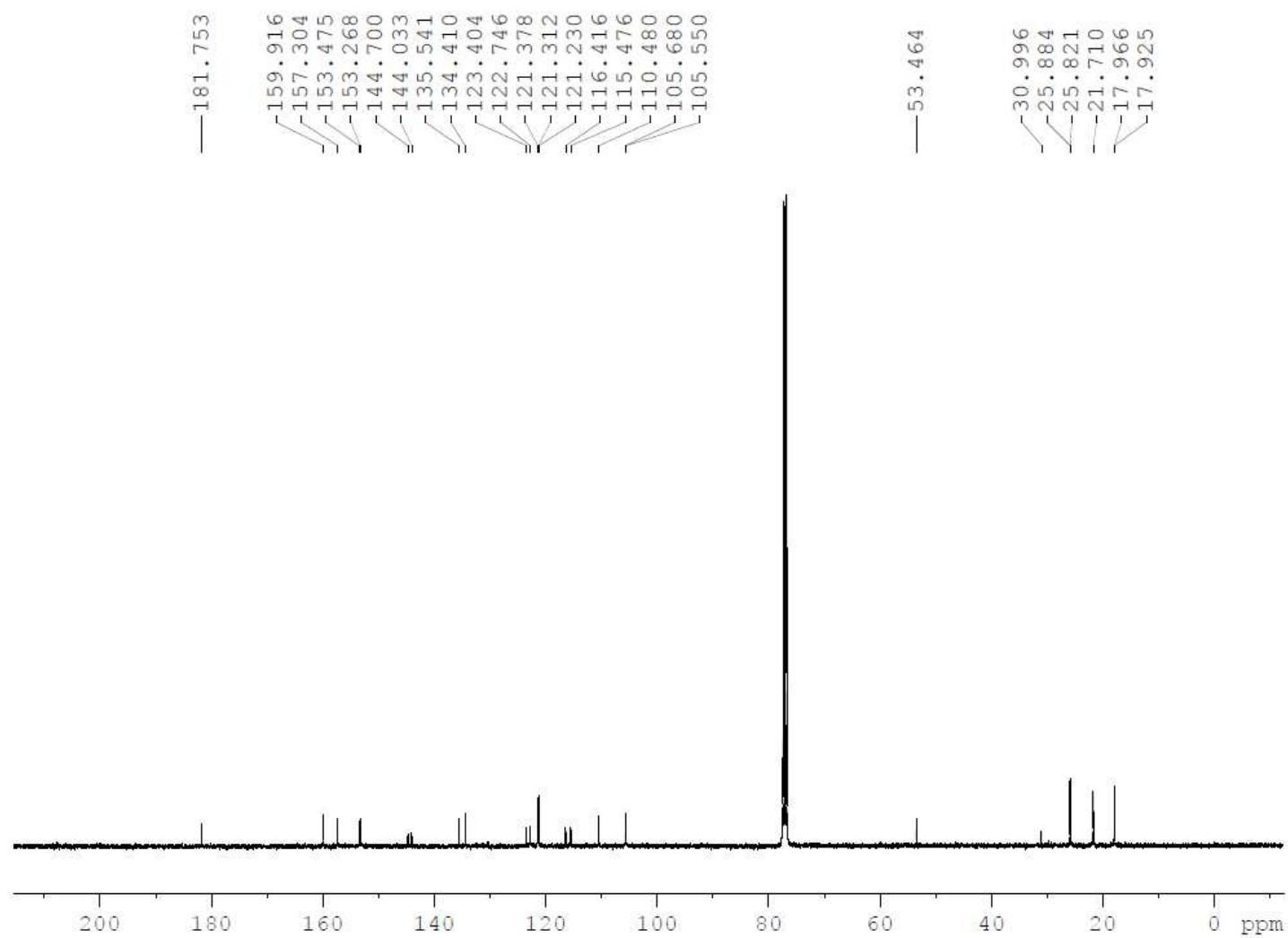


Figura S 28 - Espectro de RMN ^{13}C de *CMt_4* (CDCl_3 , 100 MHz)

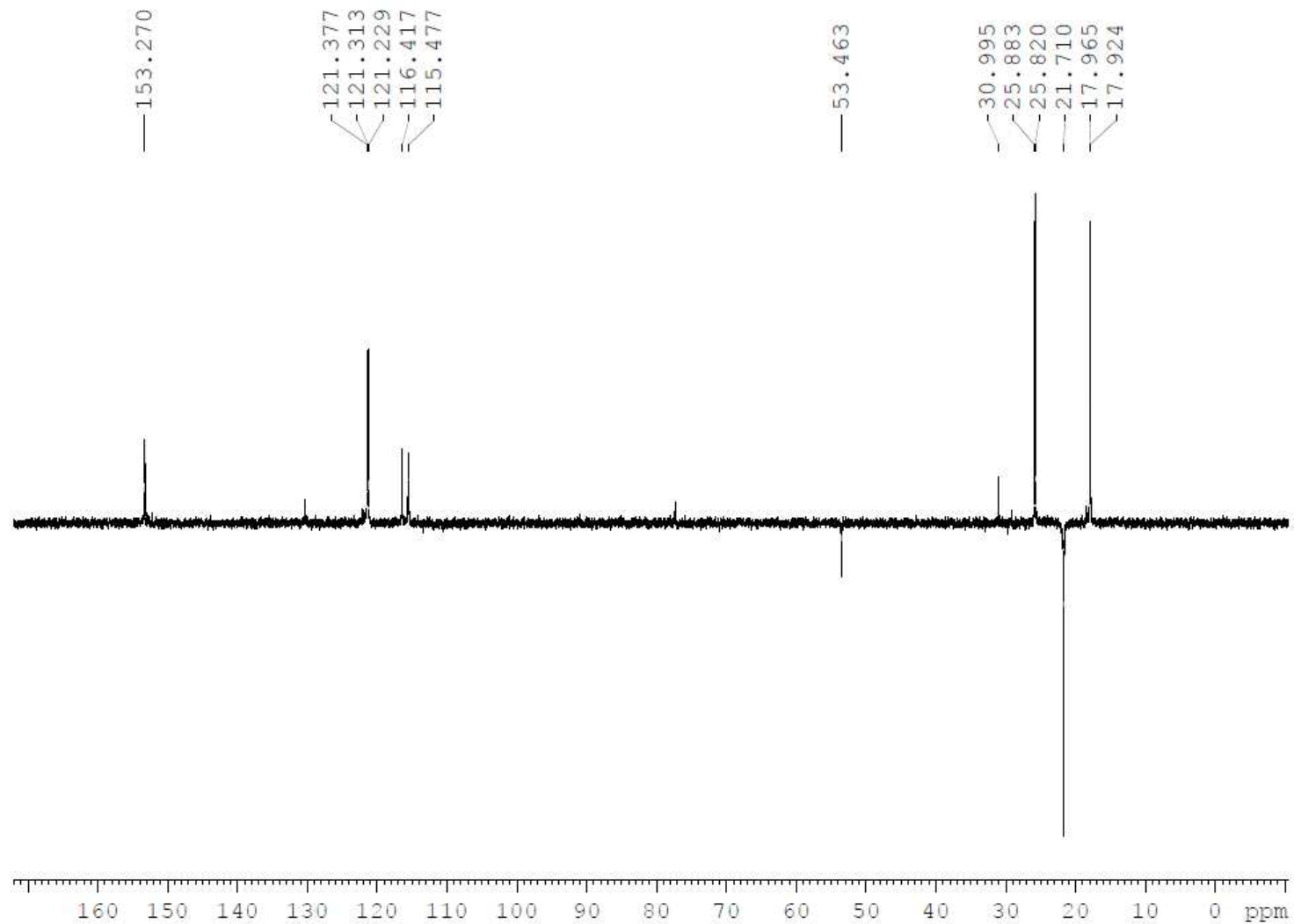


Figura S 29 - Subespectro DEPT-135 de *Cmt_4* (CDCl_3 , 100 MHz).

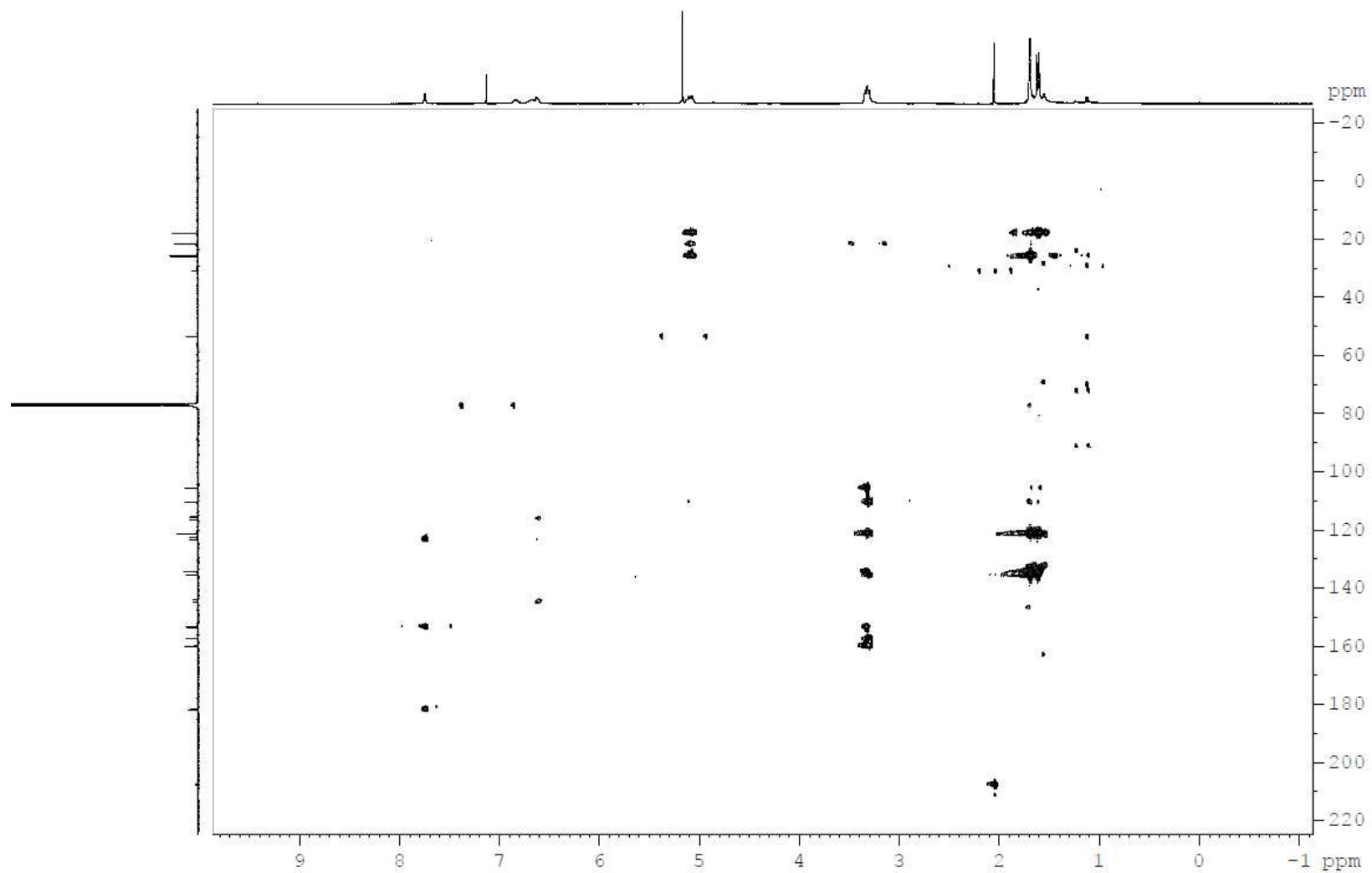


Figura S 30 - Mapa de contorno HMBC de *CMt_4* (CDCl_3 , 400 MHz), mostrando as correlações heteronucleares entre H-1''' ($\delta 3,32$) e C7 ($\delta 157,3$); H-1''' ($\delta 3,32$) e C9 ($\delta 153,3$)

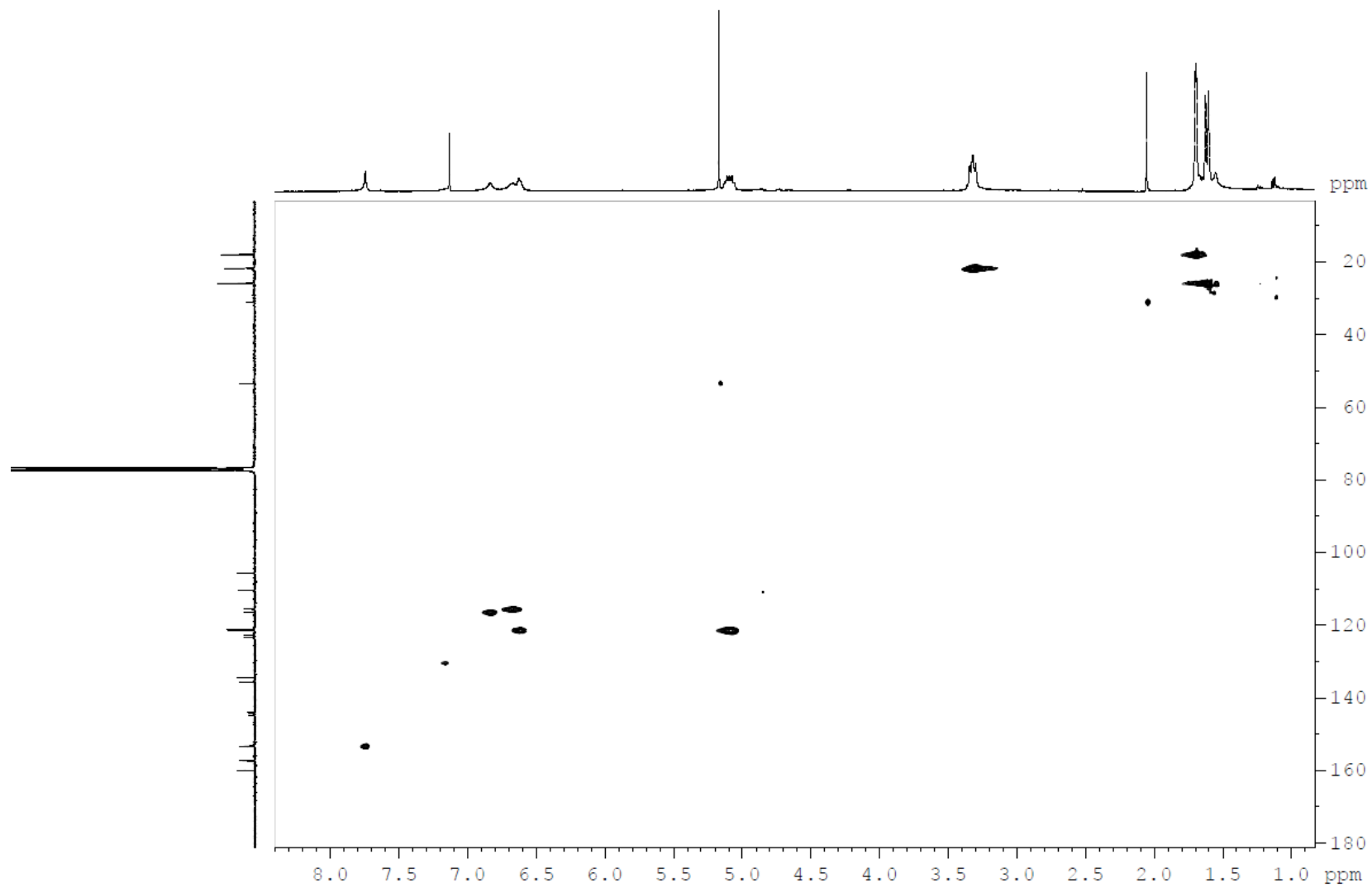


Figura S 31 - Mapa de contorno HSQC de *CMt*₄ (CDCl₃, 100 MHz para ¹³C e 400 MHz para ¹H)

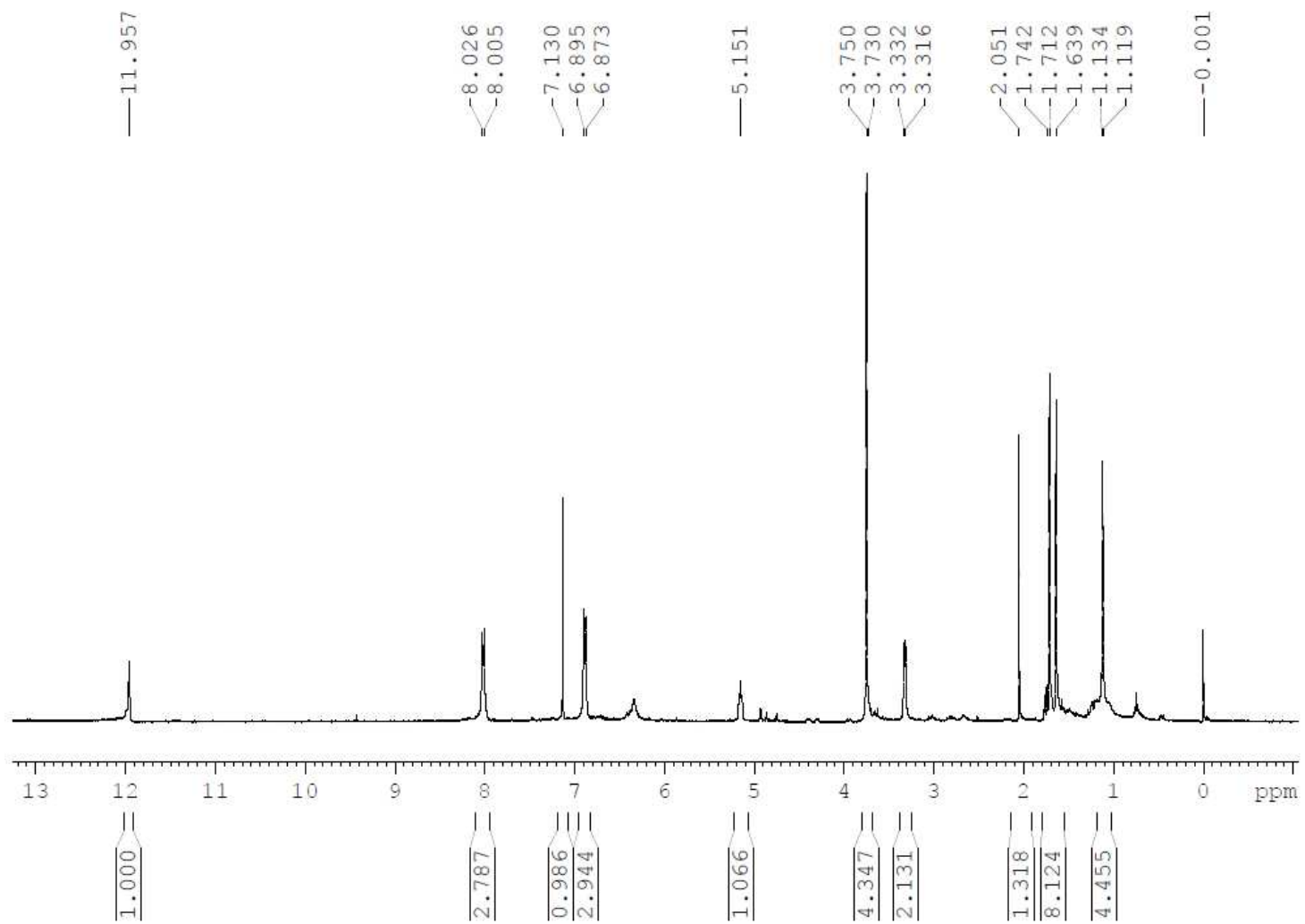


Figura S 32 - Espectro de RMN ^1H de *CMt_5* (CDCl_3 , 400 MHz)

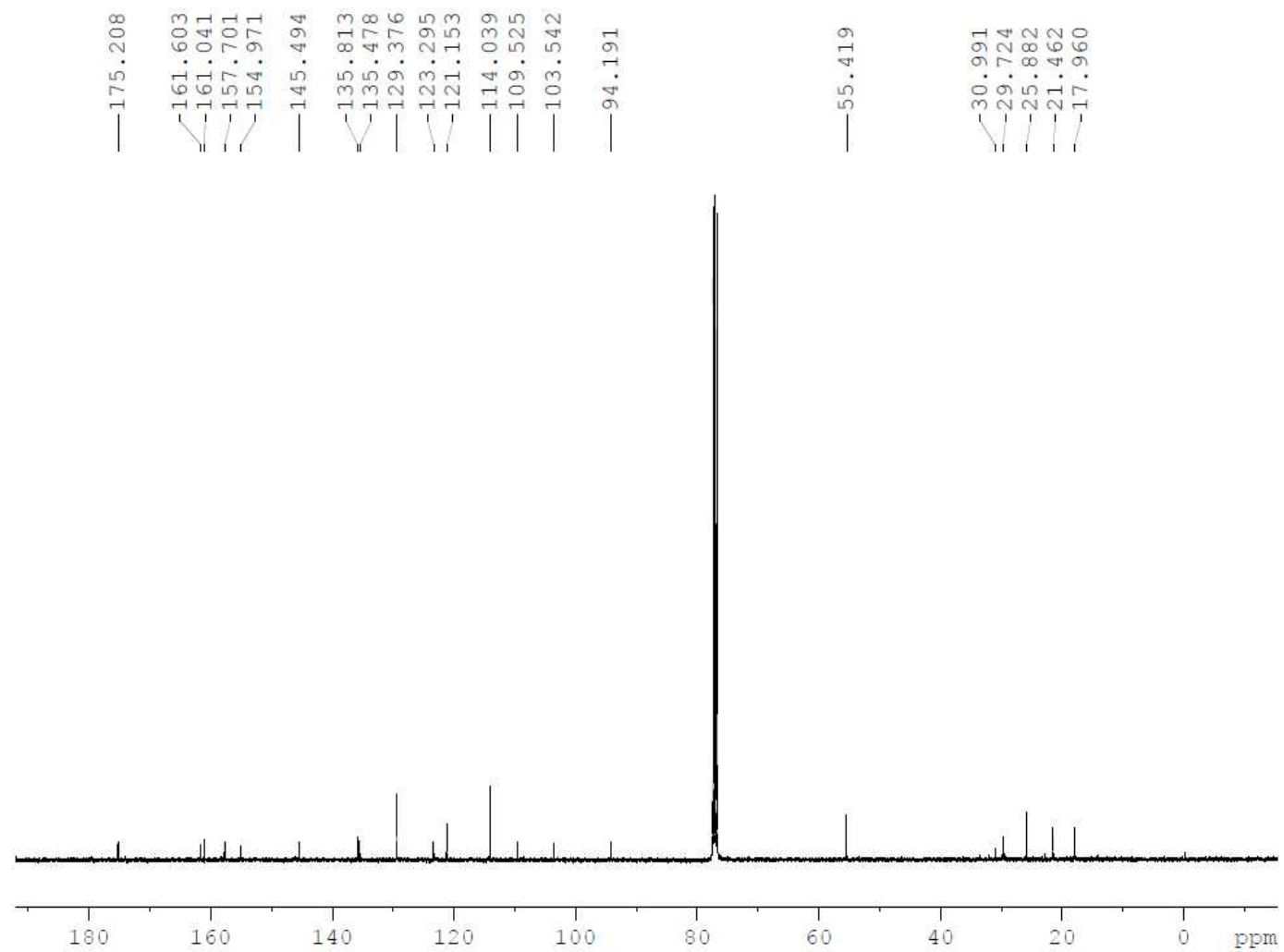


Figura S 33 - Espectro de RMN ^{13}C de *Cmt_5* (CDCl_3 , 100 MHz)

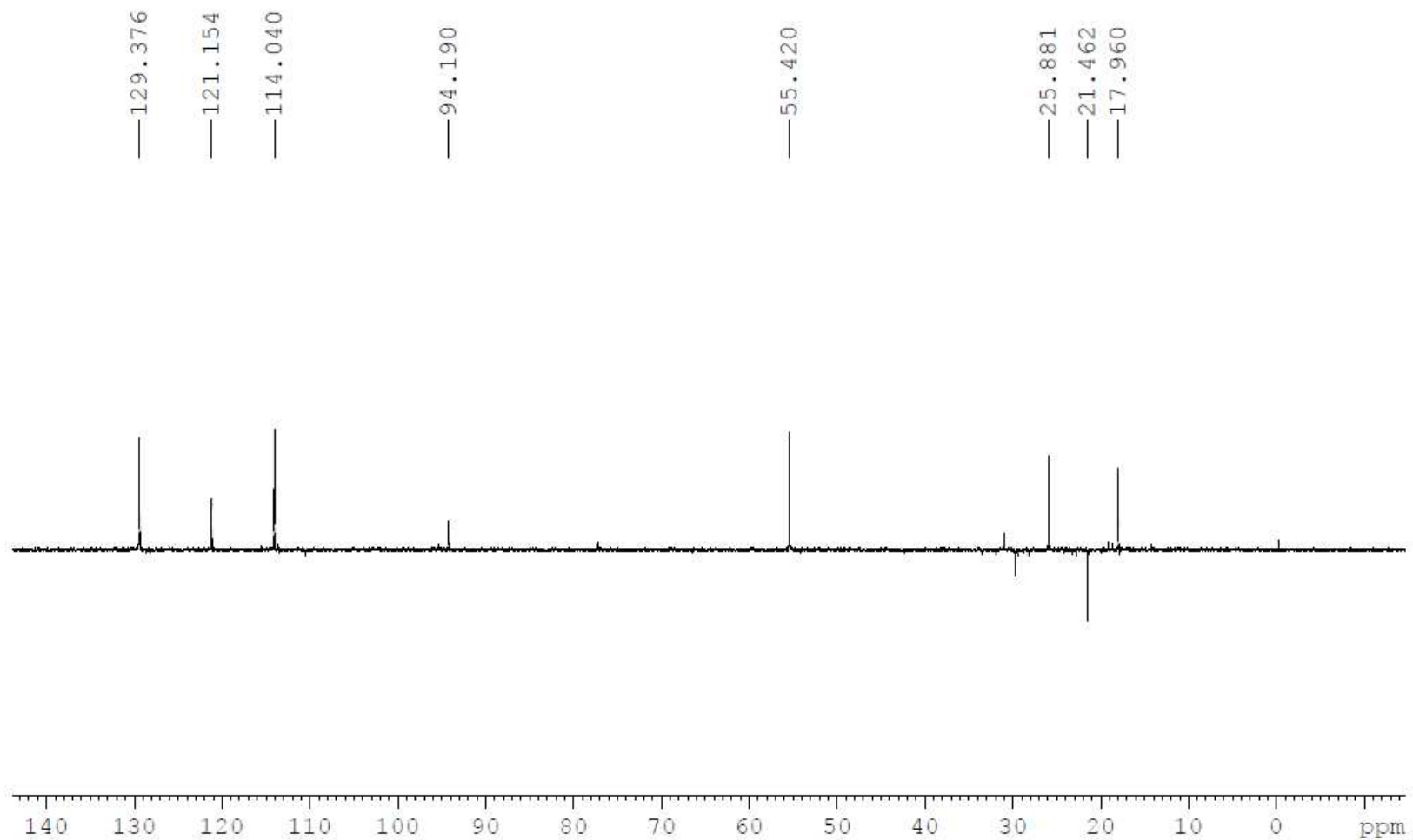


Figura S 34 - Subespectro DEPT-135 de *CMt_5* (CDCl_3 , 100 MHz).

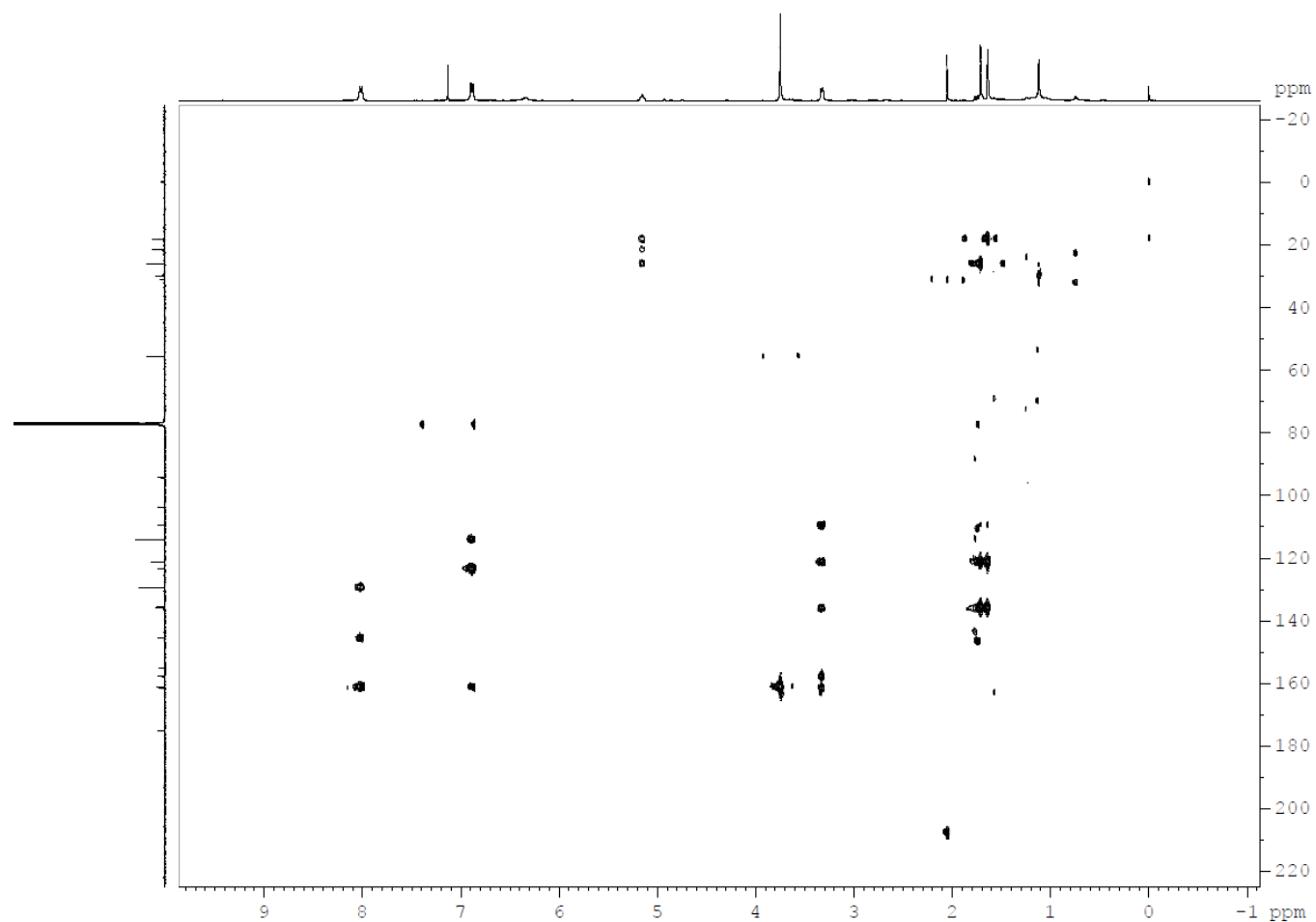


Figura S 35 - Mapa de contorno HMBC de *CMt_5* (CDCl₃, 400 MHz), mostrando as correlações heteronucleares entre H-1'' (δ3,36) e C6 (δ109,5); H-1'' (δ3,36) e C2'' (δ121,15); H-1'' (δ3,36) e C6 (δ109,5); OCH₂-H (δ3,74) e C7 (δ161,6); H-1'' (δ3,36) e C5 (δ157,8); H-1'' (δ3,36) e C7 (δ161,6).

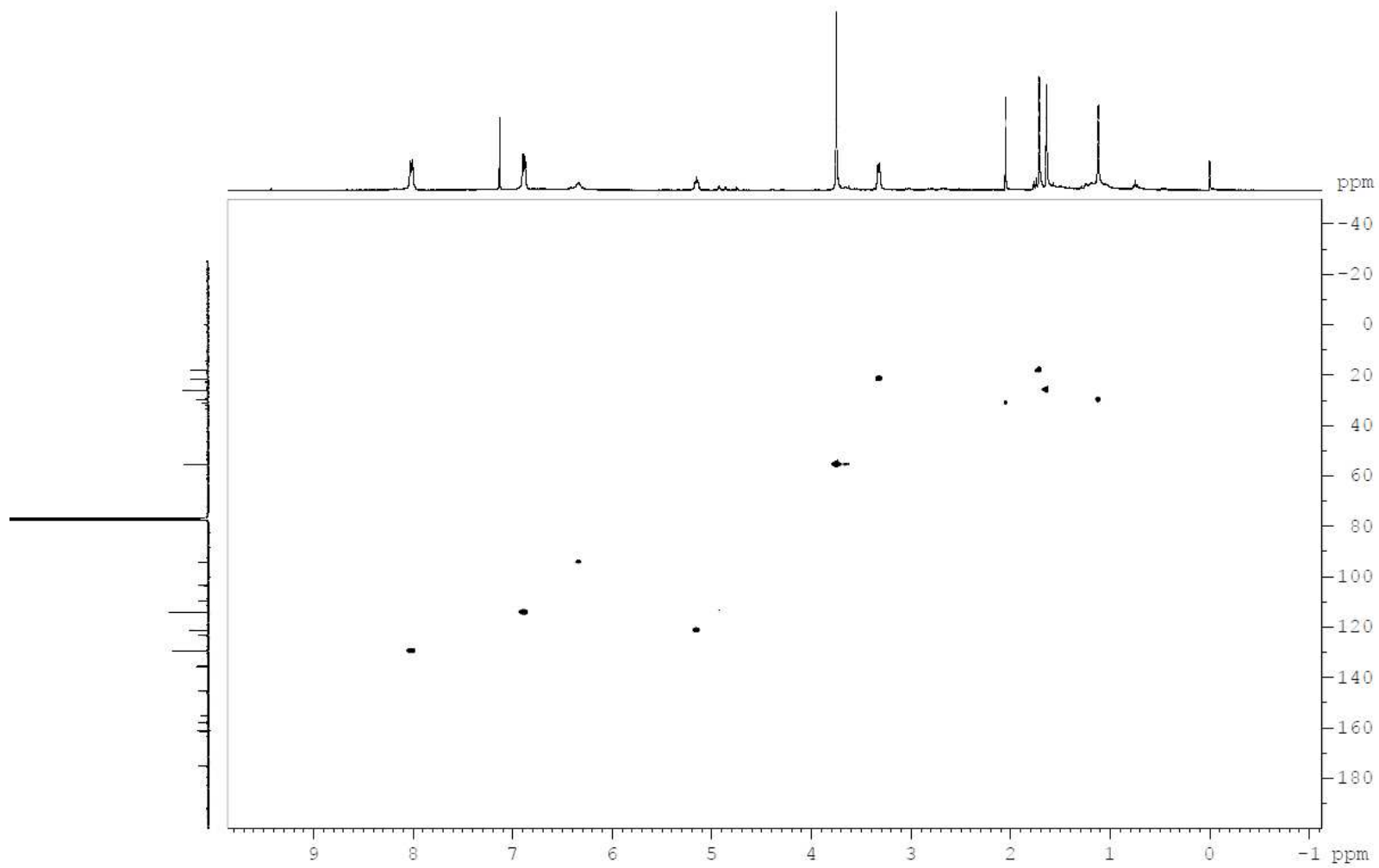


Figura S 36 - Mapa de contorno HSQC de *CMt_5* (CDCl_3 , 100 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H), mostrando a correlação heteronuclear entre H-1'' ($\delta 3,36$) e C-1'' ($\delta 161,6$).