



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, ANTIPROLIFERATIVA E
ANTIOXIDANTE E ANÁLISE POR CLAE-EM/EM DA CASCA DO
CAULE DE *Macrolobium latifolium* Vogel (FABACEAE)**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

CAMILLA MARTINS DOS SANTOS FERRAZ



Vitória da Conquista - BA

2018

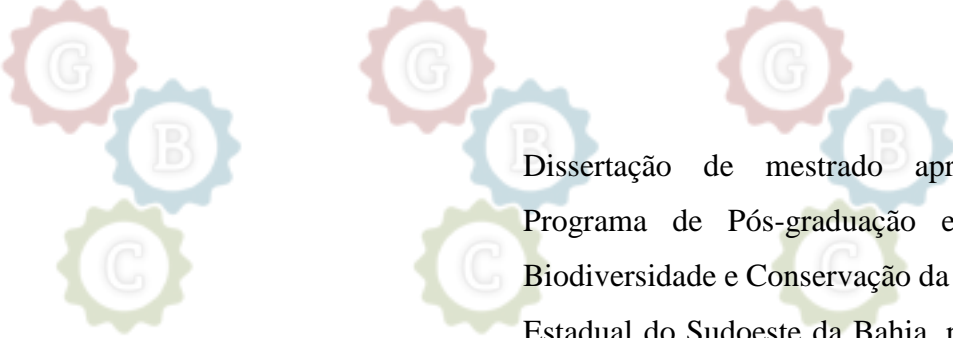
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



CAMILLA MARTINS DOS SANTOS FERRAZ

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, ANTIPROLIFERATIVA E
ANTIOXIDANTE E ANÁLISE POR CLAE-EM/EM DA CASCA DO
CAULE DE *Macrolobium latifolium* Vogel (FABACEAE)**



Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do Título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Orientador: Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz



Vitória da Conquista - BA

2018

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



F368 Ferraz, Camilla Martins dos Santos.

Atividades antibacteriana, antiproliferativa e antioxidante e análise por CLAE-EM/EM da casca do caule de *Macrolobium latifolium* Vogel (FABACEAE)/ Iracema Costa Ribeiro Gomes. - Jequié, 2018.

93f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação da Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz)

1. *Macrolobium latifolium* 2. Fabaceae 3. Antioxidante 3. Citoprotetora 4. Antibacteriana 5. Antiproliferativa I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título





Genética,

ração

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

Campus Jequié-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: "Estudo fitoquímico e atividades antibacteriana, antiproliferativa e antioxidante da casca do caule de *Macrolobium latifolium* Vogel (Fabaceae)".

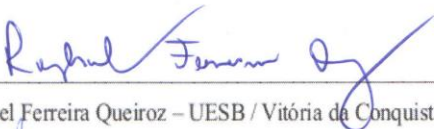
Autor (a): Camilla Martins dos Santos Ferraz.


Orientador (a): Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, pela Banca Examinadora:

Genética,

ração

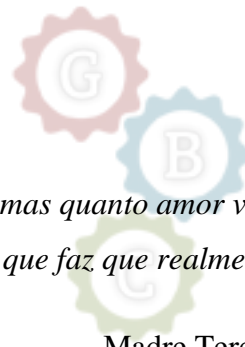
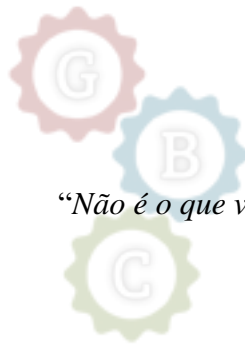

Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz – UESB / Vitória da Conquista - BA


Prof. Dr. Alexandre Branco – UEFS / Feira de Santana – BA


Profa. Dra. Regineide Xavier Santos – UESB / Vitória da Conquista - BA

Data de realização: 15 de junho de 2018.

Avenida José Moreira Sobrinho, s/n – Jequiezinho – Jequié/BA – CEP 45.206-190.
Telefones: (0**73) 3528-9725 – E-mail: ppggbc@uesb.edu.br



“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa.”

Madre Teresa de Calcutá

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Aos meus pais Carlinhos e Sibéria, minha fonte inspiradora de amor, cuidado e dedicação.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



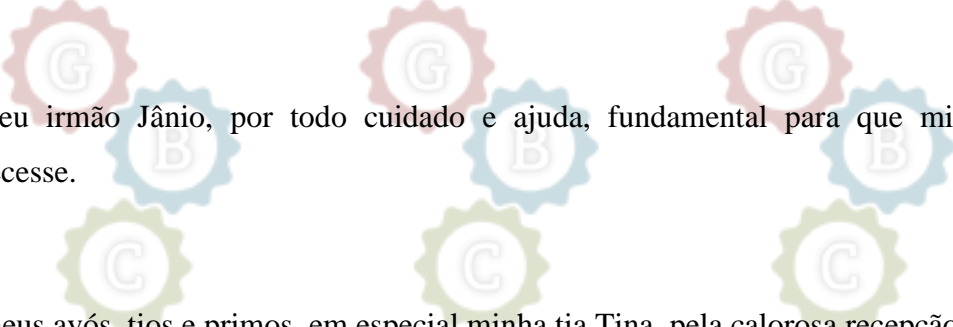
AGRADECIMENTOS

Inicialmente quero agradecer a Deus por ter me sustentado até aqui.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Aos meus pais Jânio Carlos e Maria Sibéria, por todo apoio, pelos esforços desmedidos e vontades abdicadas para que eu pudesse chegar até aqui. Eu amo vocês!

A minha irmã Dany e meu cunhado Pio, pelo incentivo, momentos de descontração e de intensa felicidade que me proporcionaram ao saber que serei tia! Esse/essa bebê já é muito amado (a) por todos nós!



Ao meu irmão Jânio, por todo cuidado e ajuda, fundamental para que minha pesquisa acontecesse.

Aos meus avós, tios e primos, em especial minha tia Tina, pela calorosa recepção em Salvador e por toda ajuda durante a execução dos testes na Fiocruz.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Aos meus amigos do laboratório Line, Léo, Dani, Tássia e Filipe. Obrigada pela companhia, pelas risadas, angústias compartilhadas e por toda ajuda no decorrer dos experimentos. Contem comigo sempre!

Ao Prof Raphael Queiroz, pela brilhante orientação, disponibilidade e por todos os ensinamentos que levarei comigo para sempre.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



AOS COLABORADORES

Foram imprescindíveis no desenvolvimento deste trabalho, desde já agradeço à:

- ✓ Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB);
- ✓ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado;
- ✓ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo ao Pesquisador do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro;
- ✓ Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação (PPGGBC);
- ✓ MSc Anny Carolinny, MSc Márcio Neri e Michele Santos;
- ✓ Profa Guadalupe Macedo e a equipe do Herbário/UESB;
- ✓ Profa Vanderlúcia Fonseca, seu aluno Lauro e a equipe do Laboratório de Produtos Naturais/UESB;
- ✓ Prof Daniel Bezerra e seus alunos Valdenizia e Luciano da FIOCRUZ/Salvador;
- ✓ Profa Milena Botelho e a equipe do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael (CBTC);
- ✓ Profa Regineide Xavier, Profa Gabriele Marisco e aluna Valdiele do Laboratório de Microbiologia/UESB;
- ✓ Profa Milena Soares e sua equipe da UFBA/Vitória da Conquista;
- ✓ Profa Flávia Carla Meotti do Instituto de Química da Universidade de São Paulo por viabilizar as análises de massas.



RESUMO

Macrolobium latifolium Vogel pertence à família Fabaceae e investigações etnofarmacológicas demonstraram que algumas espécies dessa família são utilizadas pela medicina popular no tratamento de doenças crônicas. Todavia, na literatura não há qualquer relato da atividade biológica e composição química de *M. latifolium*, que é amplamente distribuída no semiárido baiano. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a constituição química preliminar e algumas atividades biológicas da casca do caule de *Macrolobium latifolium* Vogel (Fabaceae). De maneira geral, a fração acetato de etila demonstrou o maior efeito antibacteriano em *S. aureus* (CIM=CBM=250 µg/mL), *S. epidermidis* (CIM=50 µg/mL e CBM=100 µg/mL), *K. pneumoniae* (CIM=CBM=100 µg/mL) e *P. mirabilis* (CIM=CBM=100 µg/mL) quando comparado com as demais frações. A proliferação de células tumorais HepG2, MCF7 e HCT116 também foi reduzida pela fração acetato de etila (IC₅₀ de 26,4, 19,9 e 22,1 µg/mL, respectivamente). Mais uma vez, esta fração foi a mais efetiva em reduzir os radicais DPPH• e ABTS•⁺ (IC₅₀ = 8,4 e 4,6 µg/mL, respectivamente) além de proteger macrófagos Raw 264.7 expostos ao H₂O₂ contra a morte, possivelmente devido à ativação da via do Nrf2. Os testes de fitoquímica clássica, seguido da análise por CLAE-EM/EM revelaram a presença de flavonoides do tipo quercetina e triterpenoides do tipo oleanano na fração acetato de etila, que podem estar associadas as atividades biológicas dessa planta. Em conclusão, este estudo demonstrou pela primeira vez que a casca do caule de *M. latifolium* possui propriedades biológicas diversas, o que a sugere como uma fonte em potencial de moléculas empregadas no tratamento de desordens infecciosas, tumorais e oxidativas.

Palavras-chaves: *Macrolobium latifolium*; Fabaceae; antioxidante; citoprotetora; antibacteriana; antiproliferativa, estudo fitoquímico.



ABSTRACT

Macrolobium latifolium Vogel belongs to Fabaceae family, and ethnopharmacological investigations have shown that some species from this family are used by folk medicine for treatment of chronic diseases. However, there is no report in the literature on biological activity and chemical composition of *M. latifolium*, which is widely distributed in Bahia semi-arid. In this context, our aim was to evaluate the preliminary chemical constitution and some biological activities of the stem bark from *Macrolobium latifolium* Vogel (Fabaceae). In general, the ethyl acetate fraction demonstrated the greatest antibacterial effect on *S. aureus* (CIM=CBM=250 $\mu\text{g/mL}$), *S. epidermidis* (CIM=50 $\mu\text{g/mL}$ and CBM=100 $\mu\text{g/mL}$), *K. pneumoniae* (CIM=CBM=100 $\mu\text{g/mL}$) and *P. mirabilis* (CIM=CBM=100 $\mu\text{g/mL}$) when compared among the other fractions. Furthermore, the proliferation of HepG2, MCF7 and HCT116 tumor cells was decreased by ethyl acetate fraction (IC_{50} = 26.4, 19.9 and 22.1 $\mu\text{g/mL}$, respectively). Again, this fraction was the most effective in reducing DPPH \bullet and ABTS \bullet^+ radicals (IC_{50} = 8.4 and 4.6 $\mu\text{g/mL}$, respectively) and protecting Raw 264.7 macrophages exposed to H_2O_2 against cell death, possibly due to Nrf2 pathway activation. The classical phytochemical tests, followed by analysis by LC-MS/MS revealed the presence of quercetin-type flavonoids and oleanane-type triterpenoids in this fraction, which may be associated with its biological activities. Taken together, this study demonstrated, for the first time, the diversity of biological properties from *M. latifolium* stem bark, indicating its therapeutic potential as source of molecules for treatment of infectious, carcinogenic and oxidative disorders.

Keywords: *Macrolobium latifolium*; Fabaceae; antioxidant; cytoprotective; antibacterial; antiproliferative, phytochemical study.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotografia da espécie *Macrolobium latifolium* Vogel (Fabaceae) ocorrente no Estado da Bahia, Brasil..... 20
- Figura 2.** Atividades citoprotetora (A), antioxidante (B) e indutora da hemeoxigenase (C) da fração acetato de etila da casca do caule de *M. latifolium* sobre macrófagos Raw 264.7. As células foram pré-tratadas com a fração nas concentrações de 25 e 50 µg/mL por 18 h. A atividade citoprotetora (A) foi avaliada pela determinação dos níveis de LDH no sobrenadante após adição de H₂O₂ (1 mM). Triton X-100 (1%) foi empregado como controle de lise total (100%). A atividade antioxidante (B) nas células pré-tratadas com a fração foi determinada pela oxidação da DCFH intracelular após adição de H₂O₂ (100 µM). A atividade da hemeoxigenase (C) foi estimada nas células pré-incubadas com as frações conforme descrito na Metodologia e expressa como pmol de bilirrubina/mg de proteína/hora. *p<0,05, quando comparados com controle por ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett's. 61
- Figura 3.** Cromatograma de íons (expandido) pela técnica de ionização (ESI) (modo negativo) da fração acetato de etila da casca do caule de *M. latifolium* em 210 nm. Os valores apresentados no cromatograma sob cada pico indica o tempo de retenção em minutos. 62
- Figura 4.** Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 469,00 (B) e 425,01 (C) identificados em 19,2 min. 63
- Figura 5.** Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 447,05 (B) e 497,13 (C) identificados em 21,3 min. 64
- Figura 6.** Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 301,00 (B) e 601,00 (C) identificados em 22,0 min. 65
- Figura 7.** Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 425,01 (B) e 851,04 (C) identificados em 24,4 min. 66
- Figura 8.** Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 423,00 (B) e 847,00 (C) identificados em 27,1 min. 67
- Figura 9.** Cromatograma de íons (expandido) pela técnica de ionização (ESI) (modo positivo) da fração acetato de etila da casca do caule de *M. latifolium* em 210 nm. Os valores apresentados no cromatograma sob cada pico indica o tempo de retenção em minutos.. 68
- Figura 10.** Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 471,02 (B) e 958,05 (C) identificados em 18,9 min. 69
- Figura 11.** Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 303,01 (B) e 320,04 (C) identificados em 21,7 min. 70

Figura 12. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 427,03 (B) e 870,07 (C) identificados em 24,0 min.	71
Figura 13. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 227,20 (B) e 249,18 (C) identificados em 43,3 min.	72
Figura 14. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 221,15 (B) e 243,13 (C) identificados em 47,7 min.	73
Figura 15S. Cromatograma de íons (expandido) pela técnica de ionização (ESI) (modo positivo) da fração butanólica da casca do caule de <i>M. latifolium</i> em 210 nm.	83
Figura 16S. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 471,01 (B) e 958,05 (C) identificados em 18,9 min.	84
Figura 17S. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 449,07 (B) e 914,16 (C) identificados em 20,9 min.	85
Figura 18S. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 303,01 (B) e 320,04 (C) identificados em 21,6 min.	86
Figura 19S. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 227,20 (B) e 249,18 (C) identificados em 43,2 min.	87
Figura 20S. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 221,15 (B) e 243,13 (C) identificados em 47,7 min.	88
Figura 21S. Cromatograma de íons (expandido) pela técnica de ionização (ESI) (modo positivo) da fase aquosa da casca do caule de <i>M. latifolium</i> em 210 nm.	89
Figura 22S. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 449,07 (B) e 914,16 (C) identificados em 20,8 min.	90
Figura 23S. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 227,20 (B) e 249,18 (C) identificados em 43,3 min.	91
Figura 24S. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 221,15 (B) e 243,14 (C) identificados em 47,6 min.	92
Figura 25S. Cromatograma de íons totais da fração hexânica. A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas das amostras com aqueles existentes no NIST versão 14.	93



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato e frações da casca do caule de <i>M. latifolium</i>	74
Tabela 2. Atividade antiproliferativa do extrato e frações da casca do caule de <i>M. latifolium</i> em linhagens de células tumorais e não tumoral	75
Tabela 3. Atividade antioxidante do extrato e frações da casca do caule de <i>M. latifolium</i>	76
Tabela 4. Testes de fitoquímica clássica do extrato e frações da casca do caule de <i>M. latifolium</i>	77
Tabela 5. Teor de fenólicos totais do extrato e frações da casca do caule de <i>M. latifolium</i>	78
Tabela 6. Tempos de retenção e fragmentos dos principais íons majoritários encontrados na fração acetato de etila de <i>M. latifolium</i> por CLAE-EM/EM no modo negativo e positivo	79
Tabela 7S. Tempos de retenção e fragmentos dos principais íons encontrados na casca do caule de <i>M. latifolium</i> por CLAE-EM/EM no modo positivo	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS - 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico);

BHI - Caldo de infusão de cérebro e coração, do inglês;

CBM - Concentração bactericida mínima;

CIM - Concentração inibitória mínima;

DCFH-DA - Diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína;

DMEM - Meio de Eagle Modificado de Dulbecco, do inglês;

DMSO - Dimetilsulfóxido;

DPPH• - radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila;

ESI - Ionização por electrospray;

EAG - Equivalentes de ácido gálico;

EBCML - Extrato bruto das cascas do caule de *M. latifolium*;

FHCML - Fração hexânica das cascas do caule de *M. latifolium*;

FAECML - Fração acetato de etila das cascas do caule de *M. latifolium*;

FBCML - Fração butanólica das cascas do caule de *M. latifolium*;

FaqCML - Fase aquosa das cascas do caule de *M. latifolium*;

Fiocruz - Fundação Osvaldo Cruz;

IARC - International Agency for Research on Cancer;

INCA - Instituto Nacional do Câncer;

CLAE-EM/EM - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas;

LDH - Lactato desidrogenase;

HCT116 - Células de carcinoma de cólon humano;

HepG2 - Células de carcinoma hepatocelular humano;

HO-1 - Heme-oxigenase-1;

HUESB - Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia;

MCF7 - Células de carcinoma de mama humano;

MCR5 - Células de fibroblasto humano;

MHz - Megahertz;

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio;

Nrf2 – Fator relacionado ao NFE2;

OMS - Organização Mundial de Saúde;

PBS - Tampão fosfato salino;



RNS - Espécies reativas de nitrogênio;

ROS - Espécies reativas de oxigênio;

RPMI 1640 - Meio desenvolvido por Roswell Park Memorial Institute;

UFR - Unidade de Fluorescência Relativa;

UV - Ultravioleta;

WHO - World Health Organization.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



LISTA DE SÍMBOLOS

- - Símbolo indicativo de radical;
- m/z - Razão massa carga;
- ϵ - Coeficiente de absorvidade;
- λ_{ex} - Comprimento de onda de excitação.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. A família Fabaceae	19
2.2. Propriedades biológicas da família Fabaceae	21
2.2.1. Atividade antibacteriana	21
2.2.2. Atividade antiproliferativa.....	22
2.2.3. Atividade antioxidante.....	24
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
Referências	27
1. Introdução.....	37
2. Material e métodos	38
2.1. Materiais	38
2.2. Coleta e extração.....	38
2.2.1. Material vegetal	39
2.2.2. Obtenção do extrato bruto e frações de <i>M. latifolium</i>	39
2.3. Atividades farmacológicas.....	39
2.3.1. Teste de susceptibilidade bacteriana.....	39
2.3.2. Atividade antiproliferativa.....	40
2.3.3. Atividade antioxidante.....	40
2.3.4. Avaliação da citoproteção	41
2.3.5. Determinação do estado redox intracelular dos macrófagos	41
2.3.6. Atividade da enzima heme oxigenase	42
2.3.7. Viabilidade celular.....	42



2.4. Estudo fitoquímico.....	42
2.4.1. Ensaios de fitoquímica clássica.....	42
2.4.2. Dosagem de “fenólicos totais”	43
2.4.3. CLAE-EM/EM	43
2.4.4. CG-EM	44
2.5. Análise Estatística.....	44
3. Resultados.....	45
4. Discussão	47
5. Conclusão	51
Referências	53
6. CONCLUSÕES GERAIS	81
APÊNDICE	82



1. INTRODUÇÃO

As plantas têm sido utilizadas desde a pré-história e o conhecimento sobre suas atividades terapêuticas foram se acumulando ao longo dos anos, perdurando até os tempos atuais. Durante séculos, as plantas medicinais representaram o único recurso terapêutico de inúmeras comunidades e, apesar de seus constituintes químicos serem desconhecidos, as experiências populares contribuíram para a disseminação das propriedades terapêuticas, pelos efeitos medicinais que esses vegetais produziam.

Com o aumento progressivo da indústria depois da Segunda Guerra Mundial, os “medicamentos vegetais” foram gradativamente substituídos por fármacos sintéticos nas farmácias. No entanto, apesar do crescente número de medicamentos sintéticos desenvolvidos nas últimas décadas, o interesse popular no uso de plantas medicinais para fins terapêuticos ainda permanece. Isso ocorre pelo interesse sobre estudos da biodiversidade, assim como o difícil acesso da população a fármacos sintéticos, sobretudo, em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

Apesar da importância atribuída às plantas, o seu potencial terapêutico ainda é pouco estudado. Sendo assim, estudos utilizando plantas medicinais continuam sendo uma alternativa importante na busca de novas estratégias terapêuticas, visto que o Brasil é detentor da maior biodiversidade do planeta, possuindo numerosas espécies com moléculas bioativas. Além disso, boa parte da flora brasileira ainda sequer foi estudada dos pontos de vista químico e farmacológico. Nesse contexto, as espécies da família Fabaceae são conhecidas devido ao alto conteúdo de moléculas com propriedades biológicas já confirmadas, embora a espécie *Macrobium latifolium*, objeto deste trabalho, ainda não possui quaisquer atividades biológicas descritas na literatura.

O estresse redox ocorre quando há um desequilíbrio entre a formação e a remoção de oxidantes e radicais livres em favor dos pró-oxidantes. Esse fenômeno tem papel crucial na patogênese de várias doenças crônicas, incluindo diabetes, câncer e distúrbios cardiovasculares. Em paralelo estão as doenças infecciosas, que ainda são grandes responsáveis pela mortalidade no Brasil e no mundo, devido ao uso indiscriminado dos antibacterianos e surgimento de cepas multirresistentes. Já no contexto do câncer, os fármacos antineoplásicos disponíveis clinicamente apresentam inúmeros efeitos colaterais e/ou são pouco eficientes contra alguns tumores. Em conjunto, esses fatos estimulam as pesquisas voltadas à descoberta de fármacos de origem natural com funções antioxidante, antibacteriana e antiproliferativa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A família Fabaceae

A família Fabaceae (*sensu lato*) = Leguminosae possui 751 gêneros e 19.500 espécies, incluída na ordem Fabales (Lpwg, 2013; Apg IV, 2016), apresenta distribuição cosmopolita, com centro de diversidade nos trópicos (Lewis, 1987). Ressalta-se que ainda existem controvérsias sobre a origem das leguminosas, todavia, registros fósseis descobertos na América do Norte, Europa, África e Ásia indicam o surgimento desse grupo de plantas há pelo menos 60 milhões de anos (Schrire et al., 2005). No Brasil ocorrem 222 gêneros e 2.807 espécies de leguminosas, sendo a família com maior riqueza de espécies nos biomas Amazônia e Caatinga (Bfg, 2015).

Tradicionalmente, Fabaceae é dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae. Fabaceae é uma família amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, e possui grande diversidade de formas e variados hábitos (Lewis et al., 2005). Essa é a terceira maior família de angiospermas, depois de Orchidaceae e Asteraceae. Em importância agrícola, é a segunda maior, depois de Poaceae (Judd et al., 1999; Lewis et al., 2005). Fisiologicamente, espécies de Fabaceae possuem variados compostos secundários de grande importância, como alcaloides que são amplamente utilizados por indústrias químicas, cosméticas e farmacêuticas (Souza e Lorenzi, 2008).

Os representantes de Fabaceae podem ser árvores de grande porte, arbustos, lianas, ervas anuais ou perenes. As folhas são geralmente alternas, compostas, com pulvino e estípulas persistentes ou caducas. As inflorescências geralmente são racemosas, com flores bissexuadas e diclamídeas, de prefloração imbricada ou valvar, ovário súpero, unicarpelar e unilocular, contendo um a numerosos óvulos em placentação marginal. Os frutos são legumes e derivações destes (drupa, sâmara, folículo, craspédio e lomento), deiscentes ou indeiscentes (Barroso et al., 1999; Lewis et al., 2005).

O gênero *Macrolobium* é o segundo mais representativo da tribo Detarieae *s.l.* pertencente à família Fabaceae, sendo exclusivamente neotropical, com cerca de 70-80 espécies arbóreas e arbustivas, que podem ser encontradas na América Central (Honduras, Costa Rica e Panamá) e, principalmente, na América do Sul (Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia), onde habitam às margens dos rios, igarapés, praias e florestas de terra firme. Só no Brasil, estima-se um total de 36 espécies e 26 variedades do gênero (Félix-da-Silva et al., 2013), e a bacia do alto rio Negro, na Amazônia brasileira, é considerada o centro de diversidade de *Macrolobium*, também conhecido como

arapari, araparirana, iperana, faveira ou ipê (Ducke, 1941). Esse gênero foi inicialmente estudado taxonomicamente por Bentham (1870), na “Flora Brasiliensis”, onde tratou de 15 espécies alocadas em duas seções: *Vouapa* Aubl. e *Outea* Aubl., incluindo a ilustração de quatro espécies. A revisão para espécies brasileiras de *Macrolobium* foi realizada por Ducke (1941), sendo composta por 29 espécies amazônicas, as quais foram mantidas nas seções propostas por Bentham (1870).

Macrolobium latifolium Vogel (Figura 1) é uma espécie endêmica na região litorânea da Bahia até o norte do Espírito Santo (Sambuichi et al., 2008), importante econômica e ecologicamente, sendo conhecida como óleo-comumbá, detentora de madeira própria para obras internas em construções civis, bem como para a produção de cabos de ferramentas e caixotaria. Além disso, ela é indicada para restauração de áreas degradadas por se adaptar a solos de baixa fertilidade (Sambuichi et al., 2009). A vegetação da *M. latifolium* é caracterizada como fanerófita e pode ser encontrada em áreas de floresta ombrófila, restinga arbórea e plantação de cacau (Sambuichi et al., 2008).



Figura 1. Fotografia da espécie *Macrolobium latifolium* Vogel (Fabaceae) ocorrente no Estado da Bahia, Brasil. Fonte: Popovkin et al., 2011.

Os estudos das propriedades biológicas do gênero *Macrolobium* são raros e no caso da espécie *M. latifolium* não há qualquer relato na literatura de sua farmacologia, aguçando a curiosidade científica em relação ao projeto proposto. Assim, estudos com espécies pouco conhecidas são fundamentais para a descoberta de propriedades químicas e biotecnológicas, principalmente com famílias e gêneros com amplo histórico de substâncias químicas e funções biológicas já identificadas (Barbosa et al., 2006).

2.2. Propriedades biológicas da família Fabaceae

As espécies da família Fabaceae são conhecidas devido ao alto conteúdo de flavonoides, cumarinas, ácidos fenólicos e taninos que estão associados as propriedades anti-inflamatória, antiviral, antitumoral, antibacteriana, anti-hemorrágica, hormonal e antioxidante dessas plantas (Simões et al., 2010).

2.2.1. Atividade antibacteriana

As doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortalidade mundial, sendo consideradas como grave problema de saúde coletiva devido ao impacto que geram à sociedade. Essa problemática, atrelada às altas taxas de resistência bacteriana, especialmente em ambientes hospitalares, justifica a urgência no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (Guimaraes et al., 2010).

As infecções são provocadas por bactérias patogênicas que invadem o organismo do hospedeiro, evitam ou limitam suas defesas e podem provocar danos aos tecidos (Guido et al., 2010). Atualmente, algumas dessas bactérias como *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente, *S. aureus* vancomicina-resistente, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* têm sido associados à alta letalidade e altos custos de tratamento, onerando os sistemas de saúde (Lipsky et al., 2014; Marquet et al., 2015).

Os antibacterianos são fármacos com capacidade de modificar o metabolismo bacteriano de diversas maneiras ao inibirem a síntese da parede celular, proteínas e ácidos nucléicos, além de interferir na integridade da membrana plasmática (Frieri et al., 2017). Devido ao aumento de casos de resistência bacteriana aos medicamentos clinicamente disponíveis, associado aos efeitos colaterais, a procura por moléculas isoladas de produtos naturais são uma alternativa para um terapia antimicrobiana mais eficaz e menos tóxica (Silva et al., 2008, Gonçalves et al., 2013, Figueredo et al., 2014).

Taninos e flavonoides são exemplos de fitoquímicos com propriedades antibacterianas presentes em plantas (Scalbert, 1991; Harbone, 2000; Veluri et al., 2004;

Bylka et al., 2004). Os extratos de *Newtonia buchananii* (Fabaceae), que são ricos em fenólicos, flavonóis, flavonoides, taninos e proantocianidinas, apresentaram um potente efeito antibacteriano contra *P. aeruginosa* (Motlhatlego et al., 2018). Também, extratos de *Erythrina stricta* (Fabaceae) ricos em flavonoides, terpenoides, esteroides, taninos, carboidratos e glicosídeos antraquinônicos foram muito eficientes em induzir a morte de *S. aureus* (Akter et al., 2016). Já as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram sensíveis às frações diclorometano e acetato de etila de *Pomaria sandersonii* (Fabaceae) (Muleya et al., 2015).

A combinação entre moléculas sintéticas com fitoquímicos pode expandir consideravelmente o espectro de ação do fármaco em questão, reduzir o aparecimento de resistência ou mesmo minimizar a toxicidade do fármaco sintético desde que ele seria empregado em menor dose (Chanda e Rakholiya, 2011). Na literatura, a associação de extratos e compostos isolados de plantas com cloranfenicol, canamicina, estreptomicina e ciprofloxacino contra bactérias gram-negativas resistentes (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia stuartii* e *Enterobacter cloacae*) apresentou sinergismo ou mesmo regenerou a capacidade antibacteriana de fármacos já ineficazes contra bactérias multirresistentes (Seukep et al., 2016).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um agente antibacteriano que é bacteriostático (impede o crescimento visível de bactérias). A CBM é a concentração mínima do composto que mata o inóculo, sendo determinada a partir da inoculação da bactéria pré-tratada com o produto em análise em meio de ágar sem antibióticos. Além disso, os agentes que perturbam a parede celular ou a membrana celular ou interferem com enzimas bacterianas essenciais, apresentando um CBM não mais do que quatro vezes o CIM, geralmente são considerados como bactericidas. Por outro lado, os agentes que inibem a função dos ribossomos e a síntese de proteínas, exibindo um CBM quarenta vezes maior que o CIM, são considerados como bacteriostáticos (French, 2006).

Obviamente, esses ensaios de determinação de susceptibilidade antibacteriana estão sujeitos às variações técnicas e têm limitações, apesar de serem extremamente relevantes para triagem inicial de compostos bacteriostáticos e/ou bactericidas (Pankey e Sabath, 2004; Pfaller et al., 2004; Levison, 2004). Por exemplo, as determinações de CIM e CBM são normalmente realizadas contra culturas em fase de crescimento logarítmico, enquanto que em infecções clínicas, os organismos podem crescer mais lentamente, onde nessas condições a atividade de alguns agentes pode ser reduzida ou perdida (Kim e Anthony, 1981; Eng et al., 1991).

2.2.2. Atividade antiproliferativa

Câncer é um termo genérico utilizado para designar um conjunto de doenças, as quais se caracterizam pela proliferação descontrolada de uma população de células do organismo. Essas células geralmente possuem capacidade de invadir tecidos adjacentes de maneira agressiva e sem controle (INCA, 2016; WHO, 2018).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 8 milhões de pessoas morrem por ano devido ao câncer, o que faz que esse conjunto de doenças represente uma das principais causas de morte no mundo. Ainda, estima-se que os novos casos anuais de câncer aumentem de 14 milhões, em 2012, para mais de 22 milhões nas próximas duas décadas (IARC, 2018). Somente para o Brasil, foram estimados cerca de 600 mil novos casos de câncer para o biênio de 2016-2017 (INCA, 2016).

O tratamento do câncer envolve três abordagens terapêuticas isoladas ou conjuntas, que são a quimioterapia, a radioterapia e a excisão cirúrgica, além de outras modalidades como imunoterapia e hormonioterapia (INCA, 2011). No entanto, embora tenha ocorrido progresso na terapia antineoplásica, muitos tumores ainda são de difícil remissão (Riva et al., 2012). Diante disso, a descoberta de antineoplásicos de fácil administração, maior eficácia e efeitos colaterais reduzidos é uma das principais metas dos pesquisadores da área (Costa-Lotufo et al., 2010).

Sendo assim, as plantas são consideradas como uma fonte efetiva de compostos antitumorais. Os alcaloides da vinca, vinblastina e vincristina, por exemplo, são referências no desenvolvimento de medicamentos anticancerígenos. O paclitaxel (Taxol®), isolado da *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), possui ação efetiva contra o câncer de mama, de ovário e de pulmão. O camptotecina isolado da *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae), apesar de entrar em desuso por causa da toxicidade apresentada na bexiga, contribuiu para o desenvolvimento do topotecano, utilizado atualmente no tratamento do câncer do pulmão e de ovário, e o irinotecano para câncer de colo-retal (Cragg e Newman, 2005).

Alguns exemplares da família Fabaceae também são detentores de atividade antitumoral. Conforme apontado por Masoko et al. (2010), que mostraram que células T de linhagem leucêmica (Jurkat) foram mortas por extrato acetônico das raízes de *Senna itálica*. Num estudo fitoquímico das partes aéreas de *Cassia italica* foi isolado um triterpeno com efeito citotóxico contra células de linfoma e de tumor cerebral em camundongos (Mohamed, 2014). Sowemimo et al. (2015) também demonstraram que o extrato das folhas de *Enterolobium cyclocarpum* apresentaram efeitos antiproliferativos *in vitro* contra células de carcinoma cervical e de mama, ao alterar o ciclo celular e, respectivamente, induzir apoptose. Os extratos de *Glycyrrhiza glabra* foram tóxicos contra células carcinoma cervical *in vitro* (Yaglioglu et al., 2015). Finalmente,

os extratos de vagens de *Acacia ligulata* mataram seletivamente células de melanoma *in vitro* (Jæger et al., 2018).

2.2.3. Atividade antioxidante

A oxirredução compreende um processo metabólico que ocasiona a produção de energia necessária para as atividades essenciais das células e resulta na produção de radicais livres (Roesler et al., 2007). Os radicais livres são espécies capazes de coexistir de forma independente com um ou mais elétrons desemparelhados na sua última camada. Devido a sua configuração, a maior parte dos radicais livres e oxidantes são reativos, instáveis e possuem meia vida curta, tornando-os doadores ou aceptores de elétrons (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Essas espécies são genericamente classificadas como espécies reativas do oxigênio (ROS) e espécies reativas do nitrogênio (RNS), que em baixas concentrações são importantes na sinalização em vias redox sensíveis e manutenção da homeostase celular. Contudo, em altas concentrações podem conduzir ao estresse redox por modificar irreversivelmente biomoléculas (Augusto, 2006; Winterbourn, 2014).

O estresse redox é o nome dado ao desequilíbrio na produção e remoção dessas espécies, que resulta em um desarranjo na sinalização celular, controle redox e dano molecular. O estresse redox moderado pode levar às respostas adaptativas, todavia, quando em alta intensidade ou mantido por longos períodos estar associado com o envelhecimento e o desenvolvimento de doenças metabólicas, cardiovasculares e neurodegenerativas, embora ainda não se saiba exatamente se são causa ou consequência do processo (fisiopatológico) (Gan e Johnson, 2014; Bhat et al., 2015).

Apesar dos organismos aeróbicos possuírem um aparato enzimático e não-enzimático para diminuir os danos causados por essas espécies, frequentemente as moléculas obtidas da dieta são requeridas para auxiliar nesse processo. Essas moléculas exógenas podem prevenir, impedir, reparar ou reduzir o dano oxidativo inicialmente por captarem os elétrons desemparelhados dos radicais livres ou reagir com as moléculas oxidantes (Cerqueira et al., 2007).

No entanto, a literatura atual aponta que os efeitos dos antioxidantes exógenos vão além de simples captadores de radicais quando na verdade eles atuam como inibidores enzimáticos da xantina oxidase, lipoxigenase e NADPH oxidase (Oršolić et al., 2011; Oršolić e Car, 2014; Sirovina et al., 2013), ativadores de vias citoprotetoras como aquela do Nrf2 (Huang et al., 2015; Silva-Palacios et al., 2016) ou indutores de morte celular com ativação da via das caspases (Kang et al., 2017). Os flavonoides, taninos e outras substâncias fenólicas, por

exemplo, são clássicos representantes de moléculas que atuam como antioxidantes preponderantemente por vias não-clássicas (Pandey et al., 2010; Agostini-Costa et al., 2015; Zhang et al., 2015).

Os sistemas antioxidantes enzimáticos são importantes na defesa intracelular devido a alta eficiência e variedade de reações que podem catalizar, a exemplo das enzimas superóxido dismutase, peroxiredoxinas, glutatona peroxidase e catalase. Outras enzimas como a heme oxigenase-1 (HO-1), NAD(P)H desidrogenase[quinona]1, subunidade catalítica da glutamato-cisteína ligase e subunidade reguladora da ligase glutamato-cisteína complementam o aparato antioxidante intracelular ao atuarem por vias de metabolismo de fase II (Kim e Jang, 2014).

Há alguns anos foi demonstrado que a expressão de todas essas enzimas estão relacionadas à ativação do fator relacionado à transcrição do fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) (Kim e Jang, 2014). Em condições fisiológicas, o Nrf2 é sequestrado no citoplasma por ligação à proteína 1 associada à ECH do tipo Kelch (Keap1), que por ubiquitinação promove a proteólise da proteína. Quando Keap1 é oxidado nos tióis ou modificado por fitoquímicos, por exemplo, ocorre uma mudança conformacional e, conseqüentemente, a liberação do Nrf2 que se transloca ao núcleo. No núcleo, esse fator de transcrição se liga aos elementos de resposta antioxidante nas regiões promotoras de genes antioxidantes e citoprotetores (Taguhi et al., 2011). Adicionalmente, a proteína quinase ativada por mitógeno, a fosfatidilinositol 3-quinase e a proteína quinase C também estimulam a via do Nrf2 por fosforilação (Itoh et al., 2004; Baird e Dinkova-Kostova, 2011).

Na literatura ainda são incipientes os trabalhos envolvendo o papel de plantas da família Fabaceae sobre a via do Nrf2. Contudo, Adesso et al. (2018) demonstraram recentemente que o extrato de um membro dessa família, *Astragalus membranaceus*, estimulou a translocação nuclear do Nrf2 e induziu a expressão de HO-1 e NQO1 e, conseqüentemente, agiu de forma significativa como antioxidante em células epiteliais intestinais. As frações de cloreto de metileno/metanol e metanólica de *Entada africana* (Fabaceae) apresentou altas atividades antioxidante e citoprotetora sobre hepatócitos de cultura humanos por também estimular a via do Nrf2 (Njayou et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a constituição química e as atividades biológicas da casca do caule de *Macrolobium latifolium* Vogel (Fabaceae).

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Preparar o extrato bruto da casca do caule de *M. latifolium* e fracioná-lo por partição líquido-líquido;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de *M. latifolium* pelos métodos de sequestro do radical livre DPPH[•], sequestro do radical livre ABTS^{•+} e pelo sistema da inibição da auto oxidação do β -caroteno;
- ✓ Investigar o efeito de *M. latifolium* sobre a viabilidade celular em macrófagos Raw 264.7;
- ✓ Investigar o efeito de *M. latifolium* sobre o dano oxidativo causado pelo H₂O₂ sob macrófagos Raw 264.7;
- ✓ Avaliar o efeito de *M. latifolium* sobre o estado redox intracelular sobre macrófagos Raw 264.7 tratados com H₂O₂;
- ✓ Investigar o efeito de *M. latifolium* sobre a via do Nrf2/Keap1 em macrófagos Raw 264.7;
- ✓ Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de *M. latifolium* contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*;
- ✓ Avaliar o potencial antiproliferativo *in vitro* de *M. latifolium* sobre células tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), células MCF7 (carcinoma de mama humano) e HCT116 (carcinoma de cólon humano);
- ✓ Determinar o perfil fitoquímico preliminar de *M. latifolium* por métodos qualitativos de fitoquímica clássica, CLAE-EM/EM e CG-EM.

Referências

ADESSO, S.; RUSSO, R.; QUARONI, A.; AUTORE, G.; MARZOCCO, S. 2018. *Astragalus membranaceus* Extract Attenuates Inflammation and Oxidative Stress in Intestinal Epithelial Cells via NF- κ B Activation and Nrf2 Response. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 3, p. 1-14.

AGOSTINI-COSTA, TS.; TEODORO, AFP.; ALVES, RBN.; BRAGA, LR.; RIBEIRO, IF.; SILVA, JP.; QUINTANA, LG.; BURLE, ML. 2015. Total phenolics, flavonoids, tannins and antioxidant activity of lima beans conserved in a Brazilian Genebank. *Ciência Rural*, vol, 45, no. 2, p. 335-341.

AKTER, K.; BARNES, EC.; LOA-KUM-CHEUNG, WL.; YIN, P.; KICHU, M.; BROPHY, JJ.; BARROW, RA.; IMCHEN, I.; VEMULPAD, SR.; JAMIE, JF. 2016. Antimicrobial and antioxidant activity and chemical characterisation of *Erythrina stricta* Roxb. (Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 185, p. 171-81.

APG IV. 2016. The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. The Linnean Society of London, *Botanical Journal of the Linnean Society*, vol. 181: p. 1-20.

AUGUSTO, O. 2006. *Radicais Livres: Bons, maus e naturais*, Oficina de Textos: São Paulo.

BAIRD, L.; DINKOVA-KOSTOVA, AT. 2011. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Archives of Toxicology*, vol. 85, p. 241–272.

BARBOSA, AP.; PALMEIRA, RCF.; NASCIMENTO, CS.; FEITOZA, DS.; CUNHA, MSC. 2006. Leguminosas Florestais da Amazônia Central. I. Prospecção das Classes de Compostos Presentes na Casca de Espécies Arbóreas. *Revista Fitos*, vol. 1, p. 47-57.

BARROSO, GM.; MORIM, MP.; PEIXOTO, AL.; ICHASO, CLF. 1999. Leguminosae. In: *frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas*. UFV, Viçosa. p. 186

BENTHAM, G. 1870. Leguminosae II et III: Swartzieae, Caesalpinieae, Mimoseae. *Flora Brasiliensis*, vol. 15, p. 217-224.

BFG. 2015. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, vol. 66, no. 4, p. 1085-1113.

BHAT, AH.; DAR, KB.; ANEES, S.; ZARGAR, MA.; MASOOD, A.; SOFI, MA.; GANIE, SA. 2015. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 74, p. 101–110.

BYLKA, W.; MATLAWSKA, I.; PILEWSKI, NA. 2004. Natural flavonoids as antimicrobial agents. *The American Nutraceutical Association*, vol. 7, p. 24-31.

CERQUEIRA, FM.; MEDEIROS, MHG.; AUGUSTO, O. 2007. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, vol. 30, no. 2, p. 441-449.

CERQUEIRA, MD.; SOUZA-NETA, L.; PASSOS, MGVM.; LIMA, EO.; ROQUE, NF.; MARTINS, D.; GUEDES, MLS.; CRUZ, FG. 2007. Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 18, p. 998-1003.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. 2011. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, vol. 1, no. 13, p. 520-529.

COSTA-LOTUFO, LV.; MONTENEGRO, RC.; ALVES, APNN.; MADEIRA, SVF.; PESSOA, C.; MORAES, MEA.; MORAES, MOA. 2010. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual de Química*, vol. 2, no. 1, p. 47-58.

CRAGG, GM.; NEWMAN, DJ. 2005. Plants as a source of anti-cancer agentes. *Journal of Ethnopharmacology*, vol.100, p.72-79.

DUCKE A. 1941. Revision of the *Macrobium* species of the Amazonian Hylaea. *Tropical Woods*, vol. 65, p. 21-31.

ENG, RH.; PADBERG, FT.; SMITH, SM.; TAN, EN.; CHERUBIN, CE. 1991. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 35, p.1824-1828.

FÉLIX-DA-SILVA, MM.; BASTOS, MNC.; GURGEL, ESC. 2013. *Macrobium* Schreb. (Leguminosae, Caesalpinioideae) na Floresta Nacional de Caxiuanã, Pará, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Ciências Naturais*, vol. 8, p. 75–93.

FIGUEREDO, CA.; GURGEL, IGD.; JUNIOR, GG. 2014. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. *Physis: Revista de Saúde Coletiva*, vol. 24, no. 2, p. 381–400.

FRENCH, GL. 2006. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections-the potential role of daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 58, p.1107-1117.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. 2017. Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, vol. 10, no. 4, p. 369-378.

GAN, L.; JOHNSON, JA. 2014. Oxidative damage and the Nrf2- ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1842, p. 1208–1218.

GONÇALVES, NT.; VILA, MC.; GERENUTTI, M.; CHAVES, DA. 2013. Políticas de Saúde para a Fitoterapia no Brasil. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol. 18, no. 4, p. 632–637.

GUIDO, R. C., ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. 2010. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos Avançados*, vol. 24, no. 7, p. 81-98.

GUIMARAES, DO.; MOMESSO, LS.; PUPO, MT. 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, vol. 33, no. 3, p. 667-679.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, JMC. 2015. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.

HARBORNE, JB.; WILLIAMS, CA. 2000. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*, vol. 55, p. 481-504.

HUANG, Y.; LI, W.; SU, ZY.; KONG, AN. 2015. The complexity of the Nrf2 pathway: Beyond the antioxidant response. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 26, p. 1401–1413.

IARC. 2018. *Globocan: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. Disponível em <http://glocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx> Acesso em: 15 de maio de 2018.

INCA, Brasil. 2011. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Incidência de Câncer no Brasil. Estimativa 2012: Rio de Janeiro, p.26. Acesso em: 15 de maio de 2018.

INCA, Brasil. 2016. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Incidência de câncer no Brasil: Estimativa 2016. Rio de Janeiro. Acesso em: 15 de maio de 2018.

ITOH, K.; TONG, KI.; YAMAMOTO, M. 2004. Molecular mechanism activation of Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 36, p. 1208–1213.

JÄGER, D.; SIMPSON, BS.; NDI, C.P.; JÄGER, A.K.; CROCOLL, C.; MØLLER, B.L.; WEINSTEIN, P.; SEMPLE, S.J. 2017. Biological activity and LC-MS/MS profiling of extracts from the Australian medicinal plant *Acacia ligulata* (Fabaceae). *Natural Product Research*, vol. 32, no. 5, p. 576-581.

JUDD, WS.; CAMPBELL, CS.; KELLOGG, EA.; STEVENS, PF.; DONOGHUE, MJ. 2009. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. 3 ed., Artmed, Porto Alegre.

KANG, KA.; PIAO, MJ.; RYU, YS.; HYUN, YJ.; PARK, JE.; SHILNIKOVA, K.; ZHEN, AX.; KANG, HK.; KOH, YS.; JEONG, YJ.; HYUN, JW. 2017. Luteolin induces apoptotic cell death via antioxidant activity in human colon cancer cells. *International Journal of Oncology*, vol. 51, no. 4, p. 1169-1178.

KIM, JK.; JANG, HD. 2014. Nrf2-mediated HO-1 induction coupled with the ERK signaling pathway contributes to indirect antioxidant capacity of caffeic acid phenethyl ester in HepG2 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15, p. 12149–12156.

KIM, KS.; ANTHONY, BF. 1981. Importance of bacterial growth phase in determining minimal bactericidal concentrations of penicillin and methicillin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 19, p. 1075-1077.

LEVISON, ME. 2004. Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. *Infectious Disease Clinics of North America*, vol. 18, p. 451-65.

LEWIS, GP. 1987. *Legumes of Bahia*. Kew, Royal Botanic Garden. 369p.

LEWIS, GP.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, DB., LOCK, M. 2005. *Legumes of the world*. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 1-577.

LIPSKY, BA.; NAPOLITANO, LM.; MORAN, GJ.; VO, L.; NICHOLSON, S.; CHEN, S.; BOULANGER, L.; KIM, M. 2014. Economic outcomes of inappropriate initial antibiotic treatment for complicated skin and soft tissue infections: a multicenter prospective observational study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 79, p. 266–272.

LPWG. 2013. The Legume Phylogeny Working Group. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon*, vol. 62, p. 217–248.

MARQUET, K.; LIESENBORGS, A.; BERGS, J.; VLEUGELS, A.; CLAES, N. 2015. Incidence and outcome of inappropriate in-hospital empiric antibiotics for severe infection: a systematic review and meta-analysis. *Critical Care*, vol. 19, no. 1, p. 63.

MASOKO, P.; GOLOLO, S.; MOKGOTHO, M.; ELOFF, J.; HOWARD, R.; MAMPURU, L. 2010. Evaluation of the Antioxidant, Antibacterial, and Antiproliferative Activities of the Acetone Extract of the Roots of *Senna Italica* (Fabaceae). *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, vol. 7, no. 2, p. 138–148.

MOHAMED. GA. 2014. New cytotoxic cycloartane triterpene from *Cassia italica* aerial parts. *Natural Product Research*, vol. 28, no. 13, p. 976-983.

MOTLHATLEGO, KE.; MFOTIYE NJOYA, E.; ABDALLA, MA.; ELOFF, JN.; MCGAW, LJ. 2018. The potential use of leaf extracts of two *Newtonia* (Fabaceae) species to treat diarrhoea. *South African Journal of Botany*, vol. 116, p. 25–33.

MULEYA, E.; AHMED, AS.; SIPAMLA, AM.; MTUNZI, FM.; MUTATU, W. 2015. Pharmacological properties of *Pomaria sandersonii*, *Pentanisia prunelloides* and *Alepidea amatymbica* extracts using in vitro assays. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, vol. 7, p. 1-8.

NJAYOU, FN.; AMOUGOU, AM.; FOUEMENE TSAYEM, R.; NJIKAM MANJIA, J.; RUDRAIAH, S.; BRADLEY, B.; MANAUTOU, JE.; FEWOU MOUNDIPA, P. 2015. Antioxidant fractions of *Khaya grandifoliola* C. DC. and *Entada africana* Guill. et Perr. induce nuclear translocation of Nrf2 in HC-04 cells. *Cell Stress and Chaperones*, vol. 20, p. 991–1000.

ORŠOLIĆ, N.; CAR, N. 2014. Quercetin and hyperthermia modulate cisplatin-induced DNA damage in tumor and normal tissues in vivo. *Tumour Biology*, vol. 35, no. 7, p. 6445–6454.

ORŠOLIĆ, N.; GAJSKI, G.; GARAJ-VRHOVAC, V.; DIKIĆ, D.; PRSKALO, ZŠ.; SIROVINA, D. 2011. DNA-protective effects of quercetin or naringenin in alloxan-induced diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*, vol. 656, no. 1-3, p. 110–118.

PANDEY, S.; SAH, SP.; SAH, ML.; MISHRA, D. 2010. An antioxidant potential of hydromethanolic extract of *Urtica parviflora* Roxb. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, vol. 1, p. 191-195.

PANKEY, GA.; SABATH, LD. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 38, p. 864-870.

PFALLER, MA.; SHEEHAN, DJ.; REX, JH. 2004. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 17, p. 268-80.

POPOVKIN, AV.; MATHEWS, KG.; SANTOS, JCM.; MOLINA, MC.; STRUWE, L. 2011. *Spigelia genuflexa* (Loganiaceae), a new geocarpic species from the Atlantic forest of northeastern Bahia, Brazil. *PhytoKeys*, vol. 6, p. 47–65.

RIVA, D.; BARISON, A.; STEFANELLO, MEA.; POLIQUESI, CB.; RUIZ, ALTG.; CARVALHO, JE.; SALVADOR, MJ. 2012. Estudo químico de *Sinningia allagophylla* guiado por testes de atividade antiproliferativa. *Química Nova*, vol. 35, no. 5, p. 974-977.

ROESLER, R.; MALTA, LG.; CARRASCO, LC.; HOLANDA, RB.; SOUSA, CAS.; PASTORE, GM. 2007. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 27, no.1, p. 53-60.

SAMBUICHI, RHR.; MIELKE, MS.; PEREIRA, CE. (orgs.). 2009. *Nossas árvores: conservação, uso e manejo de árvores nativas no Sul da Bahia*, 1.ed. Ilhéus: Editora da UESC, p.229.

SAMBUICHI, RHR.; OLIVEIRA, RM.; NETO, EM.; OLIVEIRA, RL.; DE PELIÇÃO, MC.; THÉVENIN, JMR.; JÚNIOR, CPJ. 2008. Status de conservação de dez árvores endêmicas da Floresta Atlântica do sul da Bahia - Brasil. *Natureza & Conservação*, vol. 6, p. 90-108.

SCALBERT, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, vol. 30, no. 12, p. 3875-3883.

SCHRIRE, BD.; LEWIS, GP.; LAVIN, M. 2005. Biogeography of the Leguminosae. *In*: Lewis, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (eds.). Legumes of the world. Kew Royal Botanic Garden, Kew. p. 21-39.

SEUKEP, JA.; SANDJO, LP.; NGADJUI, BT.; KUETE, V. 2016. Antibacterial and antibiotic-resistance modifying activity of the extracts and compounds from *Nauclea pobeguinii* against Gram-negative multi-drug resistant phenotypes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 16, p. 193.

SILVA, MA.; SILVA, MR.; HIGINO, JS.; PEREIRA, MV.; CARVALHO, AT. 2008. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 18, no. 2, p. 236–240.

SILVA-PALACIOS, A.; KÖNIGSBERG, M.; ZAZUETA, C. 2016. Nrf2 signaling and redox homeostasis in the aging heart: A potential target to prevent cardiovascular diseases? *Ageing Research Reviews*, vol. 26, p. 81–95. 2016

SIMÕES, CMO.; SCHENKEL, EP.; GOSMANN, G.; MELLO, JCP.; MENTZ, LA.; PETROVICK, PR. 2010. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS. Porto Alegre.

SIROVINA, D.; ORŠOLIĆ, N.; ZOVKO KONČIĆ, M.; KOVAČEVIĆ, G.; BENKOVIĆ, V.; GREGOROVIĆ, G. 2013. Quercetin vs chrysin: Effect on liver histopathology in diabetic mice. *Human & Experimental Toxicology*, vol. 32, p. 1058–1066.

SOARES, SE. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, vol. 15, no. 1, p. 71-81.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. 2008. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2 ed. São Paulo: Nova Odessa.

SOWEMIMO, A.; VENABLES, L.; ODEDEJI, M.; KOEKEMOER, T.; VAN DE VENTER, M.; HONGBING, L. 2015. Antiproliferative mechanism of the methanolic extract of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. (Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 159, p. 257-261.

TAGUHI, K.; MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. 2011. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells*, vol. 16, p. 123–140.

VELURI, R.; WEIR, TL.; BAIS, HP.; STERMITZ, FR.; VIVANCO, JM. 2004. Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, p. 1077-1082.

WHO. Cancer: Factsheets. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> Acesso em: 15 maio de 2018.

WINTERBOURN, CC. 2014. The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1840, p. 730-738.

YAGLIOGLU, AS.; ESER, F.; TEKIN, S.; ONAL, A. 2015. Antiproliferative activities of several plant extracts from Turkey on rat brain tumor and human cervix carcinoma cell lines. *Frontiers in Life Science*, vol. 9, no. 1, p. 69-74.

ZHANG, B.; CAI, J.; DUAN, C-Q.; REEVES, MJ.; HE, F. 2015. A Review of Polyphenolics in Oak Woods. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, no. 4, p. 6978–7014.

Artigo a ser submetido à revista Saudi Pharmaceutical Journal.

Atividades antibacteriana, antiproliferativa e antioxidante e análise por CLAE-EM/EM da casca do caule de *Macrolobium latifolium* Vogel (Fabaceae)

Camilla Martins dos Santos Ferraz^a, Michele de Jesus Santos^b, Milena Botelho Pereira Soares^{c,d}, Daniel Pereira Bezerra^c, Valdenizia Rodrigues Silva^c, Luciano de Souza Santos^c, Guadalupe Edilma Licon de Macedo^a, Vanderlúcia Fonseca de Paula^b, Raphael Ferreira Queiroz^{e,f*}

^aDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, Brasil.

^bDepartamento de Química e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, Brasil.

^cInstituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brasil.

^dCentro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Salvador, Brasil.

^eDepartamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil.

^fPrograma Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil.

***Autor Correspondente**

Prof Dr Raphael Ferreira Queiroz: Professor de Bioquímica, Departamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil.

Email: rfqueiroz@uesb.edu.br

Resumo

Macrolobium latifolium Vogel pertence à família Fabaceae e investigações etnofarmacológicas demonstraram que algumas espécies dessa família são utilizadas pela medicina popular no tratamento de doenças crônicas. Todavia, na literatura não há qualquer relato da atividade biológica e composição química de *M. latifolium*, que é amplamente distribuída no semiárido baiano. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a constituição química preliminar e algumas atividades biológicas da casca do caule de *Macrolobium latifolium* Vogel (Fabaceae). De maneira geral, a fração acetato de etila demonstrou o maior efeito antibacteriano em *S. aureus* (CIM=CBM=250 µg/mL), *S. epidermidis* (CIM=50 µg/mL e CBM=100 µg/mL), *K. pneumoniae* (CIM=CBM=100 µg/mL) e *P. mirabilis* (CIM=CBM=100 µg/mL) quando comparado com as demais frações. A proliferação de células tumorais HepG2, MCF7 e HCT116 também foi reduzida pela fração acetato de etila (IC₅₀ de 26,4, 19,9 e 22,1 µg/mL, respectivamente). Mais uma vez, esta fração foi a mais efetiva em reduzir os radicais DPPH• e ABTS•⁺ (IC₅₀ = 8,4 e 4,6 µg/mL, respectivamente) além de proteger macrófagos Raw 264.7 expostos ao H₂O₂ contra a morte, possivelmente devido à ativação da via do Nrf2. Os testes de fitoquímica clássica, seguido da análise por CLAE-EM/EM revelaram a presença de flavonoides do tipo quercetina e triterpenoides do tipo oleanano na fração acetato de etila, que podem estar associadas as atividades biológicas dessa planta. Em conclusão, este estudo demonstrou pela primeira vez que a casca do caule de *M. latifolium* possui propriedades biológicas diversas, o que a sugere como uma fonte em potencial de moléculas empregadas no tratamento de desordens infecciosas, tumorais e oxidativas.

Palavras-chaves: *Macrolobium latifolium*; Fabaceae; antioxidante; citoprotetora; antibacteriana; antiproliferativa, estudo fitoquímico.

1. Introdução

A família Fabaceae = Leguminosae é a terceira maior família de plantas do mundo dentro das Angiospermas, com 751 gêneros e 19.500 espécies (LPWG, 2013), amplamente distribuídas nas regiões tropicais (Gentry et al., 1988). As espécies da família Fabaceae são particularmente ricas em flavonoides e compostos biossinteticamente relacionados, como rotenoides e isoflavonoides. Alcaloides, terpenoides e esteroides são exemplos de outras classes de substâncias que ocorrem em muitos exemplares da família (Rocha e Silva et al., 2007). Essa diversidade química pode justificar as propriedades farmacológicas e terapêuticas de algumas espécies da família na medicina popular (Zakaria et al., 2009; Mikaeili et al., 2012; Santana et al., 2015; Ahmad et al., 2016).

O gênero *Macrolobium* é o segundo mais representativo da tribo Detarieae *s.l.* pertencente à família Fabaceae, sendo exclusivamente neotropical, com cerca de 70-80 espécies, que podem ser encontradas nas regiões da América Central e na América do Sul. A bacia do alto rio Negro, na Amazônia brasileira, é considerada o centro de diversidade de *Macrolobium*. No Brasil, estima-se que existam cerca de 36 espécies de *Macrolobium* (Félix-da-Silva et al., 2013).

Macrolobium latifolium Vogel é uma espécie endêmica na região litorânea da Bahia até o norte do Espírito Santo (Sambuichi et al., 2008), podendo ser encontrada em áreas de floresta ombrófila, restinga arbórea e plantação de cacau (Sambuichi et al., 2015). Essa espécie é econômica e ecologicamente importante, tanto no fornecimento de madeira própria em construções civis, quanto na restauração de áreas degradadas uma vez que se adaptam a solos de baixa fertilidade (Sambuichi et al., 2009). Todavia, na literatura não há qualquer relato sobre as propriedades biológicas ou composição química dessa espécie.

As doenças infecciosas são importantes no contexto da saúde pública, pois causam mais de 7,7 milhões de mortes em todo o mundo (OMS, 2017). Esses números alarmantes estão associados frequentemente ao surgimento de cepas bacterianas resistentes ao tratamento convencional. Além disso, muitos antibióticos disponíveis clinicamente apresentam muitos efeitos colaterais que limitam o uso desses fármacos e/ou adesão pelo paciente. Por essa razão, as grandes indústrias farmacêuticas estão interessadas no desenvolvimento de novos compostos com propriedades antimicrobianas e menor toxicidade (Fernandes e Martens, 2017).

O câncer é o nome genérico de mais de 200 doenças, cujas células normalmente são mais proliferativas que no estado normal e, em certas situações, tornam-se invasivas. Estima-se para o ano de 2030, 21,4 milhões de casos incidentes, 13,2 milhões de mortes e 75 milhões de

peças vivas com câncer (Mendes e Vasconcellos, 2015). Os produtos naturais e/ou fitoquímicos isolados de plantas são fontes em potencial para descoberta e desenvolvimento de fármacos anticâncer, sendo que mais de 50% dos compostos isolados de produtos naturais se mostraram eficientes em diversos ensaios (Newman e Cragg, 2016).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) são produzidas fisiologicamente e possuem importante papel na defesa e sinalização intracelular (Augusto, 2006; Winterbourn, 2014). Em excesso, essas espécies podem reagir com macromoléculas endógenas, alterar suas funções, e se relacionarem com o desenvolvimento de diversas patologias com base inflamatória, como câncer, aterosclerose, artrite e doenças neurodegenerativas (Kohen e Nyska, 2002; Niki, 2010).

Diante das evidências expostas acima, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil fitoquímico e as atividades antibacteriana, antiproliferativa e antioxidante da casca do caule de *Macrolobium latifolium* Vogel (Fabaceae) de modo a contribuir com a valoração do biodiversidade local e caracterização da espécie no intuito de futuramente se tornar fonte de moléculas potencialmente úteis na produção de medicamentos alternativos.

2. Material e métodos

2.1. Materiais

Acetato de etila, álcool etílico, hexano, metanol, clorofórmio e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Quemis. Ágar Müller-Hinton e caldo BHI (Brain heart infusion) foram comprados da Merck e Neogen, respectivamente. As cepas bacterianas foram gentilmente cedidas pelas Profas Dras Milena Soares dos Santos (Universidade Federal da Bahia) e Regineide Xavier Santos (Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia), Vitória da Conquista, BA, Brasil. Ceftriaxona, penicilina, estreptomicina, resazurina, triton X-100, cloreto de sódio, reagente de Folin Ciocalteau, DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico), β -caroteno, ácido linoleico, persulfato de potássio, Tween 40, sílica, ácido gálico, RPMI 1640, DMEM, soro bovino fetal, tripsina, cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato dissódico, fosfato monopotássico e DCFH-DA foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O kit LDH Liquiform foi comprado da Labtest. As células tumorais (HepG2, MCF7 e HCT116) e não tumorais (MCR5) foram doadas pelo Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil.

2.2. Coleta e extração

2.2.1. Material vegetal

A planta foi coletada na cidade de Itamarí (13° 46' 42" Sul, 39° 41' 24" Oeste) em julho de 2015, sob autorização de acesso do CNPq (010557/2015-6), e uma exsicata foi depositada no Herbário da UESB (HUESB 12023), cuja identidade foi confirmada pela Profa Dra Guadalupe Licona Macedo.

2.2.2. Obtenção do extrato bruto e frações de *M. latifolium*

As cascas do caule foram secas, posteriormente trituradas e submetidas a extensiva extração por maceração à frio em etanol P.A. (96%). O extrato obtido foi filtrado e concentrado em rotaevaporador até completa evaporação do solvente.

O extrato bruto da casca do caule de *M. latifolium* foi submetido à partição líquido-líquido com os solventes hexano, acetato de etila e butanol, em ordem crescente de polaridade. Em seguida essas frações foram coletadas e secas. Antes dos ensaios, o extrato e frações foram ressuspensos em etanol na concentração de 20 mg/mL.

2.3. Atividades farmacológicas

2.3.1. Teste de susceptibilidade bacteriana

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato e frações da casca do caule de *M. latifolium* frente as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25921, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Proteus mirabilis* ATCC 17407 foram determinados pelo método de microdiluição em caldo conforme descrito por Santos et al. (2017). As cepas bacterianas foram expandidas em caldo BHI por 24 h a 37 °C. Em seguida, as suspensões bacterianas foram diluídas em novo caldo até uma absorbância de 0,09 a 0,1, em 625 nm. Essas suspensões bacterianas foram então diluídas 200 vezes em caldo BHI estéril.

As bactérias (5×10^5 UFC/mL) foram então incubadas com o extrato ou frações em concentrações variadas (25 a 1000 µg/mL) num volume final de 200 µL. Após incubação por 24 h a 37°C, 60 µL do corante resazurina (0,01%) foi adicionado à suspensão e a CIM foi considerada a menor concentração na qual não houve crescimento bacteriano visível (cor azul) após 30 min. Na determinação da CBM, 10 µL da suspensão bacteriana pré-incubados com os extratos ou frações foram plaqueados em ágar Muller-Hinton a 37 °C por 24 h. A CBM foi considerada a concentração onde não houve evidência de crescimento bacteriano na superfície do meio de cultura (Cabral et al., 2009). O etanol foi empregado como controle negativo.

2.3.2. Atividade antiproliferativa

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril na concentração de 10 mg/mL. As células tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), células MCF7 (carcinoma de mama humano) e HCT116 (carcinoma de cólon humano) e não tumorais MCR5 (células de fibroblasto humano) foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL) em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. A citotoxicidade do extrato e frações foi avaliada pelo o ensaio do Alamar blue (O'brien et al., 2000). Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (100 µL/poço de uma suspensão de 7 x 10⁴ células/mL) e, após 24 h de crescimento, as amostras dissolvidas em DMSO foram adicionadas em cada poço na concentração de 50 µg/mL e incubadas por 72 h. Quatro horas antes do final do período de incubação, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de resazurina foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) em leitora de placa (Ahmed et al., 1994). A doxorrubicina (pureza ≥ 95%, cloridrato de doxorrubicina, Laboratório IMA) foi utilizado como o controle positivo (0,08-5 µg/mL), já o controle negativo recebeu o mesmo volume em DMSO. As amostras que inibiram ≥ 70% a proliferação celular na concentração de 50 µg/mL tiveram os valores de IC₅₀ calculados em concentrações que variaram de 0,19-50 µg/mL. Os valores de IC₅₀ foram obtidos por regressão não-linear dos dados obtidos em várias concentrações através do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

2.3.3. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato e frações da casca do caule de *M. latifolium* foi avaliada utilizando os métodos de sequestro do DPPH•, de redução do radical ABTS•⁺ e do sistema β-caroteno/ácido linoleico.

O potencial de redução do radical DPPH• (1,1-difenil-2-picrilidrazila) e sequestro do radical ABTS•⁺ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) foram determinados segundo o proposto por Santos et al., (2017) No ensaio do DPPH• (1,1-difenil-2-picrilidrazila), as amostras (3 a 100 µg/mL) foram incubadas com uma solução etanólica de DPPH• (1,1-difenil-2-picrilidrazila, 70 µM) num volume final de 2 mL. Após 20 min a 25 °C, a absorbância residual da solução foi determinada em 517 nm. No ensaio do ABTS•⁺ (cátion radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico), o cátion radical do ABTS foi inicialmente preparado pela reação entre ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (2,45 mM) por 16 h à

temperatura ambiente e protegido da luz. A solução ABTS^{•+} estoque foi diluída com etanol para absorvância de 0,7 a 734 nm e incubada com as amostras (0,6 a 15 µg/mL) em um volume final de 2 mL. A absorvância residual foi medida a 734 nm após 6 min de reação. Em ambos experimentos, os valores foram expressos como a concentração da amostra necessária para reduzir 50% dos radicais livres (IC₅₀), após ajuste hiperbólico dos dados (Santos et al., 2017).

No ensaio de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico, preparou-se inicialmente uma emulsão contendo 60 µL de ácido linoleico, 530 µL de Tween 40, 10 µL da solução β-caroteno (20 mg/mL) e 1 mL de clorofórmio. Após homogeneização, o clorofórmio foi rotaevaporado e água destilada aerada foi adicionada à mistura até uma absorvância inicial de 0,65 a 470 nm. As amostras (4,6 a 74,1 µg/mL) foram misturadas a 1,5 mL da solução sistema β-caroteno/ácido linoleico e incubadas a 50°C. A absorvância (λ = 470 nm) da mistura reacional foi determinada imediatamente e após 2 h de incubação (Marco 1968, Miller, 1971). Os resultados expressos como IC₅₀ foi determinado após ajuste hiperbólico dos dados.

Ácido gálico foi utilizado como controle positivo nos testes de DPPH[•] e ABTS^{•+}, enquanto Trolox no ensaio de peroxidação lipídica.

2.3.4. Avaliação da citoproteção

Os macrófagos da linhagem Raw 264.7 foram cultivados em meio DMEM com 10% de soro bovino fetal, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), em seguida transferidos para uma placa de 96 poços (1x10⁵/poço) e pré-incubados a 37 °C em atmosfera de CO₂ (5%) com a fração acetato de etila de *M. latifolium* (25 e 50 µg/mL). Após 18 h, as células foram lavadas duas vezes em tampão de fosfato salino (PBS). O meio foi trocado e H₂O₂ (1 mM) foi adicionado. Após nova incubação por 18 h a 37 °C, a viabilidade celular residual foi determinada pela determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante (Hansen et al., 1989; Facundo et al., 2005). Triton X-100 (1%) foi utilizado como controle de 100% de lise celular.

2.3.5. Determinação do estado redox intracelular dos macrófagos

Os macrófagos Raw 264.7 (1x10⁵/poço) foram plaqueados em placas de 96 poços e pré-incubados com a fração acetato de etila de *M. latifolium* (25 e 50 µg/mL) por 18 h e re-incubados com H₂O₂ (100 µM) por 30 min. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA, 10 µM) por 1 h a 37 °C no escuro. As células foram lavadas novamente com PBS para retirar o excesso de DCFH-DA extracelular. A oxidação de DCFH foi monitorada por fluorescência (λ_{ex} = 485 nm; λ_{em} = 520

nm) em um leitor de microplacas, sendo que o sinal aumentado de fluorescência indica um estado redox intracelular mais oxidante (Hansen et al., 1989; Pereira et al., 2017).

2.3.6. Atividade da enzima heme oxigenase

Os macrófagos Raw 264.7 (5×10^5 /poço) foram transferidos para placas de 12 poços e pré-incubados com a fração acetato de etila de *M. latifolium* (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) por 18 h. A atividade da heme oxigenase foi determinada no final de cada tratamento, conforme descrito por Jeong et al. (2009). As células foram submetidas a três ciclos de congelamento-descongelamento antes da adição do homogenato ao tampão fosfato (1 mL de volume final, pH 7,4) contendo cloreto de magnésio (2 mM), NADPH (0,8 mM), glucose-6- fosfato (2 mM), glucose-6-fosfato desidrogenase (0,2 unidades), citosol de fígado de rato como fonte de biliverdina redutase e o substrato hemina (20 μM). A mistura reacional foi incubada no escuro a 37°C durante 1 h e, em seguida, foi adicionado 1 mL de clorofórmio. Após vigorosa agitação, a bilirrubina extraída na camada de clorofórmio foi medida pela diferença de absorbância entre 464 e 530 nm ($\epsilon = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.3.7. Viabilidade celular

As células (1×10^5 /poço) em placas de 96 poços foram pré-incubadas por 18 h com a fração acetato de etila da casca do caule de *M. latifolium* (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) em meio de cultura contendo soro fetal bovino. Após isso, o sobrenadante foi coletado e a atividade da LDH foi determinada conforme acima (Facundo et al., 2005). Triton X-100 (1%) foi utilizado como controle de 100% de lise celular.

2.4. Estudo fitoquímico

2.4.1. Ensaios de fitoquímica clássica

✓ Teste para alcaloides:

Extrato e frações da casca do caule de *M. latifolium* foram analisados por cromatografia em camada delgada para identificação qualitativa de alcaloides, com reveladores específicos para a classe. As amostras foram previamente solubilizadas em metanol, com exceção da fração hexânica, que foi solubilizada em clorofórmio. Em seguida, foram aplicadas em placas preparadas com sílica gel (fase estacionária) e eluídas em cuba de vidro contendo uma mistura acetato de etila:metanol (8:2). As placas foram observadas sob luz UV 365 nm e, em seguida, elas foram aspergidas com o reagente de Dragendorff para revelação de alcaloides (Wagner e Bladt, 2009).

✓ **Teste para triterpenos/esteroides:**

Cerca de 50 mg das amostras foram diluídos em 1 mL de clorofórmio e, em seguida, foi adicionado 2 mL de anidrido acético e 2 gotas de ácido sulfúrico. A presença de triterpeno/esteroides é indicada pela mudança da cor azul para verde conforme descrito no teste de Liebermann-Burchard (Matos, 1997).

✓ **Teste para saponinas:**

As amostras foram misturadas com água e agitadas vigorosamente observando a formação de espuma, sendo considerado positiva a formação de forte espuma persistente por mais de 15 min (Matos, 1997).

✓ **Teste para taninos:**

Cerca de 50 mg das amostras foram diluídos em 5 mL de água e, posteriormente, foi adicionado 2 gotas de cloreto férrico. O aparecimento da coloração verde-preto identifica presença de taninos condensados e azul-preto caracteriza presença de taninos hidrolisáveis (Falcão e Araújo, 2011).

✓ **Teste para flavonoides:**

Cerca de 50 mg das amostras foram diluídos em 5 mL de etanol, seguido pela adição de um pedaço de fita de magnésio de 1,0 cm com 3 gotas de ácido clorídrico concentrado. A presença de flavonoides é indicada pelo aparecimento de coloração rósea a vermelha na mistura (Matos, 1997).

2.4.2. Dosagem de “fenólicos totais”

O conteúdo de fenólicos totais foi quantificado através do método espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Em tubo de ensaio foi adicionado 125 µL da amostra (1 mg/mL), 125 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 1 mL de água destilada. Após 3 min, 125 µL da solução saturada de Na₂CO₃ foram adicionadas e a mistura foi incubada por 30 min a 37°C. Em seguida, foi realizada a leitura dos testes em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm. Uma curva padrão de ácido gálico (0,5 a 25 µg) foi construída para quantificação dos fenólicos totais nas amostras, os quais foram expressos em µg equivalentes de ácido gálico por miligramas de amostra (µg EAG/mg) (Singleton et al., 1999).

2.4.3. CLAE-EM/EM

As análises cromatográficas das amostras foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) utilizando um cromatógrafo UPLC da Shimadzu acoplado com um espectrômetro de massa da Amazon Speed ETD, com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) em modos positivo e negativo. A coluna utilizada foi Phenomenex Luna C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) e as fases móveis foram água/ácido fórmico 0,1% (fase A) e acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (fase B). O fluxo utilizado foi de 1 mL/min com um gradiente linear a partir de 0% de B e aumentando até 100% de B em 60 min, antes de se manter por 5 min, e depois retornando para as condições iniciais em 5 min com reequilíbrio da coluna por mais 5 min. A temperatura do forno foi 40°C. As condições ESI foram: capilar = 4500 V, gás de secagem = 7 L/min, pressão do nebulizador = 27 psi, temperatura de dessolvatação = 300°C, temperatura da fonte = 300°C, com aquisição de dados entre m/z 50 e 1000. Os constituintes das amostras da casca do caule de *M. latifolium* foram sugeridos pela comparação de seus valores m/z e padrões de fragmentação com a literatura.

2.4.4. CG-EM

A fração hexânica da casca do caule de *M. latifolium* foi submetida a análise de CG-EM, em aparelho QP2020 da marca Shimadzu, usando coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (difênil dimetil polisiloxano) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, espessura do filme de 0,25 µm e hélio como gás de arraste.

A temperatura do injetor foi de 280°C com temperatura inicial de 60°C por 1 min, aumentando de 60 a 280°C na razão de 10°C/min, permanecendo nessa temperatura por 20 min. A temperatura final permaneceu em 280°C por 43 min. A temperatura do detector e da interface do sistema foram de 280°C. A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas das amostras com aqueles existentes no NIST versão 14.

2.5. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão amostral de três experimentos independentes para determinação do teor de fenólicos totais, sequestro dos radicais DPPH•, ABTS•+, co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico e atividade antioxidante em célula. A determinação do teor de fenólicos totais, sequestro dos radicais DPPH•, ABTS•+ e co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico foram analisados por ANOVA de uma via e Tukey como pós-teste. O resultado da atividade antioxidante em modelo celular foi analisado por ANOVA e Dunnett's como pós-teste. A correlação entre o teor de fenólicos e os ensaios antioxidantes

DPPH•, ABTS⁺• e peroxidação lipídica foram determinadas pelo teste de correlação de Pearson. O nível de significância utilizado foi de 5% e todos os testes foram realizados no programa GRAPHPAD Prisma (5.0).

3. Resultados

Inicialmente uma porção do extrato bruto da casca do caule de *M. latifolium* foi reservado e outra parte, cerca de 5 gramas, foi submetida a fracionamento originando as frações hexânica (FHCML = 0,06 g), acetato de etila (FAECML = 0,54 g), butanólica (FBCML = 0,35 g) e fase aquosa (FaqCML = 0,44 g).

Na determinação da susceptibilidade bacteriana todas as amostras de maneira geral, com exceção da fração hexânica, apresentaram potencial antibacteriano contra as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* na concentração de até 1 mg/mL (Tabela 1). A fração acetato de etila, apresentou o melhor perfil antibacteriano contra *S. aureus* (CIM=CBM=250 µg/mL), *S. epidermidis* (CIM=50 µg/mL e CBM=100 µg/mL), *K. pneumoniae* (CIM=CBM=100 µg/mL) e *P. mirabilis* (CIM=CBM=100 µg/mL).

Em seguida, a atividade antiproliferativa do extrato bruto e frações de *M. latifolium* sobre as células tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), MCF7 (carcinoma de mama humano) e HCT116 (carcinoma de cólon humano) foi investigada. Segundo o programa de triagem de drogas citotóxicas da Fiocruz/BA, extratos e frações com valores de IC₅₀ < 30 µg/mL são considerados promissores (Suffness e Pezzuto, 1990; Boik, 2001). Assim, a fração acetato de etila foi a única que passou na triagem e diminuiu a proliferação de células tumorais HepG2, MCF7 e HCT116 (IC₅₀ de 26,4, 19,9 e 22,1 µg/mL, respectivamente), sem qualquer efeito antiproliferativo sobre linhagem celular não tumoral de MCR5 até concentração de 50 µg/mL (Tabela 2).

Para determinação da atividade antioxidante preliminar do extrato e frações da casca do caule de *M. latifolium* inicialmente foi realizada uma triagem, onde as soluções etanólicas de DPPH• e ABTS⁺• foram incubadas com 15 a 100 µg/mL de cada amostra, respectivamente. Assim, apenas as amostras que inibiram o radical em 70% tiveram a concentração que reduz o radical pela metade (IC₅₀) determinadas. Todas as amostras, exceto a fração hexânica, tiveram seus valores de IC₅₀ calculados para ambos os testes (Tabela 3). A fração acetato de etila foi a mais potente em reduzir os radicais DPPH• e ABTS⁺• (IC₅₀ = 8,4 e 4,6 µg/mL respectivamente) comparado entre todas as amostras. No teste de inibição da peroxidação lipídica, a fração hexânica inibiu mais efetivamente o decaimento do β-caroteno (IC₅₀ = 10,1 µg/mL).

Com base nesses resultados, a fração acetato de etila da casca do caule de *M. latifolium* apresentou melhor perfil biológico e, por esse motivo, a atividade antioxidante dessa amostra também foi determinada em modelo celular. A fração acetato de etila (25 e 50 µg/mL) da casca do caule de *M. latifolium* foi eficaz em proteger as células de macrófagos Raw 264.7 contra a morte induzida pelo H₂O₂ após incubação por 18 h (Figura 2A) em cerca de 35,6 e 83,6% nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, respectivamente. Além disso, houve uma diminuição concentração dependente da fluorescência emitida pelas células quando pré-tratadas com a fração acetato de etila (25 e 50 µg/mL) antes da adição de H₂O₂, indicando menor oxidação da DCFH e, possivelmente, maior atividade antioxidante intracelular (Figura 2B).

A atividade da enzima heme oxigenase em macrófagos Raw 264.7 pré-incubados com a fração acetato de etila (25 e 50 µg/mL) também aumentou de maneira concentração dependente (Figura 2C), sendo que na concentração de 50 µg/mL a atividade alcançou valores de 1570 pmol de bilirrubina/mg de proteína/h *versus* 500 pmol de bilirrubina/mg de proteína/h da célula sem tratamento. É importante notar que, mesmo em concentrações de até 100 µg/mL da fração acetato de etila de *M. latifolium*, os macrófagos Raw 264.7 permaneceram viáveis, uma vez que a quantidade da enzima LDH citoplasmática liberada no meio de cultura foi de apenas 6,7%, o que é comparável a morte celular basal (4,5%) (dados não mostrados).

O perfil fitoquímico do extrato e frações da casca do caule de *M. latifolium* foi analisado quanto à presença de alcaloides, triterpenos/esteroides, saponinas, taninos e flavonoides por alguns métodos de fitoquímica clássica (Tabela 4). Os testes indicaram a presença de flavonoides e triterpenos/esteroides em todas as amostras, exceto a fase aquosa. A concentração de fenólicos e outros redutores (Tabela 5) do extrato e frações da casca do caule de *M. latifolium* foram determinadas através da comparação dos achados com uma curva de calibração de ácido gálico (equação da reta $y = 0,0657x - 0,0132$; $R^2 = 0,997$) (dado não mostrado). A fração acetato de etila novamente apresentou a maior concentração de fenólicos nas amostras (298,3 µg EAG/mg), enquanto que a fração hexânica a menor concentração desses compostos (42,2 µg EAG/mg). O teste de Pearson demonstrou uma correlação entre fenólicos totais e sequestro do radical DPPH• ($r=0,9839$; $p=0,0081$), mas não para o ABTS⁺• ($r=0,7392$; $p=0,1402$) e inibição da peroxidação lipídica ($r=0,1768$; $p=0,4808$).

Em seguida, as frações acetato de etila (Tabela 6 e Figuras 9-14), butanólica e fase aquosa (Tabela 7S e Figuras 15S-24S suplementares) da casca do caule de *M. latifolium* foram inicialmente analisadas por espectrometria de massas com ionização positiva, cujo padrão de fragmentação não permitiu a identificação de nenhum composto quando comparado com a literatura. Em paralelo, a fração hexânica foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a

espectrometria de massas, sendo possível identificar os compostos friedelan-3-ona, gamma-sitosterol e lup-20(29)-en-3-ona, provenientes dos picos de maior intensidade (Figura 25S suplementar).

Uma vez que a fração acetato de etila demonstrou melhores resultados nos ensaios biológicos aqui realizados (Tabelas 1-3 e Figura 2), decidimos analisá-la por espectrometria de massas com ionização negativa. Os íons com m/z 469, 603, 447, 497, 851, 847 foram os mais proeminentes na fração acetato de etila da casca do caule de *M. latifolium* (Tabela 6 e Figuras 3-8). Os íons com m/z 469 (Figura 4) e 851 (Figura 7) parecem se tratar do mesmo composto em potencial, sugerindo a presença de triterpenoides do tipo oleanano (Salih et al., 2017). O íon com m/z 603 e seus respectivos fragmentos (Figura 6) são indicativos da quercetina aglicona (Teixeira et al., 2015). Por fim, não foi encontrado na literatura nenhum metabólito correspondente ao íon m/z 447, 497 e 847.

4. Discussão

As espécies da família Fabaceae são conhecidas devido ao alto conteúdo de flavonoides, cumarinas, ácidos fenólicos, alcaloides, taninos, saponinas e triterpenos que estão associados às propriedades anti-inflamatória, antiviral, antitumoral, antibacteriana, anti-hemorrágica, hormonal e antioxidante dessas plantas (Krishna et al., 2012; Awouafacka et al., 2015; Amen et al., 2015). Dentre os diferentes metabólitos secundários, os compostos fenólicos são os mais extensivamente estudados, pois são reconhecidos por minimizar ou reparar o dano oxidativo às biomoléculas (García-Lafuente et al., 2014; Braga et al., 2016).

De maneira geral, os testes de fitoquímica clássica do extrato e frações da casca do caule de *M. latifolium* indicaram a presença de flavonoides e triterpenos/esteroides em todas as amostras, com exceção da fase aquosa. Já na determinação do teor de fenólicos totais, a fração acetato de etila apresentou maior concentração, enquanto que a fração hexânica apresentou menor concentração desses metabólitos, conforme esperado (Koleva et al., 2002).

A diferença na concentração dessas espécies deve estar relacionada com a natureza química das substâncias fenólicas (como os ácidos fenólicos, antocianinas e taninos), da interação com outros nutrientes e micronutrientes presentes na amostra e da polaridade do solvente empregado no procedimento de extração (Caetano et al., 2009). A concentração de fenólicos na fração apolar foi a menor, o que evidencia que os mesmos não se particionam em solventes lipofílicos. Esses achados estão de acordo com o descrito de Dos Santos et al. (2016), cuja fração acetato de etila das folhas de *Amburana cearenses* (Fabaceae) demonstrou maior teor de fenólicos totais (134,66 µg EAG/mg).

As análises de CLAE-EM/EM da fração acetato de etila da casca do caule de *M. latifolium* que foi mais ativa nos testes biológicos, sugerem a presença de quercetina e triterpenos do tipo oleanano na amostra. Um estudo recente utilizando o extrato hidroalcoólico das folhas de *Schotia brachypetala* (Fabaceae) identificou mais de quarenta polifenóis, incluindo glicosídeos flavonoides, isoflavonas, procianidinas, antocianinas, derivados do ácido hidroxibenzóico, taninos hidrolisáveis e vestígios de derivados flavonoides metilados e acetilados. Além disso, três compostos foram isolados e identificados do mesmo gênero pela primeira vez: ácido gálico, miricetina-3-O- α -L-¹C₄-ramnosídeo e quercetina-3-O-L-¹C₄-ramnosídeo (Sobeh et al., 2016).

A quercetina é um dos flavonoides mais estudados e está presente em várias famílias de plantas, incluindo a Fabaceae. Trata-se de um composto reconhecidamente antioxidante, anti-inflamatório, anti-hipertensivo, vasodilatador, antiobesidade, anti-hipercolesterolêmico e antiaterosclerótico, que exerce sua atividade por diferentes vias (Sultana e Anwar, 2008; Salvamani et al., 2014; David et al., 2016). A quercetina pode exercer tais atividades ao inibir a xantina oxidase (Khan et al., 2016), DNA-girase e topoisomerase IV (Hossion et al., 2011), proteína quinase C (Ferriola et al., 1989; End et al., 1987), produção de oxidantes induzida por lipopolissacarídeo e expressão de moléculas de adesão (Li et al., 2016). Além disso, ela também pode ativar a via do Nrf2 e, conseqüentemente, levar à expressão das enzimas peroxirredoxina (Miyamoto et al., 2011), p38-MAPK e HO-1 (Li et al., 2016), por exemplo.

Os triterpenoides do tipo oleanano exibem várias atividades farmacológicas, incluindo antioxidante, anti-inflamatório, hepatoprotetor, cardioprotetor, antipruriginoso, espasmolítico, antialérgico, antimicrobiano e antivirais. Estudos indicam que triterpenoides oleananos modulam múltiplas vias de sinalização intracelular e exercem atividades antioxidantes e antitumorais em vários sistemas modelo *in vitro* e *in vivo* (Parikh et al., 2014). Os triterpenoides podem regular a expressão dos microRNAs, induzir a expressão de enzimas antioxidantes como NAD(P)H quinona oxidoreductase1 e HO-1 também através da via do Nrf2 (Loboda et al., 2012). Além disso, esses compostos podem inibir a topoisomerase I causando apoptose celular, estabelecendo potencial citotóxico no desenvolvimento de drogas antiproliferativas (Herrera-Martínez et al., 2012).

Na avaliação da atividade antibacteriana a fração acetato de etila apresentou atividade bactericida sobre as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* devido a provável presença de flavonoides e/ou triterpenoides nessa amostra. De acordo com French (2006) os agentes que perturbam a parede celular ou a membrana celular ou interferem com enzimas bacterianas essenciais, apresentando um CBM não mais do que quatro vezes o CIM, geralmente são considerados como bactericidas. O único estudo biológico encontrado na

literatura com o gênero *Macrolobium*, até o presente momento, avaliou a atividade antibacteriana do extrato de *M. multijugum* sobre cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, que apresentou resultados de MICs irrelevantes ($5000 < \text{CIM} < 12500 \mu\text{g/mL}$) (De Castilho et al., 2014).

Akter et al. (2016) demonstraram que extratos em diclorometano, acetato de etila e n-hexânico da casca de *Erythrina stricta* (Fabaceae) apresentaram CIM de 7,8, 125 e 125 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus*, respectivamente. Os estudos fitoquímicos revelaram que as principais classes de constituintes nesses extratos foram flavonoides, terpenoides, esteroides, taninos, carboidratos e glicosídeos antraquinônicos. Recentemente, outro estudo também identificou o potencial antibacteriano dos extratos acetônico do caule e folhas, e metanólico/diclorometano do caule de *Newtonia buchananii* (Fabaceae) contra *P. aeruginosa* (20 $\mu\text{g/mL}$). No estudo fitoquímico, as folhas de *N. buchananii* indicaram a presença de fenólicos, flavonóis, flavonoides, taninos e proantocianidinas (Motlhatlego et al., 2018).

Na determinação da atividade antiproliferativa, a fração acetato de etila foi a única capaz de inibir a proliferação celular tumoral de forma mais significativa. Esses resultados sugerem que a provável presença de flavonoides e/ou triterpenoides na amostra atue sobre vias específicas de células tumorais, mas não em células normais uma vez que não interferiu na proliferação celular de MCR5 (Tabela 2). Na literatura também não há qualquer estudo sobre as propriedades antiproliferativas com plantas do gênero *Macrolobium*. No entanto, um triterpeno isolado das partes aéreas de *Cassia italica* (Fabaceae) apresentou efeito citotóxico contra células de linfoma e de tumor cerebral em altas concentrações (ED_{50} de 1,09 e 1,86 mM, respectivamente) (Mohamed, 2014).

Jæger et al. (2018) demonstraram que diferentes extratos de vagens de *Acacia ligulata* (Fabaceae) foram citotóxicos contra células de melanoma SK-MEL28, cujos valores de IC_{50} foram duas a quatro vezes maiores que os obtidos aqui neste trabalho. Além disso, o extrato etanólico da casca dessa mesma planta apresentou um CIM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ contra *Streptococcus pyogenes*. Os testes fitoquímicos colorimétricos e CLAE-EM/EM dos extratos etanólicos de folhas e vagens demonstraram a presença de flavonoides, triterpenos/esteroides e saponinas. Além disso, flavonoides e outros componentes fenólicos já foram isolados de várias partes de outras espécies de *Acacia* (Seigler, 2003), dos quais foram associados com as propriedades biológicas do gênero (Grace et al., 2009; Tung et al., 2010; Sun et al., 2015).

Na determinação da atividade antioxidante a fração acetato de etila foi mais eficiente no sequestro dos radicais livres, já a fração hexânica inibiu mais significativamente a peroxidação lipídica. Esse resultado já era esperado, provavelmente devido à presença de substâncias

lipofílicas nessa fração, uma vez que nesse método, o meio reacional se trata de uma emulsão. Dessa forma, substâncias de baixa polaridade, predominantes na fração hexânica, encontram maior capacidade para permanecerem na interface óleo-água da emulsão, onde ocorre a peroxidação lipídica e, assim, exerce mais facilmente sua ação antioxidante. Enquanto que frações de maior polaridade, solubilizam-se na fase aquosa, gerando diluição e consequentemente redução da atividade, o que fundamenta a menor atividade das demais frações (Koleva et al., 2002).

Apesar de não existirem estudos demonstrando a atividade antioxidante de *M. latifolium*, investigações com duas espécies de *Newtonia* da família Fabaceae demonstraram que o extrato metanólico/diclorometano das folhas de *N. hildebrandtii* reduziu o radical DPPH• com IC₅₀ de 0,3 µg/mL e os extratos metanólico/diclorometano do caule e folhas de *N. buchananii* foram os mais efetivos no sequestro do cátion radical ABTS^{•+} (IC₅₀= 0,01 e 0,1 µg/mL) (Motlhatlego et al., 2018). No trabalho de Campos et al. (2014) foi demonstrado que a fração metanólica do caule de *Bauhinia glabra* (Fabaceae) foi mais efetiva na captura do radical DPPH• (IC₅₀ 13,5 µg/mL).

Os resultados também demonstraram que a fração acetato de etila produziu atividade antioxidante em modelo celular e aumentou a atividade da enzima heme oxigenase, que é regulada pela via redox sensível da Nrf2-Keap1 (Jeong et al., 2009). Esses achados sugerem que a via do Nrf2 foi ativada pela provável presença de flavonoides e/ou triterpenoides nessa fração, o que pode explicar o efeito citoprotetor dessa amostra contra o dano oxidativo causado pelo H₂O₂. Além disso, esse resultado está de acordo com aquele apresentado para as células de MCR5, onde 50 µg/mL de extrato ou frações não causaram qualquer alteração metabólica nessa linhagem.

Os estudos acerca da capacidade de componentes de plantas da família Fabaceae em estimular a via do Nrf2 ainda são escassos. Todavia, um trabalho recente de Njayou et al. determinaram a atividade citoprotetora das frações das cascas do caule de *Entada africana*, também da família Fabaceae. A linhagem de hepatócito humano HC-04 quando pré-tratadas com as frações de cloreto de metileno/metanol e metanólica reduziram consideravelmente a liberação de LDH no sobrenadante, sendo que aquela com maior conteúdo de polifenóis foi a mais potente. Os resultados ainda mostraram que a fração de cloreto de metileno/metanol aumentou em duas vezes a translocação nuclear de Nrf2, sendo comparável ao padrão quercetina.

Os polifenóis são reconhecidamente ativadores da expressão de genes antioxidantes dependentes do Nrf2, apesar dos mecanismos exatos através dos quais os polifenóis promovem a translocação nuclear de Nrf2 ainda serem incertos. Alguns autores sugerem que os polifenóis sofrem auto-oxidação ou metabolismo intracelular, o que pode gerar um grau moderado de estresse redox que, por sua vez, ativa a via Nrf2 (Xing et al., 2011). Outros sugerem que esses compostos possam modificar os grupos tióis de Keap1, levando à liberação do Nrf2 (Chen et al., 2017).

Basar et al. (2016) analisaram extratos das raízes de *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae) frente ao estresse redox em linhagem celular de tecido mamário estável, e os resultados mostraram potencial quimiopreventivo de *G. glabra* mediado pela ativação da via do Nrf2 de defesa antioxidante, pela indução de expressão da enzima luciferase. Em outro estudo recente, Adesso et al. (2018) avaliaram o efeito do extrato de *Astragalus membranaceus* (Fabaceae) sobre o estresse redox em células epiteliais intestinais e demonstraram que esse extrato foi capaz de ativar a via do Nrf2 e induzir a expressão das enzimas HO-1 e NQO1, o que aumentou o potencial antioxidante e citoprotetor das células. Todavia, em ambos os trabalhos não foram realizados estudos fitoquímicos dos extratos no intuito de identificar os grupos metabólicos supostamente responsáveis pelo efeito.

5. Conclusão

A literatura reporta as espécies da família Fabaceae a ocorrência de alto conteúdo de flavonoides, alcaloides, triterpenos/esteroides, cumarinas, ácidos fenólicos, taninos e saponinas (Rocha e Silva et al., 2007; Awouafacka et al., 2015; Amen et al., 2015; Jæger et al., 2018). Dessa forma, os dados preliminares sobre a composição química da casca do caule de *M. latifolium* condizem com o que é esperado para a família, muito embora investigações futuras voltadas ao isolamento dos metabólitos de *M. latifolium* são imprescindíveis para uma caracterização mais fidedigna do perfil químico da planta. Neste estudo demonstramos, pela primeira vez, que a fração acetato de etila da casca do caule de *M. latifolium* apresenta propriedades antibacteriana, antiproliferativa e antioxidante sem características de toxicidade em cultura de células de MCR5 e de macrófagos murinos, possivelmente, por induzir a translocação nuclear de Nrf2 em células normais e, subsequentemente, a expressão de enzimas antioxidantes e citoprotetoras, o que indica o potencial terapêutico da planta no tratamento de distúrbios infecciosos, cancerígenos e oxidativos. Por fim, o estudo fitoquímico preliminar indicou a presença principalmente de flavonoides do tipo quercetina e triterpenoides do tipo

oleanano na fração acetato de etila da casca do caule da planta. Além de contribuir com a valoração da biodiversidade local ainda pouca explorada, este estudo destaca a *M. latifolium* como fonte em potencial de moléculas com propriedades terapêuticas.

Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) (RED038/2014), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (462401/2014-6), e Programa de Formação de Recursos Humanos - Petrobras (PRH-PB 211). Os autores são gratos a Profa Dra Milena Soares, Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, por generosamente fornecer as cepas bacterianas. Os autores também agradecem ao Hospital A.C. Camargo pela doação das células tumorais. Os autores também agradecem ao MSc Márcio Neri e MSc Anny Carolinny Tigre Chaves pela coleta da planta e preparo da exsicata.

Referências

Ahmad, F., Anwar, F., Hira, S., 2016. Review on Medicinal Importance of Fabaceae Family. PhOL. 3, 151-156.

Ahmed, S.A., Gogal, R.M., Walsh, J.E., 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [³H] thymidine incorporation assay. J. Immunol. Methods. 170, 211–224.

Akter, K., Barnes, E.C., Loa-Kum-Cheung, W.L., Yin, P., Kichu, M., Brophy, J.J., Barrow, R.A., Imchen, I., Vemulpad, S.R., Jamie, J.F., 2016. Antimicrobial and antioxidant activity and chemical characterisation of *Erythrina stricta* Roxb. (Fabaceae). J Ethnopharmacol. 185, 171-81.

Amen, Y.M., Marzouk, A.M., Zaghoul, M.G., Afifi, M.S. 2015. The genus *Machaerium* (Fabaceae): taxonomy, phytochemistry, traditional uses and biological activities. Nat Prod Res. 29, 1388-405.

Augusto, O., 2006. Radicais Livres: Bons, maus e naturais, Oficina de Textos: São Paulo.

Awouafacka, M.D., Tanea, P., Spitellerb, M., Eloffc, J.N., 2015. *Eriosema* (Fabaceae) Species Represent a Rich Source of Flavonoids with Interesting Pharmacological Activities. Nat Prod Commun. 10, 1325-1330.

Basar, N., Nahar, L., Oridupa, O.A., Ritchie, K.J., Talukdar, A.D., Stafford, A., Kushiev, H., Kan, A., Sarker, S.D., 2016. Utilization of the Ability to Induce Activation of the Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-like Factor 2 (Nrf2) to Assess Potential Cancer Chemopreventive Activity of Liquorice Samples. Phytochem. Anal. 27, 233-238.

Boik, J., 2001. Natural compounds in cancer therapy. Oregon Medical Press, Minnesota, USA, p. 25.

Braga, G.C., Melo, P.S., Bergamaschi, K.B., Tiveron, A.P., Massarioli, A.P., Alencar S.M., 2016. Extraction yield, antioxidant activity and phenolics from grape, mango and peanut agro-industrial by-products. Cienc. Rural. 46, 1498–504.

Cabral, I.S.R., Oldoni, T.L.C., Prado, A., Bezerra, R.M.N., Alencar, S.M., Ikegaki, M., Rosalen, PL., 2009. Phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of brazilian red propolis. Quím. Nova. 32, 1523-1527.

Campos, R., Oliveira, V.B., Paula, C.S., Pontarolo, R., Dias, J.F.G., Miguel, M.D., Zanin, S.M.W., Miguel, O.G. 2014. Multivariate analysis between the phytochemical features and antioxidant properties of the stems of *Bauhinia glabra* jacq. (Fabaceae). Int J. Pharm. Pharm. Sci. 6, 151-155.

Caetano, A.C.S., Melo, E.A., Lima, V.L.A.G., Araujo, C.R., 2009. Extraction of antioxidants from agro-industrial acerola waste. Braz. J. Food Technol. 12, 155-160.

Chen, L., Teng, H., Zhang, K.Y., Skalicka-Woźniak, K., Georgiev, M.I., Xiao, J., 2017. Agrimonolide and desmethylagrimonolide induced HO-1 expression in HepG2 cells through nrf2-transduction and p38 inactivation. *Front. Pharmacol*, 7, 1-12.

De Castilho, A.L., da Silva, J.P.C., Saraceni, C.H.C., Díaz, I.E.C., Paciencia, M.L.B., Varella, A.D., Suffredini, I.B., 2014. *In vitro* activity of Amazon plant extracts against *Enterococcus faecalis*. *Braz. J. Microbiol.* 45, 769–779.

Dos Santos, L., Reis, M., Ogava, L., Leão, K., Machado, L., Lira, S., 2016. Avaliação da Atividade Antioxidante dos Compostos Fenólicos Presentes na *Amburana cearensis*. *Orbital: Electron. J. Chem.* 8, 1984-6428.

End, D.W., Look, R.A., Shaffer, N.L., Balles, E.A., Persico, F.J., 1987. Non-selective inhibition of mammalian protein kinases by flavinoids in vitro. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 56, 75–86.

Facundo, H.T., De Paula, J.G., Kowaltowski, A.J. 2005. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels prevent oxidative stress, permeability transition and cell death. *J Bioenerg Biomembr.* 37, 75-82.

Falcão, L., Araújo, M.E.M., 2011. Tannins characterisation in new and historic vegetable tanned leathers fibres by spot tests. *J. Cult. Herit.* 12, 149-156.

Félix-da-Silva, M.M., Bastos, M.N.C., Gurgel, E.S.C., 2013. *Macrolobium* Schreb. (Leguminosae, Caesalpinioideae) na Floresta Nacional de Caxiuanã, Pará, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Ciências Naturais*, 8, 75–93.

Fernandes, P., Martens, E., 2017. Antibiotics in late clinical development. *Biochem. Pharmacol.* 133, p.152-163.

Ferriola, P.C., Cody, V., Middleton, E.J., 1989. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* 38:1617–1624.

French, G.L., 2006. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections-the potential role of daptomycin. *J Antimicrob Chemother*, 58, 1107-1117.

García-Lafuente, A., Moro, C., Manchón, N., Gonzalo-Ruiz, A., Guillamón, A., Rostagno, M., Mateo-Vivarachoet, L., 2014. In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. *Food. Chem.* 161:216-223.

Gentry, A.H., 1988. Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 75, 1-34.

Grace, M.H., Wilson, G., Kandil, F.E., Dimitriadis, E., Coates, R.M., 2009. Characteristic flavonoids from *Acacia burkittii* and *Acacia acuminata* heartwoods and their differential cytotoxicity to normal and leukemia cells. *Nat Prod Commun.* 4, 69–76.

Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K., 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods.* 119, 203-210.

Herrera-Martínez, M., Ramírez-Mares, M.V., Burgueño-Tapia, E., Cepillo-Portugal, E., Mirón-Enríquez, C., Hernández-Carlos, B., 2012. Screening of antitopoisomerase, antioxidant, and antimicrobial activities of selected triterpenes and saponins. *Rev. Latinoam. Quim.* 40, 165-177.

Hossion, A.M., Zamami, Y., Kandahary, R.K., Tsuchiya, T., Ogawa, W., Iwado, A., Sasaki, K., 2011. Quercetin Diacylglycoside Analogues Showing Dual Inhibition of DNA Gyrase and Topoisomerase IV as Novel Antibacterial Agents. *J. Med. Chem.* 54, 3686-3703.

Jäger, D., Simpson, B.S., Ndi, C.P., Jäger, A.K., Crocoll, C., Møller, B.L., Weinstein, P., Semple, S.J., 2017. Biological activity and LC-MS/MS profiling of extracts from the Australian medicinal plant *Acacia ligulata* (Fabaceae). *Nat. Prod. Res.* 32, 576-581.

Jeong, S.-O., Oh, G.-S., Ha, H.-Y., Soon Koo, B., Sung Kim, H., Kim, Y.-C., Kim, E.-C., Lee, K.-M., Chung, H.T., Pae, H.-O., 2009. Dimethoxycurcumin, a Synthetic Curcumin Analogue, Induces Heme Oxygenase-1 Expression through Nrf2 Activation in RAW264.7 Macrophages. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 44, 79-84.

Khan, F., Niaz, K., Maqbool, F., Ismail Hassan, F., Abdollahi, M., Nagulapalli Venkata, K. C., Nabavi, S.M, Bishayee, A. 2016. Molecular Targets Underlying the Anticancer Effects of Quercetin: An Update. *Nutrients.* 8, 529.

Kohen, R., Nyska, A., 2002. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol Pathol.* 30, 620-650.

Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., Groot, A., Evstatieva, L.N., 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.* 13, 8-17.

Krishna, P.M., Rao, K.N.V., Sandhya, S.; Banji, D., 2012. A review on phytochemical, ethnomedical and pharmacological studies on genus *Sophora*, Fabaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22, 1145-1154.

Li, C., Zhang, W.J., Frei, B., 2016. Quercetin inhibits LPS-induced adhesion molecule expression and oxidant production in human aortic endothelial cells by p38-mediated Nrf2 activation and antioxidant enzyme induction. *Redox Biol.* 9, 104-113.

Loboda, A., Rojczyk-Golebiewska, E., Bednarczyk-Cwynar, B., Lucjusz, Z., Jozkowicz, A., Dulak, J., 2012. Targeting nrf2-mediated gene transcription by triterpenoids and their derivatives. *Biomol. Ther. (Seoul).* 20, 499-505.

Lpwg [The Legume Phylogeny Working Group]. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon*, 62, 217-248 (2013).

Marco, G.J., 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. J. Am. Oil. Chem. Soc. 45, 594–598.

Matos, F.J., 1997. Introdução à fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC; 141p

Mendes, E.C., Vasconcellos, L.C.F., 2015. Palliative cares on cancer and the doctrinal principles of SUS. *Saúde em Debate*, 39, 881-892.

Mikaeili, A., Karimi, I., Shamspur, T., Gholamine, B., Modaresi, M., Khanlari, A., 2012. Anticandidal activity of *Astragalus verus* in the *in vitro* and *in vivo* guinea pig models of cutaneous and systemic candidiasis. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22, 1035-1043.

Miller, H.E., 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. J. Am. Oil. Chem. 48, 91-91.

Miyamoto, N., Izumi, H., Miyamoto, R., Kondo, H., Tawara, A., Sasaguri, Y., Kohno, K., 2011. Quercetin induces the expression of peroxiredoxins 3 and 5 via the Nrf2/NRF1 transcription pathway. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 1055-1063.

Mohamed. G.A., 2014. New cytotoxic cycloartane triterpene from *Cassia italica* aerial parts. *Nat Prod Res.* 28, 976-983.

Motlhatlego, K.E., Mfotiye Njoya, E., Abdalla, M.A., Eloff, J.N., McGaw, L.J., 2018. The potential use of leaf extracts of two *Newtonia* (Fabaceae) species to treat diarrhoea. *S Afr J Bot.* 116, 25–33.

Muleya, E., Ahmed, A.S., Sipamla, A.M., Mtunzi, F.M., Mutatu, W., 2015. Pharmacological properties of *Pomaria sandersonii*, *Pentanisia prunelloides* and *Alepidea amatymbica* extracts using in vitro assays. *J. Pharmacognosy Phytother.* 7, 1-8.

Nascimento, G.G.F., Locatelli, J., Freitas, P.C., Silva, G.L., 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 31, 247-256.

Newman, D.J., Cragg, G.M., 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629-661.

Niki, E., 2010. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic Biol Med.* 49, 503-515.

Njayou, F. N., Amougou, A. M., Fouemene Tsayem, R., Njikam Manjia, J., Rudraiah, S., Bradley, B., Manautou, J.E., Fewou Moundipa, P., 2015. Antioxidant fractions of *Khaya grandifoliola* C.DC. and *Entada africana* Guill. et Perr. induce nuclear translocation of Nrf2 in HC-04 cells. *Cell. Stress. Chaperones.* 20, 991–1000.

O'brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421-5426.

OMS divulga as dez principais causas de morte no mundo de 2000 a 2011 – Saúde. Disponível em: < news.med.br>. Acesso em 15 de maio de 2018.

Parikh, N.R., Mandal, A., Bhatia, D., Siveen, K.S., Sethi, G., Bishayee, A., 2014. Oleanane triterpenoids in the prevention and therapy of breast cancer: current evidence and future perspectives. *Phytochem Rev.* 13, 793-810.

Pereira, J.R., Queiroz, R.F., Siqueira, E.A., Vidal, C.B., Santana, A.E.G., Silva, D.M., Affonso, P.R.A.M. 2017. Evaluation of cytogenotoxicity, antioxidant and hypoglycemic activities of isolate compounds from *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae). *An. Acad. Bras. Cien.* 89, 317-331.

Rocha e Silva, H., da Silva, C.C.M., Caland-Neto, L.B., Lopes, J.A.D., Citó, A.M.G.L., Chaves, M.H., 2007. Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. *Quím. Nova.* 30, 1877-1881.

Salvamani, S., Gunasekaran, B., Shaharuddin, N.A., Ahmad, S.A., Shukor, M.Y., 2014. Antiatherosclerotic effects of plant flavonoids. *Biomed. Res. Int.* 480258.

Salih, E.Y.A., Fyhrquist, P., Abdalla, A.M.A., Abdelgadir, A.Y., Kanninen, M., Sipi, M., Luukkanen, O., Fahmi, M.K.M., Elamin, M.H., Ali, H.A., 2017. LC-MS/MS Tandem Mass Spectrometry for Analysis of Phenolic Compounds and Pentacyclic Triterpenes in Antifungal Extracts of *Terminalia brownii* (Fresen). *Antibiotics (Basel).* 6, E37.

Sambuichi, R.H.R., Mielke, M.S., Pereira, C.E., 2009. *Nossas árvores: conservação, uso e manejo de árvores nativas no Sul da Bahia*, 1.ed. Ilhéus: Editora da UESC, p.229.

Sambuichi, R.H.R., Oliveira, R.M., Neto, E.M., Oliveira, R.L de., Pelicção, M.C., Thévenin, J.M.R., Júnior, C.P.J., 2008. *Status de conservação de dez árvores endêmicas da Floresta Atlântica do sul da Bahia - Brasil.* *Nat. Conserv.* 6, 90-108.

Santana, D.B., da Costa, R.C., Araújo, R.M., Paula, J.E de., Silveira, E.R., Braz-Filho, R., Espindola, L.S., 2015. Activity of Fabaceae species extracts against fungi and *Leishmania*: vaticarpan as a novel potent anti-*Candida* agent. *Rev. Bras. Farmacogn.* 25, 401–406.

Santos, T.L.A., Queiroz, R.F., Sawaya, A.C.H.F., Lopez, B.G., Soares, M.B.P., Bezerra, D.P., Rodrigues, A.C.B.C., Paula, V.F., Waldschmidt, A.M., 2017. *Melipona mondury* produces a geopolis with antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities. *An. Acad. Bras. Cienc.* 89, 2247-2259.

Seigler, D.S., 2003. Phytochemistry of *Acacia* – *sensu lato*. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 845–873.

Shalaby, E.A., Shanab, S.M.M., 2013. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 7, 528–539.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods. Enzymol.* 299, 152–78.

Sobeh, M., ElHawary, E., Peixoto, H., Labib, R.M., Handoussa, H., Swilam, N., El-Khatib, A.H., Sharapov, F., Mohamed, T., Krstin, S., Linscheid, M.W., Singab, A.N., Wink, M., Ayoub, N., 2016. Identification of phenolic secondary metabolites from *Schotia*

brachypetala Sond. (Fabaceae) and demonstration of their antioxidant activities in *Caenorhabditis elegans*. PeerJ. 4, e2404.

Sowemimo, A., Venables, L., Odedeji, M., Koekemoer, T., van de Venter, M., Hongbing, L., 2015. Antiproliferative mechanism of the methanolic extract of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. (Fabaceae). J Ethnopharmacol. 159, 257-261.

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. The Elements of Style, fourth ed. Longman, New York

Suffness, M., Pezzuto, J.M., 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K. Editor. Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity. London: Academic Press. 71–133.

Sultana, B., Anwar, F., 2008. Flavonols (Kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. Food Chem. 108, 879-84.

Sun, Y.N., Li, W., Song, S.B., Yan, X.T., Zhao, Y., Jo, A.R., Kang, J.S., Young Ho, K., 2015. A new phenolic derivative with soluble epoxide hydrolase and nuclear factor-kappaB inhibitory activity from the aqueous extract of *Acacia catechu*. Nat Prod Res. 1–8.

Teixeira, L.L., Bertoldi, F.C., Lajolo, F.M., Hassimotto, N.M.A., 2015. Identification of Ellagitannins and Flavonoids from *Eugenia brasilienses* Lam. (Grumixama) by HPLC-ESI-MS/MS. J. Agric. Food Chem. 63, 5417-5427.

Tung, Y-T., Hsu, C-A., Chen, C-S., Yang, S.C., Huang, C-C., Chang, S-T., 2010. Phytochemicals from *Acacia confusa* Heartwood extracts reduce serum uric acid levels in oxonate-induced mice: their potential use as xanthine oxidase inhibitors. J Agric Food Chem. 58, 9936–9941.

Wagner, H., Blad, S., 2009. Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas. 2 ed. (reprint). Springer, p. 197

Winterbourn, C.C., 2014. The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. Biochimica et Biophysica Acta. 1840, 730-738.

Xing, H.Y., Liu, Y., Chen, J.H., Sun, F.J., Shi, H. Q., Xia, P.Y. 2011. Hyperoside attenuates hydrogen peroxide-induced L02 cell damage via MAPK-dependent Keap(1)-Nrf(2)-ARE signaling pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. 410, 759-765.

Zakaria, Z.A., Abdul Rahman, N.I., Loo, Y.W., Abdul Ayub, A.H., Sulaiman, M.R., Mat Jais, A.M., Gopalan, H.K., Fatimah, C.A., 2009. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Chloroform Extract of *Bauhinia purpurea* L. (Leguminosae) Leaves in Animal Models. Int. J. Trop. Med. 4, 140-145.

Zampini, I.C., Ordoñez, R.M., Isla, M.I. 2010. Autographic Assay for the Rapid Detection of Antioxidant Capacity of Liquid and Semi-solid Pharmaceutical Formulations Using ABTS⁺ Immobilized by Gel Entrapment. AAPS PharmSciTech. 11, 1159–1163.

Legendas

Figura 2. Atividades citoprotetora (A), antioxidante (B) e indutora da hemeoxigenase (C) da fração acetato de etila da casca do caule de *M. latifolium* sobre macrófagos Raw 264.7. As células foram pré-tratadas com a fração nas concentrações de 25 e 50 µg/mL por 18 h. A atividade citoprotetora (A) foi avaliada pela determinação dos níveis de LDH no sobrenadante após adição de H₂O₂ (1 mM). Triton X-100 (1%) foi empregado como controle de lise total (100%). A atividade antioxidante (B) nas células pré-tratadas com a fração foi determinada pela oxidação da DCFH intracelular após adição de H₂O₂ (100 µM). A atividade da hemeoxigenase (C) foi estimada nas células pré-incubadas com as frações conforme descrito na Metodologia e expressa como pmol de bilirrubina/mg de proteína/hora. *p<0,05, quando comparados com controle por ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett's.

Figura 3. Cromatograma de íons (expandido) pela técnica de ionização (ESI) (modo negativo) da fração acetato de etila da casca do caule de *M. latifolium* em 210 nm. Os valores apresentados no cromatograma sob cada pico indica o tempo de retenção em minutos.

Figura 4. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com *m/z* 469,00 (B) e 425,01 (C) identificados em 19,2 min.

Figura 5. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com *m/z* 447,05 (B) e 497,13 (C) identificados em 21,3 min.

Figura 6. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com *m/z* 301,00 (B) e 601,00 (C) identificados em 22,0 min.

Figura 7. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com *m/z* 425,01 (B) e 851,04 (C) identificados em 24,4 min.

Figura 8. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com *m/z* 423,00 (B) e 847,00 (C) identificados em 27,1 min.

Figura 9. Cromatograma de íons (expandido) pela técnica de ionização (ESI) (modo positivo) da fração acetato de etila da casca do caule de *M. latifolium* em 210 nm. Os valores apresentados no cromatograma sob cada pico indica o tempo de retenção em minutos.

Figura 10. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com *m/z* 471,02 (B) e 958,05 (C) identificados em 18,9 min.

Figura 11. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com *m/z* 303,01 (B) e 320,04 (C) identificados em 21,7 min.

Figura 12. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com *m/z* 427,03 (B) e 870,07 (C) identificados em 24,0 min.

Figura 13. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 227,20 (B) e 249,18 (C) identificados em 43,3 min.

Figura 14. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 221,15 (B) e 243,13 (C) identificados em 47,7 min.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Figura 2.

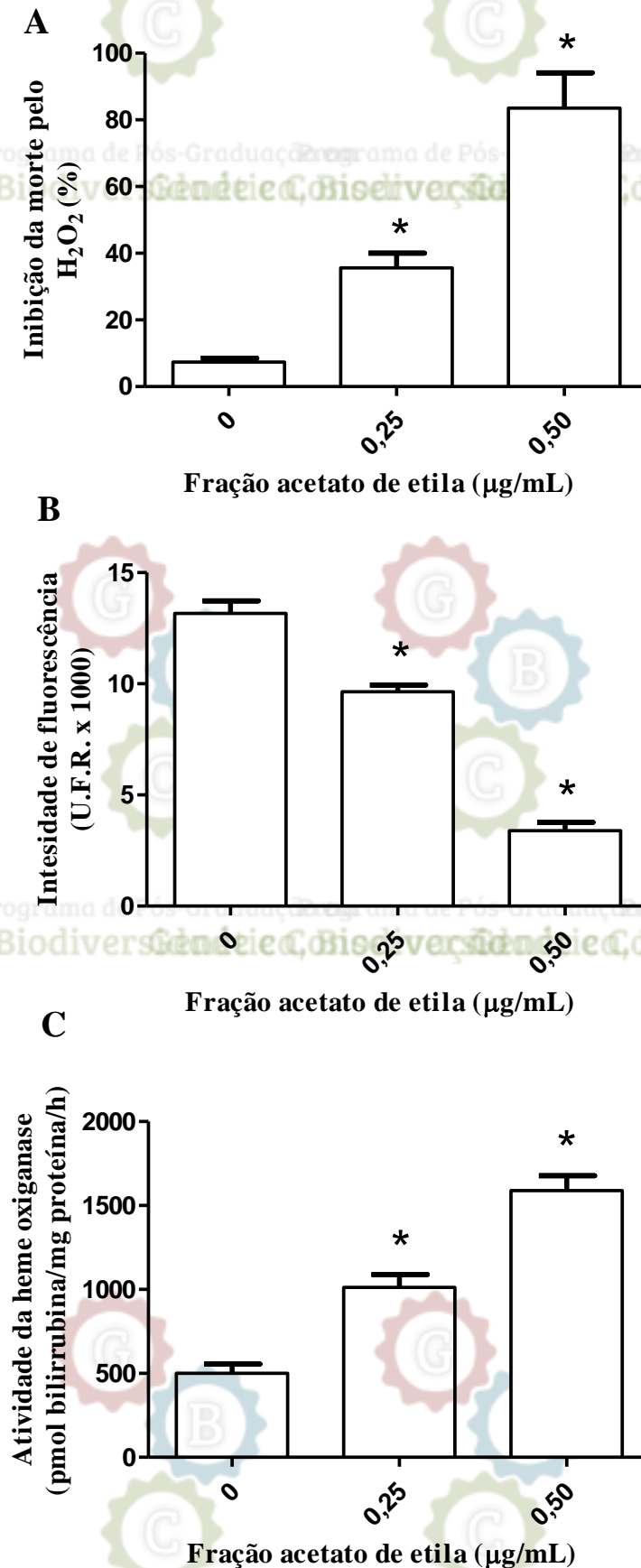


Figura 3.

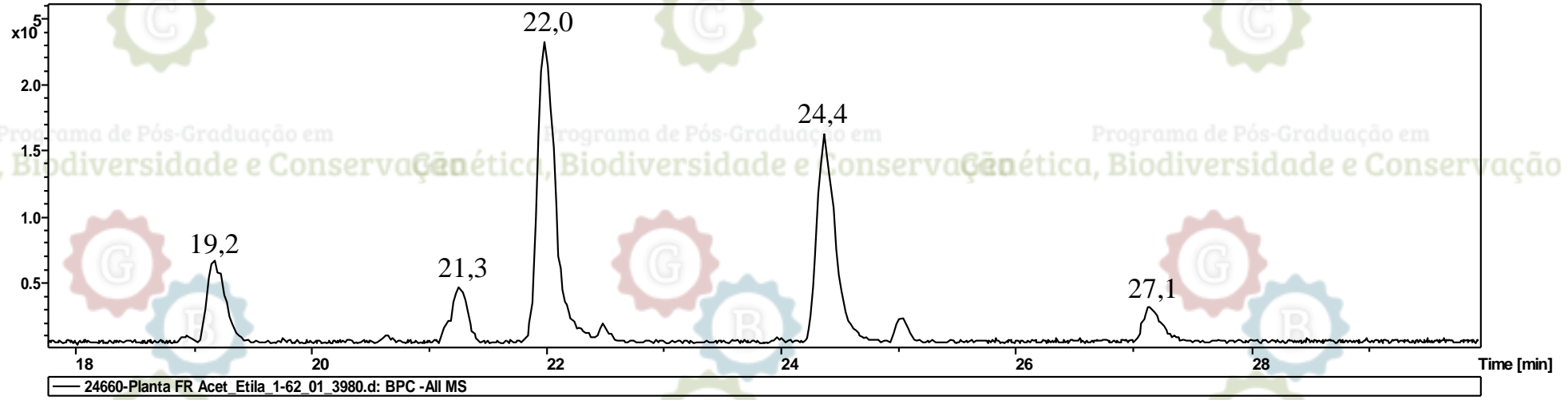
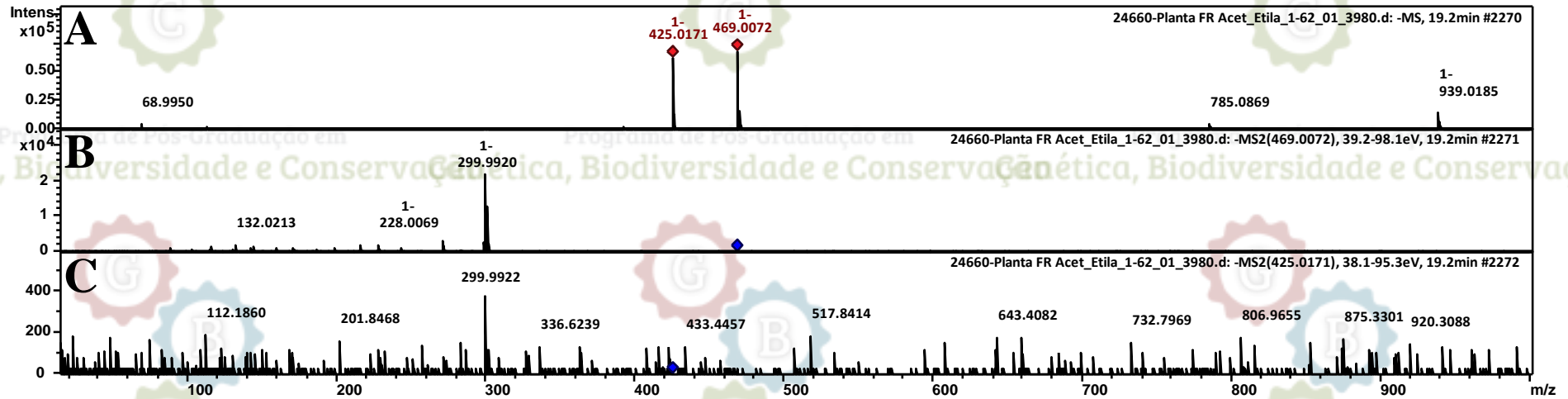


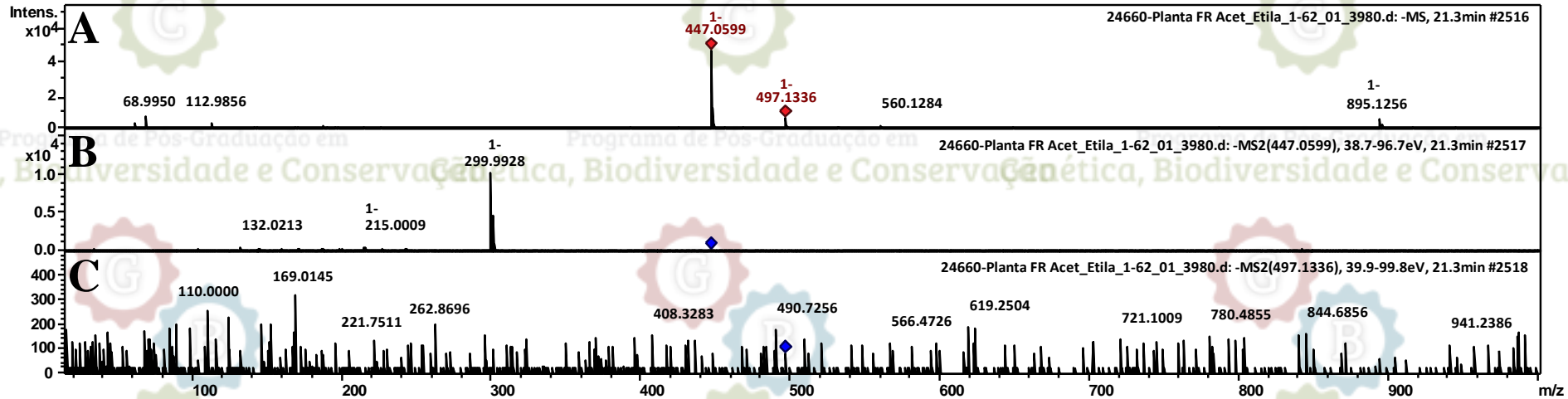
Figura 4.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Figura 5.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Figura 6.

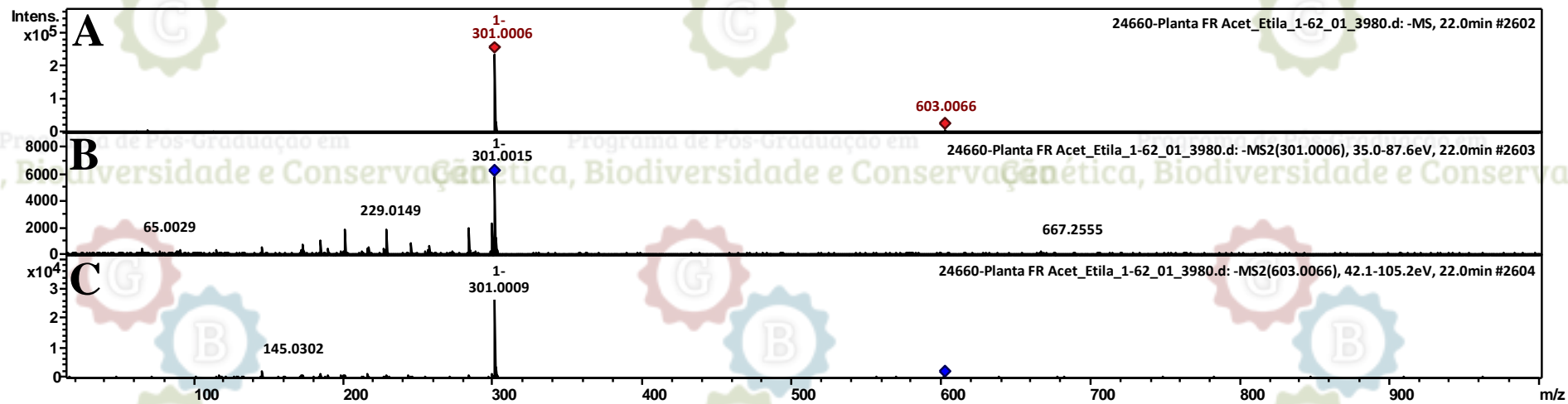
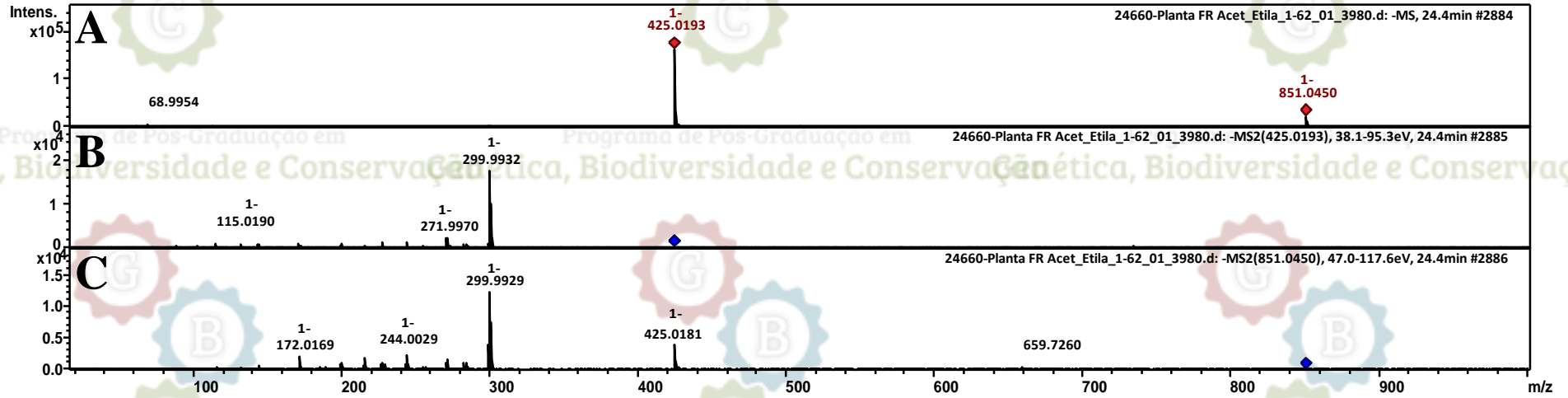


Figura 7.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Figura 8.

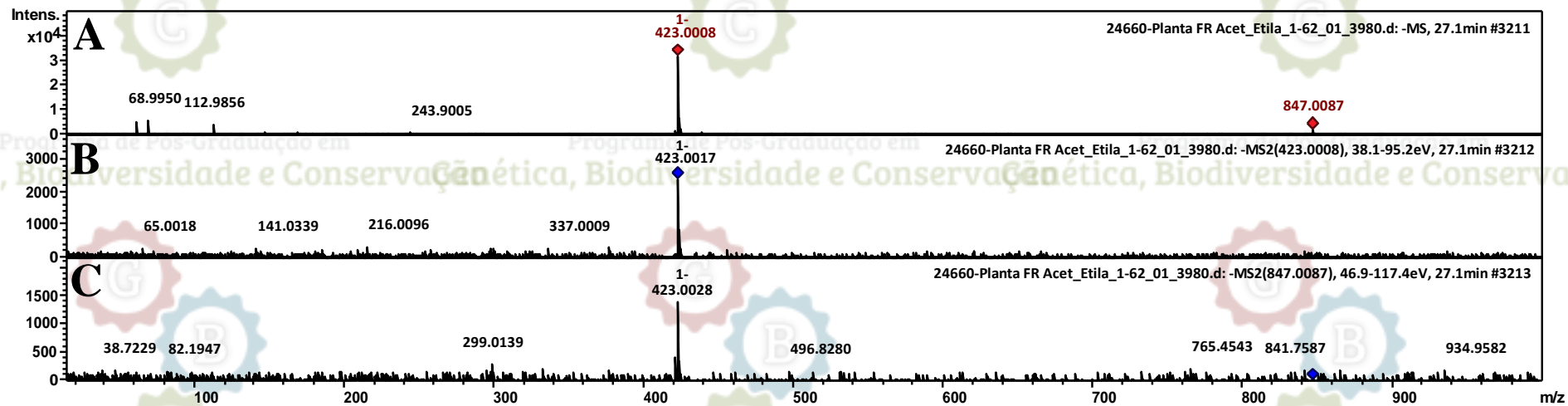


Figura 9.

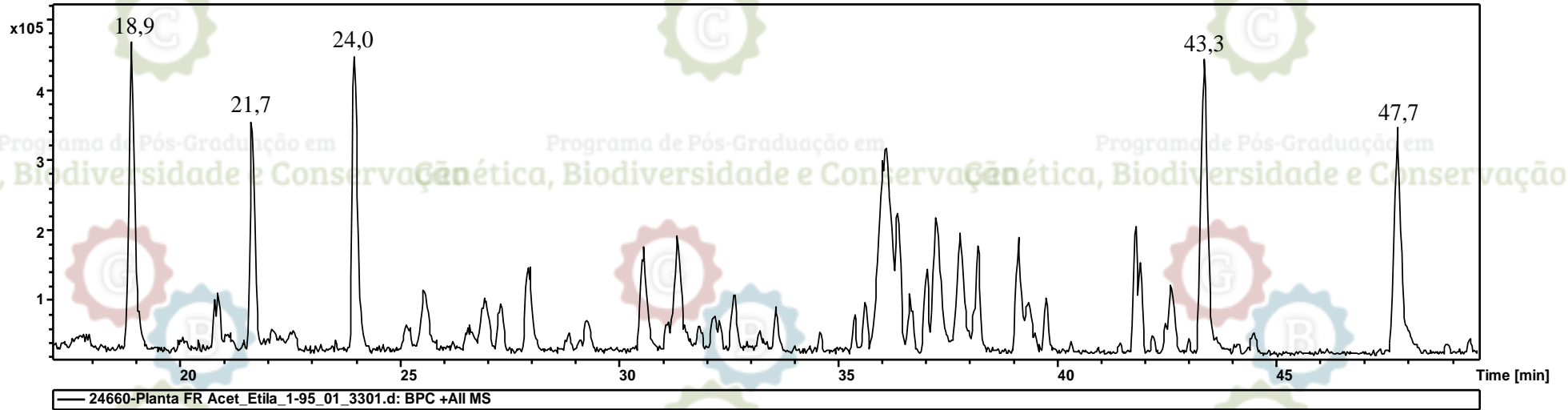


Figura 10.

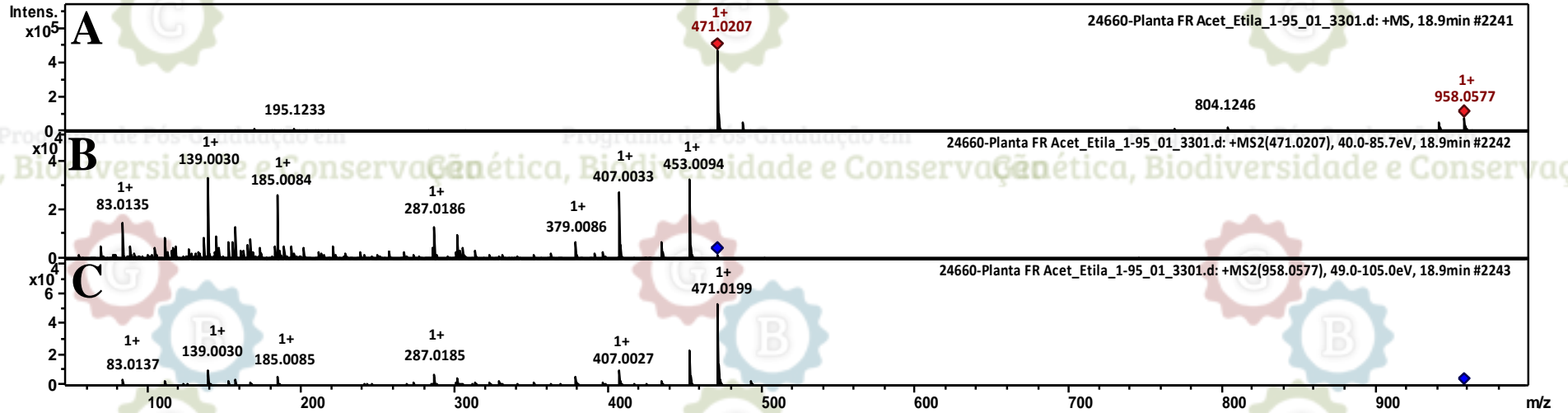


Figura 11.

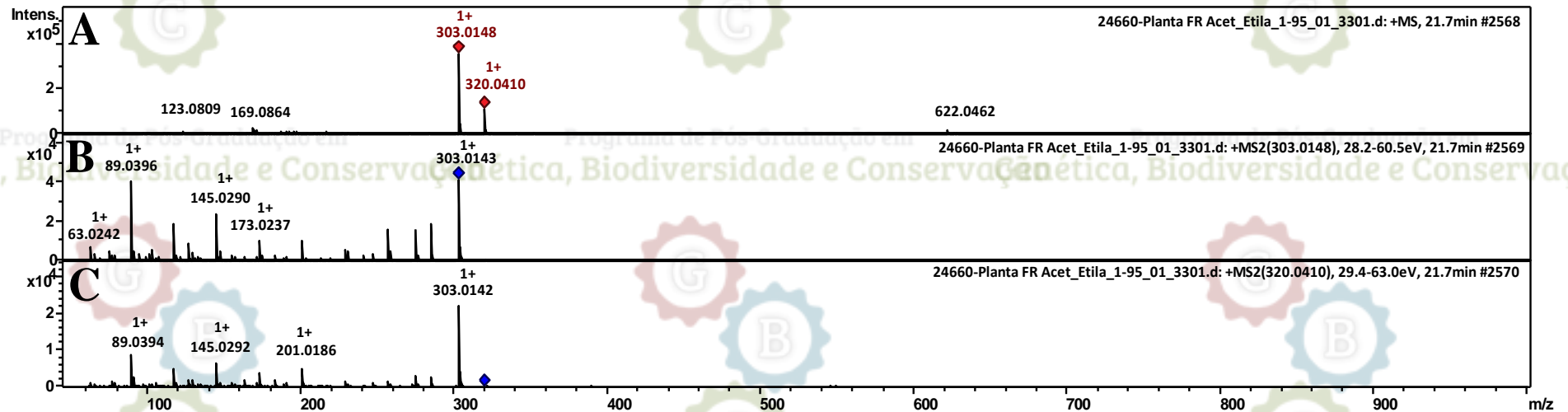


Figura 12.

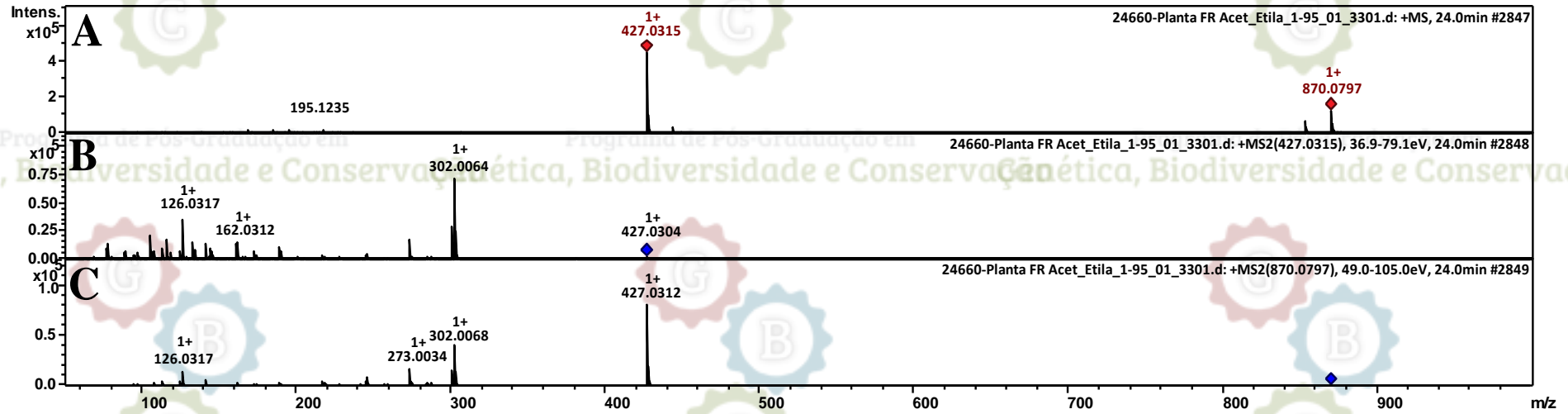


Figura 13.

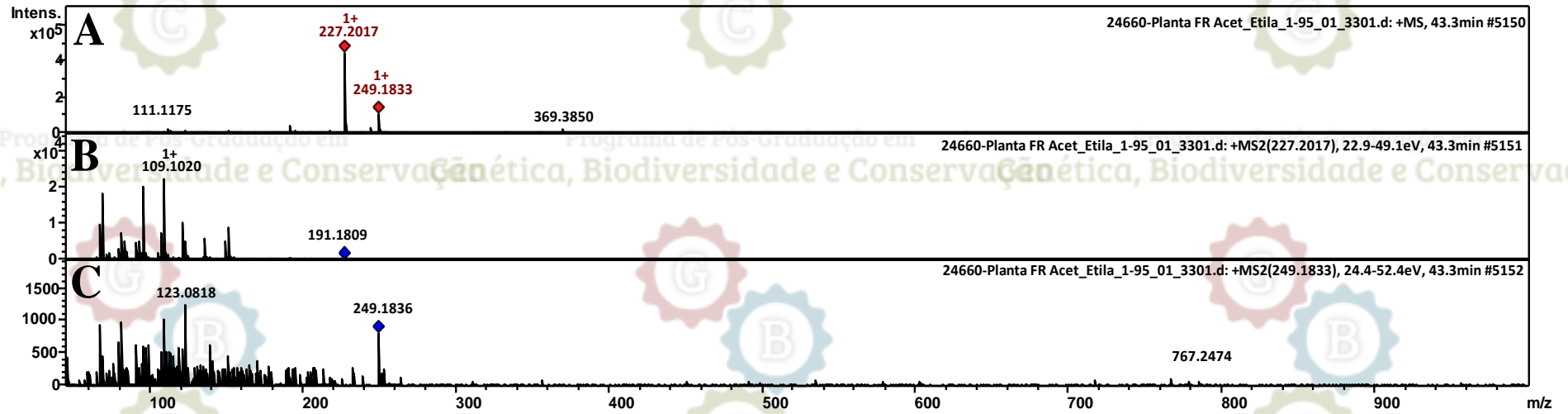


Figura 14.

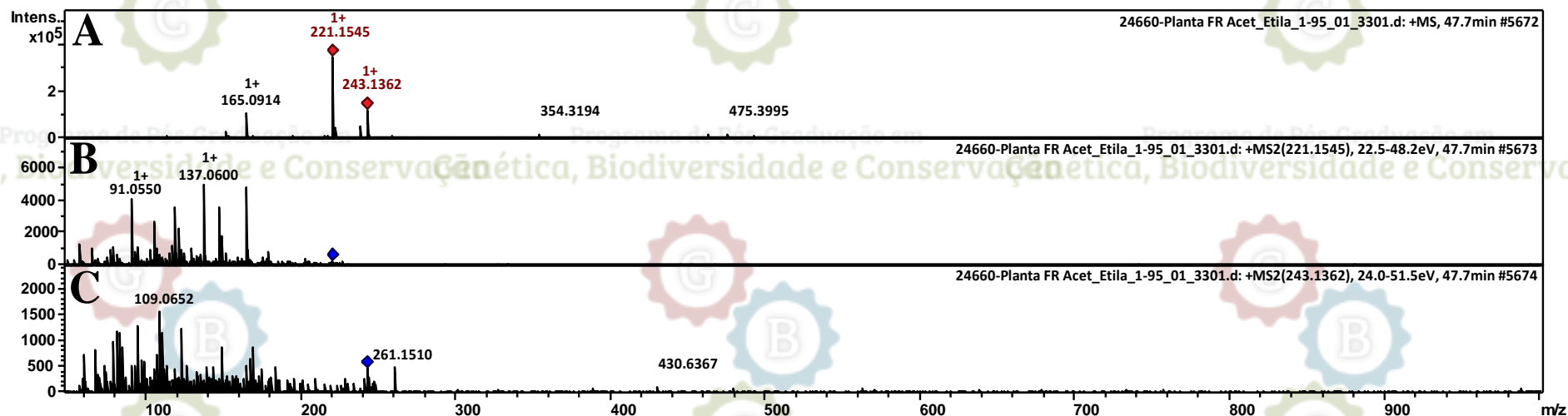


Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato e frações da casca do caule de *M. latifolium*

Bactérias	EBCML		FHCML		FAECML		FBCML		FaqCML	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>S. aureus</i>	500	500	a	a	250	250	a	a	a	a
<i>S. epidermidis</i>	250	250	a	a	50	100	250	500	100	500
<i>K. pneumoniae</i>	250	250	a	a	100	100	250	250	250	250
<i>P. aeruginosa</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>E. coli</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>P. mirabilis</i>	250	250	a	a	100	100	250	250	250	250

EBCML: Extrato etanólico das cascas do caule de *M. latifolium*; FHCML: Fração hexânica das cascas do caule de *M. latifolium*; FAECML: Fração acetato de etila das cascas do caule de *M. latifolium*; FBCML: Fração butanólica das cascas do caule de *M. latifolium*; FaqCML: Fase aquosa das cascas do caule de *M. latifolium*. (a): valores ≥ 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 2. Atividade antiproliferativa do extrato e frações da casca do caule de *M. latifolium* em linhagens de células tumorais e não tumoral

Amostras	IC ₅₀ (µg/mL)			
	MCF7	HCT116	HepG2	MCR5
EBCML	36,14 ^a 25,67 – 43,34	4,95 ^a 3,53 – 7,82	49,91 ^a 32,20 – 57,37	>50 ^a
FHCML	>50 ^b	>50 ^b	>50 ^a	>50 ^a
FAECML	19,85 ^c 14,06 – 28,04	22,06 ^c 14,83 – 32,82	26,43 ^b 19,72 – 35,43	>50 ^a
FBCML	45,55 ^d 30,16 – 58,82	>50 ^b	>50 ^a	>50 ^a
FaqCML	>50 ^b	>50 ^b	>50 ^a	>50 ^a
DOX	1,19 ^e 0,69 – 2,03	0,81 ^d 0,15 – 2,43	0,04 ^c 0,02 – 0,09	0,74 ^b 0,46 – 1,17

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre as amostras pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. EBCML: Extrato etanólico das cascas do caule de *M. latifolium*; FHCML: Fração hexânica das cascas do caule de *M. latifolium*; FAECML: Fração acetato de etila das cascas do caule de *M. latifolium*; FBCML: Fração butanólica das cascas do caule de *M. latifolium*; FaqCML: Fase aquosa das cascas do caule de *M. latifolium*. Resultados apresentam os valores de IC₅₀ e o respectivo intervalo de confiança de 95% obtido a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do Alamar blue após 72 h de exposição com as células MCF7 (carcinoma de mama humano), HCT116 (carcinoma de cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e MCR5 (células de fibroblasto humano) obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prisma versão 5.0. Doxorrubicina (DOX) foi usada como controle positivo.

Tabela 3. Atividade antioxidante do extrato e frações da casca do caule de *M. latifolium*

Amostras	DPPH• IC ₅₀ (µg/mL)	ABTS ^{•+} IC ₅₀ (µg/mL)	Sistema β-caroteno/ácido linoleico IC ₅₀ (µg/mL)
EBCML	9,3±0,11 ^a	4,4±0,03 ^a	13,3±0,31 ^a
FHCML	-	-	10,1±0,28 ^b
FAECML	8,4±0,05 ^b	4,6±0,01 ^a	16,6±0,32 ^c
FBCML	11,0±0,04 ^c	5,7±0,05 ^b	20,9±0,67 ^d
FaqCML	9,3±0,13 ^a	5,1±0,01 ^b	36,8±0,54 ^e
Ácido gálico	4,27±0,04 ^d	1,27±0,02 ^c	-
Trolox	-	-	5,38±0,38 ^f

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre as amostras pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$. EBCML: Extrato etanólico das cascas do caule de *M. latifolium*; FHCML: Fração hexânica das cascas do caule de *M. latifolium*; FAECML: Fração acetato de etila das cascas do caule de *M. latifolium*; FBCML: Fração butanólica das cascas do caule de *M. latifolium*; FaqCML: Fase aquosa das cascas do caule de *M. latifolium*. Resultados apresentam os valores de IC₅₀ e o desvio padrão obtido a partir de três experimentos independentes pelos métodos de captura dos radicais DPPH•, ABTS^{•+} e co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico obtidos por regressão não-linear. Ácido gálico e trolox foram usados como controle positivo.

Tabela 4. Testes de fitoquímica clássica do extrato e frações da casca do caule de *M. latifolium*

Amostras	Testes				
	Acaloides	Triterpenos/esteroides	Saponinas	Taninos	Flavonoides
EBCML	-	+	+	+	+
FHCML	-	+	-	-	+
FAECML	-	+	+	+	+
FBCML	-	+	+	+	+
FaqCML	-	-	+	+	+

EBCML: Extrato etanólico das cascas do caule de *M. latifolium*; FHCML: Fração hexânica das cascas do caule de *M. latifolium*; FAECML: Fração acetato de etila das cascas do caule de *M. latifolium*; FBCML: Fração butanólica das cascas do caule de *M. latifolium*; FaqCML: Fase aquosa das cascas do caule de *M. latifolium*. (+): detectado, (-): não detectado.











Tabela 5. Teor de fenólicos totais do extrato e frações da casca do caule de *M. latifolium*

Amostras	Teor de fenólicos ($\mu\text{g EAG/mg}$)
EBCML	265,1 \pm 0,04 ^a
FHCML	42,2 \pm 0,02 ^b
FAECML	298,3 \pm 0,02 ^c
FBCML	207,0 \pm 0,01 ^d
FaqCML	256,6 \pm 0,04 ^e

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre as amostras pelo teste de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$. EBCML: Extrato etanólico das cascas do caule de *M. latifolium*; FHCML: Fração hexânica das cascas do caule de *M. latifolium*; FAECML: Fração acetato de etila das cascas do caule de *M. latifolium*; FBCML: Fração butanólica das cascas do caule de *M. latifolium*; FaqCML: Fase aquosa das cascas do caule de *M. latifolium*. Resultados apresentam o teor de fenólicos totais e o desvio padrão obtido pelo método espectrofotométrico pelo reagente de Folin-Ciocalteu a partir de experimentos realizados em triplicata sendo o teor de fenólicos totais determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com ácido gálico.

Tabela 6. Tempos de retenção e fragmentos dos íons majoritários encontrados na fração acetato de etila de *M. latifolium* por CLAE-EM/EM nos modos negativo e positivo.

Tempo de retenção (min)	Modo negativo (<i>m/z</i>)		Modo positivo (<i>m/z</i>)		Classe/Compostos
	[M-H] ⁻	Fragmentos	[M-H] ⁺	Fragmentos	
18,9	--	--	471,02	83,01; 139,00; 185,00; 287,02; 453,01	n.d
	--	--	958,06	83,01; 287,02; 407,00; 471,02	n.d
19,2	469,00	270,99; 299,99; 407,61; 425,02	--	--	Triterpenoides do tipo oleanano
21,3	447,06	132,02; 215,00; 299,99	--	--	n.d
	497,13	110,00; 169,01; 221,75; 408,33; 490,72	--	--	n.d
21,7	--	--	303,01	89,04; 145,03; 303,01	n.d
	--	--	320,04	89,04; 303,01	n.d
22,0	603,00	145,03; 185,02; 301,00	--	--	Quercetina aglicona
24,0	--	--	427,03	126,03; 162,03; 302,01; 427,03	n.d
	--	--	870,08	126,03; 302,01; 427,03	n.d
24,4	851,04	244,00; 272,00; 299,99; 425,02	--	--	Triterpenoides do tipo oleanano
27,1	847,01	65,00; 216,01; 299,01; 423,00	--	--	n.d

		--	--			227,20	109,10			n.d
43,3	--	--	--			249,18	123,08; 249,18			n.d
47,7	--	--	--			221,15	137,06			n.d
	--	--	--			243,14	109,06			n.d

Os íons majoritários e seus respectivos fragmentos foram retirados das Figuras 3 a 14. (n.d): não identificado.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em

Genética, Biodiversidade e Conservação

6. CONCLUSÕES GERAIS

Em geral, a espécie *M. latifolium* demonstrou propriedades antibacteriana, antiproliferativa e antioxidante. Esses efeitos parecem depender da presença principalmente de flavonoides do tipo quercetina e triterpenoides do tipo oleanano. Além disso, essa planta não apresentou características de toxicidade sobre células normais, o que corrobora seu potencial terapêutico. Assim, *M. latifolium* pode contribuir para a busca de novas estratégias terapêuticas de desordens infecciosas, cancerígenas e oxidativas.



APÊNDICE

Tabela 7S. Tempos de retenção e fragmentos dos principais íons encontrados na casca do caule de *M. latifolium* por CLAE-EM/EM no modo positivo

Amostra	Tempo de Retenção (min)	[M-H] ⁺	Fragmentos
FBCML	18,8	471,02	83,01; 139,00; 185,00; 287,02; 453,01
		958,06	83,01; 302,00; 407,00; 471,02
	20,9	449,07	145,03; 303,01
		914,16	129,05; 303,01; 449,07
	21,6	303,01	89,04; 145,03; 303,01
		320,04	89,04; 303,01
	43,2	227,20	95,07
		249,18	123,08; 249,18
	47,7	221,15	137,06
		243,14	109,06
FaqCML	20,8	449,07	85,03; 201,02; 303,01
		914,16	129,05; 303,01; 449,07
	43,3	227,20	109,10
		249,18	123,08; 177,13; 249,18
	47,6	221,15	91,05; 137,06
		243,14	109,06; 243,14

FBCML: Fração butanólica das cascas do caule de *M. latifolium*; FaqCML: Fase aquosa das cascas do caule de *M. latifolium*. Os íons e seus respectivos fragmentos foram retirados das figuras 15S-24S, que se encontram em anexo.

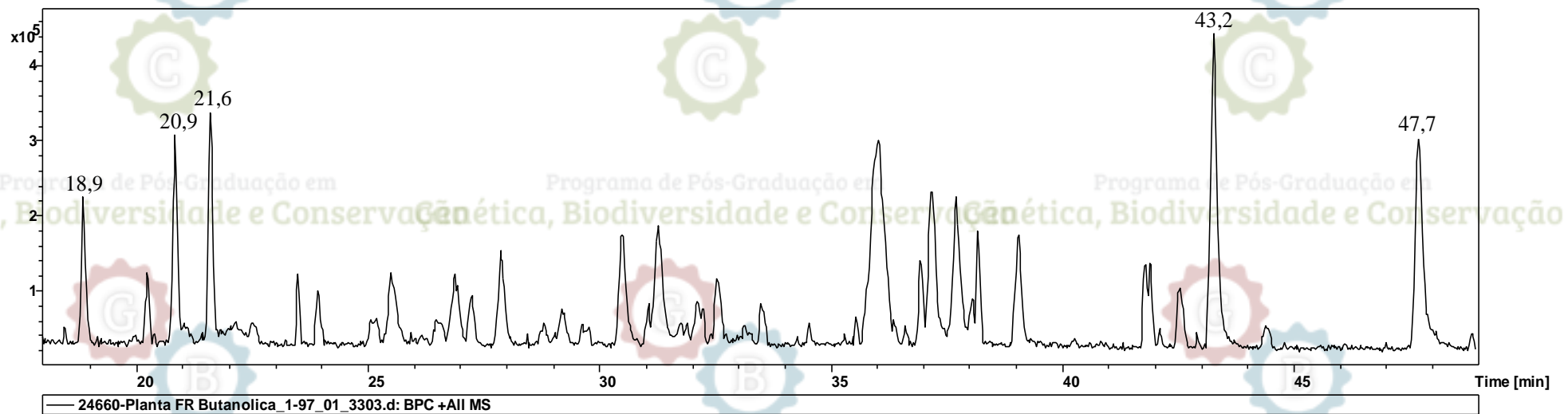


Figura 15S. Cromatograma de íons (expandido) pela técnica de ionização (ESI) (modo positivo) da fração butanólica da casca do caule de *M. latifolium* em 210 nm.

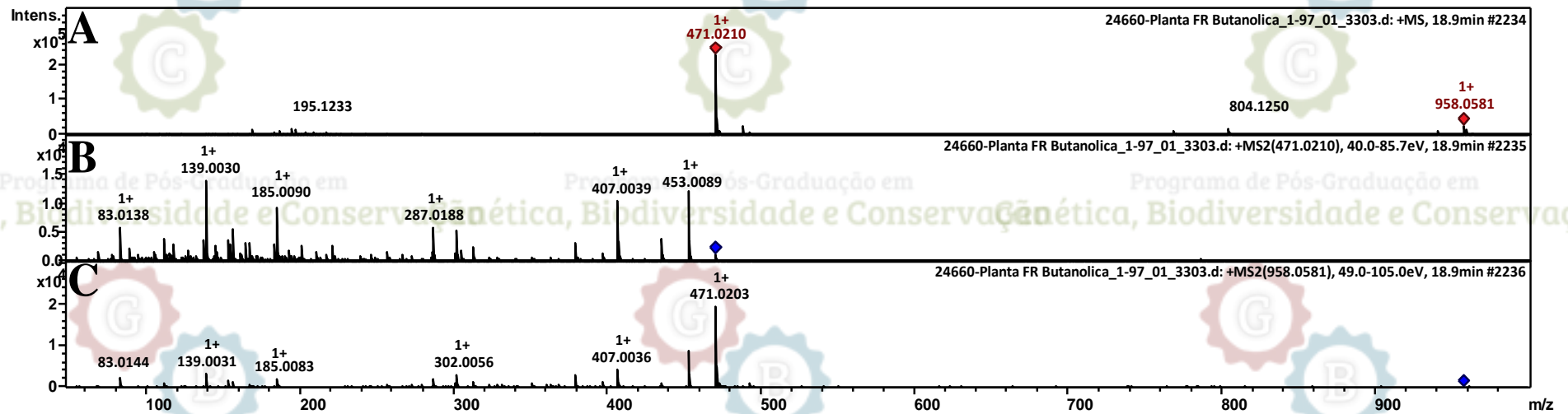


Figura 16S. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 471,01 (B) e 958,05 (C) identificados em 18,9 min.

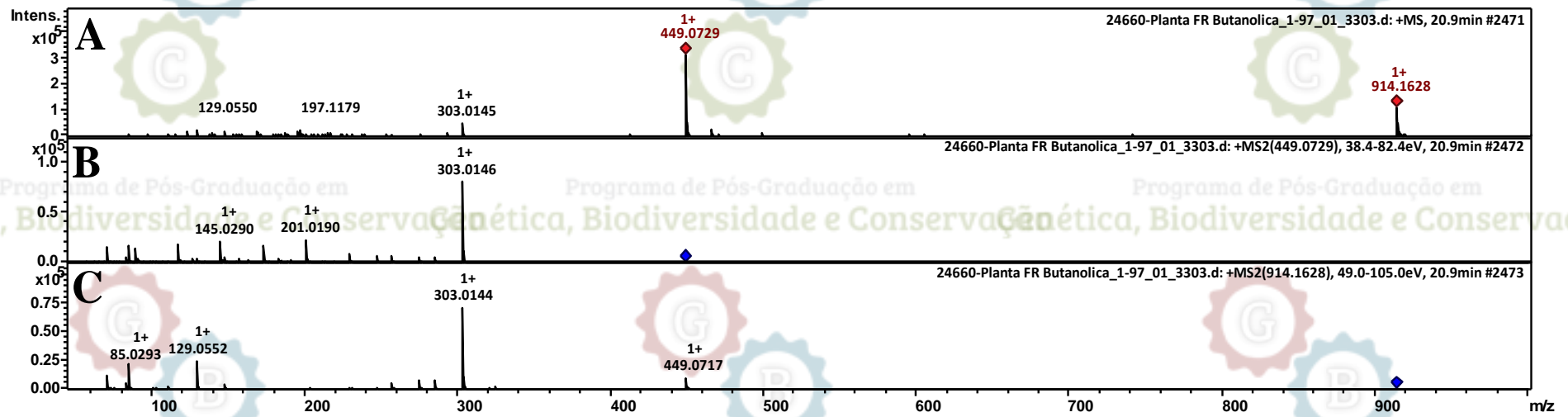


Figura 17S. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 449,07 (B) e 914,16 (C) identificados em 20,9 min.

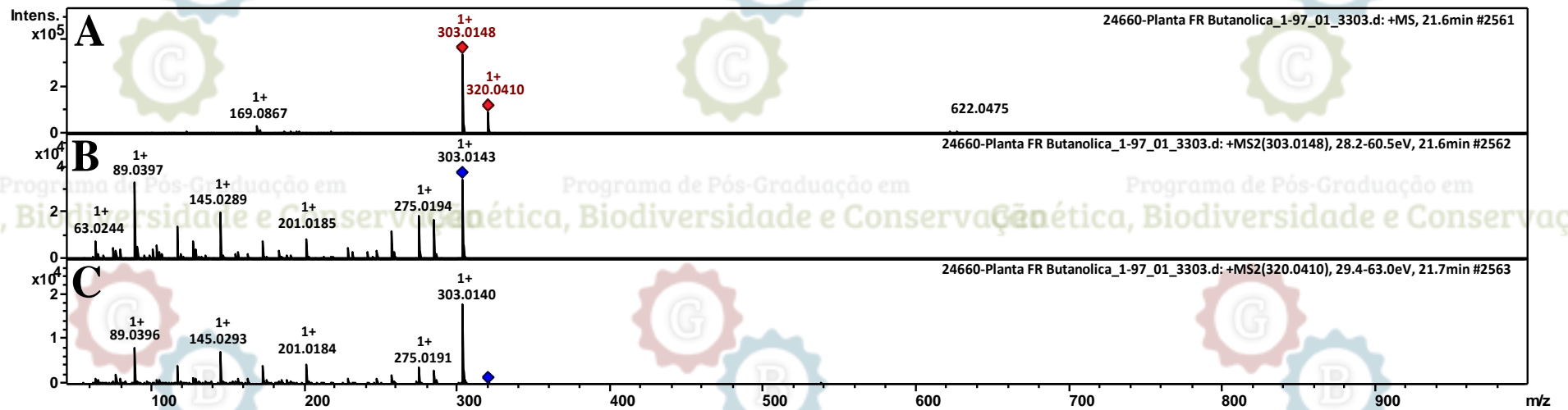


Figura 18S. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 303,01 (B) e 320,04 (C) identificados em 21,6 min.

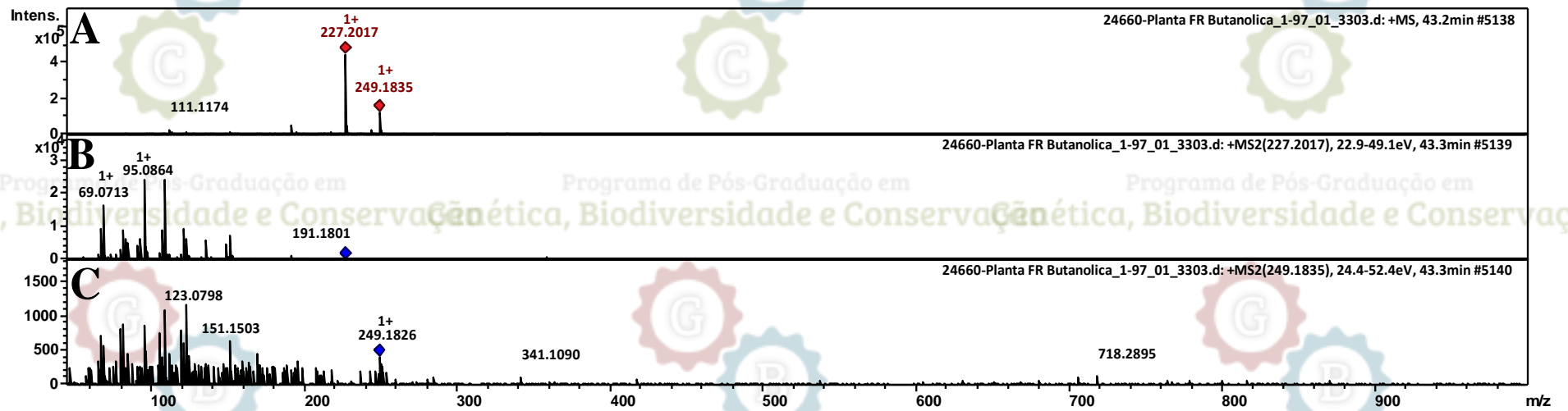


Figura 19S. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 227,20 (B) e 249,18 (C) identificados em 43,2 min.

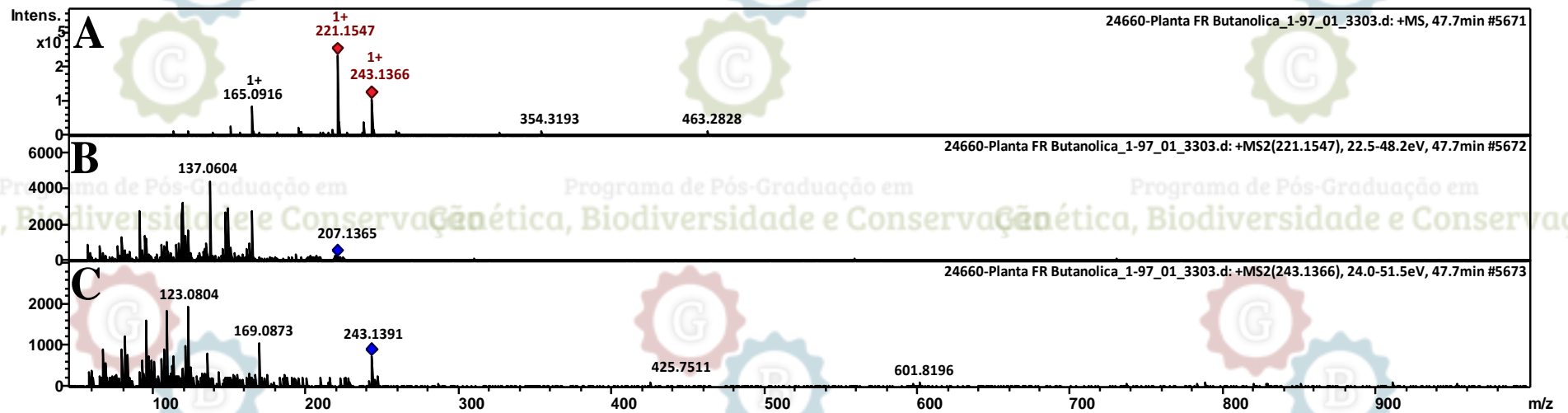


Figura 20S. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 221,15 (B) e 243,13 (C) identificados em 47,7 min.

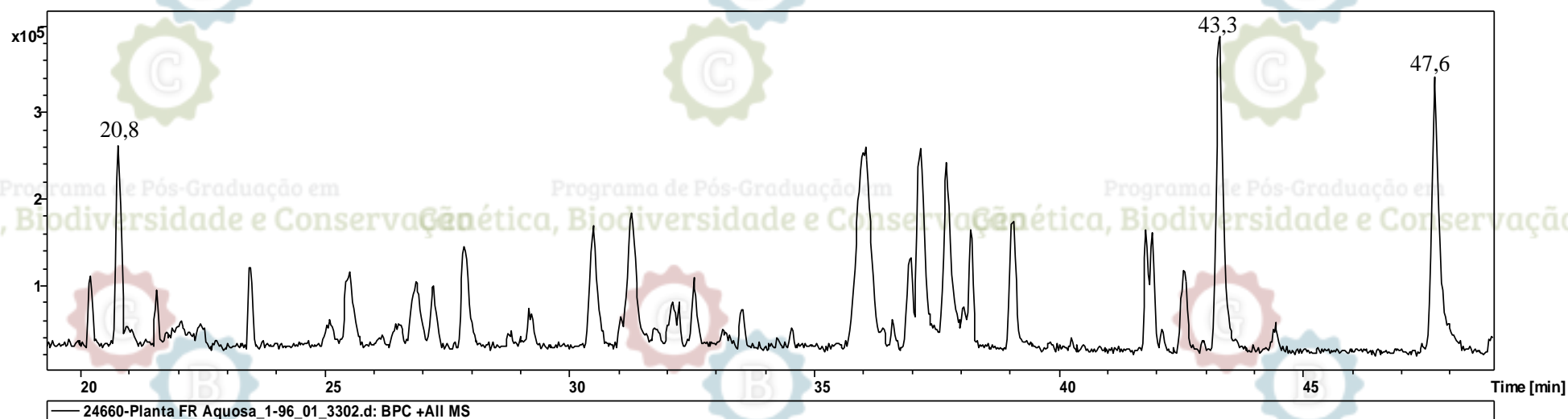


Figura 21S. Cromatograma de íons (expandido) pela técnica de ionização (ESI) (modo positivo) da fase aquosa da casca do caule de *M. latifolium* em 210 nm.

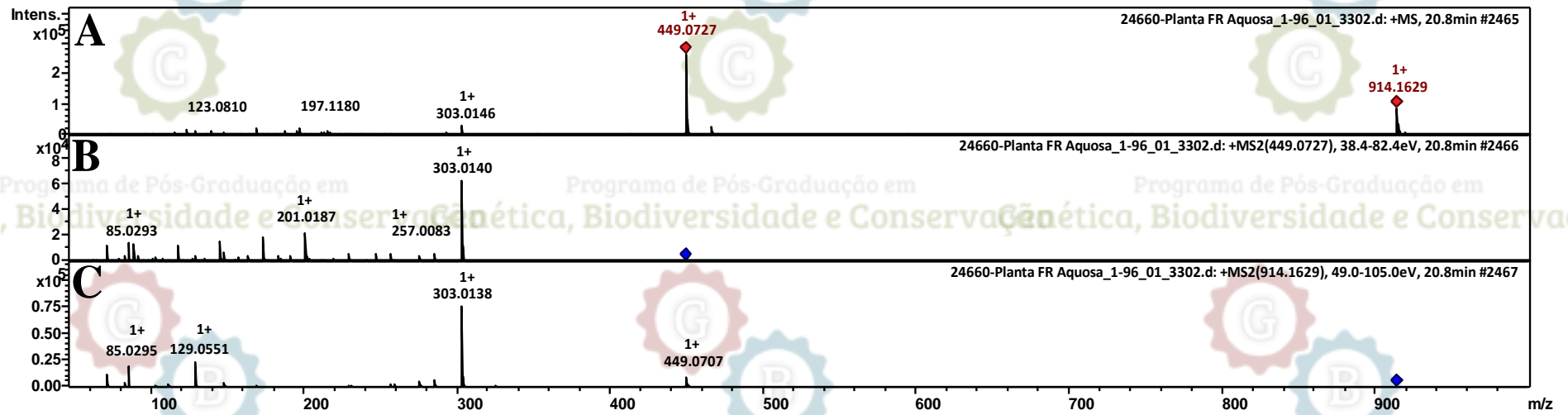


Figura 22S. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 449,07 (B) e 914,16 (C) identificados em 20,8 min.

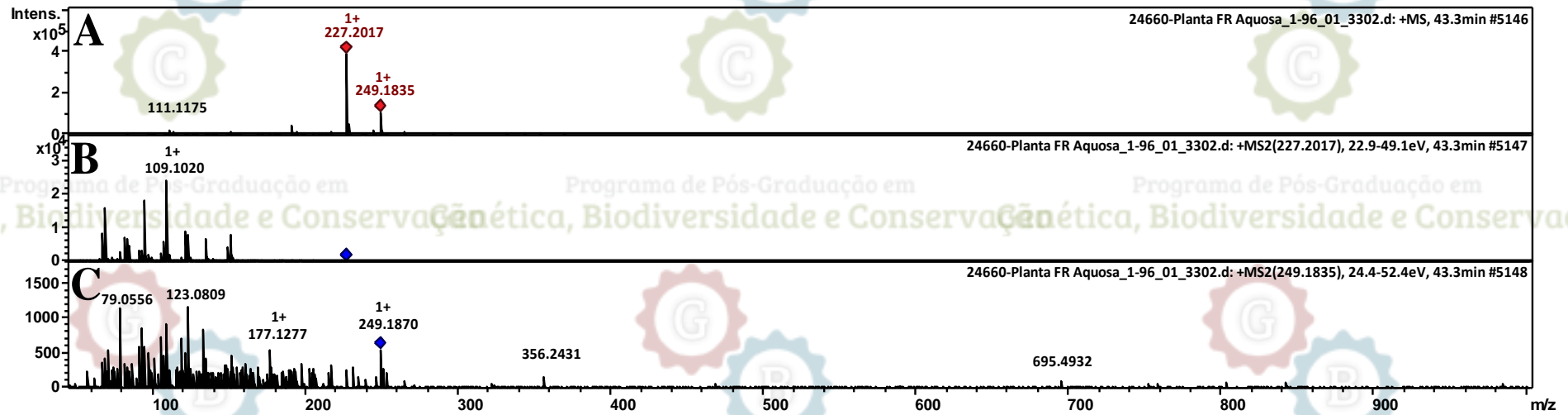


Figura 23S. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 227,20 (B) e 249,18 (C) identificados em 43,3 min.

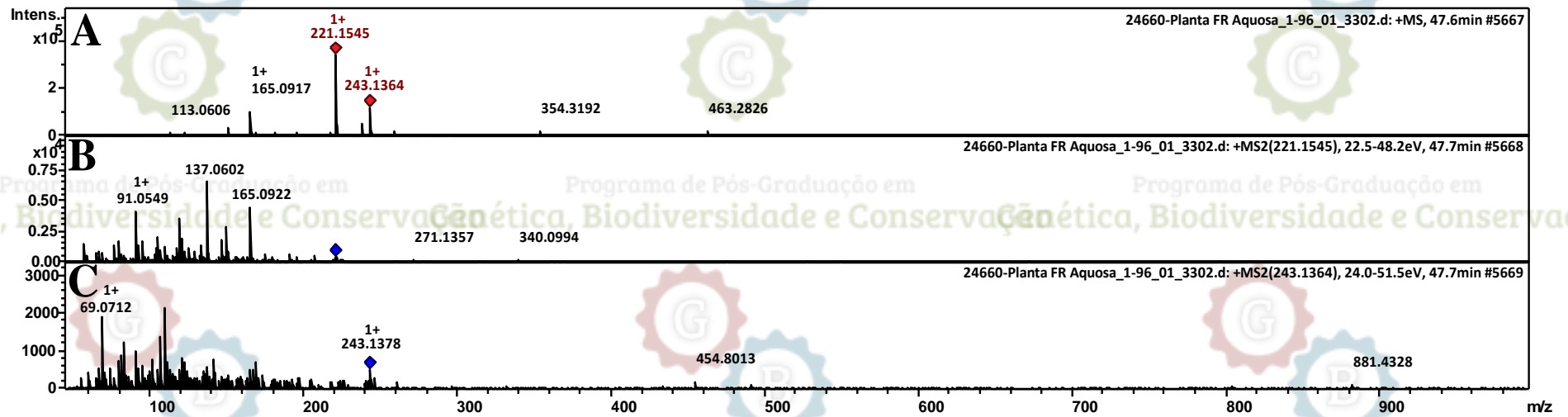
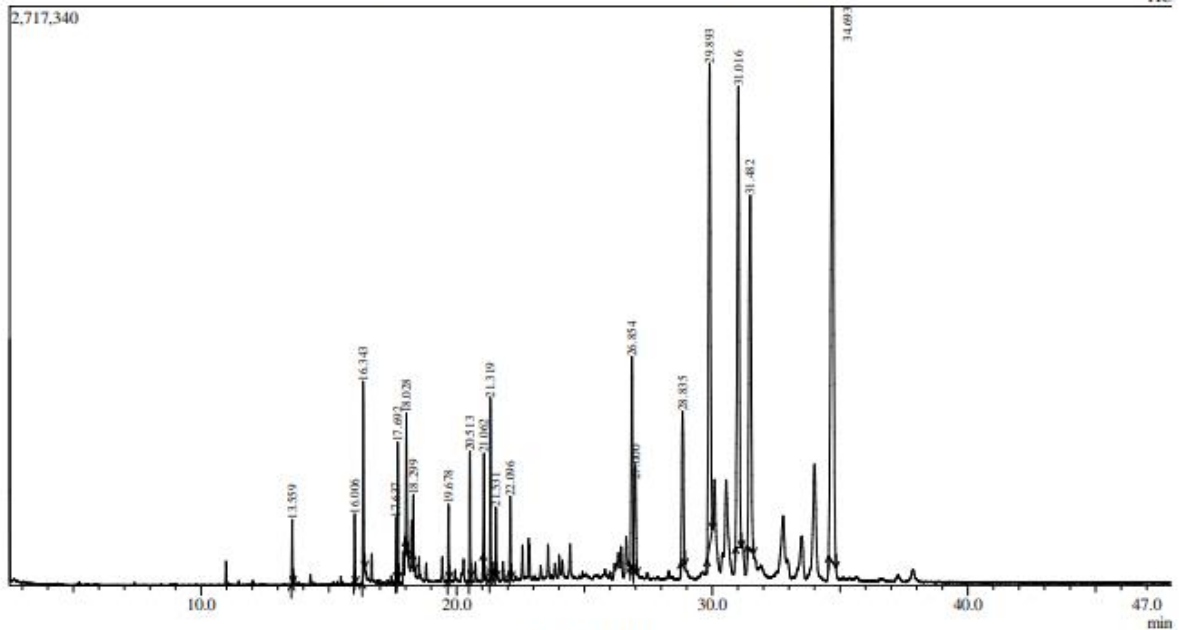


Figura 24S. Espectro de massas (A) pela técnica de ionização (ESI) e fragmentos dos íons com m/z 221,15 (B) e 243,14 (C) identificados em 47,6 min.



Chromatogram Fração Hexânica Planta C:\GCMSsolution\Data\Project1\24662A.QGD



Peak Report TIC									
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	A/H	Mark	Name
1	13.559	13.525	13.600	571353	0.74	298914	1.91		Ethylene diacrylate
2	16.006	15.975	16.042	557298	0.72	316474	1.76		Hexadecanoic acid, methyl ester
3	16.343	16.300	16.400	1925196	2.49	912305	2.11		n-Hexadecanoic acid
4	17.637	17.608	17.658	548770	0.71	288366	1.90		9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester
5	17.692	17.658	17.733	1256331	1.62	638570	1.97	V	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-
6	18.028	17.992	18.092	1364421	1.76	620951	2.20		Oleic Acid
7	18.299	18.267	18.342	506688	0.65	307669	1.65		(E)-9-Octadecenoic acid ethyl ester
8	19.678	19.642	19.717	715476	0.92	353215	2.03		Docosanal
9	20.513	20.475	20.558	1272409	1.64	595978	2.13		Eicosanal-
10	21.062	21.025	21.108	1035613	1.34	525289	1.97		Triacontane
11	21.319	21.275	21.367	1824032	2.36	843831	2.16		Docosanal
12	21.531	21.500	21.567	538066	0.70	312433	1.72		Tricyclo[20.8.0.0(7,16)]triacontane, 1(22),7(1
13	22.096	22.058	22.142	780778	1.01	364097	2.14		Docosanal
14	26.854	26.792	26.917	3826717	4.94	991189	3.86		Vitamin E
15	27.000	26.917	27.058	2145644	2.77	429735	4.99	V	Dimethyl[bis[(4,8,8-trimethyldecahydro-1,4- α
16	28.835	28.767	28.925	3326570	4.30	712984	4.67		Stigmasterol
17	29.893	29.792	30.008	12502345	16.15	2262661	5.53		γ -Sitosterol
18	31.016	30.900	31.133	12838405	16.58	2161905	5.94		Lup-20(29)-en-3-one
19	31.482	31.375	31.608	10210645	13.19	1661441	6.15		Lup-20(29)-en-3-ol, acetate, (3 β .)-
20	34.693	34.550	34.842	19664983	25.40	2603456	7.55		Friedelan-3-one
				77411740	100.00	17201463			

Figura 25S. Cromatograma de íons totais da fração hexânica. A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas de amostras com aqueles existentes no NIST versão 14.

