



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA

Estudo fitoquímico do extrato metanólico dos calos e avaliação das atividades biológicas dos extratos da planta e dos calos de *Deguelia duckeana*

PRISCILA DE MENEZES PINHEIRO

MANAUS, AMAZONAS

2020

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA

PRISCILA DE MENEZES PINHEIRO

Estudo fitoquímico do extrato metanólico dos calos e avaliação das atividades biológicas dos extratos da planta e dos calos de *Deguelia duckeana*

Dissertação apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação Ciências Biológicas (Botânica) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Botânica

Orientadora: Dra. Cecilia Veronica Nunez

MANAUS, AMAZONAS

2020

Dedicatória

*Aos meus pais por me apoiarem neste
caminho e sempre estarem ao meu lado.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado força nessa caminhada e calma nos momentos de desespero.

A minha orientadora Cecília Veronica Nunez por ter me recebido anos atrás no laboratório e ter transmitido todo seu conhecimento, ela é mulher incrível, que com o seu jeito alegre e descontraído nos transmite paz, apesar chegarmos com ela quase sempre desesperados (mas ela não sabe disso). Agradeço pelas sextas-feiras na copa que ajudaram MUITO a relaxar e dar boas risadas.

A minha família pelo apoio e compreensão nos meus momentos de desespero e choradeira quando já estava no final.

As minhas amigas Fabiele, Kalyne, Laísley e Stefhanía (ordem alfabética) que sempre estiveram ao meu lado, nos momentos bons (que foram muitos) e nos momentos ruins, que sempre me fizeram rir. Nos nossos encontros no lab dos endofíticos “fecha a porta... fecha a porta” que sempre tinha algum babado para alegrar o dia. Amo vocês.

Agradeço a minha Best Laísley que sempre esteve do meu lado, que sempre ouviu meus dramas e minha histórias loucas e nunca me abandonou. Uma amizade que em tão pouco tempo fez com que ela se tornasse uma pessoa muito especial para mim. Compartilhamos diversos momentos que ficarão guardados no meu coração assim como outros que ainda virão. Obrigada por sua amizade.

Ao Weison que me ajudou muito nesse mestrado. Ensinou TODA a parte experimental, desde fazer a plaquinha até ensinar a fazer fracionamento. Teve paciência para me ensinar (do jeito dele diga-se de passagem) o admiro muito. Obrigada por tudo.

A Maytê por ter me ajudado nessa reta final a me dar conselhos sobre os artigos e dissertação. Nos meus momentos de achar que tudo estava perdido me ajudar dando palavras de apoio. Aiiiiii Maytecita não aguento mais!!

Aos meus amigos do Lab 1 Amanda, Gabriel, Laila, Luana, Maytê e Wendell (também em ordem alfabética) por alegrarem meu dia no laboratório e por serem pessoa incríveis. Amo vocês também.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram nesse período.

A Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais, pelas análises de amostras, rapidez e eficiência.

Ao PPGBot – INPA pelos valiosos ensinamentos.

A CAPES concessão da bolsa e apoio financeiro para o projeto.

Ao INPA e LABB pela infraestrutura e amparo que permitiram a realização desta pesquisa.

RESUMO

A espécie *Deguelia duckeana* da família Fabaceae é uma planta brasileira, endêmica, conhecida como cipó-cururu ou timbó, e por possuir características de ação ictiotóxica. Estudos realizados com a espécie revelaram potencial anticâncer de flavonoides isolados a partir das raízes. O objetivo deste trabalho foi realizar a avaliação das atividades biológicas de extratos de folhas, raízes e de calos da espécie, bem como a caracterização de substâncias produzidas em calos de *D. duckeana*. Para tal, os objetivos deste trabalho foram executados em duas etapas: Capítulo 1 – Extração das partes vegetais (folhas e raiz) e realização de atividade biológicas dos extratos. Capítulo 2 - Fracionamento químico do extrato metanólico (MeOH) de calos de *D. duckeana* e avaliação de atividades biológicas dos extratos. Os extratos tanto de calos quanto do material vegetal foram avaliados quanto às atividades antibacteriana, toxicidade frente a *Artemia salina* e alelopática sobre *Lactuca sativa* (alface) e analisados por cromatografia em camada delgada comparativa e ressonância magnética nuclear. A fase acetato de etila (AcOEt) do extrato MeOH dos calos foi fracionada, sendo possível isolar os três triterpenos: Lupeol, 3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído) e ácido 3β-hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (ácido betulínico). Suas estruturas foram confirmadas através da análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais. Para os ensaios biológicos, observou-se que os três extratos da planta apresentaram atividade antibacteriana, já para os calos, o extrato MeOH e fase AcOEt apresentaram atividade antibacteriana, porém a fase hidrometanólica não apresentou atividade. Com relação a toxicidade frente de *A. salina* o extrato hexano/AcOEt das folhas e aquoso da raiz foi tóxico, o extrato MeOH das folhas não apresentou toxicidade. O extrato hexano/AcOEt e MeOH dos calos apresentaram toxicidade. Na avaliação do efeito alelopático o índice de velocidade de germinação de *Lactuca sativa* foi retardado pelo extrato MeOH das folhas. Quanto ao crescimento radicular, este sofreu um decréscimo quando submetido ao extrato hexano/AcOEt das folhas. Quanto ao crescimento radicular, este sofreu um decréscimo quando submetido ao extrato MeOH dos calos.

Palavras-chave: *Deguelia duckeana*, triterpenos, toxicidade, atividade antibacteriana, alelopatia.

ABSTRACT

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem de inibição dos extratos de <i>Deguelia duckeana</i> \pm DS frente às bactérias testadas.....	51
Tabela 2: Resultados da avaliação de toxicidade dos extratos de <i>Deguelia duckeana</i> frente a <i>Artemia salina</i>	52
Tabela 3 - Porcentagem de germinação e índice de velocidade da germinação (IVG) de <i>Lactuca sativa</i> dos extratos hexano/AcOEt e metanólico dos calos e folhas de <i>D. duckeana</i>	53
Tabela 4: Porcentagem de inibição dos extratos de <i>Deguelia duckeana</i> \pm DS frente às bactérias testadas.....	90
Tabela 5: Resultados da avaliação de toxicidade dos extratos de <i>Deguelia duckeana</i> frente a <i>Artemia salina</i>	91
Tabela 6 - Porcentagem de germinação e índice de velocidade da germinação (IVG) de <i>Lactuca sativa</i> dos extratos hexano/AcOEt e metanólico dos calos e folhas de <i>D. duckeana</i>	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Massa dos extratos de <i>D. duckeana</i> e seus respectivos rendimentos.....	45
Quadro 2: Sistema de eluição do fracionamento da fração 5-7 obtida da fase AcOEt do extrato MeOH dos calos de <i>D. duckeana</i>	64
Quadro 3. Sistema de eluição do fracionamento da fração 10-14 obtida da fase Hidrometanólica do extrato MeOH dos calos de <i>D. duckeana</i>	67
Quadro 4. Sistema de eluição do fracionamento da fração 15 obtida da fase Hidrometanólica do extrato MeOH dos calos de <i>D. duckeana</i>	68
Quadro 5. Sistema de eluição do fracionamento da fração 14 obtida da fase Hidrometanólica do extrato MeOH dos calos de <i>D. duckeana</i>	68
Quadro 6: Dados de RMN de ¹³ C do Lupeol isolado da fração 4-6 da fase AcOEt dos calos de <i>Deguelia duckeana</i> , em DMSO-d ₆ (75 MHz) e comparação com dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; MONACO & PREVITERA, 1984).....	77
Quadro 7: Dados de RMN de ¹³ C do 3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído) isolados do extrato da fração 4-6 dos calos de <i>Deguelia duckeana</i> , em DMSO-d ₆ (75 MHz) e comparação com dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; MONACO & PREVITERA, 1984).....	78
Quadro 8: Dados de RMN de ¹³ C do Ácido betulínico isolado da fase AcOEt dos calos de <i>Deguelia duckeana</i> , em DMSO-d ₆ (75 MHz) e comparação com dados da literatura (WENKERT et al., 1978).....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ocorrência mundial da família Fabaceae	16
Figura 2: Espécie <i>Deguelia duckeana</i> mantida no viveiro do LABB-INPA	18
Figura 3: Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>D. duckeana</i>	20
Figura 4: Estruturas químicas de flavonoides isolados de <i>D. duckeana</i>	22
Figura 5: Estruturas químicas dos triterpenos isolados do extrato hexano/AcOEt dos calos de <i>D. duckeana</i>	23
Figura 6: Visão simplificada das principais vias de biossíntese de metabólitos secundários e sua correlação com o metabolismo primário	25
Figura 7: Estrutura de isopreno	26
Figura 8: Imagens da espécie <i>D. duckeana</i> (A) Folhas coletadas; (B) Raízes coletadas	40
Figura 9: Fluxograma do preparo dos extratos das folhas	41
Figura 10: Fluxograma do preparo do extrato aquoso das raízes	42
Figura 11: Análise em CCDC do extrato hexano/AcOEt das folhas de <i>D. duckeana</i>	46
Figura 12: Análise em CCDC do extrato MeOH das folhas de <i>D. duckeana</i>	46
Figura 13: Análise em CCDC do extrato Aquoso das raízes de <i>D. duckeana</i>	47
Figura 14: Espectro de RMN de ¹ H do extrato hexano/AcOEt das folhas de <i>D. duckeana</i> (300 MHz, CDCl ₃).....	48
Figura 15: Espectro de RMN de ¹ H do extrato MeOH das folhas de <i>D. duckeana</i> (300 MHz, DMSO-d ₆).....	49
Figura 16: Espectro de RMN de ¹ H do extrato aquoso das raízes de <i>D. duckeana</i> (300 MHz, D ₂ O).	50
Figura 17: Efeito dos extratos MeOH, Hexano/AcOEt de folhas e aquoso das raízes de <i>Deguelia duckeana</i> no crescimento da parte aérea de <i>Lactuca sativa</i>	53
Figura 18: Efeito dos extratos MeOH, Hexano/AcOEt de folhas e aquoso das raízes de <i>Deguelia duckeana</i> no crescimento radicular de <i>Lactuca sativa</i>	54
Figura 19: Plântulas de <i>Lactuca sativa</i> sob interferência de diferentes extratos.....	54
Figura 20: Sequência da formação de calo, da periferia para o centro, em explante foliar de andiroba (<i>Carapa guianensis</i>). (1) Preparação do tecido. (2) Divisão das Células. (3) Desdiferenciação celular.	61
Figura 21: Calo da planta <i>D. macrophylla</i> . A) Calo com clorofila B) Calo friável C) Calo compacto	61
Figura 22: Fluxograma das partições líquido-líquido.....	64
Figura 23: Fluxograma geral do fracionamento da fase AcOEt.....	66
Figura 24: Fluxograma geral do fracionamento da fase hidrometanólica.....	69
Figura 25: Cromatografia em camada delgada comparativa das substâncias lupeol (I) e betulinaldeído (II)	70
Figura 26: Lupeol.....	71
Figura 27: Betulinaldeído.....	71
Figura 28 Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ suplementado com TMS) da substâncias em mistura Lupeol e 3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).....	72

Figura 29: Expansão de espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ suplementado com TMS) da substância em mistura Lupeol e 3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).....	73
Figura 30: Expansão de espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ suplementado com TMS) da substância em mistura 3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído)..	74
Figura 31: Mapa de contorno HSQC das substâncias em mistura Lupeol e 3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).....	75
Figura 32: Mapa de contorno HSQC das substâncias em mistura Lupeol e 3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).....	76
Figura 33: Cromatografia em camada delgada comparativa da fração 12-14.....	79
Figura 34: Espectro de RMN de ¹ H das substâncias III e IV em mistura.....	80
Figura 35: Cromatograma de purificação por CLAE das substâncias III e IV	81
Figura 36: Espectro de UV das substâncias III e IV, respectivamente.	82
Figura 37: Cromatografia em camada delgada comparativa da substância ácido betulínico.....	83
Figura 38: Substância Ácido betulínico	84
Figura 39: Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ suplementado com TMS) da substância Ácido betulínico.....	85
Figura 40: Mapa de contorno HSQC da substância Ácido betulínico	86
Figura 41: Mapa de contorno HMBC da substância Ácido betulínico	87
Figura 42: Espectro de CL/EM da substância Ácido betulínico	88
Figura 43: Efeito dos extratos MeOH e Hexano/AcOEt dos calos de <i>Deguelia duckeana</i> no crescimento da parte aérea de <i>Lactuca sativa</i>	92
Figura 44: Efeito dos extratos MeOH, hexano/AcOEt de folhas e aquoso das raízes de <i>Deguelia duckeana</i> no crescimento radicular de <i>Lactuca sativa</i>	93
Figura 45: Plântulas de <i>Lactuca sativa</i> sob interferência de diferentes extratos.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

^{13}C – Carbono – 13 (isótopo)

^1H – hidrogênio

AcOEt – Acetato de etila

ANA – Ácido naftaleno acético

BAP – 6-benzilaminopurina

CCA – Coluna Cromatográfica Aberta

CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CCDP – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ – Sulfato Cérico

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLSI - Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

$\text{DMSO-}d_6$ – Dimetilssulfóxido deuterado

EM – Espectrometria de massas

FeCl_3 – Cloreto Férrico

HSQC – Espectroscopia de Correlação Heteronuclear de Múltiplos Quantum

HMBC – Espectroscopia de Correlação Heteronuclear de um Único Quantum

KIN – Cinetina (6-furfurilaminaopurina)

LABB – Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia

MeOH – Metanol

mg- Miligramas

mL- Mililitros

MS – Meio de cultura Murashige & Skoog

MHz – Mega Hertz

NP-PEG – Difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol

Rf – Fator de Retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SiO_2 – Sílica

TMS – Tetrametilsilano

UV – Luz Ultravioleta

μg – Microgramas

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE QUADROS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Família Fabaceae	16
2.2 Gênero <i>Deguelia</i>	17
2.3 <i>Deguelia duckeana</i>	18
3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	23
3.1 Terpenos	26
3.2 Triterpenos	26
4. ENSAIOS BIOLÓGICOS	27
4.1 Atividade Antibacteriana	27
4.2 Atividade de toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	27
4.3 Avaliação do potencial Alelopático	28
5. OBJETIVOS	30
5.1 Geral	30
5.2 Específicos	30
6. REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 1	39
1.2 METODOLOGIA	40
1.2.1 Coleta	40
1.2.2 Preparo do Extrato	40
1.2.3 Análise cromatográfica dos extratos	42
1.2.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	42
1.2.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	42
1.2.5.1 Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo	42
1.2.5.2 Teste de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	43
1.2.5.3 Avaliação do potencial Alelopático	44
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
1.3.1 Obtenção dos extratos	45

1.3.2	Análise cromatográfica dos extratos.....	45
1.3.3	Análise de Ressonância Magnética Nuclear	47
1.3.4	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	51
1.3.4.1	Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo.....	51
1.3.4.2	Teste de toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	52
1.3.4.3	Avaliação do potencial Alelopático.....	52
1.4	CONCLUSÃO.....	55
1.5	REFERÊNCIAS.....	57
CAPÍTULO 2		59
2.1	INTRODUÇÃO.....	60
2.2	METODOLOGIA	63
2.2.1	Extrato metanólico dos calos de <i>D. duckeana</i>	63
2.2.2	Análises cromatográficas	63
2.2.3	Ressonância Magnética Nuclear	63
2.2.4	FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO	63
2.2.4.1	Fracionamento Líquido-Líquido	63
2.2.4.2	Fracionamento da fase AcOEt do Extrato metanólico dos Calos de <i>Deguelia duckeana</i>	64
2.2.4.3	Fracionamento da fase Hidrometanólica do Extrato Metanólico dos Calos de <i>Deguelia duckeana</i>	67
2.2.5	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	69
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
2.3.1	Identificação estrutural das substâncias isoladas.....	69
2.3.2	Identificação estrutural das substâncias Lupeol (I) e 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído) (II).....	70
2.3.3	Identificação estrutural das substâncias III e IV.....	79
2.3.4	Identificação estrutural da substância ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (Ácido Betulínico) (V).....	82
2.3.5	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	89
2.3.5.1	Atividade Antibacteriana pelo método de microdiluição.....	89
2.3.5.2	Atividade de toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	91
2.3.5.3	Avaliação do potencial Alelopático.....	91
2.4	CONCLUSÃO.....	94
2.5	REFERÊNCIAS.....	95

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia é o bioma com a maior biodiversidade do mundo, com ampla diversidade de animais e vegetais, oferecendo numerosos recursos para as populações locais, um deles é a utilização da flora local como medicamento. Em plantas utilizadas na terapêutica de muitas enfermidades, os chamados princípios ativos são substâncias com origem predominantemente do metabolismo secundário, como: alcaloides, flavonoides, terpenos, substâncias fenólicas, antraquinonas, entre outros (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998; GLOBO-NETO e LOPES, 2007; EVERT, 2014).

A biotecnologia vegetal através da propagação vegetativa *in vitro* permite a eliminação de doenças vegetais e o melhoramento genético das plantas. Essa técnica fornece à produção de microplantas e/ou biomassa vegetal de excelente qualidade fitossanitária e genética, em curto espaço de tempo e reduzida área física o que é fundamental para a produção de metabólitos secundários (SOUZA et al., 2018).

A fitoquímica associada à cultura de tecidos *in vitro* contribui na detecção e análise de produtos do metabolismo vegetal. Com o desenvolvimento de novos métodos, o conhecimento da composição química das plantas tem se expandido, tanto para a identificação das classes de substâncias quanto para a detecção de moléculas específicas (PILATTI, 2010). Estudos recentes indicam que é possível produzir calos *in vitro* de forma eficiente para se obter substâncias de interesse (COSTA et al., 2012; KOKOTKIEWICZ et al., 2012).

Um dos aspectos mais críticos na produção de plantas medicinais, principalmente de árvores, para a utilização terapêutica é, sem dúvida, a quantidade e a qualidade da matéria-prima vegetal. Em muitos casos há a ausência de estudos fitoquímicos e farmacológicos aprofundados, por conta da dificuldade de obtenção de material vegetal, devido à raridade e baixa frequência de ocorrência da espécie nas florestas e/ou localização de difícil acesso e ocorrência em ecossistemas ameaçados de extinção (VIANA et al., 1999).

Neste contexto, a biotecnologia vegetal oferece ferramentas, não apenas para o desenvolvimento de métodos eficientes para a propagação e conservação de germoplasma das espécies de árvores como *Deguelia duckeana*, mas também para viabilizar a produção dos metabólitos secundários de interesse, através do cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos.

O estudo da constituição química das plantas tem sido facilitado pelo desenvolvimento de métodos rápidos e precisos, tanto para a identificação das classes de

substâncias quanto para a detecção de moléculas específicas (PILATTI, 2010). O grande interesse no isolamento de substâncias derivadas do metabolismo secundário é devido à sua produção estar relacionada à interação entre organismos, apresentando frequentemente atividade biológica comprovada frente a várias patologias humanas (RHODES, 1994).

Estudos realizados previamente com *D. duckeana* pelo nosso grupo de pesquisa (LIMA et al. 2013) mostram que o extrato diclorometano (DCM) das raízes apresentou atividade antibacteriana frente a *Salmonella enteritidis*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Staphylococcus aureus*; e o extrato hexânico das folhas atividade contra *Escherichia coli* (LIMA et al., 2013; LEITE, 2018). A chalcona 4-hidroxi-lonchocarpina e a flavona 4-hidroxi-isolonchocarpina isoladas de extratos de *D. duckeana*, mostraram atividade citotóxica contra a linhagem de células tumorais do neurônio SK-N-SH. Os flavonoides lonchocarpina, 4-hidroxi-lonchocarpina, 4-hidroxi-isolonchocarpina e 3',4'-metilenodioxo-7-metoxiflavona inibiram o fator de alongamento eucariótico 2 (e-EF2) atuante na catálise do movimento no ribossomo (alongamento) correspondente a segunda etapa da síntese de proteínas nas células neurais SK-NSH (CURSINO et al., 2016).

Devido a importante produção de metabólitos secundários com efeitos farmacológicos sobre sistemas biológicos, o nosso grupo de pesquisa também realizou a indução de calos a partir de explantes foliares de *D. duckeana* com o objetivo de identificar a presença de metabólitos *in vitro*. O fracionamento fitoquímico do extrato hexano/AcOEt rendeu o isolamento dos triterpenos lupeol e 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído) (RESCAROLLI, 2018).

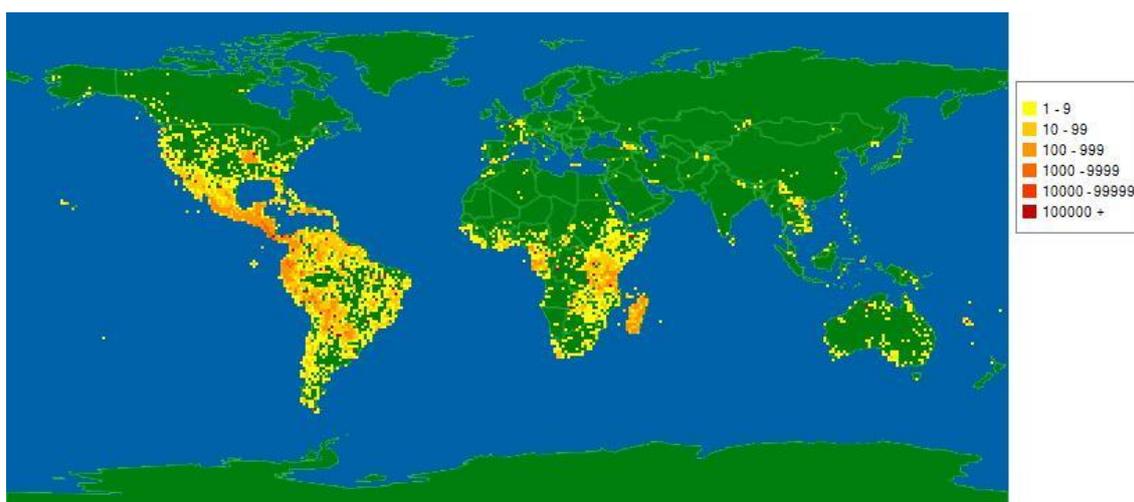
Assim, o presente estudo visou realizar o estudo fitoquímico e avaliar as atividades biológicas dos extratos de *Deguelia duckeana*, além de fracionar e isolar substâncias do extrato metanólico dos calos da espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família Fabaceae

A família Fabaceae, anteriormente conhecida como Leguminosae, é considerada a terceira maior família de Angiospermas, possui aproximadamente 946 gêneros e mais de 24.505 espécies (THE PLANT LIST, 2020), dividida em três grandes subfamílias: Papilionoideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae, conforme variações morfológicas características de cada grupo. Sendo que destes, 222 gêneros e 2.849 espécies ocorrem no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020). Trata-se de uma família cosmopolita (Figura 1), ocorrendo desde os picos das serras montanhosas até o litoral arenoso, da floresta tropical úmida até desertos, inclusive em ambientes aquáticos, mas os centros de diversidade diminuem a partir do distanciamento da linha do Equador (LEWIS, 1987). No Brasil, figura entre as principais famílias que compõem a flora dos diversos ecossistemas (SOUZA e LORENZI 2005).

Figura 1: Ocorrência mundial da família Fabaceae



Fonte: <http://www.tropicos.org/Name/42000184?tab=maps>

É conhecida como a segunda maior família com potencial econômico, por possuir grande produção de alimentos (vagens, grãos e legumes), gerando um alto consumo de proteína vegetal no mundo (GRAHAN e VANCE, 2003; FERNANDES et al., 2014). Destacam-se também outras aplicações, como a exploração madeireira, óleos-resinas, óleos essenciais, extratos vegetais e por ser usado pelas indústrias de perfumaria, farmacêutica, cosmética, tintas e vernizes e fitoterápico. Porém, não se tem muitos estudos sobre a parte fitoquímica e farmacológica dessa grande biodiversidade vegetal (JOLY et al., 2011).

Com relação à química, esta por sua vez possui uma riqueza metabólica diversificada, onde já foram encontradas classes metabólicas de polifenóis como antocianinas, flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, procianidinas e terpenos (DETTENBORN, 2009; LIMA, 2018; IGNOATO, 2012; GOMES, 2015). Muitas plantas angiospermas dessa família possuem altos teores de fenólicos e estão biossinteticamente relacionadas à via do ácido chiquímico (SANTOS-SÁNCHEZ, 2019).

Várias espécies da família Fabaceae são descritas por possuírem atividades biológicas, tais como antimaláricas dos extratos de *Prosopis juliflora* analisados contra infecção por *Plasmodium berghei* (BATISTA et al., 2018), no extrato etanólico da raiz de *Pithecellobium dulce* sendo ativo contra cepas bacterianas de *Acetobacter aceti*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia* e *Enterobacter aerogenes* (LONE et al., 2018). Além de atividade alelopática frente a *Lactuca sativa* apresentada por *Canavalia ensiformis* (PEREIRA et al., 2018).

2.2 Gênero *Deguelia*

O gênero *Deguelia* pertence à tribo Millettieae. Sua distribuição é neotropical, ocorrendo desde o limite sul do trópico de Capricórnio, na região leste do Brasil, estendendo-se ao longo da costa Atlântica em direção a região Amazônica, dispersando-se pelo norte da América do Sul até atingir o Canal do Panamá (LEITE, 2018; TOZZI 1989). As espécies deste gênero se caracterizam por possuírem flores em pseudo-racemos axilares longos, as vezes combinados em pseudo-panículas, com os eixos de última ordem curtos, cilíndricos com 3-6 flores cada (TOZZI, 1989).

Dividida em duas seções baseada em características morfológicas e número de óvulos das flores. As espécies que possuem até 6 óvulos/ovários foram colocadas da seção *Deguelia* e as que possuíam de 7-15 óvulos/ovários na seção *Multiovulis* (MARQUES et al., 2015). Neste gênero são registrados 46 nomes de espécies, porém apenas 18 são aceitas (THE PLANT LIST, 2020).

Moraes (2000), realizou um estudo onde verificou-se que o gênero *Deguelia* se caracteriza pela presença de isoflavonoides. Dentro deste, na seção *Deguelia* predomina os rotenóides, de modo que em espécies da seção *Multiovulis* predominam as 4-hidroxi-3-fenilcumarinas. A presença das 4-hidroxi-3-fenilcumarinas por sua vez é encontrada apenas em espécies das tribos Milletteae e Phaseoleae da subfamília Papilionoideae. Esta constatação é de grande importância quimiotaxonômica, pois comprova a proximidade cladística entre essas duas tribos (SOUZA NETA, 2003).

O gênero possui espécies com ação tóxica e que são conhecidas popularmente como timbó, timborana, canambi, etc. dentre elas está a espécie utilizada neste trabalho, *D. duckeana* (TOZZI, 1998).

2.3 *Deguelia duckeana*

A espécie *Deguelia duckeana* (Figura 2) é um arbusto escandente, pequeno, rasteiro de lugares abertos, secos ou alagados, na floresta pode atingir grandes dimensões, subindo em árvores altas. Suas flores são na cor róseas-violáceas (SILVA et al., 1977). Sendo as folhas com 7 ou 9 folíolos (raramente 5 ou 11), estípulas ausentes, pecíolo estriado no geral com um sulco ventral, raquis semelhante ao pecíolo, sub-angular. Inflorescência ereta, pseudo-racemosa, auxiliar, multiflora e bractéolas (TOZZI, 1989).

Figura 2: Espécie *Deguelia duckeana* mantida no viveiro do LABB-INPA
A- Planta jovem. B- Planta adulta apresentando padrão escandente. C: inflorescência



Fonte: A e B: Rescarolli, 2018;
C: <http://reflora.jbrj.gov.br>

Classificação taxonômica de *D. duckeana*

Família: Fabaceae

Subfamília: Papilionoideae (Faboideae)

Tribo: Millettieae

Gênero: *Deguelia*

Seção: *Deguelia*

Espécie: *Deguelia duckeana* A. M. G. Azevedo

É uma planta brasileira endêmica conhecida como cipó-cururu ou timbó. É uma das várias plantas usadas pelos indígenas por possuir atividade ictiotóxica. Quando suas raízes são maceradas e lançadas na água causam a morte de peixes, essa técnica é utilizada pelos índios desde a época pré-colombiana e, atualmente pelos ribeirinhos, no entanto é proibida por lei (TOZZI, 1989).

Entre as propriedades farmacológicas atribuídas aos extratos de folhas, galhos e raízes de *D. duckeana* em um estudo realizado por Lima e colaboradores (2013) os

extratos hexânico e metanólico (MeOH) foram testados quanto atividade antioxidante, toxicidade e antibacteriana. A atividade tóxica foi comprovada em ensaios de toxicidade em *Artemia salina*, onde a menor concentração testada se mostrou tóxica para os microcrustáceos (5,0 µg/mL). Apenas o extrato hexânico do caule apresentou atividade contra *S. aureus*, apresentando um halo de inibição de 7 mm. Não foi detectada atividade antioxidante nos extratos.

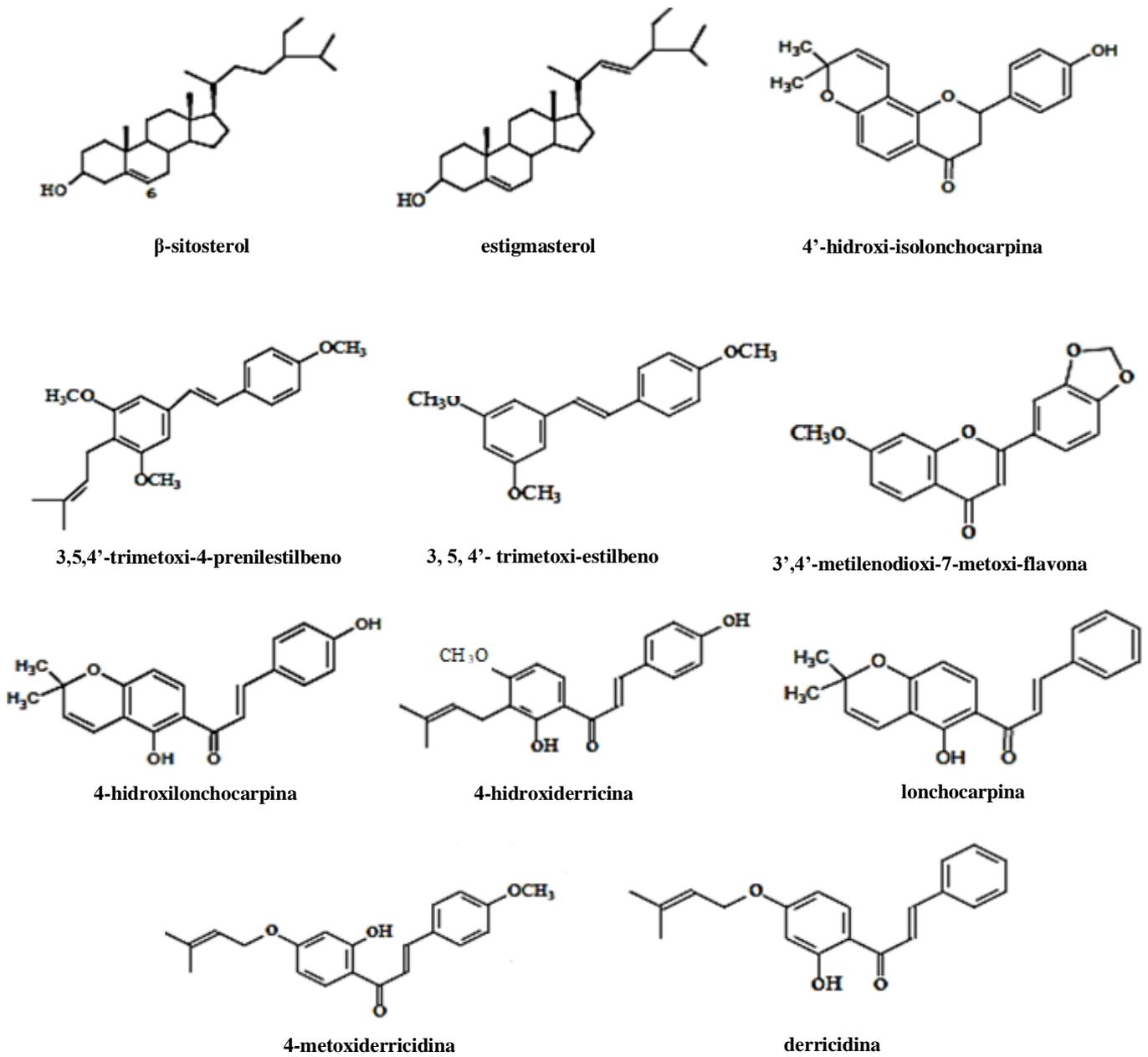
A análise fitoquímica do extrato diclorometânico (DCM) das raízes de *D. duckeana* resultou no isolamento e identificação de seis substâncias (Figura 3):

- 3,5,4'-trimetoxi-4-prenilestilbeno,
- 4-hidroxi lonchocarpina,
- 4-hidroxi derricina,
- 4-metoxiderricina,
- 4'-hidroxi-isolonchocarpina,
- 3',4'-metilenodioxo-7-metoxi-flavona.

Enquanto o fracionamento do extrato hexânico dos galhos possibilitou o isolamento de cinco substâncias (Figura 3):

- lonchocarpina,
- derricina,
- 3,5,4'- trimetoxi-estilbeno,
- mistura dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol (LIMA, 2011)

Figura 3: Estruturas químicas das substâncias isoladas de *D. duckeana*



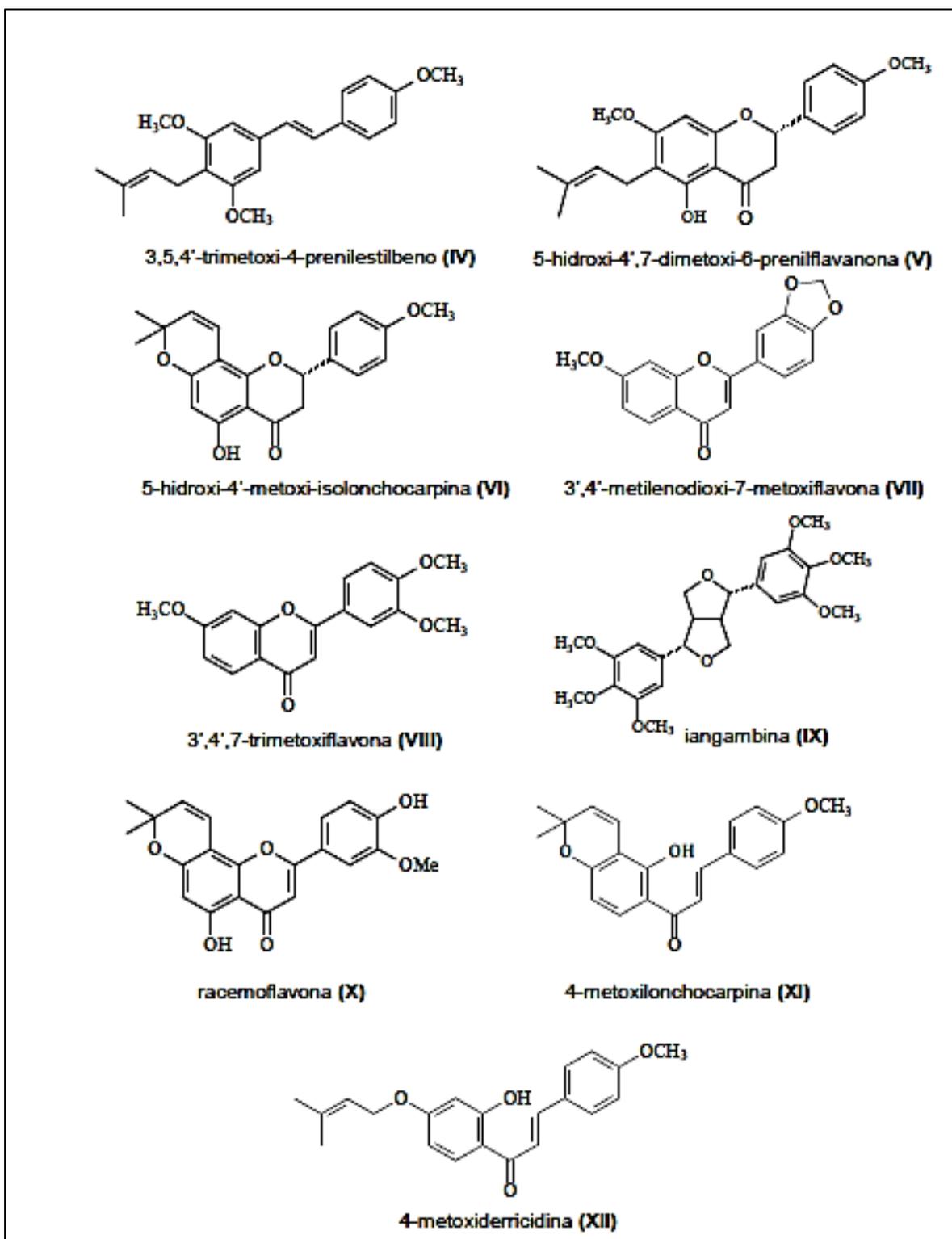
Fonte: Lima, 2013

Foi dada continuidade no fracionamento do extrato diclorometânico das raízes e hexânico dos caules de *D. duckeana* por Cursino e colaboradores (2016), onde foram isolados e identificados onze flavonoides. Algumas dessas substâncias já haviam sido relatadas por Lima (2013) assim como novas foram identificadas. As substâncias isoladas e identificadas foram (Figura 4):

- 3,5,4'-trimetoxi-4-prenilstilbeno (1),
- 4-metoxiderricidina (2),
- lonchocarpina (3),
- 4-hidroxilonchocarpina (4),
- 4-metoxillonchocarpina (5),
- 5-hidroxi-4',7-dimetoxi-6-prenilflanona (6),
- 4'-hidroxiisolonocarpina (7),
- 4'-metoxiisolonocarpina (8),
- 3',4',7-trimetoxiflavona (9),
- 3',4'-metilenodioxi-7-metoxiflavona (10)
- 2,2-dimetil-cromona-5,4'-hidroxi-5'-metoxiflavona (11).

Com exceção das substâncias 1, 3 e 4, todos esses flavonoides foram descritos pela primeira vez em *D. duckeana* e a flavonona (6) pela primeira vez na natureza (CURSINO et al., 2016).

Figura 4: Estruturas químicas de flavonoides isolados de *D. duckeana*

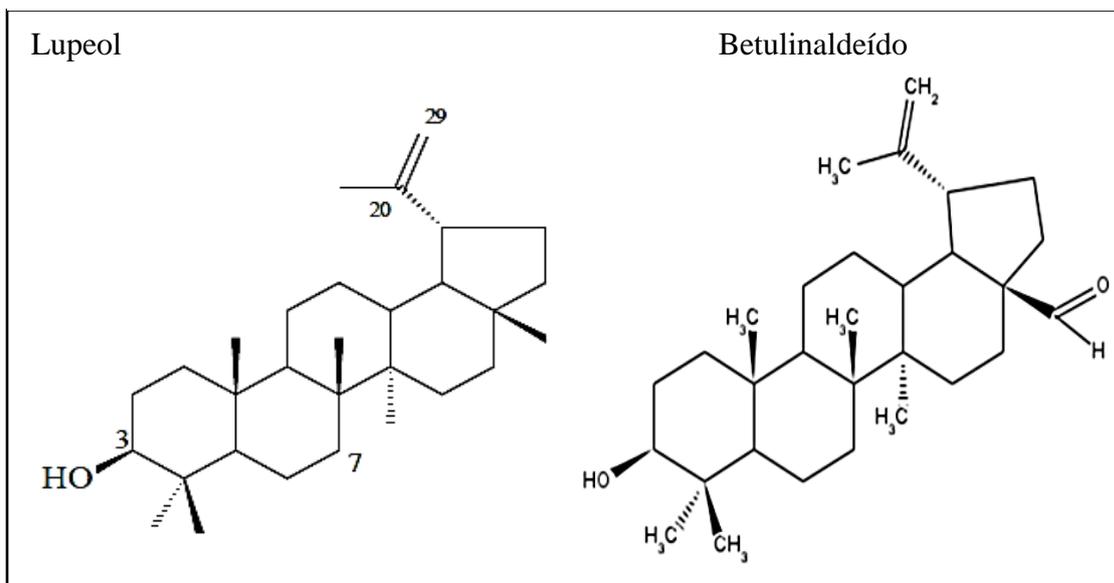


Fonte: Cursino et al., 2016

Devido a importante produção de metabólitos secundários com efeitos farmacológicos sobre sistemas biológicos, o nosso grupo de pesquisa realizou a indução de calos a partir de explantes foliares de *D. duckeana* por Rescarolli (2018) com o

objetivo de identificar a presença de metabólitos *in vitro*. O fracionamento fitoquímico do extrato hexano/acetato de etila (AcOEt) rendeu o isolamento dos triterpenos lupeol e 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído) (Figura 5).

Figura 5: Estruturas químicas dos triterpenos isolados do extrato hexano/AcOEt dos calos de *D. duckeana*



Fonte: Rescarolli, 2018

3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O metabolismo dos organismos vivos, por meio das variadas rotas biossintéticas, geram uma grande variedade de metabólitos, que são substâncias que atuam nos mais diversos tipos de funções. Os metabólitos primários são essenciais para a planta, são aquelas moléculas que intervêm diretamente em processos que auxiliam a determinar a sobrevivência, crescimento e reprodução das plantas. No entanto, os metabólitos secundários são aquelas substâncias químicas cuja biossíntese é específica a algumas espécies de organismos vivos, que desempenham funções não essenciais nas plantas, por essa razão a sua falta não afeta seu desenvolvimento (DA SILVA et al., 2010).

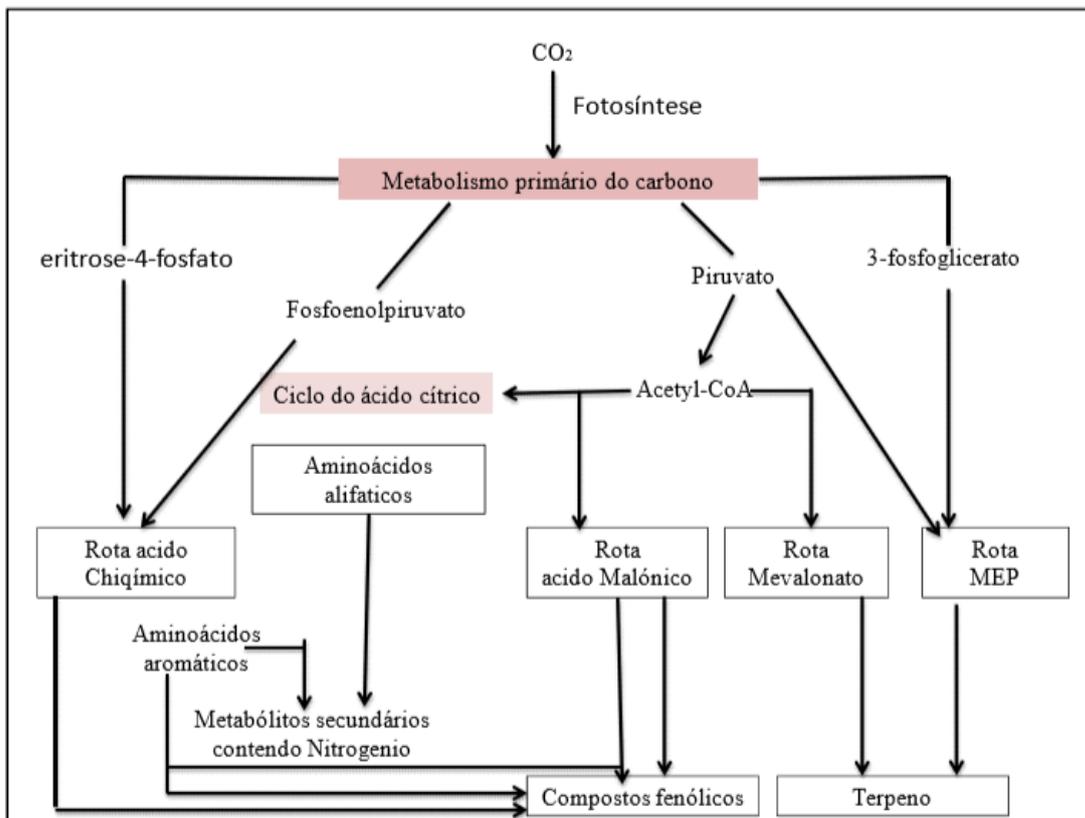
O interesse por espécies com acentuado potencial terapêutico já comprovado tem aumentado, gerando conseqüentemente uma busca por novas fontes de produtos naturais e fármacos. A capacidade biossintética das plantas é muito vasta, porém, a quantidade empregada por elas é muito pequena em relação ao que podem nos disponibilizar (FOGLIO et al., 2006).

Diversos fatores são apontados no que se refere a produção de fármacos, e particularmente daqueles que são obtidos de espécies florestais, alguns desses fatores são: acessibilidade, raridade de espécies que possuem valor comercial e medicinal, qualidade da matéria prima utilizada e principalmente aquelas localizadas em ecossistemas que são ameaçados de extinção (GONÇALVES e ROMANO, 2012; MORAIS et al., 2012).

As funções ecológicas dos metabólitos secundários são proteger o vegetal contra a herbivoria e infecções por microrganismos patogênicos, e também na atração de animais polinizadores e dispersores, geralmente, não apresentam atividade direta sobre o metabolismo primário da planta (TAIZ e ZEIGER, 2010). A grande procura por substâncias derivadas do metabolismo secundário ocorre pelo fato de serem produtos da interação entre organismos, e frequentemente apresentam atividade biológica comprovada frente a várias patologias humanas (RHODES, 1994).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas podem ser divididos em três grupos principais e quimicamente diferentes: terpenos, substâncias fenólicas e alcaloides (Figura 6). Os terpenos são biossintetizados a partir da acetil-CoA por meio do ácido mevalônico (no citoplasma) ou dos intermediários glicolíticos como o piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). As substâncias fenólicas são formadas a partir do ácido chiquímico e alguns têm biossíntese mista com o acetato. Por fim, os alcaloides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (BUCHANAN et al., 2002).

Figura 6: Visão simplificada das principais vias de biossíntese de metabólitos secundários e sua correlação com o metabolismo primário



Fonte: TAIZ e ZEIGER, 2010

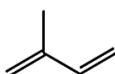
Os setores industriais e laboratoriais visando à produção, extração e purificação dos metabólitos secundários encontram dificuldades, pois algumas substâncias são produzidas em certos tipos de células e tecidos especializados (SERAFINI et al., 2001). Para Grattapaglia e Machado (1998), as principais vantagens da produção de metabólitos *in vitro* são: a independência dos fatores ambientais, o aumento do controle da produção, o uso de linhagens que garantam uma qualidade consistente do produto, a simplificação dos métodos de processamento e recuperação do produto alvo, o aproveitamento de novas rotas de síntese a partir de linhagens mutantes, a utilização de elicitores no direcionamento da produção e o aproveitamento das biotransformações que ocorrem durante o cultivo de células vegetais *in vitro*, entre outras.

Um grande exemplo de sucesso na produção de metabólitos *in vitro* foi evidenciado na obtenção dos alcaloides vincristina e vimblastina a partir de culturas de tecidos *in vitro* da espécie *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). Vincristina e Vimblastina são substâncias com comprovada ação antitumoral, porém as quantidades dessas substâncias na planta são muito pequenas (SAIMAN et al., 2014).

3.1 Terpenos

Os terpenos ou terpenoides como podem ser conhecidos é maior classe de metabólitos secundários produzidos pelas plantas (MARTINS et al., 2017), eles formam uma diversidade de estruturas derivadas de unidades de isopreno (5 carbonos) (Figura 7) (SIMÕES et al., 2017). Com relação a sua biossíntese, esta pode ser dividida em duas rotas principais, a via do ácido mevalônico, a partir do acetil-CoA e rota do metileritritol fosfato (MEP) na qual são sintetizados a partir dos intermediários glicolíticos 1-desoxi-D-xilulose e metileritritol fosfato (SIMÕES et al., 2017).

Figura 7: Estrutura de isopreno



Também chamados de inseticidas orgânicos desempenham um papel de proteção às plantas contra os insetos. Os terpenos são precursores dos triterpenos e dos sesquiterpenos já conhecidos por apresentarem ação bactericida, onde seu mecanismo de ação presumível está relacionado com a ruptura da membrana celular por compostos lipofílicos (ARANTES et al. 2005). Outras propriedades biológicas apresentadas na literatura para a classe dos terpenoides são: antivirais, antiinflamatórias, antialérgicas, antineoplásicas, entre outras (PADUCH et al., 2007).

Formam uma família grande e estruturalmente diversificada de produtos naturais derivados de unidades de isopreno C5. E são classificadas como hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (DEWICK, 2002).

3.2 Triterpenos

Os terpenos são divididos de acordo com a estrutura do esqueleto carbônico em monoterpenos (contendo dez carbonos), sesquiterpenos (contendo quinze carbonos), diterpenos (contendo vinte carbonos) e triterpenos (contendo trinta carbonos) (DEGENHARDT et al., 2009).

Os triterpenos são os maiores constituintes de uma grande parte de plantas medicinais, estão presentes em plantas assim como em alguns animais marinhos como

metabólitos secundários podendo estar conjugados a glicídios (saponinas), livres ou como ésteres (LEE et al., 2002; SALVADOR et al., 2012).

Os triterpenos são encontrados em alimentos da dieta humana (consumidos em torno de 250 mg por dia) (SIDDIQUE; SALEEM, 2011). Possuem significativa ação biológica, com por exemplo o triterpenos do tipo lupano (como a betulina, o ácido betulínico (ácido 3βhidroxi-lup-20(29)-en-28-oico) e o lupeol), que tem mostrado diversas atividades biológicas como anti-inflamatória, antihiperlipidêmica, antioxidante (ALQAHTANI et al. 2013) e anticâncer (BAGLIN et al. 2003).

4. ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.1 Atividade Antibacteriana

Sabe-se que o uso inadequado de antibióticos está relacionado a resistência dos microrganismos, o que dificulta o tratamento de infecções bacteriana, fazendo assim com que haja uma rápida disseminação desses microrganismos (KARAM et al., 2016).

Diante dessa problemática, o interesse pela busca de novos fármacos oriundos de fonte naturais e extratos vegetais aumentou bastante, facilitando o estímulo a novas pesquisas que tenham a finalidade de comprovar a eficácia da fitoterapia e assim desenvolver novos fármacos. Além disso, os fármacos sintéticos podem ser substituídos por fármacos de plantas medicinais que podem possuir alta eficácia, menor potencial tóxico e efeito terapêutico semelhante aos que são produzidos sinteticamente pelas indústrias (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Os agentes patógenos clínicos mais comuns Gram-positivos são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* e Gram-negativa as bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* e *Acinetobacter baumannii* que são causadoras de graves e até mesmo fatais infecções (HU et al., 2017; WHO et al., 2018).

4.2 Atividade de toxicidade frente *Artemia salina*

Os testes de toxicidade são realizados com o objetivo de identificar ou avaliar os efeitos de substâncias nos sistemas biológicos, assim como confirmar a toxicidade relativa dessa substância (COSTA et al., 2008).

A *Artemia salina* Leach, é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca e família Artemiidae (MEYER et al., 1982), geralmente é empregada na aquicultura e em aquários (LIBRALATO et al., 2016) e utilizada como alimento para peixes e outros crustáceos, pássaros e vários invertebrados (MILHEM et al., 2008; PEREZ e LAZO, 2010).

Nos últimos anos o uso da *A. salina* tem aumentado satisfatoriamente, devido a simplicidade no manuseio, realização de ensaios rápidos e baixo custo, favorecendo deste modo a utilização em diversos estudos (RAJABI et al., 2015). O teste de toxicidade emprega a avaliação preliminar da toxicidade de substâncias de origem natural ou sintética (BELÉM et al., 2015). A *A. salina* apresenta como vantagem, resistência ao ser transportada, simplicidade no cultivo, reprodução e no armazenamento dos ovos (MERINO et al., 2015). Podem ser visualizadas com o auxílio do microscópio ou a olho nu (SOUZA et al., 2015).

4.3 Avaliação do potencial Alelopático

A alelopatia é o efeito de uma planta sobre outra por meio da produção de substâncias químicas que são liberadas no meio ambiente (RICE, 1984), estudos realizados nesta área estão beneficiando recentes avanços tecnológicos. Neste teste estuda-se processos biológicos realizados por plantas, ou outros microrganismos, que através de metabólitos secundários, denominados aleloquímicos que são capazes de interferir no desenvolvimento de organismos. Os aleloquímicos estão presentes em todos os tecidos das plantas, tanto órgãos vegetativos quanto reprodutivos. (RIZVI et al., 1992; SOUZA et al., 2006).

A bioatividade dos aleloquímicos envolve estímulo ou inibição do desenvolvimento de outras espécies, quando esses compostos são liberados no meio ambiente, provocam mudanças morfológicas e metabólicas em espécies vizinhas, podendo influenciar no crescimento, prejudicar o desenvolvimento normal e até mesmo dificultar a germinação das sementes de outras espécies vegetais (REZENDE et al., 2003; FIORENZA et al., 2016).

Dentre os grupos de metabólitos identificados por apresentarem atividade alelopática, destacam-se: benzoquinonas, terpenoides, alcaloides, derivados do ácido benzóico e arilpropanoides, ácidos hidroxâmicos, esteroides, ácidos graxos de cadeia longa e lactonas insaturadas (BARATELLI, 2006; REIGOSA et al., 2013).

Os terpenos estão envolvidos em vários processos ecológicos de plantas, dentre eles as interações alelopáticas com outras plantas (DUKE; OLIVA, 2004). Alguns autores destacam que diferentes categorias de terpenos podem promover a inibição da germinação e crescimento de outras plantas, particularmente de plantas daninhas, sendo promissores a serem utilizados como herbicidas naturais (ABDELGALEIL et al., 2009; MACÍAS et al., 2010; GRANÃ et al., 2013).

O potencial alelopático conhecido de espécies botânicas possui importantes contribuições na investigação de novos compostos (RICE, 1984; RIZVI, 1992; KRUSE et al., 2000; LI et al., 2010).

5. OBJETIVOS

5.1 Geral

Realizar o estudo fitoquímico do extrato metanólico dos calos e avaliar as atividades biológicas dos extratos da planta e dos calos de *Deguelia duckeana*.

5.2 Específicos

- ✓ Avaliar os extratos de folhas e raízes de *Deguelia duckeana* quanto ao seu potencial antimicrobiano, tóxico frente *Artemia salina* e alelopático.
- ✓ Avaliar o extrato metanólico e as fases dos calos de *Deguelia duckeana* quanto ao seu potencial antimicrobiano, tóxica frente *Artemia salina* e alelopático.
- ✓ Isolar e identificar/elucidar as substâncias químicas presentes no extrato metanólico dos calos de *Deguelia duckeana*.

6. REFERÊNCIAS

- Abdelgaleil, S.A.M.; Hashinaga, F. 2009. Allelopathic potential of two sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 35, n. 11, 737-742.
- Alqahtani, A., Hamid, K., Kam, A., Wong, K. H., Abdelhak, Z., Razmovski-Naumovski, V., Li, G. Q. 2013. The Pentacyclic Triterpenoids in Herbal Medicines and Their Pharmacological Activities in Diabetes and Diabetic Complications. *Current Medicinal Chemistry*, 20.
- Arantes, V. P; Sato, D. N; Vilegas, W; Santos, L. C; Leite, C. Q. F. 2009. Plantas do cerrado brasileiro com atividade contra *Mycobacterium fortuitum*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 26, n. 3, p. 195-198,
- Baglin, I. et al. A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents. *Mini Rev Med Chem*, v. 3, p. 525-39, 2003.
- Baratellit. G. Estudo das propriedades alelopáticas vegetais: Investigação De Substâncias aleloquímicas em *Terminalia Catappa* L. (Combretaceae). p. 206. Dissertação de mestrado (Química de produtos naturais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- Batista, R, Santana C. C, Azevedo-Santos A. V, Suarez-Fontes A. M, Ferraz JLDAA, Silva LAM, & Vannier-Santos, M. A. 2018. In vivo antimalarial extracts and constituents of *Prosopis juliflora* (Fabaceae). *Journal of Functional Foods*. 44: 74-78.
- Belém, V. A.; Lima, F. G. C.; Barros, L. M.; Duarte A. E. 2015. Estudo da toxicidade e atividade antifúngica de *Lantana camara* L. (Verbenaceae) como ferramenta de preservação da espécie. *Caderno de Cultura e Ciência*, ano IX, vol. 13, n. 2, p. 51-59.
- Buchanan B.; Gruissem W.; Jones. R. Natural Products (secondary metabolites). 2002. In: _____ *Biochemistry & Molecular Biology Of Plants*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2002. Cap. 24, p. 1250-1318.
- Cechinel, F. V; Yunes, R. A. 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v.21, n.1.

- Costa, C. R.; Olivi, P.; Botta, C. M. R.; Espindola, E. L. G. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*. vol. 31, n. 7, p. 1820-1830.
- Costa, P.; Gonçalves S.; Valentão, P.; Andrade, P. B.; Coelho, N.; Romano, A. 2012. Thymus otocephaly wild plants and in vitro cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*. v.135, p.1253–1260.
- Cursino, L. M. C.; Lima, N.M; Murillo, R; Nunez, C. V; Merfort, I; Humar, M. 2016. Isolation of flavonoids from *Deguelia duckeana* and their effect on cellular viability, AMPK, eEF2, eIF2 and eIF4E. *Molecules*, 21(2): 192.
- Da Silva, E. F.; Dos Santos, G. B.; Bianchi, R. C. A. 2010. Química na Natureza. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, v. 7, p. 70.
- Degenhardt, J., Köllner, T.G. Gershenzon, J. 2009. Monoterpene a sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, v. 70, p. 1621-37.
- De Lima, V. L. A. G.; Mélo, E. A.; Lima, D. E. S. 2002. Fenólicos e Carotenóides Totais em Pitanga. *Scientia Agricola*. v. 59, n. 3, p. 447 - 450.
- Dettenborn, G. R. 2009. Investigação de Isoflavonas em Espécies de Leguminosas Nativas do Sul do Brasil, com ênfase em *Trifolium riograndense* Burkart. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- Dewik, P. M. 2002. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2. ed. England: John Wiley and Sons, Ltd.
- Duke, S. O., Romagni, J. G., Dayan, F. E. 2000. Natural product as source for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection*. v. 19, p. 583-589.
- Evert, R. F. R 2014. Biologia vegetal/ Ray FEvert e Susan E. Eichhorn: revisão técnica Jane Elizabeth Ana Claudia Kraus; Tradução M. Vieira. [et al.]-8. Ed-Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,
- Fabaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 17 Jan. 2020.
- Fiorenza, M.; Dotto, D. B.; Boligon, A. A.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Vestena, S. 2016. Análise itoquímica e atividade alelopática de extratos de *Eragrostis plana* Nees (capimannoni). *Iheringia*, Porto Alegre, v. 71, n. 2, p. 193-200.

- Foglio, M. A.; Queiroga, C. L.; Sousa I. M. De O., Rodrigues R. A. F. 2006. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. Construindo a História dos Produtos Naturais. http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm, acesso em fev de 2020.
- Fernandes, J. M.; Garcia, F. C. P.; Amorozo, M. C. M.; Siqueira, L. C.; Marotta, C. P. B.; Cardoso, I. M. 2014. Etnobotânica de Leguminosae entre agricultores 111 agroecológicos na Floresta Atlântica, Araponga, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia*, v. 65, n. 2, p. 539-554.
- Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. 2007. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v 30, n.2, p. 374 - 381.
- Gomes, R. F. 2015. Avaliação dos constituintes químicos em resíduos madeireiros de *Inga alba* Willd. e *Inga paraensis* Ducke. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus/ AM.
- Gonçalves, S.; Romano, A. 2013. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, v. 31, n. 2, p. 166-174,.
- Graham, P. H.; Vance, C.P. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, v. 131, n. 3, p. 872-877.
- Granã, S. O., Scheffler, B. E., Dayan, F. E. 2001. Allelochemicals as herbicides. First European Allelopathy Symposium. Vigo, Spain. p. 47-59.
- Grattapaglia, D.; Machado, M. A. 1998. Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa- CNPH, v. 1, .p.183-260.
- Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 6, p.1841-1856,
- Hu, Y. Q.; Zhang, S.; Xu, Z.; Sheng, Z.; Liu, M. L.; Feng, L. S. 2017. 4-Quinolone hybrids and their antibacterial activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.141, p. 335-345.
- Ignoato, M. C. Contribuição ao estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Aeschynomene fluminensis* e de *Machaerium hirtum* (Fabaceae) de Porto Rico – Paraná. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/ Paraná, 2012.

- Joly, C. A.; Haddad, C. F. B.; Verdade, L. M.; Oliveira, M. C. De; Bolzani, V. D. S.; Berlinck, R. G. S. 2011. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. *Revista USP*, n. 89, p. 114-133.
- Karam, G., Chastre, J., Wilcox, M. H., & Vincent, J. L. 2016. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Critical Care*, 20(1), 136.
- Kokotkiewicz, A.; Luczkiewicz, M.; Sowinski, P.; Glod, D. Gorynskic, K.; Bucinskic, A. 2012. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush) intact plant and *in vitro* cultures. *Food Chemistry*. v.133 p.1373–1382.
- Kruse, M.; Strandberg, M; Strandberg, B. 2018. Ecological effects of allelopathic plants – a review. Silkeborg: National Environmental Research Institute. Technical Report, n. 315, 2000. Disponível em: <https://www2.dmu.dk/1_viden/2_Publikationer/3_fagrapporter/rapporter/fr315.pdf>. Acesso em 25 de fev.
- Lee, Y.S. , Jin, D. Q., Kwon, E. J., Park, S. H., Lee, E. S., Jeong, T. C., Kim, J. A. . 2002 Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular Ca²⁺ release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells, *Cancer. Lett.* 186. 83-91.
- Leite, L.C.C. Revisão química e biológica da tribo Millettiae Miq. (Papilionoideae) e novas contribuições à espécie *Deguelia duckeana* A.M.G. Azevedo. Dissertação de Mestrado em Botânica, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Manaus-Amazonas, 2018.
- Lewis, G. 1987. Legumes of Bahia. *Kew: Royal Botanic Gardens*, 369p.
- Libralato, G.; Prato, E.; Migliore, L; Cicero, A. M.; Manfra, L. 2016. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological Indicators*, v, 69, p. 35-49.
- Lima, N. M.; Santos, V. N. C.; La Porta, F. A. 2018. Quimiodiversidade, Bioatividade e Quimiosistemática do Gênero *Inga* (FABACEAE): Uma Breve Revisão. *Revista Virtual de Química*, v. 10, p. 459-473.
- Lima, N.M.; Andrade J. I.; Lima K. C.; Dos Santos F. N.; Barison A.; Salomé K. S.; Matsuura T.; Nunez C. V. 2013. Chemical profile and biological activities of *Deguelia duckeana* A.M.G. Azevedo (Fabaceae). *Natural Product Research*, 27 (4–5): 425–432. Doi: 10.1080/14786419.2012.733387.

- Lone A. M. 2018. Preparation and evaluation of antibacterial potential of *Pithecellobium dulce* root extract against Gram positive and Gram negative bacteria. *Microbial pathogenesis*. 116: 49-53. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.013>
- Macias F. A, Simonet A. M. E., Galindo J. C. G. 1997. Bioactive steroids and triterpenes from *Melilotus messanensis* and their allelopathic potential. *J. Chem. Ecol.*, v. 23, n. 7, p. 1781-
- Marques, E. De J.; Serafim J. C. Da R. B.; Lemes B. B.; Carvalho M. F. A; Pereira M. De G.; Neta L. C. de S. 2015. Occurrence and Distribution of Polyphenolics in Species of *Deguelia* (Leguminosae). *Journal Microb Biochem Technol*, 7 (7): 327–333. Doi: 10.4172/1948-5948.1000234.
- Martins, M. A. R.; Silva, L. P.; Ferreira, O.; Schroder, B.; Coutinho, J. A. P.; Pinho, S. P. 2017. Terpenes solubility in water and their environmental distribution. *Journal of Molecular Liquids*. v. 241, p. 996-1002.
- Merino, F. J. Z.; Oliveira, V. B.; Paula, C. S.; Cansian, F. C.; Souza, A. M.; Zuchetto, M.; Hirota, B. C. K.; Duarte, A. F. S.; Kulik, J. D.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G. 2015. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Planta Médica*, vol. 17, n. 4, p. 1031-1040.
- Meyer, B.N.; Ferringi, N. R.; Putmam, J. B.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D.E.; Mclaughlin, J. L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Revista Brasileira Planta Medica*, v. 45, p. 31-34,.
- Milhem, M. M.; Al-Hiyasat, A. S.; Darmani, H. 2008. Toxicity Testing of Restorative Dental Materials Using Brine Shrimp Larvae (*Artemia salina*). *Journal of Applied Oral Science*, v. 16, n. 4, p. 297-301.
- Moraes, V. R. S. Estudo fitoquímico de *Deguelia hatschbachii* A.M.G Azevedo - isolamento, determinação estrutural, análise por CLAE e testes biológicos. Tese de doutorado em química, Instituto de Química (UNICAMP). 253 p. 2000.
- Morais, T. P.; Luz, J. M. Q.; Silva, S. M.; Resende, R. F.; Silva, A. S. 2012. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. Botucatu, v.14, n.1, p.110121,.
- Paduch, R.; Kandefer-Szerszeń, M.; Trytek, M.; Fiedurek, J. 2007. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 55, p. 315-327.

- Pilatti, F. K. Crescimento, perfil metabólico e citoquímica de calos de *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). Dissertação de mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). 116 p. 2010.
- Pereira J. C, Paulino C. L. D. A, Granja B. D. S, Santana A. E. G, Endres L, Souza R. C. D. 2018. Potencial alelopático e identificação dos metabólitos secundários em extratos de *Canavalia ensiformis* L. *Revista Ceres* 65: 243-252. Doi: <https://doi.org/10.1590/0034-737x201865030004>
- Pérez, O. P.; Lazo, F. J. 2010. Ensayo de *Artemia*: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*. v. 22, n.1, p. 34-43.
- Prior, Ronald L.; Wu, Xianli; Schaich, Karen. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 53, n. 10, p. 4290-4302.
- Rajabi, S.; Ramazani, A.; Hamidi, M., Naji.; T. 2015. *Artemia salina* as a model organismo in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 23, n.1, p. 20.
- Reigosa, M.; Gomes, A.S.; Ferreira, A.G.; Borgetti, F. 2013. Allelopathic research in Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 27, n. 4, p. 629–646,.
- Rescarolli, C. L. S. Triterpenos de calos de *Deguelia duckeana* A. M. G. Azevedo (Fabaceae). Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas (UFAM). 103 p. 2018.
- Rezende, C. P.; Pinto, J. C.; Evangelista, A. R.; Dos Santos, I. P. A. 2003. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens. *Boletim Agropecuário, Lavras*, v. 54, n. 1, p. 1-55.
- Rhodes, M. J. C. 1994. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant molecular biology*, v. 24, n. 1, p. 1-20,.
- Rice, E. L. 1984. Allelopathy. New York: *Academic Press*. 422 p.
- Rizvi, S. J. H.; Haque, H.; Singh, U. K.; Rizvi, V. 1992. A Discipline Called Allelopathy. In: Rizvi, S. J. H.; Rizvi, H. (Ed.). *Allelopathy – Basic and applied aspects*. 1 ed. London: Chapman & Hall, p. 1-10.
- Salvador, J. A., Moreira, V. M., Gonçalves, B. M., Leal, A. S., Jing, Y. 2012. Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs, *Natural Product Reports*. 291463- 1479

- Santos-Sánchez, Norma francenia et al. 2019. Via do ácido chiquímico na biossíntese de compostos fenólicos. In: Aspectos Fisiológicos das Plantas dos Compostos Fenólicos. *IntechOpen*.
- Saiman, M. Z., Mustafa, N. R., Pomahočová, B., Verberne, M., Verpoorte, R., Choi, Y. H., & Schulte, A. E. 2014. Analysis of metabolites in the terpenoid pathway of *Catharanthus roseus* cell suspensions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 117(2), 225-239.
- Siddique, H. R.; Saleem, M. 2011. Beneficial Health Effects of Lupeol Triterpene: A Review of Preclinical Studies. *Life Sci* 88, no. 7-8: 285-93.
- Silva, M. F.; Lisbôa, P. L. B.; Lisbôa, R. C. L. 1977. Nomes vulgares de Plantas Amazônicas. *INPA*, Manaus. 222 p.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. 2017 *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre/RS: Editora Artmed. 502pp
- Souza Neta, L. C. 2003. Estudo fitoquímico de *Deguelia longeracemosa* (Benth.) A. M. G. Azevedo, Isolamento, Determinação estrutural, Reações de Transformação da Escandenina e Testes Biológicos (Leguminosae). Tese de doutorado. UNICAMP-SP.
- Souza, V. C.; Lorenzi, H. 2005. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. *Nova Odessa: Instituto Plantarum*, 640p.
- Souza, L. S.; Velini, E. D.; Martins, D.; Rosolem, C. A. 2006. Efeito alelopático de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) sobre o crescimento inicial de sete espécies de plantas cultivadas. *Planta Daninha, Viçosa*, v. 24, n. 4, p. 657-668.
- Sousa, C. M. D. M., Silva, H. R., Ayres, M. C. C., Costa, C. L. S. D., Araújo, D. S., Cavalcante, L. C. D.; Chaves, M. H. 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química nova*, 30(2), 351-355.
- Souza, A. R. C.; Souza, P. S. C.; Espinoza-Quñones, F. R.; Módenes, A. N. 2015. Uso da *Artemia salina* como bioindicador na avaliação ecotoxicológica do fármaco cloridrato de ciprofloxacina em solução sintética tratada por processo de eletrocoagulação. VI Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, Porto Alegre-RS.
- Souza, J. C.; Rescarolli, C. L. S.; Nunez, C. V. 2018. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. *Revista Fitos*, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 269-280, out. ISSN 2446-4775. Disponível em:

- <<http://www.revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/550>>.
- Acesso em: 14 de mar. 2018. doi:<http://dx.doi.org/10.17648/2446-4775.2018.550>.
- Sharma, P.; Patil, D.; Patil, A. 2013. *Crataeva tapia* linn. - an important medicinal plant: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. v. 4, p. 582 -589, 15.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2010. Secondary metabolites and Plant defense. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Phisiology*. 5. ed. [S.l.]: Sinauer Associates, Inc. p. 782.
- The Plant List .2013. Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).
- Tozzi, A. M. G. A. Estudos taxonômicos dos gêneros *Lonchocarpus* Kunth e *Deguelia Aubl* no Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 341 p. 1989.
- Tozzi, A. M. G. A. A identidade do Timbó-verdadeiro: *Deguelia utilis* (A.C.Sm.) A.M.G.Azevedo (Leguminosae - Papilionoideae). 1998. *Revista Brasileira de Biologia*, São Carlos, v. 58, n. 3, p. 511-516, Aug.
- Turolla, M. S. R.; Nascimento, E. S. 2006. Toxicological information of some herbal medicines used in Brazil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, p. 289-306,
- Viana, A.M.; Mazza, C.; Mantell, S.H. 1999. Biotechnology: Potential Applications for the Conservation and Sustainable Exploitation of Plants from Brazilian Rain Forests. In: BENSON, E.E. *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor and Francis Ltda., London. 309 p.
- Who, 2018. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistantbacteria/en/> Acesso em: 16/01/2020

**Extração de folhas e raízes de *Deguelia duckeana*
e avaliação de atividades biológicas.**

1.2 METODOLOGIA

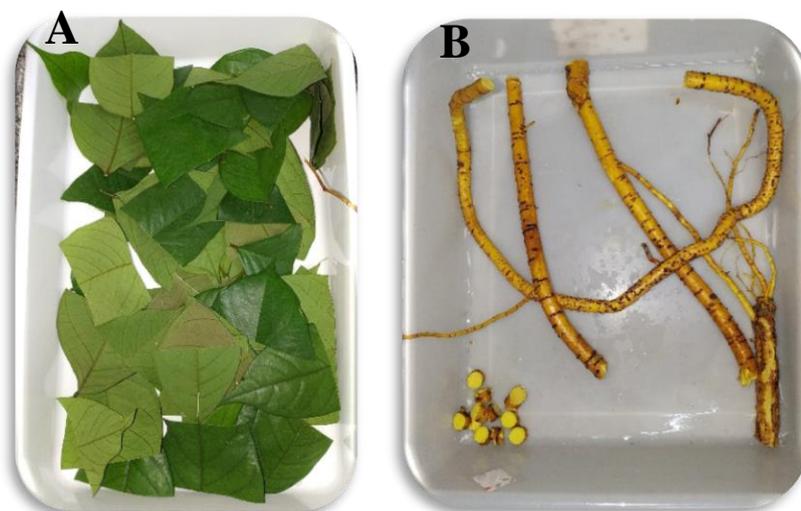
1.2.1 Coleta

As folhas foram coletadas em julho de 2019 de um espécime que se encontra em casa de vegetação no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABB) sob o número de registro de exsicata 278426, o qual se encontra depositado no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

1.2.2 Preparo do Extrato

As folhas e raízes coletadas (Figura 8) foram secas em temperatura ambiente (20 ± 2 °C) e posteriormente moídas e pulverizadas em moinho de facas.

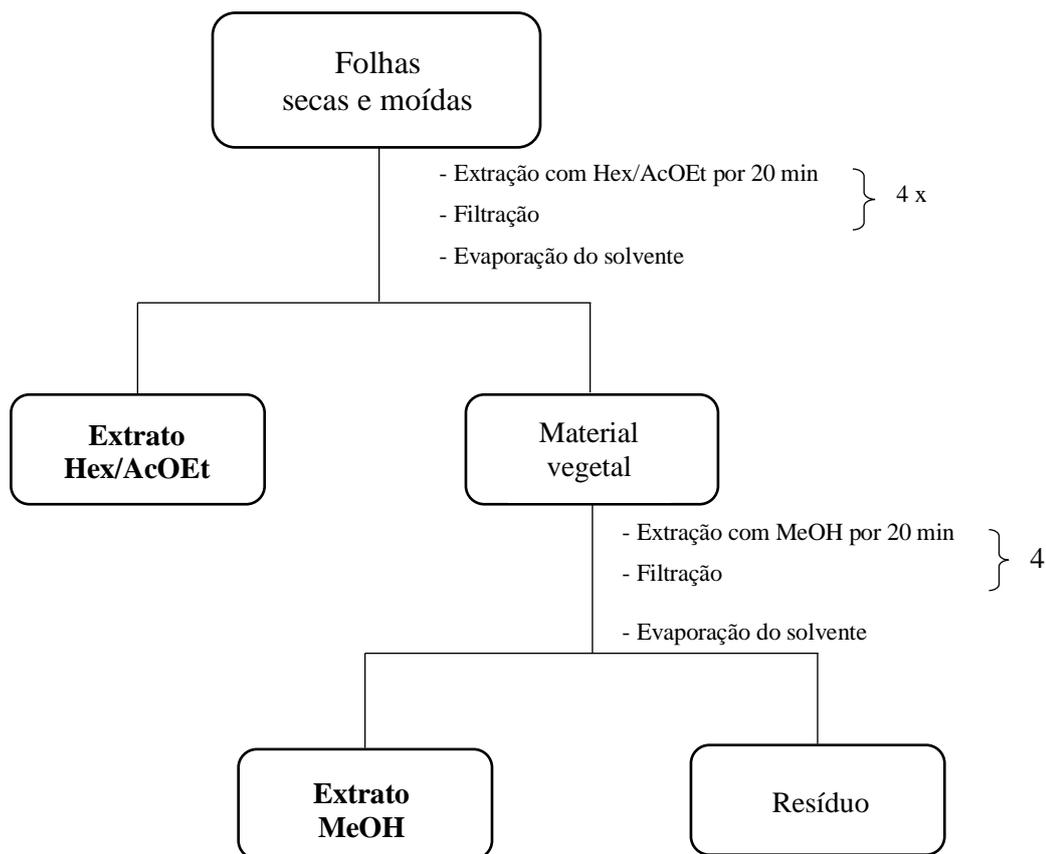
Figura 8: Imagens da espécie *D. duckeana*. (A) Folhas coletadas; (B) Raízes coletadas



Fonte: Acervo Pessoal

Em seguida o material vegetal (folhas), foi extraído com hexano/AcOEt na proporção 1:1 e MeOH 100% (Figura 9), onde, para cada 1 g de massa seca foi utilizado 10 mL do solvente. Foram realizadas quatro extrações para o sistema hexano/AcOEt (1:1) utilizando ultrassom durante 20 minutos para cada extração, posteriormente o material foi filtrado e seco em ambiente controlado de laboratório ± 24 °C, para obtenção do extrato MeOH foi realizado o mesmo procedimento.

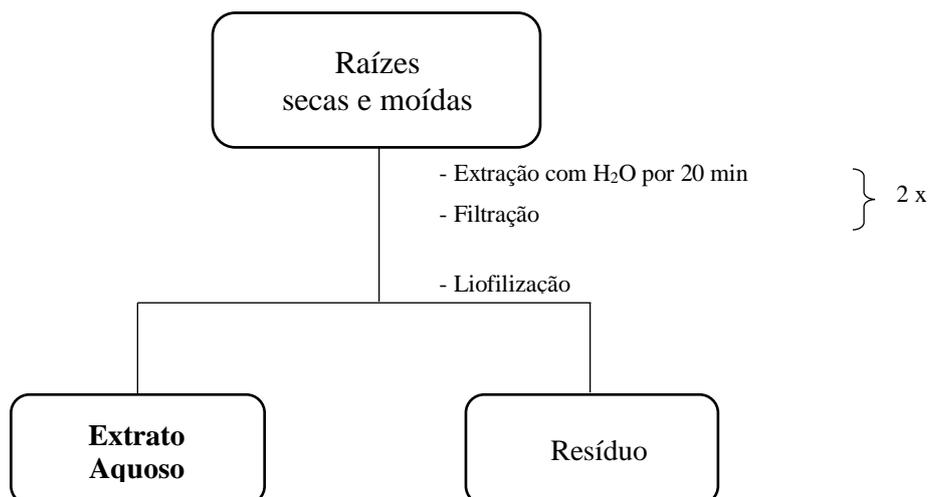
Figura 9: Fluxograma do preparo dos extratos das folhas



Posteriormente, os extratos hexano/AcOEt (1:1) e metanólico foram concentrados em rotaevaporador até a remoção completa do solvente. Os solventes utilizados para as extrações, cromatografias em camada delgada comparativa (CCDC) e cromatografias em coluna aberta (CCA) possuíam grau comercial de pureza, sendo previamente destilados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABB/INPA).

Para a obtenção do extrato aquoso das raízes, o material foi extraído com água destilada duas vezes e concentrados em liofilizador (Figura 10).

Figura 10: Fluxograma do preparo do extrato aquoso das raízes



1.2.3 Análise cromatográfica dos extratos

Os extratos da planta de *D. duckeana* foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC - WhatmanTM), empregando cromatofolhas de alumínio com sílica gel com indicador de fluorescência UV 254 nm. Para a eluição, foram realizadas combinações com vários solventes, em diferentes proporções. Na revelação das cromatofolhas empregou-se o revelador físico luz ultravioleta (comprimento de onda de 254 nm e 365 nm), e como reveladores químicos o cloreto férrico (FeCl₃), anisaldeído sulfúrico, sulfato cérico Ce(SO₄)₂, 2-aminoetil difenilborinato/polietilenoglicol (NP-PEG) e vapor de iodo.

1.2.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ¹H foram realizados no espectrômetro Bruker Fourier 300, operando em 300 MHz para o núcleo de ¹H e foram utilizados os solventes Clorofórmio, dimetilsulfóxido e água deuterados, para dissolver as amostras.

1.2.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

1.2.5.1 Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços e a determinação do crescimento microbiano foi determinado por leitura em espectrofotômetro, metodologia adaptada de CLSI, 2012. Os inóculos foram preparados com o auxílio de uma alça calibrada descartável, onde colônias bacterianas provenientes

de culturas puras de 24 horas foram inoculadas em caldo Müller Hinton e homogeneizadas.

A turvação do inóculo foi comparada e ajustada à turvação do tubo 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a uma suspensão contendo aproximadamente $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Em seguida, cada microrganismo-teste foi diluído na proporção de 1:20 e 10 μ L de cada foi inoculado nas placas. O extrato foi diluído na concentração de 1000 μ g/mL, e em seguida, 100 μ L da diluição foi adicionada em cada poço da placa.

As placas foram lidas em espectrofotômetro a 625 nm e incubadas a 37 °C por 24 horas e após esse período, lidas novamente sob as mesmas condições iniciais e os valores de crescimento das bactérias obtidos e analisados. A atividade inibitória foi obtida pelas diferenças das densidades ópticas entre as leituras realizadas antes e depois da incubação.

Os micro-organismos testados foram: *Aeromonas hydrophila* IOC/FDA 110-36, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Edwardsiella tarda* ATCC 15947, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 (NCTC 10038), *Salmonella enterica* ATCC 13076, *Serratia marcescens* ATCC 13880, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600. O controle positivo utilizado foi o antibiótico oxitetraciclina a 125 μ g/mL e como controle negativo, o próprio meio de cultura + DMSO a 5%. Os microrganismos utilizados foram doados pelo Laboratório de Micro-organismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz.

1.2.5.2 Teste de toxicidade frente a *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade foi realizado de acordo com Meyer e colaboradores (1982), com adaptações. Os extratos foram testados em triplicata, nas concentrações de 1000, 500, 250, 125, 60 e 30 μ g/mL. Foi preparada uma solução salina contendo 38 g de sal marinho diluída em 1 L de água destilada e foi adicionado 10 mg de cistos de *Artemia*, essa solução foi colocada em Becker sob luz artificial por 48 horas e a temperatura em torno de 27 a 30 °C.

Após o período de eclosão, as *Artemias* foram depositadas em uma placa de 24 poços juntamente com o extrato diluído em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) a 5%.

Foram colocados 10 indivíduos por poço e em triplicata por concentração e como controle negativo utilizou-se o DMSO e controle positivo dicromato de potássio (100 μ g/mL). As placas foram deixadas em temperatura ambiente de 27-30 °C sob luz artificial

durante 24 horas. Após 24 horas, realizou-se a contagem dos sobreviventes para cada poço e calculado o desvio padrão da quantidade de indivíduos mortos para determinar o grau de toxicidade do extrato.

A leitura dos resultados foi realizada a partir da observação das larvas, sendo consideradas mortas todas as que não apresentaram qualquer movimento ou debilidade na motilidade durante 10 minutos. A determinação da toxicidade foi realizada através do percentual (%) de mortalidade das larvas, onde é considerada alta toxicidade as amostras que apresentaram 60% de mortalidade

1.2.5.3 Avaliação do potencial Alelopático

Os extratos hexano/AcOEt e MeOH das folhas e aquoso das raízes de *D. duckeana* foram diluídos na concentração de 100% *m/v*. Como substrato utilizou-se discos duplos de papel filtro alocados em placas de Petri de 9 cm, a estes foram adicionados 2 mL de extrato, após evaporação do solvente, foi adicionado 2 mL de água destilada estéril para umidificar o substrato (SIMÕES, MADAIL e NOGUEIRA, 2013).

Cada disco de papel filtro recebeu 25 sementes (pré-esterilizadas, selecionadas por uniformidade de tamanho e distribuídas de maneira uniforme) da espécie alvo *Lactuca sativa* (alface) com percentual médio de germinação de 97%. Foram utilizadas 4 placas com 25 sementes cada, totalizando 100 sementes por concentração de cada extrato testado (BRASIL, 2009).

Nas placas controle, procedimento idêntico foi realizado, substituindo os 2 mL de extrato, por 2 mL do solvente extrator, sendo acrescentado após a evaporação do solvente, 2 mL de água destilada.

As placas foram acondicionadas em sala de germinação com fotoperíodo de 16:8 horas dia/noite sob temperatura de 26 ± 2 °C. A leitura para avaliação do percentual de germinação foi realizada diariamente e o critério utilizado foi a presença de protrusão radicular visível. Sendo o experimento concluído após três dias consecutivos sem ocorrer germinação.

Do total de sementes germinadas em cada placa petri, foram selecionados aleatoriamente 10 sementes. Três dias após a protusão radicular, foram efetuadas as medidas do tamanho radicular e da parte aérea de cada plântula.

Foi avaliado: PG - porcentagem de germinação (porcentagem de sementes germinadas em cada tratamento), IVG - índice de velocidade de germinação (número médio de sementes germinadas por dia em cada tratamento, expresso pela seguinte

formula: $IVG = (G1 / N1) + (G2 / N2) + \dots + (Gn / Nn)$, onde: G1 = número de sementes germinadas na primeira contagem, N1 = número de dias decorridos até a primeira contagem, G2 = número de sementes germinadas na segunda contagem, N2 = número de dias decorridos até a segunda contagem, n = última contagem) e crescimento de parte aérea (hipocótilo/coleótilo) e radícula (MAGUIRE, 1962).

Os resultados obtidos foram analisados através da análise de variância simples (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey de comparação de médias a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Todas as análises foram executadas pelo programa GraphPad Prism (PRISM, 1994).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Obtenção dos extratos

As massas obtidas das extrações podem ser visualizadas na Quadro 1, onde a maior massa de extrato obtido, foi oriunda da extração MeOH das folhas.

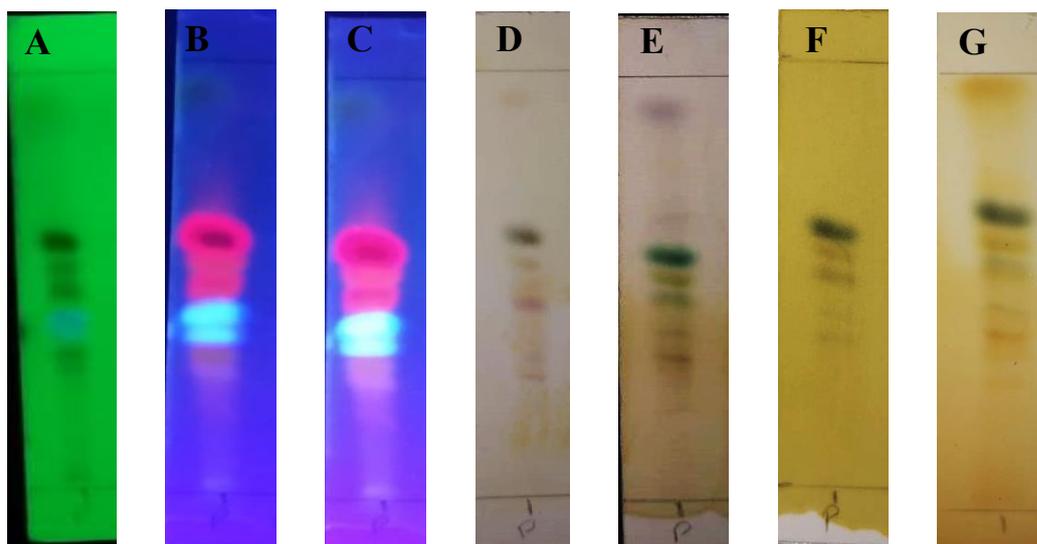
Quadro 1: Massa dos materiais vegetais e dos extratos obtidos de *D. duckeana*

Material vegetal	Massa inicial (g)	Material pulverizado (g)	Extrato Hex/AcOEt (g)	Extrato MeOH (g)	Extrato Aquoso (g)
Folhas	51,21	20,38	0,45	2,82	Não obtido
Raiz	305,00	93,00	Não obtido	Não obtido	0,4

1.3.2 Análise cromatográfica dos extratos

As placas cromatográficas dos extratos hexano/AcOEt (Figura 11) e MeOH (Figura 12) quando revelados por luz UV ($\lambda = 365$ nm) indicaram a presença de substâncias com ligações duplas conjugadas. Quando vaporizado por iodo foi possível observar manchas amarelas, sugerindo a presença de substâncias com ligação química insaturada (dupla ligação) em ambos os extratos. Os reveladores oxidantes $Ce(SO_4)_2$ e anisaldeído sulfúrico apresentaram indício de terpenos. Observaram-se indícios de substâncias fenólicas após serem reveladas com anisaldeído sulfúrico evidenciando manchas laranjas e com $FeCl_3$ manchas azul escuro. Esses resultados corroboram com o trabalho de Lima e colaboradores (2013) em que o extrato hexânico dos galhos e extrato diclorometano (DCM) de raízes também apresentaram indícios de chalconas.

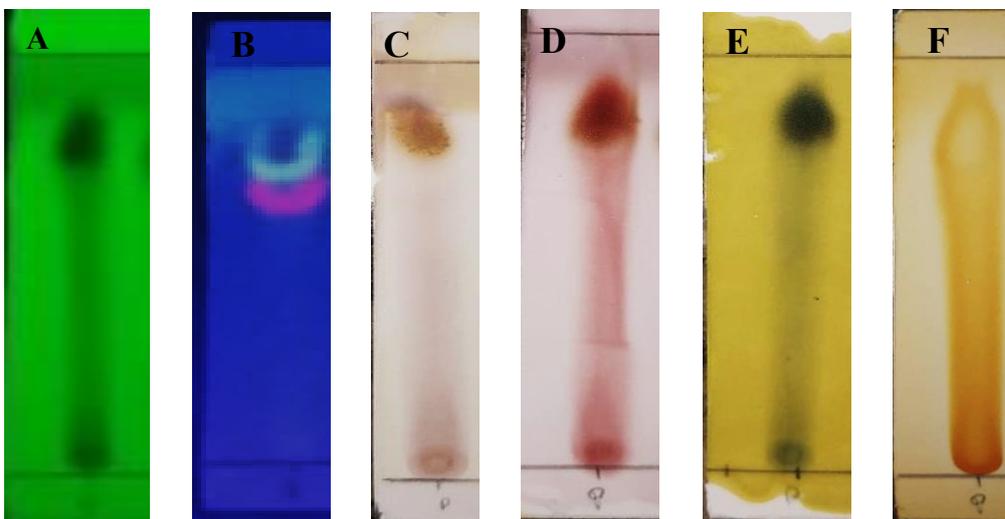
Figura 11: Análise em CCDC do extrato Hexano/AcOEt das folhas de *D. duckeana*



Hexano/DCM

Legenda: Reveladores (A): UV 254 nm; (B): UV 365 nm; (C): NP-PEG; (D): $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$; (E): Anisaldeído; (F): FeCl_3 ; (G): Iodo

Figura 12: Análise em CCDC do extrato MeOH das folhas de *D. duckeana*



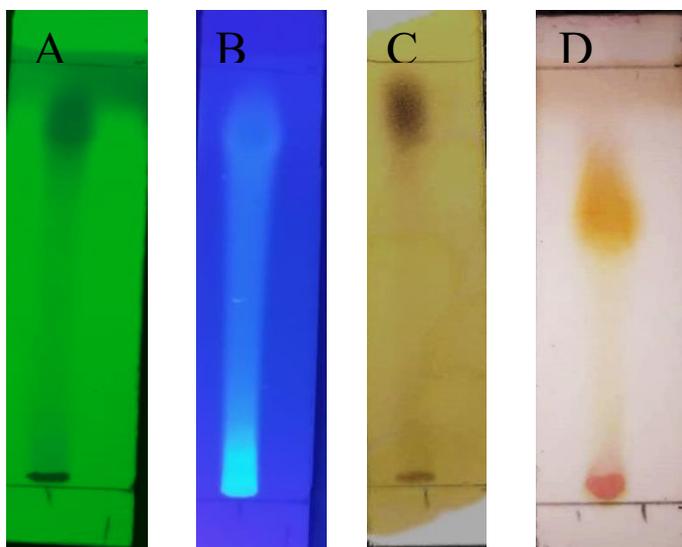
Metanol 100%

Legenda: Reveladores (A): UV-254 nm; (B): UV 365 nm; (C): $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$; (D): Anisaldeído; (E): FeCl_3 ; (F): Iodo

O extrato aquoso das raízes (Figura 13) quando revelado com UV ($\lambda = 254$ nm e 365 nm) foi possível verificar a presença de substâncias com ligações duplas conjugadas, com o revelador FeCl_3 mostrou características de substâncias polares e fenólicas. No

revelador anisaldeído o extrato apresentou coloração rosa indicativo de terpenos na origem e coloração amarela indicando presença de aromáticos.

Figura 13: Análise em CCDC do extrato aquoso das raízes de *D. duckeana*



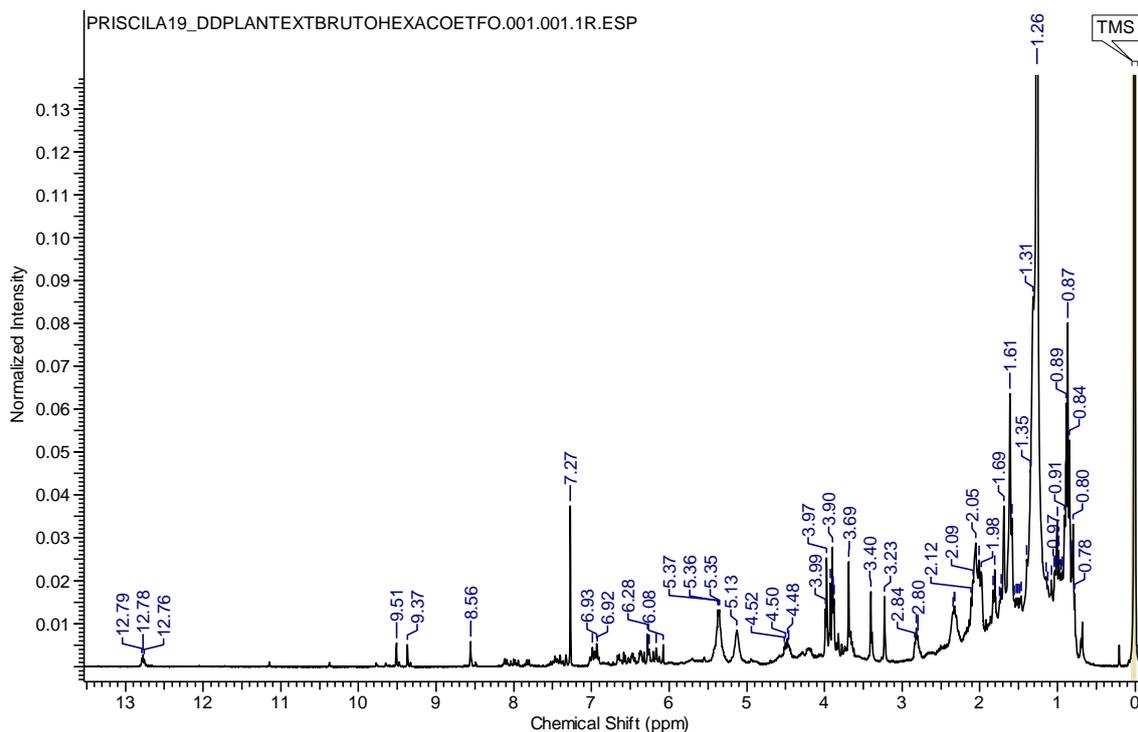
AcOEt/Acetona 2:8

Legenda: Reveladores (A): UV 254 nm; (B): UV 365 nm; (C): FeCl₃; (D): Anisaldeído

1.3.3 Análise de Ressonância Magnética Nuclear

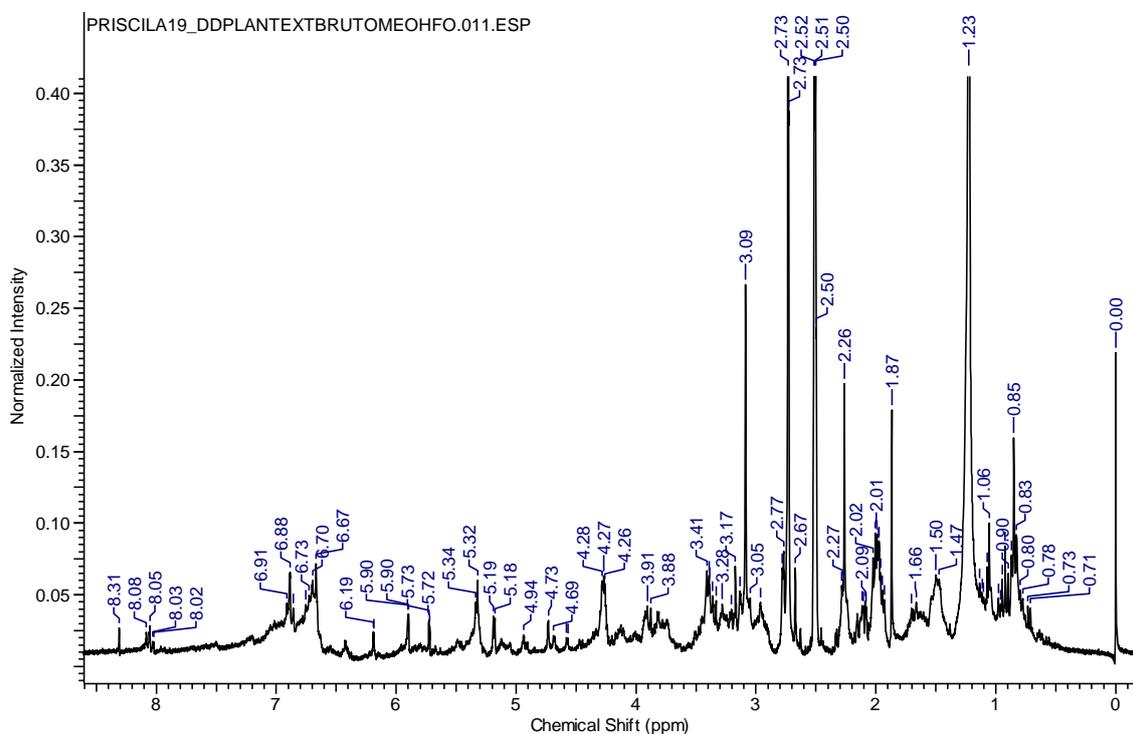
A análise do espectro de Ressonância Magnética Nuclear do extrato hexano/AcOEt das folhas mostra que está constituído principalmente de cadeias lineares de alcanos e alcenos (“graxas”), observados pelos sinais em δ_H em 1,26 e 0,87. Também observam-se sinais entre δ_H 6 e 8,2 indicativos de substâncias aromáticas. Sinais entre δ_H 9,3 e 10 de grupamentos aldeídicos e entre δ_H 12,5 e 13, sinais que podem ser de hidroxilas queladas de flavonoides, pois já foram isoladas substâncias flavonoídicas de *D. duckeana* (LIMA, *et al*, 2013, CURSINO, 2016).

Figura 14: Espectro de RMN de ^1H do extrato hexano/AcOEt das folhas de *D. duckeana* (300 MHz, CDCl_3).



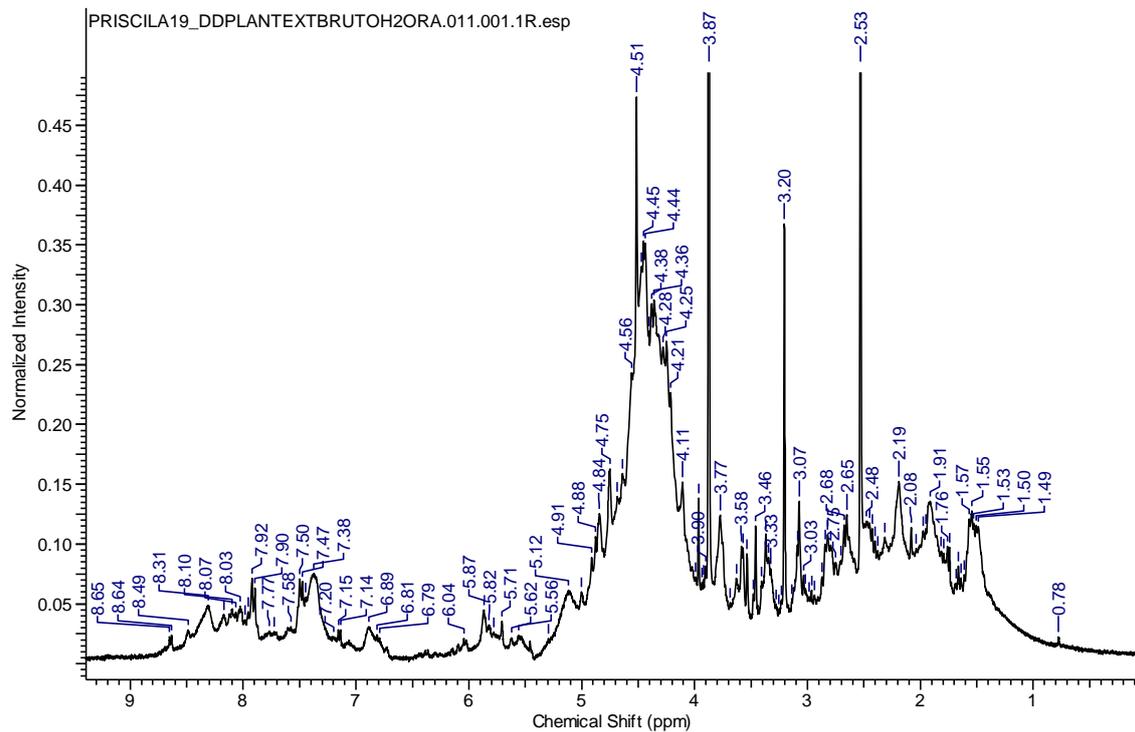
A análise do espectro de Ressonância Magnética Nuclear do extrato MeOH das folhas mostra que também está constituído por cadeias lineares de alcanos e alcenos (“graxas”), mas em menor concentração que no extrato mais apolar (hexano/AcOEt), como era de esperar, observados pelos sinais em δ_{H} em 1,23 e 0,85. Também observam-se sinais entre δ_{H} 6,0 e 8,4 indicativos de substâncias aromáticas. São observados menos sinais de metoxilas, um mais intenso em δ_{H} 3,09, entretanto observam-se vários sinais entre δ_{H} 3,0 e 4,0, referentes à açúcares, que podem estar ligados às substâncias aromáticas.

Figura 15: Espectro de RMN de ^1H do extrato MeOH das folhas de *D. duckeana* (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



A análise do espectro de Ressonância Magnética Nuclear do extrato aquoso das raízes mostra sinais entre δ_{H} 6,5 e 8,7 indicativos de substâncias aromáticas. Há uma grande concentração de sinais entre δ_{H} 3,0 e 5,0, referentes à açúcares, que podem estar ligados às substâncias aromáticas ou livres, uma vez que é extrato aquoso.

Figura 16: Espectro de RMN de ^1H do extrato aquoso das raízes de *D. duckeana* (300 MHz, D_2O).



1.3.4 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

1.3.4.1 Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo

Na concentração testada de 1000 µg/mL, verificou-se que para o extrato hexano/AcOEt das folhas, inibiu o crescimento de 9 bactérias quando comparado ao controle negativo. O extrato MeOH das folhas inibiu o crescimento de 4. O extrato aquoso das raízes apresentou atividade antibacteriana apenas para 1 bactéria. Os extratos MeOH, Hexano/AcOEt e aquoso inibiram o crescimento da bactéria gram-negativa *Pseudomonas fluorescens*, em 82,98%, 45,22% e 22,65% respectivamente. Outras porcentagens de inibição do crescimento das bactérias estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Porcentagem de inibição dos extratos de *Deguelia duckeana* ± desvio padrão frente às bactérias testadas

BACTÉRIAS	FOLHAS		RAÍZ
	Hexano/AcOEt	MeOH	H ₂ O
	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO		
<i>Staphylococcus aureus</i>	50,88 ± 0,08	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	23,14 ± 0,06	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28,93 ± 0,01	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	11,75 ± 0,1	8,23 ± 0,01	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16,19 ± 0,01	15,4 ± 0,03	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	25,55 ± 0,04	9,3 ± 0,02	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	82,98 ± 0,01	45,22 ± 0,03	22,65
<i>Escherichia coli</i>	33,95 ± 0,08	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	4,7 ± 0,02	-	-

Lima e colaboradores (2013) realizaram o teste antibacteriano de *D. duckeana* por meio da técnica difusão por cavidade-placa, com os extratos hexano, MeOH e aquosos de caules, folhas e raízes frente à diferentes cepas bacterianas, ressaltando a atividade frente a *S. aureus* onde apresentou um halo de inibição de 7 mm. Esses resultados são condizentes com o encontrado neste estudo, onde o extrato hexano/AcOEt também apresentou atividade frente a *S. aureus* pela metodologia de microdiluição em caldo.

Resultados promissores foram encontrados nos extratos hexano/AcOEt e MeOH das folhas, onde os valores foram 82,98% e 45,22% de inibição respectivamente para cepa *P. fluorescens*, essa bactéria pode causar doenças graves como septicemia, choque séptico e coagulação intravascular (SHU et al., 2019).

1.3.4.2 Teste de toxicidade frente *Artemia salina*

Os resultados do teste de toxicidade frente de *A. salina* podem ser observados na Tabela 2. O extrato hexano/AcOEt da planta foi tóxico até na menor concentração testada (30 µg/mL), causando mortalidade de 100% das larvas, o extrato metanólico da planta não apresentou toxicidade. O extrato aquoso das raízes, por sua vez apresentou toxicidade nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL. Para a avaliação de mortalidade foram considerados mortos todos os que não apresentavam nenhum movimento por alguns segundos de observação (BUENO e PIOVEZAN 2015; MEYER et al., 1982).

Tabela 2 – Resultados da avaliação de toxicidade dos extratos de *Deguelia duckeana* frente a *Artemia salina*

		Concentração dos extratos					
		1000	500	250	125	60	30
		Mortalidade (%)					
Folhas	MeOH	0	0	0	0	0	0
	Hexano/AcOEt	100	100	100	100	100	100
Raiz	Aquoso	100	100	100	100	37	7

Resultados similares quanto à toxicidade foram encontrados em estudos de Lima e colaboradores (2013) com os extratos hexânico e metanólico das folhas e aquoso de raízes de *D. duckeana*, corroborando com os resultados desta pesquisa. Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *A. salina* com atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana (MACBAE et al., 1988), sendo evidenciado tal relação nos extratos hexano/AcOEt das folhas e o extrato aquoso das raízes de *D. duckeana*, que apresentaram efeito tóxico tanto para o microcrustáceo quanto antibacteriano, possivelmente em resposta a presença de substâncias fenólicas.

1.3.4.3 Avaliação do potencial Alelopático

Na avaliação do efeito alelopático, a porcentagem de germinação de *L. sativa* não sofreu interferência de nenhum dos extratos testados. O índice de velocidade de germinação foi retardado pelo extrato metanólico da planta (Tabela 3).

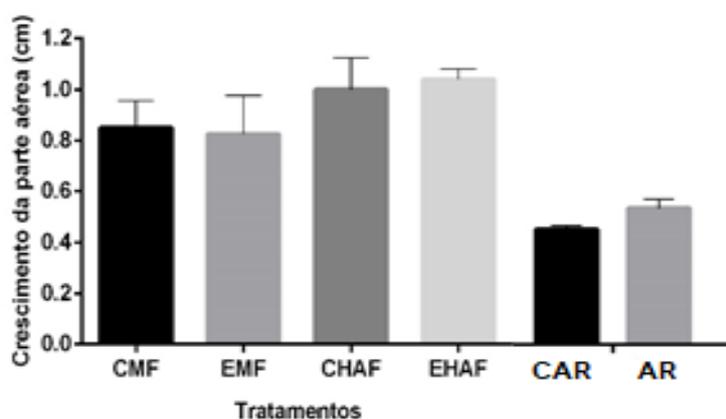
Tabela 3 - Porcentagem de germinação e índice de velocidade da germinação (IVG) de *Lactuca sativa* dos extratos hexano/AcOEt, metanólico de folhas e aquoso de raízes de *D. duckeana*.

Tratamento	Concentração	Germinação	IVG
	mg/mL	(%)	
FOLHAS			
Extrato hexânico/AcOEt	0 mg/mL	97,00	11,58
	1 mg/mL	94,00	12,33
Extratos metanólico	0 mg/mL	93,00	22,50
	1 mg/mL	88,00	16,00***
RAIZ			
Extrato aquoso	0 mg/mL	96,00	23,65
	1 mg/mL	94,00	22,94

Resultados significativos são seguidos por: *** $p < 0,001$

Por outro lado, o crescimento da parte aérea (Figura 14) não sofreu interferência em nenhum dos extratos avaliados.

Figura 17: Efeito dos extratos MeOH, Hexano/AcOEt de folhas e aquoso das raízes de *Deguelia duckeana* no crescimento da parte aérea de *Lactuca sativa*.



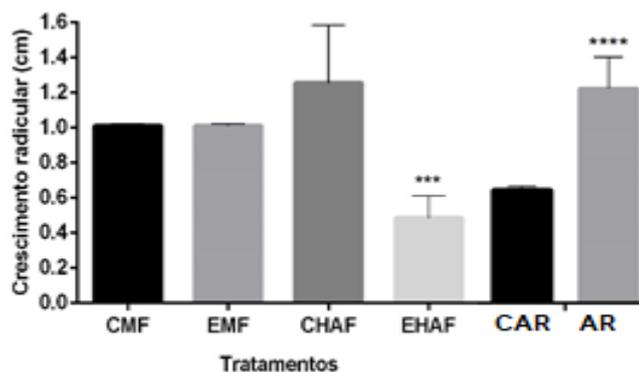
Resultados significativos são seguidos por: *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

CMF - Controle do extrato MeOH das folhas; EMF- Extrato MeOH das folhas; CHAF- Controle do extrato Hexano/AcOEt das folhas, EHAF- Extrato Hexano/AcOEt das folhas; CAR – Controle aquoso raiz; AR – Extrato aquoso raiz.

Quanto ao crescimento radicular, este sofreu um decréscimo quando submetido ao extrato hexano/AcOEt das folhas (Figura 15) possivelmente devido à possível presença de substâncias fenólicas como evidenciado nas placas cromatográficas e nos

espectros de RMN. Porém, o extrato aquoso interferiu no aumento da radícula de *L. sativa* (Figura 15).

Figura 18: Efeito dos extratos MeOH, Hexano/AcOEt de folhas e aquoso das raízes de *Deguelia duckeana* no crescimento radicular de *Lactuca sativa*.

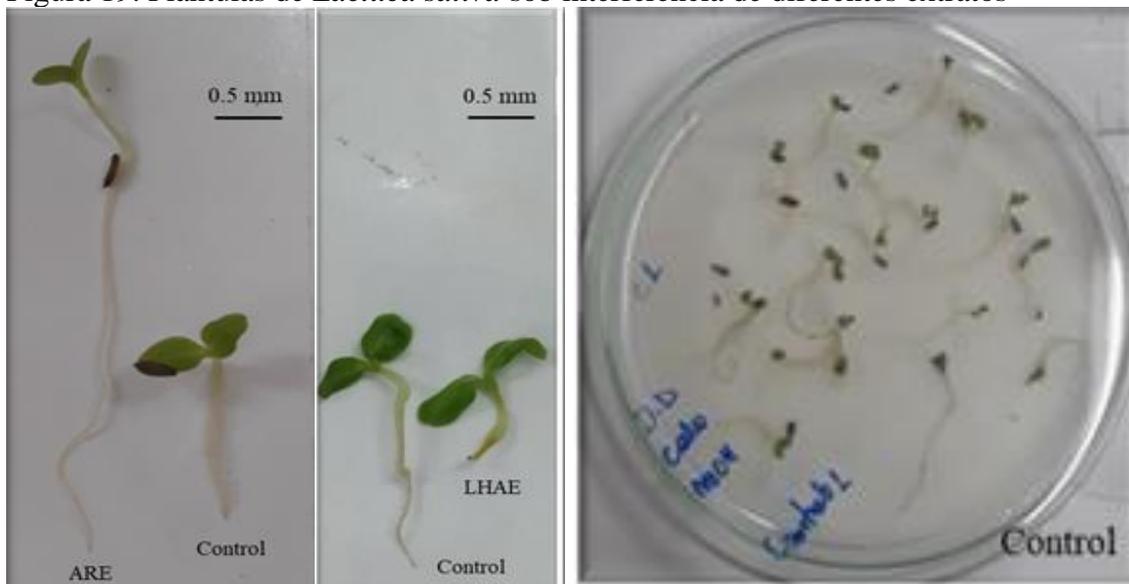


Resultados significativos são seguidos por: *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

CMF - Controle do extrato MeOH das folhas; EMF- Extrato MeOH das folhas; CHAF- Controle do extrato hexano/AcOEt das folhas, EHAF- Extrato hexano/AcOEt das folhas; CAR – Controle aquoso raiz; AR – Extrato aquoso raiz.

A figura 16 demonstra qualitativamente a redução do crescimento radicular.

Figura 19: Plântulas de *Lactuca sativa* sob interferência de diferentes extratos



As substâncias 3,5,4'-trimetoxi-4-prenilestilbeno; 4-metoxilonchocarpina e 4-metoxiderricidina do extrato diclorometano (DCM) das raízes de *D. duckeana* isoladas por Cursino (2016) confirmam os resultados obtidos por Lobo (2010) onde as substâncias fenólicas estibenos e chalconas 4-metoxilonchocarpeno; 3,5-dimetoxi-4'-hidroxi-3'-

prenil-trans-estilbeno;3,5-dimetoxi-4'-O-prenil-trans-estilbeno isolados do extrato etanólico das folhas de *Deguelia rufescens var. urucu* apresentaram atividade alelopática frente ao crescimento de *Mimosa pudica*.

Dentre os parâmetros avaliados na atividade alelopática, a inibição da germinação tem sido frequentemente utilizada para mensurar a potencialidade fitotóxica (FRANCO *et al.* 2014).

Maiores efeitos têm sido evidenciados sobre o crescimento de plantas teste, *Lactuca sativa* por exemplo se destaca em experimentos com aleloquímicos por possuir a alta sensibilidade a esses compostos, em especial, durante a fase de germinação e crescimento das plântulas (MATIAS *et al.* 2018).

Dentre as classes químicas relacionados a atividade alelopática, os compostos fenólicos e os terpenos (presente em extratos mais apolares) são comumente os mais destacados, devido causarem problemas na permeabilidade da semente, consequentemente inibindo a germinação e crescimento de plantas alvo (CARMO *et al.* 2007).

Grande parte dos trabalhos realizados em alelopatia tem tido maior enfoque em extratos aquosos, como *Mimosa bimucromata*, *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub (JACOBI e FERREIRA, 1991; CÂNDIDO 2010). Porém resultados como os deste trabalho demonstram a importância de estudos com solventes mais apolares, uma vez que como apresentado por Silva e colaboradores (2015) estes interferem no crescimento radicular e da parte aérea, sendo possível sua exploração, pela indústria biotecnológica.

1.4 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto os resultados obtidos no presente estudo permitiram obter as seguintes conclusões.

- Todos os extratos apresentaram atividade antibacteriana.
- Com relação aos resultados do teste de toxicidade frente de *A. salina* o extrato hexano/AcOEt da planta foi tóxico até na menor concentração testada (30 µg/mL). O extrato MeOH não apresentou toxicidade. O extrato aquoso das raízes, por sua vez apresentou toxicidade nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL.
- Na avaliação do efeito alelopático, a porcentagem de germinação de *L sativa* não sofreu interferência de nenhum dos extratos testados. O índice de velocidade de germinação foi retardado pelo extrato MeOH. O crescimento da parte aérea não sofreu interferência em nenhum dos extratos avaliados. Quanto ao crescimento

radicular, este sofreu um decréscimo quando submetido ao extrato hexano/AcOEt das folhas.

1.5 REFERÊNCIAS

- Bueno AC, Piovezan M. 2015. Bioensaio toxicológico utilizando *Artemia salina*: fatores envolvidos em sua eficácia. Instituto Federal de Santa Catarina.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. *Regras para análise de sementes*. p. 365. Brasília.
- Cândido A. C. D. S, Schmidt V., Laura V. A, Faccenda O., Hess S. C, Simionatto E., Peres M. T. L. P. 2010. Potencial alelopático da parte aérea de *Senna occidentalis* (L.) Link (Fabaceae, Caesalpinioideae): bioensaios em laboratório. *Acta botânica brasílica*. 24: 235-242. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062010000100025>.
- Carmo FMS, Borges EEL, Takaki M. 2007. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). *Acta botânica brasílica*. 21: 697-705. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062007000300016>.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2015. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard*. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, USA. 92pp.
- Franco D. M, Almeida L. F, Poletto R. 2014. Allelopathic potential of *Equisetum giganteum* L. and *Nephrolepis exaltata* L. on germination and growth of cucumber and lettuce. *Journal of Plant Sciences*. 2: 237–241. Doi: <http://dx.doi.org/10.11648/j.jps.20140205.24>.
- Jacobi US, Ferreira AG. 1991. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC) OK. sobre espécies cultivadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 26: 935-943
- Lima, N.M.; Andrade J. I.; Lima K. C.; Dos Santos F. N.; Barison A.; Salomé K. S.; Matsuura T.; Nunez C. V. 2013. Chemical profile and biological activities of *Deguelia duckeana* A.M.G. Azevedo (Fabaceae). *Natural Product Research*, 27 (4–5): 425–432. Doi: 10.1080/14786419.2012.733387.
- Lobo L. T, Silva G. A. D, de Freitas M. C, Souza Filho A. P. S, Silva M. N. D, Arruda A. C, Arruda M. S. 2010. Stilbenes from *Deguelia rufescens* var. *urucu* (Ducke) AMG Azevedo leaves: effects on seed germination and plant growth. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21: 1838-1844. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010001000007>
- MacBae W. D, Hudson J. B, Towers G. H. N. 1988. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 22: 143-172. Doi: [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(88\)90124-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(88)90124-9)

- Maguire, J. D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177.
- Matias R, Oliveira A. K. M, Pereira K. C. L, Rizzi E. S, Rosa A. C. 2018. Potencial alelopático do extrato etanólico de *Anacardium humile* (cajuzinho-do-cerrado) na germinação e formação de plântulas de alface, tomate e fedegoso. *Gaia Scientia*. 12 (2):144-160. Doi: <https://doi.org/10.22478/ufpb.1981-1268.2018v12n2>.
- Meyer, B. N.; Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols D. E.; McLaughlin, J. L.; Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.
- Prism, GraphPad. 1994. Graphpad software. San Diego, CA, USA.
- Silva C. I, Silva V.M, Silva OBJ, Ferreira VM. 2015. Germinação de sementes de Corda de viola (*Ipomoea purpurea* L.) submetidas ao extrato aquoso de sementes de mamão (*Carica papaya* L.). *Cadernos de Agroecologia* 10: 1-5.
- Simões, M. S.; Madail, R. H.; Nogueira, M. L. 2013. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. *Biotemas*, v. 26, n. 3, p. 29-36.
- Shu, H., Chen, H., Wang, X., Hu, Y., Yun, Y., Zhong, Q. & Chen, W. 2019. Antimicrobial Activity and Proposed Action Mechanism of 3-Carene against *Brochothrix thermosphacta* and *Pseudomonas fluorescens*. *Molecules*, 24(18), 3246.

Fracionamento do extrato MeOH dos calos de *Deguelia duckeana* e avaliação de atividades biológicas.

2.1 INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos pode ser aplicada em várias áreas, como por exemplo, na bioquímica, morfologia, fisiologia, biologia molecular e genética celular, assim como propagando plantas e melhorando o aspecto de espécies economicamente importantes (GUO et al. 2004).

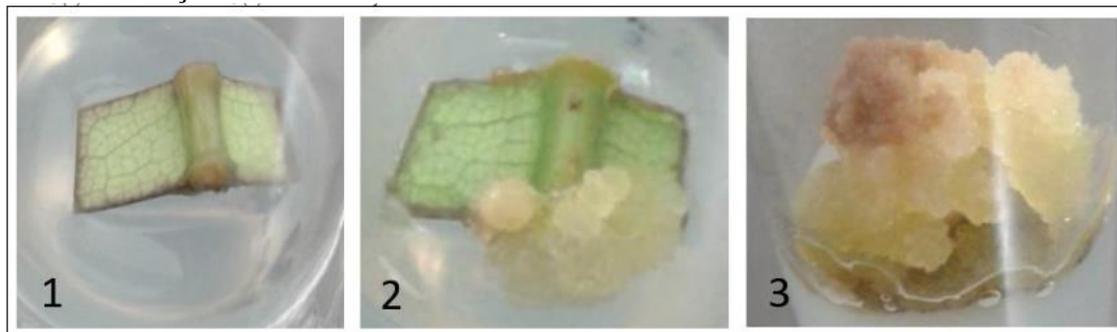
Cultura de tecidos vegetais *in vitro* compreende-se por um conjunto de técnicas de cultivo de células (inóculo) e tecidos vegetais (explantes) em meio nutritivo, sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luminosidade, temperatura e trocas gasosas, para gerar uma planta (QUISEN e ANGELO, 2008). A cultura *in vitro* apresenta diversas aplicações práticas como multiplicação de plantas em larga escala, melhoramento genético, conservação de germoplasma e produção de metabólitos secundários (SATHYANARAYANA; VARGHESE, 2007; THORPE, 2012). Essa técnica é empregada principalmente para aquelas espécies que possuem difícil propagação (ALVES et al., 2008), e tem como vantagem o fato de se obter mudas livres de fitopatógenos e doenças, tornando-se um método mais eficaz em relação ao método convencional (REINHARDT e CUNHA, 1999).

Sem a totipotência nada disso seria possível, pois devido essa competência apresentada pelas células vegetais, de serem induzidas a voltar ao estado meristemático e redefinir seu padrão de diferenciação celular, viabiliza, desta forma, a formação de novos órgãos ou de uma planta completa (TERMIGNONI, 2005).

Na cultura de tecidos, a organogênese é uma via de regeneração que pode ser tanto direta (sem a formação de calo) quanto indireta (com a formação de calo). Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Quando um explante é cortado para se colocar na cultura *in vitro*, é produzida uma injúria. Isto desenvolverá uma resposta na parte do tecido lesionado onde começa a formar um pequeno agrupamento de células recém divididas na superfície. Este pode continuar a se dividir, associado a uma aplicação diferencial de reguladores de crescimento e condições controladas no meio de cultura para produzir uma massa de células relativamente indiferenciadas que formam o calo (AHMAD et al., 2013; GROUT, 2017; SMITH, 2013), conforme a Figura 20, abaixo.

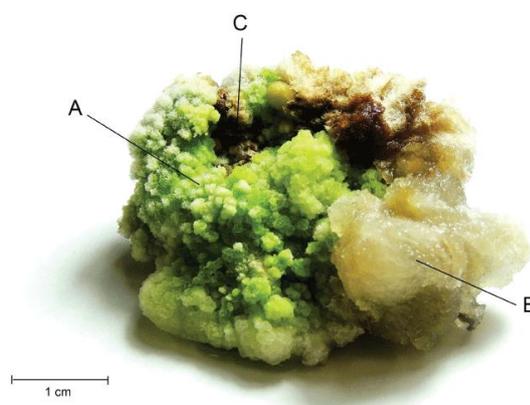
Figura 20: Sequência da formação de calo, da periferia para o centro, em explante foliar de andiroba (*Carapa guianensis*). (1) Preparação do tecido. (2) Divisão das Células. (3) Desdiferenciação celular.



Fonte: Souza et. al., 2018

O calo (Figura 21) é um conjunto de células que se multiplicam desordenadamente, formando um tecido mais ou menos organizado e podem se formar por meio de um pequeno pedaço de qualquer órgão de uma determinada planta e tendo a capacidade de regenerar plantas inteiras ou apenas tecidos, órgãos e embriões, ou ainda se manter em estado de calo por tempo indeterminado (PIERIK,1990; TORRES e CALDAS, 1998). O calo é geralmente composto de células friáveis, grandes, vacuoladas que são altamente desorganizadas. Também pode ser duro e compacto, podendo conter regiões de pequenos agregados de células meristemáticas (indiferenciadas) as quais possuem maior capacidade de regeneração (SMITH, 2013).

Figura 21: Calo da planta *D. macrophylla*. A) Calo com clorofila B) Calo friável C) Calo compacto



Fonte: ZANCA et al., 2016

A cultura de tecidos também tem sido apontada como valioso instrumento para o estudo dos metabólitos primários e secundários, constituindo um sistema apropriado para

a produção de substâncias farmacológicas importantes. Pesquisas têm demonstrado sucesso na produção de metabólitos secundários em diferentes órgãos e culturas não organizadas como calos e suspensões de células (SCHRIPEMA e VERPOORTE, 1994; KARAM et al., 2003; FURDEN et al., 2005; GYORGY et al., 2005).

Estudos atuais revelam que é possível a produção de calos *in vitro* de forma eficiente para a produção de substâncias de interesse (COSTA, et al., 2012; KOKOTKIEWICZ, et al., 2012). Existem substâncias bioativas que possuem um grande valor econômico e científico, porém, produzidas em pequenas quantidades na planta, como é o caso do taxol, que é utilizado para o tratamento de pessoas com câncer. Para obter essa substância em quantidade suficiente para a realização do tratamento contra o câncer de uma pessoa, são necessárias as cascas de três árvores de aproximadamente cem anos de idade (NOSOV, 2012). A vincristina e vimblastina são substâncias com comprovada ação antitumoral, porém as quantidades dessas substâncias na planta (*Catharanthus roseus*) também são muito pequenas (SAIMAN et al., 2014) e para o melhoramento da produção da quantidade dessas substâncias estão utilizando a produção de células em suspensão com uso de elicitores que consiste na geração de um estresse químico ou físico nas células para induzir a produção de metabólitos secundários que de outra forma não estariam sendo produzidos. (FUMAGALI et al. 2008; FUKUYAMA et al., 2015; FATIMA et al., 2015), quanto a indução *in vitro* através da genética (PRAKASH et al., 2015; MOERKERCKE et al., 2013).

Outra substância que está sendo estudada, é a artemisinina, importante antimalárico extraído de espécies do gênero *Artemisia*. Para conseguir o aumento da produção, estão sendo testados culturas em suspensão celular com a utilização de elicitores, assim como os utilizados em vincristina e vimblastina (ALI et al., 2014; TARIQ et al., 2014).

Assim, sabendo da importância dos metabólitos secundários nos vegetais e suas formas de atuação sobre sistemas biológicos, os benefícios da cultura de tecidos e além de já ter isolado triterpenos de extratos de calos de *D. duckeana in vitro*, estudos fitoquímicos e biológicos são necessários para identificar substâncias presentes na espécie.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Extrato metanólico dos calos de *D. duckeana*

Os calos foram obtidos a partir do trabalho de Rescarolli (2018) onde a biomassa vegetal usada foram explantes foliares (número de registro 50410), o meio usado para a multiplicação foi a combinação de duas citocininas e uma auxina (3 mg.L⁻¹ BAP + 2 mg.L⁻¹ ANA + 2 Kin). A manutenção dos repiques ocorreu a cada 30 dias. Após a extração desses calos geraram 2 extratos brutos: hexano/AcOEt 1:1 e MeOH. Sendo este último o que foi utilizado neste trabalho.

2.2.2 Análises cromatográficas

Para a análise cromatográfica dos extratos dos calos de *D. duckeana* empregou-se a mesma metodologia usada no Cap. 1 (tópico 1.2.3). Essa metodologia também foi utilizada para a determinação dos procedimentos para o fracionamento e para a análise das frações obtidas, indicando a similaridade entre as frações, o nível de pureza, e as possíveis classes de metabólitos presentes.

2.2.3 Ressonância Magnética Nuclear

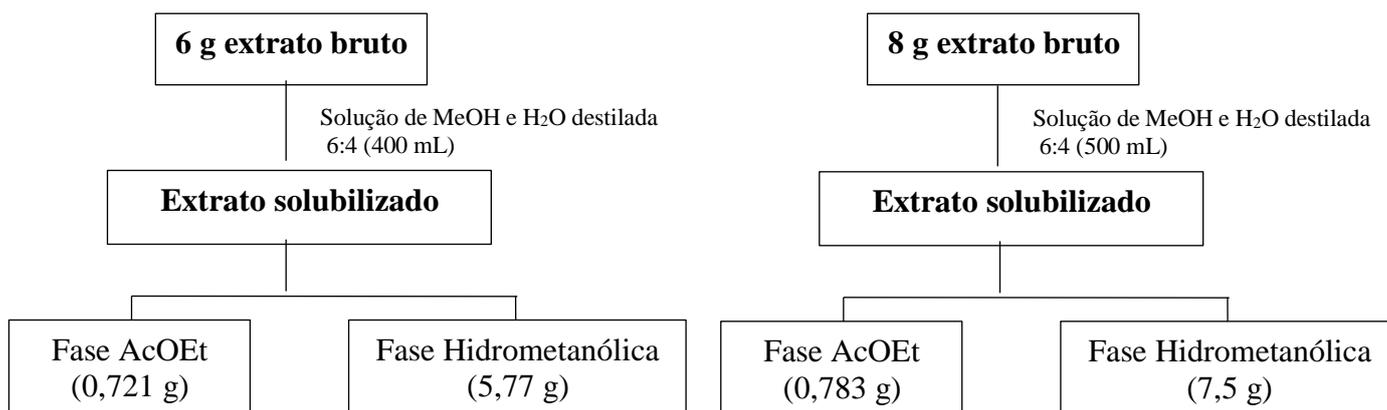
Para a análise de RMN do extrato MeOH dos calos de *D. duckeana* e substâncias isoladas, empregou-se a mesma metodologia usada no Cap. 1 (tópico 1.2.4). Foi utilizado o solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) para dissolver as amostras.

2.2.4 FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO

2.2.4.1 Fracionamento Líquido-Líquido

O extrato metanólico dos calos (14 g) foi fracionado por meio de partição líquido-líquido. Inicialmente, utilizou-se 6 g de extrato MeOH solubilizado em 400 mL de solução com MeOH/água destilada (6:4), e extraídos por quatro vezes com AcOEt na proporção de 1:1. Posteriormente, foram utilizados 8 g de extrato solubilizado em 500 mL de MeOH/água destilada (6:4) sendo extraído quatro vezes com AcOEt na proporção 1:1. Esse procedimento visa uma separação preliminar dos constituintes químicos para facilitar o seu posterior fracionamento cromatográfico (Figura 22).

Figura 22: Fluxograma das partições líquido-líquido



2.2.4.2 Fracionamento da fase AcOEt do Extrato metanólico dos Calos de *Deguelia duckeana*

Visando purificar as substâncias presentes no extrato, as fases AcOEt obtidas foram reunidas (1,3 g) e fracionada em coluna cromatográfica aberta de vidro com altura da fase estacionária x diâmetro interno de 50 cm x 3 cm, usando Sephadex LH-20 como fase estacionária e eluição em sistema isocrático em MeOH, gerando 49 frações. As frações obtidas foram analisadas por CCDC utilizando reveladores físicos luz UV 254 nm e 365 nm e químicos anisaldeído sulfúrico, NP-PEG, $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, FeCl_3 , vapor de iodo.

Após análise por CCDC as frações coletadas foram agrupadas e as frações 5-7 (161 mg) foram escolhidas para continuar o processo de purificação. Foi realizado em CCA com 40 cm de altura por 1 cm de diâmetro e 16 g de sílica gel 60 (200-400 Mesh), usando gradiente de DCM 100%, DCM em acetona, acetona 100% até MeOH 100%. Conforme o Quadro 2. O volume de cada eluição adicionada à coluna cromatográfica foi de 110 mL, rendendo 64 frações.

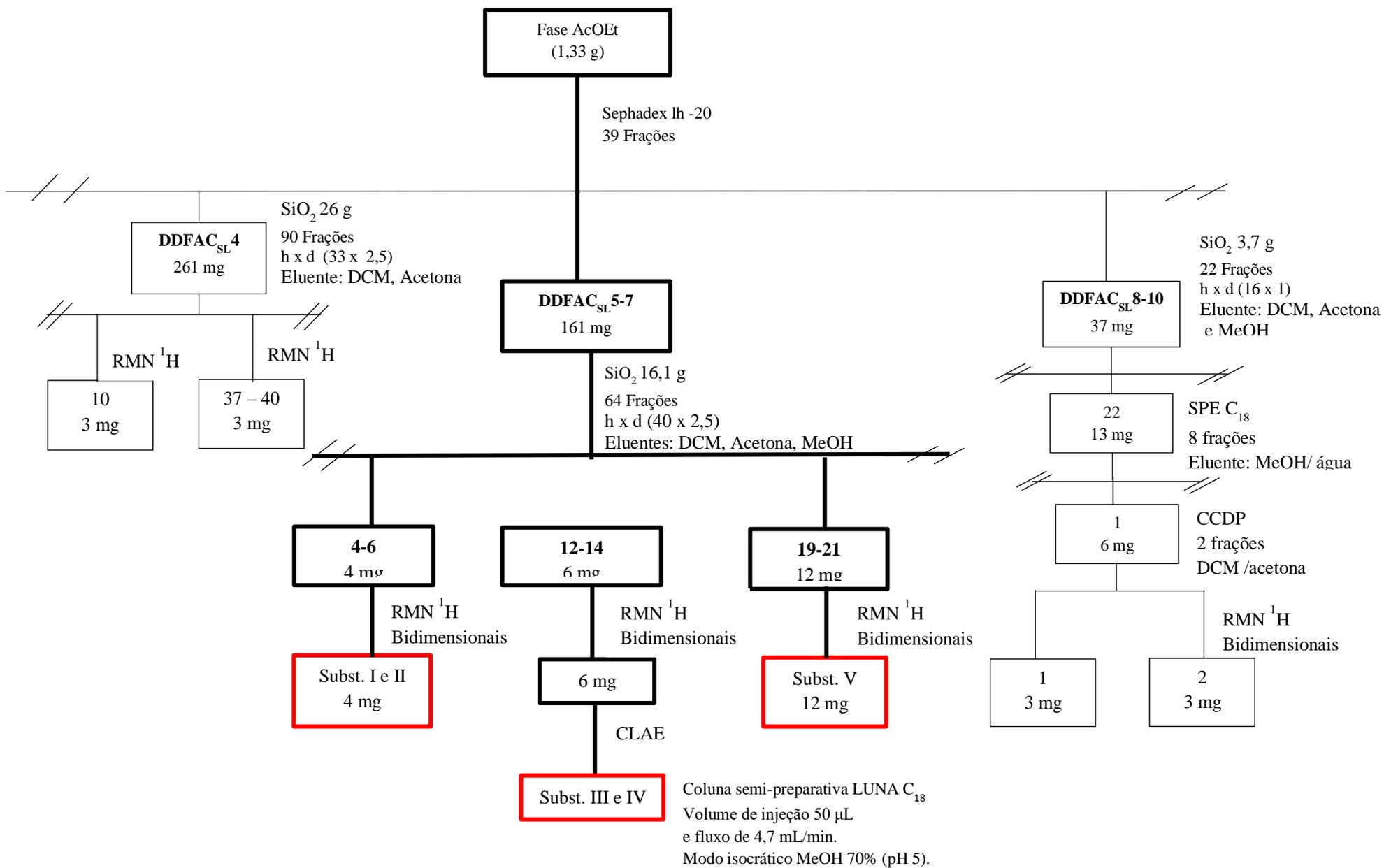
Quadro 2. Sistema de eluição do fracionamento da fração 5-7 obtida da fase AcOEt do extrato MeOH dos calos de *D. duckeana*.

FRAÇÕES COLETADAS	SISTEMA DE ELUIÇÃO
1 a 5	DCM 100%
6 a 13	DCM/Acetona 99:1
14 a 22	DCM/Acetona 98:2
23 a 29	DCM/Acetona 95:5

30 a 37	DCM/Acetona 9:1
38 a 43	DCM/Acetona 8:2
44 a 51	DCM/Acetona 6:4
52 a 57	DCM/Acetona 1:1
58 a 63	Acetona 100%
64	MeOH

Após as análises por CCDC das 64 frações obtidas da CCA as frações 4-6; 12-14; 19-21 foram submetidas a análise de RMN uni e bidimensionais. A fração 12-14 por apresentar perfil cromatográfico semelhante foram reunidas e refractionadas utilizando CLAE. A amostra foi solubilizada em MeOH, foi utilizada uma coluna semi-preparativa LUNA C₁₈(Phenomenex®; 250 x 10 mm 100A) com volume de injeção de 50 µL e fluxo de 4,7 mL/min. A purificação foi realizada no modo isocrático utilizando MeOH 70% (pH 5), sendo a água acidificada com ácido acético. Os picos obtidos foram submetidos a RMN de ¹H, e encontram-se em análise. A Figura 20 mostra o fluxograma geral do fracionamento realizado.

Figura 23: Fluxograma geral do fracionamento da fase AcOEt



2.2.4.3 Fracionamento da fase Hidrometanólica do Extrato Metanólico dos Calos de *Deguelia duckeana*

Da fase hidrometanólica obtida, 1 g de material foi fracionado em CCA de vidro com altura da fase estacionária x diâmetro interno de 50 cm x 3cm, usando Sephadex LH-20 como fase estacionária e eluição em sistema isocrático em MeOH, gerando 21 frações. As frações obtidas foram analisadas por CCDC utilizando reveladores físicos luz UV 254 nm e 365 nm e químicos anisaldeído sulfúrico, NP-PEG, Ce(SO₄)₂, FeCl₃ e vapor de iodo.

A partir do resultado das placas cromatográficas, a fração 18 (19 mg) foi enviada para a análise por RMN e para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As frações 10-14 foram reunidas (130 mg) e realizado o fracionamento em CCA com 23,5 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro e 13 mg de Florisil (Sigma Aldrich, 100-200 mesh), usando gradiente de DCM/MeOH até MeOH/H₂O. Conforme o Quadro 3. O volume de cada eluição adicionada à coluna cromatográfica foi de 60 mL, rendendo 17 frações.

Quadro 3. Sistema de eluição do fracionamento da fração 10-14 obtida da fase hidrometanólica do extrato MeOH dos calos de *D. duckeana*.

FRAÇÕES COLETADAS	SISTEMA DE ELUIÇÃO
0 a 2	DCM/MeOH 7:3
3 a 5	DCM/MeOH 6:4
6 e 7	DCM/MeOH 1:1
8 a 10	DCM/MeOH 4:6
11 a 13	DCM/MeOH 2:8
14 a 17	MeOH/H ₂ O 1:1

As frações 12, 13, 14, 15 e 16 foram submetidas a análise por CLAE.

A fração 15 (140 mg) da coluna Sephadex LH-20 foi fracionada em CCA com 23,5 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro e 14 mg de Alumina (Sigma, Grado: Super I, tipo: WN-6: Neutro) usando gradiente de DCM/MeOH até MeOH 100%. Conforme o Quadro 4. O volume de cada eluição adicionada à coluna cromatográfica foi de 50 mL, rendendo 33 frações.

Quadro 4. Sistema de eluição do fracionamento da fração 15 obtida da fase hidrometanólica do extrato MeOH dos calos de *D. duckeana*.

FRAÇÕES COLETADAS	SISTEMA DE ELUIÇÃO
0 a 4	DCM/MeOH 9:1
5 a 8	DCM/MeOH 8:2
9 a 13	DCM/MeOH 7:3
14 a 18	DCM/MeOH 6:4
19 a 24	DCM/MeOH 1:1
25 a 33	MeOH 100%

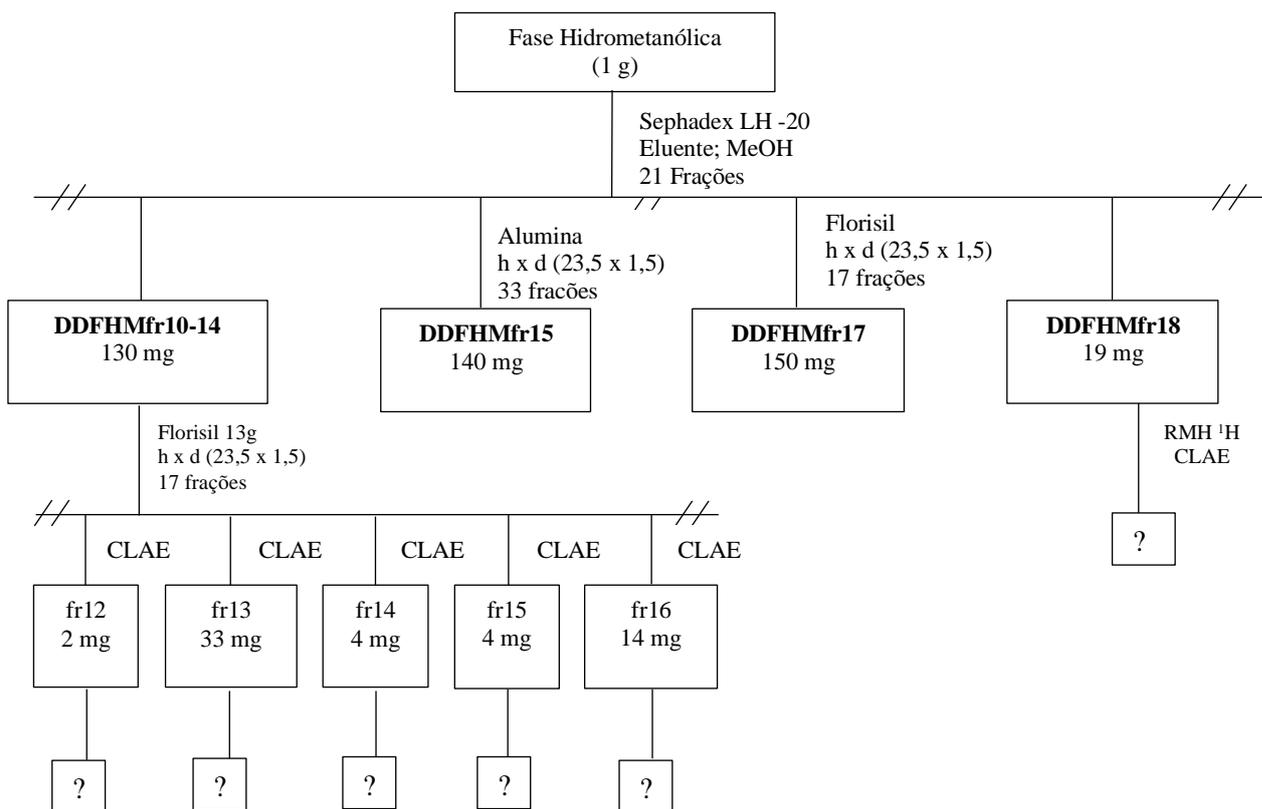
A fração 17 (150 mg) foi fracionada em CCA de 14 cm de altura por 3 cm de diâmetro, com 15 mg de Florisil (Sigma Aldrich, 100-200 mesh) usando gradiente de DCM/MeOH até MeOH 100%, conforme o Quadro 5. O volume de cada eluição adicionada à coluna cromatográfica foi de 40 mL, rendendo 23 frações.

Quadro 5. Sistema de eluição do fracionamento da fração 14 obtida da fase hidrometanólica do extrato MeOH dos calos de *D. duckeana*.

FRAÇÕES COLETADAS	SISTEMA DE ELUIÇÃO
0 a 4	DCM/MeOH 7:3
5 a 10	DCM/MeOH 6:4
11 a 14	DCM/MeOH 1:1
15 a 19	DCM/MeOH 4:6
20 a 22	MeOH 100%
23	MeOH/H ₂ O 1:1

A Figura 24 mostra o fluxograma geral do fracionamento da fase hidrometanólica.

Figura 24: Fluxograma geral do fracionamento da fase hidrometanólica



A fase hidrometanólica foi fracionada, porém não foi possível isolar substâncias em tempo viável.

2.2.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Todas as metodologias para avaliação das atividades biológicas (antibacteriana, tóxica frente *A. salina* e alelopática) dos extratos dos calos foram as mesmas realizadas para o extrato da planta (Cap. 1; tópico 1.2.5).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Identificação estrutural das substâncias isoladas

O extrato MeOH dos calos de *D. duckeana* quando analisado por CCDC e revelados com luz UV nos comprimentos de onda de 254 nm, revelaram manchas, indicando a presença de grupos com ligações duplas. No comprimento de onda 365 nm foi possível verificar fluorescência, indicando presença de cromóforos. Quando reveladas com anisaldeído, a coloração lilás foi visualizada apontando indícios da presença de terpenos no extrato analisado. Quando revelado com sulfato cérico (coloração marrom).

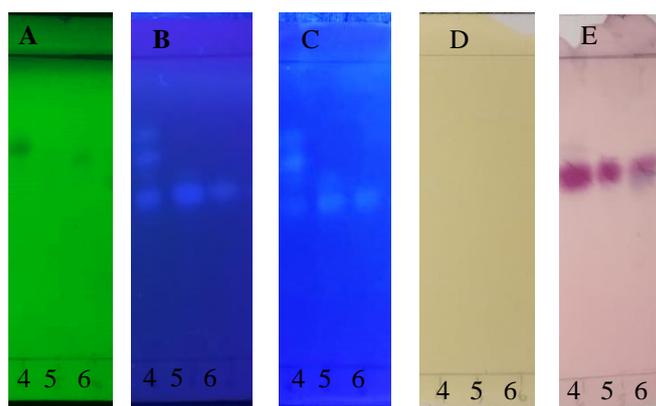
Foi possível observar a presença manchas azul escuro, indicativo de substâncias fenólicas após ser reveladas com cloreto férrico.

Após fracionamento sucessivo do extrato MeOH como mostrado nos itens 2.2.4.2 e 2.2.4.3 foi possível isolar e identificar os triterpenos: lupeol (**I**), betulinaldeído (**II**) e ácido betulínico (**III**).

2.3.2 Identificação estrutural das substâncias Lupeol (**I**) e 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído) (**II**)

As substâncias I e II (4 mg) foram identificadas como lupeol e betulinaldeído e estas encontram-se em mistura. As substâncias foram obtidas na forma de um sólido branco, apresentava coloração lilás quando revelada com anisaldeído (Figura 25) e eluída em DCM 100% e Rf de 0,8.

Figura 25: Cromatografia em camada delgada comparativa das substâncias lupeol (**I**) e betulinaldeído (**II**)



DCM 100%

Legenda: A – UV 254 nm, B – UV 365 nm, C - NP/PEG, D – FeCl₃, D – anisaldeído

Ao analisar o espectro de RMN de ¹H (Figuras 28, 29 e 30) observaram-se sinais característicos de triterpenoides, com vários sinais intensos com deslocamentos entre δ_H 0,65 e 2,35 (WENKERT *et al.*, 1978). Destacando-se a presença dos hidrogênios olefínicos da dupla ligação terminal entre δ_H 4,7 e 4,5. Em δ_H 9,6 observa-se o sinal de hidrogênio de aldeído. Os mapas de contorno bidimensionais de HSQC (Figura 31) e HMBC (Figura 32) mostraram vários sinais característicos de triterpenos pentacíclicos lupano, como deslocamentos em δ_C 110,1 e 150,7 (dupla ligação entre C20 e C29), e

comparando com dados da literatura (Quadro 6 e 7) para as substâncias I e II, foram identificados o lupeol (Figura 26) e o betulinaldeído (Figura 27).

Figura 26: Lupeol

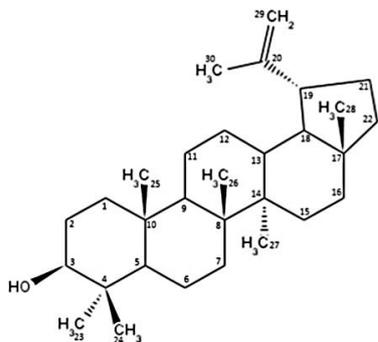


Figura 27: Betulinaldeído

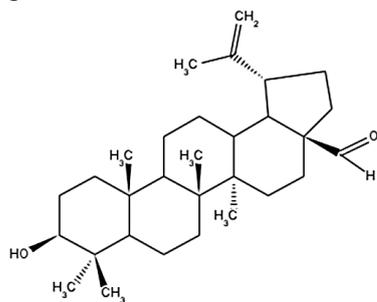


Figura 28 Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 suplementado com TMS) da substâncias em mistura Lupeol e 3β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído)

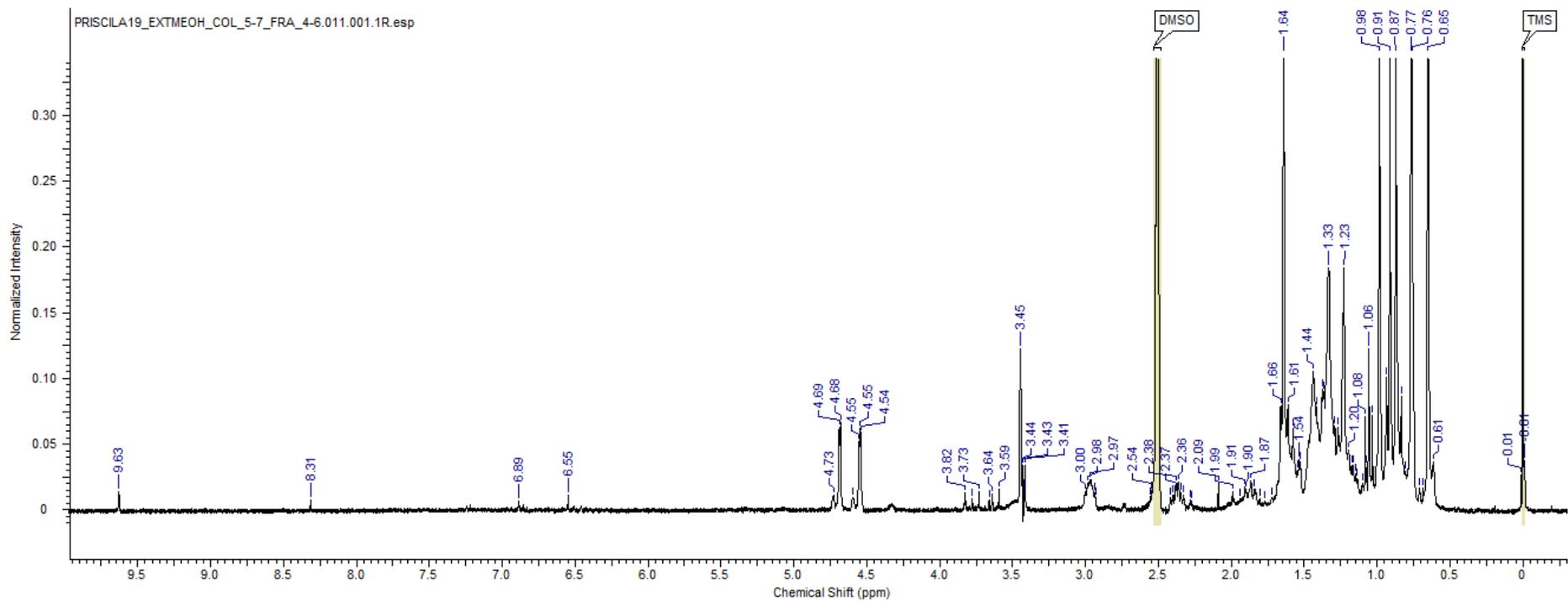


Figura 29: Expansão de espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 suplementado com TMS) da substância em mistura Lupeol e 3β -hidroxil-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).

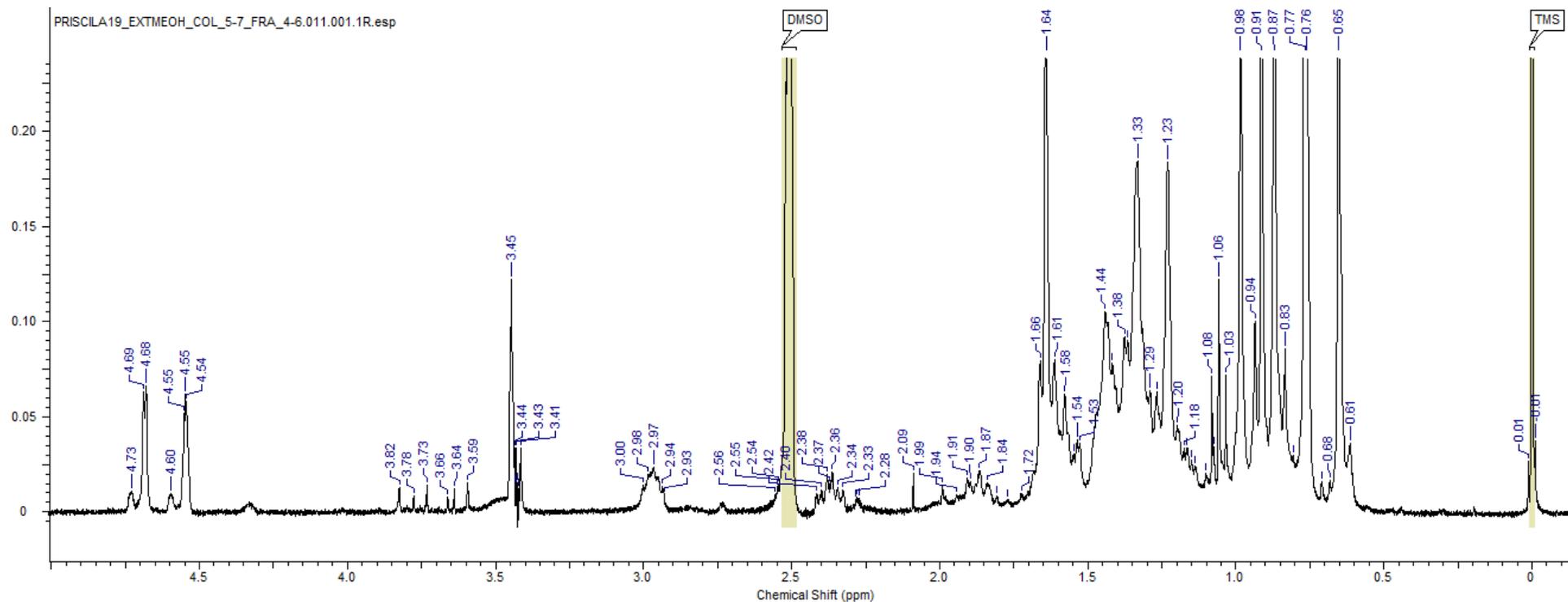


Figura 30: Expansão de espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-d_6 suplementado com TMS) da substância em mistura 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).

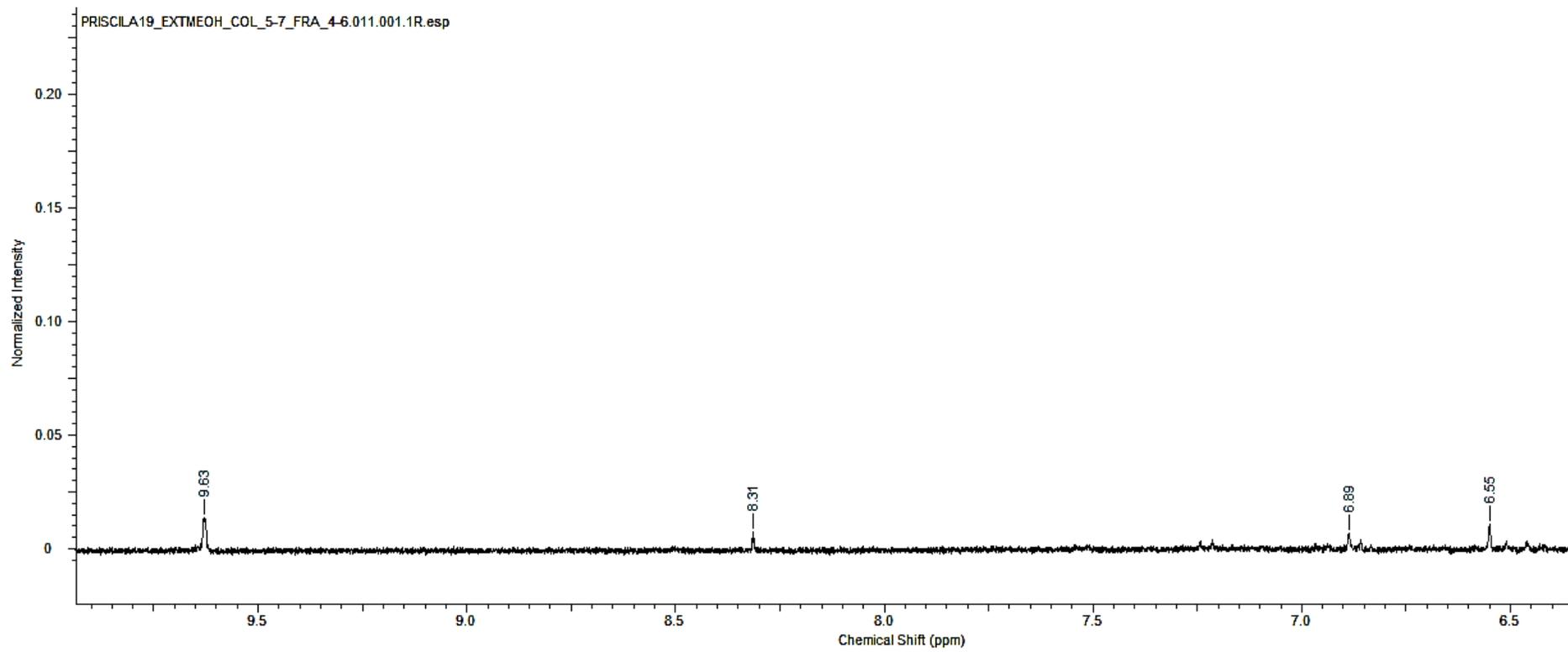


Figura 31: Mapa de contorno HSQC das substâncias em mistura Lupeol e 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído).

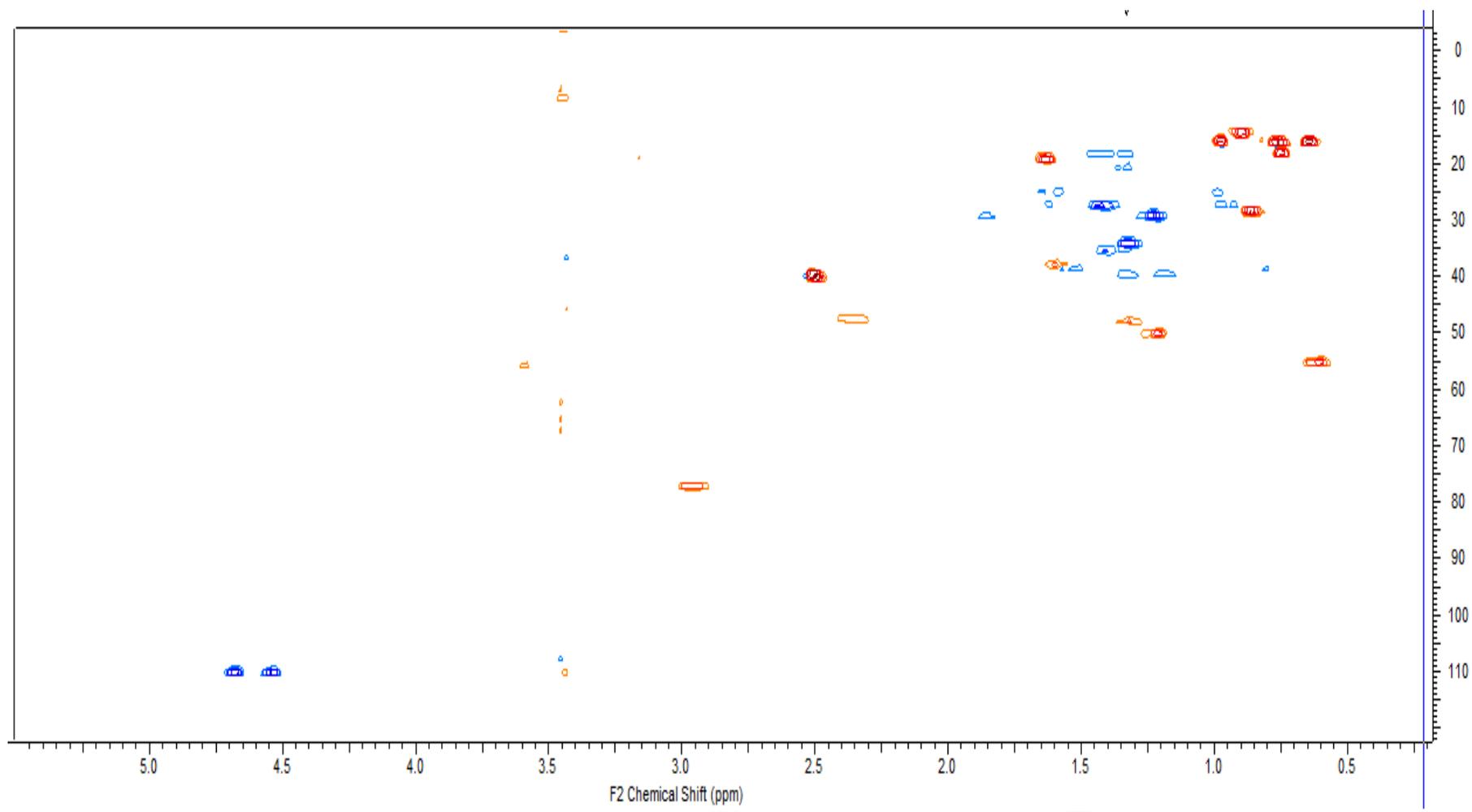
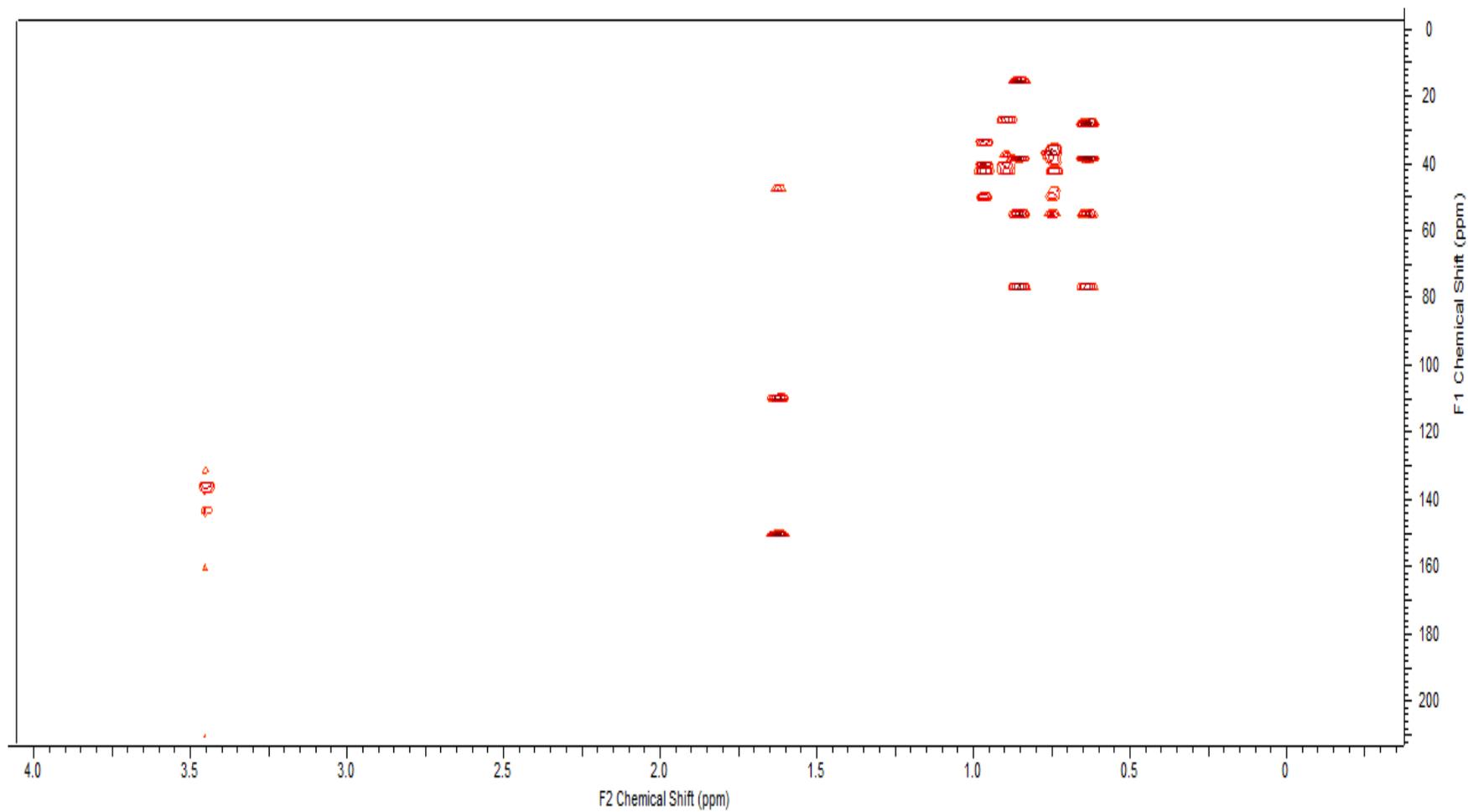


Figura 32: Mapa de contorno HSQC das substâncias em mistura Lupeol e 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído)



Quadro 6: Dados de RMN de ^{13}C do Lupeol isolado da fração 4-6 da fase AcOEt dos calos de *Deguelia duckeana*, em DMSO- d_6 (75 MHz) e comparação com dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; MONACO & PREVITERA, 1984).

Posição	Observado	Multiplicidade	Literatura
1	38,9	CH ₂	38,7
2	27,5	CH ₂	27,4
3	77,2	CH	78,9
4	38,0	C	38,8
5	55,3	CH	55,3
6	18,2	CH ₂	18,3
7	34,2	CH ₂	34,2
8	40,0	C	40,8
9	50,2	CH	50,4
10	37,9	C	37,1
11	20,9	CH ₂	20,9
12	25,1	CH ₂	25,1
13	38,0	CH	38,0
14	42,8	C	42,8
15	27,6	CH ₂	27,4
16	34,2 (?)	CH ₂	35,5
17	42,9	C	43,0
18	48,2	CH	48,0
19	47,8	CH	47,9
20	150,9	C	150,9
21	29,3	CH ₂	29,8
22	40,1	CH ₂	40,0
23	28,5	CH ₃	28,0
24	16,0	CH ₃	15,4
25	16,1	CH ₃	16,1
26	16,2	CH ₃	15,9
27	14,7	CH ₃	14,5
28	18,1	CH ₃	18,0
29	110,0	CH ₂	109,3
30	19,4	CH ₃	19,3

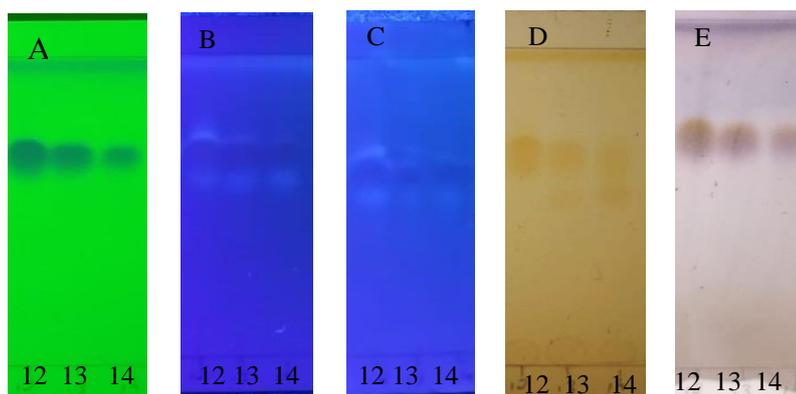
Quadro 7: Dados de RMN de ^{13}C do 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído) isolados da fração 4-6 da fase AcOEt dos calos de *Deguelia duckeana*, em CDCl_3 (75 MHz) e comparação com dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; MONACO & PREVITERA, 1984)

Posição	Observado	Multiplicidade	Literatura
1	38,0	CH_2	38,7
2	27,5	CH_2	27,3
3	77,2	CH	78,9
4	38,7	C	38,8
5	55,3	CH	55,5
6	18,2	CH_2	18,2
7	34,2	CH_2	34,3
8	40,1	C	40,8
9	50,2	CH	50,4
10	37,9	C	37,1
11	20,9	CH_2	20,7
12	25,1	CH_2	25,5
13	38,7	CH	38,7
14	42,8	C	42,5
15	29,3	CH_2	29,2 a
16	28,5	CH_2	28,8 a
17	-	C	59,3
18	48,1	CH	48,0 b
19	47,8	CH	47,5 b
20	150,7	C	149,7
21	29,6	CH_2	29,8
22	33,1	CH_2	33,2
23	27,5	CH_3	27,9
24	14,9	CH_3	15,4
25	16,0	CH_3	15,9 b
26	16,1	CH_3	16,1 b
27	14,7	CH_3	14,2
28	NO	C	205,6
29	110,1	CH_2	110,1
30	19,4	CH_3	19,0

2.3.3 Identificação estrutural das substâncias III e IV

As substâncias III e IV obtidas na forma de um sólido branco, apresentavam coloração lilás e amarelada quando revelada com anisaldeído. Quando vaporizado por iodo foi possível observar manchas amarelas em todas as frações, sugerindo a presença substâncias com ligação química insaturada (dupla ligação) (Figura 33) e eluída em DCM/Acetona 98:2.

Figura 33: Cromatografia em camada delgada comparativa da fração 12-14

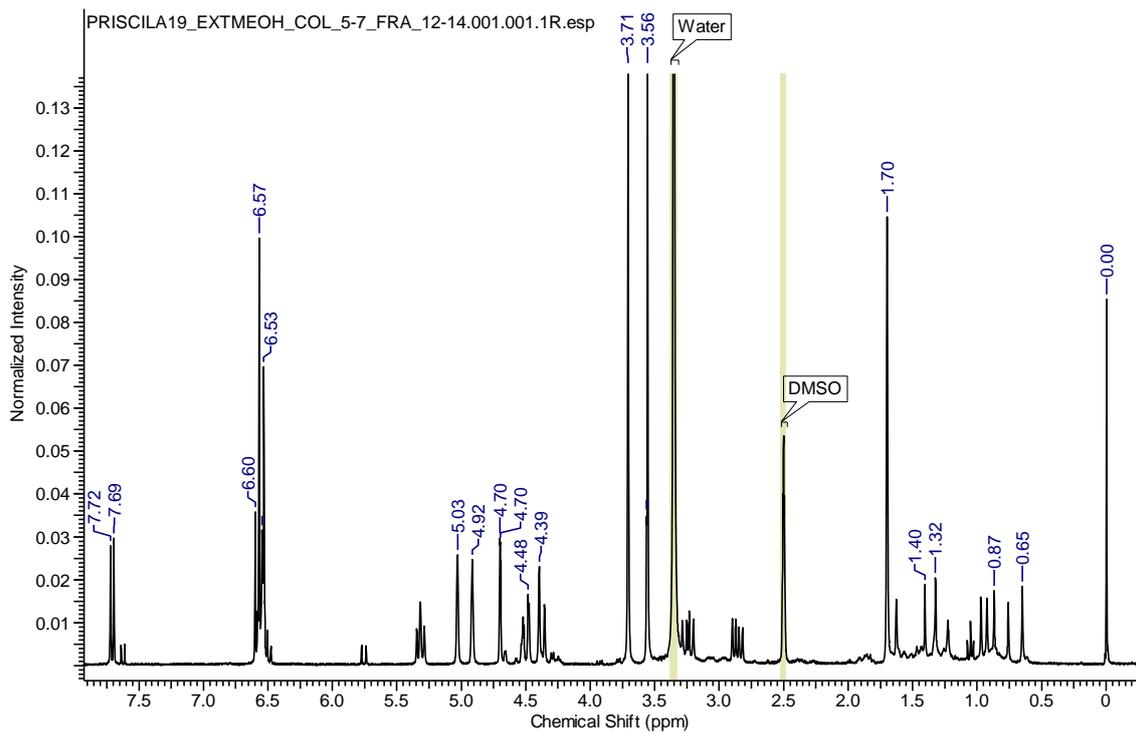


DCM / acetona 98:2

Legenda: Reveladores (A): UV 254 nm; (B): UV 365 nm; (C): NP PEG; (D): $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$; (E): Anisaldeído; (F): FeCl_3 ; (G): Iodo

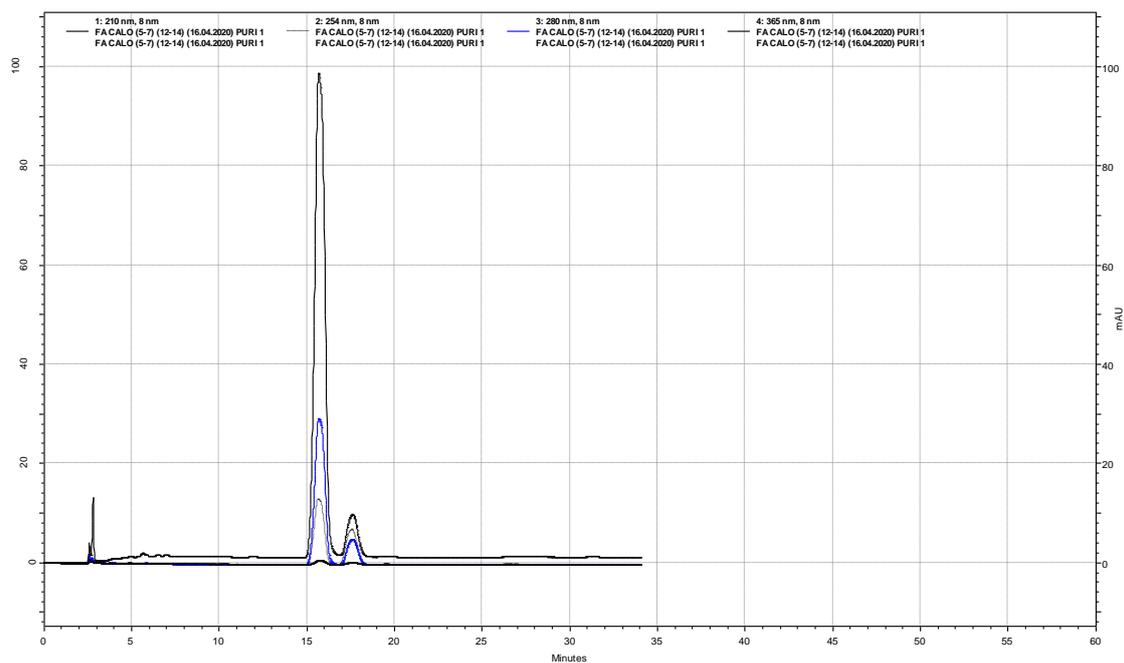
A análise de RMN de ^1H da fração 12-14 mostrou que a mesma se encontrava em mistura (Figura 34).

Figura 34: Espectro de RMN de 1H das substâncias III e IV em mistura



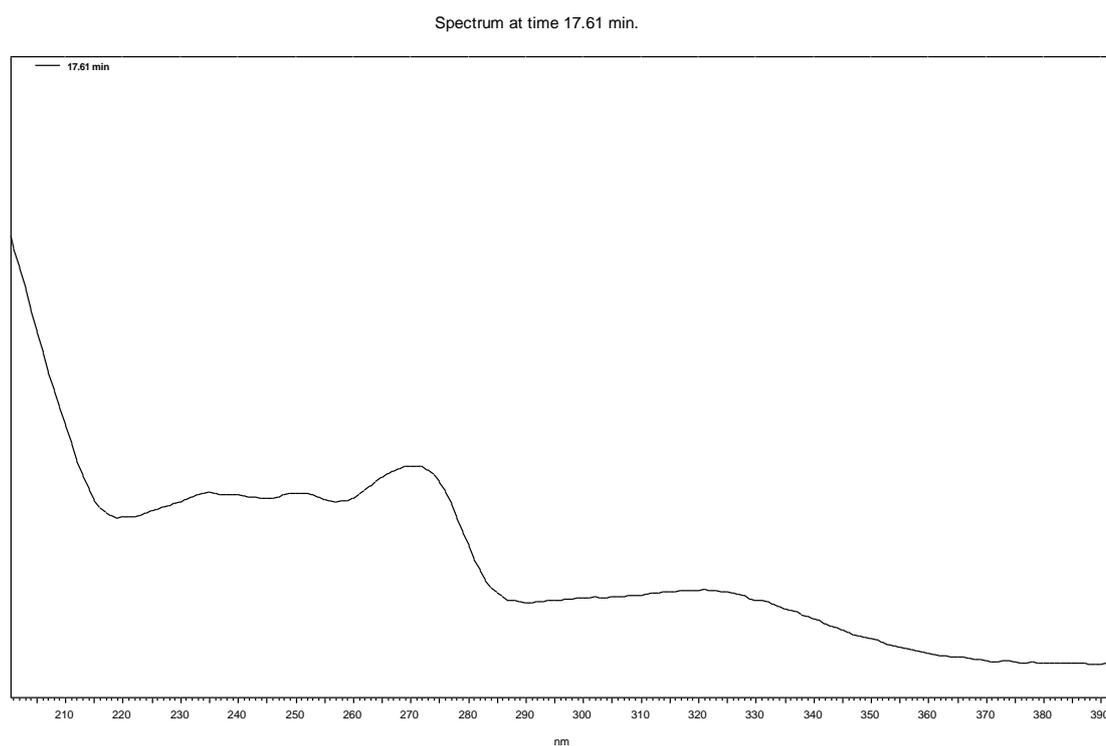
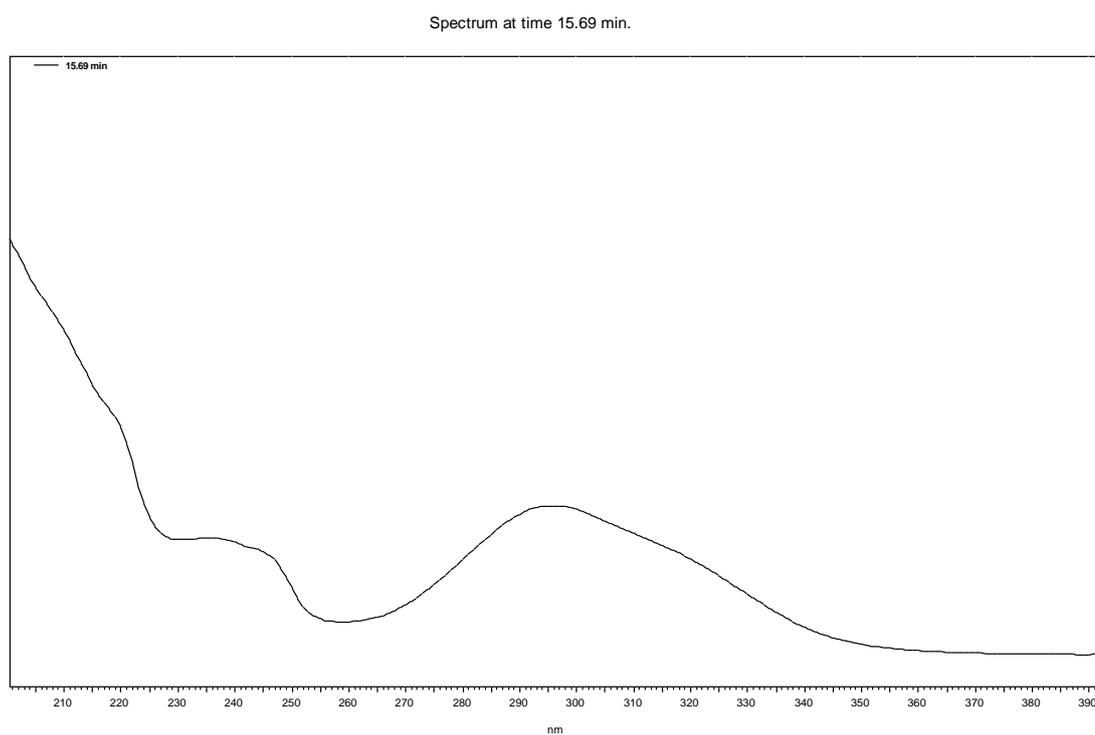
Por esta razão, esta fração foi refractionada utilizando CLAE, e apresentou dois picos majoritários com tempo de retenção de 15,69 e 17,61 min como demonstra o cromatograma na figura 35.

Figura 35: Cromatograma de purificação por CLAE das substâncias III e IV



A figura 36 apresenta o espectro de UV das substâncias III e IV com tempos de retenção de 15,69 e 17,61 min, respectivamente.

Figura 36: Espectro de UV das substâncias III e IV, respectivamente.

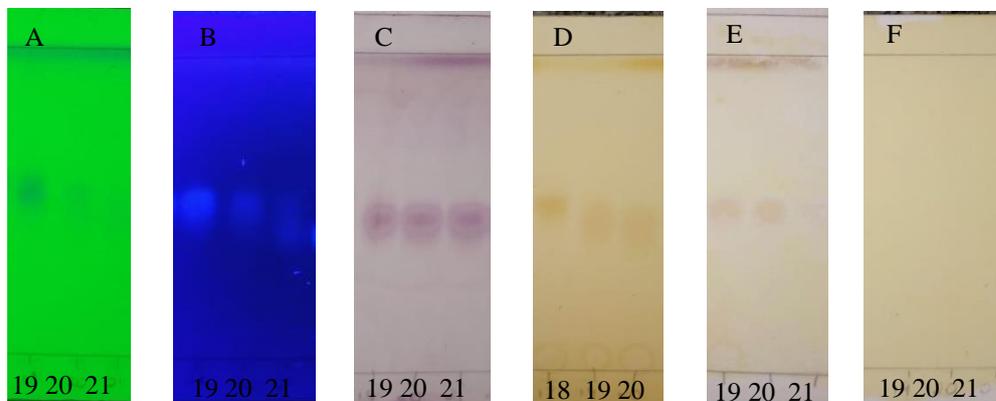


2.3.4 Identificação estrutural da substância ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (Ácido Betulínico) (V)

A substância V (12 mg) foi identificada como ácido betulínico. A substância obtida na forma de um sólido branco, apresentava coloração lilás quando revelada com

anisaldeído e marrom quando revelada com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (Figura 30) e eluída em DCM/Acetona 98:2 e R_f de 0,6.

Figura 37: Cromatografia em camada delgada comparativa da substância ácido betulínico



DCM / acetona 98:2

Legenda: A – UV 254 nm, B – UV 365 nm, C – Anisaldeído, D – vapor de iodo, E – $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, F – FeCl_3

O espectro de RMN de ^1H (Figura 39) mostrou a presença de sinais de hidrogênios vinílicos de dupla ligação terminal em δ_{H} 4,68 e 4,65, característica dos triterpenos de estrutura lupano. Foram observados também sinais entre δ_{H} 0,65 e 1,70 referente às metilas. Os espectros de RMN bidimensionais de HSQC (Figura 40) e HMBC (Figura 41), mostraram os sinais de 30 carbonos, característicos de triterpenos correlacionando com os hidrogênios. Foi possível observar a presença de um carbono com deslocamento em δ_{C} 177 o qual foi atribuído a carbonila no C28, característica do grupo ácido, além de carbonos em δ_{C} 109,3 e 150,8 referentes aos carbonos na posição C29 e C20, assim como um carbono com deslocamento em δ_{C} 77,2 que seria correspondente a hidroxila na posição C3. A comparação dos dados obtidos (Quadro 8) com os descritos na literatura (WENKERT et al., 1978) permitiu concluir que este tratava-se do ácido betulínico. (Figura 38).

Os espectros de CL/EM (Figura 42) mostraram a presença do aduto ionizado no tempo de retenção de 11,4 min no modo positivo ($[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 439,31), compatível com m/z 160 u e a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$.

Figura 38: Substância ácido betulínico

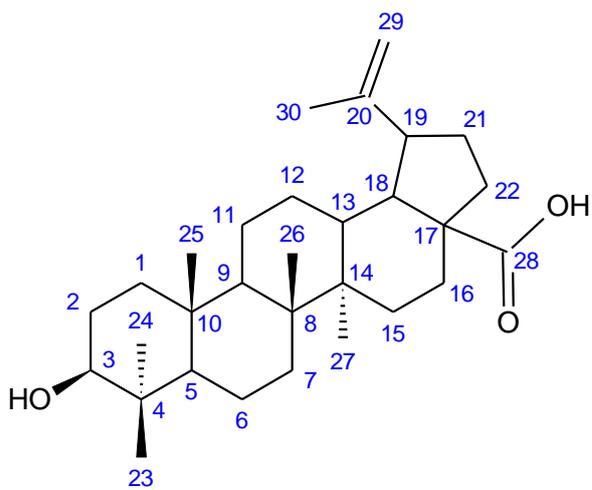


Figura 39: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-d_6 suplementado com TMS) da substância ácido betulínico

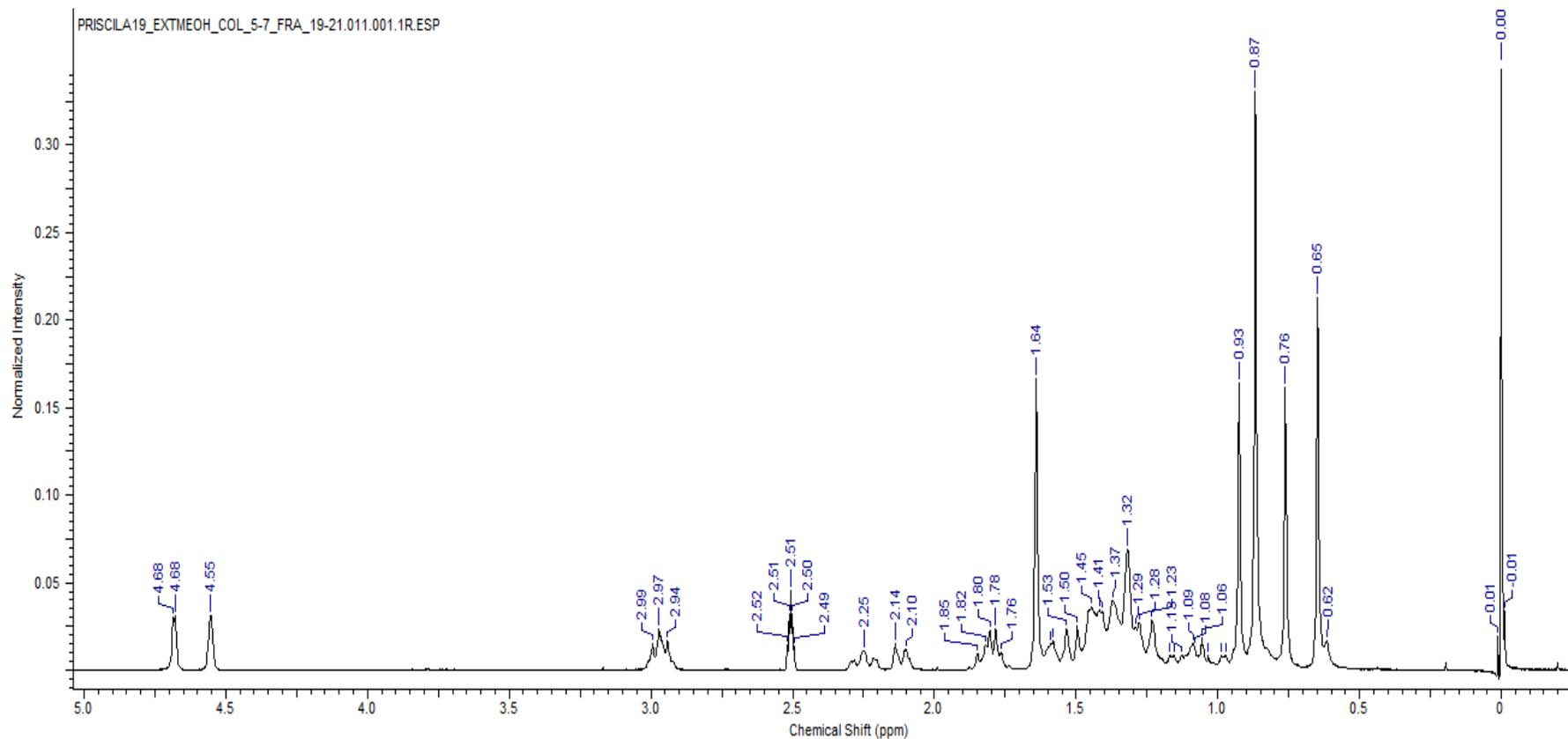


Figura 40: Mapa de contorno HSQC da substância ácido betulínico

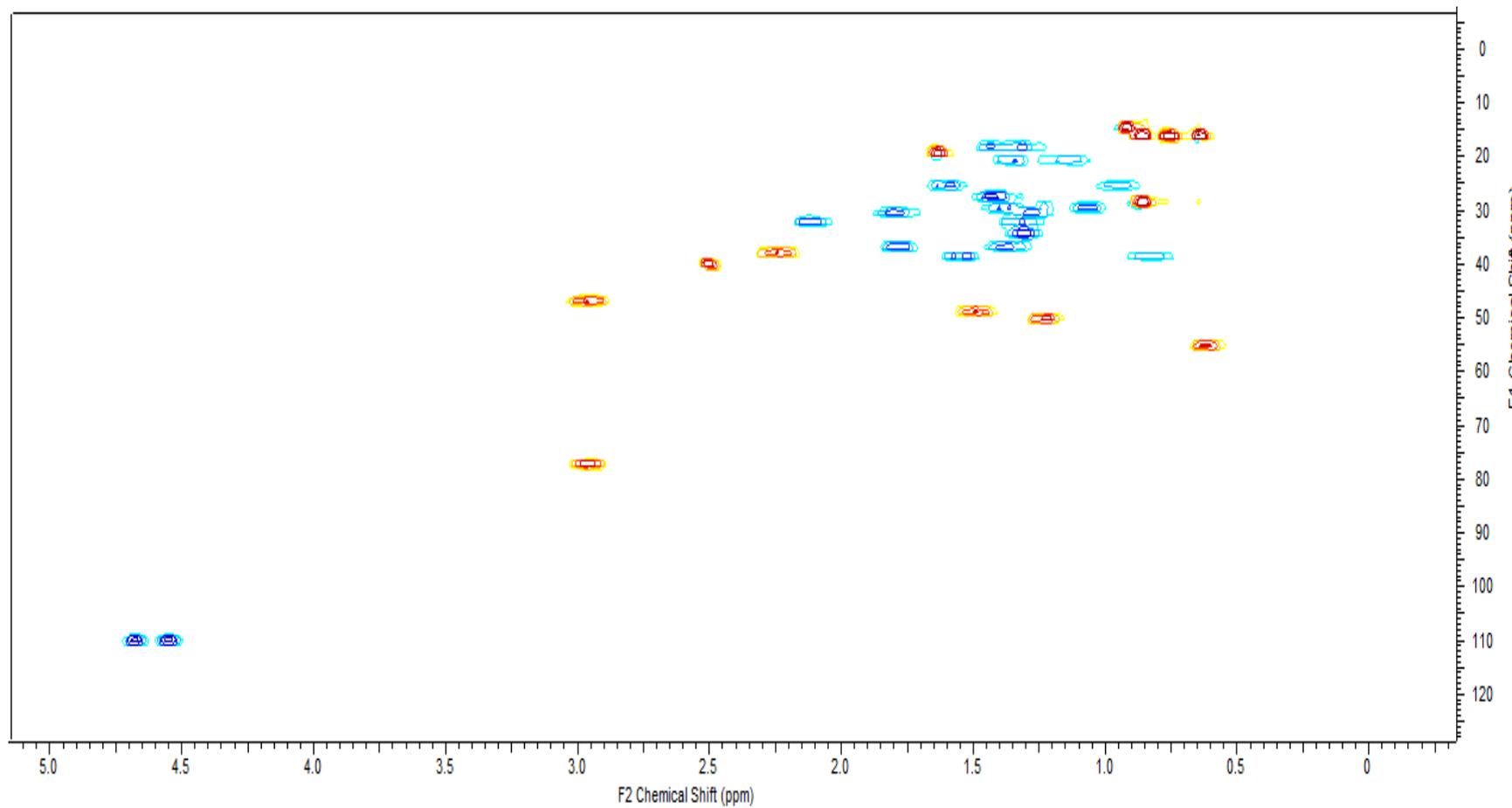


Figura 41: Mapa de contorno HMBC da substância ácido betulínico

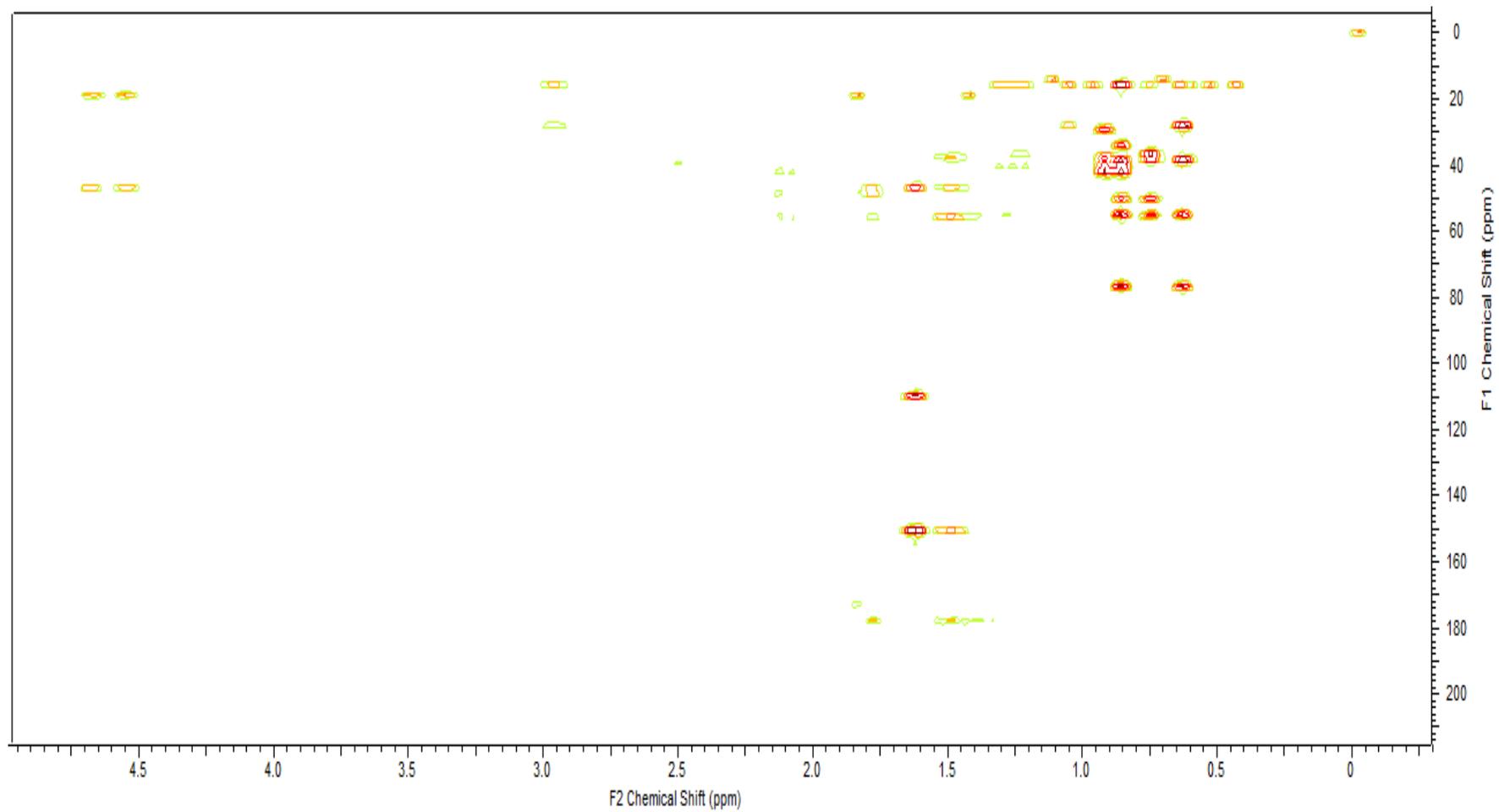
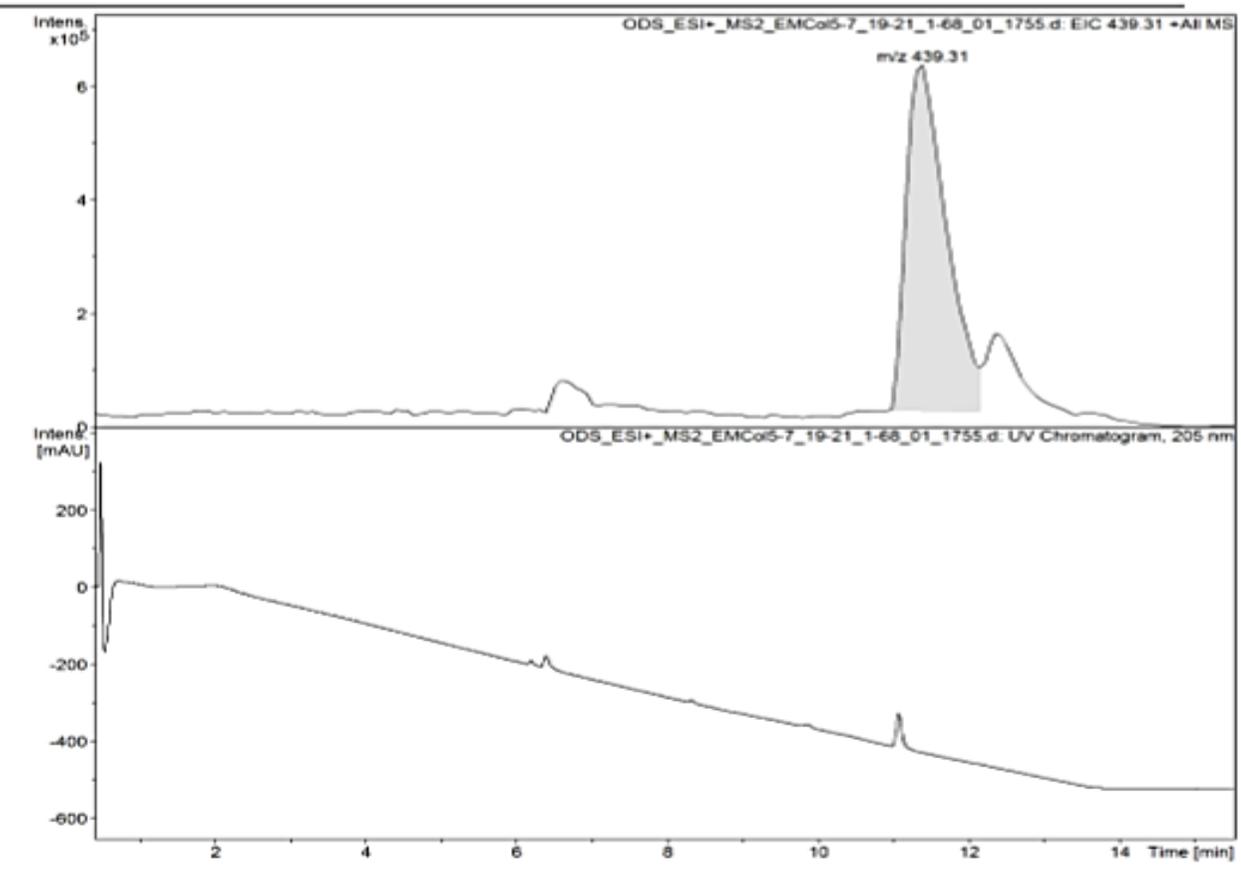


Figura 42: Espectro de CL/EM da substância ácido betulínico



Quadro 8: Dados de RMN de ^{13}C do ácido betulínico isolado da fase AcOEt dos calos de *Deguelia duckeana*, em DMSO- d_6 (75 MHz) e comparação com dados da literatura (WENKERT et al., 1978).

C	Observado	Multiplicidade	Literatura
1	38,7	CH ₂	38,2
2	27,65	CH ₂	27,1
3	77,2	CH	76,7
4	38,7	C	38,5
5	55,3	CH	54,8
6	18,42	CH ₂	17,9
7	34,33	CH ₂	33,9
8	38,7	C	38,5
9	50,38	CH	49,9
10	39,9	C	36,7
11	20,87	CH ₂	20,4
12	25,54	CH ₂	25,0
13	37,95	CH	37,5
14	42,2	C	41,9
15	30,62	CH ₂	29,2
16	32,37	CH ₂	31,7
17	55,3	C	55,4
18	47,13	CH	48,5
19	50,37	CH	49,9
20	150,8	C	150,3
21	30,57	CH ₂	30,09
22	36,9	CH ₂	36,3
23	28,56	CH ₃	28,1
24	16,24	CH ₃	15,73
25	16,27	CH ₃	15,9
26	16,44	CH ₃	15,8
27	14,8	CH ₃	14,3
28	177,7	C	177,2
29	109,0	CH ₂	109,0
30	19,4	CH ₃	18,9

2.3.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

2.3.5.1 Atividade Antibacteriana pelo método de microdiluição

Nos resultados obtidos, verificou-se que o extrato MeOH dos calos inibiu o crescimento apenas da bactéria *Serratia marcescens* em 39,22% quando comparado ao controle positivo. O extrato da fase hidrometanólica não inibiu o crescimento de nenhuma das bactérias testadas. O extrato da fase AcOEt inibiu o crescimento de 6 bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella pneumoniae*; *Edwardsiella tarda*; *Pseudomonas*

fluorescens; *Escherichia coli*; *Salmonella Enteritidis*). As porcentagens de inibição do crescimento das bactérias estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Porcentagem de inibição dos extratos de *Deguelia duckeana* ± desvio padrão frente às bactérias testadas

BACTÉRIAS	CALOS		
	Bruto MeOH	Fase Hidrometanólica	Fase AcEOt
	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO		
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	39,22 ± 0,00	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	30,96 ± 0,01
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	51,37 ± 0,00
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-	7,01 ± 0,01
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	15,09 ± 0,04
<i>Escherichia coli</i>	-	-	27,15 ± 0,02
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	3,24 ± 0,03

O extrato bruto MeOH dos calos de *D. duckeana* foi capaz de inibir apenas o crescimento da bactéria *S. marcescens*, devido apresentar mistura de metabólitos secundários, no entanto as substâncias presentes, devem ser avaliadas de forma isolada, pois o extrato bruto pode conter outras substâncias, que podem interferir nos resultados (AIYEGORO et al., 2011)

Rescarolli (2018) realizou o teste antibacteriano com o extrato Hexano/AcOEt dos calos de *D. duckeana* onde oito bactérias apresentaram inibição do seu crescimento quando comparado ao controle positivo. Sendo que para *Aeromonas hydrophila*, *Candida albican*, *Salmonella enteritidis*, o extrato foi ativo até nas menores concentrações (30 µg/mL). Para *Edwardsiella tarda*, concentrações acima de 60 µg/mL se mostraram ativas, *Morganella morganii* a concentração mínima inibitória foi de 125 µg/mL e para *Enterobacter cloacae* 500 µg/mL.

Aos triterpenos são atribuídas diversas atividades farmacológicas, dentre essas atividades podemos destacar os processos anti-inflamatórios, distúrbios renais, diabetes, hepatotoxicidade, doenças cardiovasculares, câncer e infecções microbianas (PEREIRA et., 2018; CHEN et., 2018). Estudos realizados com betulinaldeído e ácido betulínico apresentaram atividade antibacteriana contra *M. tuberculosis* H37Ra (IC₅₀ de 98, 169 e 93 µM) (MORRISON et al 2016). Estudos com ácido betulínico e ácido ursólico, dois triterpenos pentacíclicos, apresentaram atividade antibacteriana sobre *Bacillus subtilis* e

Escherichia coli (CHANDRAMU, et al., 2003). Lupeol extraído de sementes de *Caesalpinia bonducella*, apresentou inibição do crescimento de microrganismos, quando comparado a outros triterpenos (SAEED, et al., 2001).

2.3.5.2 Atividade de toxicidade frente *Artemia salina*

O ensaio com a *A. salina* foi realizado em triplicata de cada uma das amostras testadas, nas concentrações de 1000, 500, 125, 60 e 30 µg/mL. Na tabela abaixo, são mostrados os valores correspondentes a cada taxa de mortalidade dos indivíduos de *Artemia salina* em cada poço.

Tabela 5: Resultados da avaliação de toxicidade dos extratos de *Deguelia duckeana* frente a *Artemia salina*

		Concentração dos extratos					
		1000	500	250	125	60	30
		Mortalidade (%)					
Calos	Hex/AcOEt	100	100	100	100	99	98
	MeOH	100	100	54	17	14	0

O extrato hexano/AcOEt apresentou toxicidade em todas as concentrações, matando todos os indivíduos, já o extrato MeOH apresentou-se tóxico nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL.

A toxicidade dos extratos pode estar relacionada à boa atividade contra células cancerígenas e atividade contra protozoários (HOCAYEN, 2012), dessa maneira, foi possível a realização de uma investigação fitoquímica em busca de substâncias bioativas. A presença dos triterpenos apresentam principalmente atividade citotóxica e antibacteriana (MACHADO et al., 2010)

2.3.5.3 Avaliação do potencial Alelopático

Na avaliação do efeito alelopático, a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação de *L sativa* não sofram interferência de nenhum dos extratos testados (Tabela 6).

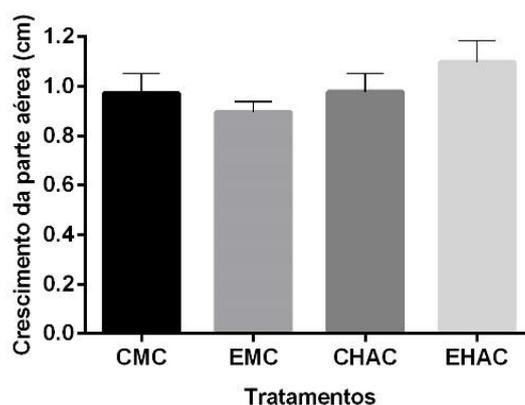
Tabela 6 - Porcentagem de germinação e índice de velocidade da germinação (IVG) de *Lactuca sativa* dos extratos hexano/AcOEt e metanólico dos calos e folhas de *D. duckeana*.

Tratamento	Concentração mg/mL	Germinação (%)	IVG
CALOS			
Extrato hexânico/ AcOEt	0 mg/mL	95,00	14,89
	1 mg/mL	91,00	14,88
Extratos metanólico	0 mg/mL	98,00	23,96
	1 mg/mL	96,00	23,26

Resultados significativos são seguidos por: *** $p < 0,001$.

Com relação a parte aérea (Figura 35), esta por sua vez não sofreu interferência em nenhum dos extratos avaliados.

Figura 43: Efeito dos extratos MeOH e Hexano/AcOEt dos calos de *Deguelia duckeana* no crescimento da parte aérea de *Lactuca sativa*.

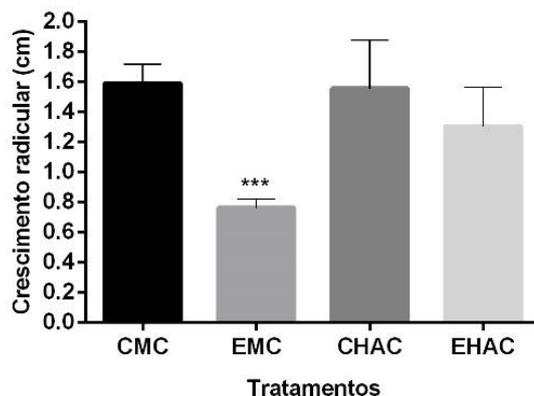


Resultados significativos são seguidos por: *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

CMC - Controle do extrato MeOH dos calos; EMC- Extrato MeOH dos calos; CHAC- Controle do extrato hexano/AcOEt dos calos, EHAC- Extrato hexano/AcOEt dos calos.

Quanto ao crescimento radicular, este sofreu um decréscimo quando submetido ao extrato MeOH (Figura 36).

Figura 44: Efeito dos extratos MeOH, hexano/AcOEt de folhas e aquoso das raízes de *Deguelia duckeana* no crescimento radicular de *Lactuca sativa*.

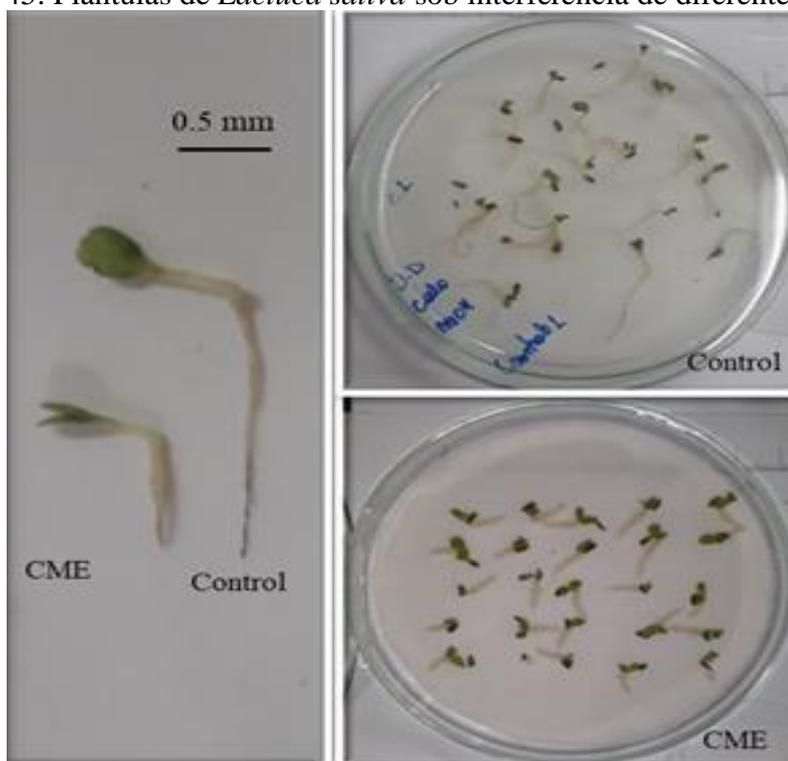


Resultados significativos são seguidos por: *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

CMF - Controle do extrato MeOH das folhas; EMF- Extrato MeOH das folhas; CHAF- Controle do extrato hexano/AcOEt das folhas, EHAF- Extrato hexano/AcOEt das folhas; CAR – Controle aquoso raiz; AR – Extrato aquoso raiz.

A figura 38 demonstra qualitativamente a redução do crescimento radicular.

Figura 45: Plântulas de *Lactuca sativa* sob interferência de diferentes extratos



Periotto e colaboradores (2004) em estudos fitotóxicos com extrato aquoso de *Andira humilis* sobre *Lactuca sativa*, quando comparado o crescimento da raiz e da parte aérea (hipocótilo/coleóptilo), observaram que os efeitos alelopáticos foram mais

evidentes no crescimento da radicular do que no da parte aérea. Segundo os mesmos autores, este fenômeno pode ter ocorrido devido à absorção e, conseqüentemente, a concentração de fitotoxinas nos tecidos radiculares devido ocorrência de contato físico da raiz com o papel filtro.

Triterpenos foram isolados de extrato hexano/AcOEt de calos de *D. duckena* (RESCAROLLI, 2018) e do extrato MeOH. Porém resultados relacionados ao seu potencial alelopático de triterpenos são antagônicos, pois alguns pesquisadores relatam um forte efeito alelopático enquanto outros indicam uma fraca atividade. Isso ocorre devido aos variados tipos de triterpenos (MACÍAS et al.,1997).

2.4 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto os resultados obtidos no presente estudo permitiram obter as seguintes conclusões.

- O fracionamento do extrato MeOH permitiu isolar três triterpenos: lupeol, o 3β-hidroxi-20(29)-lupen-28-al (betulinaldeído) e o ácido 3βhidroxi-lup-20(29)-en-28-oico (ácido betulínico).
- O extrato MeOH e a fase AcOEt dos calos apresentaram atividade antibacteriana. O extrato da fase hidrometanólica não apresentou atividade.
- Com relação a toxicidade frente a *A. salina* o extrato hexano/AcOEt apresentou toxicidade em todas as concentrações. O extrato MeOH apresentou-se tóxico nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL.
- Na avaliação do efeito alelopático, a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação de *L sativa* não sofreu interferência de nenhum dos extratos testados. Com relação a parte aérea, esta por sua vez não sofreu interferência em nenhum dos extratos avaliados. Quanto ao crescimento radicular, este sofreu um decréscimo quando submetido ao extrato MeOH.

2.5 REFERÊNCIAS

- Ahmad, S. Garg M, Tamboli E. T, Abdin M. Z, Ansari S. H. 2013. *In vitro* production of alkaloids: Factors, approaches, challenges and prospects. *Pharmacognosy Reviews*, v. 7, n. 1, p. 27.
- Ali, M.; Abbasi, B, H. 2014. Light-induced fluctuations in biomass accumulation, secondary metabolites production and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 140. 223–227.
- Alves, C.; Oliveira, J. R. ; Reis, E.S. ; Corrêa, R.M. ; Souza, J. ; Silva, J. C. O. ; Paula, J.C.R. ; Rodrigues, L.H.F. ; Souza, M.A. ; Mendonça, M.R. 2008. Cultura de Tecidos na Agricultura. In: I Jornada Científica/ I Semana de Ciencia e Tecnologia, 2008, Bambuí. Anais.... CEFET-Bambuí.
- Aiyegoro, O., Adewusi, A., Oyedemi, S., Akinpelu, D., & Okoh, A. 2011. Interactions of antibiotics and methanolic crude extracts of *Azelaia Africana* (Smith.) against drug resistance bacterial isolates. *International journal of molecular sciences*, 12(7), 4477-4487.
- Costa, P.; Gonçalves S.; Valentão, P.; Andrade, P. B.; Coelho,N.; Romano, A. 2012. *Thymus obovatus* wild plants and *in vitro* cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*.v.135, p.1253–1260.
- Chen, M.C.; Hsu, H.H.; Chu, Y.Y.; Cheng, S.F.; Shen, C.Y.; Lin, Y.J.; Chen, R.J.; Viswanadha, V.P.; Lin, Y.M.; Huang, C.Y. 2018. Lupeol alters ER stress-signaling pathway by downregulating ABCG2 expression to induce Oxaliplatin-resistant LoVo colorectal cancer cell apoptosis. *Environ. Toxicol.*
- Fatima, S. Mujib, A.; Tonk, D. 2015. NaCl amendment improves vinblastine and vincristine synthesis in *Catharanthus roseus*: a case of stress signalling as evidenced by antioxidant enzymes activities. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 121:445–458.
- Fukuyama, T. D.; Ohashi-Kaneko, K.; Watanabe, H. 2015. Estimation of Optimal Red Light Intensity for Production of the Pharmaceutical Drug Components, Vindoline and Catharanthine, Contained in *Catharanthus roseus* (L.) *Environ. Control Biol.*, 53 (4), 217-220.
- Furden, B.V.; Humburg A.; Fuss E. 2005. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6- methoxy podophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, v.24, p.312-7.

- Grattapaglia, D.; Machado, M. A. 1998. Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa- CNPH, v. 1, .p.183-260.
- Grout, B. 2017. General Principles of Tissue Culture. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, v. 2..
- Guo, Y. M.; Yang, Y. G.; Guo, Y.; Gou, Z.; 2004. Adventitious shoot bud formation and plant regeneration from in vitro cultured stem segments of reed (*Phragmites communis* Trin). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, Columbia, v.40, n. 4, p.412 – 415, July/Aug..
- Gyorgy, Z.; Tolonen, A.; Neubauer, P.; Hohtola, A. 2005. Enhanced biotransformation capacity of *Rhodiola rosea* callus cultures for glycosid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.83, p.129-35.
- Hocayen, S De A, P; Campos, A, L; Pochapski, Mt, Malfatti, M, RC. Avaliação da toxicidade do extrato bruto metanólico de *Baccharis dracunculifolia* por meio de ensaio com *Artemia salina*. *INSULA: Revista de Botânica, Florianópolis*, n.41, p. 23-31. 2012.
- Karam, N.S.; Jawad M. F.; Arikat A. N.; Shibl A. R. 2003. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.73, p.117-21.
- Kokotkiewicz, A.; Luczkiewicz, M.; Sowinski, P.; Glod, D. Gorynskic, K.; Bucinskic, A. 2012. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush) intact plant and *in vitro* cultures. *Food Chemistry*.v.133 p.1373–1382.
- Macías F.A, Simonet A.ME Galindo J.C.G. 1997. Bioactive steroids and triterpenes from *Melilotus messanensis* and their allelopathic potential. *J. Chem. Ecol.*, v. 23, n. 7, p. 1781-
- Machado, F. L. S.; Kaiser, C. R.; Costa, S. S.; Gestinari, L. M.; Soares, A. R. 2010. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20, n.3, p.441-452, Curitiba. ISSN 0102-695X
- Mahato, S. B. E Kundu, A. P. 1994. ¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids Compilation and some Salient Features. *Phytochemistry*. p. 1517- 1575.
- Moerkercke, A. V.; Fabris, M., Pollier, J., Gino J.E. Baart, G. J. E., Rombauts, S., Hasnain, G., Rischer, H., Memelink, J., Oksman-Caldentey, K., Goossens, A.

- CathaCyc, A. 2013. Metabolic Pathway Database Built from *Catharanthus roseus* RNA-Seq Data. *Plant Cell Physiol.* 54(5): 673–685..
- Monaco, P.; Previtiera, L. Isoprenoids from the leaves of *Quercus suber*. *Journal Natural Product.*, 47, p.673-6. 1984.
- Morrison, S. A., Li, H., Webster, D., Johnson, J. A., & Gray, C. A. 2016. Antimycobacterial triterpenes from the Canadian medicinal plant *Sarracenia purpurea*. *Journal of ethnopharmacology*, 188, 200-203.
- Nosov, A. M. 2012. Application of Cell Technologies for Production of Plant Derived Bioactive Substances of Plant Origin. *Applied Biochemistry and Microbiology*. v.48, n.7, p. 609–624.
- Pereira Beserra, F., Xue, M., Maia, G. L. D. A., Leite Rozza, A., Helena Pellizzon, C., & Jackson, C. J. (2018). Lupeol, a pentacyclic triterpene, promotes migration, wound closure, and contractile effect in vitro: possible involvement of PI3K/Akt and p38/ERK/MAPK pathways. *Molecules*, 23(11).
- Periotto, F., Perez, S. C. J. G. D., Lima, M. I. S. 2004. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta botânica brasílica*, 18(3), 425-430.
- Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. *Martins: Nijoff*, 326p.
- Prakash, P.; Ghosliya, D.; Gupta, V. 2015. Identification of conserved and novel microRNAs in *Catharanthus roseus* by deep sequencing and computational prediction of their potential targets. *Gene* 554, 181–195..
- Quisen, R.C.; Angelo, P.C.S. 2008. Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, p.44.
- Reinhardt, D.H.R.C.; Cunha, G. A. P. 1999. Métodos De Propagação. In: Cunha, G.A.P.; Cabral, J.R.S.; Souza, L.F. da S. O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia. Brasília: *Embrapa-SPI*, p.105-138.
- Rescarolli, C. L. S. Triterpenos de calos de *Deguelia duckeana* A. M. G. Azevedo (Fabaceae). Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas (UFAM). 103 p. 2018.
- Saiman, M. Z.; Mustafa, N. R., Pomahoc̣ova, B., Verbene, M., Verpoorte, R., Choi, H., Elisabeth, A. 2014. Analysis of metabolites in the terpenoid pathway of

- Catharanthus roseus* cell suspensions. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 117:225–239.
- Sathyanarayana, B. N.; Varghese, D.B. 2007. *Plant Tissue Culture. Practices and new experimental protocols*. I. K. International Pvt Ltd. 316p..
- Schripsema, J.; Verpoorte, R. 1994. Primary and secondary metabolism of plants and plant cell cultures: III Special Issue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.38, n.2, p.23-8.
- Smith, R. H. 2013. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. 3. ed. USA: *Elsevier*.
- Tariq, U.; Ali, M.; Abbasi, B. H. 2014. Morphogenic and biochemical variations under different spectral lights in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 130, 264–271..
- Termignoni, R. R. 2005. *Cultura de Tecidos Vegetais*. Editora da UFRGS, Porto Alegre. 182p.
- Thorpe, T. A. History of Plant Tissue Culture In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; VÁZQUEZ-FLOTA, F. *Plant Cell Culture Protocols*, 2º Ed. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2012
- Torres, C. T.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: *EMBRAPA/CNPQ*, v. 1, 1998.
- Wenkert E, Baddeley V, Burfett I. R, Moreno L. N. 1978. ¹³C Nuclear magnetic-resonance spectroscopy of naturally-occurring substances. Triterpenes related to lupane and hopane. *Org Magn Res* 11: 337-343.