



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Monnina oblongifolia*

BEATRIZ FELIX PIMENTA DA SILVA

Florianópolis
Novembro/2015

Beatriz Felix Pimenta da Silva

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Monnina oblongifolia*

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientadora: Inês Maria Costa Brighente

Florianópolis
11/2015

Beatriz Felix Pimenta da Silva

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Monnina oblongifolia*

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Profa. Ines Maria Costa Brighente
Orientadora

Profa. Patricia Devantier Neuenfeldt

Celso Rodrigo Nicoletti

Florianópolis
Novembro/2015

A minha amada mãe, Eduvirges,
minha irmã Luiza e para mim, dedico.

AGRADECIMENTOS

Durante toda a graduação muitas pessoas contribuíram de uma forma ou de outra, para o desenvolvimento deste trabalho, a todos vocês que se sentem parte deste trabalho, meus sinceros agradecimentos. Em especial agradeço:

À Eduvirges, minha mãe, amiga, companheira, porto seguro, meu refúgio. Agradeço todo o amor, zelo, cuidado e incentivo para que eu pudesse realizar meu sonho. Sem você nada seria possível!

À Rosângela e Luiza pelo apoio incondicional, pelo amor, pelas broncas, pelas risadas e trapalhadas. Vocês foram os meus alicerces para chegar onde estou.

Às minhas amigas Camila, Kauana, Isabelle, Laíse e Karla pela verdadeira amizade durante esses mais de dez anos. Agradeço imensamente por terem me ensinado que apesar das diferenças, o amor e a união sempre estarão entre nós.

Aos meus amigos e companheiros durante a graduação. Sheila, Jéssica, Suélen, Karin, Lila, Marília, Marcela, Mayara e Carolina vocês me fizeram ser uma pessoa melhor por todos os momentos juntas!

À Inês M. C. Brighente, minha orientadora, agradeço pela paciência e confiança depositada em mim durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores que me guiaram no início desta longa caminhada. Na resolução de problemas, na criação de questionamentos, nas noites mal dormidas que antecederam provas e principalmente nos momentos de puro altruísmo em que deram o seu máximo para o meu aprendizado. Muito obrigada!

Finalmente, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 Família <i>Polygalaceae</i>	10
2.2 Gênero <i>Monnina</i>	10
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivos gerais	16
3.2 Objetivos específicos	16
4 METODOLOGIA	17
4.1 Reagentes e Equipamentos	17
4.2. Material Vegetal	17
4.3. Fracionamento do extrato bruto	18
4.3.1. Filtração por coluna de sílica gel	18
4.3.2. Extração líquido-líquido	19
4.4 Testes de bancada	21
4.4.1. Determinação do conteúdo de fenólicos totais	21
4.4.2. Determinação do conteúdo de flavonoides	22
4.4.3. Determinação do potencial redutor	22
4.4.4. Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH	22
4.4.5. Teste de inibição da enzima acetilcolinesterase	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. Estudo fitoquímico	24
5.2. Análise dos Testes de bancada	40
5.2.1 Atividade antioxidante	40
5.2.2. Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase	44
6 CONCLUSÕES	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Aspectos morfológicos de <i>Monnina oblongifolia</i>	14
Figura 2. Glicosídeos de canferol encontrados em <i>M. sylvatica</i>	16
Figura 3. Bifenis e xantona isoladas de <i>M. sylvatica</i>	16
Figura 4. Xantona e bifenil encontradas em <i>M. obtusifolia</i>	17
Figura 5. Compostos isolados a partir de <i>M. obtusifolia</i>	17
Figura 6. Flavonóides isolados <i>M. obtusifolia</i>	18
Figura 7. Fluxograma da coluna cromatográfica do extrato bruto	21
Figura 8. Fluxograma da extração líquido-líquido	23
Figura 9. Fluxograma da coluna cromatográfica da fração acetato de etila	23
Figura 10. IV da sub-fração 17-20	28
Figura 11. Estrutura proposta para sub-fração 17-20: quercetina glicosilada..	28
Figura 12. RMN H ¹ da sub-fração 17-20	29
Figura 13. Ampliação do RMN H ¹ da sub-fração 17-20	29
Figura 14. IV da sub-fração 20-21	30
Figura 15. IV da sub-fração 49-53	31
Figura 16. Estrutura proposta para a sub-fração 49-53: ácido cumárico	31
Figura 17. RMN H ¹ da sub-fração 49-53	32
Figura 18. Ampliação do RMN H ¹ da sub-fração 49-53	33
Figura 19. RMN C ¹³ da sub-fração 49-53	33
Figura 20. RMN de H ¹ da sub-fração 3	35
Figura 21. RMN de H ¹ da sub-fração 4	35

Figura 22. RMN H ¹ da sub-fração 22	36
Figura 23. IV do precipitado butanol	37
Figura 24. Estrutura proposta para o precipitado butanol	37
Figura 25. RMN de H ¹ do precipitado butanol	38
Figura 26. Ampliação do RMN de H ¹ do precipitado butanol	39
Figura 27. RMN de C ¹³ do precipitado butanol	40
Figura 28. Ampliação do RMN de C ¹³ do precipitado butanol	40
Figura 29. RMN de C DEPT do precipitado butanol	41
Figura 30. RMN COSY do precipitado butanol	42
Figura 31. RMN HETCOR do precipitado butanol	42
Figura 32. Reação de oxi-redução na determinação de compostos fenólicos	44
Figura 33. Formação do anel estável de 6 membros do Al ⁺³ com o flavonóide	44
Figura 34. Reação de oxi-redução do teste que avalia o poder redutor	45
Figura 35. Reação do DPPH com um composto fenólico	45
Figura 36. Reação que ocorre no teste da inibição da enzima acetilcolinesterase	47

ÍNDICE DE TABELAS

1. Deslocamentos do RMN H ¹ da sub-fração 17-20	30
2. Deslocamentos do RMN H ¹ e do RMN C ¹³ da sub-fração 49-53	34
3. Deslocamentos dos espectros de RMN do precipitado butanol	44
4. Determinação do conteúdo de fenólicos, de flavonóides e avaliação da atividade antioxidante usando DPPH e poder redutor.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE - Acetilcolinesterase

AcOEt – Acetato de etila

BuOH - Butanol

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

DPPH – 2,2-difenil-2-picril-hidrazil

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

EtOH – Etanol

Fr - Fração

Hex – Hexano

HPLC - *High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

IC₅₀ – *Inhibitory Concentration 50%* (Concentração inibitória 50%)

IV – Espectroscopia no infravermelho

LC-MS – cromatografia líquida acoplada ao espectroômetro de massas

MeOH – Metanol

Ppt - Precipitado

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

Sub-Fr – Sub-fração

RESUMO

Monnina oblongifolia pertencente à família *Polygalaceae* é um sub-arbusto comumente encontrada em beira de estradas. No gênero *Monnina* foram encontrados metabólitos secundários como flavonóides glicosilados, xantonas e bifenis, ésteres de oligossacarídeos que de maneira geral apresentaram atividade antimicrobiana. Devido a ausência de relatos na literatura da espécie, o objetivo deste trabalho é fazer um estudo fitoquímico e biológico relativo a atividade antioxidante e de inibição da enzima acetilcolinesterase. As folhas e raízes secas foram trituradas e maceradas em álcool dando origem ao extrato bruto. Este foi fracionado por filtração em coluna de sílica gel gerando as frações hexano, acetato de etila e etanol. O fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila originou dois compostos sendo um deles uma quercetina glicosilada e o outro o ácido cumárico. Uma outra parte do extrato bruto foi também particionada por diferentes solventes. Na fração butanol foi observada a formação de um precipitado que quando analisado por métodos espectroscópicos foi identificado como sendo uma glicose ligada a um isopreno através de uma ligação éster. A fração acetato de etila obtida de ambos tratamentos com o extrato bruto (filtração em sílica e partição líquido-líquido) apresentou o maior conteúdo de fenólicos e de flavonóides, que por sua vez também está relacionado com a maior atividade antioxidante avaliada pelo teste do poder redutor e pela captura de radicais pelo DPPH. No teste de inibição da enzima acetilcolinesterase, aplicado ao extrato bruto e frações obtidas da filtração em leito de sílica gel, observou-se uma inibição maior que de 50% para o extrato bruto (72,5%) e para a fração etanol (73,4%). Já as frações hexano e acetato de etila inibiram a enzima em 44,2% e 38,0% respectivamente. Os valores da concentração de amostra necessária para obter 50% de inibição da enzima, foram de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato bruto e fração etanol, respectivamente. Estes resultados incentivam a busca de compostos ativos responsáveis por estas atividades.

Palavras-chave: Monnina oblongifolia, antioxidante, inibição da acetilcolinesterase.

INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais é conhecida desde os primórdios da humanidade. O homem sempre procurou na natureza soluções para tratar enfermidades, assim como pigmentos, venenos e ferramentas. O grande interesse nesse campo é devido a sua interdisciplinaridade abrangendo áreas como a química, biologia, farmácia e medicina.

Produtos naturais são metabólicos secundários que organismos vivos produzem e que não são utilizados para sua sobrevivência. No país existe uma grande abundância de biodiversidade, o que acarreta em muitas possibilidades de estudos nessa área. Ainda há muitas espécies para se descobrir e buscar novos compostos com princípios ativos com atividade para diversas terapias.

Uma planta pode produzir milhares de substâncias, sendo que somente apenas uma ou algumas delas são responsáveis pela sua atividade de defesa ou tóxica. Por isso se faz necessário o uso de testes biológicos simples e baratos a fim de encontrar atividades desejadas no extrato da planta e de suas frações.

Os testes de bancada são utilizados para detectar compostos ativos que estão presentes na planta em pequena concentração devendo ser específicos para um determinado alvo biológico. Os testes de bancada aplicados neste trabalho, são aqueles que detectam atividade antioxidante e atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase.

Inúmeros trabalhos taxonômicos, florísticos, fitoquímicos e biológicos sobre a família *Polygalaceae* já foram realizados no Brasil, assim como muitos outros ainda estão em desenvolvimento. Nesta família, já foram detectados: saponinas, xantonas, ligninas, cumarinas, flavonoides glicosilados e ésteres de oligossacarídeos.

No gênero *Monnina*, pertencente à família Poligalaceae, há pesquisas taxonômicas de suas espécies, porém os estudos fitoquímicos são escassos. Devido a isso, o objetivo deste trabalho é realizar um estudo fitoquímico e biológico de *M. oblongifolia*.

REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Família Polygalaceae

A família Polygalaceae é composta por 19 gêneros com aproximadamente 13.000 espécies, sendo encontradas em regiões tropicais e temperadas (Marques & Peixoto 2007). Na flora brasileira a família está representada por 10 gêneros, *Acanthocladus* Klotzsch ex Hassk., *Asemeia* Raf. emend. Small, *Barnhartia* Gleason, *Bredemeyera* Willd., *Caamembeca* J.F.B.Pastore, *Diclidanthera* Mart., *Monnina* Ruiz & Pav., *Moutabea* Aubl., *Polygala* L. e *Securidaca* L., que somam 191 espécies (Pastore et al., 2012). A Região Sul do Brasil está representada pelos gêneros *Bredemeyera*, *Monnina*, *Polygala* e *Securidaca*.

A família *Polygalaceae* vem sendo alvo de diversos estudos fitoquímicos, já tendo sido detectados saponinas, xantonas, ligninas, cumarinas, flavonoides glicosilados e ésteres de oligossacarídeos (Silveira & Falcão, 1995; Oliveira & Silveira, 2000; Pizzolatti et al. 2004; Li et al., 2006; Bashir et al., 1991). Algumas espécies de *Polygala* têm importância medicinal pela presença de salicilato de metila no córtex da raiz. O salicilato de metila é muito usado na indústria farmacêutica em medicamentos tópicos para o tratamento de contusões e dores musculares (Marques 1996). Dentre as muitas espécies de Polygalaceae reconhecidas pelo uso fitoterápico, *Polygala senega* L é a mais estudada. Esta espécie é popularmente conhecida como “polígala-da- virginia” ou “sénega” e foi utilizada por índios Apaches como antiofídica e também é citada no combate a bronquites, asma, coqueluche e reumatismo devido à sua ação expectorante (Marques 1989).

2.2. Gênero *Monnina*

O gênero *Monnina* foi estabelecido por Ruiz & Pavón, em 1798, tendo sido posicionado na Classe Diadelfia e Octandria de Linnaeus. Em 1808, Bonpland descreveu o gênero *Hebeandra* que mais tarde foi sinonimizado com *Monnina* por Kunth em 1823.

As espécies de *Monnina* são preferencialmente campestres, podendo ser eventualmente encontradas em beira de matas, como é o caso de *M. tristaniana*.

Algumas espécies como *Monnina cardiocarpa*, *M. cuneata*, *M. itapoanensis* e *M. resedoides* podem ocorrer nos solos arenosos do litoral. Ao contrário do gênero *Polygala*, as espécies de *Monnina* são menos freqüentes no campo, porém, sempre formam grandes populações (Ludtke, et al, 2009).

Monnina oblongifolia é caracterizada por apresentar fruto desprovido de alas, unisseminado e pela presença de nectários extraflorais na base do pecíolo e do pedicelo. São subarbustos que possuem 40-93 cm de altura com caule densamente piloso. Suas folhas apresentam pecíolo de 1-2 mm de comprimento e estão dispostas em toda a extensão do caule podendo ser obovadas ou oblongas apresentando base obtusa ou aguda. Flores de 4,5-5,5 mm comprimento, brancas, rosadas ou magenta (Ludtke, et al, 2009). Alguns aspectos morfológicos desta espécie podem ser observados na Figura 1.



Figura 1 – Aspectos morfológicos de *Monnina oblongifolia*

A espécie ocorre no Paraguai, Uruguai, Argentina e Brasil e no nosso país no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul onde é muito comum (Wurdack & Smith 1971; Marques 1989). Pode ser encontrada nos mais diversos ambientes, em campos limpos, secos ou úmidos, pedregosos, em barrancos de beira de estrada, morros graníticos e até mesmo em solos arenosos. Exemplares com flores e frutos foram coletados em todos os meses do ano (Ludtke, et al, 2008).

Monnina oblongifolia é classificada taxonomicamente como pertencente ao reino *Plantae*; filo *Magnoliophyta*; classe *Magnoliopsida*; ordem *Fabales*; família *Polygalaceae*; gênero *Monnina*; espécie *Monnina oblongifolia* Arechav

Na literatura não há relatos fitoquímicos e biológicos sobre *Monnina oblongifolia*, espécie foco deste estudo, conforme Ludtke (2008). Há somente estudos morfológicos desta espécie em razão disto, será abordado um levantamento bibliográfico de plantas do gênero *Monnina*.

Monnina obtusifolia é usada na medicina popular do Equador como antifúngico, antitumoral, antisséptico e na limpeza de pele. Também é usada como desintoxicante, eliminando a retenção de alimentos, promove o fluxo sanguíneo e possui uso como expectorante (Pinto et al., 1994).

Entre as espécies do gênero *Monnina* destacam-se os estudos sobre *M. sylvatica* e *M. obtusifolia*.

O fracionamento do extrato metanólico das partes aéreas de *M. sylvatica* levou ao isolamento de quatro glicosídeos de canferol: canferol 3-O- α -L-ramnosil(1,6)- β -D-galactosídeo **[1]**, canferol 3-O- β -D-apiosil(1,2)- β -D-galactosídeo **[2]**, canferol 3-O- β -D-apiosil(1,2)-O-[α -L-ramnosil(1,6)]- β -D-galactosídeo **[3]**, canferol 3-O- β -D-apiosil-(1,2)-O-[α -L-ramnosil(1,6)]- β -D-galactosídeo e canferol 3-O- β -D-glicosil-(1,2)-O-[α -L-ramnosil(1,6)]- β -D-galactosídeo **[4]** (Bashir et al., 1991).

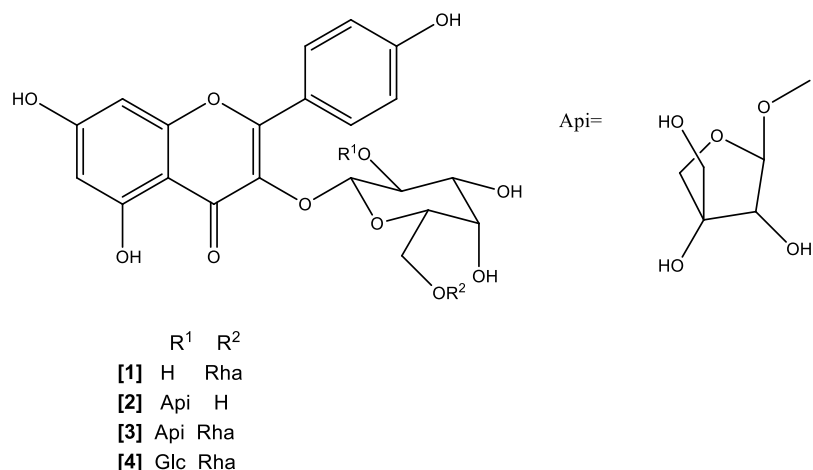


Figura 2 – Glicosídeos de canferol encontrados em *M. sylvatica*

No extrato de diclorometano obtido das raízes de *M. sylvatica* foram isolados dois bifenis: 3'-hidroxi-4',5-dimetoxi-3,4-metilenodioxibifenil **[5]** e 3',4',5-trimetoxi-3,4-metilenodioxibifenil **[6]** que apresentaram atividades antifúngicas e uma xantona previamente conhecida, 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona **[7]**. O composto **[5]** mostrou atividade antifúngica contra *Cladosporium cucumetinum*, *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes* (Bashir et al., 1992).

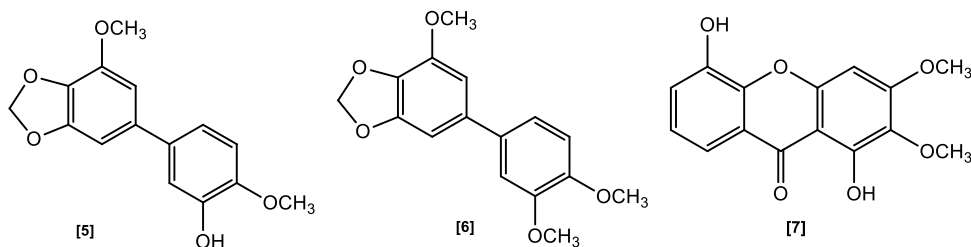


Figura 3 - Bifenis e xantona isoladas de *M. sylvatica*

A partir do extrato de diclorometano das partes aéreas de *M. obtusifolia* foram isolados quatro xantonas: 1,3,5-trihidroxi-2-metoxixantona **[8]**, 1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona **[9]**, 1,5-dihidroxi-3-metoxixantona **[10]**, 1,3-dihidroxi-2,5-dimetoxixantona **[11]** e três bifenis: 3'-hidroxi-5-metoxi-3,4-metilenodioxibifenil **[12]**, 3'-hidroxi-4',5-dimetoxi-3,4-metilenodioxibifenil **[13]** e 3'-hidroxi-5',5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxibifenil **[14]** foram isoladas desse extrato (Pinto et al., 1994).

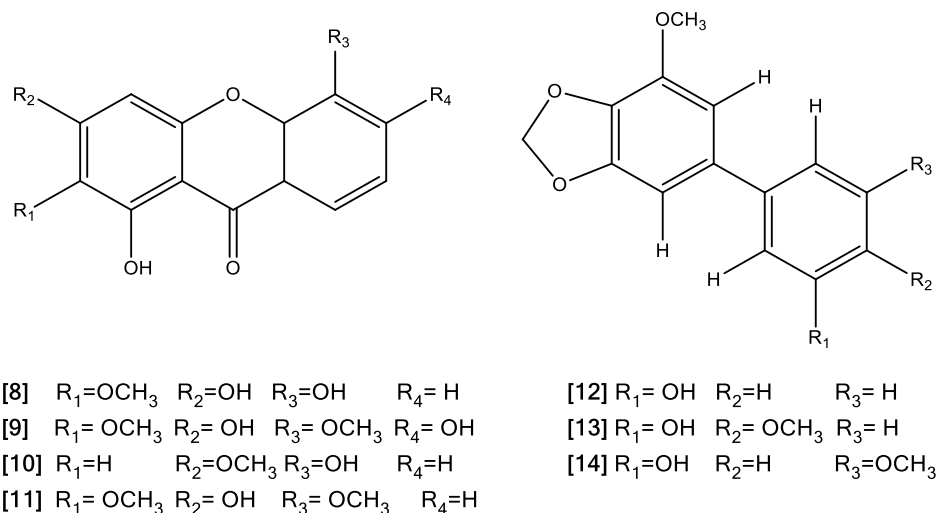


Figura 4 - Xantonas e bifenis encontradas em *M. obtusifolia*

O fracionamento sucessivo do extrato butanólico das partes aéreas de *Monnina obtusifolia* em butanol levou ao isolamento de seis compostos: 1-O-(ácido-4-hidroxi-2-metileno-butanóico)-6-O-β-D-(4-hidroxi-2-metileno-butanoil)-glicopirranose **[15]**, 1-O-(isopentenil)-6-O-β-D-(4-hidroxi-2-metileno-butanoil)-glicopirranose **[16]**, 1-O-(ácido-4-hidroxi-2-metileno-butanóico)-6-O-β-D-(isovaleroil)-glicopirranose **[17]**, 1-O-(3-metilbut-3-enil)-6-O-β-D-(isovaleroil)-glicopirranose **[18]** e dois ésteres de sacarose, 3,4-O-β-D-di-feruloil-frutofuranosil-6-O-α-D-(p-cumaroil)-glicopiranosídeo **[19]**, e 3,4-O-β-D-di-feruloil-frutofuranosil-6-O-α-D-(cafeoil)-glicopiranosídeo **[20]** (Lepore et al., 2011).

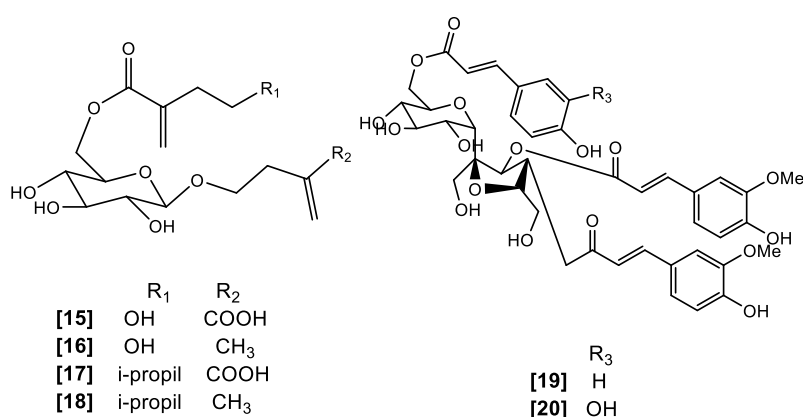


Figura 5 - Compostos isolados a partir de *M. obtusifolia*

O fracionamento HPLC do extrato solúvel em butanol de *M. obtusifolia* forneceu também os seguintes flavonóides: quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo **[21]**, quercetina 3-O-β-D-galactopiranosil-(1,6)-glicopiranosídeo **[22]**, quercetina 3-O-

β -D-xilopiranosil-(1,2)-galactopiranosídeo [23] e quercetina 3-O- β -D-apiofuranosil-(1,2)-galactopiranosídeo [24] (Lepore et al., 2011).

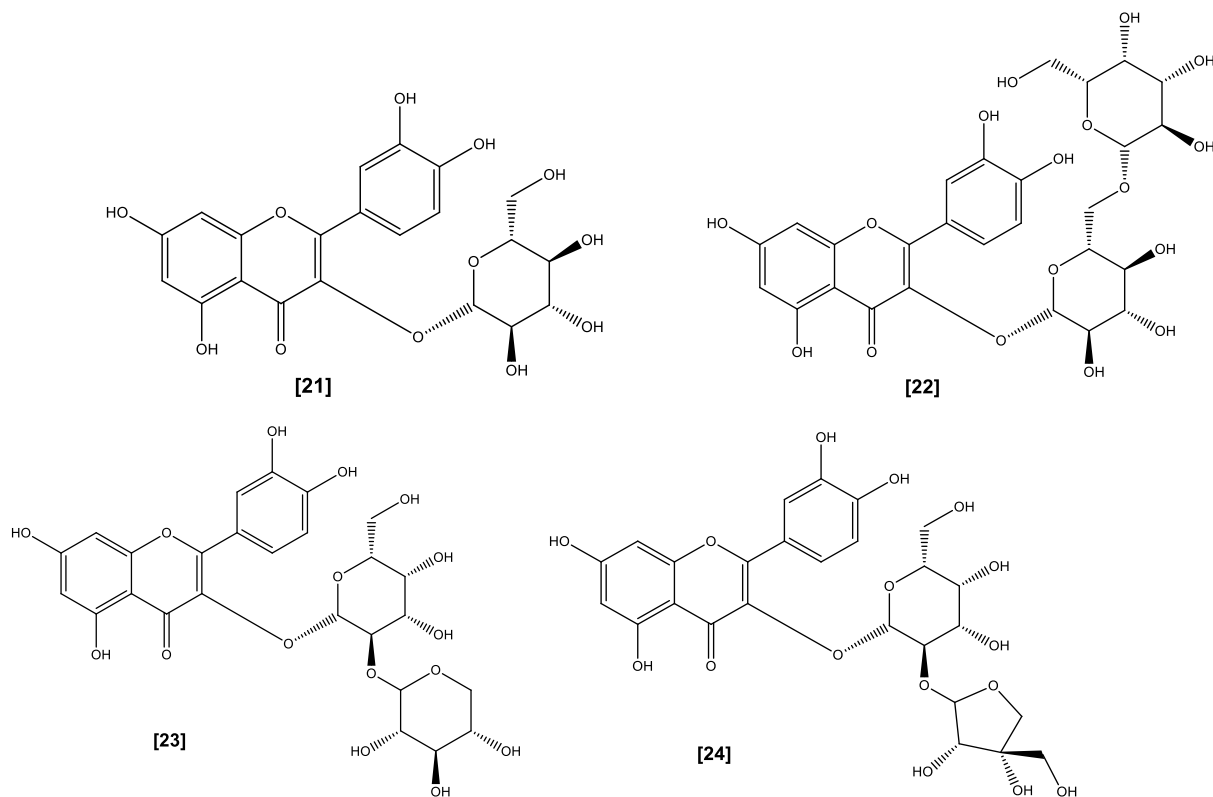


Figura 6 - Flavonóides isolados *M. obtusifolia*

OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste projeto é o estudo biológico e fitoquímico de *Monnina oblongifolia* na busca de compostos com atividade antioxidante e inibidora da enzima acetilcolinesterase.

3.2. Objetivos Específicos:

Especificamente, têm-se os seguintes objetivos:

3.2.1. Coletar e obter o extrato bruto das partes aéreas de *Monnina oblongifolia*;

3.2.2. Fracionar o extrato bruto através de filtração em leito de sílica gel, a fim de obter a fração hexano, acetato de etila e etanol;

3.2.3. Particionar o extrato bruto através de extração líquido-líquido com diferentes solventes, como hexano, acetato de etila e butanol;

3.2.4. Fracionar através de cromatografia em coluna algumas frações obtidas do fracionamento do extrato bruto;

3.2.5. Analisar por cromatografia em camada delgada as sub-frações obtidas na cromatografia em coluna;

3.2.6. Purificar através de recristalização as sub-frações que se apresentarem na forma de sólido e com um bom rendimento;

3.2.7. Determinar as constantes físicas dos possíveis compostos isolados e purificados;

3.2.8. Analisar os compostos purificados por meio de métodos espectrométricos;

3.2.9. Aplicar os ensaios antioxidantes através do teste que avalia o poder redutor e aquele que avalia a captura de radicais livres pelo DPPH ao extrato bruto e diferentes frações, comparando com o teor de fenólicos e flavonoides nestas amostras.

3.2.10. Aplicar o ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase ao extrato bruto;

METODOLOGIA

4.1. Reagentes e Equipamentos

Foram utilizados diversos solventes obtidos comercialmente tais como etanol, metanol, acetona, hexano, acetato de etila, butanol e diclorometano. Foi utilizado também sulfato de sódio anidro como sal dissecante, ferricianeto de potássio, DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), ácido acético, ácido ascórbico, ácido gálico, sílica gel para colunas cromatográficas, cromatoplasmas de alumínio cobertas com sílica gel 60 para cromatografia em camada delgada (CCD) de 0,2 mm de espessura (Merck). Como revelador foi utilizado uma solução de anisaldeído sulfúrico 5% em metanol.

Utilizou-se os equipamentos como estufa, rota evaporador, balança analítica, gabinete revelador cromatográfico, espectrofotômetro UV-VIS PERKIN ELMER Lambda2S, câmara com luz UV e um aparelho digital Micro Química MQA PF – 301 para medir o ponto de fusão. Os espectros de IV foram analisados através de um espectrômetro ABB FTLA 2000 e as análises de RMN de ^{13}C e ^1H foram realizadas nos equipamentos VARIAN NMR AS 400 (400 MHz) e BRUKER AC200 (200 MHz).

Para o ensaio com a enzima acetilcolinesterase se utilizou as seguintes soluções tampões: Tampão A – solução de Tris-HCl 50 mM pH = 8,0; Tampão B – solução de Tris-HCl 50 mM pH = 8,0 acrescido de 0,1 % de soro albumina bovina; Tampão C – solução de Tris-HCl 50 mM pH = 8,0 acrescido de NaCl 0,1 M e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02 mol/L. Foram utilizados também soluções de iodeto de acetiltiocolina, reagente de Elman (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico-DTNB) e a enzima acetilcolinesterase liofilizada (Tipo VI-S obtida de *Electroparus electricus*). Todos estes reagentes foram obtidos da Aldrich.

4.2. Material Vegetal

Foram realizadas duas coletas no município de Painel-SC. Uma realizada no dia 11/05/14 e outra em 15/06/14 totalizando uma massa de 415 g de amostra vegetal fresca.

O material vegetal recolhido foi seco por 3 dias a 50°C, moído, e macerado em etanol 96% por três vezes seguidas com intervalos de 7 dias. Após a evaporação do solvente, foi obtido o extrato bruto (EB) de massa total igual a 33,17g.

4.3. Fracionamento do extrato bruto

O extrato bruto foi particionado de duas maneiras: através de uma filtração em coluna de sílica gel com diversos eluentes e através de uma extração líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades.

4.3.1. Filtração por coluna de sílica gel

A filtração do extrato bruto em coluna de sílica gel foi realizada com hexano, acetato de etila e etanol. A fração acetato de etila originou uma massa sequencialmente de 4 g que foi posteriormente separada por cromatografia em coluna (**coluna 1**). Para a realização da cromatografia em coluna foi feita uma pastilha contendo 8 g de sílica gel e 4 g da fração e os solventes utilizados foram hexano e acetato de etila com aumento gradual da polaridade. A cromatografia em coluna originou 80 sub-frações que foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD). As frações analisadas que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas (Figura 7). As frações que se apresentaram na forma de cristal foram purificadas por recristalização. Estas frações tiveram suas constantes físicas determinadas e algumas delas foram analisadas por espectroscopia no IV, RMN H¹ e RMN C¹³.

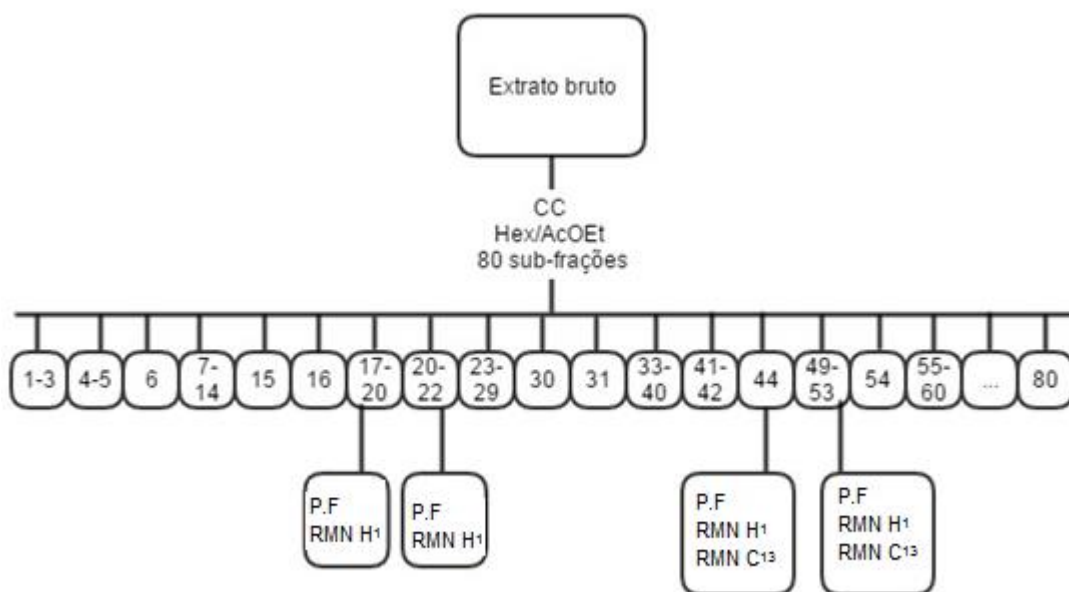


Figura 7- Fluxograma da coluna cromatográfica do extrato bruto

Somente as sub-frações 17-20, 20-22 e 49-53 desta coluna foram purificadas. As sub-frações 20-22 da coluna 1 deram uma quantidade razoável de um sólido verde que foi fracionado por cromatografia em coluna (**coluna 2**) com hexano/acetato de etila/etanol como eluentes gerando 21 sub-frações. Essa coluna não originou nenhum sólido para posterior recristalização então foram feitas análises espectroscópicas nessas sub-frações.

4.3.2. Extração líquido-líquido

Uma segunda parte do extrato bruto ($m = 31,07$ g) foi suspensa em etanol 30%, formando um material insolúvel, que posteriormente foi filtrado gerando uma resina (13,4%) e uma parte solúvel. Na parte solúvel realizou-se extração com hexano em dez vezes de 100 mL para originar 1,50 g de fração hexano. Posteriormente a fase aquosa foi extraída com acetato de etila em somente duas vezes pois houve formação de emulsão (Fr AcOEt emulsão 1 de $m = 0,23$ g). Para tentar amenizar a formação de emulsão, a parte aquosa foi submetida a rotaevaporação para retirar a possível presença de solvente. A fase aquosa foi submetida a três novas extrações com acetato de etila mas ainda houve formação de emulsão (Fr AcOEt emulsão 2; $m = 2,57$ g) porém houve também a presença de uma fase orgânica sem emulsão (Fr AcOEt; $m = 6,05$ g). Por fim realizou-se uma extração com butanol (seis vezes) gerando um precipitado (ppt Fr BuOH de $m = 0,6103$ g) e a fração butanol (Fr BuOH), que não foi rotaevaporada (Figura 8).

A fração hexano foi fracionada em cromatografia em coluna (**coluna 3**) com hexano/acetato de etila/etanol como eluentes gerando 38 sub-frações que não originaram sub-frações na forma de sólidos mas sim com aspecto de graxa e por consequência não foram analisadas espectroscopicamente.

A fração acetato de etila também foi fracionada por cromatografia em coluna (**coluna 4**) utilizando hexano/acetato de etila/etanol como eluentes originando 30 sub-frações (Figura 9) em que três destas (sub-fr 3, 4 e 22) foram recristalizadas

com acetona gerando sólidos que foram analisados por IV, RMN H¹ e RMN C¹³ e tiveram seus pontos de fusão determinados.

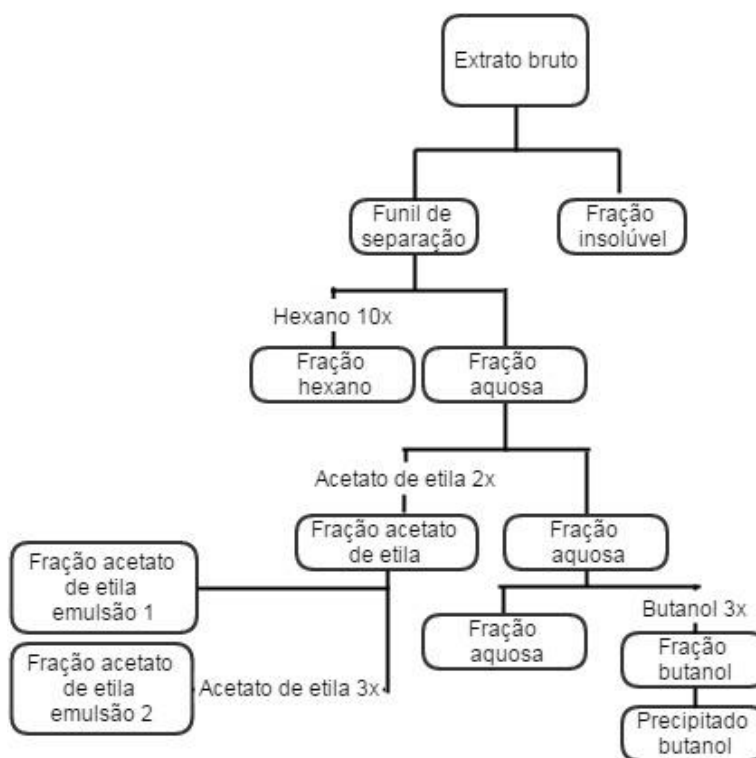


Figura 8 - Fluxograma da extração líquido-líquido

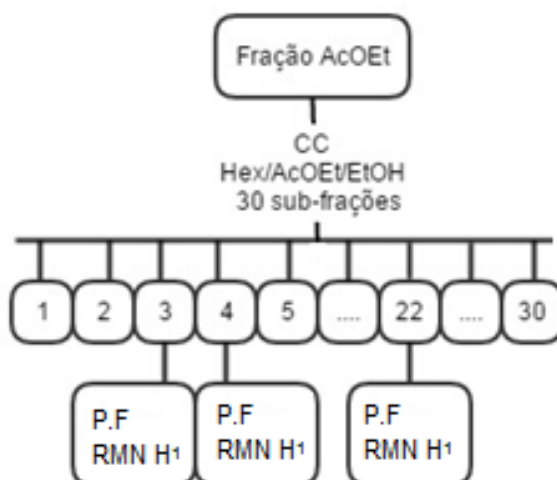


Figura 9– Fluxograma da coluna cromatográfica da fração acetato de etila

O extrato bruto e as diferentes frações isoladas foram submetidos aos ensaios que determinam o conteúdo de fenólicos totais e de flavonoides para relacionar com testes antioxidantes que avaliam o poder redutor e a captura de radicais livres pelo DPPH, além do teste que avalia a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase.

4.4. Testes de bancada

4.4.1. Determinação do conteúdo de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi determinado de acordo com o método adaptado por Brighente, et al. (2007). A cada 0,5 mL de uma solução etanólica da amostra vegetal ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), foram adicionados 5 mL de água destilada e 0,25 mL do reativo Folin-Ciocalteu. Após três minutos, foram adicionados 1,0 mL da solução saturada de Na_2CO_3 , agitou-se e a solução descansou por uma hora. A absorbância da solução foi determinada em espectrofotômetro UV-vis a 720 nm. O teste foi realizado em triplicata. Como branco utilizou-se uma solução preparada conforme descrito acima, porém, sem a presença da solução de amostra vegetal. Um aparecimento da cor azul esverdeada é indicativo da presença de fenólicos no extrato ou fração testada. O conteúdo de fenólicos foi obtido através de uma curva de calibração com solução de ácido gálico (AG) e expresso em mg AG/g de amostra vegetal.

4.4.2. Determinação do conteúdo de flavonoides

A determinação do conteúdo de flavonoides segue o seguinte método, descrito por Moresco et al, 2012. A cada 50 μL de uma solução etanólica da amostra vegetal ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em microplacas de 96 peças foram adicionados 200 μL de etanol e 50 μL de uma solução AlCl_3 2% em etanol. Após uma hora de repouso, foram feitas as leituras das absorbâncias das misturas em espectrofotômetro UV-VIS a 415 nm. O teste foi feito em triplicata. Como branco, foi utilizada uma solução preparada como descrito acima, porém sem a presença de AlCl_3 . O conteúdo de flavonoides foi obtido através de uma curva de calibração com solução de quercetina (QE) e expresso em mg QE/g de amostra vegetal.

4.4.3. Determinação do potencial redutor

A análise da atividade antioxidante através da determinação do potencial redutor foi realizada seguindo a metodologia Moresco, et al, 2012. As misturas reacionais foram preparadas contendo 50 µL de solução etanólica de amostra vegetal diluídas em metanol (1000 µg.mL⁻¹), 195 µL de água deionizada e 50 µL de uma solução de FeCl₃ 0,1 mol/L em HCl 0,1 mol.L⁻¹. Após três minutos adicionou-se 100 µL de uma solução de ferricianeto de potássio 0,008 mol/L. Após 15 minutos foi feita a leitura da absorbância da amostra em espectrofotômetro a 720 nm. Como branco foi utilizado uma solução preparada conforme o procedimento anterior, porém sem a amostra vegetal. A análise de dados foi feita construindo-se uma curva de calibração utilizando solução de ácido ascórbico para comparação. O potencial redutor das amostras é expresso em equivalente de ácido ascórbico (mg ácido ascórbico/g de extrato ou fração). Este estudo foi realizado em triplicata. O aparecimento da cor azul de Prússia é um indicativo de poder redutor.

4.4.4. Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH

A partir da metodologia usada por Moresco et al, 2012, foi feita a avaliação da ação sequestradora de radicais livres usando o DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil). Adiciona-se uma alíquota de 100 µL de solução de DPPH em etanol (0,004%) a 60 µL de extrato etanólico vegetal 1000 µg/mL. A mistura em seguida foi agitada e deixada em repouso por 30 minutos. A absorbância do DPPH nas soluções foi determinada em um espectrofotômetro UV-Vis a 517 nm. A análise foi realizada em triplicata. Através da leitura da absorbância de uma solução de DPPH (200 µL) acrescida de 100 µL de EtOH, foi obtido a absorbância do DPPH (Abs_{controle}). Como branco (Abs_{branco}) foi utilizada solução com etanol (240 µL) e solução da amostra (60 µL). A absorbância da amostra (Abs_{amostra}) é convertida em porcentagem da atividade antioxidante usando a fórmula:

$$AA\% = 100 - [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle}$$

Como padrões foram usados ácido ascórbico e ácido gálico. Para as amostras vegetais que na concentração de 200 µg.mL⁻¹ (na microplaca) apresentarem valores de atividade antioxidante maior que 50%, determina-se então a concentração necessária para diminuir em 50% a absorbância do DPPH, ou seja,

a concentração efetiva 50 % (CE₅₀) através de um gráfico, onde graficou-se a % de DPPH que desaparece em função da concentração das amostras.

4.4.5. Teste de inibição da enzima acetilcolinesterase

Seguiu-se a metodologia adaptada da literatura de Magina et al 2012 para a aplicação deste teste. Inicialmente as amostras foram dissolvidas em etanol (0,1 mg/mL), e então uma fração de 30 µL desta amostra foi adicionada a 90 µL do tampão tris-HCl 50 mmol/L pH = 8 em uma microplaca de 96 peças, seguida da adição de 15 µL da enzima acetilcolinesterase. Após 15 minutos, foi acrescentado 25 µL iodeto de acetilticolina e 140 µL do reagente de Ellman. A leitura foi efetuada em espectrofotômetro UV-Vis a 405 nm após 30 minutos. O fármaco Reminyl, que contém galantamina, foi utilizado como controle positivo na concentração de 0,01 mg/mL. Como controle negativo, onde a atividade enzimática é considerada 100%, foi utilizado 30 µL de etanol em vez da amostra. A taxa de inibição enzimática foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$I(\%) = 100 - (A_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}} / A_{\text{controle}}) \times 100$$

A_{amostra} é a absorbância da amostra junto aos reagentes e enzima e A_{controle} é a absorbância do controle negativo. Os testes foram conduzidos em triplicata e no branco ($\text{Abs}_{\text{branco}}$) o tampão tris-HCl foi utilizado em vez da enzima. Os valores de IC₅₀ foram determinados através de um gráfico da porcentagem de inibição em função da concentração da solução da amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo fitoquímico

O extrato hidroalcoólico bruto obtido de *M. oblongifolia* teve um rendimento de 8 g % a partir do material vegetal fresco. Uma parte do extrato bruto foi filtrada com diferentes solventes por coluna de sílica gel a fim de obter as diferentes frações, como frações hexano, fração acetato de etila e fração etanólica.

O particionamento cromatográfico através da cromatografia em coluna da fração acetato de etila (4 g) forneceu 80 sub-frações. Dentre essas sub-frações que foram reunidas por semelhança em seu perfil cromatográfico, as sub-frações 17-20, 20-21 e 49-53 foram purificadas em acetona e analisadas por espectroscopia no IV e RMN.

A sub-fração 17-20 obtida da **coluna 1** (Hexano: AcEtOH 80:20) se apresentou como sendo um sólido amorfo amarelo mas seu ponto de fusão não pode ser determinado porque o composto carboniza.

O espectro de IV desta fração (Figura 10) mostrou bandas típicas de absorção referentes a estiramento de grupos –OH em 3420 cm^{-1} , referente a absorção da ligação C-H em 2959 e 2918 cm^{-1} e em 1713 cm^{-1} observa-se o estiramento referente a absorção do grupo $>\text{C}=\text{O}$. Em 1629 cm^{-1} observa-se uma banda de média intensidade referente ao estiramento da ligação CH de anel aromático. É interessante ressaltar a diferença de intensidade entre as bandas de absorção da ligação –OH e -CH, indicando que o composto é altamente hidroxilado.

A análise conjunta dos espectros de IV e RMN de H^1 e comparação dos espectros de RMN de H^1 com a literatura revelaram a possível estrutura de um flavonoide glicosilado, com a parte aglicona sendo constituída por uma quercetina, Figura 11.

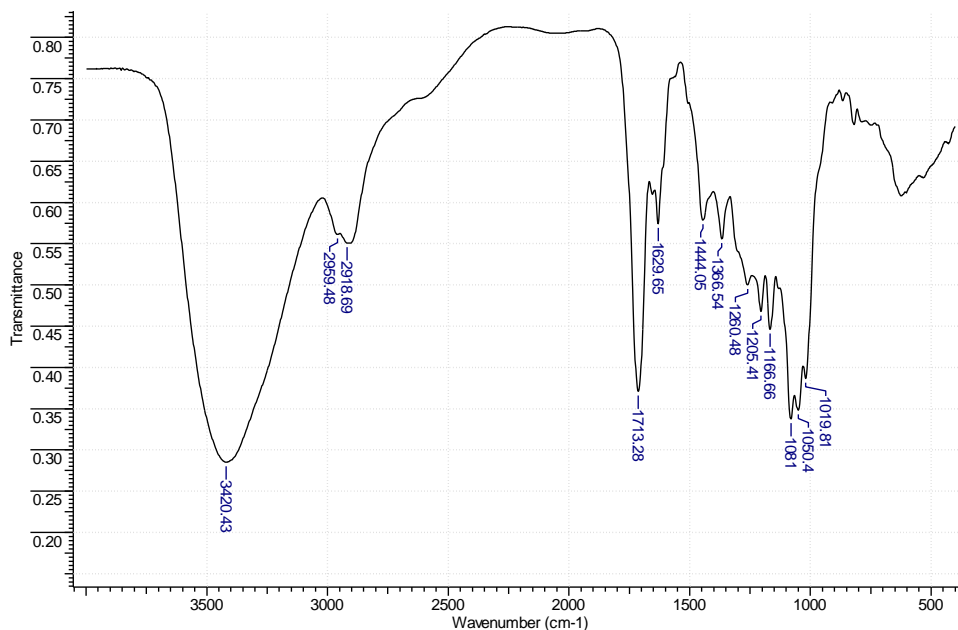


Figura 10 - IV da sub-fração 17-20

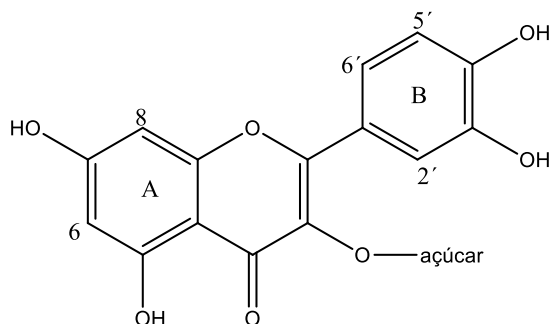


Figura 11 – Estrutura proposta para a sub-fração 17-20: quercetina glicosilada

A análise do espectro de RMN de H^1 (Figura 12) revelou a presença de vários sinais na região de hidrogênio aromáticos (6 a 8 ppm) e na região de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados (3,5 - 5 ppm). Na figura 11, em 12,61 ppm, 10,89 ppm, 9,75 ppm e 9,19 ppm observa-se quatro simpletos relativos aos hidrogênios de $-OH$. Na região de hidrogênios aromáticos do espectro da figura 13 (ampliação) podem-se observar cinco conjuntos de sinais, todos com integração para um hidrogênio. Os sinais estão representados na tabela 1.

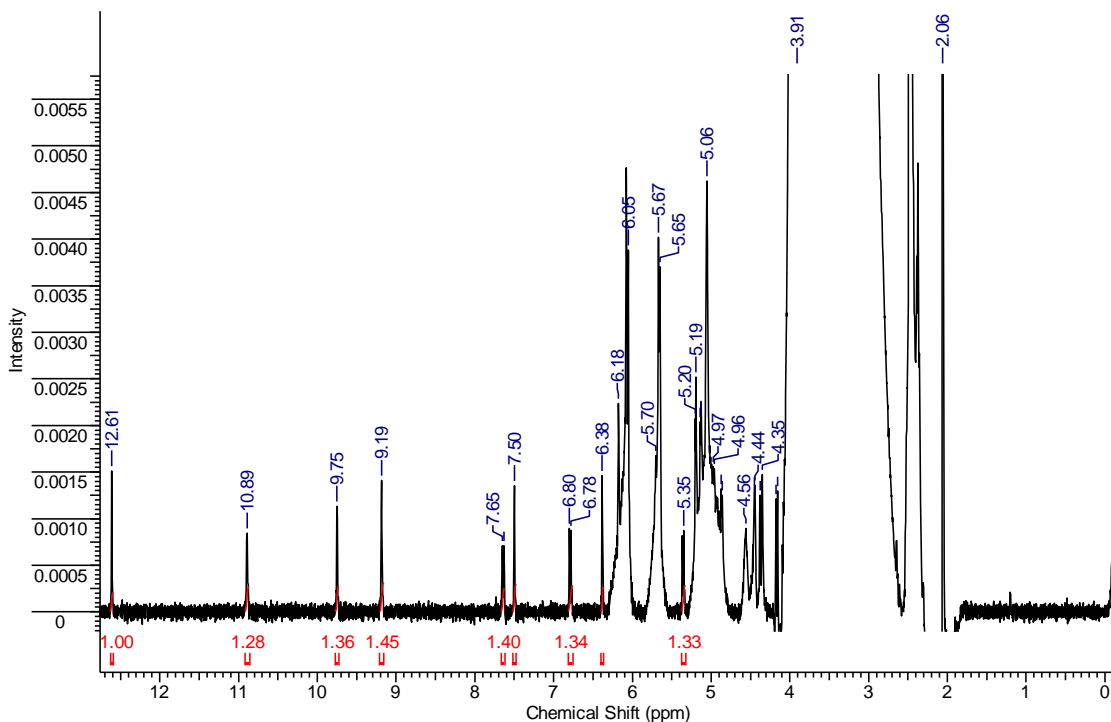


Figura 12 - RMN de H¹ da sub-fração 17-20 (CD₃OD)

Em 6,38 e 6,18 ppm ocorrem dois simpletos relativos aos hidrogênios H₆ e H₈ do anel A do flavonóide. Em 7,65 e 6,79 ppm observa-se dois sinais na forma de dupletos, ambos com constante de acoplamento (J) igual a 8,0 Hz, relativos aos hidrogênios H_{6'} e H_{5'} que estão orto relacionados no anel B da quercetina. Em 7,51 ppm observa-se um singlete relativo ao hidrogênio H_{2'} do anel B do flavonóide.

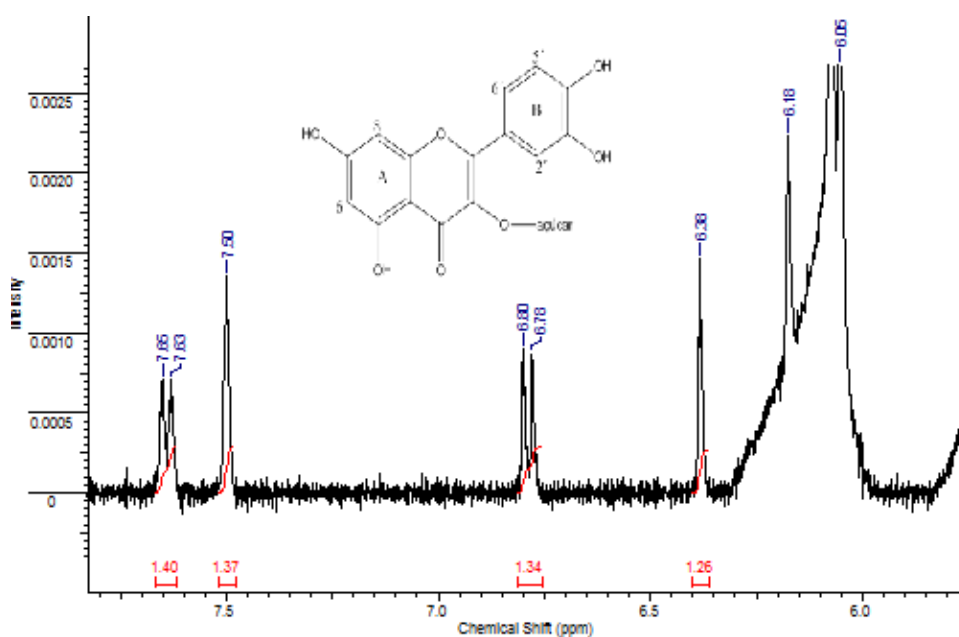


Figura 13- Ampliação do RMN de H¹ da sub-fração 17-20

A grande quantidade de átomos de hidrogênio ligados a carbonos oxigenados na região entre 4,0 e 5,8 ppm indica a possibilidade de unidades sacarídicas na estrutura deste flavonoide glicosilado.

Tabela 1 – Deslocamentos do RMN H^1 da sub-fração 17-20

Hidrogênio	δ H^1 (ppm) (400 MHz, DMSO- d_6)
OH ₅	12,61 (s)
OH ₇	10,89 (s)
OH _{4'}	9,75 (s)
OH _{3'}	9,19 (s)
H _{6'}	7,64 (d, $J = 8,0$ Hz)
H _{2'}	7,50 (s)
H _{5'}	6,79 (d, $J = 8,0$ Hz)
H ₈	6,38 (s)
H ₆	6,18 (s)

A sub-fração 20-21 obtida a partir da coluna 1 (Hexano:AcOEt 77:23) é um sólido amorfo verde escuro, com ponto de fusão de 162,2-163° C. O espectro no IV (figura 14) mostra bandas características de grupos –OH em 3436 cm^{-1} e 3395 cm^{-1} . Em 2959 cm^{-1} , 2922 cm^{-1} e 2867 cm^{-1} temos bandas características de estiramento da ligação –CH. Em 1737,75 cm^{-1} e 1699 cm^{-1} bandas de compostos carbonílicos. As bandas em 1629 cm^{-1} e em 1615 cm^{-1} são características de estiramentos da ligação –CH de compostos aromáticos. É importante ressaltar a proporção entre as bandas referentes aos grupos –OH e >C=O que mostram uma maior intensidade de grupos carbonílicos. Posteriormente, a sub-fração 20-21 foi reunida com a sub-fração 22 para fazer uma cromatografia em coluna que dentre as sub-frações obtidas não houve nenhuma fração na forma de sólido.

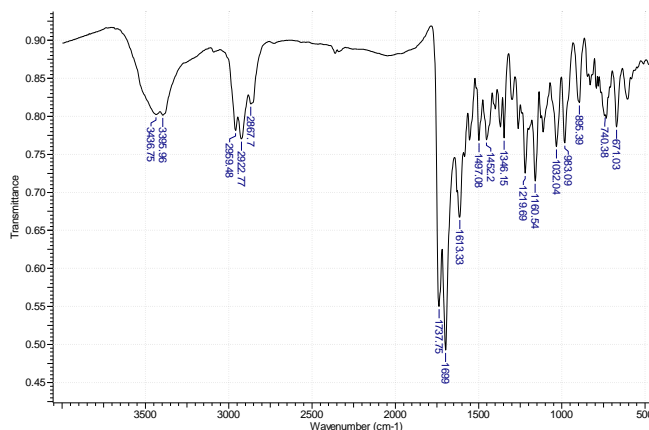


Figura 14 - IV da sub-fração 20-21

A sub-fração 49-53 obtida na **coluna 1** (Hexano:Acetato de etila 25:75) apresentou-se como um sólido branco de ponto de fusão 172,6-173,8° C e foi caracterizado por espectroscopia no IV e de RMN H¹ e de C¹³.

O espectro de IV (figura 15) mostrou bandas típicas de absorção referentes a estiramento de grupos –OH em 3422 cm⁻¹, referente a absorção da ligação C-H em 2953 cm⁻¹ 2924 cm⁻¹ e 2853 cm⁻¹ e em 1705 cm⁻¹ e 1686 cm⁻¹ observa-se o estiramento referente a absorção do grupo >C=O. Em 1631 cm⁻¹ observa-se uma banda de média intensidade referente ao estiramento da ligação CH de anel aromático.

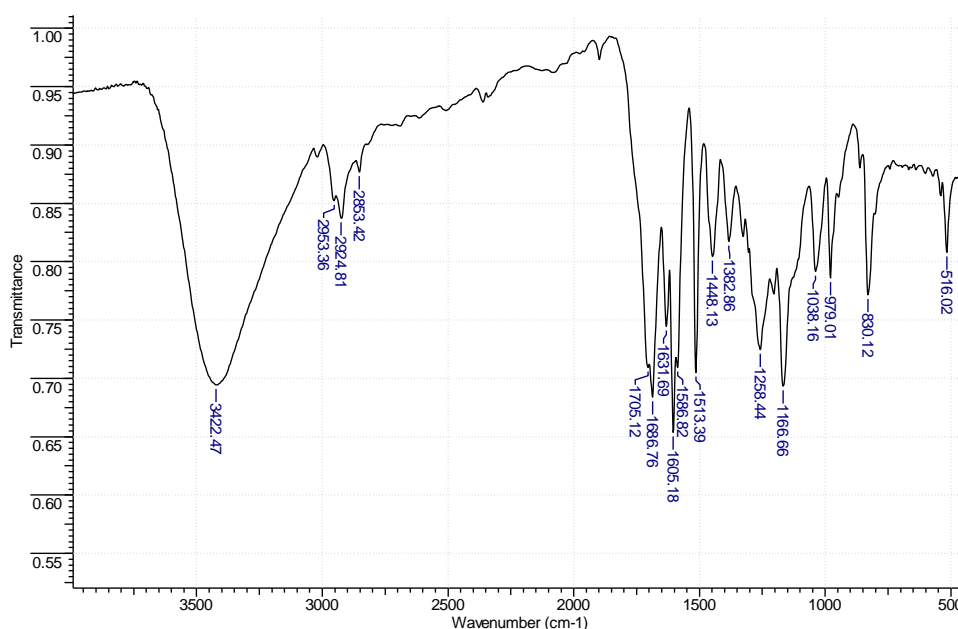


Figura 15 - IV da sub-fração 49-53

Análise dos espectros de IV e RMN permitiu deduzir a estrutura da sub-fração 49-53 como sendo o ácido cumárico, figura 16.

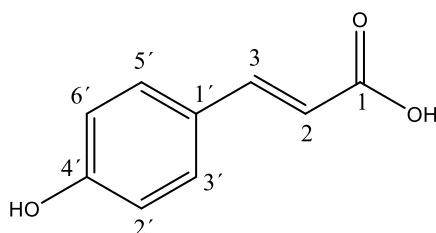


Figura 16 - Estrutura proposta para a sub-fração 49-53: ácido cumárico.

O espectro de RMN de H^1 (figuras 17 e 18) apresentou um duplete centrado em 6,36 ppm com constante de acoplamento de $J = 15,9$ Hz, referente ao H-2, outro duplete em 7,66 ppm com constante de acoplamento também igual a $J = 15,9$ Hz, referente ao H-3, indicando que estes dois hidrogênios estão acoplado e são característicos de uma estereoquímica trans. Observa-se ainda dois pares de dupletos centrados em 6,79 e 7,45 ppm, com constantes de acoplamento de 8,5 Hz e integração para dois hidrogênios cada, referentes aos hidrogênios aromáticos H-3' e H-5' e aos hidrogênios H-2' e H-6', respectivamente. Os picos em 4,29 4,26 e 3,87 ppm são devido a impurezas.

No espectro de RMN de C^{13} (Figura 19) pode-se observar o pico em 169,16 ppm característico do carbono carboxílico. Em 147,11 e 115,00 ppm observa-se os carbonos sp^2 C_3 e C_2 respectivamente. Os picos em 131,35 ppm e em 116,99 ppm representam os carbonos aromáticos $C_{2'}$ e $C_{6'}$ e $C_{3'}$ e $C_{5'}$, respectivamente, que são os picos mais intensos. O pico em 161,45 ppm refere-se ao carbono aromático oxigenado $C_{4'}$ e o pico em 127,30 ppm refere-se ao carbono aromático $C_{1'}$. O restante dos picos no espectro é devido a presença de impureza.

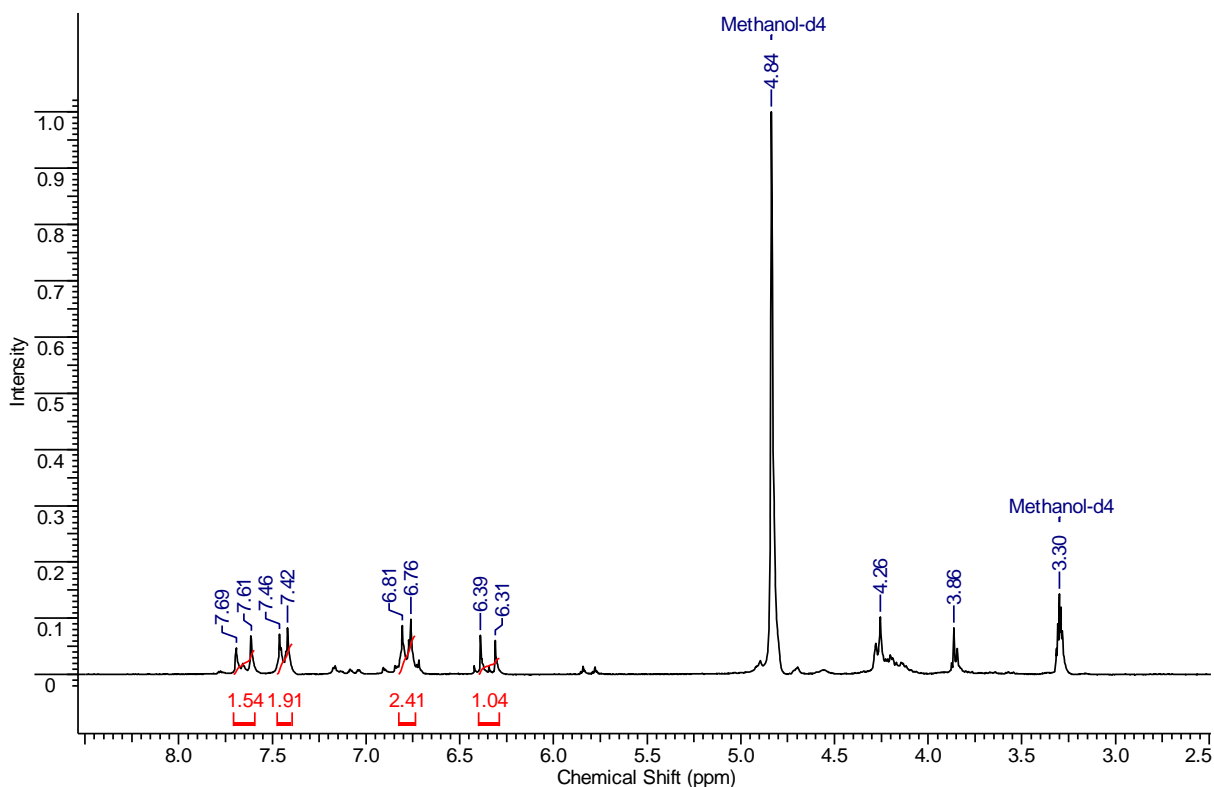


Figura 17 - RMN H^1 da sub-fração 49-53

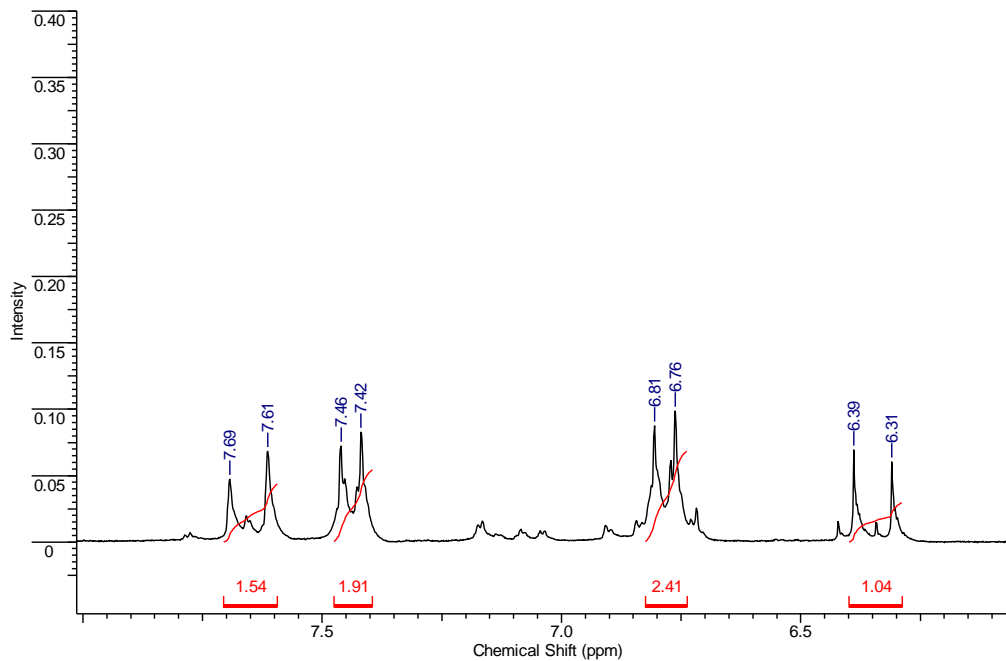


Figura 18 - Ampliação do RMN de H¹ da sub-fração 49-53

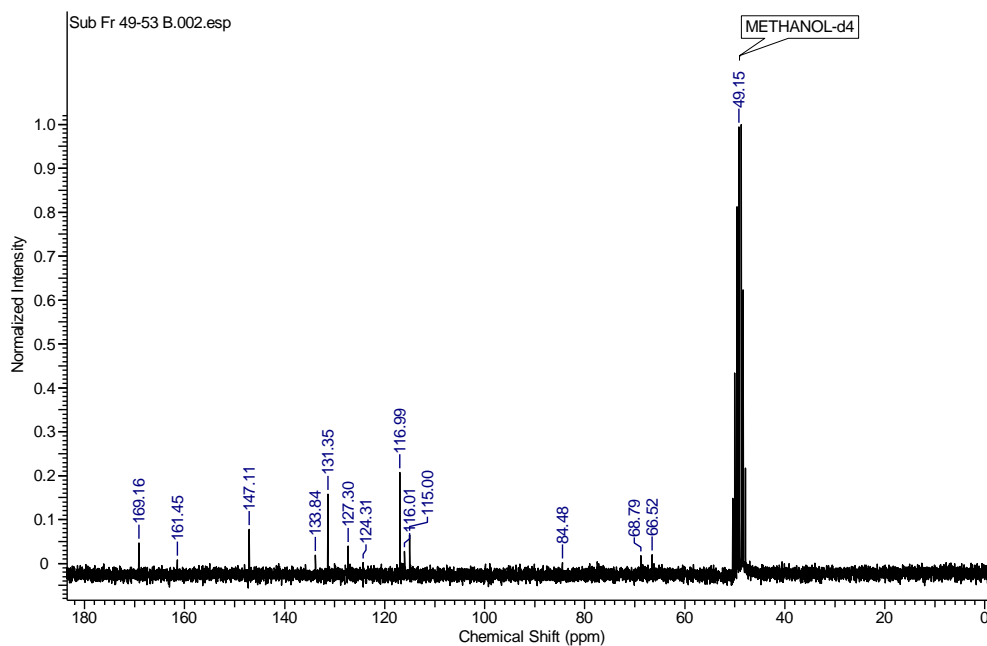


Figura 19 - RMN C¹³ da sub-fração 49-53

Os dados da análise dos espectros de RMN de H¹ e de C¹³ encontram-se compilados na tabela 2.

Tabela 2 – Deslocamentos do RMN H¹ e do do RMN C¹³ da sub-fração 49-53

	δ ¹ H (ppm) (400 MHz, DMSO-d6)	δ ¹³ C (ppm) (400 MHz, DMSO-d6)
1	-	169,16
2	6,36 (d, J=15,9 Hz)	115,00
3	7,66 (d, J= 15,9 Hz)	147,11
1'	-	127,30
2'	7,45 (d, J= 8,5 Hz)	131,35
3'	6,79 (d, J= 8,5 Hz)	116,99
4'	-	161,45
5'	6,79 (d, J= 8,5 Hz)	116,99
6'	7,45 (d, J= 8,5 Hz)	131,35

Uma segunda parte do extrato bruto (m = 31,07 g) foi suspensa em etanol 70%, formando um material insolúvel, que posteriormente foi filtrado gerando uma parte insolúvel (13,4%) e uma parte solúvel. A parte solúvel foi particionada através de uma extração líquido-líquido rendendo as frações hexano (4,83 %), acetato de etila (28,5 %) e butanol, que não foi secada. Durante este fracionamento com acetato de etila formou-se duas vezes uma emulsão que foi separada e registrada como fração acetato de etila emulsão 1 e fração acetato de etila emulsão 2. A fração butanol não foi evaporada, pois começou a formar um precipitado nas bordas do béquer, sendo por isso designada de precipitado butanol.

A fração hexano foi submetida a uma cromatografia em coluna usando como eluentes hexano/acetato de etila/etanol gerando 38 sub-frações. Estas sub-frações originaram frações de aspecto resinoso e em pequenas quantidades, conseqüentemente não foram analisadas espectroscopicamente.

A fração acetato de etila foi também submetida a uma cromatografia em coluna, utilizando como eluentes hexano/acetato de etila/etanol e gerando 30 sub-frações. As sub-frações foram reunidas conforme sua semelhança por cromatografia em camada delgada. As sub-frações 3, 4 e 22 foram purificadas com acetona e posteriormente analisadas por RMN de H¹.

As sub-frações 3 e 4 obtidas a partir da **coluna 4** (Hexano:AcOEt 65:35) apresentaram-se com um aspecto de graxa e de cor amarelada. Estas duas frações se mostraram muito parecidas no espectro de RMN H¹ (figuras 20 e 21), mostram picos na região de hidrogênios aromáticos e uma grande quantidade de picos na

região de 5,4 a 0,8 ppm. A partir destes espectros não se conseguiu tirar uma informação mais precisa.

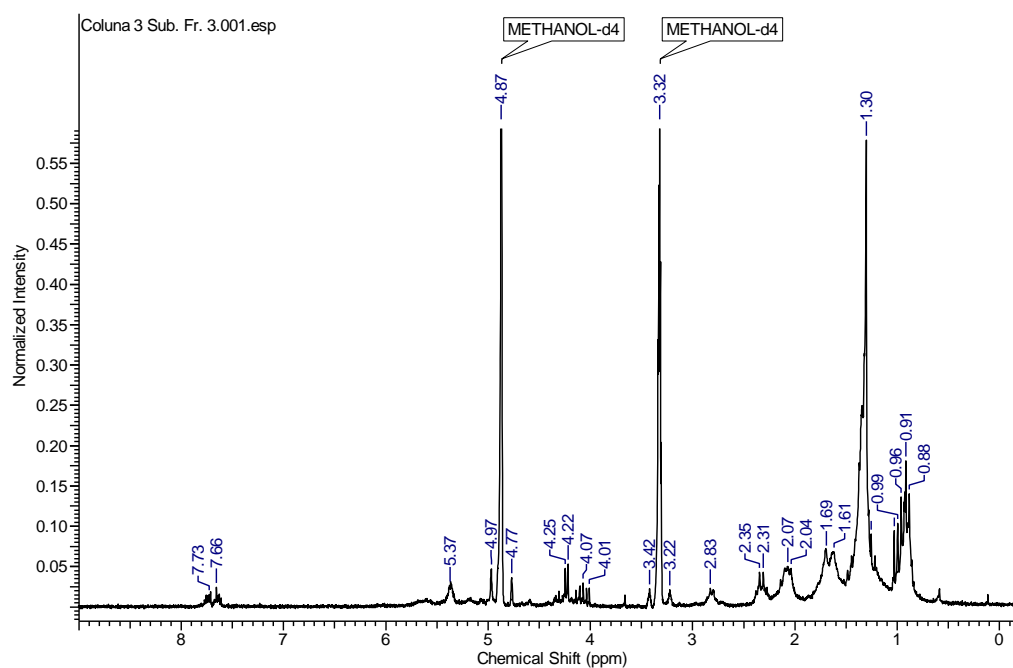


Figura 20 - RMN de H¹ da sub-fração 3

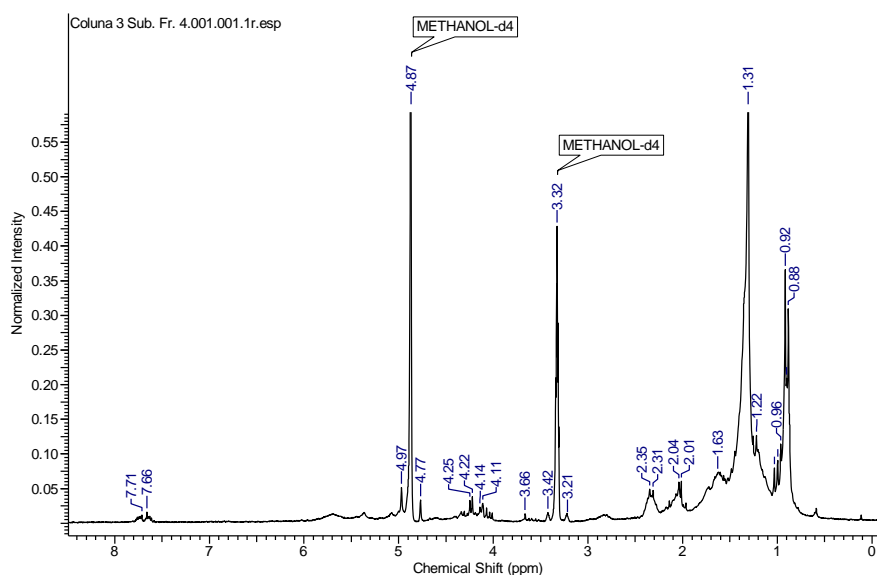


Figura 21 - RMN H¹ da sub-fração 4

A sub-fração 22 obtida a partir da **coluna 4** (Hexano:AcOEt 40:60) é um sólido branco com ponto de fusão de 278,2-278,8°C. Foi analisado por

espectroscopia de RMN H^1 (figura 22). A análise do espectro de RMN H^1 mostrou sinais na região compreendida entre 3,0 e 5,5 ppm, indicando a provável presença de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, levando a considerar a presença de açúcar. A existência de sinais na região de hidrogênios de carbonos alifáticos indica a complexidade da amostra.

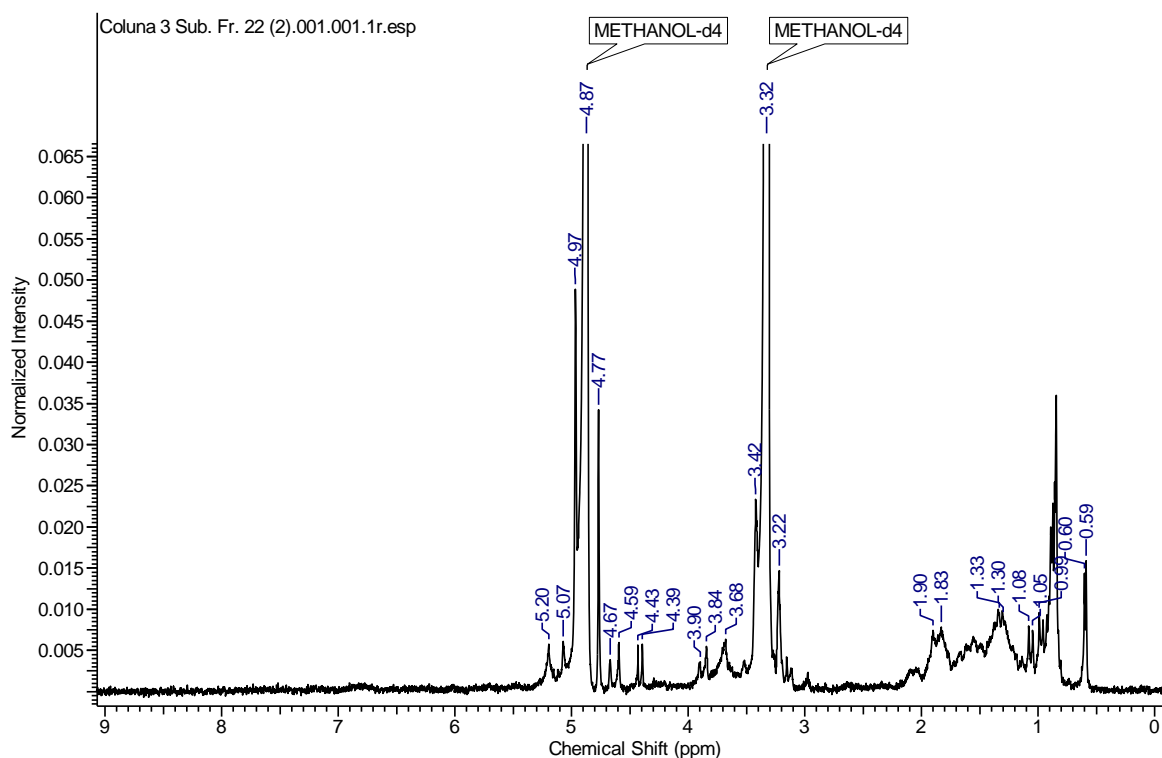


Figura 22- RMN H^1 da sub-fração 22

Finalmente, o precipitado da fração butanol apresentou ponto de fusão de 111-112° C. Esta amostra foi submetida a análises de IV (figura 23). O espectro no IV apresentou bandas em 3402 e 3361 cm^{-1} referentes a grupos $-OH$, bandas em 2953 cm^{-1} , 2935 cm^{-1} , 2896 cm^{-1} e 2877 cm^{-1} características de ligações $-CH$. Em 1709 cm^{-1} e em 1694 cm^{-1} o espectro apresentou bandas de grupos carbonílicos. A análise entre a proporção das bandas de grupamentos $-OH$ e $>C=O$ indica que o composto é bastante hidroxilado.

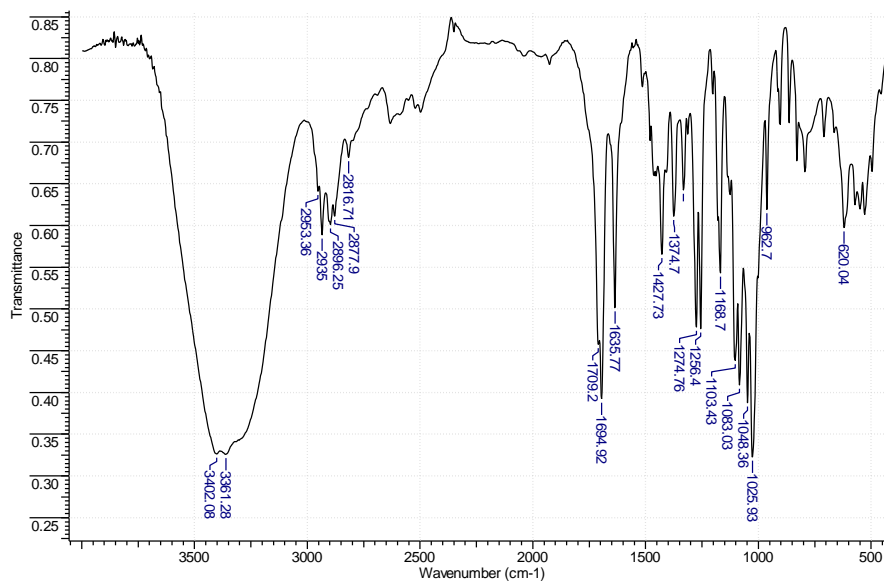


Figura 23 - IV do precipitado butanol

A análise por LC-MS forneceu uma massa molar de 278 g/mol que permitiu deduzir a fórmula molecular como $C_{11}H_{18}O_8$.

A análise dos espectros de IV, RMN uni e bidimensionais juntamente com as análises por LC-MS, permitiram elucidar a estrutura do precipitado butanol como sendo um isoprenóide glicosilado, como mostrado na figura 24. Os espectros de RMN são discutidos a seguir.

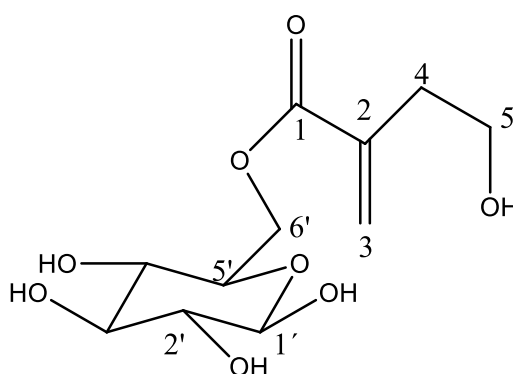


Figura 24 – Estrutura proposta para o precipitado butanol

O espectro de RMN de H^1 (figura 25) apresenta um duplete em 6,23 ppm com constante de acoplamento $J = 1,40$ Hz, um outro duplete em 5,76 ppm com

constante de acoplamento igual a 1,29 Hz. Estes picos são característicos de hidrogênios geminais ligados a carbono sp². Os picos na região entre 3,0 e 4,5 ppm indicam que há uma estrutura de açúcar no composto. O tripleto centrado em 2,64 ppm indica a presença de hidrogênios metilênicos.

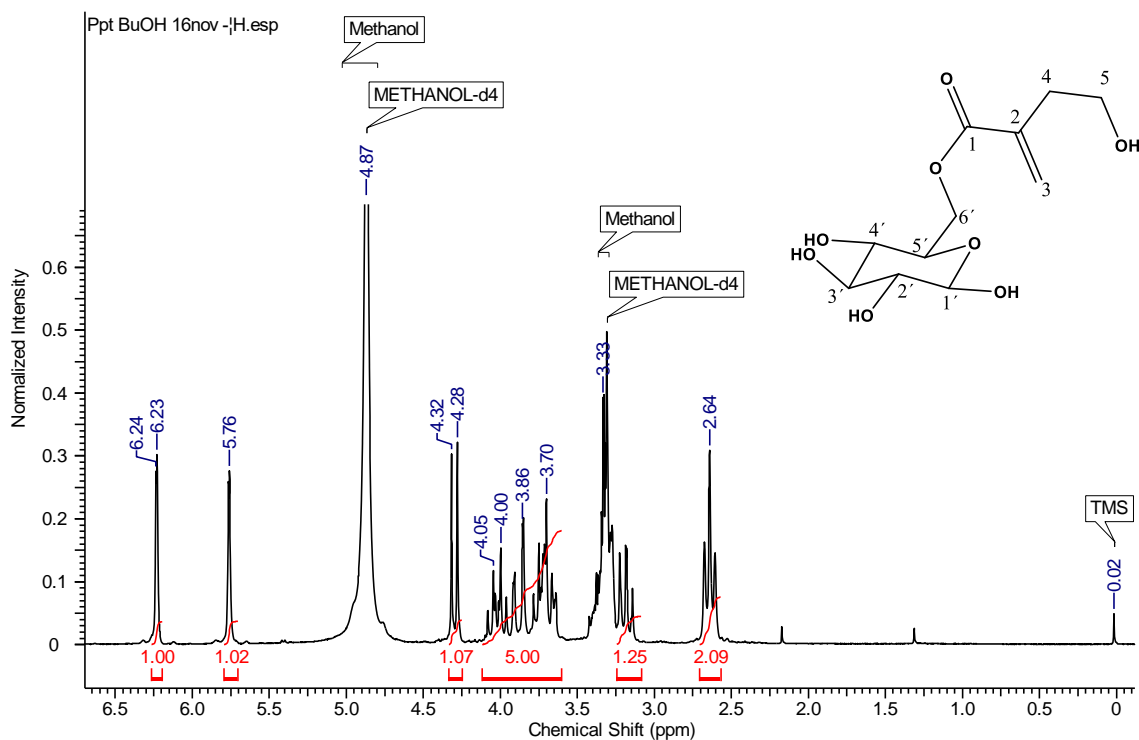


Figura 25 - RMN de H¹ do precipitado butanol

A ampliação deste espectro pode ser melhor visualizada na figura 26. O tripleto centrado em 2,64 ppm com constante de acoplamento igual a 6,90 Hz corresponde ao hidrogênio do C₄. Entre 3,5-4 ppm observa-se dois duplos dupletos relativos aos hidrogênios do C₅ da unidade isoprênica, um deles centrado em 4,02 ppm com constantes de acoplamentos iguais a 8,42 e 9,71 Hz e o outro centrado em 3,70 ppm com constantes de acoplamento iguais a 9,7 e 6,9 Hz. O duplete em 4,30 ppm com constante de acoplamento igual a 6,90 Hz é característico do hidrogênio anomérico e o duplo duplete centrado em 3,86 ppm com constantes de acoplamento iguais a 12 e 1,8 Hz é característico do hidrogênio ligado ao C_{6'} da glicose. Os picos na região de 3,3 ppm correspondem aos demais hidrogênios ligados aos carbonos da glicose C_{3'}, C_{4'} e C_{5'}.

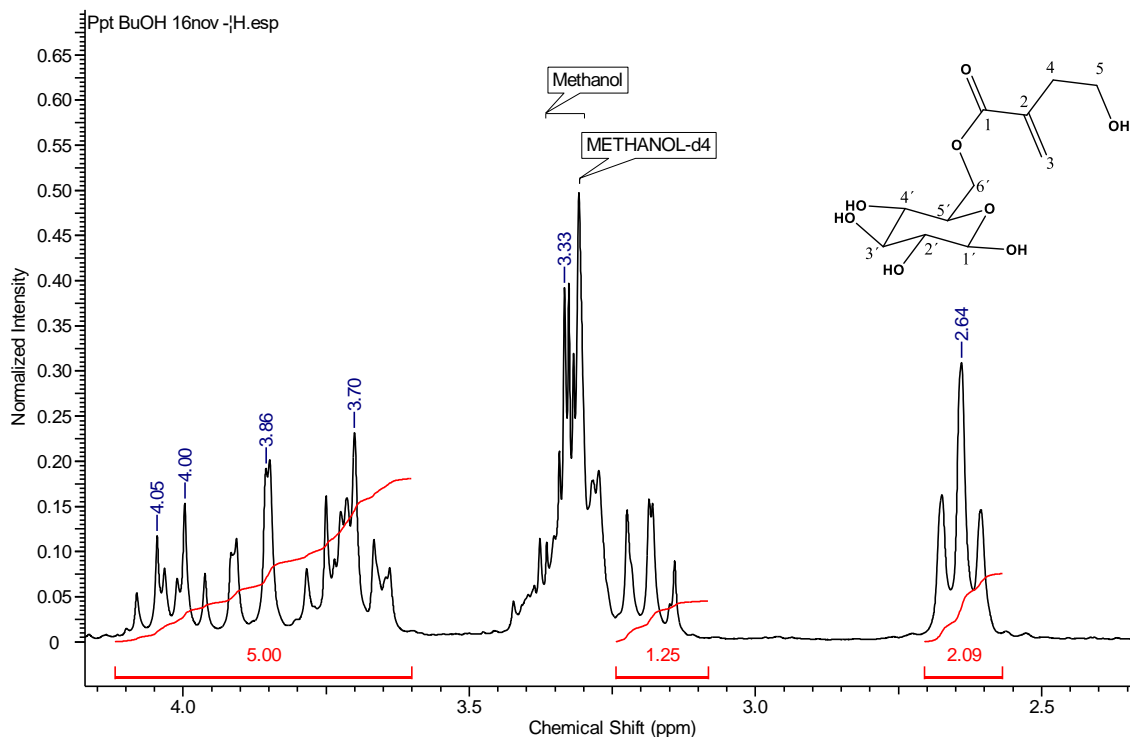


Figura 36 – Ampliação do RMN de H^1 do precipitado butanol

O espectro de RMN de C^{13} (figura 27) mostra a presença de onze carbonos. Em 170,5 ppm observa-se um pico característico de $>C=O$ correspondente ao C_1 da unidade isoprênica, em 139,2 e 127,7 ppm são picos dos carbonos sp^2 , C_2 e C_3 . O carbono anomérico $C_{1'}$ pode ser observado em 104,5 ppm e o C_5 é observado no pico em 69,53 ppm. Por fim, o pico em 33,3 ppm é característico de carbono metilênico C_4 .

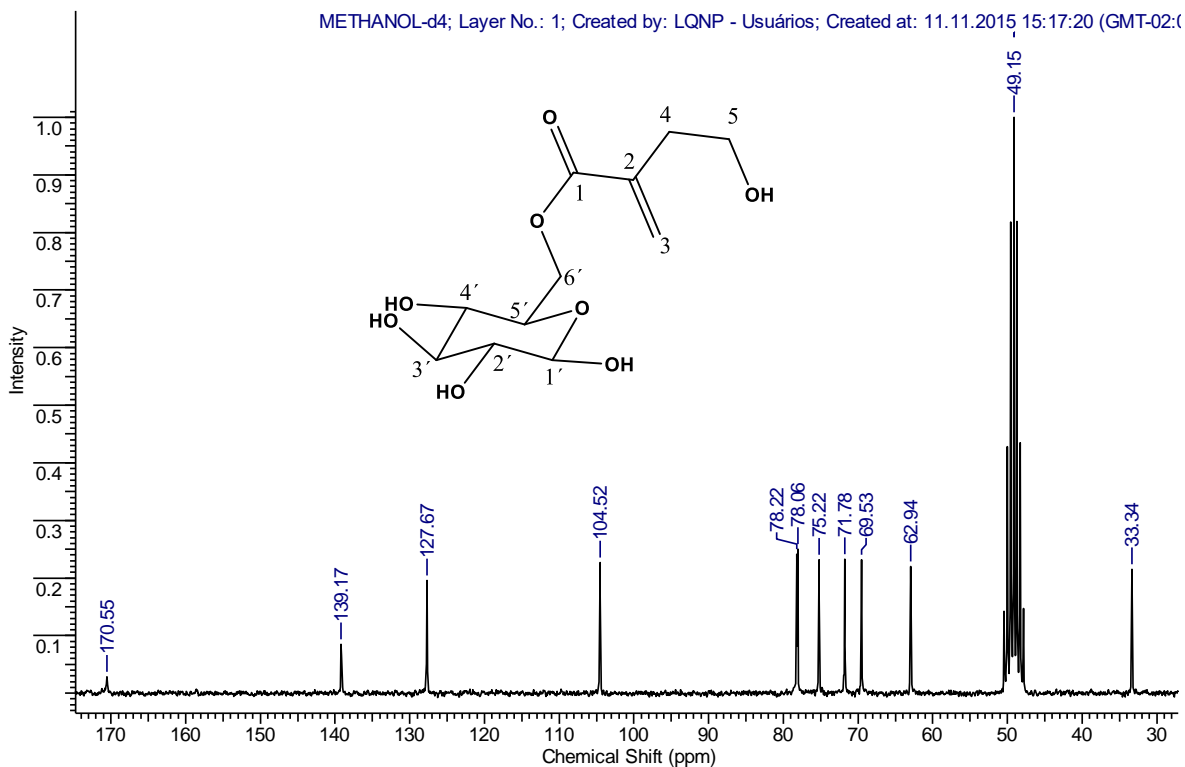


Figura 27 - RMN de C^{13} do precipitado butanol

Os demais picos na região de 79 a 60 ppm são característicos de carbonos ligados a oxigênios da glicose. O pico em 75,22 ppm é característico do $C_{2'}$ e o pico em 62,94 ppm corresponde ao $C_{6'}$. Os picos na região de 78 ppm e o pico em 71,78 ppm correspondem aos carbonos $C_{3'}$, $C_{4'}$ e $C_{5'}$.

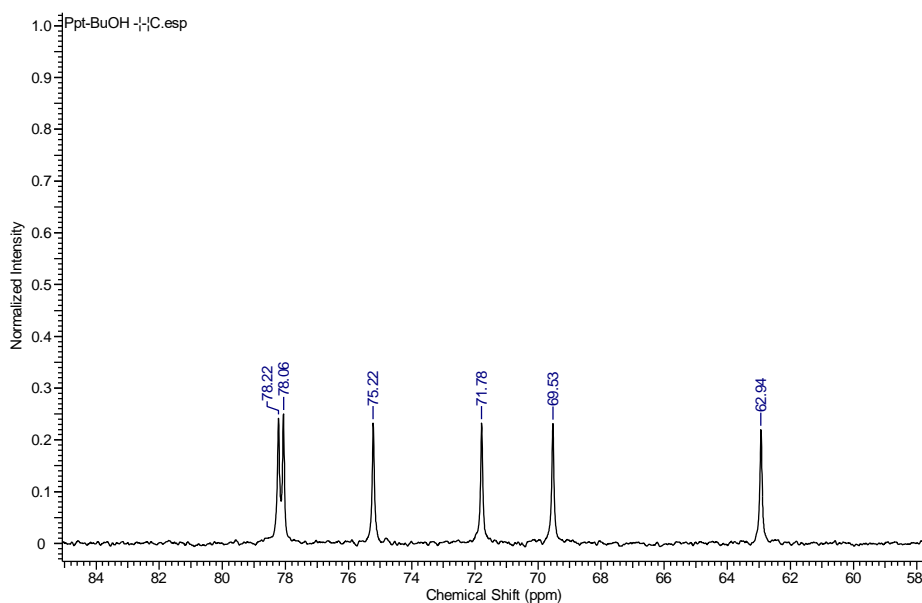


Figura 28 - Ampliação do RMN de C^{13} do precipitado butanol

O espectro de DEPT mostra a existência de quatro carbonos secundários e 5 terciários (Figura 29). Os carbonos secundários C₃ (126,13 ppm), C₅ (67,96 ppm), C_{6'} (61,34 ppm) e o C₄ (31,77 ppm) estão representados na parte superior do espectro. Já os carbonos terciários C_{1'} (102,95 ppm), C_{3'} e C_{4'} (sinais em 76 ppm), C_{2'} (73,64 ppm) e o C_{6'} (70,20 ppm) estão na parte inferior do espectro. Como a fórmula molecular indicou a presença de onze carbonos, tem-se ainda o carbonílico C₁ e o carbono C₂ que são quaternários. Os dados estão compilados na tabela 3.

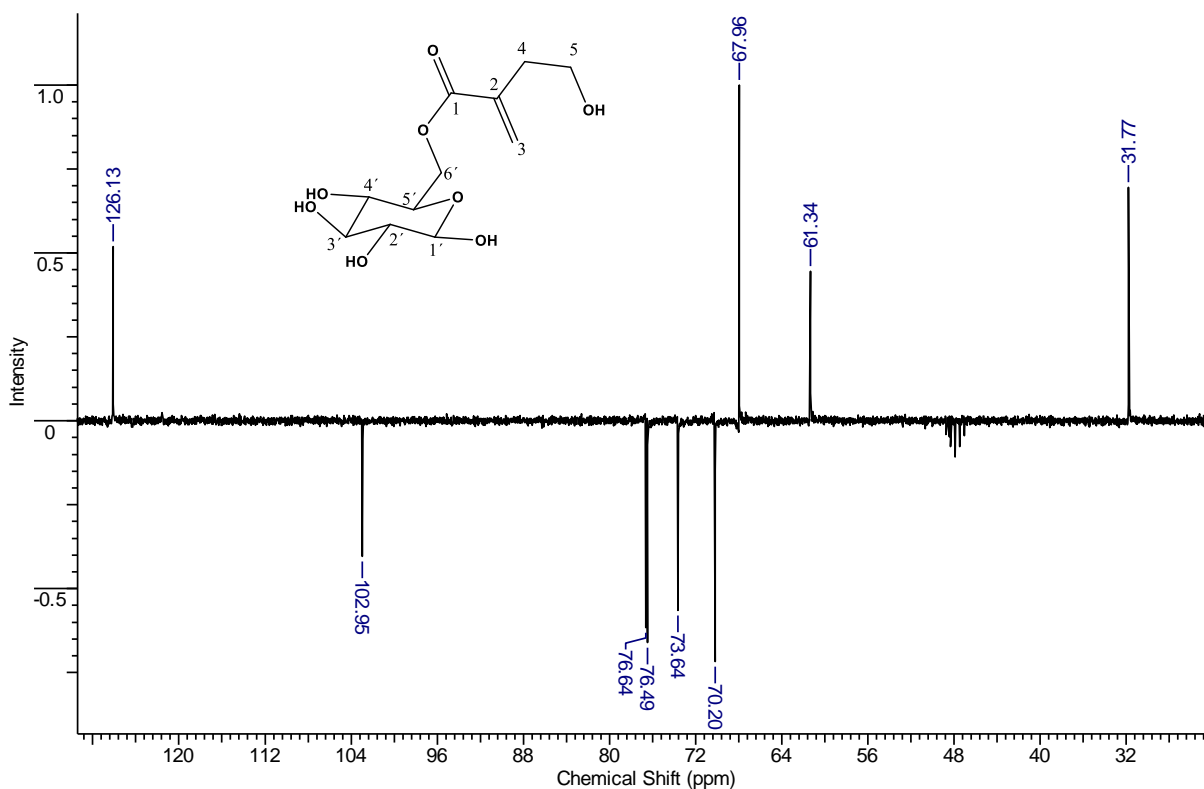


Figura 29 - RMN de C DEPT do precipitado butanol

No espectro COSY (Figura 30), pode-se observar a relação do hidrogênio H₃ com os hidrogênios H₄ e H₅, assim como a relação dos dois hidrogênios H₅ com o hidrogênio H₄.

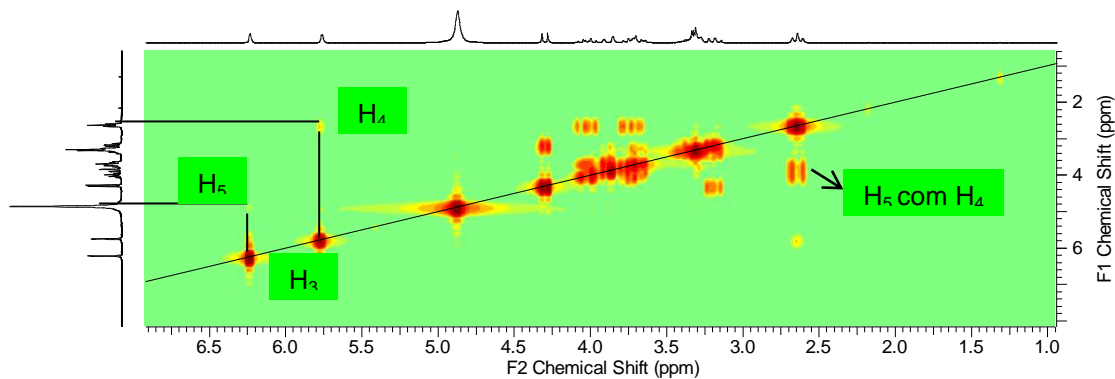


Figura 30 - RMN COSY do precipitado butanol

No espectro HETCOR (Figura 31), observa-se a relação do carbono C₃ com os hidrogênios H₃, do carbono C₁' com o hidrogênio H₁' e finalmente, a relação do carbono C₄ com os hidrogênios H₄.

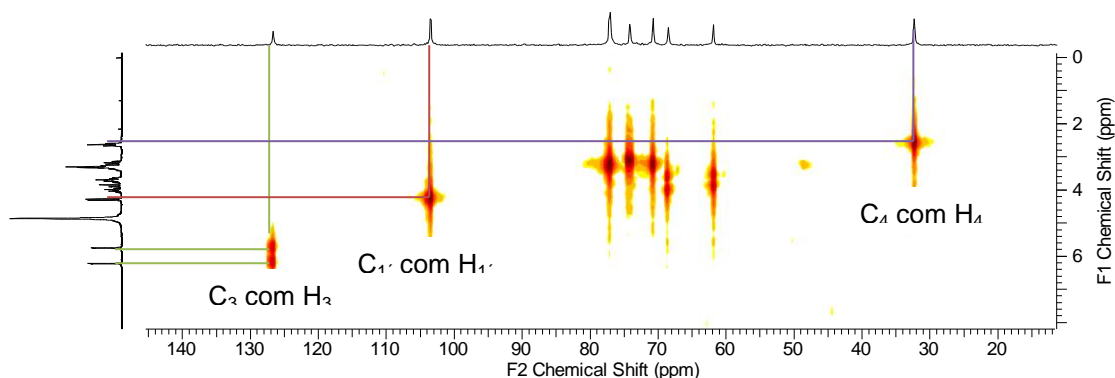


Figura 31 - RMN HETCOR do precipitado butanol

Os valores dos picos relacionados aos hidrogênios/carbonos correspondentes estão representados na tabela 3.

Tabela 3 – Deslocamentos dos espectros de RMN do precipitado butanol

C/H	δ ¹ H (ppm) (J-Hz)	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹³ C DEPT	COSY H /
1	-	170,5		
2	-	139,2		
3	d 6,23 (J= 1,40 Hz) d 5,76 (J= 1,29 Hz)	127,7	CH2	5,76 correlaciona 4,02; 3,74 e 2,84
4	t 2,64	33,3	CH2	
5	dd 4,02 (J= 8,42 e 9,71 Hz) dd 3,74 (J= 9,70 e 6,90 Hz)	69,5	CH2	4,02 correlaciona 3,74 e 2,84
1'	d 4,30 (J= 7,68 Hz)	104,5	CH	4,30 correlaciona 3,19
2'	dd 3,19 (J= 7,64 e 1,30 Hz)	75,2	CH	
3'	3,3*	78,2*	CH	
4'	3,4*	78,1*	CH	
5'	3,3*	71,8*	CH	
6'	dd 3,86 (J= 12 e 1,8 Hz) s 3,69	62,9	CH2	

(400 Hz, DMSO-d6)

*Os valores podem estar trocados

5.2. Análise dos Testes de bancada

5.2.1. Atividade antioxidante

Espécies oxidantes, como os radicais livres, atuam sobre o organismo causando uma série de patologias incluindo câncer, doenças hepáticas, aterosclerose e envelhecimento. Os efeitos resultantes da oxidação de componentes celulares são mediados principalmente por espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), produzidas como parte do processo metabólico (de 2 a 5% do oxigênio respirado), por exemplo, e de fontes exógenas. Os antioxidantes são substâncias que, numa concentração menor que o substrato oxidável, retarda o processo oxidativo, diminuindo a velocidade da reação (Halliwell,1995).

Os extratos vegetais são conhecidos por sua eficácia antioxidante, considerando isto, foi avaliada a capacidade antioxidante de compostos químicos e/ou extratos vegetais, através de ensaios, como a atividade sequestrante de

radicais livres e potencial redutor. O conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides foram determinados para os extratos vegetais, a fim de correlacionar estes dados com a atividade antioxidante.

Numerosos estudos demonstram que os compostos fenólicos possuem alta capacidade antioxidante, especialmente os ortodifenóis ou catecóis (Tuck & Hayball, 2002). A determinação do conteúdo de fenólicos baseia-se na formação de um complexo inorgânico, formado quando o íon fenolato é oxidado em condições ácidas, reduzindo o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico (Figura 32) que fornece uma coloração azul para a solução (Waterman & Mole, 1994).

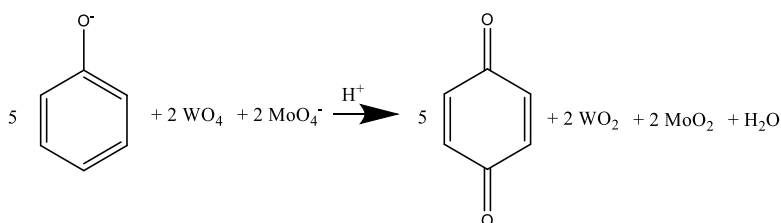


Figura 32 - Reação de oxi-redução na determinação de compostos fenólicos

Os flavonoides são uma classe de metabólitos vegetais secundários, de natureza fenólica, que possuem notável capacidade antioxidante. Para a determinação do teor de flavonóides nos extratos e frações vegetais utilizou-se a complexação com cloreto de alumínio (AlCl_3). Este reagente forma um quelato com hidroxilas fenólicas e com o grupo cetônico nos flavonoides (Figura 33), proporcionando um deslocamento batocrômico das bandas de absorvâncias do espectro de Uv/VIS para uma região característica (Zuazanni & Montanha, 2003).

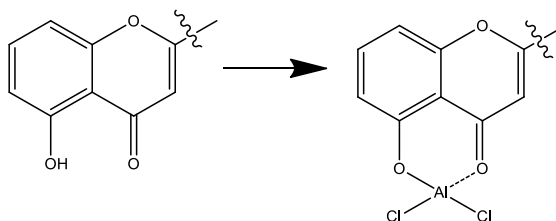


Figura 33 - Formação do anel estável de seis membros do Al^{+3} com o flavonóide

O poder redutor tem como objetivo detectar compostos com potencial de redução de valores menores que 0,7 (Prior & Schaich, 2005). Este ensaio é baseado na reação de redução de íons férricos (Fe^{+3}) a íons ferrosos (Fe^{+2}) pelo substrato, devido a presença de compostos elétrons-doadores. Dessa forma, os íons

ferricianeto são reduzidos a ferrocianeto que, por sua vez, formam um complexo ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) de coloração azul intensa (azul da Prússia) com os íons ferro III, apresentando banda de absorção em 720 nm. A reação está representada na figura 34.

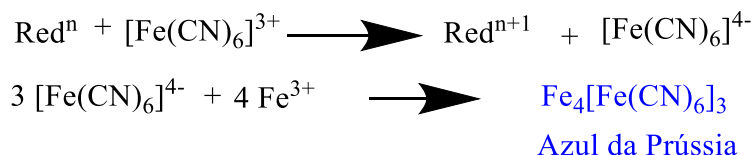


Figura 34 – Reação de oxi-redução do teste que avalia o poder redutor

O ensaio antioxidante utilizando o radical livre DPPH avalia a capacidade sequestrante de radicais livres da amostra analisada. A habilidade de compostos fenólicos em doar hidrogênios ao radical livre DPPH leva à formação de espécies pouco reativas. O DPPH é um radical livre relativamente estável e de forte coloração púrpura que quando abstrai um átomo de hidrogênio de compostos fenólicos, torna-se amarelo (Figura 35). A medida do desaparecimento da cor do DPPH é analisada espectrofotometricamente a 517 nm.

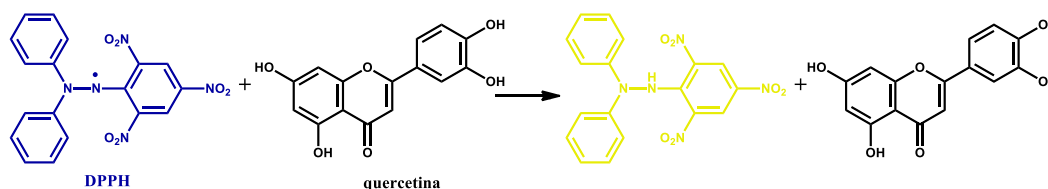


Figura 35 - Reação do DPPH com um composto fenólico

Os resultados dos testes de bancada estão representados na tabela 4. Foram avaliadas as amostras obtidas do extrato bruto através de dois métodos diferentes de partição, i) pela filtração em leito de sílica gel e ii) pelo particionamento líquido-líquido.

Em relação às frações hexano, acetato de etila e etanol obtidas da filtração em sílica gel, pode-se observar que a fração acetato de etila (AcOEt) apresentou o maior conteúdo de fenólicos e flavonoides que a fração etanol (EtOH), que por sua vez também está relacionado com a maior atividade antioxidante avaliada pelo teste do poder redutor. Na fração hexano não foram detectados compostos fenólicos, por

isso os demais testes não foram realizados. O teste de captura de radicais livres pelo DPPH indicou que o extrato bruto e frações obtidas da filtração em sílica gel apresentaram em torno de 90% de atividade antioxidante quando testados a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de amostra.

Dentre as frações obtidas do fracionamento líquido-líquido (tabela 4), pode-se observar que a fração acetato de etila apresentou o maior conteúdo de fenólicos como também a maior atividade antioxidante. O extrato bruto e frações acetato de etila e butanol apresentaram uma acentuada atividade antioxidante quando observado pela captura de radicais livres. O valor da concentração efetiva 50% para a fração acetato de etila foi menor que 10 ppm. Para as demais frações, como fração insolúvel, emulsão 1, emulsão 2 e fração butanol os valores da concentração efetiva 50% (CE_{50}) foram respectivamente 33, 48, 105 e 47 ppm.

Tabela 4 - Determinação do conteúdo de fenólicos, de flavonóides e avaliação da atividade antioxidante usando DPPH e poder redutor

Filtração em sílica	Fenólicos^a	Flavonoides^b	Poder redutor^c	%DPPH^d	Atividade antioxidante
Extrato bruto	91,9	5,4	159,9	10,9	89,1
Fr. Hexano	ND	NR	NR	NR	-
Fr. AcOEt	166,2	37,4	284,4	9,9	90,1
Fr. EtOH	51,5	6,0	84,4	12,9	87,1
Partição líquido-líquido					
Fr insolúvel	65,5	4,5	159,8	10,8	89,2
Fr Hexano	38,8	2,9	146,9	77,7	22,3
Fr Acetato de etila	137,0	14,7	426,4	7,7	92,3
Emulsão 1 Fr AcOEt	61,0	10,9	294,4	10,8	89,2
Emulsão 2 Fr AcOEt	31,3	4,2	98,9	41,7	58,3
Fr Butanol	56,3	1,4	36,5	17,0	83,0

^a- mg ácido gálico.g⁻¹; ^b- mg quercetina.g⁻¹; ^c- mg ácido ascórbico.g⁻¹; ^d- 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
 ND = não detectado; NR = não realizado.

5.2.2. Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase

A acetilcolina é um neurotransmissor, em grande parte responsável pela aprendizagem e pela formação de memória. Sabe-se que na Doença de Alzheimer, este neurotransmissor encontra-se em concentrações reduzidas devido à diminuição da atividade da enzima colina acetiltransferase, responsável pela sua síntese. Tendo em conta que a enzima acetilcolinesterase (AChE) é a responsável pela hidrólise da acetilcolina, pressupõe-se que a inibição deste enzima possa contribuir para o tratamento sintomático da doença de Alzheimer leve a moderada, aumentando os níveis de acetilcolina na fenda sináptica. (Pinheiro, 2011)

Um número reduzido de fármacos é utilizado no tratamento desta doença (Lin, 2008) entre eles já são aprovados para o tratamento os medicamentos sintéticos tacrina, donepezila e rivastigmina e princípios extraídos de plantas como galantamina. A galantamina pode ser isolada de diversas espécies dos gêneros *Galanthus* e *Narcissus* da família *Amaryllidaceae*, mas atualmente produzido sinteticamente, é considerada a mais efetiva no tratamento da doença de Alzheimer.

Tendo em vista a grande utilidade dos inibidores da acetilcolinesterase na medicina e o limitado arsenal terapêutico para o tratamento da Doença de Alzheimer, a busca de compostos naturais que possuam boa atividade de inibição desta enzima é pertinente.

A enzima hidrolisa o substrato acetiltiocolina, gerando como produto a tiocolina, que reage com o DTNB ou reagente de Ellman, produzindo 2-nitrobenzoato-5- mercaptotiocolina e o ácido 2-nitro-4-tiobenzóico facilmente identificado pela coloração amarela (Figura 36).

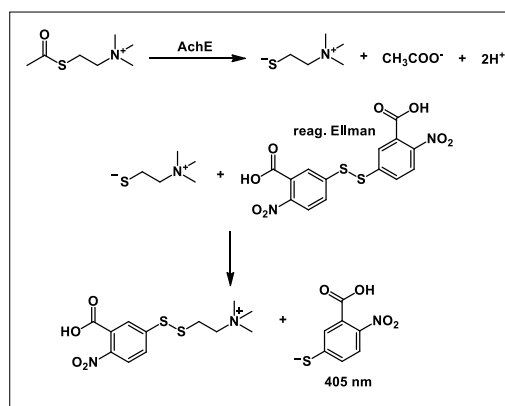


Figura 36 – Reação que ocorre no teste da inibição da enzima acetilcolinesterase

O extrato bruto e frações obtidas da filtração em coluna de sílica gel foram avaliadas quanto a inibição enzimática. Quando as amostras foram avaliadas na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, observou-se uma inibição enzimática maior de 50% para o extrato bruto (72,5%) e para a fração etanol (73,4%). As frações hexano e acetato de etila inibiram a enzima em 44,2% e 38,0% respectivamente. Para as amostras que apresentaram um valor de inibição maior que 50% foi determinado os valores de IC_{50} , ou seja a concentração de amostra necessária para obter 50% de inibição. Os valores de IC_{50} foram respectivamente $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato bruto e fração etanol.

CONCLUSÕES

O estudo biológico e fitoquímico de *Monnina oblongifolia* levou as seguintes conclusões:

- ✓ O fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila obtida da filtração do extrato bruto em leito de sílica gel, originou dois compostos sendo um deles uma quercetina glicosilada e o outro o ácido cumárico.
- ✓ Na fração butanol obtida da partição líquido-líquido do extrato bruto gerou um precipitado que foi analisado por métodos espectroscópicos uni e bidimensionais, sendo identificado como um isopreno esterificado a glicose.
- ✓ As frações acetato de etila (AcOEt) obtidas a partir da filtração em leito de sílica gel do extrato bruto e a partir do fracionamento líquido-líquido do extrato bruto apresentaram um maior conteúdo de fenólicos e de flavonóides, que por sua vez também está relacionado com a maior atividade antioxidante.
- ✓ No teste de inibição da enzima acetilcolinesterase aplicado ao extrato bruto e frações obtidas da filtração em leito de sílica gel, observou-se uma inibição enzimática maior que 50% para o extrato bruto (72,5%) e para a fração etanol (73,4%). Já as frações hexano e acetato de etila inibiram a enzima em 44,2% e 38,0%, respectivamente.
- ✓ Estes resultados incentivam a busca de compostos ativos responsáveis por esta atividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASHIR, B.; HAMBURGUER, M.; GUPTA, M. P.; SOLIS, P.; HOSTETTMANN, K. Flavonol glycosides from *Monnina Sylvatica*. **Phytochemistry**, Vol. 30, No. 11, pp. 3781-3784, 1991.

BASHIR, B.; HAMBURGUER, M.; GUPTA, M. P.; SOLIS, P.; HOSTETTMANN, K. Biphenyls and a xantone from *Monnina Sylvatica*. **Phytochemistry**, Vol. 31, No. 9, pp. 3203-3205, 1992.

BRIGHENTE, I.M.C.; DIAS, M.; VERDI, L.G.; PIZZOLATTI, M.G. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. **Pharmaceutical Biology**, 45, 156-161, 2007.

HALIWELL B; DNA and Free Radicals, **Journal of American Chemical Society**, 117, 4, 1995.

LEPORE, L; MALAFRONTI, N.; CONDERO, F. B.; GUALTIERI, M. J.; ABDO, S.; PIAZ, F. D.; TOMMASI, N. Isolation and structural characterization of glycosides from an anti-angiogenic extract of *Monnina obtusifolia* H.B.K. **Fitoterapia**, 82, 178–183, 2011.

LI TZ; ZHANG, WD; YANG, GJ; LIU, WY; CHEN, HS; SHEN, YH. Saponins from *Polygala japonica* and their effects on a forced swimming test in mice. **J Nat Prod**, 69, 59, 1-4 2006.

LIN, H.Q. Anti-acetylcholinesterase activities of traditional Chinese medicine for treating Alzheimer's disease. **Chemico-Biological Interactions**, v.175, p.352-4, 2008.

LUDTKE, L.; SOUZA-CHIES, T. T.; MIOTTO, S. T. S. O gênero *Monnina* (*Polygalaceae*) na Região Sul do Brasil. **Acta bot. bras.** 23(1): 175-195, 2009.

MAGINA, M.D.A., DALMARCO, E.M.; DALMARCO, J.B.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. *Quím. Nova*, vol.35, n.6, 1184-1188. 2012.

MARQUES, M. C. M. O gênero *Monnina Ruiz et Pavon (Polygalaceae)* no Brasil. **Rodriguésia**, 67(41), 3-33, fig. 1-11, 1989.

MARQUES, M. C. M. *Securidaca L. (Polygalaceae)* do Brasil. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 34(1), 7-144, 1996.

MARQUES, M. C. M.; PEIXOTO, A. L. Estudo taxonômico de *Polygala L.* subgênero *Ligustrina (Chodat) Paiva (Polygalaceae)*. **Rodriguésia**, 58(1), 95-146, 2007.

MORESCO, H.H.; QUEIROZ, G.S.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. Chemical constituents and evaluation of the toxic and antioxidant activities of *Averrhoa carambola* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22 (2), 319-324. 2012

OLIVEIRA, M. D. F.; SILVEIRA, E. R. Pentaoxygenated, xatones and fatty acids from *Bredmeyeria brevifolia*. **Phytochemistry**, 55 (7), 847-851, 2000

PASTORE, J.F.; Ludtke, R.; Ferreira, D.M.C.; Kuntz, J. *Polygalaceae* em Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2012. Acesso em 08 de Novembro de 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB195>>.

PINHEIRO, S. M.M.; Desenvolvimento de métodos para estudos de inibidores da acetilcolinesterase (Tratamento sintomático da doença de Alzheimer). 111 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa. 2011

PINTO, DIANA C. G.; FUZZATI, N.; PAZMINO, X.C.; HOSTETTMANN, K. Xanthone and antifungal constituents from *Monnina obtusifolia*. **Phytochemistry**. 37(3), 875-878, 1994

PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA, A. JR.; PEREIRA, W. S.; MONACHE, F. D. A new styryl-2-pyrone derivative from *Polygala sabulosa (Polygalaceae)*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 32, 603-606, 2004

PRIOR R.; WU X.; SCHAICH K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agr. Food Chem.**, 53: 4290-4302. 2005

SILVEIRA, E. R.; FALCÃO, M. J. C.; Menezes, A. Pentaoxygenated xanthones from *Bredemeyera floribunda*. **Phytochemistry**, 39(6), 1433-1436, 1995

TUCK, K.L.; HAYBALL, P.J.; Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects, **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 11, 636-644, 2002.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. Analysis of Phenolic Plant Metabolites, **Oxford: Black Scientific Publications**, 238, 1994.

WURDACK, J. J.; SMITH, L. B. *Poligaláceas* in: REITZ, P. R. **Flora Ilustrada Catarinense**, p: 3-70.

ZUAZANINI, J.A.C.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: Simões O. et al. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ed, Porto Alegre, 2003.