

Elielson Rodrigo Silveira

**Caracterização química de *Conchocarpus macrocarpus*  
(Engl.) Kallunki & Pirani biomonitorada com atividades  
biológicas**

São Paulo

202



**Elielson Rodrigo Silveira**

**Caracterização química de *Conchocarpus macrocarpus* (Engl.)  
Kallunki & Pirani biomonitorada com atividades biológicas**

**Chemical characterization of *Conchocarpus macrocarpus* (Engl.)  
Kallunki & Pirani guided by biological activities**

EXEMPLAR CORRIGIDO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo, para a obtenção de  
Título de Mestre em Ciências, na Área de Botânica

Orientadora: Profa Dra Déborah Yara Alves Cursino dos Santos

São Paulo

2021

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Silveira, Elielson Rodrigo**

**Caracterização química de *Conchocarpus macrocarpus* (Engl.) Kallunki & Pirani biomonitorada com atividades biológicas**

**169 páginas**

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica.

1. Rutaceae. 2. Composição química. 3. Atividades biológicas

Instituto de Biociências. Departamento de Botânica

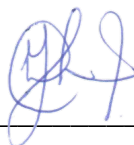
## COMISSÃO JULGADORA:

---

Prof(a). Dr(a)

---

Prof(a). Dr(a)



---

Profa Dra Déborah Y. A. C. dos Santos

Orientadora

*Aos meus pais, Rosa e Silvio,  
por terem sempre apoiado minha trajetória,  
dedico esse trabalho.*



“[...] *talvez seja capaz de mais do que imagina* [...]”

L. Frank Baum – O Mágico de OZ



## Agradecimentos

---

Essa é a parte do trabalho em que posso escrever em primeira pessoa. Aproveito para deixar registrado a primeira memória que me vem a mente quando me perguntam quando eu decidi ser botânico. Pois bem, por volta dos meus 5 anos eu não queria ficar com minha avó para deixar minha mãe ir trabalhar, então ela propôs que eu poderia escolher um presente caso eu a deixasse ir. Sem pensar duas vezes, respondi: *um galho de ipê*. Com 5 anos eu decidi que queria ser botânico, entretanto, o caminho até aqui não teria sido traçado se não fosse os colaboradores, professores, amigos e colegas, que foram fundamentais na realização dessa pesquisa, ou tornaram possível minha caminhada até aqui. A pesquisa nunca é feita sozinha, e os nomes citados aqui são prova disso.

Agradeço aos meus pais. Meu pai não é biólogo, mas tem a alma de um. Ele é daqueles que entra no meio da mata e sente prazer em me contar o nome de tudo ali em volta, ou quando não estou junto, guarda para mim uma sementinha, um ramo de alguma planta que talvez eu não conheça. Minha mãe é o motor da família, batalhadora, alegre, pulso firme. Os dois juntos não medem esforços para ver os filhos estudando e traçando bons caminhos, e isso deixa tudo mais fácil. Agradeço também aos meus irmãos, William e Ruan por todo amor e carinho, além da minha cunhada Estefânia que se tornou uma irmã do coração.

A professora Déborah merece um capítulo só para este fim. Agradeço por ter me lapidado com tanta maestria, por ter me dado todo suporte ao longo do mestrado, por ter investido fins de semana lendo minhas coisas para que conseguíssemos entregar algo a tempo, por ter me motivado a seguir em frente em momentos de aflições. Obrigado pelos conselhos, cafés, confiança e inspirações. Quando eu crescer quero ser igual a você.

Agradeço a professora Érika, minha querida orientadora de iniciação científica. Você foi uma peça chave na minha vida acadêmica, com tanta didática



nas aulas da graduação, e com tantos ensinamentos nas correções dos meus primeiros textos científicos. Carregarei para sempre o respeito, admiração e amizade que construímos. Aproveito para agradecer outras pessoas incríveis que conheci durante meu período de IC: o Jefferson, que tanto me ensinou sobre rotina de laboratório, ensaios antimicrobianos; e também agradeço a professora Dra. Ivana Suffredini, por todos ensinamentos. Além disso, obrigado aos dois pela colaboração nos ensaios antimicrobianos, é sempre bom trabalhar com vocês.

Tenho muito a agradecer a outros pesquisadores que tive o prazer em contar com a colaboração nesse trabalho. A Dra. Priscilla (Pri), pela ajuda em vários ensaios, além de outras colaborações paralelas ao meu mestrado. À professora Dra. Katia e ao professor Dr. Hugo, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pela colaboração nos ensaios antioxidantes. Ao professor Dr. Pirani, pela identificação da espécie e também pela colaboração com nosso trabalho de cera. À professora Dra. Letícia Lotufo e a doutoranda Larissa, pela colaboração no ensaio antiproliferativo. Além disso, agradeço a professora Dra. Gladys Flávia pela coleta do material vegetal.

À nossa querida técnica Mourisa, que sem dúvida é a alma do nosso laboratório. Obrigado por toda ajuda e conselhos (além das broncas carinhosas). Agradeço também aos outros técnicos: a Aline por todas injeções nos cromatógrafos e principalmente pela paciência em me ensinar a usar o CLAE semipreparativo, ao Leandro por manter nosso laboratório organizado, além da Suzie, a qual guardo um enorme carinho.

Aos amigos da sala 144, por todos momentos e conhecimentos compartilhados. Vocês fazem da nossa sala um ambiente extremamente agradável de se estar, e o reflexo disso é nossa sala sempre cheia (mesmo com alunos das outras salas). Um agradecimento especial a Tamara, que me recebeu no grupo e fez com que eu me sentisse acolhido, que tanto me ajudou durante essa caminhada, e por poder contar com sua amizade que certamente vai muito além da pós graduação. Também agradeço ao Lucas por sempre dividir seu conhecimento, por ter me ensinando tanto sobre cera, pela colaboração em nosso artigo, o qual me trouxe muito aprendizado.

Agradeço aos professores da fitoquímica. Ao professor Marcelo, por todas as dicas, ensinamentos em disciplinas e em laboratório, assim como a professora Cláudia. À professora Maria Luiza, pelas prazerosas conversas durante o café e ao professor Salatino, a pessoa mais culta que tive a honra de conhecer e dividir bancada.

Além disso, agradeço aos amigos do laboratório. À Ju, pela linda amizade que construímos. Certamente você foi uma das melhores coisas que a fitoquímica me deu, e obrigado também por sempre tirar minhas dúvidas de química e sempre ouvir meus desabafos da vida. O Sr. Wilton, que também foi uma das primeiras amizades que fiz no laboratório. Todos alunos que tive o prazer de dividir uma bancada, ou uma pizza, ou um bar depois do trabalho. Vocês foram essenciais!

Pelos amigos fora do laboratório, por terem entendido minha ausência em tantos momentos. Obrigado por não desistirem de me convidar para sair, ou de fazer alguma coisa, mesmo depois de tantas vezes que desmarquei por estar ocupado demais com a pós graduação. Obrigado também por me ouvirem falar por horas sobre Rutaceae, metabolismo secundário e tantos outros assuntos que 90% não tinha sentido para vocês.

Por fim, agradeço ao CNPq (130087/2019-0) e a Capes pelo auxílio financeiro que permitiu a execução desse trabalho.

À todos, muito obrigado uai!



## Sumário

<b>Introdução Geral .....</b>	<b>1</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>2</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>4</b>
1.1 Metabólitos secundários – visão geral.....	4
1.2 Potenciais atividades biológicas dos metabólitos secundários.....	9
1.3 Rutaceae – visão geral.....	11
1.4 Gênero <i>Conchocarpus</i> (J.C.Mikan) .....	13
1.5 Uso de redes moleculares na caracterização fitoquímica.....	19
<b>2 Justificativa .....</b>	<b>20</b>
<b>3 Ojetivo Geral .....</b>	<b>21</b>
<b>4 Referências bibliográficas .....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>32</b>
Resumo.....	33
Abstract .....	34
<b>1 Introdução .....</b>	<b>35</b>
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>36</b>
<b>3 Materiais e Métodos .....</b>	<b>36</b>
3.1 Obtenção do material .....	36
3.2 Preparação do extrato etanólico bruto (EB) e fases de partição (FP).....	36
3.3 Análises Cromatográficas.....	37
3.3.1 Cromatografia a Gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) .....	37
3.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD).....	38
3.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espetrometria de massas de alta resolução (CLAE-MS/MS).....	38
<b>4 Resultados e Discussão .....</b>	<b>40</b>
4.1 Análise do Perfil Cromatográfico dos extratos por CLAE-DAD.....	40
4.2 Identificação das substâncias majoritárias .....	40

4.3 Análise do perfil cromatográfico das fases de partição apolares por CG-EM .....	45
4.4 Identificação das substâncias da fase de partição butanólica (Fo-BuOH) por CLAE-EM/EM .....	51
4.5 Identificação dos picos cromatográficos das fases de partição em Hexano e em Diclorometano (Fo-HxDCM) por CLAE-EM/EM .....	58
<b>5 Referências bibliográficas .....</b>	<b>65</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>71</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>72</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>73</b>
<b>1 Introdução .....</b>	<b>74</b>
<b>2 Materiais e métodos .....</b>	<b>76</b>
2.1 Coleta do material e preparação dos extratos e fases de partição .....	76
2.2 Cromatografia em coluna de sílica de topo aberto .....	76
2.3 Cromatografia em coluna de Sephadex .....	76
2.4 Ensaio da inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase .....	77
2.5 Ensaio da atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	80
2.6 Ensaio de atividade antiproliferativa .....	80
2.7 Avaliação da toxicidade e atividade antioxidante das amostras em células RAW .....	81
2.8 Ensaio antimicrobiano .....	83
<b>3 Resultados.....</b>	<b>84</b>
3.1 Ensaio iniciais .....	84
3.1.1 Atividade antiacetilcolinesterásica .....	84
3.1.2 Potencial antioxidante <i>in vitro</i> .....	85
3.1.3 Atividade antiproliferativa .....	87
3.2 Bioensaios específicos .....	88
3.2.1 Avaliação da toxicidade e atividade antioxidante das amostras em células RAW .....	89
3.2.2 Atividade antimicrobiana .....	91
<b>4 Discussão .....</b>	<b>95</b>
4.1 Atividade antiacetilcolinesterásica .....	95
4.2 Potencial antioxidante.....	96
4.3 Ensaio antimicrobiano .....	98
4.4 Atividade antiproliferativa.....	100
<b>5 Referências bibliográficas .....</b>	<b>102</b>

<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>109</b>
Resumo.....	<b>110</b>
Abstract .....	<b>111</b>
<b>1 Introdução</b> .....	<b>112</b>
<b>2 Materiais e métodos</b> .....	<b>114</b>
2.1 Obtenção dos óleos voláteis.....	114
2.2 Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)....	114
2.3 Ensaio antimicrobiano .....	115
2.4 Preparo das amostras .....	115
2.5 Microdiluição em caldo .....	116
<b>3 Resultados e Discussão</b> .....	<b>116</b>
3.1 Identificação dos compostos de óleo volátil.....	116
3.2 Atividade antimicrobiana.....	119
<b>4 Referências bibliográficas</b> .....	<b>123</b>
<b>Considerações finais</b> .....	<b>132</b>
Resumo Geral .....	<b>136</b>
Abstract .....	<b>138</b>
<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>140</b>
<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>151</b>
<b>APÊNDICE C</b> .....	<b>160</b>



## *Introdução Geral*

---



## Resumo

---

Rutaceae pertence a ordem Sapindales, compreendendo cerca de 155 gêneros e 1.600 espécies, sendo descritos no Brasil 32 gêneros e 194 espécies. Muitos membros dessa família possuem importância econômica, notadamente as espécies do gênero *Citrus* com frutos comestíveis (diversas variedades e cultivares de laranja, limões, tangerinas, limas). Além disso, várias espécies são utilizadas na medicina popular, tais como *Citrus sinensis*, cujo extrato das folhas apresenta propriedades analgésicas e digestivas, além de espécies de *Pilocarpus* que são fonte de pilocarpina, alcaloide utilizado no tratamento de glaucoma. Rutaceae apresenta grande variedade de metabólitos secundários, sendo muitos de grande complexidade estrutural e com grande diversidade de atividades biológicas. Dentre as diversas classes de metabólitos secundários encontrados se destacam os alcaloides, em especial os derivados de ácido antranílico, como os furanoquinolínicos e acridônicos, sendo estes últimos exclusivos de Rutaceae. *Conchocarpus*, um dos gêneros dessa família, possui 47 espécies, sendo a maioria endêmica do Brasil. Dentre as 47 espécies, apenas sete já foram investigadas em estudos fitoquímicos, tendo sido relatados alcaloides do tipo furoquinolínicos e quinolínicos, flavonoides, cumarinas, entre outros metabólitos. Diversas atividades biológicas também já foram associadas a essas espécies, entre elas, antioxidante, anticolinesterásica e antiproliferativa. Dessa forma, reconhecendo-se a importância econômica de Rutaceae, assim como os dados já relatados para *Conchocarpus*, o principal intuito deste trabalho foi analisar a composição química e o potencial biológico dos extratos etanólicos foliar e caulinar de *Conchocarpus macrocarpus*.

**Palavras-chave:** *Conchocarpus*, composição química, atividades biológicas, Rutaceae





## Abstract

---

Rutaceae belongs to Sapindales, comprising about 155 genera and 1,600 species. In Brazil 32 genera and 194 species are described. This family contains many members with economic importance, notably species of the genus *Citrus* due its edible fruits (several varieties and cultivars of oranges, lemons, tangerines and limes). In addition, several species are used in folk medicine, such as *Citrus sinensis*, from which leaf extract has analgesic and digestive properties, as well as species of *Pilocarpus* which are source of pilocarpine, an alkaloid used in the treatment of glaucoma. Rutaceae presents a wide variety of secondary metabolites, many with great structural complexity and with a great diversity of biological activities. Among these secondary metabolites, the alkaloids stand out, especially those derived from anthranilic acid, such as furoquinolinic and acridinic, the latter exclusive of Rutaceae. *Conchocarpus*, one of the genus of this family, has 47 species, most of which endemic to Brazil. Among the 45 species, only seven have been chemically investigated, with furoquinolinic and quinolic alkaloids, flavonoids, coumarins, among other metabolites beeing reported. Several biological activities have also been associated with these species, including antioxidant, anticholinesterase and antiproliferative. Thus, recognizing the economic importance of Rutaceae as well as the data already reported for *Conchocarpus*, the main purpose of this study was to analyze the chemical composition and biological potential of foliar and stem ethanolic extracts of *Conchocarpus macrocarpus*.

**Keywords:** *Conchocarpus*, chemical composition, biological activities, Rutaceae



# Introdução

---

Atualmente, observa-se o ressurgimento da medicina natural enfatizando as plantas medicinais para restabelecimento da saúde humana. Um dos fatores que contribui para a larga utilização de plantas para fins medicinais no Brasil é o grande número de espécies vegetais encontradas no país (BORBA; MACEDO, 2006). O uso milenar de plantas relacionado ao seu potencial medicinal serve como base de estudo para a produção de novos fármacos (MACEDO; PACHECO, 2001), sendo a maioria desses compostos oriunda do metabolismo secundário vegetal (Santos, 2015).

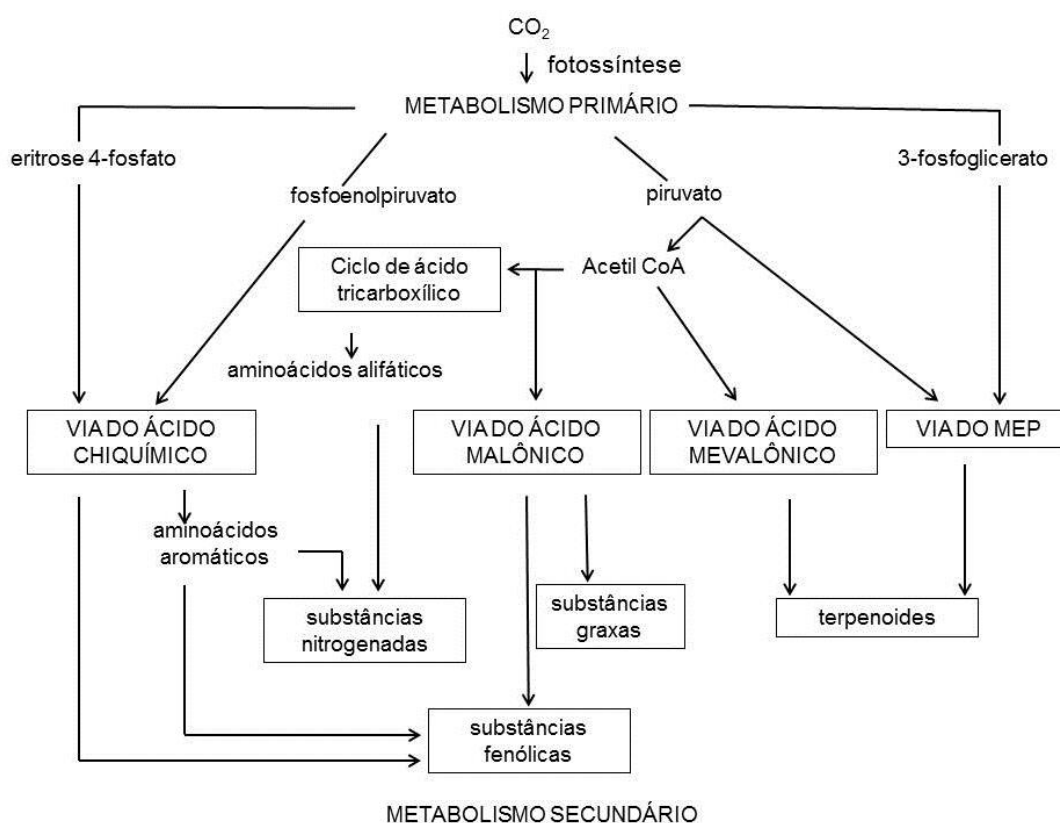
## **1.1 Metabólitos secundários – visão geral**

Define-se como metabolismo vegetal o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células e pode ser dividido, didaticamente, em primário e secundário. Entende-se por metabolismo primário, os processos metabólicos que desempenham uma função essencial nos vegetais, tais como a fotossíntese e a respiração, ao passo que considera-se como metabolismo secundário a biossíntese de estruturas complexas como alcaloides, terpenoides e derivados de fenilpropanoides, encontrados em grupos específicos de organismos e que se constituem como uma expressão da individualidade da espécie (ALVES, 2001).

As plantas possuem uma grande variedade de compostos químicos distintos dos produtos do metabolismo primário nomeados conjuntamente de metabólitos secundários ou especiais, os quais, no passado, eram vistos como desperdício resultante de “erros” do metabolismo primário e, portanto, de pouca importância no desenvolvimento e crescimento das plantas (BENNETT; WALLSGROVE, 1994). Entretanto, estudos atuais demonstram que essa grande diversidade de metabólitos secundários tem papel crucial como componentes de defesa contra herbívoros e/ou microrganismos, uma vez que plantas são sésseis

e não podem fugir quando atacadas por predadores e parasitas. Além disso, atuam como componentes sinalizadores para atrair polinizadores e animais dispersores de sementes, entre outras funções (WINK, 2013).

Os produtos naturais (ou metabólitos secundários) podem ser divididos, de maneira simplificada, em três grandes grupos: os terpenoides, os alcaloides e os compostos fenólicos, formados por poucas vias biossintéticas que utilizam precursores provenientes do metabolismo primário (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema geral das vias de síntese dos metabólitos secundários e suas ligações com o metabolismo primário. Baseado em Taiz & Zeiger (2009).

Os terpenoides constituem a maior classe de produtos secundários. As diversas substâncias dessa classe são, em geral, insolúveis em água e sintetizadas pelas vias do acetato-mevalonato (MEV) e/ou do metil-eritritol fosfato (MEP) a partir de acetil-CoA ou de intermediários glicolíticos (TETALI, 2019)

A via do MEV ocorre no citosol das células, enquanto a via do MEP ocorre dentro dos cloroplastos sendo, portanto, presente apenas em organismos

fotossintetizantes. Tanto por uma via, ou por outra, são formadas unidades de cinco carbonos, denominadas isopentenilpirofosfato (IPP), popularmente conhecidas como isoprenos (CHAVES; MELIS, 2018). A quantidade de unidades isoprênicas dará nome aos diferentes grupos de terpenoides.

Certos terpenos desempenham função bem característica no crescimento e desenvolvimento do vegetal (MEWALAL et al., 2017), como por exemplo, as giberelinas, importantes na germinação de sementes, alongamento caulinar e expansão foliar de espécies vegetais (YAMAMURA et al., 2018). Os terpenoides também podem atuar na coloração de partes das plantas, como o caso dos carotenoides, que dão a coloração vermelha, amarela e laranja, ajudando na atração de um grande número de insetos, por exemplo (BONCAN et al., 2020).

Limonoides, por exemplo, constituem uma classe de terpenos oxigenados, amplamente conhecidos por sua ação anti-herbívoria. Assim como as lactonas sesquiterpênicas, essas substâncias apresentam um sabor amargo para humanos e outros mamíferos, causando um impacto negativo comercialmente para, por exemplo, certas variedades de *Citrus*, como laranja, toranja e limão (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000; ROY; SARAF, 2006). Em um estudo feito por (SZCZEPANIK et al., 2005), foi determinado que o anel furano e o grupo epoxi presente nos limonoides de *Citrus*, como a limonina, estão intimamente ligados com a alta atividade biológica dessas substâncias, como por exemplo, a atividade anti-herbívora contra *Leptinotarsa decemlineata* Say, conhecido popularmente como besouro colorado. A azadiractina, atualmente comercializada pelo seu alto poder de repelência de insetos, é um limonoide extraído originalmente de *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000).

No caso dos óleos voláteis (OV), os principais terpenos encontrados são monoterpenos e sesquiterpenos, sendo de grande importância para as plantas na atração de polinizadores ou mesmo na repelência de insetos e pragas (BONCAN et al., 2020). Estima-se que existam cerca de 300 OV de grande importância comercial no mundo, sendo que um dos principais é o óleo volátil de laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), produzido no Brasil como subproduto da indústria de sucos

(BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). O limoneno é seu principal componente, muito utilizado na indústria farmacêutica em medicamentos usados na neutralização da azia, além de ser utilizado na prevenção e tratamento contra alguns tipos de cancer (CHEN; DA FONSECA; SCHÖNTHAL, 2018). Além do limoneno, outros monoterpenos presentes no OV da laranja, como o mirceno e a 1,2-epóxi-pulegona, apresentam atividade inseticida decorrente da inibição de acetilcolinesterase nos insetos (BRUNO et al., 1999).

Outro grande grupo de metabólitos secundários são os nitrogenados, como é o caso dos alcaloides, os glicosídeos cianogênicos e os glicosinolatos, muito importantes devido a toxicidade e usos medicinais (VETTER, 2000).

Os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos que apresentam, pelo menos, um átomo de nitrogênio ligado ao seu anel derivado de um aminoácido precursor. Os principais aminoácidos que dão origem a quase totalidade dos alcaloides são a ornitina, a lisina, a tirosina e o triptofano (BUSH; FANNIN, 2009). Os alcaloides podem ser encontrados em cerca de 20% das espécies de plantas vasculares, sendo a maior parte deles associados a defesa contra predadores, principalmente mamíferos (BABBAR, 2015). Quando ingeridos em grande quantidade, praticamente todos os alcaloides são tóxicos para humanos, como por exemplo, a estricnina, a atropina e aconiina, obtidos da cicuta (*Conium maculatum* L. - Apiaceae). Muitos, entretanto, são farmacologicamente úteis como a codeína, a morfina e a escopolamina. Além disso, existem vários outros exemplos de alcaloides de uso não medicinal no dia-a-dia, como a cafeína e a nicotina (BABBAR, 2015).

Testes de atividades biológicas com alcaloides foram feitos com muitas espécies vegetais. Atividades citotóxica, antimicrobiana, antiparasítica, além de inibidoras contra tripanossomas foram relacionadas a alcaloides do tipo acridínicos, comuns em espécies de Rutaceae (MICHAEL, 2017).

Outra grande classe de metabólitos secundários são os compostos fenólicos (CARTEA et al., 2011), substâncias que apresentam pelo menos um grupo hidroxila funcional em um anel aromático. Em plantas, estas substâncias

são principalmente sintetizadas pela via do ácido chiquímico, havendo, porém, várias substâncias fenólicas formadas pela via do acetato-malonato.

Esse grupo quimicamente diverso apresenta uma variedade de funções nos vegetais. Muitos agem na defesa contra herbívoros e patógenos, enquanto outros têm função como atrativos de polinizadores e dispersores de sementes, na proteção contra radiação ultravioleta, no suporte mecânico ou mesmo agindo como composto alelopático, reduzindo o crescimento de plantas competidoras adjacentes (Taiz & Zeiger, 2009).

Os compostos fenólicos apresentam diversas atividades biológicas, como propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antivirais, antialérgicas e antitumorais (SOTO-HERNÁNDEZ; TENANGO; GARCÍA-MATEOS, 2017), além de possuírem atividade antioxidante e inibirem a atividade de muitas enzimas, como as xantina-oxidases (PIETTA, 2000).

As cumarinas, uma classe de substâncias fenólicas, são derivadas do ácido chiquímico, via orto-hidroxilação catalisada pela enzima trans-cinamato 4-hidroxilase, isomerização cis-trans da dupla ligação da cadeia lateral e consequente lactonização (BOURGAUD et al., 2006). As rutáceas são grandes produtoras de cumarinas, em especial, furanocumarinas, nas quais há a ligação de uma unidade terpênica, seguida de ciclização e origem do anel furano (STANJEK; PIEL; BOLAND, 1999).

Os flavonoides formam uma grande classe de compostos fenólicos, com mais de 4.500 compostos distintos. Essa classe é determinante na coloração de várias flores, além de apresentar a função de proteção das plantas contra radiação ultra-violeta. Esses compostos, caracterizados pelo arranjo C6-C3-C6, são biossintetizados por via mista, sendo a parte C6-C3 originada da via do ácido chiquímico e o outro anel aromático (C6) formado pela ligação de três unidades de malonil-CoA, proveniente da via do acetato-malonato (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000).

Esses compostos são principalmente distribuídos em angiospermas e gimnospermas. Alguns grupos vegetais, como Rutaceae, Lamiaceae,

Zingiberaceae, Scrophulariaceae e Fabaceae são excelentes produtores de flavonoides, nos quais essas substâncias ocorrem em abundância (SHAO et al., 2020). Rutaceae, assim como Asteraceae e Fabaceae, são grupos com maior abundância de flavanonas, flavonas e dihidroflavonois (IWASHINA, 2000; YORO et al., 2020).

### **1.2 Potenciais atividades biológicas dos metabólitos secundários**

Extratos ou substâncias isoladas de espécies vegetais podem ser aplicados de diversas formas, como, por exemplo, em suplementos alimentares, na indústria de cosméticos, como inseticidas naturais, ou mesmo proporcionar a descoberta e caracterização de novas moléculas (Santos, 2015).

O surgimento de diversas doenças associadas ao envelhecimento, como catarata, câncer, doenças cardiovasculares, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (PISOSCHI; POP, 2015) está relacionado ao aumento do estresse oxidativo no corpo humano (VELLOSA et al., 2007) proporcionado pela formação excessiva de radicais livres gerados por diversos processos metabólicos.

Em linhas gerais existem duas categorias básicas de antioxidantes, os naturais e os sintéticos. Recentemente, tem aumentado consideravelmente a busca por antioxidantes naturais para uso em alimentos e/ou fins medicinais visando substituir os antioxidantes sintéticos, uma vez que a esses últimos podem ser associados alguns efeitos colaterais, como carcinogenicidade (ZHENG; WANG, 2001). Os compostos fenólicos, como já mencionado, são amplamente conhecidos por apresentarem atividade antioxidante, desempenhando um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres (ZHENG; WANG, 2001). Além disso, outras substâncias não fenólicas, como ascorbatos, tocoferóis e carotenoides também apresentam atividade antioxidante e são consolidados por diversas publicações relacionado ao seu papel fundamental na saúde humana (DIMITRIOS, 2006).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2015, 8,8 milhões de pessoas no mundo perderam a vida em decorrência do desenvolvimento de algum tipo de câncer, o que corresponde a uma em cada seis mortes na

população em geral (WHO). De acordo com uma revisão feita por Ferlay et al. (2021), foi estimado um aumento de 19,3 milhões novos casos em 2020, sendo o cancer de mama o diagnóstico mais comum e o cancer de pulmão o principal responsável pelas mortes. Dessa forma, a busca por novas drogas visando o tratamento e/ou cura dessas doenças é sempre um tópico de grande relevância, incluindo investigações com produtos naturais. Exemplos de substâncias usadas no tratamento de câncer derivados de vegetais são a doxorrubicina e o paclitaxel (SAJADIMAJD; KHAZAEI, 2018). Além disso, drogas como vincristina e a vimblastina, isoladas do *Catharantus roseus* L. G. Don, são utilizadas na quimioterapia (CARVALHAES et al., 2002)

Descobertas importantes como essas despertam cada vez mais o interesse dos pesquisadores a buscarem alternativas na cura e prevenção do câncer, a fim de desenvolver novos medicamentos antiproliferativos que ajudem no combate dessa doença (DE SILVA; REID, 2003). Componentes do óleo volátil de *Citrus paradise* Macfad. induziram fortemente a apoptose de células tumorais (HATA et al., 2003). Além disso, flavonoides encontrados em extratos dos frutos de espécies de *Citrus* têm demonstrado resultado de inibição em células de adenocarcinomas (LUO; GUAN; ZHOU, 2008; XIAO et al., 2009).

O Alzheimer é uma doença neurodegenerativa de grande impacto socioeconômico e está associado a um déficit nos neurotransmissores do cérebro (GAULA; MESULAM, 1994). O tratamento sintomático envolve a restauração da função colinérgica (TERESA et al., 2003). Atualmente, a inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase tem sido o método terapêutico mais efetivo para melhorar o sistema colinérgico em pacientes com essa doença. Muitas drogas derivadas de plantas, como rivastigmina e galantamina são utilizadas como inibidores de colinesterases no tratamento de estágios iniciais de Alzheimer (SCOTT; GOA, 2000).

Alguns estudos têm demonstrado diversos alcaloides como inibidores da enzima acetilcolinesterase (BARBOSA FILHO et al., 2006). Estudos fitoquímicos com diferentes extratos e substâncias isoladas de *Conchocarpus fontanesianus* (A.St.-Hil.) Kallunki & Pirani demonstraram efeito inibitório da atividade da



acetilconinasterase, sendo mais intenso com a fração hexânica e com os alcaloides isolados (CABRAL et al., 2012a).

### 1.3 Rutaceae – visão geral

Rutaceae apresenta cerca de 150 gêneros e 1.600 espécies, com distribuição relativamente cosmopolita, embora seja mais centrada na região neotropical, onde ocorrem cerca de 52 gêneros, sendo 32 gêneros nativos do Brasil (MORTON; TELMER, 2014).

Muitos dos membros dessa família possuem importância econômica, notadamente espécies do gênero *Citrus*, com frutos comestíveis (diversas variedades e cultivares de laranja, limões, tangerinas, limas). Espécies de *Flindersia*, *Zanthoxylum*, *Balfourodendron* e *Euxylophora* são utilizadas na indústria madeireira, sendo algumas consideradas de excelente qualidade. Além desses usos, espécies de *Boronia*, *Choisya*, *Clausena*, *Correa*, *Murraya*, *Poncirus*, *Ravenia*, *Skimmia* e *Triphasia*, entre outras, são utilizadas como ornamentais em várias partes do mundo (Pirani, 1999).

A utilização de espécies de Rutaceae como agentes promotores da saúde é cada vez maior. Muitos representantes são utilizados na medicina popular como, por exemplo, as folhas de *Citrus sinensis* L. Osbeck usadas como analgésico e digestivo, além de serem fontes de óleos voláteis (Pirani, 1999). Espécies de *Pilocarpus* são fonte de pilocarpina (alcaloide utilizado no tratamento de glaucoma) e também utilizadas popularmente contra perda de cabelo (OLIVEIRA; KFFURI; CASALI, 2010).

Rutaceae é famosa dentre os pesquisadores de produtos naturais devido sua vasta diversidade de metabólitos secundários (HAQUE et al., 2013). Dentre algumas características químicas de Rutaceae inclui-se a ocorrência regular de óleos voláteis, a presença de alcaloides derivados de ácido antranílico, sugeridos como marcadores quimiotaxonômicos da família (ALLEVATO et al., 2019), inúmeras cumarinas, notadamente as furanocumarinas, característica compartilhada com Apiaceae, além de tetranorterenos do tipo limonoides, que também ocorrem em Meliaceae e Simaroubaceae (EPIFANO et al., 2015). Essa

diversidade química torna essa família uma fonte potencial de substâncias de importância medicinal.

Dentre os representantes de grandes produtores de óleos voláteis (OV) na família destaca-se *Ruta graveolens* L., popularmente conhecida como arruda (LORENZI; MATOS, 2002). O óleo volátil desta espécie é amplamente utilizado na medicina tradicional no tratamento e/ou prevenção de distúrbios menstruais, inflamações de pele, cólicas, dor de ouvido e dor de cabeça (MEJRI; ABDERRABBA; MEJRI, 2010; RATHEESH et al., 2011). A posição do Brasil entre os maiores produtores de OV no mundo se deve principalmente aos OV de cítricos, que são subprodutos da indústria de sucos, sendo o óleo volátil de laranja (*Citrus sinensis*), considerado o óleo volátil de maior importância mundial (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Em relação aos alcaloides, os principais encontrados na família são dictamina, esquimiamina e kokusagininina, sendo esses do tipo furanoquinolínicos (ADAMSKA-SZEWCZYK; GLOWNIAK; BAJ, 2016). Além desses, outra classe de alcaloides também derivados de ácido antranílico e amplamente encontrados no grupo, são os quinolínicos, como arborinina, metil-arborinina, acridona e xanthoxolina (BELLETE et al., 2012).

Cumarinas de esqueleto simples são amplamente encontradas em Rutaceae, na qual ocorrem com grande diversidade estrutural. Dentre as cumarinas já relatadas para a família encontram-se escopoletina (BELLETE et al., 2012), umbeliferona, escoparona (Mafezoli et al., 2000) entre outras. Além disso, Rutaceae está entre as quatro mais importantes famílias na produção de cumarinas lineares (furanocumarinas), junto com Apiaceae, Moraceae, Fabaceae (BOURGAUD; OLRYS; HEHN, 2014). Dentre as principais furanocumarinas encontradas na família, se destaca a marmesina amplamente encontrada no grupo (ISIDORO et al., 2012).

Os limonoides são compostos de sabor bastante amargo, encontrados em *Citrus*, principalmente na casca (KHALIL; MAATOOQ; EL SAYED, 2003). Esse gênero, assim como outros gêneros próximos, são conhecidos pela vasta presença

de limonoides nas formas de agliconas e glicosídeos, sendo a linomina, o limonoide mais conhecido (MANNERS et al., 2003).

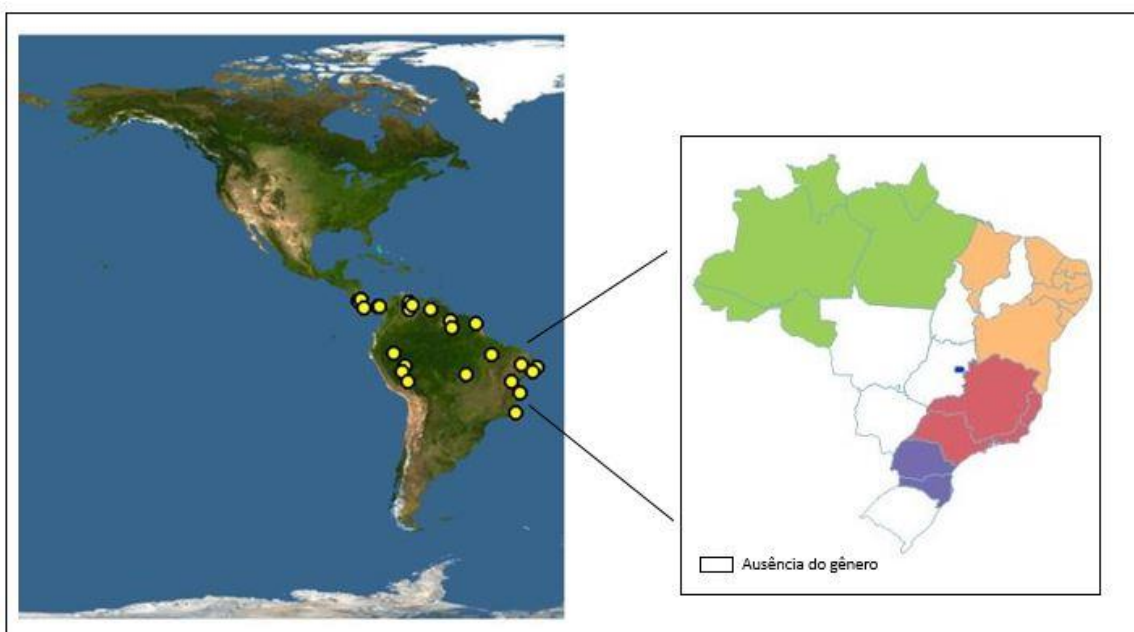
A grande maioria dos trabalhos relacionados a quimiotaxonomia de Rutaceae é centrada principalmente em dois grandes grupos de metabólitos secundários: os fenilpropanoides, que incluem os ácidos fenólicos, flavonoides, lignanas, etc., e os terpenoides, em especial, os limonoides (BERHOW et al., 2000).

Rutaceae, devido a sua grande diversidade química, é uma fonte potencial de substâncias bioativas. Pesquisas mostrando aplicações de produtos naturais no tratamento de diversas condições, como Alzheimer e depressão, assim como também no tratamento de câncer e infecções (ADAMSKA-SZEWCZYK; GLOWNIAK; BAJ, 2016) têm sido realizadas por diversos grupos. Em estudo feito por Moraes et al. (2006) com o óleo volátil de *Citrus aurantium* L. foram encontrados bons resultados quanto sua capacidade de diminuir a ansiedade. Além disso, flavonoides presentes nesta mesma espécie exibiram forte ação antiproliferativa contra o câncer de próstata (PARK et al., 2014). As lignanas, estudadas por Wu et al. (2012) apresentaram atividade anti-HIV, anticancerígena, antioxidante e atividades anti-inflamatórias. Cumarinas mostraram forte potencial antioxidante, antiproliferativo, inibidor enzimático, vaso relaxante, anti-inflamatório, anti-HIV, citotóxico, redutor lipídico e anticoagulante.

#### **1.4 Gênero *Conchocarpus* (J.C.Mikan)**

*Conchocarpus* é o maior gênero da subtribo neotropical Galipeinae (tribo Galipeeae, subfamília Rutoideae, Rutaceae), composto por arbustos ou pequenas árvores de até sete metros de altura, com folhas alternas, inflorescência geralmente terminal ou extra-axilar, cálice relativamente pequeno e uma corola tubular formada por pétalas coerentes. Em uma revisão feita por Kallunki & Pirani (1998), foram reconhecidas 45 espécies de *Conchocarpus*, duas novas espécies foram descritas e uma nova combinação foi feita (PIRANI; GROppo; KALLUNKI, 2011). Além disso, três espécies de *Almeidea* foram transferidas para *Conchocarpus* (POLESELLI BRUNIERA; KALLUNKI; GROppo, 2015). Posteriormente, Groppo e colaboradores (2021) descreveram

uma nova espécie para o gênero, totalizando 52 espécies. Entretanto, um estudo filogenético recente revelou *Conchocarpus sensu lato* como um grupo não monofilético, sendo proposto a separação em dois clados distintos: *Conchocarpus sensu stricto* com 47 espécies e um novo gênero *Dryades* Groppo, Kallunki & Pirani com cinco espécies, restaurando o monofiletismo em *Conchocarpus* (GROPPO et al., 2021). Das 47 espécies do gênero, 37 são endêmicas do Brasil. O gênero está distribuído da Nicarágua ao norte da Bolívia e em vários estados do Brasil, ocorrendo em vários domínios fitogeográficos, como Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (GROPPO et al., 2008, 2021) (Figura 2).



**Figura 2.** Distribuição do gênero *Conchocarpus*. As áreas coloridas no mapa do Brasil correspondem a regiões de ocorrência do gênero. Fonte: Adaptação de Discover Life e Flora do Brasil, acessado em 23 de Setembro de 2021.

Das 47 espécies descritas, apenas sete foram estudadas quanto a sua composição fitoquímica e/ou atividades biológicas e seis em relação a composição da cera cuticular (SILVEIRA et al., 2021) sendo elas todas nativas (Tabela 1). De maneira geral, já foram identificados cerca de 30 alcaloides, principalmente derivados de ácido antranílico, como furanoquinolínicos e acridínicos, 12 cumarinas e furanocumarinas, além de outras classes de

metabólitos secundários como flavonoides, esteroides e triterpenos (Figura 3) (Santos et al., 1998; Mafezoli et al., 2000; Cortez et al., 2009; Ambrozim et al., 2008; Bellete et al., 2012; Cabral et al., 2012). Atividades tripanocida e de inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase já foram descritas para extratos brutos, fases de partição e metabólitos isolados (Ambrozim et al., 2008; Cortez et al., 2009; Bellete et al., 2012; Cabral et al., 2012).

**Tabela 1.** Relação dos metabólitos secundários encontrados em espécies de *Conchocarpus*.

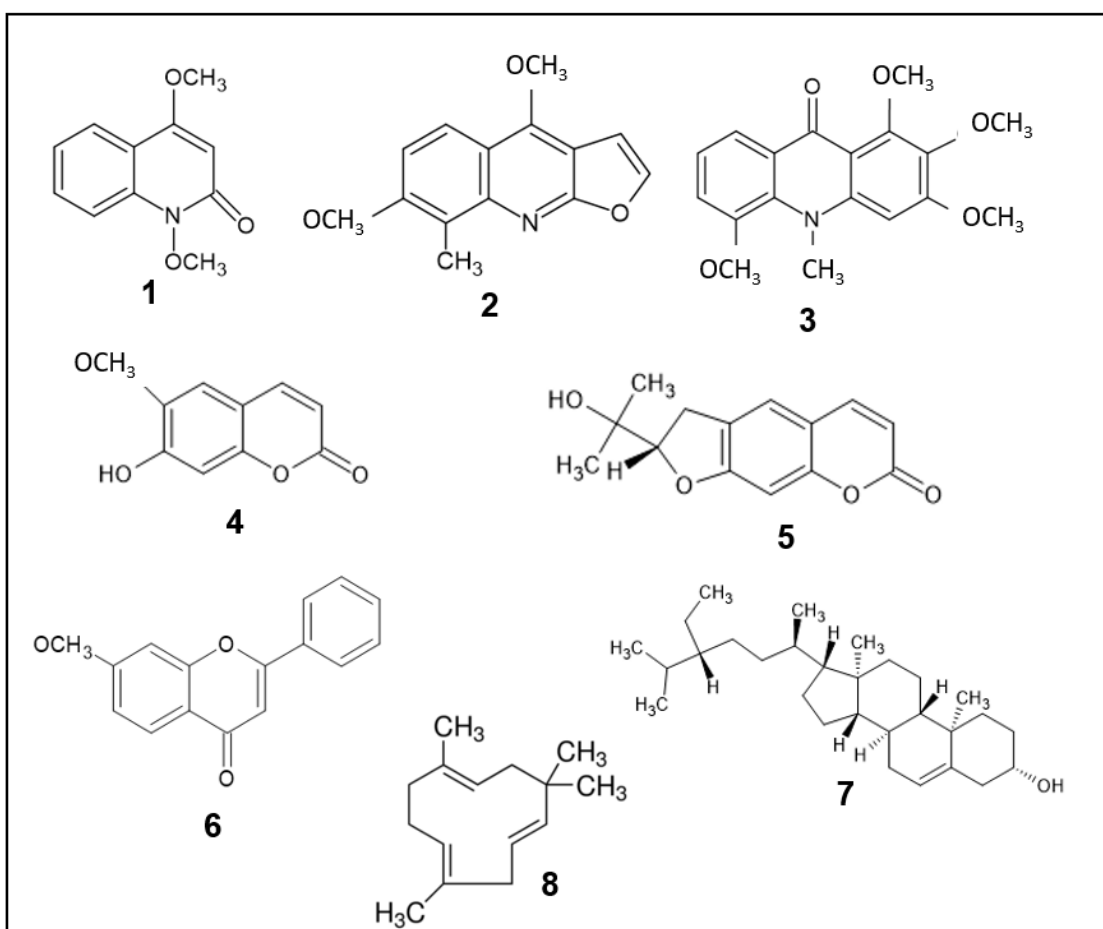
Espécie	Parte da planta estudada	Classe de substância investigada	Substâncias identificadas	Atividade biológica promissora	Extrato testado	Referência
<i>C. fontanesianus</i>	Caule	Alcaloide	Dicatimina, $\gamma$ -fagarina, esquimiamina, 2-fenil-1-metil-4-quinolina	Acetilcolinesterase	***	Cabral et al., 2012
		Cumarina	Marmesina			
	Folha	Componentes de óleo volátil	T-muurolol, (+)-epi-bicyclosesquiphellandrene, $\delta$ -3-careno, germacreno D, $\alpha$ -humuleno, $\beta$ -cubebeno, $\alpha$ -cadinol, (E)-calameno, $\beta$ -mirceno, espatuleno	Antifúngica e citotóxica	***	Cabral et al., 2016
<i>C. gaudichaudianus</i>	Folha	Alcaloide	3-(2-(7,7-dimetil-3,7-dihidropirano [3,2-e]indol-1-il)etil)quinolina-2,4 (1H, 3H)-diona, 3-(2-(7,7-dimetil-3,7-di-hidropirano [3,2-eindol-1-il)etil)-1-hidroxiquinolina-2,4 (1H, 3H)-diona, 3-(2-(7,7-dimetil-3,7-diidropirano [3,2-e] indol-1-il)etil-1-metil quinolina-2,4 (1H, 3H)-diona, (E)-3-(6,7-dihidroxi-3,7-dimetiloct-2-enil)-4-metoxi-1-metilquinolin-2 (1H)-ona	Tripanocida	Hexânico	Cortez et al., 2009
<i>C. heterophyllus</i>	Caule e folha	Flavonoide	7-metoxiflavona, 5-hidroxiflavona	Tripanocida	Hexânico, metanólico	Ambrozim et al., 2008
		Alcaloide	Haplotusina, 2-fenil-1-metil-4-quinolona			
		Esteróide	$\beta$ -sitosterol, estigmasterol			
<i>C. marginatus</i>	Folha	Alcaloide	2-fenil-1-metil-quinolin-4-ona, 2-fenil-1-metil-7-metoxi-quinolin-4-ona, 1-hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona, arborinina, 1-hidroxi-3,6-dimetoxi-N-metilacridona, 1,2,3,6-tetrametoxiacridona, 1-hidroxi-2,3,6-trimetoxi-N-metilacridona	Tripanocida	Hexânico	Belleite et al., 2012

<i>C. longifolius</i>	Folha	Alcaloide	4,6-dimetoxi-2-quinolona, 6-metoxihaplotusina, N-metilhaplamina, N-metoxihaplamina, esquimiamina	Tripanocida	Hexânico, etanólico	Mafezoli et al., 2000
		Cumarina	3-metoxiangelicina, 3,6-metoxiangelicina, esfodina, quiahucumarina-D, pimpinelina, isobergapteno, umbeliferona, escoparona, 5,6-diamino-4,9-dimetoxi-furo[3,2-g]cromen-7-ona, aurapteno			
<i>C. coeruleus</i>	Folha	Alcaloide	7-metoxi-8-(3,3-dimetilalil)-dictamina, 7-O-acetilhaplofilidina, dutadrupina, isodutadrupina, arborinina	...	...	Santos et al., 1998
		Triterpeno	3 $\beta$ -O-tiglyl-24-metilcicloartanol			
<i>C. inopinatus</i>	Folha	Alcaloide	Arborinina, 1-hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona, xantoxilina, 1,2,3,5-tetrametoxi-N-metilacridona, toddaliopsina C	Tripanocida	Metanólico	Bellete et al., 2012
		Cumarina	Marmesina, escopoletina			
		Alcano (EP)	Tritriacontano	...	...	Silveira et al., 2021
		Ácido graxo (EP)	Ácido hexadecanoico			
		Álcool primário (EP)	Tetratriacontanol			
Fitoesteroide (EP)	$\beta$ -sitosterol, sitostenona					
<i>C. macrocarpus</i>	Folha	Alcano (EP)	Hentriacontano	...	...	Silveira et al., 2021
		Ácido graxo (EP)	Ácido hexadecanoico			
		Álcool primário (EP)	Tetratriacontanol			
		Fitoesteroide (EP)	$\beta$ -sitosterol, colesterol, campesterol			
		Triterpeno (EP)	$\beta$ -Amyrin			
<i>C. macrophyllus</i>	Folha	Alcano (EP)	Tritriacontano	...	...	Silveira et al., 2021
		Ácido graxo (EP)	Ácido hexadecanoico			
		Álcool primário (EP)	Tetratriacontanol			
		Fitoesteroide (EP)	Sitosterol, colesterol, sitostenona			

<i>C. mastigophorus</i>	Folha	Alcano (EP)	Hentriacontano	...	...	Silveira et al., 2021
		Ácido graxo (EP)	Ácido hexadecanoico			
		Álcool primário (EP)	Tetratriacontanol			
		Fitoesteroide (EP)	Sitosterol, estigmasterol, colesterol			
<i>C. obovatus</i>	Folha	Alcano (EP)	Hentriacontano	...	...	Silveira et al., 2021
		Ácido graxo (EP)	Ácido hexadecanoico			
		Álcool primário (EP)	Docosanol			
		Fitoesteroide (EP)	$\beta$ -sitosterol, colesterol			
<i>C. ruber</i>	Folha	Alcano (EP)	Hentriacontano	...	...	Silveira et al., 2021
		Ácido graxo (EP)	Ácido hexadecanoico			
		Álcool primário (EP)	Tetratriacontanol			
		Triterpeno (EP)	$\alpha$ -Amyrina, lupeol			

EP= classes de substâncias identificadas na cera epicuticular. Os compostos apresentados são os majoritários de cada classe. A caracterização completa pode ser encontrada no artigo de referência.





**Figura 3.** Exemplos das principais classes e subclasses de metabólitos secundários encontrados em espécies de *Conchocarpus*. **(1)** 6-metoxihaplotusina (alcaloide quinolínico); **(2)** Esquimiamina (alcaloide furanoquinolínico); **(3)** Arborinina (alcaloide acridínico); **(4)** Escopoletina (cumarina); **(5)** Marmesina (furanocumarina); **(6)** 7-metoxiflavona (flavonoide); **(7)**  $\beta$ -sitosterol (esteroide) e **(8)**  $\alpha$ -humuleno (terpenoide).

### 1.5 Uso de redes moleculares na caracterização fitoquímica

Embora o número de novos produtos naturais descobertos por ano venha sendo constante ao longo das duas últimas décadas, o índice de descoberta de novos esqueletos químicos encontra-se em declínio (PYE et al., 2017). Nos últimos anos, diversas metodologias surgiram com o propósito de facilitar a exploração de perfis químicos em extratos complexos, principalmente visando minimizar o alto índice de redescoberta de metabólitos já identificados (SPICER et al., 2017).

Dentre essas ferramentas, se destaca a rede molecular (*Molecular Networking*), a qual vem demonstrando uma grande eficiência na derreplicação

de misturas complexas. Seu conceito baseia-se na organização e visualização de dados espectrométricos (MS<sup>2</sup>) através de um mapa de similaridade e agrupamento espectral (OLIVON et al., 2018). Com isso, extratos brutos podem ser analisados, assim como frações, individualmente ou em conjunto. Com os dados obtidos, substâncias já conhecidas (derreplicação) e seus análogos, assim como potenciais compostos inéditos podem ser identificados, poupando tempo no trabalho de isolamento para uma posterior identificação (HOSTETTMANN; WOLFENDER; TERREAUX, 2001). Outra vantagem no uso da técnica é que além de poder ser utilizada para a identificação de produtos naturais, pode também ser empregada na identificação de amostras biológicas, fármacos, proteínas e genoma (Watrous et al., 2012; Allard et al., 2016). As técnicas cromatográficas CLAE-EM e CLAE-DAD-EM usualmente são as mais utilizadas para o processo de derreplicação (HOSTETTMANN; WOLFENDER; TERREAUX, 2001).

Com a obtenção dos espectros EM/EM, esses dados podem ser convertidos e inseridos, por exemplo, na plataforma do GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) e, de acordo com a similaridade dos fragmentos, tais como o íon molecular e fragmentos de íon, esses espectros são agrupados formando as redes moleculares (Watrous et al., 2012; Chen et al., 2013; Allard et al., 2016). O grau de parentesco entre as substâncias presentes na amostra é medida por uma série de parâmetros, como o valor do co-seno entre as substâncias da amostra e do banco de dados, que pode variar de 0 à 1, sendo que quanto mais próximo de 1 for o grau de similaridade, maior o parentesco entre as substâncias (Watrous et al., 2012; Chen et al., 2013; Allard et al., 2016).

## **2 JUSTIFICATIVA**

A busca por substâncias bioativas provenientes de fontes naturais, entre elas as plantas, tem sido objeto de diversos estudos em diferentes áreas. Esses estudos afirmam que a busca por agentes antioxidantes em produtos naturais é de suma importância, pois, como dito anteriormente, antioxidantes de origem sintética têm sido responsáveis por efeitos colaterais indesejados (ZHENG; WANG, 2001). Da mesma forma, há grande interesse na busca de produtos

naturais com atividade antiproliferativa. Estima-se que mais de 60% dos fármacos utilizados atualmente no tratamento do câncer sejam derivados de fontes naturais. No caso de doenças infecciosas essa porcentagem é ainda maior (> 75%) (CRAGG; NEWMAN, 2013). No Brasil, apesar da ampla diversidade de espécies, estima-se que menos de 5% da flora nativa tenham sido submetidos a investigações específicas relacionadas a sua constituição fitoquímica (Luna et al., 2005).

Como já mencionado, Rutaceae é uma família de grande importância econômica, além de ser conhecida por possuir uma vasta diversidade de metabólitos secundários. Dentro dessa família, pouco se sabe a respeito da composição química de *Conchocarpus*. Das 47 espécies desse gênero, apenas sete foram estudadas quimicamente.

Dessa forma, o estudo fitoquímico de espécies nativas, como por exemplo, *Conchocarpus macrocarpus*, apresenta grande potencial na descoberta de novas substâncias e/ou novas aplicações, além de possibilitar um maior conhecimento a respeito da diversidade química de espécies da flora brasileira. Cabe salientar que, considerando os dados disponíveis para *Conchocarpus*, espécies deste gênero parecem promissoras para investigações fitoquímicas e/ou de atividades biológicas.

### **3 OBJETIVO GERAL**

Analisar a composição química e algumas atividades biológicas potenciais do extrato etanólico das folhas e caules de *Conchocarpus macrocarpus*.

#### 4 Referências bibliográficas

- Adamska-Szewczyk, A., Glowniak, K., & Baj, T. (2016). Furochinoline alkaloids in plants from Rutaceae family - a review. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 29(1), 33–38.
- Albarici, T. R., Vieira, P. C., Fernandes, J. B., Silva, M. F. D. G. F. D., & Pirani, J. R. (2010). Cumarinas e alcalóides de *Rauia resinosa* (Rutaceae). *Química Nova*, 33(10), 2130-2134.
- Allard, M. W., Strain, E., Melka, D., Bunning, K., Musser, S. M., Brown, E. W., & Timme, R. (2016). Practical value of food pathogen traceability through building a whole-genome sequencing network and database. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(8), 1975–1983.
- Alves, H. de M. (2001). A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova Na Escola*, 3, 10–15.
- Ambrozin, A. R. P., Vieira, P. C., Fernandes, J. B., Silva, M. F. D. G. F. D., & Albuquerque, S. D. (2008). Piranoflavonas inéditas e atividades tripanocidas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*. *Química Nova*, 31, 740-743.
- Barbosa Filho, J. M., Medeiros, K. C. P., Diniz, M. de F. F. M., Batista, L. M., Athayde-Filho, P. F., Silva, M. S., da Cunha, E. V. L., Almeida, J. R. G., & Quintans-Júnior, L. J. (2006). Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 258–285.
- Belleite, B. S., Sá, I. C. G. de, Mafezoli, J., Cerqueira, C. do N., Silva, M. F. das G. F. da, Fernandes, J. B., Vieira, P. C., Zukerman-Schpector, J., & Pirani, J. R. (2012). Fitoquímica e quimiosistemática de *Conchocarpus marginatus* e *C. inopinatus* (Rutaceae). *Química Nova*, 35, 2132–2138.

- Bennett, R. N., & Wallsgrove, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, 127(4), 617–633.
- Berhow, M. A., Hasegawa, S., Kwan, K., & Bennett, R. D. (2000). Limonoids and the chemotaxonomy of *Citrus* and the Rutaceae family. *ACS Symposium Series*, 758, 212–229.
- Bizzo, H. R., Hovell, A. M. C., & Rezende, C. M. (2009). Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, 32, 588–594.
- Borba, A. M., & Macedo, M. (2006). Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 20, 771–782.
- Bourgaud, F., Olry, A., & Hehn, A. (2014). Recent advances in molecular genetics of furanocoumarin synthesis in higher plants. *Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products*, 363–375.
- Bruno, M., Ciriminna, R., Piozzi, F., Rosselli, S., & Simmonds, M. S. J. (1999). Antifeedant activity of neo-clerodane diterpenoids from *Teucrium fruticans* and derivatives of fruticolone. *Phytochemistry*, 52(6), 1055–1058.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2000). *Biochemistry & molecular biology of plants* (2° ed.). American Society of Plant Physiologists.
- Cabral, R. S., Sartori, M. C., Cordeiro, I., Queiroga, C. L., Eberlin, M. N., Lago, J. H. G., Moreno, P. R. H., & Young, M. (2012). Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from stems of *Conchocarpus fontanesianus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(2), 374–380.
- Carvalhaes, S. F. de, Costa, D. L., Mazzei, J. L., Taddei, L. E. M., & d'Avila, L. A. (2002). Alternative extraction of alkaloid anticarcinogens from Brazilian "*Vinca rosea*" using ion exchange chromatography. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12, 83–85.

- Chen, T. C., da Fonseca, C. O., & Schönthal, A. H. (2018). Intranasal perillyl alcohol for glioma therapy: molecular mechanisms and clinical development. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3905.
- Chen, T., Yang, W.-H., Wang, D., & Wan, L.-J. (2013). Globally homochiral assembly of two-dimensional molecular networks triggered by co-absorbers. *Nature Communications*, 4(1), 1–8.
- Colli-Silva, M., & Pirani, J. R. (2019). Biogeographic patterns of Galipeinae (Galipeeae, Rutaceae) in Brazil: Species richness and endemism at different latitudes of the Atlantic Forest “hotspot.” *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 251, 77–87.
- Cortez, D., E. Ranieri Cortez, L., B. Fernandes, J., C. Vieira, P., G. Ferreira, A., & Fátima das G. F. da Silva, M. (2009). New Alkaloids from *Conchocarpus gaudichaudianus*. *Heterocycles*, 78(8), 2053.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3670–3695.
- de Moraes Pultrini, A., Galindo, L. A., & Costa, M. (2006). Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sciences*, 78(15), 1720–1725.
- de Silva, M. V. C., & Reid, R. (2003). Gastrointestinal stromal tumors (GIST): C-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and targeted cancer therapy with Imatinib. *Pathology Oncology Research*, 9(1), 13–19.
- Devakumar, C., Dev, S., Randhawa, N. S., & Parmar, B. S. (1993). *Neem research and development*. Society of Pesticide Science, India.
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
- Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(9), 505–512.

- Epifano, F., Fiorito, S., Genovese, S., Granica, S., Vitalini, S., & Zidorn, C. (2015). Phytochemistry of the genus *Skimmia* (Rutaceae). *Phytochemistry*, 115, 27–43.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778-789.
- Gaula, C., & Mesulam, M. M. (1994). Cholinergic systems and related neuropathological predilection patterns in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease*, 263–291.
- Groppo, M., de Lemos, L. J. C., de Lima Ferreira, P., Ferreira, C., Bruniera, C. P., de Castro, N. M., Pirani, J. R., el Ottra, J. H., & Kallunki, J. A. (2021). A tree nymph of the Brazilian Atlantic Forest: *Dryades* (Galipeinae, Rutaceae), a new neotropical genus segregated from *Conchocarpus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 154, 106971.
- Groppo, M., Pirani, J. R., Salatino, M. L. F., Blanco, S. R., & Kallunki, J. A. (2008). Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. *American Journal of Botany*, 95(8), 985–1005.
- Haque, M. M., Begum, S., Sohrab, M. H., Ahsan, M., Hasan, C. M., Ahmed, N., & Haque, R. (2013). Secondary metabolites from the stem of *Ravenia spectabilis* Lindl. *Pharmacognosy Magazine*, 9(33), 76.
- Hata, T., Sakaguchi, I., Mori, M., Ikeda, N., Kato, Y., Minamino, M., & Watabe, K. (2003). Induction of apoptosis by *Citrus paradisi* essential oil in human leukemic (HL-60) cells. *In Vivo (Athens, Greece)*, 17(6), 553–559.
- Hostettmann, K., Wolfender, J.-L., & Terreaux, C. (2001). Modern screening techniques for plant extracts. *Pharmaceutical Biology*, 39(sup1), 18–32.
- Isidoro, M. M., Silva, M. F. da G. F. da, Fernandes, J. B., Vieira, P. C., Arruda, A. C., & Silva, S. da C. (2012). Fitoquímica e quimiosistemática de *Euxylophora paraensis* (Rutaceae). *Química Nova*, 35, 2119–2124.

- Iwashina, T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113(3), 287.
- Kallunki, J. A., & Pirani, J. R. (1998). Synopses of *Angostura* Roem. & Schult. and *Conchocarpus* JC Mikan (Rutaceae). *Kew Bulletin*, 257–334.
- Lorenzi, H., & Matos, F. J. A. (2002). Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas, Editora Instituto Plantarum. Nova Odessa, São Paulo, 512.
- Luo, G., Guan, X., & Zhou, L. (2008). Apoptotic effect of citrus fruit extract nobiletin on lung cancer cell line A549 in vitro and in vivo. *Cancer Biology & Therapy*, 7(6), 966–973.
- Macedo, M., & Pacheco, I. B. (2001). Uso odontológico de plantas medicinais por idosos em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Cadernos de Saúde-Cuiabá, UNIC-CPG*, 2, 63–73.
- Mafezoli, J., Vieira, P. C., Fernandes, J. B., da Silva, M. F. G. F., & de Albuquerque, S. (2000). In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1–2), 335–340.
- Manners, G. D., Breksa, A. P., Schoch, T. K., & Hidalgo, M. B. (2003). Analysis of bitter limonoids in citrus juices by atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(13), 3709–3714.
- Mejri, J., Abderrabba, M., & Mejri, M. (2010). Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L: Influence of drying, hydro-distillation duration and plant parts. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 671–673.
- Michael, J. P. (2017). Acridone alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 78, 1–108.
- Morton, C. M., & Telmer, C. (2014). New subfamily classification for the Rutaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 99(4), 620–641.



- Oliveira, H. B. de, Kffuri, C. W., & Casali, V. W. D. (2010). Ethnopharmacological study of medicinal plants used in Rosário da Limeira, Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(2), 256–260.
- Olivon, F., Apel, C., Retailleau, P., Allard, P. M., Wolfender, J. L., Touboul, D., Roussi, F., Litaudon, M., & Desrat, S. (2018). Searching for original natural products by molecular networking: Detection, isolation and total synthesis of chloroaustralasines. *Organic Chemistry Frontiers*, 5(14), 2171–2178.
- Park, K.-I., Park, H.-S., Kim, M.-K., Hong, G.-E., Nagappan, A., Lee, H.-J., Yumnam, S., Lee, W.-S., Won, C.-K., & Shin, S.-C. (2014). Flavonoids identified from Korean *Citrus aurantium* L. inhibit Non-Small Cell Lung Cancer growth in vivo and in vitro. *Journal of Functional Foods*, 7, 287–297.
- Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042.
- Pirani, J. R. (1999). Two new species of *Esenbeckia* (Rutaceae, pilocarpinae) from Brazil and Bolivia. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 129(4), 305–313.
- Pirani, J. R., Groppo, M., & Kallunki, J. A. (2011). Two new species and a new combination in *Conchocarpus* (Rutaceae, Galipeeae) from eastern Brazil. *Kew Bulletin*, 66(4), 521–527.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.
- Poleselli Bruniera, C., Kallunki, J. A., & Groppo, M. (2015). *Almeidea* A. St.-Hil. belongs to *Conchocarpus* JC Mikan (Galipeinae, Rutaceae): evidence from morphological and molecular data, with a first analysis of subtribe Galipeinae. *PLoS One*, 10(5), e0125650.
- Pye, C. R., Bertin, M. J., Lokey, R. S., Gerwick, W. H., & Linington, R. G. (2017). Retrospective analysis of natural products provides insights for future

discovery trends. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(22), 5601–5606.

- Ratheesh, M., Shyni, G. L., Sindhu, G., & Helen, A. (2011). Inhibitory effect of *Ruta graveolens* L. on oxidative damage, inflammation and aortic pathology in hypercholesteromic rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63(3), 285–290.
- Ribeiro, C. V. C., & Kaplan, M. A. C. (2002). Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em Angiospermae. *Química Nova*, 25, 533–538.
- Roy, A., & Saraf, S. (2006). Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(2), 191–201.
- Sajadimajd, S., & Khazaei, M. (2018). Oxidative stress and cancer: the role of Nrf2. *Current Cancer Drug Targets*, 18(6), 538–557.
- Santos, C. S., Januário, A. H., Vieira, P. C., Fernandes, J. B., Silva, M., & Pirani, J. R. (1998). Cycloartane triterpenoid and alkaloids from *Ameidea* spp. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9, 39–42.
- Santos, D. Y. A. C. (2015). Botânica aplicada: metabólicos secundários na interação planta-ambiente. Tese de livre docência. Universidade de São Paulo.
- Scott, L. J., & Goa, K. L. (2000). Galantamine. *Drugs*, 60(5), 1095–1122.
- Shao, S. Y., Ting, Y., Wang, J., Sun, J., & Guo, X. F. (2020). Characterization and Identification of the Major Flavonoids in *Phyllostachys edulis* Leaf Extract by UPLC-QTOF-MS/MS. *Acta Chromatographica*, 32(4), 228–237.
- Silveira, E. R., Roma, L. P., Pirani, J. R., & dos Santos, D. Y. A. C. (2021). Contrasting leaf cuticular wax composition of *Conchocarpus* and *Dryades* species (Rutaceae) from the Atlantic Forest and “Restinga.” *Brazilian Journal of Botany*. <https://doi.org/10.1007/s40415-021-00743-7>

- Soto-Hernández, M., Tenango, M. P., & García-Mateos, R. (2017). Phenolic compounds: biological activity. BoD–Books on Demand.
- Spicer, R., Salek, R. M., Moreno, P., Cañueto, D., & Steinbeck, C. (2017). Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. *Metabolomics*, 13(9), 1–16.
- Stanjek, V., Piel, J., & Boland, W. (1999). Biosynthesis of furanocoumarins: mevalonate-independent prenylation of umbelliferone in *Apium graveolens* (Apiaceae). *Phytochemistry*, 50(7), 1141–1146.
- Szczepanik, M., Obara, R., Szumny, A., Gabryś, B., Halarewicz-Pacan, A., Nawrot, J., & Wawrzeńczyk, C. (2005). Synthesis and insect antifeedant activity of precocene derivatives with lactone moiety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 5905–5910.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2009). *Fisiologia vegetal*. 4ª Edição. Artmed, Porto Alegre
- Trevisan, M. T. S., Macedo, F. V. V., Meent, M. V. D., Rhee, I. K., & Verpoorte, R. (2003). Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova*, 26, 301-304.
- Velloso, J. C. R., Barbosa, V. de F., Khalil, N. M., Santos, V. A. de F. F. M. dos, Furlan, M., Brunetti, I. L., & Oliveira, O. M. M. de F. (2007). Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43, 447–453.
- Waterman, P. G. (1975). Alkaloids of the Rutaceae: their distribution and systematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 3(3), 149–180.
- Watrous, J., Roach, P., Alexandrov, T., Heath, B. S., Yang, J. Y., Kersten, R. D., van der Voort, M., Pogliano, K., Gross, H., & Raaijmakers, J. M. (2012). Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), E1743–E1752.
- Wink, M. (2013). Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany*, 89, 164–175.

- Wu, B., Zhang, X., & Wu, X. (2012). New lignan glucosides with tyrosinase inhibitory activities from exocarp of *Castanea henryi*. *Carbohydrate Research*, 355, 45–49.
- Xiao, Y., Gao, X., Taratula, O., Treado, S., Urbas, A., Holbrook, R. D., Cavicchi, R. E., Avedisian, C. T., Mitra, S., & Savla, R. (2009). Anti-HER2 IgY antibody-functionalized single-walled carbon nanotubes for detection and selective destruction of breast cancer cells. *BMC Cancer*, 9(1), 1–11.
- Yamamura, Y., Taguchi, Y., Ichitani, K., Umebara, I., Ohshita, A., Kurosaki, F., & Lee, J.-B. (2018). Characterization of ent-kaurene synthase and kaurene oxidase involved in gibberellin biosynthesis from *Scoparia dulcis*. *Journal of Natural Medicines*, 72(2), 456–463.
- Yoro, T., Diallo, A., Ndoye, I., Yin, Y., Renucci, F., Guèye, R. S., Baldé, M., Diédhiou, A., Fall, D., & Seck, M. (2020). The flavonoid compounds from *Zanthoxylum leprieurii* Guill. et Perr (Rutaceae) extracts and their antioxidant activity against ABTS•+. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(2-s), 120–124.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165–5170.



**Capítulo I**

---

Diversidade química de *Conchocarpus*  
*macrocarpus*



---

## Resumo

---

*Conchocarpus macrocarpus* (Rutaceae) é uma espécie endêmica da Mata Atlântica brasileira. Em literatura, nada se sabe a respeito de sua composição química, despertando o interesse na realização de um estudo fitoquímico. Para tal, folhas e galhos de indivíduos dessa espécie foram coletados em Cachoeiro do Itapemirim, Espírito Santo, compondo uma amostragem complexa. O material vegetal foi seco em estufa a 60 °C por 10 dias e triturado, separadamente, em moinho de facas. O pó resultante foi submetido ao processo de extração exaustiva por maceração a frio em etanol 70% e os extratos obtidos foram filtrados e concentrados em rotaevaporador. Em seguida, os extratos foram ressuspensos em etanol 20% e particionados com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol). As fases de partição foram avaliadas quanto seu potencial biológico e as mais ativas foram caracterizadas quimicamente. Para isso, as fases mais apolares (hexano e diclorometano) foram analisadas em cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), possibilitando a identificação de N-metil-prolina, docosano, estigmasterol, sitostenona em todas amostras analisadas, além de um alcaloide acridínico não identificado. Além disso, coniferol e o alcaloides furanoquinolínicos esquimiamina e dutadrupina também foram encontrados nessas fases de partição apolares. O fitoesteroides sitostenona foi encontrado em todas amostras, enquanto  $\beta$ -sitosterol está presente apenas na fase de partição hexânica do caule. Posteriormente, as fases de partição em diclorometano, hexano e butanol obtidas do extrato foliar foram analisadas em CLAE-DAD acoplado a espectômetro de massas de alta resolução. Os espectros de massas obtidos foram utilizados para criação de redes moleculares pelo GNPS (*The Global Natural Product Social Molecular Networking*). Com isso, na fase butanólica foi possível a sugestão de identificação das flavonas isovitexina-2"-O-ramnosideo, isovitexina 2"-O-arabinosideo, vitexina e saporanina e amidas como feruloil putrescina, feruloil agmatina e *p*-coumaroil agmatina, além de alcaloides quinolínicos nas fases de partição mais apolares, semelhantes a cloroaustralasinas.

**Palavras-chave:** alcaloides, flavonas, *Conchocarpus*, caracterização química



## Abstract

---

*Conchocarpus macrocarpus* (Rutaceae) is an endemic species of the Brazilian Atlantic Forest. In the literature, there is not any information about its chemical composition. In this context, leaves and stems of some specimens were collected in Cachoeiro do Itapemirim, Espírito Santo, composing a complex sample. The plant material was oven dried at 60 °C for 10 days. The dried materials (leaves and branches, separately) were crushed in a knife mill. The resulting powder was submitted to the 70% ethanolic exhaustive maceration and the extracts were filtered and concentrated in a rotaevaporator. Then, the extracts were resuspended in 20% ethanol and partitioned with increasing polarity solvents (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol). The partition phases were evaluated for their biological activities and the most active samples were chemically characterized. The most apolar phases (hexane and dichloromethane) were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), enabling the identification of N-methyl-proline, docosane, stigmasterol, sitostenone in all analyzed samples, in addition to an acridine alkaloid not identified. Coniferol and the furanoquinolinic alkaloids skimamine and dutadrupin were also found in these apolar partition phases. The phytosteroid sitostetone was found in all samples, while  $\beta$ -sitosterol was present only in the stem hexane partition phase. In addition, the hexanic, dichloromethanic and butanolic partition phases from leaf extract were analysed by HPLC-DAD coupled to a high resolution mass spectrometer. The mass spectra obtained were used to create molecular networks by GNPS (The Global Natural Product Social Molecular Networking). Thus, the flavones isovitexin-2''-O- rhamnoside, isovitexin 2''-O-arabinoside, vitexin and saporanin and the amides feruloyl putrescine, feruloyl agmatine and *p*-coumaroyl were identified in the butanolic phase. Quinoline alkaloids similar to chloroaustralasin were detected at the apolar partition phases.

**Keywords:** alkaloids, flavones, *Conchocarpus*, chemical characterization





# Diversidade química de *Conchocarpus macrocarpus*

---

## 1 Introdução

Rutaceae é caracterizada por grande diversidade de metabólitos secundários, como cumarinas, limonoides, flavonoides, lignanas, óleos voláteis e alcaloides (Ribeiro & Kaplan, 2002; Regina Albarici et al., 2010).

*Conchocarpus* é um dos 150 gêneros pertencentes a Rutaceae, subfamília Rutoideae, sendo o maior gênero dentro da subtribo Galipeinae (GROPPO et al., 2021), distribuído da Nicaraguá ao norte da Bolívia e sul do Brasil, com grande diversidade na Mata Atlântica (COLLI-SILVA; PIRANI, 2019). É composto por arbustos ou pequenas arvores de até sete metros de altura, com folhas alternas, inflorescência geralmente terminal ou extra-axilar, cálice relativamente pequeno e uma corola tubular formada por pétalas coerentes (KALLUNKI; PIRANI, 1998). De acordo com estudos recentes, são reconhecidas 47 espécies de *Conchocarpus* (GROPPO et al., 2021). Dentre essas espécies, apenas sete tiveram sua composição química analisada.

De modo geral, entre as classes de metabólitos encontradas no gênero, os alcaloides destacam-se como substâncias mais diversificadas no grupo, podendo ser encontrados alcaloides quinolínicos (*Conchocarpus fontanesianus* Kallunki & Pirani – Cabral et al., 2012; *C. gaudichaudianus* (A.St.-Hil.) Kallunki & Pirani [atualmente = *Dryades gaudichaudiana* (A.St.-Hil.) Groppo, Kallunki & Pirani] – Cortez et al. 2009; *C. heterophyllus* (A.St.-Hil.) Kallunki & Pirani - Ambrozim et al., 2008 e *C. longifolius* (A.St.-Hil.) Kallunki & Pirani - Mafezoli et al., 2000), indoloquinazolônicos (*C. gaudichaudianus* - Cortez et al. 2009), furanoquinolínicos (*C. inopinatus* Pirani - Bellete et al., 2012) e acridínicos (*C. coeruleus* (A.St.-Hil.) Bruniera & Groppo - Santos et al., 1998; *C. inopinatus* e *C. marginatus* (Rizzini) Kallunki & Pirani - Bellete et al., 2012), sendo esses últimos

restritos a Rutaceae. Além disso, outras classes também já foram encontradas como cumarinas (*C. longifolius* - Mafezoli et al. 2000), flavonoides (*C. heterophyllus* - Ambrozim et al. 2008), esteroides (*C. heterophyllus* - Ambrozim et al., 2008) e triterpenos (*C. coeruleus* - Santos et al., 1998). Maiores detalhes sobre compostos identificados em *Conchocarpus* estão descritos na introdução geral deste trabalho.

## **2 Objetivos**

1. Obter o extrato etanólico das folhas e galhos de *Conchocarpus macrocarpus*;
2. Prosseguir o fracionamento desses extratos de maneira biomonitorada utilizando a capacidade antioxidante e as atividades acetilcolinesterásica e antiproliferativa como indicativos;
3. Identificar, se possível, os componentes majoritários associados às potenciais atividades biológicas testadas.

## **3 Materiais e Métodos**

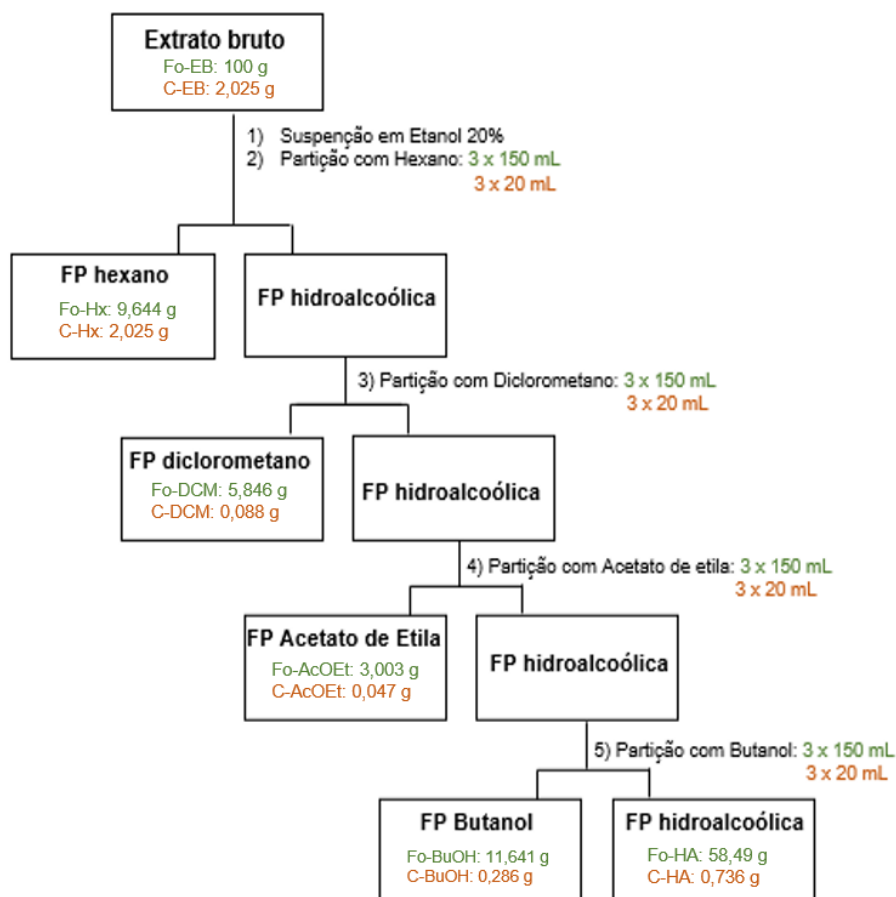
### **3.1 Obtenção do material**

Folhas e galhos de *Conchocarpus macrocarpus* foram coletados de vários indivíduos em Cachoeiro do Itapemirim – Espírito Santo (J.R.Pirani et al. 3530) pela Profa. Dra. Gladys Flávia A. M. de Pinna. Esse material foi mantido em estufa a 60 °C até a secura. Em seguida, o material foi triturado em moinho de facas.

### **3.2 Preparação do extrato etanólico bruto (EB) e fases de partição (FP)**

O pó resultante do material coletado em Cachoeiro do Itapemirim (800 g de folhas e 17 g de galhos) foi submetido a maceração a frio com etanol 70% na proporção 1g:100mL, sob agitação constante por 10 dias, com três trocas de solvente. O extrato foi filtrado, concentrado em evaporador rotativo e liofilizado até completa secura (EB), rendendo 100g (12,6%) para as folhas e 2,025g (16,6%) para os caules.

Em seguida, o extrato bruto foi dissolvido em etanol 20% e particionado com solventes de polaridade crescente (hexano - Hx, diclorometano - DCM, acetato de etila – AcOEt e butanol – BuOH), com três lavagens consecutivas de cada solvente, sendo utilizado para cada lavagem 150 mL para o extrato foliar e 20 mL para o caulinar, conforme indicado na Figura 1.



**Figura 1.** Processo de partição do extrato bruto com solventes de polaridade crescente. Em preto estão representados os processos em comum para o extrato foliar (Fo) e caulinar (C); em verde encontra-se as informações referente ao extrato e fases de partição (FP) foliares e em laranja referente ao extrato e FP caulinares.

### 3.3 Análises Cromatográficas

Todas fases de partição (FP) obtidas foram submetidas a ensaios de atividades biológicas e análises cromatográficas preliminares.

#### 3.3.1 Cromatografia a Gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Duas alíquotas com aproximadamente 1 mg cada das Fo-Hx, Fo-DCM, C-Hx e C-DCM foram separadas para análise. Uma delas foi derivatizada utilizando uma solução de 50:50 µL de *N,O*-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) : Piridina, seguido de aquecimento a 70 °C por 1 hora em banho seco (modificado de Jetter et al., 2000). Após a derivatização, as amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM). Foi utilizado o conjunto Agilent 6850/Agilent 5975C, coluna Agilent HP5-MS (30 m x 250 µm x 0.25 µm), volume de injeção 1 µL, gás de arraste hélio com fluxo de 1 mL/min com método de impacto eletrônico em 70 eV. As temperaturas do injetor, quadrupolo e fonte foram de 300 °C, 230 °C e 150 °C, respectivamente. A rampa de aquecimento da coluna seguiu a seguinte programação: temperatura inicial de 100 °C por 5 minutos seguido de aquecimento de 5 °C. por minuto até 320 °C (temperatura final), mantida por 8 minutos. O tempo total de análise foi de 57 minutos.

### **3.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD)**

Os EB e todas as FP foram suspensos em MeOH grau HPLC e preparados na concentração de 2 mg/mL para serem analisadas.

As análises por CLAE-DAD foram feitas utilizando o sistema Agilent 1260. Os cromatogramas foram obtidos com detecção em 352 nm e 280 nm, empregando-se a coluna Zorbax C18 (150 mm x 4.6 mm x 3.5 µm) a 45 °C. Como fase móvel foi empregado gradiente de ácido acético 0,1% (AcOH) e acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN), começando a corrida com 10% de CH<sub>3</sub>CN (0-6 min), aumentando para 15% (6-7 min), mantendo isocrático por 15 min, seguido de aumento para 50% (22-32 min) e para 100% (32-42 min) mantendo-se isocrático por mais 8 minutos. O fluxo de solvente foi de 1,0 mL/min. O volume de amostra injetado para análise foi de 3 µL.

### **3.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (CLAE-MS/MS)**

Para essa análise foram submetidas as amostras Fo-BuOH e Fo-HxDCM.

As análises foram desenvolvidas em um cromatógrafo (Shimadzu - modelo) acoplado a um espectrômetro de massas (Maxis - modelo) equipado com uma

fonte de ionização por elétron-spray (ESI) operando em modo positivo na Central Analítica do IQ-USP. A coluna empregada foi uma Zorbax-C18 column (150 mm x 4,6 mm x 3,5  $\mu$ m) a 40 °C. A fase móvel, o fluxo e o volume de injeção foram os mesmos usados na análise por CLAE-DAD. As condições do espectrômetro de massas foram ionização em modo positivo, com potencial capilar de 4000 V, temperatura de secagem da amostra de 200°C e fluxo do gás nebulizador (Nitrogênio) de 5 L.min<sup>-1</sup> com pressão de 35 psi. Os espectros de massas foram adquiridos em modo de total scan na faixa de  $m/z$  50 a 1200. Uma rampa de 20 a 75 eV de energia de colisão foi empregada nas análises.

### 3.4 Obtenção das redes moleculares

As redes moleculares foram construídas usando o fluxo de trabalho online “online workflow” (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) disponível na página do GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Os dados foram filtrados removendo todos os íons de fragmento de MS/MS dentro de +/- 17 Da do precursor  $m/z$ . Os espectros de MS/MS foram filtrados por janela, escolhendo apenas os seis íons de fragmento superiores na janela de +/- 50 Da em todo o espectro. A tolerância de massa do íon precursor foi fixada em 2,0 Da e a tolerância de fragmento de íon MS/MS de 0,5 Da.

Uma rede foi criada na qual as bordas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,7 e mais de seis picos correspondentes. Além disso, as bordas entre dois nós foram mantidas na rede somente se cada um dos nós aparecesse nos respectivos 10 nós mais semelhantes. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100 e as bordas de pontuação mais baixas foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite.

Os espectros na rede foram então pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre os espectros da rede e os espectros da biblioteca deveriam ter uma pontuação acima de 0,7 e pelo menos seis picos correspondentes.

## **4 Resultados e Discussão**

### **4.1 Análise do Perfil Cromatográfico dos extratos por CLAE-DAD**

Os extratos foliares e caulinares de *Conchocarpus macrocarpus*, assim como as fases de partição obtidas, foram analisadas em CLAE-DAD. Na tabela 1 pode ser observado o tempo de retenção e porcentagem relativa dos picos obtidos e na Figura 2 os espectros de absorção em UV-Vis desses compostos.

Com base nesses resultados preliminares é possível observar que alguns padrões de espectros de absorção UV-visível são mais frequentes nas amostras analisadas, tanto em termos qualitativos quanto quantitativos. Dentre os espectros de UV-visível que mais se repetem e que se referem a substâncias majoritárias, destacam-se o espectro 1, 4, e 13, que se referem a alcaloides, flavonas e amidas derivadas de ácido hidroxicinâmico, respectivamente. Observa-se também que enquanto o espectro 1 está presente nas frações mais apolares (hexano e diclorometano), os espectros 4 e 13 são mais frequentes na fração de butanol.

### **4.2 Identificação das substâncias majoritárias**

Após avaliação das fases de partição (FP) quanto seu potencial antioxidante, antiacetilcolinesterásico e citotóxico, as FP de hexano, diclorometano e butanol oriundas do extrato foliar e caulinar apresentaram os resultados mais promissores e, por isso, foram submetidas às técnicas para identificação dos componentes principais.

Para identificação das substâncias foram utilizados os dados obtidos a partir da análise por CLAE-DAD e CLAE-EM/EM, assim como CG-EM. Além disso, os espectros de massas das amostras foliares foram analisados na plataforma GNPS. A maioria das sugestões de identificação das classes e substâncias presentes nas frações de hexano, diclorometano e butanol foi feita a partir de análises do extrato foliar, entretanto, os extratos caulinares apresentaram uma certa semelhança no perfil cromatográfico, sendo que muitas substâncias com identificação sugerida podem também ser encontradas nas amostras de caule.

**Tabela 1.** Tempo de retenção (TR) e porcentagem relativa dos picos obtidos através da técnica de CLAE-DAD, no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 352nm. Espaços preenchidos com (\*) lê-se ausência do pico. Os picos encontram-se organizados por ordem de eluição. # os números na coluna “UV” correspondem aos espectros de UV-Vis representados na Figura 2.

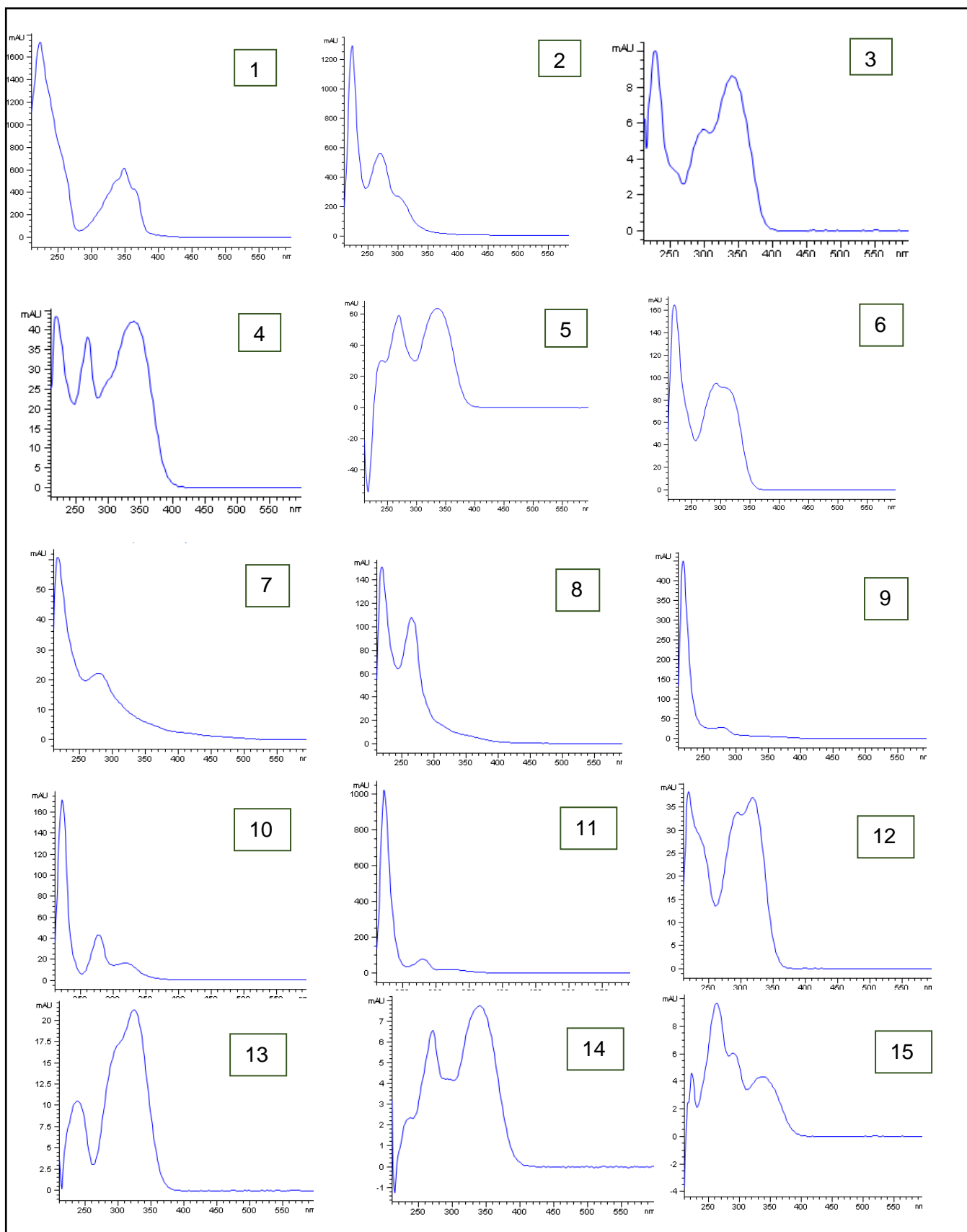
TR	Fases de partição										UV#
	Fo-H	C-H	Fo-DCM	C-DCM	Fo-AcOEt	C-AcOEt	Fo-BuOH	C-BuOH	Fo-HA	C-HA	
1,297	****	****	****	****	****	****	****	****	3,973	8,384	7
1,382	****	****	****	****	****	4,563	****	4,618	3,973	23,396	8
1,479	****	****	****	****	****	****	****	****	****	6,711	9
1,516	****	****	****	1,294	1,902	9,513	3,537	35,504	23,504	38,093	2
1,711	****	****	****	****	****	****	1,248	10,905	****	****	10
1,888	****	****	****	****	****	4,048	1,731	2,915	****	5,719	10
1,922	****	****	****	****	****	6,595	1,865	5,451	11,931	8,616	11
2,707	****	****	****	****	****	****	8,845	****	****	****	12
2,761	****	****	****	****	****	11,107	****	6,194	****	****	13
3,015	****	****	****	****	****	2,351	3,425	2,236	****	****	13
4,109	****	****	****	1,57	****	25,71	****	14,194	****	****	13
3,512	****	****	****	****	****	6,125	5,659	10,148	1,523	2,586	13
4,393	****	****	****	****	****	19,583	****	12,478	****	****	13

5,19	****	****	****	****	2,424	****	8,845	****	****	****	6
6,027	****	****	****	****	2.158	****	10.642	8.371	****	****	13
6,349	****	****	****	****	****	****	****	****	29,210	****	3
10,159	****	****	****	****	3,852	****	12,013	****	****	****	5
10.698	****	****	****	****	1,248	****	20,486	****	****	****	4
12,593	****	****	****	****	1,692	****	3,222	****	****	****	14
13,892	****	****	****	****	19,603	****	30,507	****	16,844	****	4
14,603	****	****	0,922	****	13,893	****	29,691	****	****	****	4
14.997	****	****	****	****	****	****	18.657	****	****	****	4
28,219	****	****	****	1,392	****	7,069	****	****	****	****	12
29,636	****	****	****	****	14,627	****	1,848	****	****	****	1
29,715	****	****	13,854	****	2,079	****	2,397	****	****	****	****
29,722	****	****	****	1,271	****	****	****	****	****	****	1
31,658	****	****	4,411	****	2,237	****	****	****	****	****	1
31,745	****	****	5,296	****	1,177	****	****	****	****	****	1
31,88	****	****	****	2,671	****	****	****	****	****	****	16
32,633	1,048	2,347	3,131	13,104	1,067	****	****	****	****	****	1
32,985	1,377	1,708	9,520	8,96	4,764	****	****	****	****	****	1

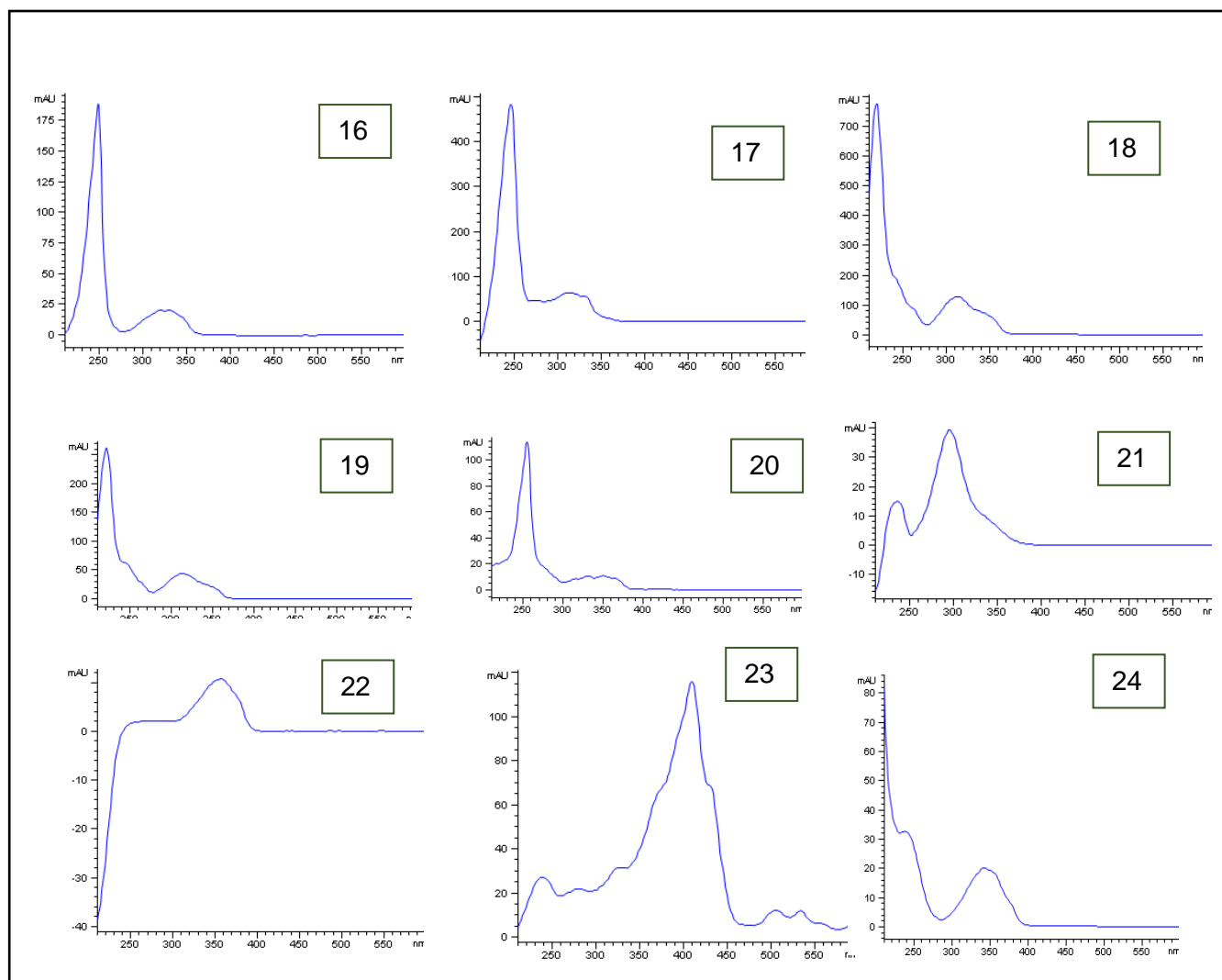


33,678	****	1,064	****	33,088	****	****	****	****	****	****	17
34,077	****	1,371	****	****	****	****	****	****	****	****	1
34,222	1,615	****	5,096	****	****	****	****	****	****	****	1
34,301	****	****	5,030	****	1,732	****	****	****	****	****	1
34,700	6.992	****	8,160	****	3,385	****	****	****	****	****	1
35,233	****	****	2,698	****	****	****	****	****	****	****	1
35,762	****	1,866	****	12,307	****	****	****	****	****	****	18
37,661	****	****	****	3,976	****	****	****	****	****	****	19
38,683	65.838	77,457	8,525	****	4,036	****	****	****	****	****	1
39,098	****	7,341	****	2,72	****	****	****	****	****	****	20
40,824	4,372	1,126	****	****	****	****	****	****	****	****	1
42,545	****	****	1,391	1,983	1,094	11,807	1,312	****	8,354	****	21
43,537	1,584	1,646	2,872	****	****	****	****	****	****	****	22
43,944	2,271	****	****	****	****	****	****	****	****	****	22
45,241	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	23
45,592	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	24

Fo: folha, C: caule, H: fase de partição em hexano, DCM: fase de partição em diclorometano, AcOEt: fase de partição em acetato de etila, BuOH: fase de partição em butanol, HA: fase hidroalcoólica.



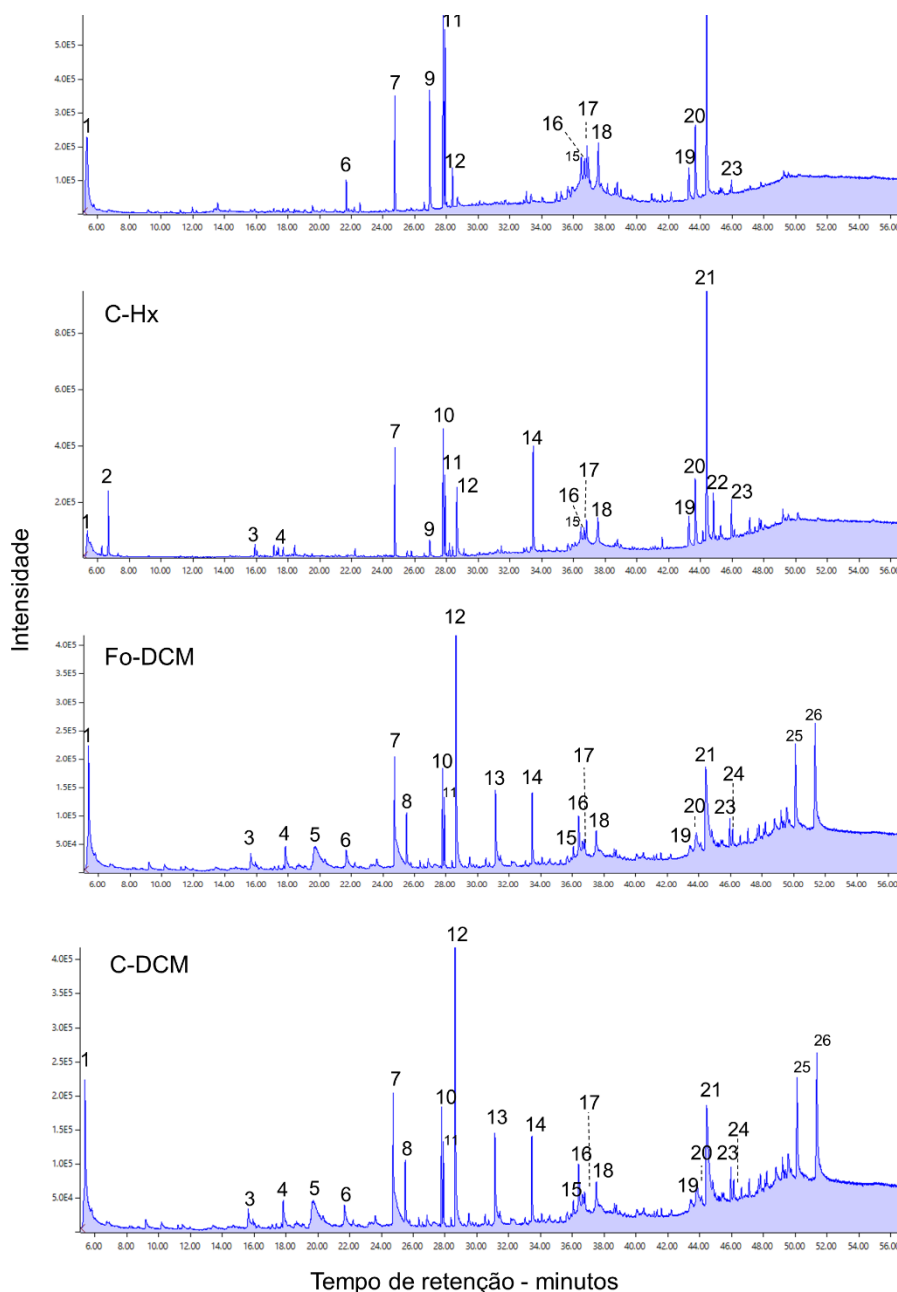
**Figura 2.** Espectros de absorção UV-visível dos picos indicados na tabela 1. Figura continua na página seguinte.



**Figura 2.** Continuação

### 4.3 Análise do perfil cromatográfico das fases de partição apolares por CG-EM

Visando a obtenção dos espectros de massas e padrão de fragmentação, as fases de partição mais apolares de caule e folhas de *Conchocarpus macrocarpus* (Fo-Hx, Fo-DCM, C-Hx, C-DCM) foram analisadas em CG-EM. O perfil cromatográfico das amostras de hexano e diclorometado do caule (C-Hx e C-DCM) e das folhas (Fo-Hx e Fo-DCM), podem ser observados na Figura 3. Os espectros de massas dessas substâncias, mesmo as não identificadas, encontram-se **no Apêndice A** numerados por ordem de eluição conforme representado no cromatograma da Figura 3.



**Figura 3.** Perfil cromatográfico das fases de partição Fo-Hx, C-Hx, Fo-DCM e C-DCM obtidas a partir do extrato bruto foliar e caulinar de *C. macrocarpus* analisadas em CG-EM. Os picos cromatográficos encontram-se numerados por ordem de eluição, sendo que os números dos picos que se repetem nos cromatogramas relativos a mesma substância. C: caule, Fo: folha, DCM: diclorometano, Hx: hexano.

Em comparação com a literatura e banco de dados, como o Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST), sugestões de identificação de alguns

espectros de massa puderam ser feitas para as fases de partição apolares (hexano e diclorometano) de caule e folhas.

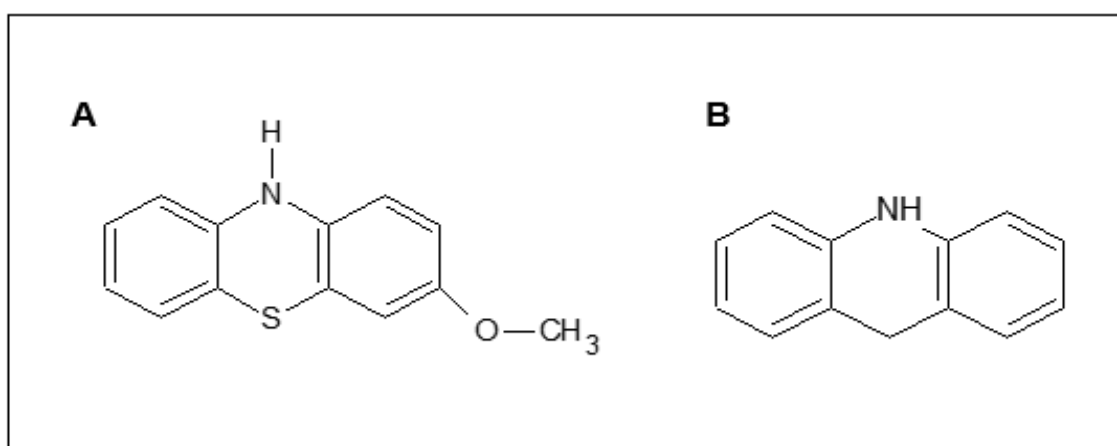
O pico **1**, presente em todas amostras analisadas teve sua identificação sugerida como 1-metil prolina, com base em sua fragmentação e comparação dos fragmentos mais abundantes com a biblioteca da NIST. Prolinas são aminoácidos comumente encontrados em plantas, sendo que algumas espécies se caracterizam por apresentar um baixo nível dessas substâncias em condições ótimas ou seu acúmulo sob algum estresse, seja salínico, estresse hídrico, deficiência de nitrogênio no solo, entre outros (RAMANJULU; BARTELS, 2002). É sabido que esses aminoácidos estão envolvidos na biossíntese de compostos relacionados a proteção contra tais estresses (SERVILLO et al., 2011). Além disso, prolinas, como por exemplo 1-metil prolina e outras substâncias derivadas deste mesmo metabolismo, já foram relatadas em outra espécie de Rutaceae, como por exemplo em bergamota (*Citrus bergamia* Risso et Poit.) (SERVILLO et al., 2011).

O padrão de fragmentação observado para o pico **5**, presente nas duas amostras de diclorometano, sugere que esse composto seja um coniferol. Fragmentos resultantes de quebras características, como por exemplo o pico base de  $m/z$  137, atribuído ao rearranjo molecular de um íon precursor e perda subsequente do radical neutro  $\text{CH}_2\text{CHO}$ , além do segundo pico mais abundante de  $m/z$  180, referente ao íon molecular desse composto são descritos para esse composto (TAKAHASHI et al., 2011). A comparação do espectro de massas dessa substância com a NIST corroborou com a identificação sugerida. Esse composto e/ou substâncias derivadas já foram relatadas em diversas espécies de Rutaceae, como nas raízes de *Zanthoxylum chalybeum* (Anza et al., 2014), ou em casca de espécies de *Citrus*, como em laranja (*C. sinensis* L. Osbeck), tangerina (*C. reticulata* L. Blanco), toranja (*C. paradisi* L. Macf.) e limão (*C. limon* L. Burm (MANTHEY; GROHMANN, 2001). Entretanto, não foi encontrado na literatura nenhuma descrição de coniferol para espécies de *Conchocarpus*.

O pico **10**, presente em todas amostras analisadas apresenta fragmentação característica de alcano, com perda de fragmentos de  $m/z$  14. Além disso, o fragmento  $\text{M}^+$  de  $m/z$  310 permitiu a identificação desse composto como docosano. A presença dessa substância já foi relatada por Silveira et al.,

(2021) na cera cuticular das folhas de diversas espécies de *Conchocarpus*. Em outras Rutaceae, Tagad et al. (2018) descreveram a presença de docosano no extrato de éter de petróleo das frutas de *Aegle marmelos* (L.). Além disso, docosano também foi reportado no extrato de CO<sub>2</sub> líquido das flores de *Murraya paniculata* Linn (ROUT; RAO; NAIK, 2010).

O pico **12** apresentou uma fragmentação muito semelhante ao composto 3-metoxi-10H-fenotiazina (Figura 4 a), de acordo com comparação da biblioteca da NIST e o banco de dados do PubChem (2021), onde os fragmentos  $m/z$  229,  $m/z$  186 e  $m/z$  214 aparecem como mais abundantes nessa substância. Entretanto, até onde vai nosso conhecimento, nada se encontra na literatura a respeito da presença desse composto em plantas de Rutaceae. Por outro lado, alcaloides acridínicos (Figura 4 b), característicos dessa família (WAINWRIGHT, 2001), apresentam um esqueleto químico bastante semelhante a fenotiazina. Fenotiazinas nunca foram relatadas em *Conchocarpus*, por outro lado, vários alcaloides acridínicos já foram descritos por Mafezoli et al. (2001) em *C. inopinatus* e em *C. marginatus* por Bellete et al. (2012). Portanto, para que seja possível afirmar se esse pico é uma fenotiazina ou um alcaloide acridínico, o isolamento dessa substância para posterior elucidação estrutural por RMN é necessária.

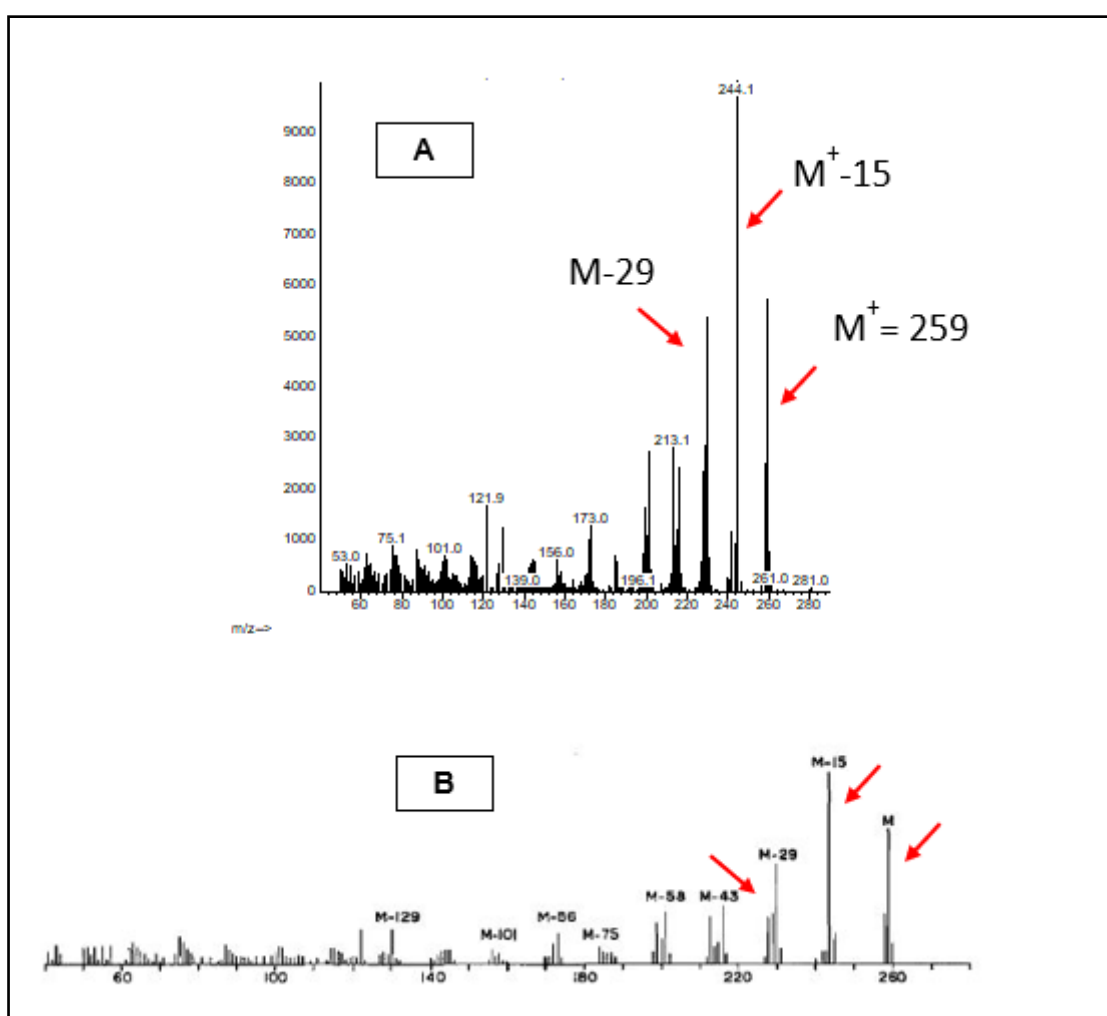


**Figura 4.** Representação das estruturas do composto 3-metoxi-10H-fenotiazina (A) e do esqueleto básico de um alcaloide acridínico (B).

O pico **14** foi identificado como esquimiamina por comparação com a biblioteca da NIST e em comparação com o espectro desse alcaloide furanoquinolínico encontrado por Cabral et al. (2011) em *C. fontanesianus*. A

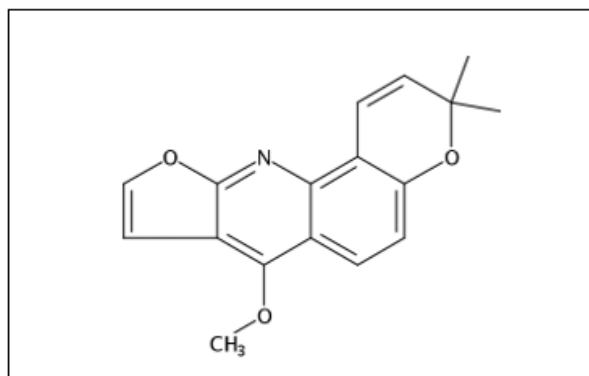
Figura 5 representa a comparação do espectro de massas encontrado neste trabalho (A) com o espectro de massas da esquimiamina identificada por Cabral et al. (2011) (B).

Esquimiamina é um alcaloide amplamente encontrado em Rutaceae, descrito em espécies como *Almeidea coerulea* (Cortez et al., 2009), *Spiranthera odoratissima* (TEREZAN et al., 2010), *Raulinoa echinata* (BIAVATTI et al., 2002), *Boninia glabra* (INADA et al., 2008), *Conchocarpus fontanesianus* (CABRAL et al., 2012b), entre outras. Segundo Iwashina (2000), esquimiamina é um dos alcaloides mais comuns na família.



**Figura 5.** Comparação entre o espectro de massas da esquimiamina identificada em *Conchocarpus macrocarpus* (pico 12) (A) com espectro de massas da mesma substância identificada por Cabral et al. (2011) em *C. fontanesianus* (B). As setas em vermelho indicam importantes fragmentos comuns para essa substância.

Com base no padrão de fragmentação do pico **15**, em comparação com espectro de massas da NIST, a identificação para esse composto foi sugerida como sendo o alcaloide furanoquinolínico dutadrupina (Figura 6).



**Figura 6.** Representação da estrutura da dutadrupina.

Em uma busca na literatura foi observado que o alcaloide dutadrupina está principalmente distribuído em espécies de Rutaceae, família a qual esse composto foi descrito pela primeira vez por Baudouin e colaboradores (1981) (BAUDOUIN et al., 1981) em *Dutaillyea drupacea* Guill.

Assim como em *C. macrocarpus*, em *Comptonella sessilifoliola* Guill, esse alcaloide foi encontrado nas fases de partição mais apolares do extrato etanólico de caule, junto com outros alcaloides furanoquinolínicos (Pusset *et al.*, 1991). Além disso, a dutadrupina também foi descrita em outras espécies de Rutaceae, como no extrato de diclorometano das folhas de *Almeidea caerulea* (Nees & Mart.) A.St.-Hil., (SANTOS et al., 1998) [= *Conchocarpus guyanensis* (Pulle) Kallunki & Pirani (Pirani & Groppo, 2020)] e nas fases de partição apolares do extrato foliar de *Conchocarpus coeruleus* (A.St.-Hil.) Bruniera & Groppo (Santos et al., 1998).

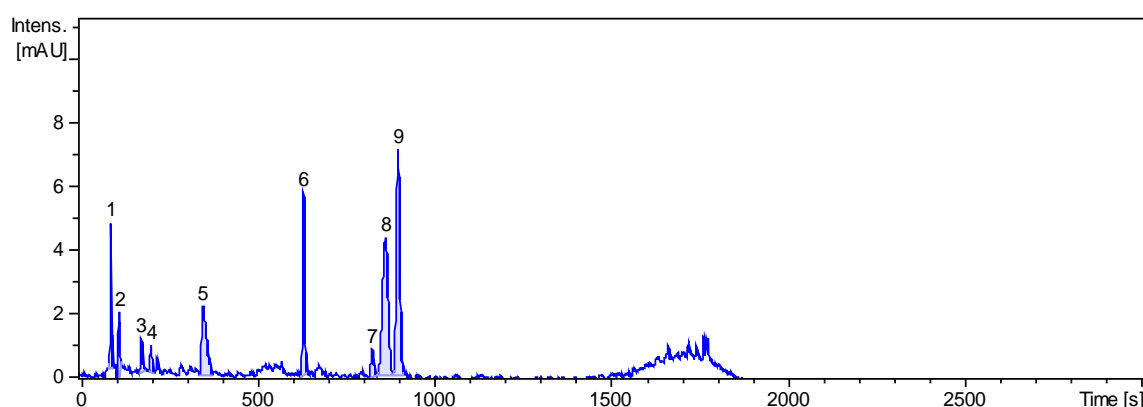
Os picos **19**, **22** e **23** foram identificados como fitoesteróides. O pico 19 foi identificado como estigmasterol por apresentar como pico base o íon 83, além de picos característicos  $m/z$  129 e  $M^+$  484. O pico 22 foi identificado como  $\beta$ -sitosterol por apresentar como pico base o íon  $m/z$  129, além de fragmentos  $m/z$  357, 396, 471 ( $M^+$  -15) e  $M^+$  486. Por último, o pico 23 foi identificado como sitostenona por apresentar como pico base o íon  $m/z$  124 e o fragmento  $M^+$  412. A presença de fitoesteróides em fases de partição apolares é esperada, uma



vez que são componentes comuns em extratos vegetais, distribuídos em uma grande variedade de plantas (TULASI; REDDY; RAO, 1992). Estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol são os principais fitoesteroides encontrados em ceras cuticulares, inclusive já descritos para espécies de *Conchocarpus* (SILVEIRA et al., 2021), embora esses compostos também possam estar presente em extratos e fases de partição, como já descritos no extrato hexânico e fase de partição de diclorometano de *Conchocarpus heterophyllus* (Ambrozim, 2008), assim como na fase de partição de diclorometano de *C. gaudichaudianus* (Cortez et al., 2009).

#### 4.4 Identificação das substâncias da fase de partição butanólica (Fo-BuOH) por CLAE-EM/EM

A Fo-BuOH foi avaliada através de CLAE-DAD e os picos foram numerados de acordo com a ordem de eluição (Figura 7). Valores de absorção máxima em UV-visível e dados referentes ao espectro de massas para cada substância são apresentados na tabela 2. Além disso, os espectros de massa (EM/EM) e de UV-visível, assim como as estruturas das substâncias, constam no **APÊNDICE B**. A rede molecular obtida com os dados de espectrometria de massas com auxílio da plataforma GNPS está representada na Figura 8, na qual é possível observar os diferentes grupos de metabólitos secundários que se juntaram devido a familiaridade de fragmentação.

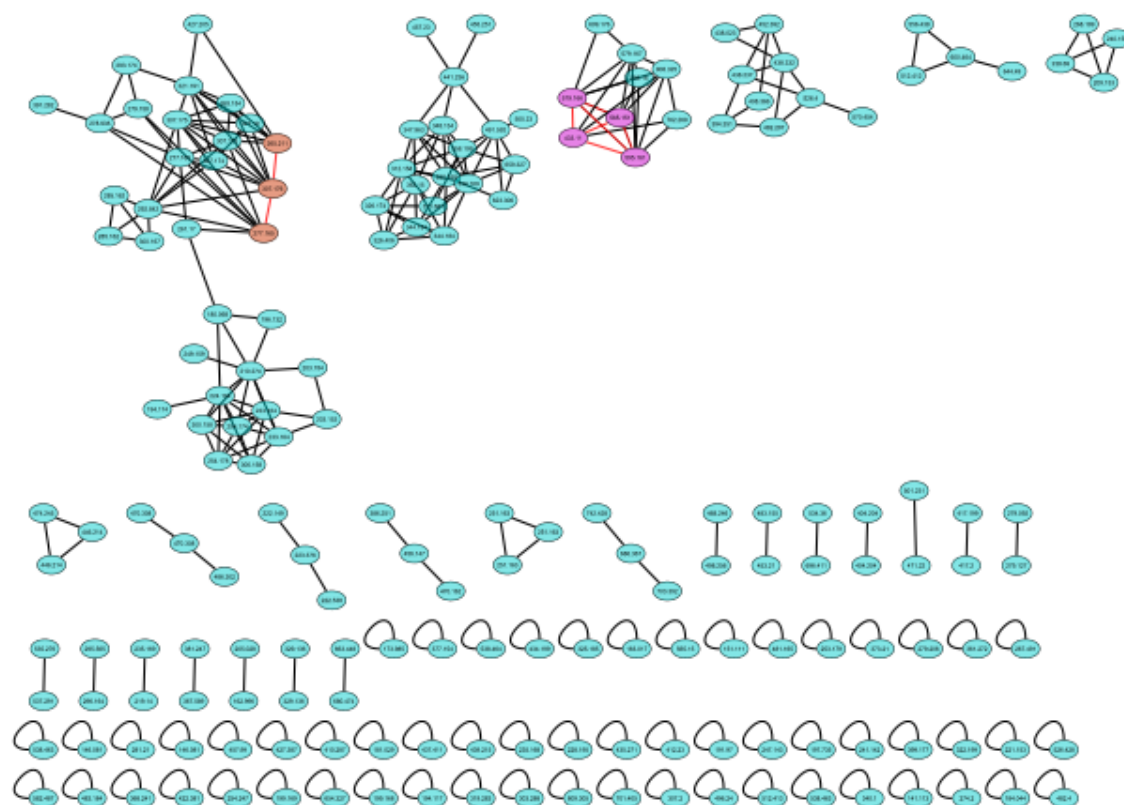


**Figura 7.** Cromatograma obtido por análise em CLAE-DAD no comprimento de onda de 352nm da fase de partição butanólica (Fo-BuOH) obtida a partir do extrato foliar de *Conchocarpus macrocarpus*.

**Tabela 2.** Compostos identificados na fração Fo-BuOH.

Pico	t.r. (min)	Substâncias	Massa [M+H] <sup>+</sup>	Diferença de massa	Erro de massa (PPM)	Ionização positiva EM/EM	UV max (nm)
1	1.6	--	--	--	--	--	--
2	2.0	--	--	--	--	--	--
3	3.0	<i>p</i> -Coumaroil agmatina	277.1643	1.004	3609	277 → 260; 218; 147; 119; 114	220; 316
4	3.5	Feruloil putrescina	265.1521	0.002	5	265 → 248; 177; 145; 117; 106	222; 316
5	5.9	Feruloil agmatina	307.1752	0.001	3	307 → 248; 177; 145; 117	226; 316
6	10.6	Saponarina	595.1611	0.003	5	595 → 415; 397; 379; 367; 337; 313; 283; 183; 165; 121	230; 270; 334
7	13.9	Isovitexina 2''-O-arabinosideo	565.1519	0.003	5	565 → 433; 397; 283; 183; 121	236; 270; 332
8	14.6	Isovitexina-2''-O-ramnosideo	579.1691	0.003	4	579 → 433; 367; 313; 283; 256; 121	228; 268; 338
9	15.0	Vitexina	433.1095	0.004	9	433 → 313; 283; 165	228; 270; 338

Lê-se (--) para composto não identificado.



**Figura 8.** Rede molecular dos compostos da fase de partição butanólica obtida do extrato bruto foliar de *Conchocarpus macrocarpus*. Os círculos em azul representam compostos minoritários; em laranja e roxo os compostos enumerados no cromatograma representado na Figura 6 e as linhas vermelhas destacam a ligação entre esses metabólitos.

A ionização dos picos **1** e **2** não foram encontradas na análise de CLAE-EM/EM, sendo assim, nenhuma sugestão de identificação para esses compostos pode ser feita.

Os picos **3**, **4** e **5** apresentaram semelhança no espectro de UV visível, com absorção máxima ( $\lambda$  max) entre 220 e 316 nm, características de substâncias derivadas de ácido cinâmico (CALDAS et al., 2019).

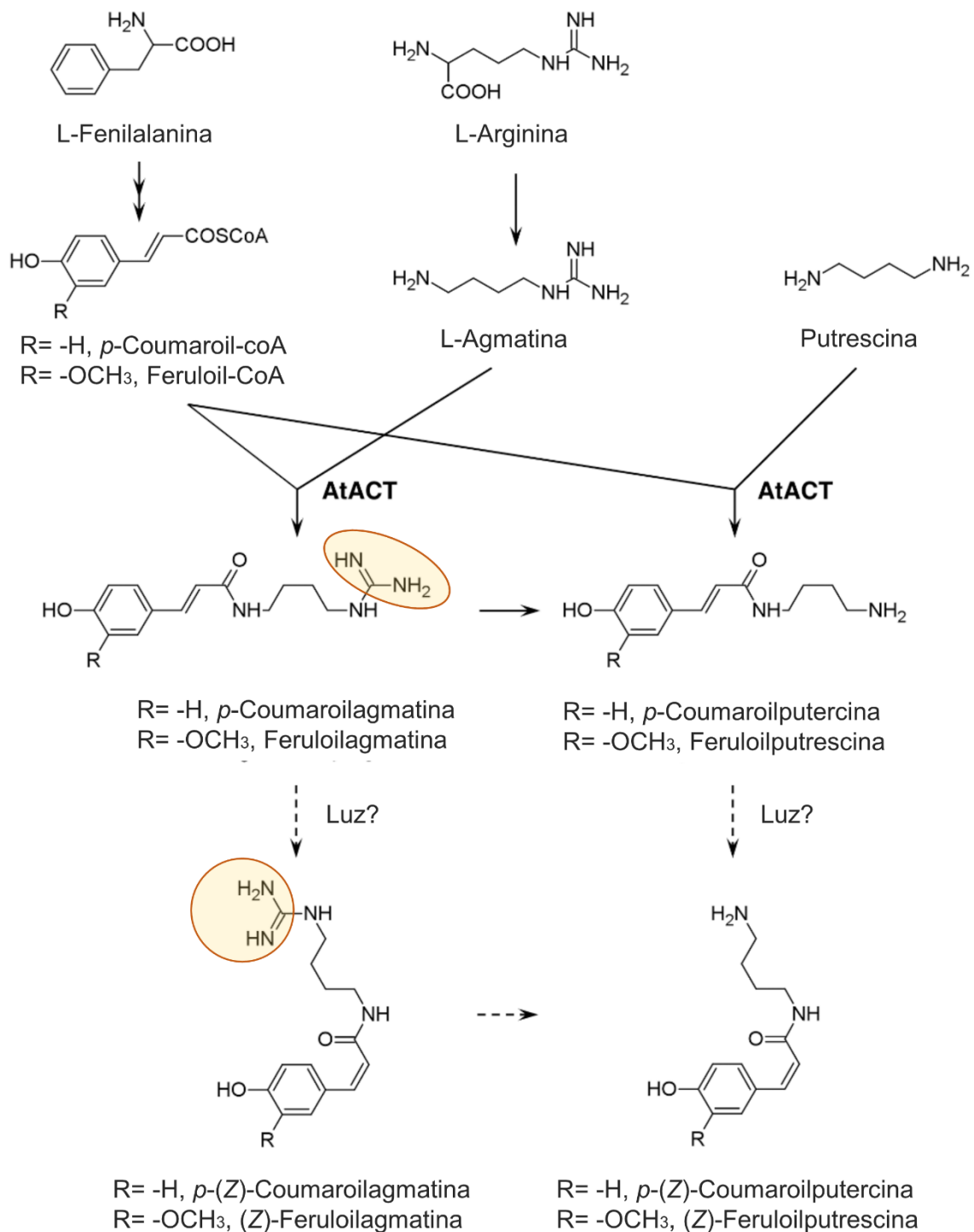
O pico **3** foi identificado como *p*-coumaroil agmatina. De acordo com a literatura (National Center for Biotechnology Information, 2021), esse composto apresenta massa exata de 276.158626 g/mol. No presente trabalho esse fenilpropanoide aparece protonado, sendo observada uma diferença de massa

de 1 u.m.a., correspondente a massa do hidrogênio. Em relação a fragmentação, essa substância apresenta como pico majoritário o fragmento em MS<sup>2</sup> de  $m/z$  147 [M+H-130]<sup>+</sup>, correspondente a perda do resíduo agmatina (C<sub>5</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>), como já foi previamente reportado por Pihlava (2014).

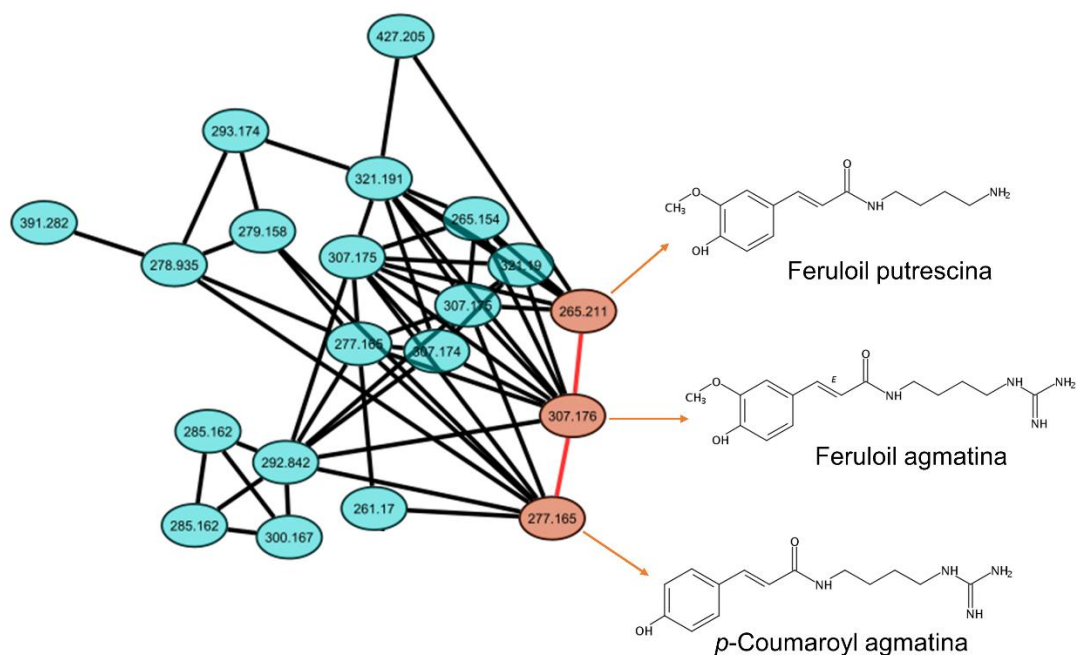
O pico 4 foi identificado como feruloil putrescina. Em relação a fragmentação, essa substância apresenta quebras características como o fragmento em MS<sup>2</sup> de  $m/z$  177, correspondente ao íon feruloil, e um fragmento de  $m/z$  145, proveniente de perdas neutras de espermidina (LI et al., 2018). Além disso, o pico 4 apresentou espectro de MS e fragmentação MS<sup>2</sup> similar a dados previamente reportados por Pihlava (2014).

O pico 5 apresenta uma fragmentação similar ao composto 4, entretanto apresenta uma diferença de  $m/z$  42 maior que o pico anterior. Essa diferença de massa foi atribuída ao fragmento (NH-C=NH) na estrutura, destacado na Figura 8. Com isso, a sugestão de identificação para esse pico foi atribuído a feruloil agmatina.

Além disso, é possível notar a relação do ponto de vista biossintético das três substâncias derivadas de ácidos hidroxicinâmicos identificadas (Figura 9). A biossíntese dessas substâncias justifica a similaridade na fragmentação, conseqüentemente, seus agrupamentos no mesmo cluster da rede molecular. Na Figura 10 está representado a interligação por rede molecular dessas substâncias, com destaque em linha vermelha para a ligação entre elas.



**Figura 9.** Esquema biossintético dos derivados de ácidos hidroxicinâmicos identificados e sua interligações. A exposição a “Luz” indica possibilidade de isomeria do tipo *trans*. AtACT = coumaroiltransferase. Fonte: adaptado de Muroi et al. (2012).



**Figura 10.** Conexão das amidas derivadas de ácidos hidroxicinâmicos presentes na fase de partição Fo-BuOH.

Amidas derivadas de ácido hidroxicinâmico como as identificadas na fase de partição butanólica são substâncias antifúngicas conhecidas, sendo que muitas são descritas como fitoalexinas, sintetizadas por plantas em resposta a infecções causadas por patógenos (MUROI et al., 2012; KUMAR et al., 2018). Um grande número de amidas oriundas de fontes vegetais tem sido reportado para várias plantas, principalmente Piperaceae e Rutaceae, que são famílias conhecidas como boas produtoras dessa classe de metabólitos secundários associados ao processo de defesa das plantas (KUMAR; BHATT; KUMAR, 2018). Segundo Dala-Paula e colaboradores (2019), espécies de *Citrus* infectadas por patógenos tendem produzir uma grande quantidade desses compostos, como feruloil putrescina, resultando em um sabor mais amargo ao suco. Algumas amidas já foram descritas para espécies de *Conchocarpus*, como por exemplo *N-trans-feruloiltiramina* (moupinamida) em *C. gaudichaudianus* (Cortez et al., 2009) e *C. fontanesianus* (Cabral et al., 2016). Entretanto, até onde vai nosso conhecimento, esse é o primeiro relato de *p-coumaroil agmatina*, feruloil putrescina e feruloil agmatina nesse gênero.

Os picos cromatográficos **6**, **7**, **8** e **9** apresentaram espectros de absorção UV-Vis semelhantes, com absorção máxima ( $\lambda$  max) em torno de 270 nm e 334 nm, valores descritos para vários flavonoides do tipo flavona, derivados de apigenina (OSZMIANŃSKI et al., 2020).

Além da semelhança no espectro de UV-Vis, essas substâncias apresentaram fragmentação em MS<sup>2</sup> semelhante, com muitos fragmentos em comum, como a quebra em  $m/z$  313 na maioria das moléculas, referente a parte C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> da estrutura. Além disso, o fragmento  $m/z$  283 referente a parte C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> foi encontrado em todas flavonas identificadas.

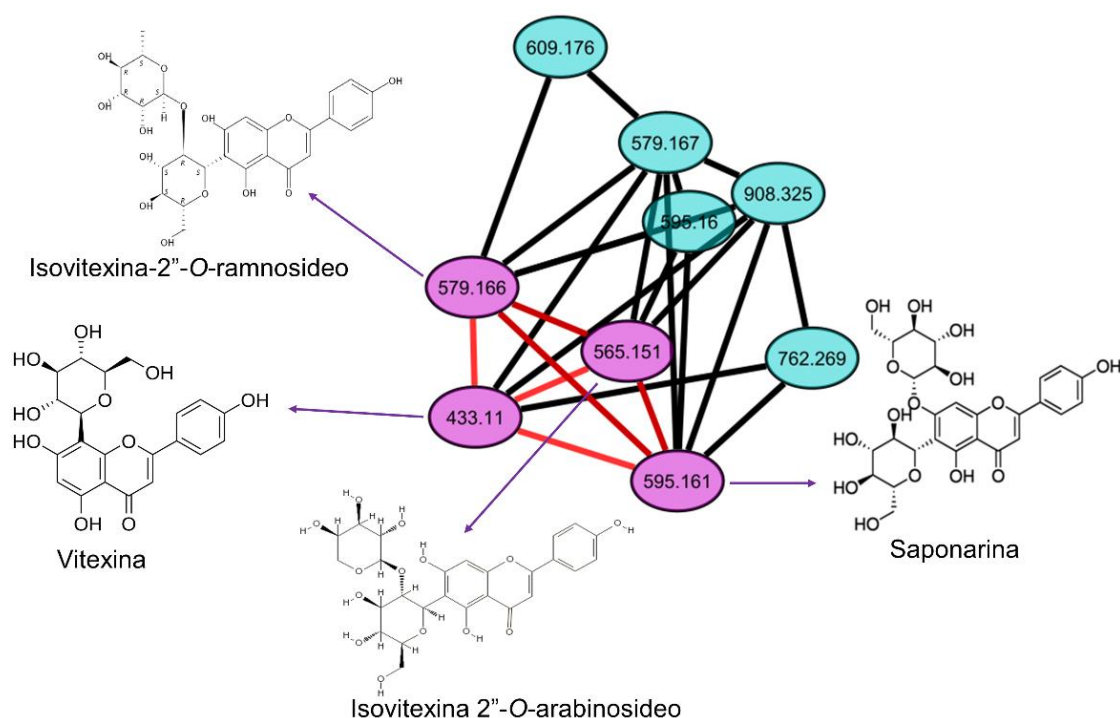
Os fragmentos encontrados foram agrupados e comparados com a biblioteca do GNPS, permitindo a sugestão de identificação de quatro flavonas glicosiladas: saponarina (**6**), Isovitexina 2"-O-arabinosídeo (**7**), Isovitexina-2"-O-ramnosídeo (**8**) e vitexina (**9**). Os dados de fragmentação foram comparados com flavonas identificadas por Abrankó e colaboradores (2011).

Na Figura 11 está representado a conexão por rede molecular das 4 flavonas presentes na fase de partição Fo-BuOH, destacadas em roxo. As linhas vermelhas destacam a ligação dessas substâncias entre elas.

Flavonoides são descritos em literatura como compostos amplamente distribuídos nas plantas, sendo muito comuns em espécies de Rutaceae, Zingiberaceae, Scrophulariaceae, Leguminosae, Ranunculaceae e Myrtaceae (Iwashina, 2000; Wang et al., 2019).

As flavonas encontradas nesse trabalho já foram relatadas para outras espécies de Rutaceae. Vitexina foi descrita por Noori e colaboradores (2019) em *Ruta graveolens* L., em *Erythrochiton brasiliensis* Nees & Mart (BAJ et al., 2017) e em *Euodia daniellii* (Benn.) Hemsl. (YOO et al., 2002). A isovitexina-2"-O-arabinosídeo e isovitexina-2"-O-ramnosídeo foram encontrados na casca do fruto de *Fortunella margarita* (Lour.) Swingle (sinônimo de *Citrus japonica* Thunb.) (SADEK; MAKRIS; KEFALAS, 2009). Saponarina foi encontrada no extrato etanólico de *Feronia limonea* Scheff., além de vitexina e outros flavonoides (INTEKHAB; ASLAM, 2009; KULKARNI et al., 2021). Além disso, em *Limonia acidissima* Groff, esse flavonoide também foi reportado no extrato foliar (DHAKAR et al., 2019), assim como em *Citrus hystrix* DC (UMRAN et al., 2020),

dentre outras espécies da família. Até onde podemos afirmar, esses flavonoides não foram previamente descritos em outras espécies de *Conchocarpus*, entretanto nesse gênero outras C-glicosilflavonas já foram descritas, como por exemplo isoswertisina; 6,8-di-C-arabinosilapigenina; 6-C-glucosil-8-C-arabinosilgenkwanina em *Conchocarpus guyanensis* (Pulle) Kallunki & Pirani (WIRASUTISNA et al., 1986).



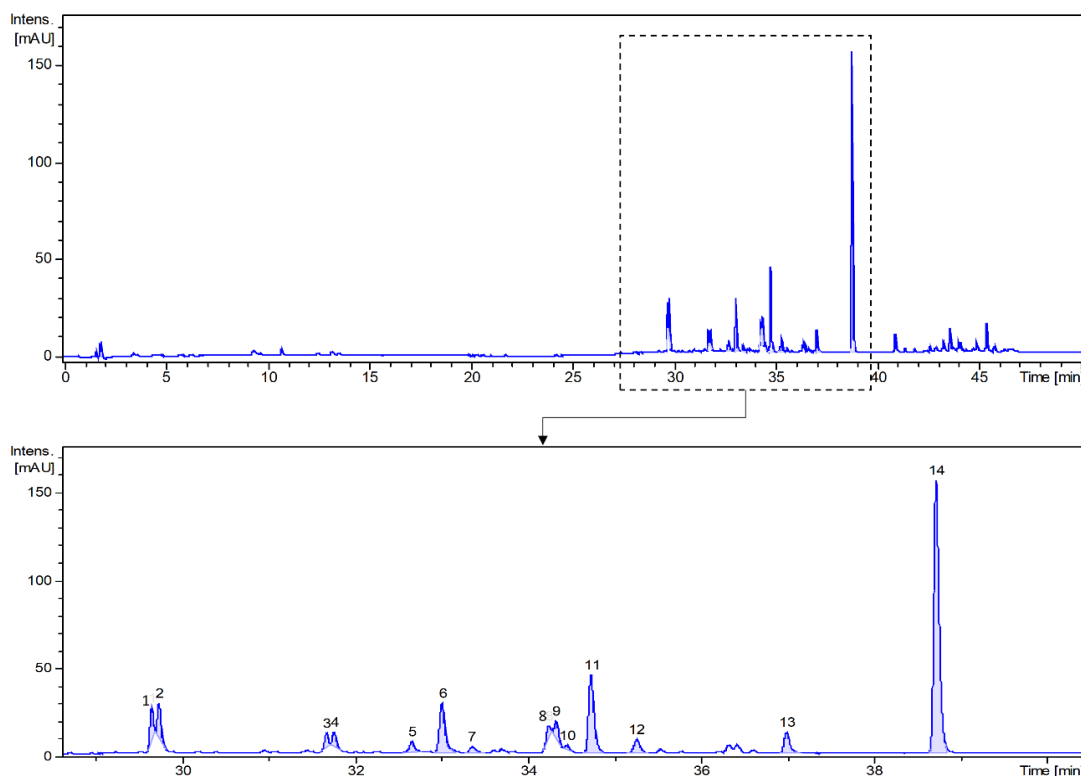
**Figura 11.** Flavonas presentes na fase de partição Fo-BuOH (em roxo), com destaque em linha vermelha para a conexão entre elas. Em azul estão representadas os compostos minoritários.

#### 4.5 Identificação dos picos cromatográficos das fases de partição em Hexano e em Diclorometano (Fo-HxDCM) por CLAE-EM/EM

As duas fases de partição mais apolares (Hexano e Diclorometano) apresentaram similaridade qualitativa em relação aos seus constituintes. Com isso, essas duas fases foram agrupadas formando uma única amostra (Fo-HxDCM).



A parte solúvel em metanol do grupo Fo-HxDCM foi avaliada através de CLAE-DAD e os picos foram numerados de acordo com a ordem de eluição (Figura 12).



**Figura 12.** Cromatograma da amostra Fo-HxDCM oriunda da junção de duas fases de partição foliares (Fo-Hx e Fo-DCM) obtido por CLAE-DAD em 352 nm. Os picos cromatográficos foram numerados por ordem de eluição. Fo: folha, DCM: diclorometano, Hx: hexano.

Todos os dados que serão apresentados e discutidos a seguir na identificação das substâncias referentes a cada pico cromatográfico estão expostos em maior detalhe da tabela 4, onde consta todos os dados de absorção UV-Vis e espectrometria de massas. Além disso, os espectros de massa (EM/EM) e de UV-Vis obtidos, assim como as estruturas das substâncias, constam no **APÊNDICE C**.

As substâncias presentes na fração Fo-HxDCM foram agrupadas pelo GNPS de acordo com a similaridade de fragmentação e a rede molecular (Figura 14) foi gerada pelo programa Cytoscape.

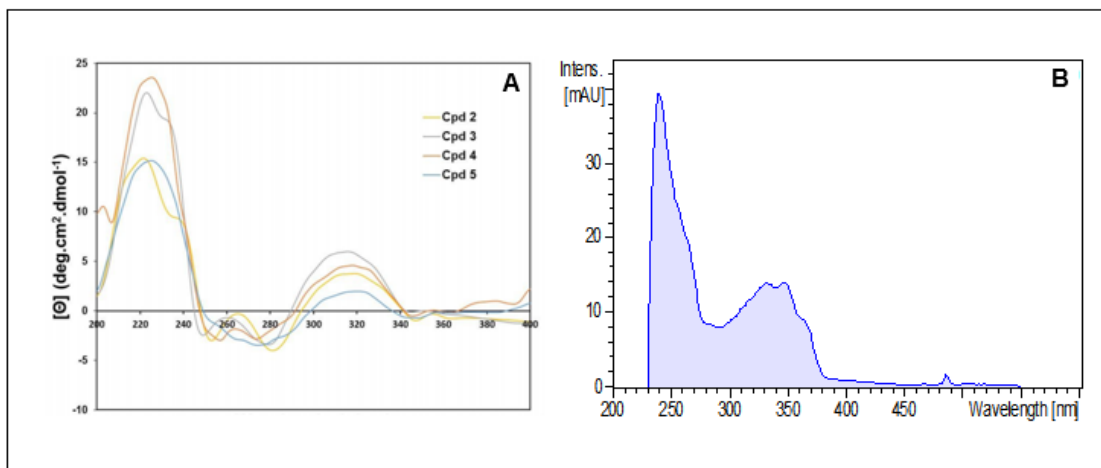
**Tabela 4.** Dados de fragmentação de massas e absorção máxima de UV-visível de substâncias encontradas na porção solúvel do grupo Fo-HxDCM obtido pela junção das fases de partição Fo-Hx e Fo-DCM. Fo: folha, DCM: diclorometano, Hx: hexano.

Pico	t.r. (min)	Massa [M+H] <sup>+</sup>	Ionização positiva EM/EM	UV max (nm)
1	--	--	--	--
2	--	--	--	--
3	31.5	344.1851	344 → 326; 308; 266; 256; 254; 202; 188; 176; 160; 134; 106	240; 348
4	31.6	687.3599	688 → 344; 326; 308; 256; 254; 202; 188; 176; 160; 134; 106	240; 348
5	32.7	312.1590	312 → 294; 252; 228; 214; 212; 188; 174	242; 348
6	32.9	312.1590	312 → 294; 252; 212; 188; 174	242; 348
7	33.4	--	--	--
8	34.2	358.2006	358 → 312; 294; 252; 242; 240; 188; 174; 162	242; 348
9	34.2	312.1567	312 → 294; 252; 190; 174; 213	242; 348
10	34.3	310.1415	310 → 292; 240; 188; 174; 162	244; 348
11	34.6	312.1580	312 → 294; 252; 242; 188; 174; 162	240; 348
12	35.0	326.1731	326 → 308; 266; 202; 188; 134; 106	244; 348
13	36.8	326.1735	326 → 308; 266; 256; 238; 214; 202	240; 350
14	38.5	296.1646	296 → 254; 240; 228; 216; 188; 174; 120; 95	240; 350

Lê-se (--) para composto não identificado.

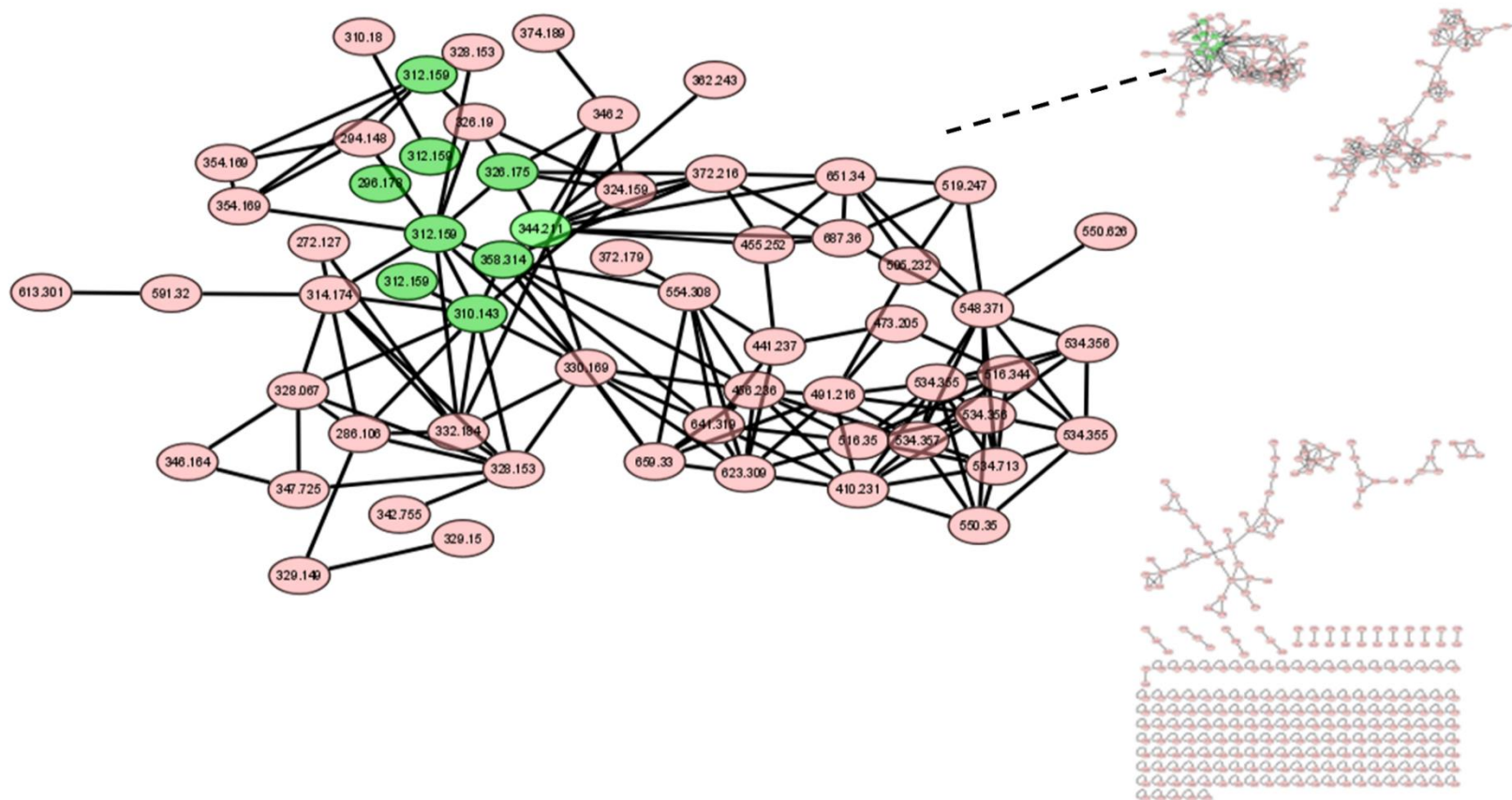
As substâncias encontradas nesse grupo apresentaram espectros de absorção no UV-Vis bastante semelhantes entre si, o que sugere que todas pertencem a mesma classe de metabólitos secundários. Além disso, esses espectros, que podem ser observados na Figura 13 B e no **Apêndice C**, são

bastante parecidos com os encontrados por Olivon e colaboradores (2018) referentes a alcaloides quinolínicos derivados de cloroaustralasinas (Figura 13 A), composto sugerido pelo GNPS por apresentar similaridade na fragmentação.



**Figura 13.** Espectro de absorção UV-VIS de (A) quatro monoterpênil-quinolin-2-onas. Cpd 2 à 4 referem-se a cloroaustralasinas A-C, respectivamente. Cpd 5 refere-se ao espectro UV do composto hidrato trans-erioaustralasina e (B) alcaloides presente nas fases de partição apolares de *C. macrocarpus*. Fonte: Olivon et al., 2018 (material suplementar).

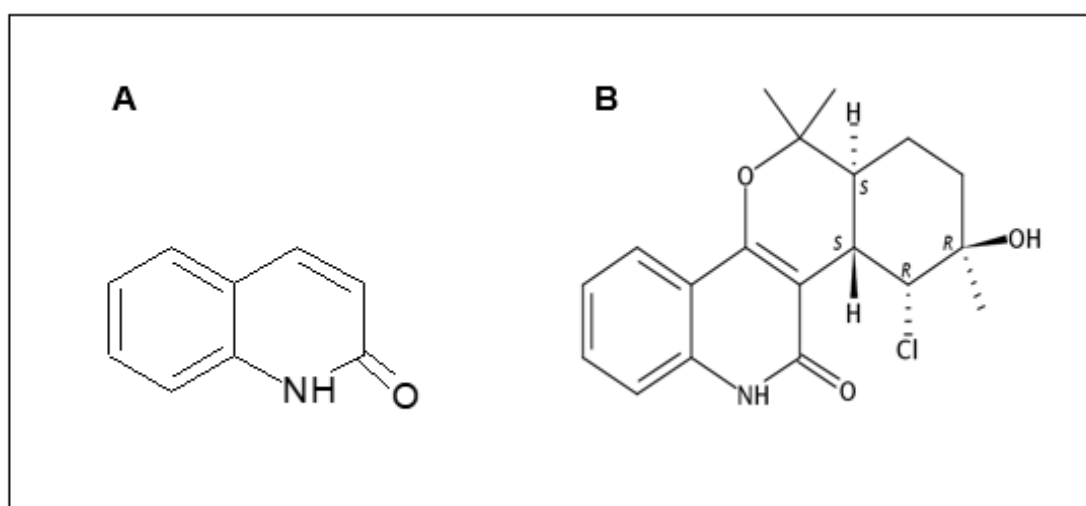
Além disso, todas essas substâncias foram agrupadas pelo GNPS mostrando a similaridade na fragmentação (Figura 14). Com base no banco de dados da plataforma, o esqueleto básico dessas substâncias possui uma fragmentação semelhante a cloroaustralasina B. Com isso, as substâncias encontradas no grupo Fo-HxDCM possivelmente são estruturalmente semelhantes a esse alcaloide.



**Figura 14.** Rede molecular dos compostos do grupo Fo-HxDCM obtido da junção das fases de partição Fo-Hx e Fo-DCM do extrato bruto foliar de *Conchocarpus macrocarpus*. O valor dentro dos círculos corresponde a massa do composto e os círculos verdes representam os picos majoritários no cromatograma. Fo: folha, DCM: diclorometano, Hx: hexano.

Os esqueletos do tipo quinolínicos (Figura 15 A), como os que estão sendo propostos nesse trabalho, são principalmente oriundos de espécies de Rutaceae (ASAHARA; NAGAMATSU, 2004). Além disso, especificamente os alcaloides com esqueleto 3-monoterpenil-quinolin-2-ona (Figura 15 B), sugerido pela biblioteca do GNPS para as substâncias presentes em Fo-HxDCM, são ainda mais restritos. Olivon et al. (2018) descreveu pela primeira vez a presença desses alcaloides do tipo cloroaustralasina em espécies de Euphorbiaceae, pois até então esse raro grupo de metabolitos secundários só tinha sido descrito duas vezes em espécies de Rutaceae, especificamente em *Eriostemon australasius* Pers. subsp. *banksii* (A. Cunn. ex Endl.) P. G. Wilson (Dacunha et al., 1993) e *Halfordia kendack* (Mountr.) Guillaumin (SULTANA; WATERMAN, 2001).

Embora possamos sugerir a classe dos compostos presentes em Fo-HxDCM, não conseguimos afirmar com mais de precisão a correta identificação dessas substâncias devido a poucos dados na literatura referente a fragmentação desses metabolitos. Para isso, para publicações futuras, pretendemos submeter a análises de ressonância nuclear de hidrogênio (RMN) alguns desses alcaloides que foram isolados. Com isso, poderemos afirmar com exatidão a estrutura dessas substâncias.



**Figura 15.** Esqueleto básico de um alcaloide quinolínico (A) e alcaloide com esqueleto 3-monoterpenil-quinolin-2-ona (cloroaustralasina) (B).

Em geral, os dados encontrados nesse trabalho corroboram com dados disponíveis para espécies próximas a *Conchocarpus*. Amidas e flavonoides, notadamente flavonas, são relatadas para espécies desse gênero, e são amplamente conhecidas em espécies de Rutaceae. Além disso, essa família também é reportada por diversos autores como uma fonte rica em alcaloides, em especial os derivados de ácido antranílico, como os que estão sendo sugeridos nesse trabalho. Vale ressaltar que apenas as fases de partição que demonstraram alguma atividade biológica foram objetos de estudo para identificação dos compostos químicos, com isso, a caracterização química de *Conchocarpus macrocarpus* pode ser dita parcial, sendo que outras substâncias não mencionadas nesse trabalho podem estar presente em outras amostras, como por exemplo cumarinas, que apesar de amplamente comum em Rutaceae, não foram encontradas para a espécie estudada.

## 5 Referências bibliográficas

- Asahara, M., Katayama, T., Tohda, Y., Nishiwaki, N., & Ariga, M. (2004). Synthesis of unnatural 1-methyl-2-quinolone derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(11), 1334-1338.
- Baj, T., Kukula-Koch, W., Świątek, Ł., Zielińska-Pisklak, M., Adamska-Szewczyk, A., Szymczyk, D., Rajtar, B., Polz-Dacewicz, M., & Skalicka-Woźniak, K. (2017). Chemical profile, antioxidant activity and cytotoxic effect of extract from leaves of *Erythrochiton brasiliensis* Nees & Mart. from different regions of Europe. *Open Chemistry*, 15(1), 380–388.
- Baudouin, G., Tillequin, F., Koch, M., Pusset, J., & Sévenet, T. (1981). Plantes de Nouvelle-Calédonie. LXXIII. Alcaloides de *Dutaillyea oreophila* e de *Dutaillyea drupacea*. *Journal of Natural Products*, 44(5), 546-550.
- Biavatti, M. W., Vieira, P. C., Silva, M., Fernandes, J. B., Victor, S. R., Pagnocca, F. C., Albuquerque, S., Caracelli, I., & Zukerman-Schpector, J. (2002). Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa echinata* and X-ray structure of flindersiamine. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 13, 66–70.
- Cabral, R. S., Sartori, M. C., Cordeiro, I., Queiroga, C. L., Eberlin, M. N., Lago, J. H. G., Moreno, P. R. H., & Young, M. (2012). Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from stems of *Conchocarpus fontanesianus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(2), 374–380.
- Caldas, F. R. L., Augusto, F., Facundo, H. T., Alves, R. F., dos Santos, F. de A. R., Silva, G. R. da, Camara, C. A., & Silva, T. (2019). Composição química, atividade antiradicalar e antimicrobiana do pólen apícola de Fabaceae. *Química Nova*, 42, 49–56.
- Colli-Silva, M., & Pirani, J. R. (2019). Biogeographic patterns of Galipeinae (Galipeeae, Rutaceae) in Brazil: Species richness and endemism at different latitudes of the Atlantic Forest “hotspot.” *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 251, 77–87.

- Ranieri Cortez, L. E., Garcia Cortez, D. A., Fernandes, J. B., Vieira, P. C., Ferreira, A. G., & da Silva, M. F. G. F. (2009). New alkaloids from *Conchocarpus gaudichaudianus*. *Heterocycles*, 78(8), 2053.
- Dala-Paula, B. M., Plotto, A., Bai, J., Manthey, J. A., Baldwin, E. A., Ferrarezi, R. S., & Gloria, M. B. A. (2019). Effect of huanglongbing or greening disease on orange juice quality, a review. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1976.
- Dhakar, A., Chorotiya, P., Meena, M., Singh, C., Purvia, R. P., & Adlakha, M. K. (2019). Pharmacological properties and phytochemical of *Limonia acidissima*: a review. *World J Pharm Res*, 8, 637–645.
- Groppo, M., de Lemos, L. J. C., de Lima Ferreira, P., Ferreira, C., Bruniera, C. P., de Castro, N. M., Pirani, J. R., el Ottra, J. H., & Kallunki, J. A. (2021). A tree nymph of the Brazilian Atlantic Forest: *Dryades* (Galipeinae, Rutaceae), a new neotropical genus segregated from *Conchocarpus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 154, 106971.
- Inada, A., Ogasawara, R., Koga, I., Nakatani, N., Inatomi, Y., Murata, H., Nishi, M., & Nakanishi, T. (2008). Three new furoquinoline alkaloids from the leaves of *Boninia glabra*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56(5), 727–729.
- Intekhab, J., & Aslam, M. (2009). Isolation of a flavonoid from *Feronia limonia*. *Journal of Saudi Chemical Society*, 13(3), 295–298.
- Iwashina, T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113(3), 287.
- Kallunki, J. A., & Pirani, J. R. (1998). Synopses of *Angostura* Roem. & Schult. and *Conchocarpus* JC Mikan (Rutaceae). *Kew Bulletin*, 257–334.
- Kulkarni, S., Dwivedi, P., Danappanvar, A. N., Subhash, B. A., & Patil, B. M. (2021). Identification of  $\alpha$ -amylase inhibitors from flavonoid fraction of *Feronia elephantum* and its integration with in-silico studies. *In Silico Pharmacology*, 9(1), 1–8.



- Kumar, V., Bhatt, V., & Kumar, N. (2018). Amides from plants: structures and biological importance. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 56, pp. 287–333). Elsevier.
- Li, Z., Zhao, C., Zhao, X., Xia, Y., Sun, X., Xie, W., Ye, Y., Lu, X., & Xu, G. (2018). Deep annotation of hydroxycinnamic acid amides in plants based on ultra-high-performance liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry and its in silico database. *Analytical Chemistry*, 90(24), 14321–14330.
- Manthey, J. A., & Grohmann, K. (2001). Phenols in *Citrus* peel byproducts. Concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in *Citrus* peel molasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3268–3273.
- Muroi, A., Matsui, K., Shimoda, T., Kihara, H., Ozawa, R., Ishihara, A., Nishihara, M., & Arimura, G. I. (2012). Acquired immunity of transgenic torenia plants overexpressing agmatine coumaroyltransferase to pathogens and herbivore pests. *Scientific Reports*, 2.
- Oszmiański, J., Wojdyło, A., Juszczak, P., & Nowicka, P. (2020). Roots and leaf extracts of *Dipsacus fullonum* L. and their biological activities. *Plants*, 9(1), 78.
- Pihlava, J. M. (2014). Identification of hordatines and other phenolamides in barley (*Hordeum vulgare*) and beer by UPLC-QTOF-MS. *Journal of Cereal Science*, 60(3), 645–652.
- Ramanjulu, S., & Bartels, D. (2002). Drought-and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 141–151.
- Albarici, T. R., Vieira, P. C., Fernandes, J. B., Silva, M. F. D. G. F. D., & Pirani, J. R. (2010). Cumarinas e alcalóides de *Rauia resinosa* (Rutaceae). *Química Nova*, 33(10), 2130-2134.
- Ribeiro, C. V. C., & Kaplan, M. A. C. (2002). Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em Angiospermae. *Química Nova*, 25, 533–538.

- Rout, P. K., Rao, Y. R., & Naik, S. (2010). Liquid CO<sub>2</sub> extraction of *Murraya paniculata* Linn. flowers. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 338–342.
- Sadek, E. S., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2009). Polyphenolic composition and antioxidant characteristics of kumquat (*Fortunella margarita*) peel fractions. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 297–302.
- Santos, C. S., Januário, A. H., Vieira, P. C., Fernandes, J. B., Silva, M., & Pirani, J. R. (1998). Cycloartane triterpenoid and alkaloids from *Ameidea* spp. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9, 39–42.
- Servillo, L., Giovane, A., Balestrieri, M. L., Cautela, D., & Castaldo, D. (2011). Proline derivatives in fruits of bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poit): presence of N-methyl-L-proline and 4-hydroxy-L-prolinebetaine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 274–281.
- Silveira, E. R., Roma, L. P., Pirani, J. R., & dos Santos, D. Y. A. C. (2021). Contrasting leaf cuticular wax composition of *Conchocarpus* and *Dryades* species (Rutaceae) from the Atlantic Forest and “Restinga.” *Brazilian Journal of Botany*.
- Sultana, N., & Waterman, P. G. (2001). 3-Monoterpenyl-2, 4-dioxygenated quinoline alkaloids from the aerial parts of *Halfordia kendack*. *Phytochemistry*, 58(2), 329–332.
- Tagad, V. B., Sahoo, A. K., & Annapure, U. S. (2018). Phytochemical study and GC-MS analysis of bael (*Aegle marmelos*) fruit pulp. *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 4(5), 779–791.
- Takahashi, L. K., Zhou, J., Kostko, O., Golan, A., Leone, S. R., & Ahmed, M. (2011). Vacuum-ultraviolet photoionization and mass spectrometric characterization of lignin monomers coniferyl and sinapyl alcohols. *The Journal of Physical Chemistry A*, 115(15), 3279–3290.
- Terezan, A. P., Rossi, R. A., Almeida, R. N. A., Freitas, T. G., Fernandes, J. B., Silva, M., Vieira, P. C., Bueno, O. C., Pagnocca, F. C., & Pirani, J. R. (2010). Activities of extracts and compounds from *Spiranthera*

- odoratissima* St. Hil.(Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21, 882–886.
- Tulasi, S. J., Reddy, P. U. M., & Rao, J. V. R. (1992). Accumulation of lead and effects on total lipids and lipid derivatives in the freshwater fish *Anabas testudineus* (Bloch). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 23(1), 33–38.
- Umran, N. S. S., Mohamed, S., Lau, S. F., & Mohd Ishak, N. I. (2020). *Citrus hystrix* leaf extract attenuated diabetic-cataract in STZ-rats. *Journal of Food Biochemistry*, 44(8), e13258.
- Wainwright, M. (2001). Acridine—a neglected antibacterial chromophore. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(1), 1–13.
- Waterman, P. G. (1975). Alkaloids of the Rutaceae: their distribution and systematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 3(3), 149–180.
- Wirasutisna, K. R., Gleye, J., Moulis, C., Stanislas, E., & Moretti, C. (1986). Flavone C-glycosides of *Almeidea guyanensis*. *Phytochemistry*, 25(2), 558–559.
- Yoo, S. W., Kim, J. S., Kang, S. S., Son, K. H., Chang, H. W., Kim, H. P., Bae, K., & Lee, C.-O. (2002). Constituents of the fruits and leaves of *Euodia daniellii*. *Archives of Pharmacal Research*, 25(6), 824–830.



## **Capítulo II**

---

### Atividades biológicas de extratos e fases de partição de *Conchocarpus macrocarpus*



## Resumo

---

*Conchocarpus* é o maior gênero na subtribo Galipeinae, tribo Galipeae, com 47 espécies distribuídas predominantemente em regiões neotropicais. Apesar de diverso, pouco se conhece a respeito de sua constituição química, assim como seu potencial biológico. Com isso, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar potenciais atividades biológicas dos extratos brutos, fases de partição e frações obtidos de *Conchocarpus macrocarpus*. Para tal, folhas e galhos foram coletados em Cachoeiro do Itapemirim, Espírito Santo. O material vegetal foi triturado e submetido ao processo de extração exaustiva. Os extratos brutos (EB) foram particionados com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol). Os EB e as fases de partição foram avaliados quanto ao potencial inibitório da atividade *in vitro* da enzima acetilcolinesterase, potencial antioxidante *in vitro* pelo sequestro do radical DPPH e ensaio de Folin-Ciocalteu e atividade antiproliferativa de células de carcinoma de cólon (HCT-116) e de adenocarcinoma de mama (MCF-7). As amostras mais ativas seguiram com fracionamento em coluna de topo aberto. As fases de partição selecionadas e as frações obtidas foram avaliadas em relação a toxicidade e atividade antioxidante em células RAW com base no método MTT e atividade antimicrobiana com *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Nos ensaios antioxidantes, as frações foliares mais polares, ricas em flavonas, apresentaram os melhores resultados, principalmente a fração Fo-BuOH G2.1 com valores de  $1238,1 \pm 6,4$   $\mu\text{mol/g}$  equivalente a Trolox e  $945,3 \pm 12,5$   $\mu\text{mol/g}$  equivalente a ácido gálico, nos ensaios DPPH e Folin-Ciocalteu, respectivamente. Entretanto, não foi observado efeito de proteção contra o peróxido de hidrogênio para qualquer uma das amostras nos ensaios antioxidantes *in vivo*. No entanto, essas flavonas presentes na amostra Fo-BuOH G2.1 foram relacionadas a inibição de *C. albicans* com CIM = 1,25 mg/mL na maior carga microbiana ( $1,5 \times 10^5$  UFC/mL). Os alcaloides presentes na amostra Fo-DCM G5 foram associados a efetiva inibição de *Staphylococcus aureus*, com CIM = 0,312 mg/mL nas duas maiores cargas de microrganismos testadas ( $1,5 \times 10^5$  e  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL). Os ensaios de inibição de acetilcolinesterase e antiproliferativo não apresentaram resultados promissores associados aos compostos majoritários.

**Palavras-Chave:** Antioxidante, antimicrobiano, alcaloide, flavona



---

## Abstract

---

*Conchocarpus* is the largest genus in the subtribe Galipeinae, tribe Galipeae, with 47 species distributed predominantly in neotropical regions. Despite the great diversity, little is known about its chemical composition, as well as its biological potential. Thus, the main goal of this work was to evaluate the biological activities of crude extracts, partition phases and fractions obtained from *Conchocarpus macrocarpus*. For this purpose, leaves and stems were collected in Cachoeiro do Itapemirim, Espírito Santo. The plant material was crushed and subjected to an exhaustive extraction process with 70% ethanol. The crude extracts (EB) were partitioned with increasing polarity solvents (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol). The EB and the partition phases were evaluated for inhibitory potential of the *in vitro* activity of the enzyme acetylcholinesterase, *in vitro* antioxidant potential by DPPH radical scavenging and Folin-Ciocalteu assays and antiproliferative activity of colon carcinoma (HCT-116) and breast adenocarcinoma (MCF-7) cells. The most active samples were selected for fractionation in an open top column. The selected partition phases and the fractions obtained were evaluated in relation to cytotoxicity and antioxidant activity in RAW cells based on the MTT method and for antimicrobial activity with *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. In the antioxidant assays, the more polar leaf fractions, rich in flavones, presented the best results, mainly the Fo-BuOH G2.1 fraction with values of  $1238.1 \pm 6.4$   $\mu\text{mol/g}$  equivalent to Trolox and  $945.3 \pm 12.5$   $\mu\text{mol/g}$  equivalent to gallic acid, in the DPPH and Folin-Ciocalteu tests, respectively. However, no protection against hydrogen peroxide was found for any of the samples in the *in vivo* antioxidant assay. Furthermore, flavones present in the Fo-BuOH G2.1 sample were related to inhibition of *C. albicans* with MIC = 1.25 mg/mL at the highest microbial load ( $1.5 \times 10^5$  CFU/mL), while alkaloids, present in the Fo-DCM G5, were associated with effective inhibition of *Staphylococcus aureus*, with MIC = 0.312 mg/mL in the two highest loads of microorganisms tested ( $1.5 \times 10^5$  and  $1.5 \times 10^4$  CFU/mL). Acetylcholinesterase and antiproliferative inhibition assays did not show promising results associated with the major compounds.

**Key-Words:** antioxidant, antimicrobial, alkaloid, flavone



# Atividades biológicas de extratos e fases de partição de *Conchocarpus macrocarpus*

---

## 1 Introdução

A íntima relação milenar entre o homem e as plantas não se deve apenas ao uso alimentício, mas também como principal meio de prevenção e/ou cura de diversas enfermidades e conservação da saúde humana (BERNARDINI et al., 2018).

O Brasil é o país que apresenta o maior número de espécies de angiospermas no planeta. Entretanto, apesar da ampla diversidade de espécies, estima-se que apenas cerca de 5% da flora nativa tenham sido submetidos a investigações específicas relacionadas a sua constituição fitoquímica e atividades biológicas (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Rutaceae é amplamente conhecida pela complexidade estrutural e diversidade de seus metabólitos secundários, tais como lignanas, cumarinas, flavonoides, óleos voláteis e alcaloides, principalmente os derivados de ácido antranílico (DE ANDRADE et al., 2020). Muitos desses metabólitos secundários já foram relacionados a uma vasta diversidade de atividades biológicas de grande importância farmacológica, mostrando a importância dessa família na investigação fitoquímica (COIMBRA; FERREIRA; DUARTE, 2020).

O gênero *Conchocarpus* abrange, de acordo com estudos recentes, 47 espécies encontradas predominantemente em regiões neotropicais (GROPPO et al., 2021). Apesar de diverso, pouco se conhece a respeito de sua constituição química, assim como seu potencial biológico.

Dentre as 47 espécies do gênero, apenas seis foram avaliadas quanto seu potencial biológico. Atividade antiacetilcolinesterásica foi descrita para o extrato e substâncias isoladas do caule de *C. fontanesianus* (A.St.-Hil.) Kallunki & Pirani (CABRAL et al., 2012); atividade tripanocida para o extrato hexânico das



folhas de *C. gaudichaudianus* (A.St.-Hil.) Kallunki & Pirani [atualmente = *Dryades gaudichaudiana* (A.St.-Hil.) Groppo, Kallunki & Pirani] (Cortez et al., 2009), extrato metanólico foliar e caulinar de *C. heterophyllus* (A.St.-Hil.) Kallunki & Pirani (Ambrozim et al., 2008), extrato metanólico foliar de *C. inopinatus* Pirani (BELLETE et al., 2012), extrato hexânico foliar de *C. marginatus* (Rizzini) Kallunki & Pirani (Bellete et al., 2012) e extrato hexânico foliar de *C. longifolius* (A.St.-Hil.) Kallunki & Pirani (MAFEZOLI et al., 2000). Além disso, atividades antioxidante, citotóxica, antimicrobiana e antifúngica foram verificadas para o óleo volátil de *C. fontanesianus* (CABRAL et al., 2016).

De maneira geral, os principais compostos encontrados para espécies desse gênero são alcaloides, principalmente derivados de ácido antranílico, como furanoquinolínicos, quinolínicos e acridínicos. Além disso, outras classes como cumarinas, furanocumarinas, flavonoides, esteroides, triterpenos e diversos componentes apolares das ceras cuticulares também foram descritas (Santos et al., 1998; Mafezoli et al., 2000; Ambrozim et al., 2008; Cortez et al., 2009; Cabral et al., 2012; Bellete et al., 2012; Silveira et al., 2021).

*Conchocarpus macrocarpus* (Engl.) Kallunki & Pirani é uma espécie endêmica do Brasil, com ocorrência nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Essa espécie é bem distinta pelas flores sésseis, botão cônico, em inflorescências robustas eretas e não ramificadas, pelos frutos relativamente grandes e verrucosos, e pelas folhas unifolioladas coriáceas e reticulado-venosas (Pirani & Groppo, 2020). Até onde vai nosso conhecimento, o único estudo químico encontrado para essa espécie caracterizou a composição da cera cuticular das folhas (SILVEIRA et al., 2021), entretando nenhum estudo de atividades biológicas de seus metabolitos é reportado.

O uso de plantas na inspiração e descoberta de novas drogas promove uma infusão de novos compostos com potencial cura de uma infinidade de doenças que comprometem a saúde humana (Cragg & Newman, 2013). Nesse contexto, o presente estudo tem como principal objetivo avaliar o potencial dos extratos foliares, caulinares, fases de partição e frações de *C. macrocarpus* frente a algumas atividades biológicas e, se possível, relacionar essas atividades com os compostos majoritários presentes nas amostras.

## **2 Materiais e Métodos**

### **2.1 Coleta do material e preparação dos extratos e fases de partição**

Conforme já descrito no capítulo 1, folhas e caules finos de *Conchocarpus macrocarpus* (J.R.Pirani et al. 3530) foram coletados de vários indivíduos em Cachoeiro do Itapemirim – Espírito Santo pela Profa. Dra. Gladys Flávia A. M. de Pinna, do laboratório de Anatomia Vegetal do IB-USP. Esse material foi mantido em estufa a 60 °C até a secura. Em seguida, o material foi triturado em moinho de facas.

O pó resultante do material coletado (800 g de folhas e 17 g de galhos) foi submetido a maceração a frio com etanol 70% na proporção 1g:100mL, sob agitação constante por 10 dias, com três trocas de solvente. O extrato foi filtrado, concentrado em evaporador rotativo e liofilizado até completa secura (EB). Em seguida, o extrato bruto foi solubilizado em etanol 20% e particionado com solventes de polaridade crescente (hexano - Hx, diclorometano - DCM, acetato de etila – AcOEt e butanol – BuOH), com três lavagens consecutivas de cada solvente. Maiores detalhes são descritos no Capítulo 1.

### **2.2 Cromatografia em coluna de sílica de topo aberto**

As fases de partição mais apolares (Fo-Hx e Fo-DCM) foram submetidas a cromatografia em coluna de sílica de topo aberto, usando como fase móvel uma série de eluentes em ordem crescente de polaridade: hexano:diclorometano (7:3, 1:1, 3:7, 0:10), diclorometano:acetato de etila (7:3, 1:1, 3:7, 0:10), acetato de etila:metanol (7:3, 1:1, 3:7, 0:10), sendo o metanol puro usado até limpeza completa da coluna. As frações obtidas foram concentradas, monitoradas em cromatografia em camada delgada (CCD) e agrupadas por similaridade de eluição, rendendo dois (Fo-Hx) e 13 (Fo-DCM) grupos.

### **2.3 Cromatografia em coluna de Sephadex**

A Fo-BuOH foi submetida a cromatografia em coluna de Sephadex LH20. Como fase móvel foi empregada a mesma série de eluentes descrita acima. As frações obtidas foram concentradas, monitoradas em cromatografia em camada delgada (CCD) e agrupadas por similaridade de eluição, tendo sido obtidos sete grupos.

Na Figura 1 encontra-se um organograma esquematizando as etapas de fracionamento e identificando as amostras que foram avaliadas quanto seu potencial biológico.

#### **2.4 Ensaio da inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase**

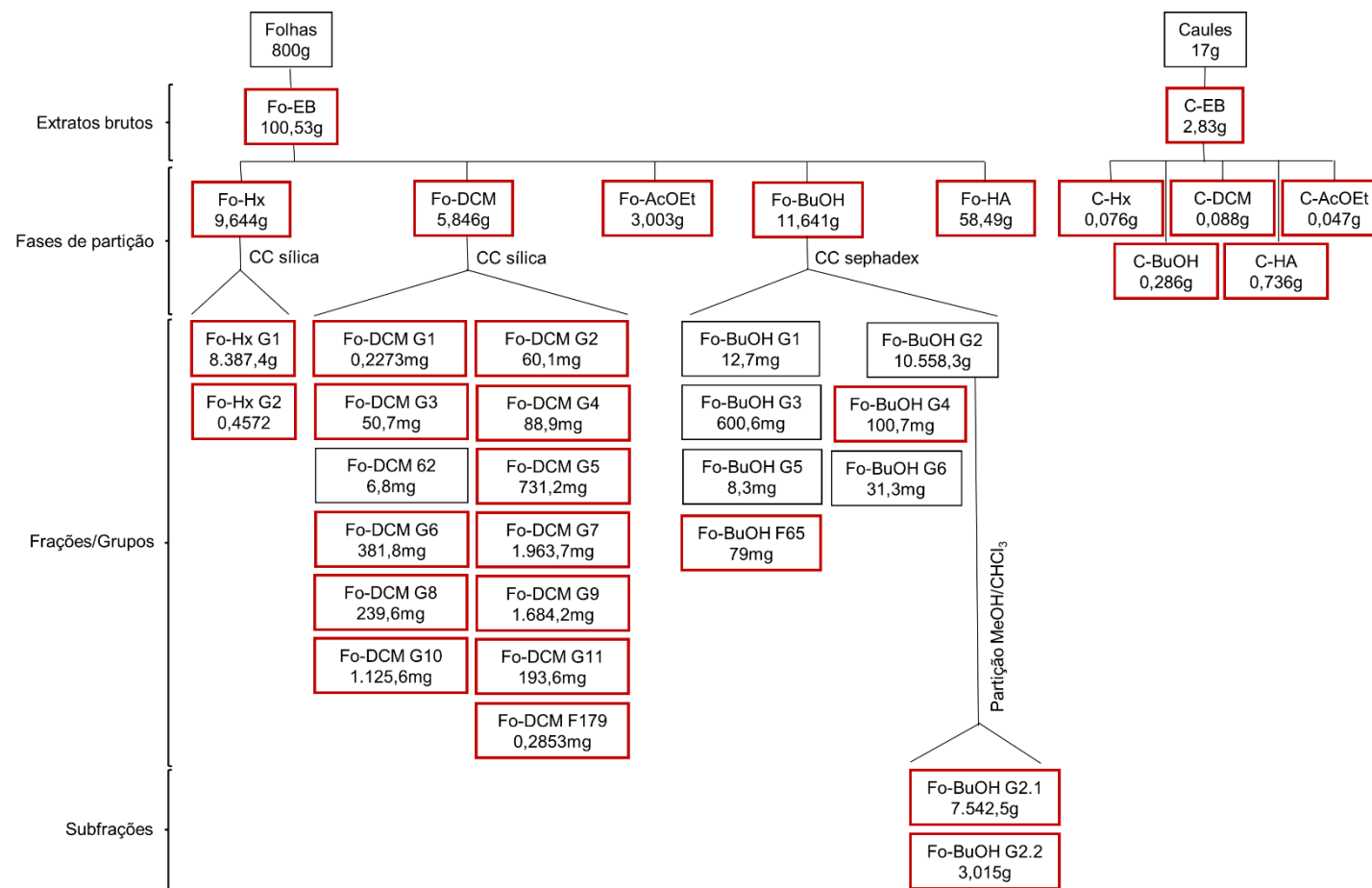
Esse ensaio foi realizado em colaboração com a Dra. Priscila Bezerra Torres, do Departamento de Botânica – USP, utilizando as amostras Fo-EB, Fo-Hex, Fo-DCM, Fo-AcOEt, Fo-BuOH, Fo-HA, C-EB, C-Hex, C-DCM, C-AcOEt, C-BuOH, C-HA (Figura 1).

O ensaio da inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase foi realizado conforme Mathew & Subramanian (2014), com modificações. Tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8) foi usado para preparar todas as soluções usadas neste ensaio. Foi preparada uma solução contendo DTNB (ácido 2,2'-dinitro-5-5'-ditio-dibenzóico) (10 mM), cloreto de sódio (0,1 M) e cloreto de magnésio (0,02 M). A enzima acetilcolinesterase (Sigma-Aldrich®) foi dissolvida a 1026 U/mL e armazenada em freezer -80 °C (solução estoque). As diluições posteriores na concentração de 0,26 U/mL foram feitas em albumina do soro bovino (BSA) 0,1% em tampão Tris-HCl.

Para o ensaio, foram adicionados em cada poço, 20 µL de amostra a 1 mg/mL em DMSO 10%, ou controle positivo (fisostigmina, 0 a 8 µg/mL em DMSO 10%), ou controle negativo (DMSO 10%), 50 µL da solução contendo DTNB, 10 µL da enzima acetilcolinesterase diluída (0,26 U/mL) e 110 µL de tampão Tris-HCl. A placa foi incubada por 15 min a temperatura ambiente sob agitação constante e, em seguida, realizada a leitura a 405 nm. Esta primeira leitura corresponde ao branco das amostras. A seguir foram adicionados automaticamente 10 µL de iodeto de acetiltiocolina (15 mM) e novas leituras foram realizadas após 20 min em temperatura ambiente sob agitação constante.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da enzima, calculados com a seguinte fórmula:  $(Ac - Aa) \times 100 / Ac$ , onde Ac é absorvância do controle negativo e Aa absorvância da amostra, sendo estas obtidas através da diferença entre os valores de absorvância da leitura após

a adição do iodeto de acetilcolina menos os valores das mesmas amostras antes da adição (branco das amostras).



**Figura 1.** Esquema dos processos de obtenção dos extratos e fases de partição de *Conchocarpus macrocarpus*. Em destaque vermelho as amostras avaliadas quanto seu potencial biológico.

## **2.5 Ensaio da atividade antioxidante *in vitro***

Esse ensaio foi realizado em colaboração com a Dra. Priscila Bezerra Torres, do Departamento de Botânica – USP.

Todas as fases de partição e extratos brutos obtidos (Fo-EB, Fo-Hx, Fo-DCM, Fo-AcOEt, Fo-BuOH, Fo-HA, C-EB, C-Hx, C-DCM, C-AcOEt, C-BuOH, C-HA) foram avaliados pelos ensaios do sequestro do radical DPPH (FURLAN et al., 2015) e de Folin-Ciocalteu (WATERMAN; MOLE, 1994). Para isso, as amostras foram solubilizadas em metanol na concentração de 20 mg/mL. Os protocolos foram realizados em microplaca de 96 poços e as leituras de absorbância realizadas em leitor para microplacas (Synergy™ H1). Os ensaios foram feitos em triplicatas procedimentais.

Para o ensaio de DPPH, uma solução 80 µM de DPPH em metanol foi preparada no momento do teste. Em cada poço da microplaca foram acrescentados 200 µL da solução de DPPH e 20 µL de cada amostra. Após incubação da microplaca por 30 min a temperatura ambiente, a absorbância foi verificada a 517 nm. Os valores foram calculados em equivalente de trolox por grama de extrato (µmol/g).

No ensaio com o reagente de Folin-Ciocalteu, em cada poço da microplaca uma alíquota de 20 µL das amostras foi adicionada a 200 µL de água ultrapura e 20 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Dinâmica®). Entre 5-8 min, foi adicionada a essa mistura 60 µL de uma solução saturada de carbonato de sódio (250 mg/mL utilizada após formação de um precipitado). Após 30 min, as absorbâncias foram lidas a 760nm. Através de uma curva de calibração de ácido gálico (0-120 µg/mL), os valores foram calculados em equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato (µmol/g).

## **2.6 Ensaio de atividade antiproliferativa**

A atividade antiproliferativa das amostras Fo-EB, Fo-Hx, Fo-DCM, Fo-AcOEt, Fo-BuOH, Fo-HA, C-EB, C-Hx, C-DCM, C-AcOEt, C-BuOH, C-HA (Figura 1) foi avaliada em colaboração com a doutoranda Larrisa Costa de Almeida e a Profa Dra Letícia Lotufo do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas – USP.

As linhagens celulares utilizadas foram HCT-116 (carcinoma de cólon, ATCC CCL-247) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama ATCC HTB22). As células foram cultivadas a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As células HCT-116 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) contendo 2g/L de NaHCO<sub>3</sub>, enquanto as células MCF-7 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) GlutaMAX suplementado com 2 mM de glutamina. Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino, 100 mg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) como controle negativo.

Após o período inicial de incubação, as amostras foram adicionadas em concentrações de 5 mg/mL e 50 mg/mL, cada concentração em duplicata, e incubadas por 72 h. Em seguida, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/mL). Três horas mais tarde, o sobrenadante foi removido e, após secagem da placa, o precipitado contendo azul de formazan de MTT foi dissolvido em 150 µL de DMSO 0,5%, e a absorbância foi medida a 570 nm (Mosmann, 1983). Os valores de concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) juntamente com intervalos de confiança de 95% foram calculados por regressão não linear usando GraphPad Prism 8.

## **2.7 Avaliação da toxicidade e atividade antioxidante das amostras em células RAW**

A atividade antioxidante foi medida através do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), tendo sido realizado em colaboração com o Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha e a Profa Dra. Katia Castanho Scortecci, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Primeiramente, as células RAW (macrófagos murínicos) foram mantidas em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (estreptomicina 10 mg/mL e penicilina 10.000 unidades) e incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram subcultivadas a cada 10 dias.

Para avaliar a citotoxicidade das amostras, células RAW (macrófagos murínicos) foram colocadas em microplacas de 96 poços (1x10<sup>4</sup> células por

poço) em meio DMEM com SFB (10%) e deixadas em repouso por 24 h em estufa a 37 °C com 5% de saturação de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, o meio de cultivo foi aspirado e em seu lugar foi adicionado DMEM sem SFB. Decorrido 24 h, o meio foi aspirado e em seu lugar foram adicionadas as amostras diluídas (0,5 mg/mL) em meio DMEM contendo 10% de SFB. Após mais 24 h, a capacidade antioxidante das amostras foi determinada pelo teste colorimétrico de MTT (Mosmann, 1983). Para tal, o meio foi removido e adicionou-se DMEM sem SFB contendo MTT a 1 mg/mL. Após 4 h, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan formados pela redução do MTT foram solubilizados em 100 µL de etanol. A placa contendo este material permaneceu sob lenta agitação por 15 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi levada a um leitor de microplacas e as absorbâncias das soluções contidas em cada poço foi determinada em 570 nm. Os resultados foram apresentados em porcentagem de redução do MTT, considerando-se a absorbância do controle negativo (células não expostas a amostras ou peróxido) como 100% de redução.

Para a determinação de condição da injúria, foi usado um método adaptado de Ouyang (2011). Inicialmente, as células RAW foram transferidas para placas de 96 poços da mesma forma da primeira etapa descrita acima. Em seguida, o meio foi trocado por uma solução sem SFB, contendo diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (0,1 até 5 mM), ficando em repouso por 1 h. Posteriormente, o meio com peróxido de hidrogênio foi retirado e foram adicionados de meio de cultura DMEM com SFB. Após 24 h de incubação, a capacidade das células em reduzir o MTT foi avaliada como descrito acima, sendo observado que na condição de 3 mM as células sofriam dano suficiente para diminuir a redução do MTT em 50%.

Por fim, foi realizada a avaliação da atividade antioxidante das amostras provenientes de *C. macrocarpus* (Figura 1) em células concomitantemente tratadas com peróxido de hidrogênio 3 mM. Para isso, células RAW (4x10<sup>3</sup> células/poço) em meio DMEM com SFB (10%) foram transferidas para placas de 96 poços e deixadas em repouso por 24 h em estufa a 37 °C com 5% de saturação de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, o meio foi aspirado e substituído por meio DMEM + SFB, contendo as amostras (Fo-DCM G1; Fo-DCM G2; Fo-DCM G3; Fo-DCM G4; Fo-DCM G5; Fo-DCM G6; Fo-DCM G7; Fo-DCM G8; Fo-DCM G9;



Fo-DCM G10; Fo-DCM G11; F-DCM 179; Fo-DCM; Fo-EB; Fo-Hx G1; Fo-Hx G2; Fo-Hx; Fo-BuOH; Fo-BuOH G4; Fo-BuOH F65; Fo-BuOH G2.1; Fo-BuOH G2.2) nas concentrações de 0,1 mg/mL e 0,25 mg/mL mais 3 mM de peróxido de hidrogênio, permanecendo incubadas por 2 h. Em seguida, o meio foi retirado e substituído por DMEM+SFB, a placa incubada por 24 h e a capacidade antioxidante das amostras foi determinada pelo teste colorimétrico de MTT como descrito acima. Para o controle positivo foi usado somente DMEM com SFB e peróxido. Para controle negativo utilizou-se DMEM com SFB, sem peróxido.

## 2.8 Ensaio antimicrobiano

Esse ensaio foi realizado em colaboração com a Profa Dra. Ivana Barbosa Suffredini e o doutorando Jefferson de Souza Silva, do Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade, NPBio, da Universidade Paulista – UNIP.

O extrato bruto (Fo-EB) e frações (Fo-Hx G1, Fo-Hx G2, Fo-DCM G1, Fo-DCM G2, Fo-DCM G3, Fo-DCM G4, Fo-DCM G5, Fo-DCM G6, Fo-DCM G7, Fo-DCM G8, Fo-DCM G9, Fo-DCM G10, Fo-DCM G11, Fo-DCM F179, Fo-BuOH F65, Fo-BuOH G4, Fo-BuOH G2.1, Fo-BuOH G2.2) (Figura 1) foram preparados a uma concentração de 100 mg/mL em DMSO e depois diluídas seis vezes em escala  $\frac{1}{2}$ , utilizando DMSO, obtendo as seguintes concentrações: 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL.

Para o ensaio foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, seguindo o documento CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2008). Inóculos foram preparados a partir de colônias cultivadas em meio ágar Mueller Hinton (MH) (Oxoid) para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e Sabouraud dextrose (SD) (Oxoid) para *Candida albicans*. As colônias foram suspensas em solução salina estéril, homogeneizadas e ajustadas para as concentrações utilizadas. Cada microrganismo foi testado em quatro concentrações,  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL,  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL,  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL e  $1,5 \times 10^2$  UFC/mL.

Utilizou-se diluição de 1:20 em meio caldo MH (para as bactérias) e SD (para levedura), ao qual foram adicionadas alíquotas de 10  $\mu$ L as amostras em 190  $\mu$ L de meio, nos poços de microplacas de 96 poços (Costar), obtendo as concentrações finais por poço de 5,00 mg/mL, 2,50 mg/mL, 1,25 mg/mL,

$6,25 \times 10^{-1}$  mg/mL,  $3,13 \times 10^{-1}$  mg/mL,  $1,56 \times 10^{-1}$  mg/mL. Dois poços foram deixados como padrões, um negativo (só meio de cultura, sem microrganismo) e um positivo (meio de cultura mais inoculo). Como controle positivo foi usado a Clorexidina (Chx) para *S. aureus* e *E. coli* e Anfotericina B (AmB) para *C. albicans*. Todos os testes foram realizados em duplicata. Depois de preenchidas, as microplacas foram incubadas a 36 °C por 24 h. Posteriormente, foram transferidos 2 µL de cada poço para placas de Petri contendo meios ágar MH e SD e realizou-se incubação a 36 °C por 24 h para leitura da concentração microbiana mínima.

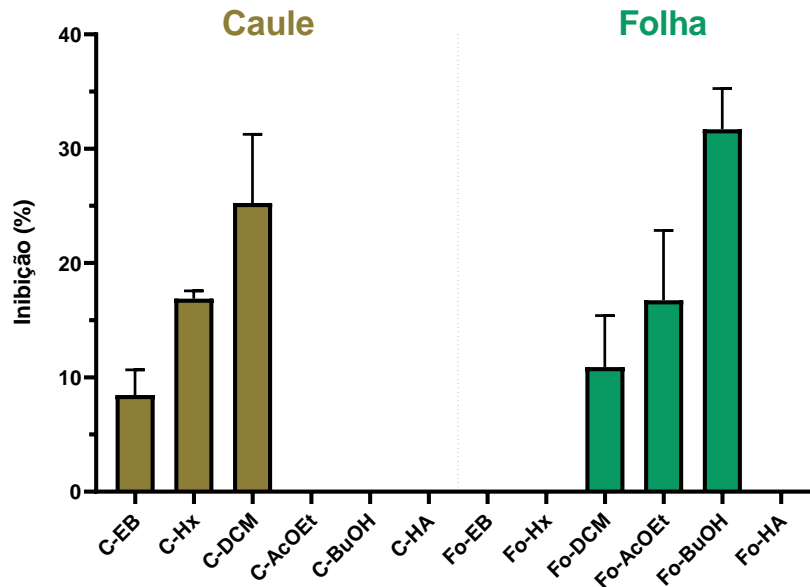
### **3 Resultados**

Os extratos brutos, assim como as fases de partição, obtidos de caules e folhas foram submetidos aos ensaios antioxidantes *in vitro* (DPPH e Folin Ciocalteu), antiacetilcolinesterase e antiproliferativo com as linhagens celulares de carcinoma de cólon (HCT-116) e de carcinoma de de Mama (MCF-7). Os resultados desses ensaios iniciais embasaram os novos fracionamentos e bioensaios específicos com as células RAW e com microrganismos.

#### **3.1 Ensaios iniciais**

##### **3.1.1 Atividade antiacetilcolinesterásica**

Os extratos brutos assim como as suas fases de partição foram avaliados quanto seu potencial de inibir a enzima acetilcolinesterase. O máximo de porcentagem de inibição observado foi em torno de 30% para a fase de partição butanólica do extrato foliar de *C. macrocarpus*. Outras amostras com alguma atividade inibitória foram extrato bruto de caule (9%), fases de partição hexânica e diclorometânica de caule (17% e 26%, respectivamente), além das fases de partição em diclorometano (12%) e em acetato de etila das folhas (15%) (Figura 2). Com base nesses resultados, mesmo a baixa atividade inibitória observada para a fase de partição butanólica do extrato foliar contribuiu para a seleção dessa amostra para o prosseguimento no processo de fracionamento.

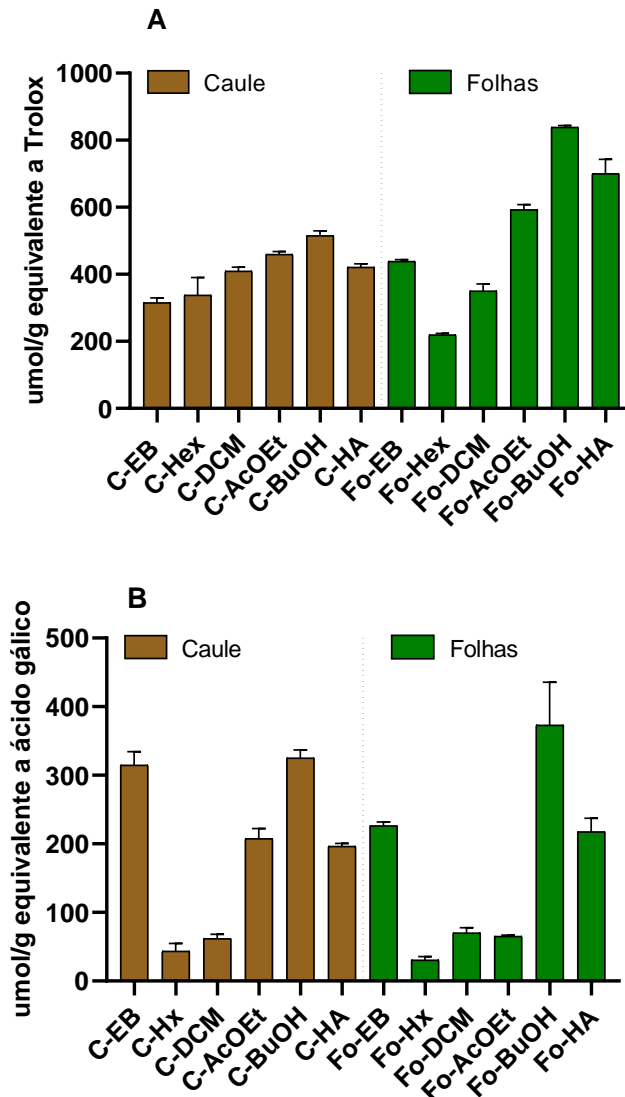


**Figura 2.** Porcentagem de inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase pelas amostras obtidas de *Conchocarpus macrocarpus*. Todas as amostras foram testadas na concentração de 1 mg/mL com concentração final no poço de 0,02 mg/mL. As barras correspondem a média de três repetições (média  $\pm$  SEM) (n=3). C: caule, Fo: folha, EB: extrato bruto, Hx: fase de partição em hexano, DCM: fase de partição em diclorometano, ACoEt: fase de partição em acetato de etila, BuOH: fase de partição em butanol, HA: fase hidroalcoólica.

### 3.1.2 Potencial antioxidante *in vitro*

Os extratos brutos e as fases de partição obtidas a partir deles foram analisadas quanto ao potencial antioxidante *in vitro* através dos ensaios de DPPH e Folin-Ciocalteu.

Os valores de atividade antioxidante com os ensaios DPPH e Folin variaram entre  $219,5 \pm 3,9$  a  $839,1 \pm 4,8$   $\mu\text{mol/g}$  equivalente a trolox para o primeiro e  $35,9 \pm 3,6$  a  $367,6 \pm 10,2$   $\mu\text{mol/g}$  equivalente a ácido gálico para o segundo. Nos dois ensaios, as fases de partição mais polares, principalmente a fase butanólica, apresentou os melhores resultados (Figura 3). Com isso, a fase de partição Fo-BuOH foi escolhida para seguir com fracionamento. O extrato bruto e as fases de partição obtidos de caule não foram fracionadas devido a pouca quantidade (Figura 1).



**Figura 3.** Avaliação da atividade antioxidante das fases de partição e do extrato bruto caulinar e foliar de *Conchocarpus macrocarpus*. Para o ensaio DPPH (A), a atividade foi medida em comparação com o padrão Trolox e os dados foram expressos em  $\mu\text{mol/g}$  equivalente a trolox. No ensaio de Folin-Ciocalteu (B), a atividade foi medida em comparação com o padrão ácido gálico e os dados foram expressos em  $\mu\text{mol/g}$  equivalente a ácido gálico. C: caule, Fo: folha, EB: extrato bruto, Hx: fase de partição em hexano, DCM: fase de partição em diclorometano, ACoEt: fase de partição em acetato de etila, BuOH: fase de partição em butanol, HA: fase hidroalcoólica.

O fracionamento da Fo-BuOH gerou sete grupos/frações (Figura 1), sendo duas delas avaliadas quanto seu potencial antioxidante. Além disso, uma das frações/grupos obtida do fracionamento (Fo-BuOH G2 – Figura 1) foi submetida a nova partição, sendo as duas subfrações também avaliadas. Os resultados de

atividade antioxidante *in vitro* dessas frações e das fases de partição podem ser observados na tabela 1. A partição da fração/grupo Fo-BuOH G2 potencializou a atividade antioxidante de uma das subfrações Fo-BuOH G2.1, destacado em negrito na tabela 1.

**Tabela 1.** Atividade antioxidante dos extratos brutos foliares e caulinares, com suas fases partição e frações obtidos de *C. macrocarpus* frente aos ensaios DPPH e Folin-Ciocalteu.

Amostra <sup>#</sup>	DPPH umol/g equivalente a Trolox	Folin-Ciocalteu umol/g equivalente a ácido gálico
Fo-BuOH	839,1 ± 4,8	367,6 ± 10,2
Fo-BuOH G4	137,7 ± 9,7	67,4 ± 23,5
Fo-BuOH G7	124,4 ± 75,9	10,3 ± 1
Fo-BuOH G2.1	<b>1238,1 ± 6,4</b>	<b>945,3 ± 12,5</b>
Fo-BuOH G2.2	417,0 ± 18,6	334,9 ± 6,2

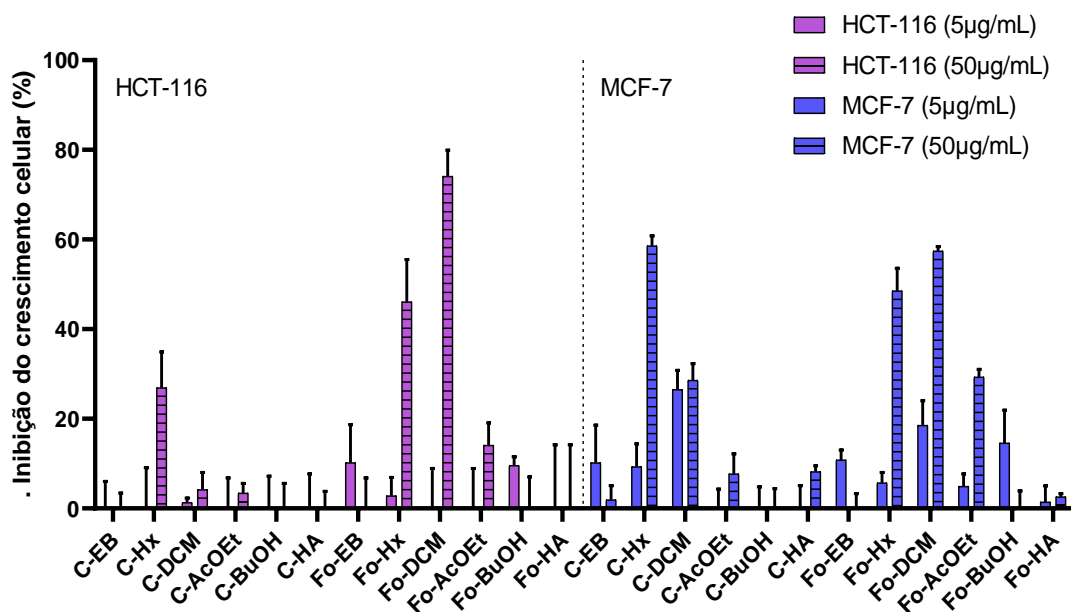
<sup>#</sup> Fo: folha, BuOH: fase de partição em butanol. G4 e G7: grupos de frações obtidas por coluna de topo aberta e agrupadas por similaridades de eluição. G2.1 e G2.2: fases de partição em metanol e diclorometano, respectivamente, obtidas a partir de Fo-BuOH G2.

### 3.1.3 Atividade antiproliferativa

As fases de partição e os extratos brutos foram analisados quanto ao potencial de inibição de crescimento de duas linhagens celulares: HCT 116 (carcinoma de cólon) e MCF-7 (carcinoma de mama). Para isso as amostras foram preparadas nas concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL.

Na maior concentração testada (50 µg/mL) as fases de partição obtidas em hexano e em diclorometano, tanto das folhas como dos caules, foram as que apresentaram os maiores valores de inibição tanto para a linhagem HCT 116 como para MCF-7. Já na concentração de 5 µg/mL nenhuma das amostras testadas atingiu 15% de inibição para qualquer uma das linhagens celulares (Figura 4).

De modo geral, assim como observado para o padrão de atividade antiacetilcolinesterásica, não foram verificados resultados promissores para as amostras avaliadas. Entretanto, as fases de partição hexânica e diclorometânica das folhas, que apresentaram os melhores resultados, foram selecionadas para continuidade no fracionamento. As amostras obtidas de caule não prosseguiram devido a pequena quantidade de material.



**Figura 4.** Inibição do crescimento celular (%) frente a duas linhagens celulares: HCT-116 (carcinoma de cólon, destacado em roxo) e MCF-7 (carcinoma de mama, destacado em azul) com as amostras obtidas de *C. macrocarpus* em duas concentrações (5 µg/mL e 50 µg/mL). C: caule, Fo: folha, EB: extrato bruto, Hx: fase de partição em hexano, DCM: fase de partição em diclorometano, ACoEt: fase de partição em acetato de etila, BuOH: fase de partição em butanol, HA: fase hidroalcoólica.

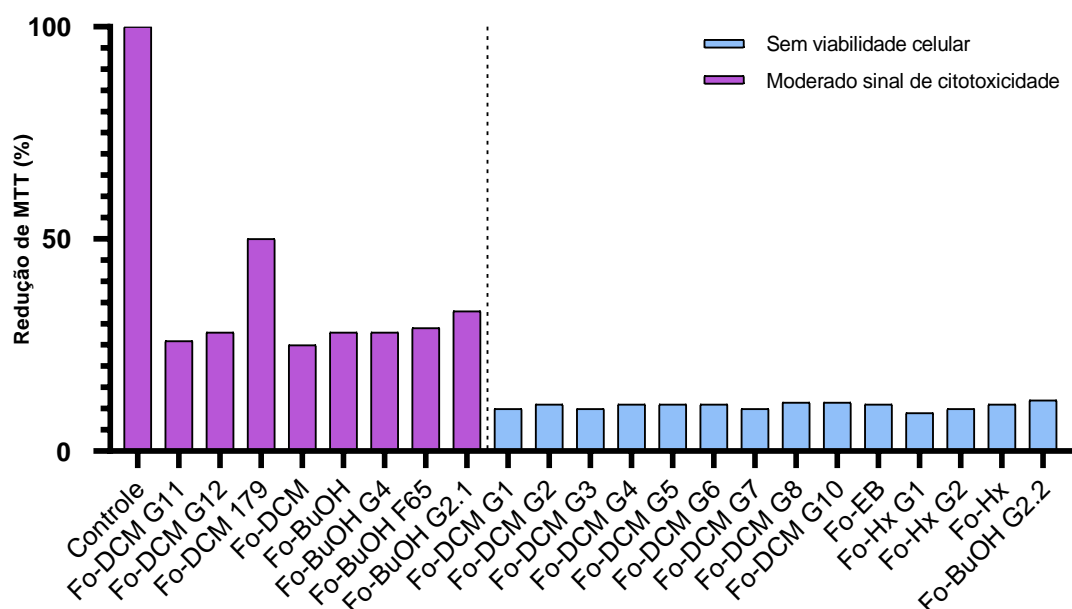
### 3.2 Bioensaios específicos

As fases de partição selecionadas com base nos ensaios iniciais para prosseguir o processo de fracionamento (Fo-Hx, Fo-DCM e Fo-BuOH), assim como as frações obtidas (Fo-Hx G1, Fo-Hx G2, Fo-DCM G1, Fo-DCM G2, Fo-DCM G3, Fo-DCM G4, Fo-DCM G5, Fo-DCM G6, Fo-DCM G7, Fo-DCM G8, Fo-DCM G9, Fo-DCM G10, Fo-DCM G11, Fo-DCM F179, Fo-BuOH F65, Fo-BuOH G4, Fo-BuOH G2.1, Fo-BuOH G2.2) (Figura 1) foram utilizadas em dois outros

ensaios: (1) avaliação da toxicidade e atividade antioxidante das amostras em células RAW, (2) atividade antimicrobiana.

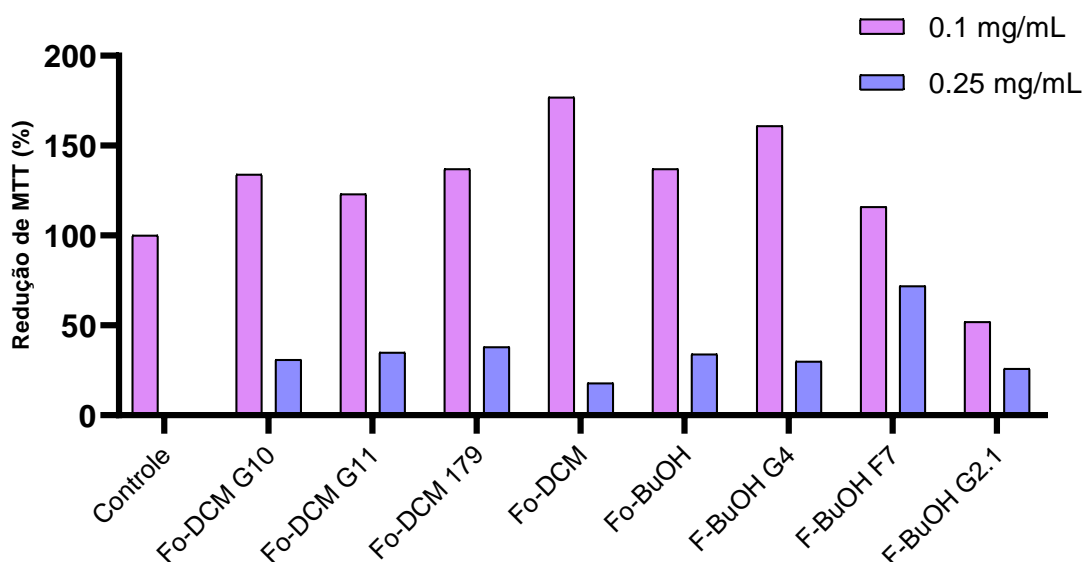
### 3.2.1 Avaliação da toxicidade e atividade antioxidante das amostras em células RAW

Células RAW (macrófagos murínicos) intactas foram cultivadas com acréscimo das amostras na concentração de 0,5 mg/mL. Todas as amostras mostraram sinais de citotoxicidade, sendo que as amostras Fo-DCM G1, Fo-DCM G2, Fo-DCM G3, Fo-DCM G4, Fo-DCM G5, Fo-DCM G6, Fo-DCM G7, Fo-DCM G8, Fo-DCM G10, Fo-EB, Fo-Hx G1, Fo-Hx G2, Fo-Hx e Fo-BuOH G2.2 (Figura 1) levaram a inviabilidade celular, com valores de redução do MTT abaixo de 15% (Figura 5).



**Figura 5.** Teste de viabilidade celular após tratamento das células RAW com as amostras obtidas de *C. macrocarpus* na concentração de 0,5 mg/mL pelo método de MTT. Em azul estão representadas as amostras que causaram maiores danos às células e em roxo as amostras que causaram moderado sinal de citotoxicidade. Fo: folha, EB: extrato bruto, Hx: fase de partição em hexano, DCM: fase de partição em diclorometano, BuOH: fase de partição em butanol, G1 a G12: grupo de frações obtidas por coluna de topo aberto e agrupadas por similitude de eluição em cromatografia em camada delgada, G2.1 e G2.2: fases de partição em metanol e clorofórmio, controle: meio DMEM com soro.

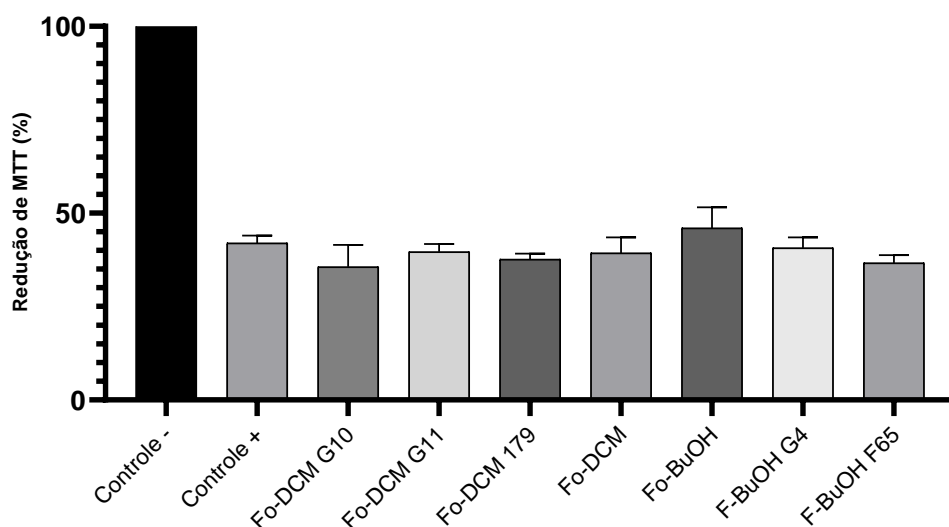
Com isso, as amostras com sinal moderado de citotoxicidade, com valores de redução do MTT entre 24% – 52%, foram avaliadas em concentrações menores (0,1 mg/mL e 0,25 mg/mL). Na concentração de 0,1 mg/mL todas as amostras, exceto a Fo-BuOH G2.1, não foram citotóxicas (Figura 6).



**Figura 6.** Teste de viabilidade celular após tratamento das células RAW com as amostras obtidas de *C. macrocarpus* nas concentrações de 0,1 mg/mL e 0,25 mg/mL pelo método de MTT, onde quanto maior a redução, mais viáveis as células. Fo: folha, DCM: fase de partição em diclorometano, BuOH: fase de partição em butanol, F: fração, G: grupo de frações obtidas por coluna de topo aberto e agrupadas por similitude de eluição em cromatografia em camada delgada, G.2.1: fase de partição em metanol, controle: meio DMEM com SFB.

A atividade antioxidante das amostras não citotóxicas a 0,1 mg/mL foi avaliada em células RAW expostas ao peróxido de hidrogênio. Não foi observada ação protetora das células submetidas ao estresse oxidativo decorrente da presença das amostras (Figura 7), ou seja, não foi observada diferença entre a porcentagem de redução do MTT no controle positivo (células RAW + peróxido) e nas amostras (células RAW + peróxido + amostras).





**Figura 7.** Viabilidade celular das células RAW frente exposição concomitante a peróxido de hidrogênio e as amostras obtidas de *C. macrocarpus* na concentração de 0,1 mg/mL. Para o controle (+) foi usado somente meio DMEM com SFB e peróxido, enquanto para o controle (-) utilizou-se DMEM com SFB, sem peróxido. Fo: folha, DCM: fase de partição em diclorometano, BuOH: fase de partição em butanol, F: fração, G: grupo de frações obtidas por coluna de topo aberto e agrupadas por similitude de eluição em cromatografia em camada delgada.

### 3.2.2 Atividade antimicrobiana

Inicialmente, todas as amostras selecionadas para os bioensaios específicos (Fo-Hx G1, Fo-Hx G2, Fo-DCM G1, Fo-DCM G2, Fo-DCM G3, Fo-DCM G4, Fo-DCM G5, Fo-DCM G6, Fo-DCM G7, Fo-DCM G8, Fo-DCM G9, Fo-DCM G10, Fo-DCM G11, Fo-DCM F179, Fo-BuOH F65, Fo-BuOH G4, Fo-BuOH G2.1, Fo-BuOH G2.2) foram testadas na concentração de 5 mg/mL para verificar a capacidade de inibir o crescimento de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* preparados com em diferentes cargas de microrganismos ( $1,5 \times 10^5$  UFC/mL,  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL,  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL e  $1,5 \times 10^2$  UFC/mL). De modo geral, foi observada a inibição do crescimento de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* por diversas amostras em diferentes cargas de microrganismos. No entanto, para *E. coli* apenas a amostra Fo-DCM G1

conseguiu inibir o crescimento desse microrganismo e somente na menor carga avaliada ( $1,5 \times 10^2$  UFC/mL) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Triagem da atividade antimicrobiana das amostras obtidas de *Conchocarpus macrocarpus* na concentração de 5 mg/mL frente aos microrganismos *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em diferentes cargas.

Amostras <sup>#</sup>	<i>C. albicans</i>				<i>E. coli</i>				<i>S. aureus</i>			
	Concentração de microrganismos (UFC/mL)											
	1,5x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>2</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>2</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>2</sup>
Fo-EB	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Fo-Hx G1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Fo-Hx G2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Fo-DCM G1	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Fo-DCM G5	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Fo-DCM G7	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Fo-DCM G8	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fo-DCM G9	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Fo-DCM G10	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Fo-DCM G11	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fo-DCM F179	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Fo-AcOEt	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Fo-BuOH	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Fo-BuOH G2.1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Fo-BuOH G2.2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Fo-BuOH G4	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

<sup>#</sup> Fo: folha, EB: extrato bruto, Hx: fase de partição em hexano, DCM: fase de partição em diclorometano, AcOEt: fase de partição em acetato de etila, BuOH: fase de partição em butanol, ha: fase hidroalcoólica, G: grupo de frações obtidas por coluna de topo aberto e agrupadas por similitude de eluição em cromatografia em camada delgada, G2.1 e G2.2: fases de partição em metanol e clorofórmio. (-) Sem crescimento do microrganismo, (+) com crescimento do microrganismo.

A seguir, a concentração inibitória mínima das amostras que apresentaram inibição no ensaio anterior foi determinada utilizando-se somente *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* (Tabela 3). De maneira geral, foi observada maior inibição de crescimento de *C. albicans*, mesmo nas cargas de microrganismo mais elevadas, com valores de CIM menores associados as menores concentrações de microrganismos. A amostra Fo-BuOH G2.1 foi a mais eficiente na inibição de *C. albicans* com CIM = 1,25 mg/mL na maior carga microbiana ( $1,5 \times 10^5$  UFC/mL). No caso de *Staphylococcus aureus* a amostra mais ativa na inibição do crescimento foi Fo-DCM G5 com CIM = 0,312 mg/mL nas duas maiores cargas de microrganismos testadas ( $1,5 \times 10^5$  e  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL).

**Tabela 3.** Concentração inibitória mínima (CIM) das amostras capaz de inibir o crescimento de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. Os valores na tabela correspondem a concentração das amostras em mg/mL. (-) amostra não testada nessa carga microbiana. (x) amostra testada sem atividade inibitória. (\*) Os valores correspondem a todas concentrações avaliadas.

Amostras <sup>#</sup>	<i>Candida albicans</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>			
	Concentração de microrganismos (UFC/mL)							
	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$
Fo-EB	5	2,5	-	-	-	-	-	-
Fo-Hx G1	X	1,25	-	-	-	-	2,5	1,25
Fo-Hx G2	5	<0,156	-	-	-	-	-	2,5
F-DCM G1	2,5	0,625	-	-	5	5	-	-
Fo-DCM G5	5	2,5	-	-	0,312	0,312	-	-
Fo-DCM G7	-	2,5	<0,156	-	-	-	-	-
Fo-DCM G8	-	-	1,25	0,625	-	-	-	-
Fo-DCM G9	-	2,5	2,5	-	-	-	-	-
Fo-DCM G10	-	2,5	1,25	-	-	-	-	-
Fo-DCM G11	X	1,25	-	-	-	-	-	-
Fo-DCM F179	-	X	X	-	-	-	-	-
Fo-AcOEt	-	X	1,25	-	-	-	-	-
Fo-BuOH	-	X	-	-	-	-	-	-
Fo-BuOH G2.1	1,25	X	-	-	-	-	X	5
Fo-BuOH G2.2	2,5	X	-	-	-	-	-	-
Fo-BuOH G4	X	X	-	-	-	-	-	-
Clorexidina							<0,18*	
Anfoterecina B		<0,15*						

<sup>#</sup> Fo: folha, EB: extrato bruto, Hx: fase de partição em hexano, DCM: fase de partição em diclorometano, AcOEt: fase de partição em acetato de etila, BuOH: fase de partição em butanol, HA: fase hidroalcoólica, G: grupo de frações obtidas por coluna de topo aberto e agrupadas por

similitude de eluição em cromatografia em camada delgada, G2.1 e G2.2: fases de partição em metanol e clorofórmio.

## **4 Discussão**

### **4.1 Atividade antiacetilcolinesterásica**

Forte ação anticolinesterásica já foi relatada para extratos e compostos isolados de espécies de Rutaceae. Em *Esenbeckia leiocarpa*, os compostos obtidos a partir da fração enriquecida em alcaloides apresentaram uma forte ação anticolinesterásica, em especial o alcaloide leptomerina ( $IC_{50}$  2.5  $\mu$ M), que se aproximou ao controle positivo fisostigmina ( $IC_{50}$  1.7  $\mu$ M) (Cardoso-Lopes et al., 2010). Cabral e colaboradores (2012) isolaram compostos ativos, como alcaloides quinolínicos e furanoquinolínicos e cumarinas do extrato etanólico caulinar de *Conchocarpus fontanesianus* utilizando fracionamento biomonitorado guiado pela atividade antiacetilcolinesterase.

Nenhuma das amostras testadas de *Conchocarpus macrocarpus* foi eficiente na inibição da atividade da acetilcolinesterase. Segundo Coz et al. (2006), extratos em concentração de 100  $\mu$ g/mL com inibição superior a 50% indicam boa atividade nesses ensaios *in vitro*. No nosso caso, mesmo a fase de partição mais eficiente não atingiu 40% de inibição da atividade enzimática.

Murraya e colaboradores (2013) afirmaram que alcaloides oriundos de fontes naturais são os compostos mais potentes na inibição de acetilcolinesterase. Nesse sentido, era esperado que as fases de partição obtidas com hexano e com diclorometano dos extratos de caule e folhas apresentassem boa atividade antiacetilcolinesterásica devido a ocorrência de vários alcaloides (ver Capítulo 1).

A fase de partição que apresentou a maior porcentagem de inibição neste estudo foi a butanólica obtida a partir do extrato foliar, na qual estão presentes, em maioria, flavonoides do tipo flavonas. Gali & Bedjou (2019) demonstraram que a fase butanólica obtida a partir do extrato etanólico de folhas de *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) apresentou uma boa ação antiacetilcolinesterásica devido a presença de flavonoides.

## 4.2 Potencial antioxidante

O ensaio do radical DPPH é um dos ensaios mais comuns para avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* (TAN; LIM, 2015). Muitos autores recomendam a utilização desse ensaio por ser um recurso fácil e preciso para a avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais (Ribeiro et al., 2002; Aaby et al., 2004; Atoui et al., 2005; Cardoso et al., 2005; Anagnostopoulou et al., 2006; Stratil et al., 2006; Termentzi et al., 2006; Surveswaran et al., 2007; Jayaprakasha et al., 2007).

O ensaio antioxidante de DPPH mostrou bons resultados com a fase de partição butanólica do extrato foliar de *C. macrocarpus* e algumas frações obtidas. Li et al. (2014) consideram o valor de  $216 \pm 0,066 \mu\text{mol/g}$  equivalente a trolox encontrado para *Zanthoxylum avicennae* como uma boa capacidade antioxidante. Após um fracionamento da Fo-BuOH, algumas frações apresentaram valores ainda mais expressivos. Quando se compara a atividade antioxidante da amostra Fo-BuOH ( $831,3 \pm 13,7 \mu\text{mol/g}$  equivalente a trolox) com o resultado obtido de uma das frações (Fo-BuOH G2.1 -  $1238,1 \pm 6,4 \mu\text{mol/g}$  equivalente a trolox) fica evidente esse aumento na capacidade antioxidante da amostra. Esse aumento na atividade pode está relacionado com a eliminação de compostos presente na fração butanólica que não estão associados com a atividade antioxidante, conseqüentemente, um maior teor na concentração de flavonoides relacionados a esta atividade.

Algumas espécies de Rutaceae, principalmente as que apresentam uma significativa importância econômica, como espécies de *Citrus*, já foram ensaiadas quanto seu potencial antioxidante. Gorinstein e colaboradores (2006) analisaram a capacidade antioxidante de frutos de *Citrus* de diferentes espécies e/ou cultivares, detectando valores de  $722 \pm 33 \mu\text{mol/g}$  equivalente a trolox para *Citrus sinensis*,  $783 \pm 40 \mu\text{mol/g}$  equivalente a trolox para *Citrus paradise* e  $1007 \pm 85 \mu\text{mol/g}$  equivalente a trolox para *Citrus paradisi* var Jaffa Sweetie, sendo esse último o que mais se aproxima da capacidade antioxidante da amostra Fo-BuOH G2.1 de *C. macrocarpus*.

Os resultados do presente trabalho também foram superiores aos dados encontrados para espécies de *Zanthoxylum* (Rutaceae). Os frutos de *Z.*

*bungeanum* Maxim analisados por Shan et al. (2005) apresentaram uma atividade antioxidante de  $369 \pm 5 \mu\text{mol/g}$  equivalente a trolox. O extrato etanólico foliar e a fase de partição butanólica obtidos de *Z. avicennae* apresentaram baixa atividade antioxidante ( $52 \pm 0,006 \mu\text{mol/g}$  equivalente a trolox e  $55 \pm 0,065 \mu\text{mol/g}$  equivalente a trolox, respectivamente) (LI et al., 2014).

Neste estudo, o método Folin-Ciocalteu foi usado como indicativo da capacidade antioxidante das amostras. Entretanto, muitos trabalhos utilizam esse método para quantificar os fenois totais (Blainski et al., 2013; Derakhshan et al., 2018; Aryal et al., 2019), sendo, na maioria das vezes, esses compostos os responsáveis pela atividade antioxidante mensurada (LUZIA; JORGE, 2010; FEJZIĆ; ČAVAR, 2014). Essa relação foi observada no presente estudo, uma vez que as amostras com melhores resultados medidos pelo Folin-Ciocalteu foram as que apresentam maior capacidade antioxidante no método DPPH. Fejzić & Cavar (2014) encontrou resultados semelhantes analisando a capacidade antioxidante em espécies de *Citrus*, uma vez que dentre as amostras avaliadas, o extrato de casca de laranja apresentou o maior conteúdo de fenois totais (232,5 mg GAE/g) e um dos menores  $\text{IC}_{50}$  ( $19.15 \pm 0.24 \text{ mg/mL}$ ) e, ao contrário, o suco de limão apresentou o maior  $\text{IC}_{50}$  ( $78.11 \pm 6.70 \text{ mg/mL}$ ) e o menor conteúdo de fenois totais (102.2 mg GAE/g).

Como já mencionado, a amostra Fo-BuOH G2.1 apresentou a maior atividade antioxidante dentre as fases de partição e frações obtidas. Como apresentado no Capítulo 1 deste trabalho, a fase butanólica apresentou como principais constituintes, compostos fenólicos, em especial flavonas que são os principais flavonoides descritos para espécies de Rutaceae (YORO et al., 2020). Compostos fenólicos, como flavonoides, são amplamente descritos na literatura como produtos naturais com forte ação antioxidante (Moure et al., 2001; Heim et al., 2002; Souza et al., 2020).

Apesar das amostras obtidas a partir da fase de partição butanólica terem apresentado atividade antioxidante *in vitro*, não ofereceram proteção ao estresse oxidativo provocado pela exposição de células RAW (macrófagos murínicos) ao peróxido de hidrogênio. A proteção celular contra o peróxido de hidrogênio já foi reportada para algumas espécies de Rutaceae, como por exemplo em *Clausena excavata* Burm. f., para a qual Albaayit et al. (2015) relaciona a presença de

quercetina e miricetina nos extratos com essa forte proteção. Resultado similar é descrito por Alam et al. (2020) em um estudo realizado com o extrato foliar de *Zanthoxylum armatum* DC, em que a boa atividade antioxidante (DPPH) assim como uma boa proteção celular contra o peróxido de hidrogenio são associadas ao alto teor de compostos fenólicos, sobretudo quercetina. Entretanto, em *Citrus paradisi* Macf., segundo Lado et al. (2016), apesar do potencial antioxidante frente ao ensaio DPPH, essa atividade não foi relacionada com a proteção contra peróxido de hidrogênio, uma vez que não foi verificado uma proteção significativa nas células avaliadas, resultado similar ao encontrado no presente estudo. Segundo Zhang et al. (2008), favonois, como por exemplo rutina, apresentam três requisitos estruturais importantes na efetividade da proteção celular, como o grupo 3-hidroxila no anel C, o grupo 3', 4'-ortodihidroxi (estrutura catecol) no anel B, bem como a ligação 2,3-dupla conjugada com a função 4-oxo no anel C. Já as flavonas derivadas de apigenina, como as identificadas em *C. macrocarpus*, não apresentam dois desses requisitos, fazendo com que tenham baixa ou nenhuma atividade de proteção celular, como já descrito por Surveswaran et al. (2007).

#### **4.3 Ensaio antimicrobiano**

Os extratos avaliados foram mais ativos contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e o fungo *C. albicans* e praticamente inativos contra *E. coli* (Gram-negativa). Variação no padrão de inibição de crescimento entre bactérias Gram-positivo e Gram-negativo pode ser atribuída a diferença na composição da parede celular bacteriana, sendo as Gram-negativas muito mais complexas, permitindo uma menor permeabilidade de drogas (LEE; KIM; KIM, 2008).

Espécies de Rutaceae têm sido amplamente investigadas quanto seu potencial antimicrobiano. A concentração mínima inibitória (CMI) do extrato etanólico de *Coleonema album* (Thunb.) Bartl. & H.L.Wendl. variou de 0,195 mg/mL a 0,234 mg/mL para *C. albicans* e foi de 0,729 mg/mL para *S. aureus*. Já a CIM do extrato em acetona variou de 0,299 mg/mL à 0,338 mg/mL e 1,666 mg/mL à 2,083 mg-mL para os dois microrganismos, respectivamente. Nesse caso, agliconas de cumarinas foram as responsáveis por essa atividade (ESTERHUIZEN; MEYER; DUBERY, 2006). O extrato metanólico e alcaloides furanoquinolínicos isolados de *Teclea afzelii* Engl. (Rutaceae) também



apresentaram uma forte ação antimicrobiana sobre uma diversidade de microrganismos, como *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, entre outros (KUETE et al., 2008). Além disso, o extrato em diclorometano de *Conchocarpus fontanesianus* apresentou ação antifúngica frente a *C. albicans*, sendo os alcaloides flindersina e metoxiflindersina os responsáveis por essa ação (Cabral et al., 2016).

Neste estudo foi observado que para *S. aureus*, o extrato bruto foliar (Fo-EB) não exibiu nenhum resultado de inibição, assim como as fases de partição mais polares, exceto Fo-BuOH G2.1, que apresentou uma fraca atividade na maior concentração de extrato (5mg/mL) e menor carga microbiana avaliada ( $1,5 \times 10^2$  UFC/mL). Nessas amostras mais polares foram identificados flavonoides como vitexina, saponarina, isovitexina 2"-O-arabinosideo, isovitexina-2"-O-ramnosideo ou amidas como feruloil putrescina, feruloil agmatina e p-coumaroil agmatina (ver Capítulo 1), podendo ser responsáveis pela atividade, ainda que baixa, da amostra Fo-BuOH G2.1. Todavia, essas amostras mais polares se mostram mais ativas contra *C. albicans*, mesmo que moderadamente, com CMI da amostra Fo-BuOH G2.1 de 1,25 mg/mL. Um estudo feito por Ivanov et al. (2021) mostra que flavonas apresentam potencial antifúngico contra *C. albicans*, o que pode explicar o fato de Fo-BuOH G2.1 ser mais ativa entre as amostras avaliadas.

Por outro lado, as amostras mais apolares como Fo-Hx G1, Fo-Hx G2, Fo-DCM G1 e Fo-DCM G5, principalmente essa última, apresentaram uma inibição significativa do crescimento de *S. aureus*, com um CIM de 0,312 mg/mL da amostra Fo-DCM G5 na maior carga de microrganismo avaliada ( $1,5 \times 10^5$  UFC/mL). Suffredini et al. (2006) já consideram extratos vegetais ativos contra microrganismos quando inibem o crescimento microbiano em concentrações inferiores a 200 mg/mL em uma carga de microrganismos de  $1,5 \times 10^2$  UFC/mL. Nessa fração mais ativa, dois picos majoritários atribuídos a alcaloides quinolínicos do grupo das cloroclaustalaginas (ver Capítulo 1) podem estar relacionados com o potencial antimicrobiano. Alcaloides com núcleo quinolínico apresentam atividade antimicrobiana frente a uma ampla diversidade de bactérias, tendo sido demonstrada relação estrutura-bioatividade dependente dos substituintes ligados ao esqueleto quinolínico (GOMEZ; KOUZNETSOV, 2013).

Alcaloides quinolínicos foram associados a forte atividade antimicrobiana descrita para *Cryptolepis sanguinolenta* Lindl. Schltr. (Periplocaceae) (SAWER et al., 1995) e *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) (Cho et al., 2005).

#### 4.4 Atividade antiproliferativa

Espécies de Rutaceae vêm se mostrando uma boa fonte para obtenção de produtos naturais na cura e tratamento de câncer, uma vez que muitas de suas espécies são descritas como fontes potenciais de agentes capazes de inibir a proliferação de células cancerígenas. Dentre alguns relatos de atividade citotóxica em espécies de Rutaceae, pode-se citar os alcaloides isolados de *Aegle marmelos* (L.) Corrêa (RIYANTO et al., 2001) ou de *Clausena lansium* Lour. Skeels (PENG et al., 2020), além das amidas e lignanas encontradas na casca do caule de *Fagara heitzii* Aubrév. & Pellegr (MBAZE et al., 2009), entre outros.

Em *Zanthoxylum buesgenii* (Rutaceae), os alcaloides derivados de quinolinas, como isoquinolínicos e furanoquinolínicos, desempenharam um efeito satisfatório frente a células tumorais, em especial um alcaloide benzilisoquinolínico (1-metoxi-12-metil-13H-[1,3]benzodioxolo[5,6-c]fenantridina-2,13-diol) que foi capaz de inibir nove linhagens de células cancerígenas com poder de ação próximo a doxorrubicina, usada como controle positivo (SANDJO et al., 2014).

Uma atividade significativa foi descrita para o extrato hexânico e diclorometânico da casca do caule de *Citrus reticulata* (Rutaceae) contra a linhagem celular de cancer de mama (MCF-7) (TAHSIN et al., 2017). Esse dado corrobora com o que foi encontrado nesse trabalho, uma vez que as fases de partição em hexano e diclorometano foram as mais ativas contra essa linhagem celular, ainda que não de forma significativa. Além disso, nessas amostras estão concentrados os alcaloides quinolínicos, e como já mencionado anteriormente, esses compostos desempenharam efeito satisfatório frente a linhagens celulares. Entretanto, para entender melhor a capacidade antiproliferativa desses extratos, as substâncias dessas frações mais ativas deveriam ser isoladas, incluindo os compostos minoritários. Devida a baixa atividade, provavelmente não são os compostos majoritários que estão relacionados nessa bioatividade.

De modo geral, nos ensaios antioxidantes, as frações foliares mais polares, ricas em flavonoides do tipo flavona, apresentaram os melhores resultados, principalmente a fração Fo-BuOH G2.1 com valores de  $1238,1 \pm 6,4$   $\mu\text{mol/g}$  equivalente a Trolox e  $945,3 \pm 12,5$   $\mu\text{mol/g}$  equivalente a ácido gálico, nos ensaios DPPH e Folin-Ciocalteu, respectivamente. Entretanto, nenhuma proteção contra o peróxido de hidrogênio foi encontrada para qualquer uma das amostras nos ensaios antioxidantes *in vivo*. Além disso, flavonas presentes na amostra Fo-BuOH G2.1 foram relacionadas a inibição de *C. albicans* com CIM = 1,25 mg/mL a maior carga microbiana ( $1,5 \times 10^5$  UFC/mL), enquanto alcaloides presentes na amostra Fo-DCM G5 foram associados a efetiva inibição de *Staphylococcus aureus*, com CIM = 0,312 mg/mL nas duas maiores cargas de microrganismos testadas ( $1,5 \times 10^5$  e  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL). Os ensaios de inibição de acetilcolinesterase e antiproliferativo não apresentaram resultados promissores associados aos compostos majoritários.

## 5 Referências bibliográficas

- Aaby, K., Hvattum, E., & Skrede, G. (2004). Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: relationship to antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4595–4603.
- Alam, F., Din, K. M., Rasheed, R., Sadiq, A., Jan, M. S., Minhas, A. M., & Khan, A. (2020). Phytochemical investigation, anti-inflammatory, antipyretic and antinociceptive activities of *Zanthoxylum armatum* DC extracts-*in vivo* and *in vitro* experiments. *Heliyon*, 6(11), e05571.
- Albaayit, S. F. A., Abba, Y., Rasedee, A., & Abdullah, N. (2015). Effect of *Clausena excavata* Burm. f. (Rutaceae) leaf extract on wound healing and antioxidant activity in rats. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 3507.
- Anagnostopoulou, M. A., Kefalas, P., Papageorgiou, V. P., Assimopoulou, A. N., & Boskou, D. (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*, 94(1), 19–25.
- Aryal, S., Baniya, M. K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R., & Koirala, N. (2019). Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from Western Nepal. *Plants*, 8(4), 96.
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89(1), 27–36.
- Belleite, B. S., Sá, I. C. G. de, Mafezoli, J., Cerqueira, C. do N., Silva, M. F. das G. F. da, Fernandes, J. B., Vieira, P. C., Zukerman-Schpector, J., & Pirani, J. R. (2012). Fitoquímica e quimiosistemática de *Conchocarpus marginatus* e *C. inopinatus* (Rutaceae). *Química Nova*, 35, 2132–2138.

- Blainski, A., Lopes, G. C., & de Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852–6865.
- Cabral, R. S. A., Allard, P. M., Marcourt, L., Young, M. C. M., Queiroz, E. F., & Wolfender, J. L. (2016). Targeted Isolation of Indolopyridoquinazoline Alkaloids from *Conchocarpus fontanesianus* Based on Molecular Networks. *Journal of Natural Products*, 79(9), 2270–2278.
- Cabral, R. S., Sartori, M. C., Cordeiro, I., Queiroga, C. L., Eberlin, M. N., Lago, J. H. G., Moreno, P. R. H., & Young, M. (2012). Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from stems of *Conchocarpus fontanesianus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(2), 374–380.
- Cardoso, C. L., Silva, D. H. S., Castro-Gamboa, I., & Bolzani, V. da S. (2005). New biflavonoid and other flavonoids from the leaves of *Chimarrhis turbinata* and their antioxidant activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16, 1353–1359.
- Cardoso-Lopes, E. M., Maier, J. A., Silva, M. R. da, Regasini, L. O., Simote, S. Y., Lopes, N. P., Pirani, J. R., Bolzani, V. da S., & Young, M. C. M. (2010). Alkaloids from stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl.(Rutaceae) as potential treatment for Alzheimer disease. *Molecules*, 15(12), 9205–9213.
- Chaves, J. O., de Souza, M. C., da Silva, L. C., Lachos-Perez, D., Torres-Mayanga, P. C., da Fonseca Machado, A. P., Forster-Carneiro, T., Vázquez-Espinosa, M., González-de-Peredo, A. V., & Barbero, G. F. (2020). Extraction of flavonoids from natural sources using modern techniques. *Frontiers in Chemistry*, 8.
- Cho, J. H., Lee, C. H., Lee, H. S. (2005). Antimicrobial activity of quinoline derivatives isolated from *Ruta chalepensis* toward human intestinal bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(3), 646–651.

- Cortez, D., E. Ranieri Cortez, L., B. Fernandes, J., C. Vieira, P., G. Ferreira, A., & Fátima das G. F. da Silva, M. (2009). New Alkaloids from *Conchocarpus gaudichaudianus*. *Heterocycles*, 78(8), 2053.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3670–3695.
- Esterhuizen, L. L., Meyer, R., & Dubery, I. A. (2006). Antimicrobial compounds from *Coleonema album* (Rutaceae). *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 61(7–8), 489–498.
- Fejzić, A., & Ćavar, S. (2014). Phenolic compounds and antioxidant activity of some citrus. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, 42, 1–4.
- Furlan, C. M., Santos, K. P., Sedano-Partida, M. D., da Motta, L. B., Santos, D. Y. A. C., Salatino, M. L. F., Negri, G., Berry, P. E., van Ee, B. W., & Salatino, A. (2015). Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of *Croton* (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Botany*, 38(4), 693–702.
- Gali, L., & Bedjou, F. (2019). Antioxidant and anticholinesterase effects of the ethanol extract, ethanol extract fractions and total alkaloids from the cultivated *Ruta chalepensis*. *South African Journal of Botany*, 120, 163–169.
- Gomez, C. M. M., & Kouznetsov, V. v. (2013). Recent developments on antimicrobial quinoline chemistry. In *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education* (pp. 666–677). Formatex.
- Gorinstein, S., Huang, D., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Yamamoto, K., Soliva-Fortuny, R., Martín Belloso, O., Matínez Ayala, A. L., & Trakhtenberg, S. (2006). Determination of naringin and hesperidin in citrus fruit by high-performance liquid chromatography. The antioxidant potential of *Citrus* fruit. *Acta Chromatographica*, 2006, Vol. 17, p. 108-124.

- Grosso, M., de Lemos, L. J. C., de Lima Ferreira, P., Ferreira, C., Bruniera, C. P., de Castro, N. M., Pirani, J. R., el Ottra, J. H., & Kallunki, J. A. (2021). A tree nymph of the Brazilian Atlantic Forest: *Dryades* (Galipeinae, Rutaceae), a new neotropical genus segregated from *Conchocarpus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 154, 106971.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584.
- Ivanov, M., Kannan, A., Stojković, D. S., Glamočlija, J., Calhelha, R. C., Ferreira, I. C. F. R., Sanglard, D., & Soković, M. (2021). Flavones, Flavonols, and Glycosylated Derivatives—Impact on *Candida albicans* Growth and Virulence, Expression of CDR1 and ERG11, Cytotoxicity. *Pharmaceuticals*, 14(1), 27.
- Kuete, V., Ngameni, B., Simo, C. C. F., Tankeu, R. K., Ngadjui, B. T., Meyer, J. J. M., Lall, N., & Kuate, J. R. (2008). Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 120(1), 17–24.
- Lee, J. M., Kim, S. M., & Kim, S. M. (2008). Biochemical and antibacterial properties of lysozyme purified from the viscera of scallops (*Patinopecten yessoensis*). *Journal of Food Biochemistry*, 32(4), 474–489.
- Li, X. F., Zheng, N. N., Tang, L., Zhang, W. X., Wang, Y. X., An, S., & Zhu, Y. Q. (2014). Antioxidant activities of ethanol extracts from *Zanthoxylum avicennae*. *Applied Mechanics and Materials*, 472, 801–804.
- Luzia, D. M. M., & Jorge, N. (2010). Potencial antioxidante de extratos de sementes de limão (*Citrus limon*). *Food Science and Technology*, 30, 489–493.
- Mafezoli, J., Vieira, P. C., Fernandes, J. B., da Silva, M. F. G. F., & de Albuquerque, S. (2000). In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 73). [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)

- Mathew, M., & Subramanian, S. (2014). In vitro screening for anti-cholinesterase and antioxidant activity of methanolic extracts of ayurvedic medicinal plants used for cognitive disorders. *PloS One*, 9(1), e86804.
- Mbaze, L. M., Lado, J. A., Wansi, J. D., Shiao, T. C., Chiozem, D. D., MESAIK, M. A., Choudhary, M. I., Lacaille-Dubois, M.-A., Wandji, J., & Roy, R. (2009). Oxidative burst inhibitory and cytotoxic amides and lignans from the stem bark of *Fagara heitzii* (Rutaceae). *Phytochemistry*, 70(11–12), 1442–1447.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., & Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145–171.
- Peng, W.-W., Fu, X.-X., Xiong, Z.-H., Wu, H.-L., Chang, J.-W., Huo, G.-H., & Li, B.-T. (2020). Taxonomic significance and antitumor activity of alkaloids from *Clausena lansium* Lour. Skeels (Rutaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 90, 104046.
- Petsko, G. A. (1996). For medicinal purposes. *Nature*, 384(6604 Suppl), 7–9.
- Ribeiro, C. V. C., & Kaplan, M. A. C. (2002). Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em Angiospermae. *Química Nova*, 25, 533–538.
- Riyanto, S., Sukari, M. A., Rahmani, M., Ee, G. C. L., Yap, Y. H. T., Aimi, N., & Kitajima, M. (2001). Alkaloids from *Aegle marmelos* (Rutaceae). *Malaysian J Anal Sci*, 7(2), 463–465.
- Sandjo, L. P., Kuete, V., Tchangna, R. S., Efferth, T., & Ngadjui, B. T. (2014). Cytotoxic benzophenanthridine and furoquinoline alkaloids from *Zanthoxylum buesgenii* (Rutaceae). *Chemistry Central Journal*, 8(1), 1–5.
- Santos, C. S., Januário, A. H., Vieira, P. C., Fernandes, J. B., Silva, M., & Pirani, J. R. (1998). Cycloartane triterpenoid and alkaloids from *Ameidea* spp. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9, 39–42.



- Sawer, I. K., Berry, M. I., Brown, M. W., & Ford, J. L. (1995). The effect of cryptolepine on the morphology and survival of *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(3), 314–321.
- Silveira, E. R., Roma, L. P., Pirani, J. R., & Santos, D. Y. A. C. (2021). Contrasting leaf cuticular wax composition of *Conchocarpus* and *Dryades* species (Rutaceae) from the Atlantic Forest and “Restinga.” *Brazilian Journal of Botany*.
- Stratil, P., Klejdus, B., & Kubáň, V. (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 607–616.
- Suffredini, I. B., Paciencia, M. L. B., Nepomuceno, D. C., Younes, R. N., & Varella, A. D. (2006). Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts-Clusiaceae. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 287–290.
- Surveswaran, S., Cai, Y.-Z., Corke, H., & Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102(3), 938–953.
- Tahsin, T., Wansi, J. D., Al-Groshi, A., Evans, A., Nahar, L., Martin, C., & Sarker, S. D. (2017). Cytotoxic properties of the stem bark of *Citrus reticulata* Blanco (Rutaceae). *Phytotherapy Research*, 31(8), 1215–1219.
- Tan, J. B. L., & Lim, Y. Y. (2015). Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Food Chemistry*, 172, 814–822.
- Termentzi, A., Kefalas, P., & Kokkalou, E. (2006). Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages. *Food Chemistry*, 98(4), 599–608.
- Waterman, P. G. (1975). Alkaloids of the Rutaceae: their distribution and systematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 3(3), 149–180.

- Waterman, P. G., & Grundon, M. F. (1983). Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales. Academic Press.
- Waterman, P. G., & Mole, S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific.
- Yoro, T., Diallo, A., Ndoye, I., Yin, Y., Renucci, F., Guèye, R. S., Baldé, M., Diédhiou, A., Fall, D., & Seck, M. (2020). The Flavonoid Compounds from *Zanthoxylum leprieurii* Guill. et Perr (Rutaceae) Extracts and their Antioxidant Activity against ABTS•+. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(2-s), 120–124.

### **Capítulo III**

---

## Composição e atividade antimicrobiana dos óleos voláteis de *Conchocarpus macrocarpus* (Rutaceae)



## Resumo

*Conchocarpus* J.C. Mikan é o maior gênero da subtribo Galipeinae, tribo Galipeeae (Rutaceae), distribuído da Nicarágua ao norte da Bolívia e sul do Brasil, com centro de diversidade de espécies na Mata Atlântica brasileira. Apesar da grande diversidade de espécies de *Conchocarpus*, até o momento, poucos aspectos químicos foram explorados. Apenas *Conchocarpus fontanesianus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani já foi analisada quanto à composição do óleo volátil (OV) e suas potenciais atividades biológicas. Portanto, o objetivo principal do presente estudo foi investigar a composição química do óleo volátil das folhas de *Conchocarpus macrocarpus*, uma espécie endêmica do Brasil, coletada em Cachoeiro do Itapemirim (ES) e em São Paulo (SP). Os compostos voláteis foram extraídos por hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM - Agilent 6850/Agilent 5975C). Comparando o perfil químico das amostras, hidrocarbonetos como heptano, nonano e *n*-octano foram exclusivos da amostra de SP, sendo (+)-epi-biciclosesquifelandreno (15,14%), 1,3-xileno (11,04%) e cariofileno (10,42%) os compostos majoritários. Por outro lado, sesquiterpenos oxigenados como  $\alpha$ -cadinol, espatulenol e  $\beta$ -selineno foram detectados apenas na amostra do ES, na qual germacreno D (14,0%),  $\beta$ -elemeno (13,09%) e copaeno (6,22%) foram os compostos principais. A composição química do OV da amostra de SP apresenta semelhança com aquela descrita para *C. fontanesianus*. O óleo volátil da amostra de SP foi avaliado contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* por meio de ensaio de microdiluição em caldo. Uma forte atividade antimicrobiana foi encontrada contra *Candida albicans* (CBM = 0,312mg/mL) para a carga de microrganismos de  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL e uma atividade fraca contra *Staphylococcus aureus* (CBM = 2,5 mg/mL) para a carga de  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL. Concluindo, foi detectada variação na composição dos OV nas amostras de *Conchocarpus macrocarpus*. Entretanto, se essa variação está relacionada à localidade de coleta, ao processamento das amostras, ou a ambos é uma questão que necessita mais estudos.

**Palavras-chave:** *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, Sapindales, Inibição microbiana



---

## Abstract

---

*Conchocarpus* J.C. Mikan is the largest genus of the subtribe Galipeinae, tribe Galipeeae (Rutaceae) distributed from Nicaragua to northern Bolivia and southern Brazil, with the center of species diversity in the Brazilian Atlantic Forest. Despite the great diversity of *Conchocarpus* species, few chemical aspects have been explored. Only *Conchocarpus fontanesianus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani has been analyzed regarding the essential oil (EO) composition and its potential biological activities. Therefore, the main objective of this study was to investigate the chemical composition of EO from leaves of *Conchocarpus macrocarpus*, an endemic species from Brazil, collected in Cachoeiro do Itapemirim (ES) and São Paulo (SP). Volatile compounds were extracted by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS - Agilent 6850/Agilent 5975C). Comparing the chemical profile of the samples, hydrocarbons such as heptane, nonane and *n*-octane were exclusive to the SP sample, with (+)-*epi*-bicyclosquiphelandrene (15.14%), 1,3-xylene (11.04%) and caryophyllene (10.42%) as major compounds. On the other hand, oxygenated sesquiterpenes such as  $\alpha$ -cadinol, spathulenol and  $\beta$ -selinene were detected only in the ES sample, in which germacrene D (14.0%),  $\beta$ -elemene (13.09%) and copaene (6.22 %) were the main compounds. The chemical composition of the EO from the SP sample was similar to that described for *C. fontanesianus*. The EO from the SP sample was evaluated against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by broth microdilution test. A strong antimicrobial activity was found against *Candida albicans* (MIC = 0.312mg/mL) for the microorganism load of  $1.5 \times 10^4$  CFU/mL and a weak activity against *Staphylococcus aureus* (MIC = 2.5 mg/mL) for the microorganism load of  $1.5 \times 10^3$  CFU/mL. In conclusion, variation in EO composition was detected in *Conchocarpus macrocarpus* samples. However, whether this variation is related to the collection location, sample processing, or both is an issue that needs further investigation.

**Key-words:** *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, Sapindales, microbial inhibition



# Composição e atividade antimicrobiana dos óleos voláteis de *Conchocarpus macrocarpus* (Rutaceae)

---

## 1 Introdução

*Conchocarpus* J.C. Mikan é o maior gênero na subtribo Galipeinae, tribo Galipeae (Rutaceae), com 47 espécies distribuídas da Nicarágua ao norte da Bolívia e sudeste do Brasil, com centro de diversidade de espécies na Mata Atlântica brasileira (Groppo et al. 2021). Apesar da ampla diversidade morfológica das espécies desse gênero, poucos aspectos químicos têm sido explorados.

Silveira et al. (2021) realizam o primeiro estudo sobre a composição da cera cuticular em folhas de *Conchocarpus*, relatando principalmente alcanos de cadeia longa em *Conchocarpus inopinatus* Pirani, *Conchocarpus macrocarpus* (Engl.) Kallunki & Pirani, *Conchocarpus macrophyllus* J.C. Mikan, *Conchocarpus mastigophorus* Kallunki, *Conchocarpus obovatus* (Nees & Mart.) Kallunki & Pirani e *Conchocarpus ruber* (A.St.-Hil.) Bruniera & Groppo. Além disso, alcaloides quinolínicos foram descritos para *Conchocarpus fontanesianus* (A.St.-Hil.) Kallunki & Pirani, *C. gaudichaudianus* (A.St.-Hil.) Kallunki & Pirani [atualmente = *Dryades gaudichaudiana* (A.St.-Hil.) Groppo, Kallunki & Pirani], *C. heterophyllus* (A.St.-Hil.) Kallunki & Pirani e *C. longifolius* (A.St.-Hil.) Kallunki & Pirani (Mafezoli et al. 2001; Ambrozin et al. 2008; Cortez et al. 2009; Cabral et al. 2012), enquanto alcaloides acridínicos foram identificados em *C. inopinatus* Pirani e *C. marginatus* (Rizzini) Kallunki & Pirani (Bellete et al. 2012). Em relação a compostos fenólicos, diversos flavonoides foram descritos em *C. heterophyllus* (Ambrozin et al. 2008) e cumarinas em *C. longifolius* (Mafezoli et al. 2000).

Em *Conchocarpus*, pouco se sabe a respeito da constituição química e potenciais atividades biológicas de óleos voláteis. Cabral et al. (2016) analisaram

a composição dos óleos voláteis de folhas e frutos de *Conchocarpus fontanesianus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani. Nesse estudo, os pesquisadores detectaram espatulenol e  $\alpha$ -cadinol como majoritários nas folhas, enquanto nos frutos  $\beta$ -mirceno, (+)-epi-biciclosesquifelandreno e biciclogermacreno foram predominantes. A avaliação através de bioautografia em cromatoplasmas mostrou inatividade do OV dos frutos contra *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, oposto ao observado para o OV das folhas. A presença marcante de sesquiterpenos oxigenados nas amostras foliares foi atribuída, pelos autores, como responsável pela inibição do crescimento do fungo.

Os óleos voláteis apresentam uma grande aplicação e alta demanda nas indústrias de alimento, perfumaria, cosméticos, farmacêutica, entre outras (Magwa et al. 2006). Muitos deles são de grande importância devido a suas atividades biológicas como antibacteriana, antifúngica e antioxidante (Graven et al. 1992; Gundidza 1993; Rabe e van Staden, 1997; Burits et al. 2001; Lee et al., 2003).

Os OV obtidos a partir de espécies de Rutaceae têm apresentado resultados promissores frente as atividades biológicas citadas anteriormente. Uma forte atividade antioxidante foi descrita para o OV de *Murraya paniculata* (L.) Jack, espécie utilizada frequentemente na medicina tradicional (Silva et al. 2020), e também para *Ruta montana* L. (Kambouche et al. 2008). Gong et al. (2007) demonstraram que o OV de *Zanthoxylum bungeanum* Maxim pode ser uma fonte de compostos antifúngicos para o controle de doenças de plantas, especialmente quando aplicados na preservação de frutas e outros vegetais. Atividade antibacteriana foi verificada para OV de *Ruta graveolens* L. (Orlanda & Nascimento 2015), *Aegle marmelos* (L.) Corr., *Toddalia asiatica* (Linn.) Lan. e *Zanthoxylum budrunga* Wall. ex Hook.f. (Kamkaen et al., 2008). Entretanto, grande parte do conhecimento da composição dos óleos voláteis de espécies de Rutaceae está principalmente voltada para *Citrus* L. Devido ao seu aroma único, caracterizado pela abundância de compostos como linalool e limoneno, e a grande importância econômica de várias espécies desse gênero, o OV dessas espécies é também um produto valorizado (Esfahani et al. 2017; Hardjono et al. 2021). O OV de *Citrus aurantium* L., por exemplo, já foi amplamente investigado

em amostras de folhas (p. ex. Azhdarzadeh et al., 2016; Farahmandfar et al. 2020) ou casca (p. ex. Farahmandfar et al. 2020; Sevindik et al. 2021).

Nesse contexto, o principal objetivo desse trabalho foi descrever a composição química dos óleos voláteis (OV) das folhas de *C. macrocarpus* coletadas em Cachoeiro do Itaperimim – ES e em São Paulo – SP, além de avaliar a potencial atividade antimicrobiana do OV dos espécimes de SP.

## **2 Materiais e métodos**

Folhas de *Conchocarpus macrocarpus* (J.R. Pirani et al. 3530 - NY, SPF) foram coletadas de vários indivíduos em Cachoeiro do Itapemirim – Espírito Santo pela Profa. Dra. Gladys Flávia A. M. de Pinna. Paralelamente, foram coletadas folhas de três indivíduos cultivados no Fitotério do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP (latitude: -23.565840°; longitude: -46.73175016°).

### **2.1 Obtenção dos óleos voláteis**

Para análise de óleo volátil, foram utilizados 20 gramas de folhas secas em estufa do material coletado em Cachoeiro do Itapemirim – Espírito Santo, além de outros 200 gramas de folhas frescas obtidas no fitotério. Os dois materiais foram submetidos ao mesmo processo de extração. O material vegetal foi triturado em moinho de facas e colocado em balão de destilação adaptado ao extrator de Clevenger juntamente com 1 L de água destilada, permanecendo em aquecimento por 4 horas. O óleo foi recolhido em microtubo de 2 mL e armazenado em congelador até o momento de análise e a realização dos ensaios biológicos.

### **2.2 Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)**

Uma alíquota do óleo volátil foi solubilizada em hexano e submetida a análise em cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) em um conjunto Agilent 6850/Agilent 5975C equipado com coluna Agilent HP5-MS (30 m x 250 µm x 0,25 µm). O volume de injeção foi de 1 µL em modo splitless e hélio foi empregado como gás de arraste com fluxo de 1mL/min. A temperatura do injetor foi de 250 °C e o aquecimento da coluna obedeceu ao programa: 40



°C por 5 min, elevação de 3 °C/min até chegar em 160 °C, totalizando 45 minutos de corrida. Os espectros de massas foram detectados por impacto eletrônico em 70 eV em modo de aquisição em varredura completa variando entre 50 e 800 m/z e 2,66 varreduras s<sup>-1</sup>. A temperatura da fonte e do quadrupolo foram ajustadas para 230 °C e 150 °C, respectivamente.

A identificação dos componentes foi feita por comparação dos respectivos espectros de massas com os da biblioteca NIST (versão 2.0, 2008) e pelo cálculo do índice de retenção linear (IRL) conforme descrito por Viegas & Bassoli (2007). Para isso, 1 µL de uma mistura padrão de *n*-alcanos (Sigma-Aldrich C8-C20) foi injetado no sistema CG-EM, operando nas mesmas condições de análise dos óleos. Os tempos de retenção de cada homólogo foram usados como padrão externo de referência para o cálculo do IRL, juntamente com os tempos de retenção de cada composto de interesse. O IRL de cada componente foi calculado conforme a seguinte equação:  $IRL = 100 \times [((t_c - t_n)/(t_{n+1} - t_n)) + n]$ . Onde: IRL - índice de retenção linear;  $t_c$  - tempo de retenção do composto de interesse;  $t_n$  - tempo de retenção do hidrocarboneto anterior ao composto de interesse;  $t_{n+1}$  - tempo de retenção do hidrocarboneto posterior;  $n$  - número de carbonos do hidrocarboneto anterior.

Todos os valores de IRL obtidos foram comparados com os valores presentes em Adams (2007) e na literatura específica de óleos voláteis em *Conchocarpus* (Cabral et al. 2016). Para a identificação, foram consideradas as substâncias com porcentagem relativa no óleo volátil maior ou igual a 1% .

### **2.3 Ensaio antimicrobiano**

Esse ensaio foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Ivana Barbosa Suffredini e o doutorando Jefferson de Souza Silva, do Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade, NPBio, da Universidade Paulista – UNIP.

### **2.4 Preparo das amostras**

O óleo volátil da amostra de São Paulo foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO, Synth) em concentração de 40 mg/mL. Para o ensaio de microdiluição, o óleo volátil foi diluído seis vezes em razão ½, utilizando DMSO, obtendo as seguintes concentrações: 20mg/mL, 10mg/mL, 5mg/mL, 2,5mg/mL, 1,25mg/mL e 0,625mg/mL.

## **2.5 Microdiluição em caldo**

Para realizar o teste, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, seguindo o documento CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute* 2008). Inóculos foram preparados a partir de colônias cultivadas em meio ágar Mueller Hinton (MH) (Oxoid) para *Staphylococcus aureus* Rosenbach e *Escherichia coli* Castellani & Chalmers e em meio Sabouraud dextrose (SD) (Oxoid) para *Candida albicans* (C. P. Robin) Berkhout. As colônias foram suspensas em solução salina estéril, homogeneizadas e ajustadas por contagem para as concentrações utilizadas. Cada microrganismo foi testado quatro vezes em quatro concentrações,  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL,  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL,  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL e  $1,5 \times 10^2$  UFC/mL.

Utilizou-se diluição de 1:20 em meio caldo MH (para as bactérias) e SD (para levedura), ao qual foram adicionadas alíquotas de 10 µL das diluições do OV em 190 µL de meio, nos poços de microplacas de 96 poços (Costar), obtendo as concentrações finais por poço de 0,156 mg/mL a 5 mg/mL. Todos os testes foram realizados em duplicata. Depois de preenchidas, as microplacas foram incubadas a 36 °C por 24 h. Posteriormente, foram transferidos 2 µL de cada poço para placas de Petri contendo ágar MH e SD e realizou-se incubação a 36 °C por 24 h para verificação da presença de microrganismos viáveis nos meios líquidos tratados e consequente determinação da concentração bactericida mínima (CBM). Dois poços foram deixados como padrões, um negativo (só meio de cultura, sem inóculo) e um positivo (meio de cultura mais inóculo).

## **3 Resultados e Discussão**

### **3.1 Identificação dos compostos de óleo volátil**

Os picos cromatográficos foram identificados através do seu padrão de fragmentação e comparação com a biblioteca da NIST (versão 2.0, 2008) e pelo IRL (Adams, 2007) (Tabela 1). Na amostra de Cachoeiro do Itapemirim foram identificados 17 sesquiterpenos, sendo três oxigenados. Já na amostra de São Paulo foram identificados três hidrocarbonetos, seis monoterpenos e 10 sesquiterpenos.

Contrastando a composição química dos óleos voláteis dos dois pontos de coleta, hidrocarbonetos como heptano, *n*-octano e nonano e monoterpenos

**Tabela 1.** Porcentagem relativa dos compostos identificados no óleo volátil de *Conchocarpus macrocarpus* coletados no Espírito Santo e em São Paulo.

Substância	IRL	Coleta ES	Coleta SP
<b>MONOTERPENOS</b>			
1,3-xileno		-	11,04
Ciclogeraniolano	1307	-	1,65
Hemimeliteno	1356	-	1,58
Indano	1340	-	1,64
Metil-p-xileno	-	-	4,13
p-xileno	-	-	3,57
TOTAL		-	23,60
<b>SESQUITERPENOS</b>			
(+)-epi-biciclosesquifelandreno	1487	2,04	15,14
1,5-Cadinadieno	1523	1,70	-
Aromadendreno	1430	2,52	1,55
Azuleno	1498	0,95	-
Biciclogermacreno	1492	6,16	5,36
Cariofileno	1406	3,13	10,42
Copaeno	1366	6,22	3,67
β-Bourboneno	1374	1,00	-
Germacreno D	1470	14,00	-
Octahidronaftaleno	-	-	1,59
Óxido de cariofileno	1570	3,83	-
α-Cariofileno	1410	3,13	-
β-Cubebeno	1376	-	1,47
β-Elemeno	1380	13,09	5,03
δ-Cadineno	1513	4,53	1,77
δ-Elemeno	1327	5,06	2,71
TOTAL		67,36	45,17
<b>SESQUITERPENOS OXIGENADOS</b>			
α-Cadinol	1641	1,41	-
Espatulenol	1557	3,11	-
β-Selineno	1476	3,26	-
TOTAL		7,77	-
<b>HIDROCARBONETOS</b>			
Heptano	-	-	6,16
n-octano	-	-	6,52
Nonano	-	-	3,24
TOTAL		-	14,57
<b>NI</b>		3,24	13,13

IRL= índice de retenção linear. ES = Cachoeiro do Itapemirim/ES. SP = Fitotério do Departamento de Botânica - IBUSP

foram exclusivos da amostra de São Paulo, na qual (+)-epi-biciclosesquifelandreno (15,14%), 1,3-xileno (11,04%) e cariofileno (10,42%)

foram os compostos majoritários. Por outro lado, sesquiterpenos oxigenados, como  $\alpha$ -cadinol, espatulenol e  $\beta$ -selineno foram detectados apenas em na amostra do Espírito Santo, sendo germacreno D (14%),  $\beta$ -elemeno (13,09%) e copaeno (6,22%) encontrados em maior abundância. Os sesquiterpenos não oxigenados, que corresponderam a maioria dos compostos identificados, foram detectados na composição dos óleos voláteis dos indivíduos de ambos pontos de coleta.

Compostos presentes em óleos voláteis podem facilmente sofrer variações mesmo se forem obtidos a partir da mesma espécie, seja devido à influência da sazonalidade (Martins et al., 2019), do órgão vegetal analisado (Cabral et al., 2016), do ciclo fenológico (Mirjalili et al., 2006), ou de diferentes estágios de desenvolvimento do vegetal (Sefidkon et al. 2003). Além disso, Okoh et al. (2008) demonstraram que a obtenção de óleos voláteis a partir de folhas frescas ou secas também pode ocasionar diferenças na composição.

Em termos de diversidade de substâncias, comparando-se as duas amostras, foram detectados somente dois componentes a menos no OV obtido das folhas secas (Cachoeiro do Itapemirim – ES) em relação aquele obtido da amostra de folhas frescas (São Paulo). Alguns autores reportam que a secagem do material vegetal antes da obtenção de OV pode ocasionar uma redução de até 50% dos componentes (Raghavan et al. 1997; Fatemeh et al. 2006). No caso do presente estudo essa perda foi muito menor, assim como observado em outro estudo com plantas de alecrim (Ibanez et al. 1999).

Segundo Loughrin & Kasperbauer (2003), as mudanças dos compostos voláteis durante a secagem dependem de vários fatores ligados ao método de secagem, ou mesmo qual espécie está sendo analisada. Moyler (1994) sugere que os componentes dos OV que se perdem em amostras obtidas de material seco são principalmente aqueles armazenados na superfície das folhas ou próximos a ela. A principal diferença que pode ser observada em relação a composição dos OV de folhas secas e frescas nesse estudo, é a ausência de monoterpenos e hidrocarbonetos nas primeiras. Khangholi & Rezaeinodehi (2008) observaram uma correlação entre aumento da temperatura de secagem de amostras de *Artemisia annua* com a queda no conteúdo de monoterpenos.

A presença de espatulenol e  $\alpha$ -cadinol, detectados na amostra de Cachoeiro do Itaperim, já havia sido descrita nas folhas de *Conchocarpus fontanesianus* (Cabral et al. 2016). Biciclogermacreno e (+)-epi-biciclosesquifelandreno abundantes nos frutos de *Conchocarpus fontanesianus* (Cabral et al. 2016) foram detectados nas folhas das duas amostras de *C. macrocarpus* (Tabela 1).

Os compostos obtidos nas amostras de OV deste estudo são semelhantes aos encontrados nos óleos voláteis de espécies de *Esenbeckia* (Rutaceae), segundo uma revisão feita por Carvalho et al. (2021). Entretanto, uma grande diferença em termos de composição de OV é observada quando comparado com espécies de *Citrus*, gênero mais estudado pelo ponto de vista químico dentre as Rutaceae. Diferentemente de *Conchocarpus fontanesianus* (Cabral et al. 2012) ou de *C. macrocarpus*, analisado nesse estudo, em geral, os óleos voláteis de espécies de *Citrus* se caracterizam principalmente pela abundância de linalool e acetato de linalil nas folhas (Hojjati et al. 2017; Zareiyar et al. 2021) e da predominância de limoneno nas cascas (Gültepe et al. 2020; Hardjono et al. 2021).

### 3.2 Atividade antimicrobiana

O óleo volátil da amostra de São Paulo foi avaliado quanto seu potencial antimicrobiano.

Inicialmente, os microrganismos *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, em diferentes cargas, foram avaliados frente ao acréscimo do OV na concentração de 2 mg/mL (Tabela 2).

**Tabela 2.** Atividade antimicrobiana do óleo volátil de *Conchocarpus macrocarpus* frente a *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em diferentes concentrações de microrganismos.

Microrganismos	Concentração de microrganismos (UFC/mL)			
	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$
<i>C. albicans</i>	+	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	-	-	-

(+) = amostra não inibiu o crescimento de microrganismos, (-) = inibiu o crescimento de microrganismos.

O OV apresentou inibição do crescimento de *C. albicans* e *S. aureus* em todas as cargas de microrganismos testadas abaixo de  $10^5$  UFC/mL. Entretanto, não apresentou qualquer atividade sobre *E. coli*, mesmo na menor carga avaliada dessa bactéria ( $1,5 \times 10^2$  UFC/mL). Essa variação de inibição crescimento entre bactérias Gram-positiva (*S. aureus*) e Gram-negativa (*E. coli*) já foi observada por diversos autores (Chrysoula e Nychas 1995; Bosnić et al. 2006; Djihane et al. 2016; Semeniuc et al. 2016) e pode estar associada a maior complexidade da parede celular das bactérias Gram-negativa, como *E. coli*, permitindo uma menor permeabilidade ao composto testado (Breijyeh 2020).

Os dois microrganismos que sofreram a ação inibitória do OV foram novamente avaliados a fim de calcular concentração bactericida mínima (CBM) (Tabela 3) para diferentes cargas de microrganismos.

**Tabela 3.** Concentração bactericida mínima (CBM) do óleo volátil de *Conchocarpus macrocarpus* frente a *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* em diferentes concentrações de microrganismos.

Microrganismos	Concentração de microrganismos (UFC/mL)	
	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$
<i>C. albicans</i>	0,312	<0,156
<i>S. aureus</i>	X	2,5
<b>Padrões</b>		
CHX		<0,18
AmB		<0,15

Os valores na tabela se referem a menor concentração de extrato ou padrão (mg/mL) capaz de inibir o crescimento bactericida. (x) sem inibição do crescimento. Padrões apresentaram a mesma concentração de inibição nas duas cargas de microrganismos avaliadas. CHX = Clorexidina usada para *S. aureus* e AmB = Anfotericina B usada para *C. albicans*.

Viljoen et al. (2006) analisaram a atividade antimicrobiana dos OV de 17 espécies de *Agathosma* (Rutaceae), sendo observada, para a maioria das espécies, maior atividade frente a *C. albicans* (CBM: 3mg/mL) do que *S. aureus* (4mg/mL), com carga de microrganismo de  $10^5$  UFC/mL, resultado também encontrado no presente estudo. Como não foram avaliadas concentrações superiores à 2mg/mL do OV de *Conchocarpus macrocarpus*, não foi possível calcular a CBM para a carga microrganismo de  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL.

OV obtidos a partir de outras espécies de Rutaceae já foram reportados com uma boa ação antimicrobiana (CBM: <0,5 mg/mL) contra *C. albicans*, como, por exemplo, *Citrus aurantium* L. (Nidhi et al. 2020) e *Ruta graveolens* L. (Haddouchi et al. 2013). No caso do OV de *Zanthoxylum monogynum* St. Hill. essa inibição foi menos expressiva (CBM: 3 mg/mL) (Silva et al. 2017). O OV de *C. macrocarpus* apresentou uma boa atividade de inibição para os dois microrganismos testados, com CBM = 0,312 mg/mL na maior carga microbiana de *C. albicans* ( $1,5 \times 10^4$  UFC/mL) e CBM = 2,5 mg/mL para *S. aureus* em  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL.

Até onde vai nosso conhecimento, somente *C. fontanesianus* já foi previamente estudada quanto a composição do OV e suas potenciais atividades biológicas (Cabral et al. 2016), tendo sido observada boa atividade antifúngica, contra *Cladosporium cladosporioides*, associada a presença predominante de sesquiterpenos oxigenados nos OV de folhas.

Apesar da ausência de sesquiterpenos oxigenados no OV de *C. macrocarpus* coletado em SP, uma boa ação antimicrobiana foi observada. Esse fato pode ser explicado devido à presença de outros compostos que já foram descritos em literatura como potenciais agentes antimicrobianos, como aromadendreno encontrado no OV de *Eucalyptus globulus* Labill. (Mulyaningsih et al. 2010), biciclogermacreno como composto majoritário de espécies de *Origanum* (Tabanca et al. 2001), cariofileno presente no rizoma de *Zingiber nimmonii* J. Graham (Sabulal et al. 2006),  $\beta$ -elemeno no OV de *Nigella damascena* L. (Sieniawska et al. 2018), dentre outros.

Com base no exposto, foi verificado que há variação na composição dos OV nas amostras de *Conchocarpus macrocarpus* coletadas em Cachoeiro do Itapemirim e São Paulo, principalmente pela ausência de monoterpenos e hidrocarbonetos na primeira. Se essa variação está relacionada a localidade de coleta, ao processamento das amostras, ou a ambos é uma questão que necessita mais estudos. Biciclogermacreno, copaeno, germacreno D e  $\beta$ -elemeno são os componentes principais na amostra Cachoeiro do Itapemirim, enquanto 1,3-xileno, (+)-epi-biciclosesquifelandreno, cariofileno, n-octano e heptano são os majoritários na amostra de São Paulo. Além disso, o OV de *C.*

*macrocarpus* coletado em São Paulo apresentou boa atividade antimicrobiana (CBM = 0,312 mg/mL) na maior carga microbiana testada de *C. albicans* ( $1,5 \times 10^4$  UFC/mL).

Os dados apresentados neste capítulo são preliminares. Pretendemos realizar novas coletas de material vegetal em Cachoeiro do Itapemirim e em São Paulo e submetê-los ao mesmo procedimento de pré-extração. Com isso, a composição desses OV poderá ser comparada com maior segurança, assim como poderemos avaliar a atividade antimicrobiana para as duas amostras.



#### 4 Referências bibliográficas

- Adams RP (2007) 'Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy', Allured Publishing, Carol Stream.
- Ambrozini ARP, Vieira PC, Fernandes JB, da Silva MFGF, Albuquerque S (2008) Piranoflavonas inéditas e atividades tripanocidas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*. Quím. Nova [online]. v. 31, n. 4 [Acessado 12 Setembro 2021], pp. 740-743. Epub 16 Jun 2008. ISSN 1678-7064. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000400005>.
- Aromdee C, Anorach R, Sriubolmas N (2005) Essential oil of the flower *Azadirachta indica* (Meliaceae). Acta Hort. (679), 11–14. doi:10.17660/ActaHortic.2005.679.1
- Azhdarzadeh F, Hojjati M (2016) Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. Nutr. Food Sci. Res. 3, 43–50. <http://dx.doi.org/10.18869/acadpub.nfsr.3.1.43>
- Belleite BS, Sa ICG, Mafezoli J, Cerqueira CN, Silva MFGF, Fernandes JB, Vieira PC, Zukerman-Schpector J, Pirani JR (2012) Fitoquímica e quimiosistemática de *Conchocarpus marginatus* e *C. inopinatus* (Rutaceae). Quím. Nova 35:2132–2138. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001100006>
- Boelens MH, Jimenez R (1988) Essential oils from Seville bitter orange (*Citrus aurantium* L. ssp. amara). In: Lawrence, B.M., Mookherjee, B.D. and Willis, B.J. (eds.) Flavors and fragrances: A world perspective. Proc. 10th Inter. Congr. Essential oils, Fragrances and flavours. Washington, DC, USA. Elsevier science publishers B.V., Amsterdam, 551-565.

- Boelens MH, Jimenez R (1989) The chemical composition of the peel oils from unripe and ripe fruits of bitter orange, *Citrus aurantium* L. ssp. amara Engl. Flavour Fragr J. 4: 139-142.
- Bosnić T, Softić D, Grujić-Vasić J (2006) Antimicrobial activity of some essential oils and major constituents of essential oils. Acta Med Acad 35, pp. 19-22
- Boussaada O, Chemli R (2007) Seasonal Variation of Essential Oil Composition of *Citrus Aurantium* L. var. amara. J. Essent. Oil-Bear. Plants 10(2), 109–120. doi:10.1080/0972060X.2007.10643528
- Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R (2020) Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. Molecules 25(6), 1340–. doi:10.3390/molecules25061340
- Brophy JJ, Goldsack RJ, Forster PI (2001) The leaf oils of the Australian species of *Citrus*. J. Essential Oil Res. 13 (4): 264-268
- Burits M, Asres K, Buclar F (2001) The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*. Phytother. Res. 15, 103–108.
- Cabral RS, Sartori MC, Cordeiro I, Queiroga CL, Eberlin MN, Lago JHG, Moreno PRH, Young MCM (2012) Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from stems of *Conchocarpus fontanesianus*. Rev Bras Farmacogn 22:374–380. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000219>
- Cabral RS, Suffredini IB, Young MC (2016) Chemical Composition and in vitro Biological Activities of Essential Oils from *Conchocarpus fontanesianus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani (Rutaceae). Chem. Biodivers. doi:10.1002/cbdv.201600036
- Campbell WE, Gammon DW, Smith P, Abrahams M, Purves TD (1997) Composition and antimalarial activity in vitro of the essential oil of *Tetradenia riparia*. Planta Med. 63, 270-272.

- Carvalho JCS, Pirani JR, Ferreira MJP (2021) *Esenbeckia* (Pilocarpinae, Rutaceae): chemical constituents and biological activities. *Braz. J. Bot.* <https://doi.org/10.1007/s40415-021-00747-3>
- CLSI (2008) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fung; Approved Standard – Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute
- Cortez LER, Cortez DAG, Fernandes JB, Vieira PC, Ferreira AG, Silva MFGF (2009) New alkaloids from *Conchocarpus gaudichaudianus*. *Heterocycles* 78:1–7
- Djihane B, Wafa N, Elkhamssa S, Haro JP; Esteban MA; Mouhamed MZ. (2016) Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. *Saudi Pharm J.* S131901641630130X–. doi:10.1016/j.jsps.2016.11.001
- Dugo G, Verzera A, D'alcontres HS, Cotroneo A, Ficarra R (1993) On the Genuineness of Citrus Essential oils. Part XLI. Italian Bitter orange Essential Oil : Composition and detection of contamination and additions of oils and terpenes of sweet orange and lemon. *Flavour Fragr. J.* 8: 25-33.
- Dugo G, Mondello L, Cotroneo A, D'Alcontres I. S, Basile A, Previti P, Dugo P, Bartle KD (1996) Characterization of Italian *Citrus* petitgrain oils. *Perfum. Flavor.* 21 (33): 17-28
- Esfahani RE, Moradi P (2017) Experimental Paper. The effect of different development stages on the quantity and quality of the essential oil of *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle in Iran. *Herba Pol* 63:32–42.
- Farahmandfar R, Tirgarian B, Dehghan B. et al (2020) Comparison of different drying methods on bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel waste: changes in physical (density and color) and essential oil (yield, composition, antioxidant and antibacterial) properties of powders. *J.*

Food Meas. Charact 14, 862–875. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00334-x>

Fatemeh S, Khadijeh A, Gholamreza BK (2006) Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. Food Chem 99: 19-23.

França Orlanda JF, Nascimento AR (2015) Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil. S. Afr. J. Bot 99(), 103–106. doi:10.1016/j.sajb.2015.03.198

Graven EH, Deans SG, Svoboda KP, Mavi S, Gundidza MG (1992) Antimicrobial and antioxidative properties of the volatile (essential) oil of *Artemisia afra* Jacq. Flavour Fragr J 7, 121–123.

Groppo M, Lemos LJC, Ferreira PL, Ferreira C, Bruniera CP, Castro NM, Pirani JR, El Ottra JHL, Kallunki JA (2021) A tree nymph of the Brazilian Atlantic Forest: *Dryades* (Galipeinae, Rutaceae), a new neotropical genus segregated from *Conchocarpus*. Mol Phylogenet Evol 154:106971. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106971>

Gültepe N (2020) Protective effect of d-limonene derived from orange peel essential oil against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout. Aquac. Rep. 18:100417. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100417>

Gundidza M (1993) Antifungal activity of the essential oil from *Artemisia afra* Jacq. Cent Afr J Med. 39, 140–142

Haddouchi F, Chaouche TM, Zaouali YK, Riadh AA, Benmansour A (2013) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. Food Chem. 141(1), 253–258. doi:10.1016/j.foodchem.2013.03.007

Hardjono H, Dewi EN, Lusiani CE, Febriansyah I, Bachtiar RI: D-limonene from orange (*Citrus Maxima*) peel extraction as destructive agent of styrofoam waste. IOP Conf Ser: Mater Sci Eng. 2021; 1073:012013. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1073/1/012013>

- Haubruge E, Lognay G, Marlier M, Danhier P, Gilson JC, Gaspar CH (1989) Etude de la toxicité de cinq huiles essentielles extraites de Citrus sp. A l'égard de *Sitophilus zeamais* Motsch. (Col. urculionidae), *Prostephanus truncatus* Horn. (Col. Bostrychnidae) et *Tribolium castaneum* Herbst (Col. Tenebrionidae). Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent 54/3b, 1083-1091.
- Hojjati M, Barzegar H (2017) Chemical Composition and Biological Activities of Lemon (*Citrus limon*) Leaf Essential Oil. Nutr Food Sci Res. 4 (4) :15-24. <http://dx.doi.org/10.29252/nfsr.4.4.3>
- Hossein Mirjalili M, Salehi P, Sonboli A. et al (2006) Essential oil variation of *Salvia officinalis* aerial parts during its phenological cycle. *Chem Nat Compd* 42, 19–23. <https://doi.org/10.1007/s10600-006-0027-4>
- Huet R (1991) Les huiles essentielles d' agrumes. *Fruits*. 46: 551
- Ibanez E, Oca A, de Murga G, Sebastian LS, Tabera J, Reglero G (1999) Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants. *J. Agric. Food. Chem.* 47: 1400-1404
- Kambouche N, Merah B, Bellahouel S, Bouayed J, Dicko A, Derdour A, Younos C, Soulimani R (2008) Chemical Composition and Antioxidant Potential of *Ruta montana* L. Essential Oil from Algeria. *J. Med. Food. Sep* 593-595. <http://doi.org/10.1089/jmf.2007.0515>
- Kamkaen N, Wilkinson J, Ruangrunsi N (2008) Chemical compositions and antibacterial activities of essential oil from the family Rutaceae. *IJEOT: exploring the bioactivity of aromatic plants*, 2(4), 158-162.
- Khangholi S, Rezaeinodehi A (2008) Effect of drying temperature on essential oil content and composition of sweet wormwood (*Artemisia annua*) growing wild in Iran. *Pak. J. Biol. Sci.* 11, pp. 934-93
- Lee SE, Shin HT, Hwang HJ, Kim JH (2003) Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumadai* seed. *Phytother. Res.* 17, 1041–1047.

- Lin ZK, Hua F, Gu YH (1986) The chemical constituents of the essential oil from the flowers, leaves and peels of *Citrus aurantium*. Act. Bot. Sinica. 28 (6): 641-645.
- Lopes NP, Kato MJ, Andrade EH, Maia JG, Yoshida M, Planchart AA, Katzin A (1999) Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Viola surinamensis* (Rot.) Warb. by Waiapi Amazon Indians. J. Ethnopharmacol. 67, 313-319.
- Loughrin JH, Kasperbauer MJ (2003) Aroma Content of Fresh Basil (*Ocimum basilicum* L. Leaves as Affected by Light Reflected from Colored Mulches. J. Agric. Food. Chem. 51: 2272-2276.
- Macleod AJ, Macleod G, Subramanian G (1988) Volatile aroma constituents of orange. Phytochemistry. 27(7): 2185-2188.
- Mafezoli J, Vieira PC, Fernandes JB, da Silva MFGF, de Albuquerque S (2000) In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. J Ethnopharmacol 73:335–340. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00315-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00315-9)
- Mafezoli J (2001) *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil.
- Mondello L, Dugo G, Dugo P, Bartle KD (1996) Italian *Citrus* petitgrain oils. Part I. Composition of bitter orange petitgrain oil. J. Essential oil Res. 8: 597
- Moyler DA (1994) Spices – recent advances in Charalambous (Ed.), Spices, herbs and edible fungi, Amsterdam: Elsevier., pp. 1-70.
- Mulyaningsih S, Sporer F, Zimmermann S Jürgen R, Wink M (2010) Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. Phytomedicine 17(13), 1061–1066. doi:10.1016/j.phymed.2010.06.018

- Nidhi P, Rolta R, Kumar V, Dev K; Sourirajan A (2020) Synergistic potential of *Citrus aurantium* L. essential oil with antibiotics against *Candida albicans*. J. Ethnopharmacol. 113135–.doi:10.1016/j.jep.2020.113135
- Rabe T, van Staden J (1997) Antibacterial activity of South African plant used for medicinal purposes. J. Ethnopharmacol. 56, 81–87.
- Raghavan B, Rao L, Singh M, Abraham K (1997) Effect of drying methods on the flavour quality of marjoram (*Origanum majorana* L.), Nahrung 41(3): 159- 61.
- Sabulal B, Dan M, J AJ, Kurup R, Pradeep NS, Valsamma RK, George V (2006) Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. Phytochemistry. Nov;67(22):2469-73. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.08.003. Epub 2006 Sep 14. PMID: 16973189.
- Sefidkon F, Kalvandi R, Mirza M (2003) Chemical variation of the essential oil of *Nepeta heliotropifolia* in different stage of plant growth. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 19(3):255-267. Available from: <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=120103> .\_\_ Accessed 28 Sep 2021
- Semeniuc CA, Pop CR, Rotar AM (2016) Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. J. Food Drug Anal. S1021949816300801– . doi:10.1016/j.jfda.2016.06.002
- Sevindik E, Aydın S, Sujka M. *et al* (2021) GC-MS Analysis and Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils Extracted From Fruit Peel of *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) Grown in the West Anatolian Area. *Erwerbs-Obstbau* **63**, 135–142. <https://doi.org/10.1007/s10341-021-00549-7>
- Sieniawska E, Sawicki R, Golus J, Swatko-Ossor M, Ginalska G, Skalicka-Wozniak K (2018) *Nigella damascena* L. Essential Oil—A Valuable Source of  $\beta$ -Elemene for Antimicrobial Testing. *Molecules*. 23(2):256. <https://doi.org/10.3390/molecules23020256>

- Silva F, Santos N, Pascon R, Vallim M, Figueiredo C, Martins R, Sartorelli, P (2017) Chemical Composition and In Vitro Cytotoxic and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from Leaves of *Zanthoxylum monogynum* St. Hill (Rutaceae). *Medicines*, 4(2), 31–. doi:10.3390/medicines4020031
- Silva FFA, Fernandes CC, Oliveira GA; Candido ACBB, Magalhães LG, Vieira TM, Crotti AEM, Silva Claudinei A, Miranda MLD (2020) In vitro antileishmanial and antioxidant activities of essential oils from different parts of *Murraya paniculata* (L.) Jack: a species of Rutaceae that occur in the Cerrado biome in Brazil. *Aust. J. Crop Sci.* (14(02):2020), 347–353. doi:10.21475/ajcs.20.14.02.p1966
- Silveira ER, Roma LP, Pirani JR, Santos DYAC (2021) Contrasting leaf cuticular wax composition of *Conchocarpus* and *Dryades* species (Rutaceae) from the Atlantic Forest and “Restinga”. *Braz. J. Bot.* <https://doi.org/10.1007/s40415-021-00743-7>
- Tabanca N, Demirci F, Ozek T. et al (2001) Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Origanum x dolichosiphon* P. H. Davis. *Chem. Nat. Compd.* 37, 238–241. <https://doi.org/10.1023/A:1012513922871>
- Tassou CC, Nychas GJE (1995) Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. chia) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in Model Food System. *Int Biodeterior Biodegradation* 36(3-4), 411–420. doi:10.1016/0964-8305(95)00103-4
- Viegas MC, Bassoli DG (2007) Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. *Quím. Nova*, 30(8), 2031–2034. doi:10.1590/S0100-40422007000800040
- Viljoen AM, Moolia A, Van VSF, Van ZRL, Başer KHC, Demirci, Özek T, Trinder-Smith TH (2006) The Biological Activity and Essential Oil Composition



of 17 *Agathosma* (Rutaceae) Species. J. Essent. Oil Res. 18(sup1), 2–16. doi:10.1080/10412905.2006.12067112

Youwen Gong, Yongfu Huang, Ligang Zhou, Xueyan Shi, Zejian Guo, Mingan Wang & Weibo Jiang (2009) Chemical Composition and Antifungal Activity of the Fruit Oil of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. (Rutaceae) from China, J. Essent. Oil Res. 21:2, 174-178, DOI: 10.1080/10412905.2009.9700141

Zareiyan F, Khajehsharifi H (2021) Analyzing Bioactive Compounds in Essential Oil of *Citrus maxima* and *Citrus sinensis* Peel. J. Essent. Oil-Bear. Plants. 1–6.

## *Considerações finais*

---



---

## Considerações finais

---

Rutaceae desperta o interesse em pesquisadores de produtos naturais por ser uma família com grande importância econômica e conhecida por sua diversidade química e complexidade estrutural de seus constituintes. *Conchocarpus* é um dos 150 gêneros pertencentes a Rutaceae, subfamília Rutoideae, sendo o maior gênero dentro da subtribo Galipeinae. Entretanto poucas espécies foram investigadas até o momento em relação a composição química e atividades biológicas.

A investigação do metabolismo secundário de *Conchocarpus macrocarpus* permitiu a identificação de uma diversidade de substâncias, desde fitoesteróides como estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol e sitostenona; alceno como docosano, N-metil-prolina, alcaloides furanoquinolínicos como esquimiamina e dutadrupina, além da sugestão de alcaloides quinolínicos e acridínico. Flavonoides do tipo flavonas também foram identificados, como isovitexina-2-O-ramnosideo, isovitexina 2''-O-arabinosideo, vitexina e saporanina e amidas como feruloil putrescina, feruloil agmatina e *p*-coumaroil agmatina. As fases de partição e frações onde estão presente os compostos mencionados foram ensaiadas frente algumas atividades biológicas, sendo os alcaloides relacionados a uma boa atividade antimicrobiana e os flavonoides a uma atividade antioxidante *in vitro* satisfatória. O isolamento de algumas algumas substâncias, em especial os alcaloides que não puderam ser identificados será realizado para que seja possível a análise por RMN. Pensamos também em submeter as substâncias isoladas aos bioensaios específicos.

Este estudo também contribui com a caracterização química e atividade antimicrobiana dos óleos voláteis (OV) dessa espécie. Até o momento, somente uma espécie, *Conchocarpus fontanesianus*, havia sido investigada quanto ao perfil dos OV e potenciais atividades biológicas. Nossos dados mostram diferença

no perfil de OV em amostras provenientes de localidades diferentes, evidenciadas pela presença exclusiva de hidrocarbonetos nas folhas frescas da amostra de São Paulo e sesquiterpenos oxigenados nas folhas secas coletadas no Espírito Santo. A real contribuição do local de coleta e/ou do tratamento diferencial das folhas antes da extração nessa diferença necessita de investigações adicionais. O óleo volátil da amostra de SP apresentou bom resultado contra *Candida albicans* (CBM = 0,312mg/mL) para a carga de microrganismos de  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL.

De forma geral, acreditamos que os dados reportados e discutidos neste trabalho contribuem com um maior conhecimento da biodiversidade brasileira, abrindo portas para investigações futuras.

*Resumo Geral e Abstract*

---



---

## Resumo Geral

---

*Conchocarpus* é o maior gênero na subtribo Galipeinae, tribo Galipeae (Rutaceae), com 47 espécies distribuídas predominantemente em regiões neotropicais, sendo a maioria endêmica do Brasil. Apesar de diverso, pouco se conhece a respeito de sua constituição química, assim como seu potencial biológico. Dentre as 47 espécies, apenas sete já foram investigadas em estudos fitoquímicos, tendo sido relatados alcaloides do tipo furoquinolínicos e quinolínicos, flavonoides, cumarinas, entre outros metabólitos. Diversas atividades biológicas também já foram associadas a essas espécies, entre elas, antioxidante, anticolinesterásica e antiproliferativa. Dessa forma, reconhecendo-se a importância econômica de Rutaceae, assim como os dados já relatados para *Conchocarpus*, o principal intuito deste trabalho foi analisar a composição química e o potencial biológico dos extratos etanólicos foliar e caulinar de *Conchocarpus macrocarpus*, espécie endêmica do Brasil. Nas fases de partição foliares e caulinares mais apolares (hexano e diclorometano), analisadas em cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), foi reportado a presença de N-metil-prolina, docosano, estigmasterol, sitostenona em todas as amostras analisadas, além de um alcaloide acridínico não identificado. Além disso, coniferol e os alcaloides furanoquinolínicos esquimiamina e dutadrupina também foram encontrados nessas fases de partição apolares. O fitoesteroide  $\beta$ -sitosterol está presente apenas na fase de partição hexânica do caule. Posteriormente, as fases de partição em diclorometano, hexano e butanol obtidas do extrato foliar foram analisadas em CLAE-DAD acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução. Os espectros de massas obtidos foram utilizados para criação de redes moleculares pelo GNPS (*The Global Natural Product Social Molecular Networking*). Com isso, na fase butanólica foi possível a sugestão de identificação das flavonas isovitexina-2"-O-ramnosídeo, isovitexina 2"-O-arabinosídeo, vitexina e saporanina e das amidas feruloil putrescina, feruloil

agmatina e *p*-coumaroil agmatina, além de alcaloides quinolínicos nas fases de partição mais apolares, semelhantes a cloroaustralasinas. Os componentes de óleos voláteis, obtidos a partir de *Conchocarpus macrocarpus* coletado em Cachoeiro do Itapemirim (ES) e São Paulo (SP) também foram analisados, sendo essas amostras diferenciadas pela presença exclusiva de hidrocarbonetos nas folhas frescas da amostra de São Paulo e sesquiterpenos oxigenados nas folhas secas coletadas no Espírito Santo. O extrato bruto e fases de partição foram avaliadas quanto ao potencial antioxidante *in vitro*, antiproliferativo e antiacetilcolinesterásico. Posteriormente, as amostras e frações mais ativas foram submetidas a bioensaios específicos: antimicrobiano e antioxidante *in vivo* e *in vitro*. As frações polares foram mais promissoras quanto a atividade antioxidante *in vitro*, especialmente a fração Fo-BuOH G2.1 com valores de  $1238,1 \pm 6,4$   $\mu\text{mol/g}$  equivalente a Trolox e  $945,3 \pm 12,5$   $\mu\text{mol/g}$  equivalente a ácido gálico, nos ensaios DPPH e Folin-Ciocalteu, respectivamente. Entretanto, nenhuma amostra apresentou resultados significativos na proteção de células RAW a ação oxidativa do peróxido de hidrogênio no ensaio *in vivo*. Além disso, flavonas presente na amostra Fo-BuOH G2.1 foram relacionadas a inibição de *Candida albicans* com CIM = 1,25 mg/mL na maior carga microbiana ( $1,5 \times 10^5$  UFC/mL), enquanto alcaloides presentes na amostra Fo-DCM G5 foram associados a efetiva inibição de *Staphylococcus aureus*, com CIM = 0,312 mg/mL nas duas maiores cargas de microrganismos testadas ( $1,5 \times 10^5$  e  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL). Em relação aos óleos voláteis, uma forte atividade antimicrobiana foi encontrada contra *Candida albicans* (CIM = 0,312mg/mL) para a carga de microrganismos de  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL e uma atividade fraca contra *Staphylococcus aureus* (CIM = 2,5 mg/mL) para a carga de  $1,5 \times 10^3$  UFC/mL. Os ensaios de inibição de acetilcolinesterase e antiproliferativo não apresentaram resultados promissores associados aos compostos majoritários. Por fim, esperamos que este estudo possa estimular mais trabalhos investigativos quanto a diversidade química de espécies de *Conchocarpus* e suas atividades biológicas.

**Palavras-Chave:** Antioxidante, antimicrobiano, composição química, Sapindales



## Abstract

---

*Conchocarpus* is the largest genus in the Galipeinae subtribe, tribe Galipeeae (Rutaceae), with 47 species distributed predominantly in neotropical regions, most of them endemic to Brazil. Despite the great diversity, little is known about its chemical composition, as well as its biological potential. Among the 47 species, only seven have been investigated in phytochemical studies, being reported mainly furoquinolinic and quinolic alkaloids, flavonoids, coumarins, among other metabolites. Several biological activities have also been associated with these species, including antioxidant, anticholinesterase and antiproliferative. Thus, recognizing the economic importance of Rutaceae, as well as the data already reported for *Conchocarpus*, the main purpose of this work was to analyze the chemical composition and biological activities of the leaf and stem ethanolic extracts of *Conchocarpus macrocarpus*, an endemic species in Brazil. In the more apolar leaf and stem partition phases (hexane and dichloromethane), analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), the presence of N-methyl-proline, docosan, stigmaterol, sitostenone was reported in all analyzed samples, in addition to an unidentified acridine alkaloid. Furthermore, coniferol and the furanoquinoline alkaloids skimiamine and dutadrupin were also found in these nonpolar partition phases. The phytosteroid  $\beta$ -sitosterol was found only in the stem hexane partition phase. Subsequently, the partition phases in dichloromethane, hexane and butanol obtained from the leaf extract were analyzed using HPLC-DAD coupled to a high resolution mass spectrometer. The mass spectra obtained were used to create a molecular networks using GNPS (*The Global Natural Product Social Molecular Networking*). Thus, in the butanolic phase, it was possible to suggest the identification of the flavones isovitexin-2"-O-rhamnoside, isovitexin 2"-O-arabinoside, vitexin and saporanin and the amides feruloyl putrescine, feruloyl agmatine and *p*-coumaroyl agmatine, in addition to quinoline alkaloids in the more apolar partition phases,

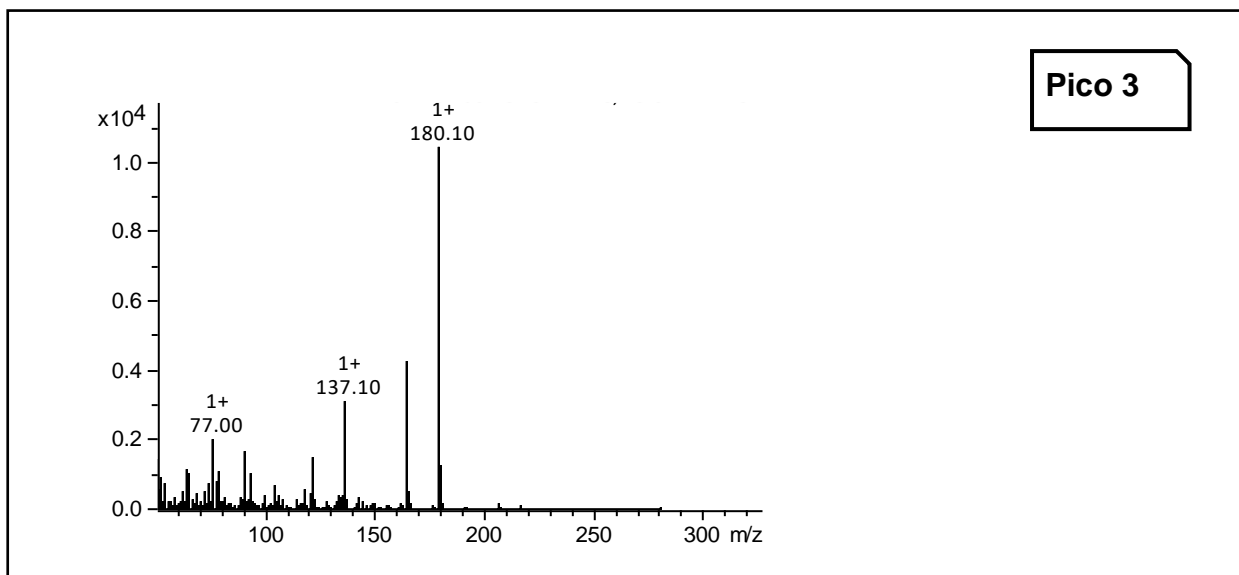
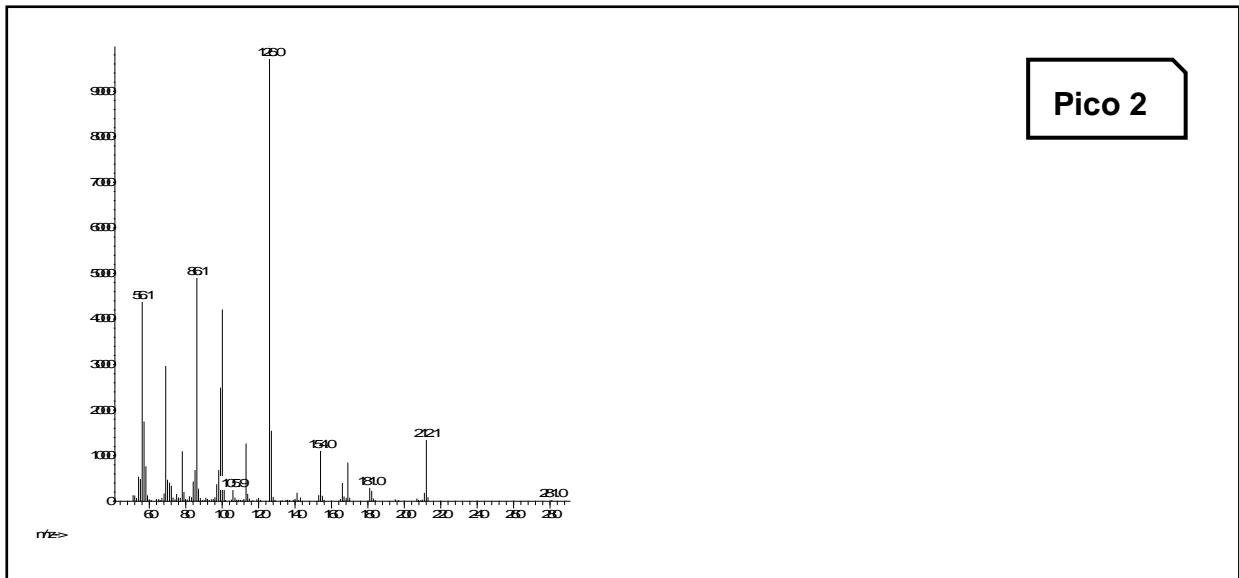
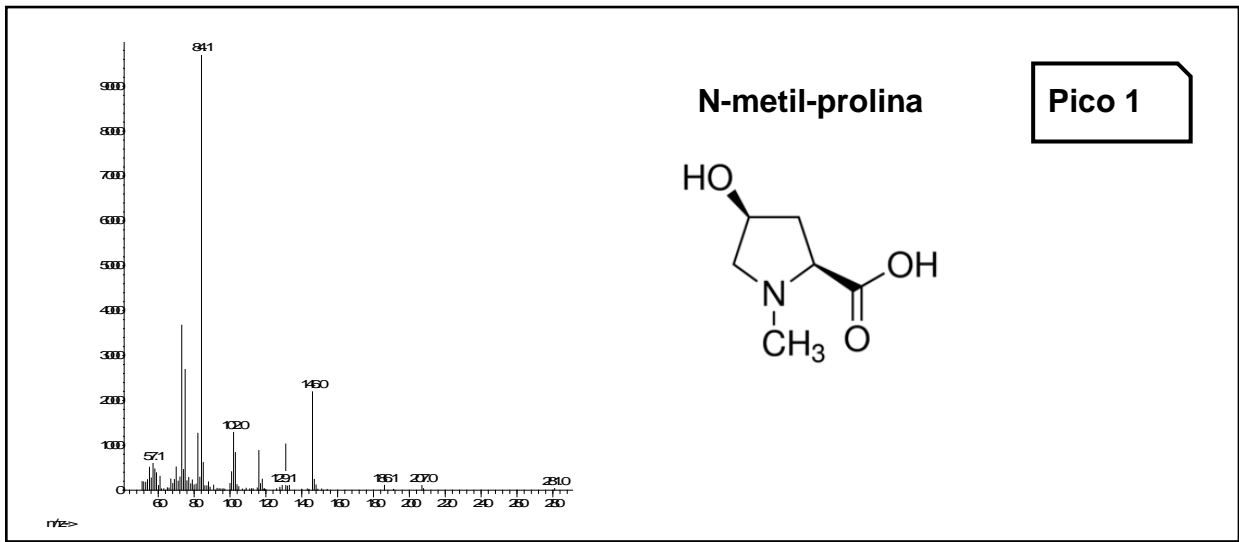


similar to chloroaustralasines. The volatile oil components obtained from *Conchocarpus macrocarpus* collected in Cachoeiro do Itapemirim (ES) and São Paulo (SP) were also analyzed, and these samples being differentiated mainly by the exclusive presence of hydrocarbons in the fresh leaves of the São Paulo sample and oxygenated sesquiterpenes in dried leaves from specimens of Espírito Santo. The crude extract and partition phases were evaluated for *in vitro* antioxidant, antiproliferative and antiacetylcholinesterase potential. Subsequently, the most active samples and fractions were submitted to specific bioassays: antimicrobial and antioxidant *in vivo* and *in vitro*. The polar fractions were more promising for *in vitro* antioxidant activity, especially the Fo-BuOH G2.1 fraction with values of  $1238.1 \pm 6.4$   $\mu\text{mol/g}$  equivalent to Trolox and  $945.3 \pm 12.5$   $\mu\text{mol/g}$  equivalent to Gallic acid, in the DPPH and Folin-Ciocalteu assays, respectively. However, any of the analysed samples showed significant results in protecting RAW cells from the oxidative action of hydrogen peroxide in the *in vivo* assay. Furthermore, flavones present in the Fo-BuOH G2.1 sample were related to inhibition of *Candida albicans* with MIC = 1.25 mg/mL at the highest microbial load ( $1.5 \times 10^5$  CFU/mL), while alkaloids present in the Fo-DCM G5 were associated with effective inhibition of *Staphylococcus aureus*, with MIC = 0.312 mg/mL in the two highest loads of microorganisms measured ( $1.5 \times 10^5$  and  $1.5 \times 10^4$  CFU/mL). Regarding essential oils, a strong antimicrobial activity was found against *Candida albicans* (MIC = 0.312mg/mL) for the microorganism load of  $1.5 \times 10^4$  CFU/mL and only a weak activity against *Staphylococcus aureus* (MIC = 2.5 mg/mL) for a load of  $1.5 \times 10^3$  CFU/mL. Acetylcholinesterase and antiproliferative inhibition assays did not show promising results associated with the major compounds. Finally, we hope that this study could stimulate more investigative work concerning the chemical diversity of *Conchocarpus species* and their biological activities.

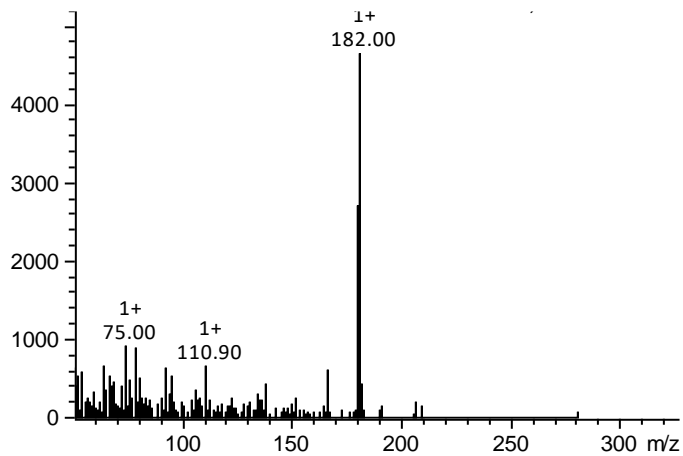
**Key-Words:** Antioxidant, antimicrobial, chemical composition, Sapindales

*APÊNDICE A*

---

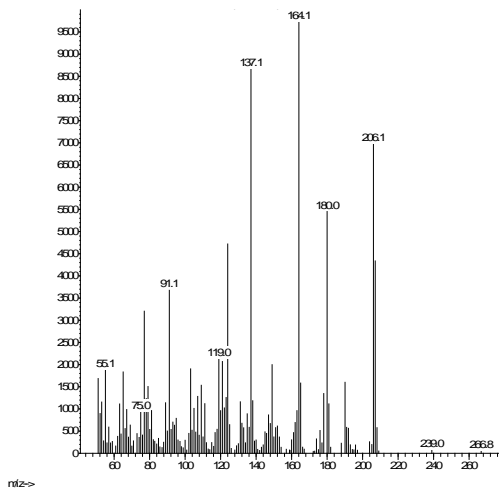
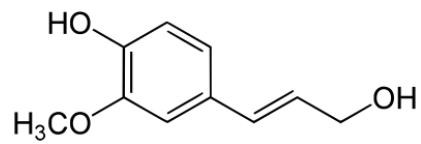


Pico 4

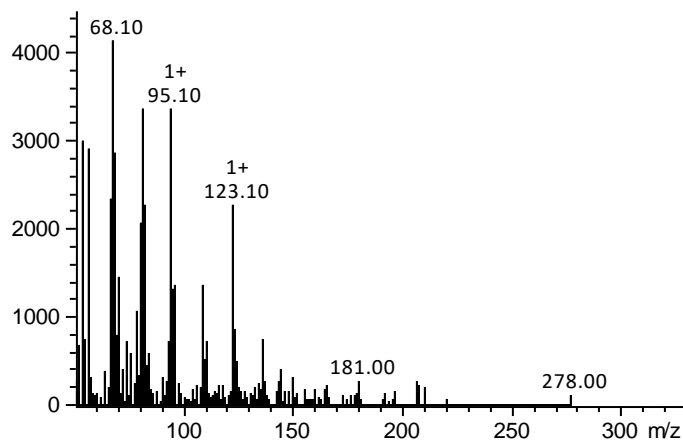


Pico 5

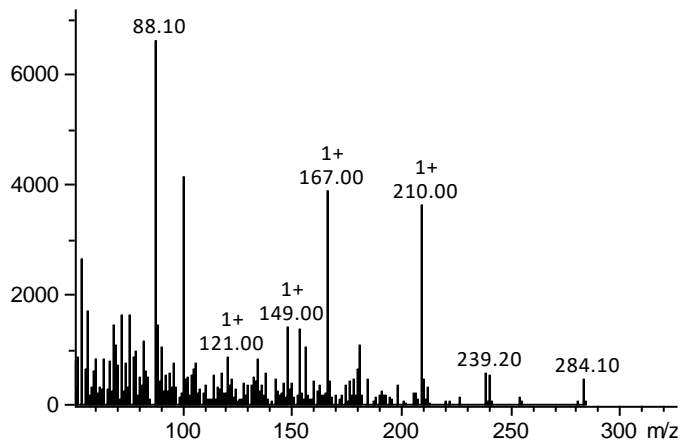
Coniferol



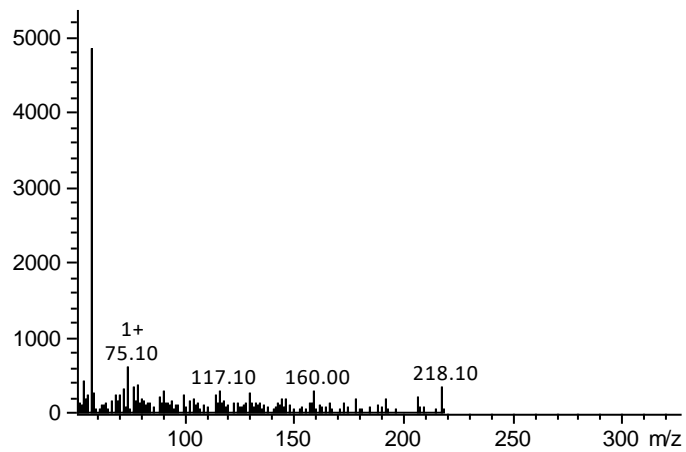
Pico 6



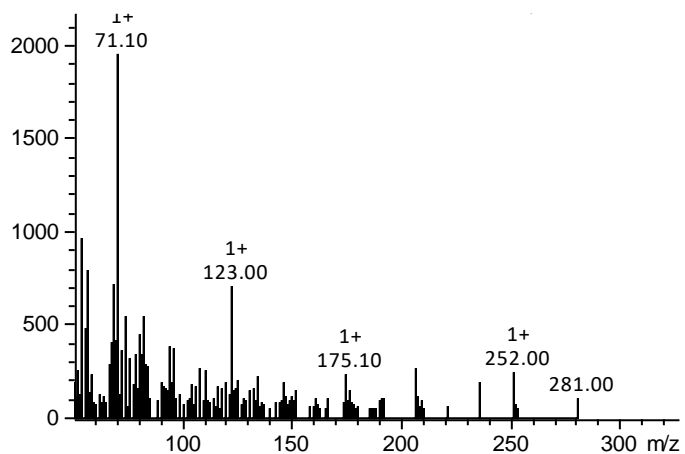
**Pico 7**

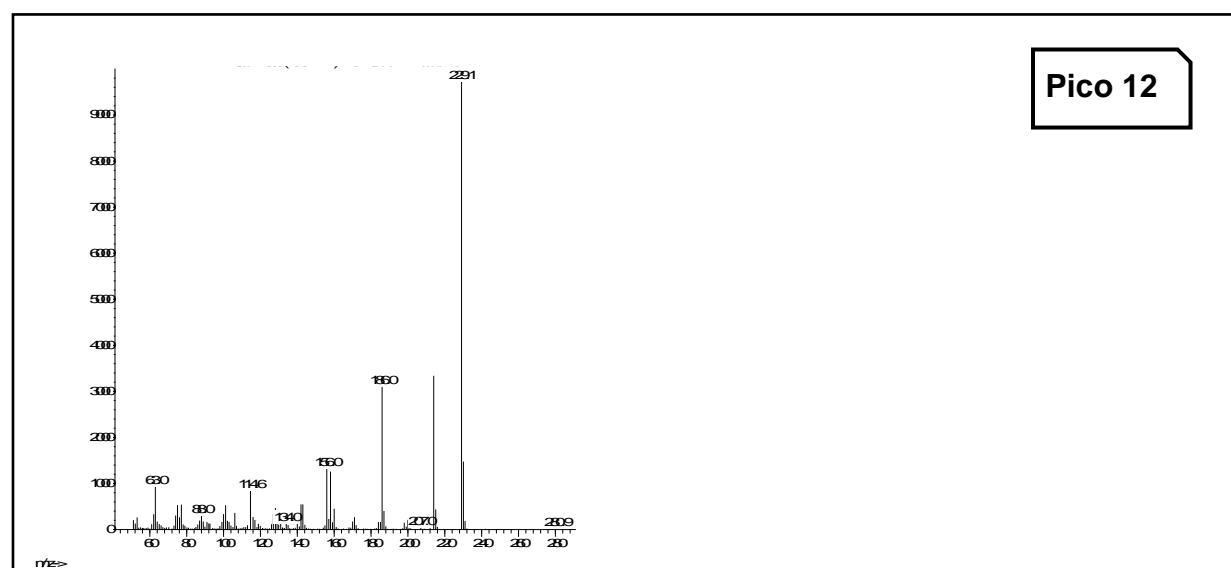
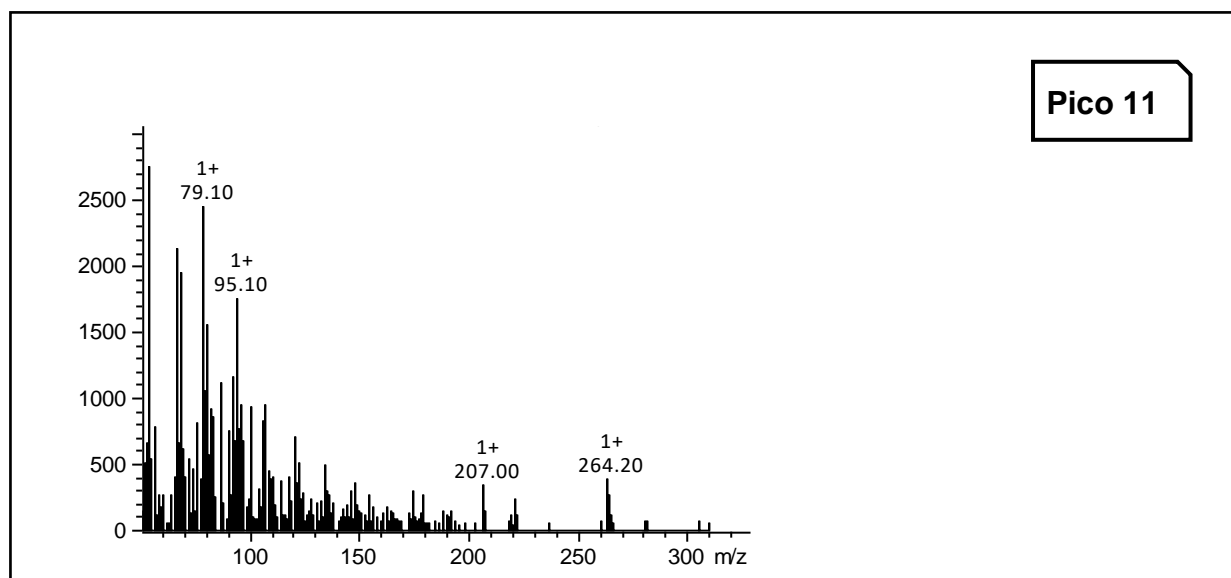
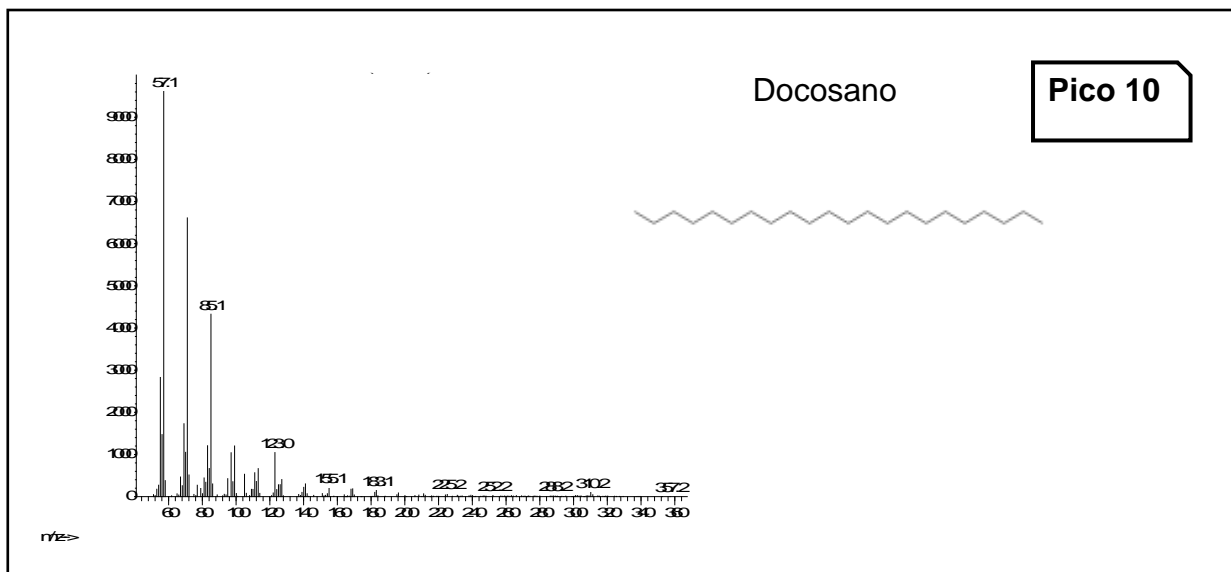


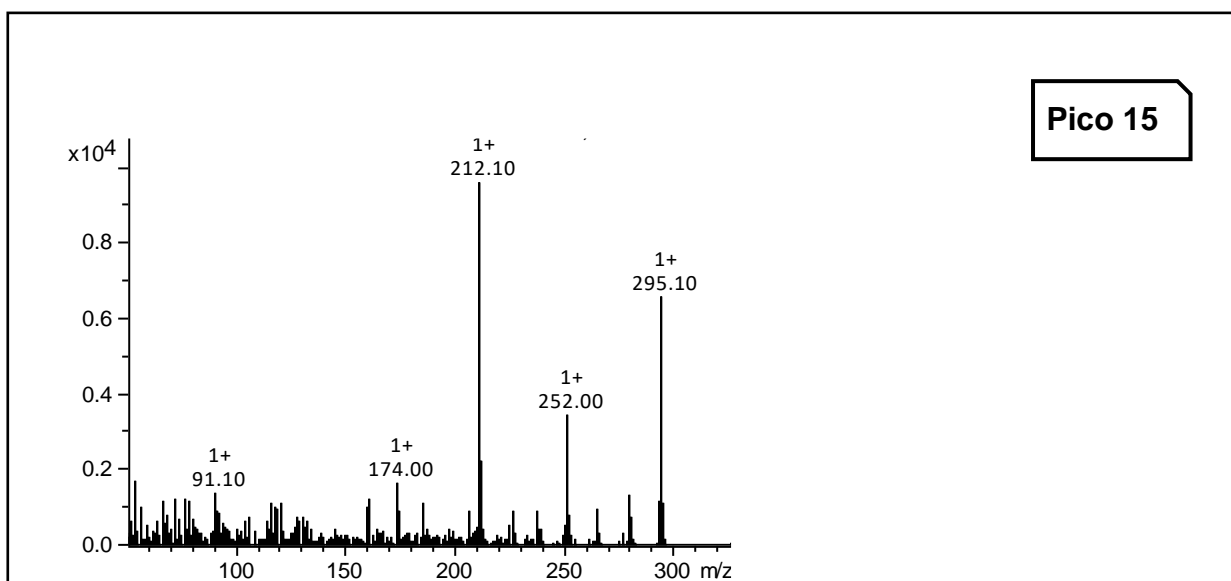
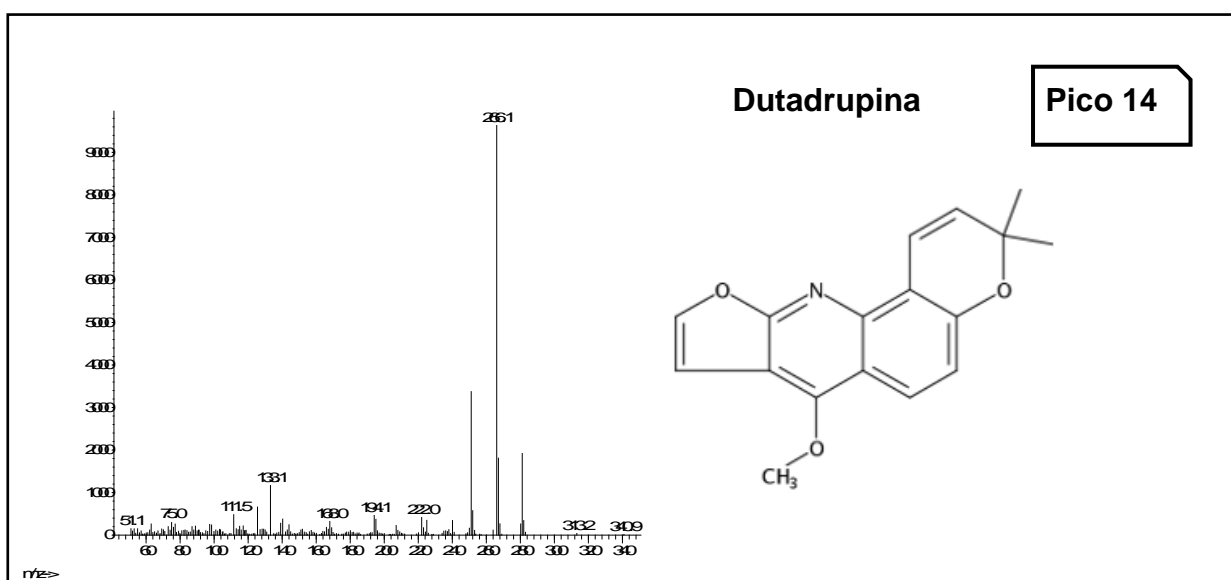
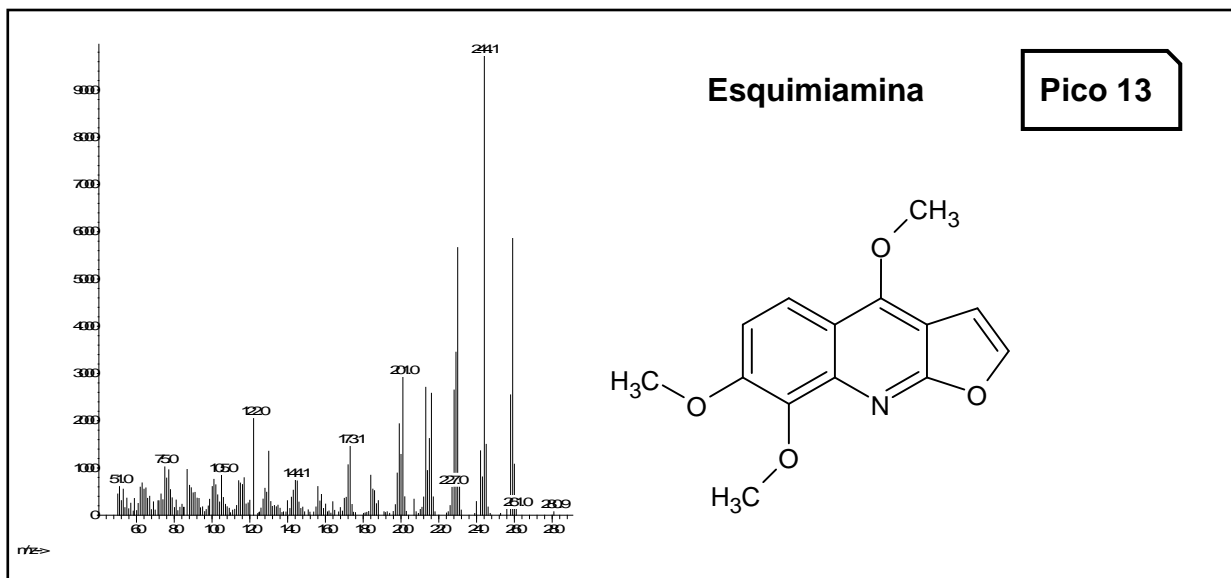
**Pico 8**

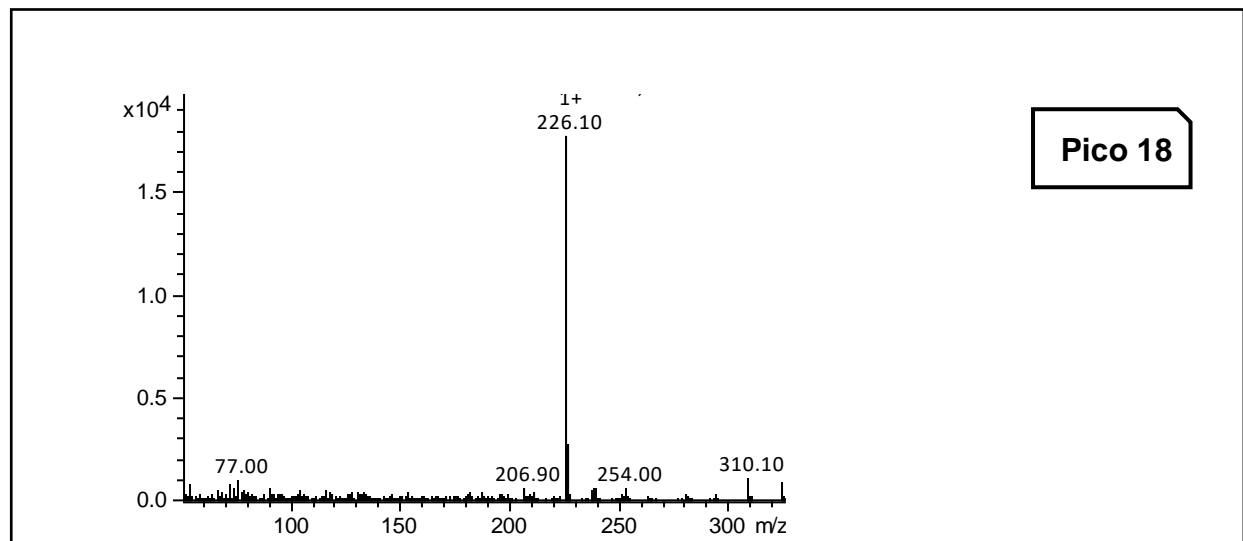
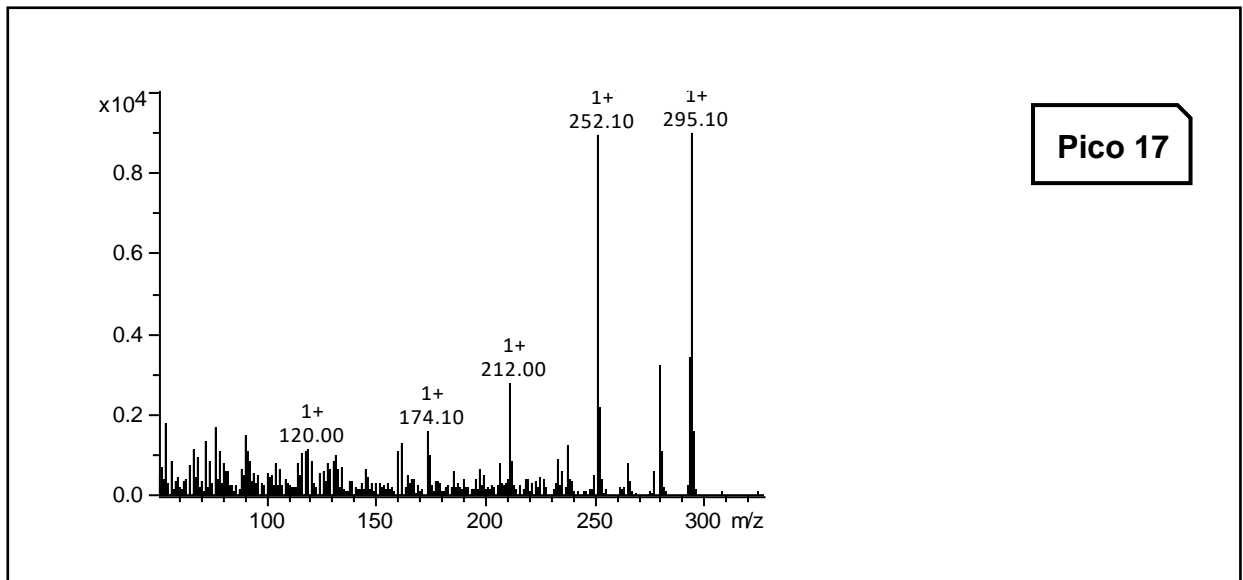
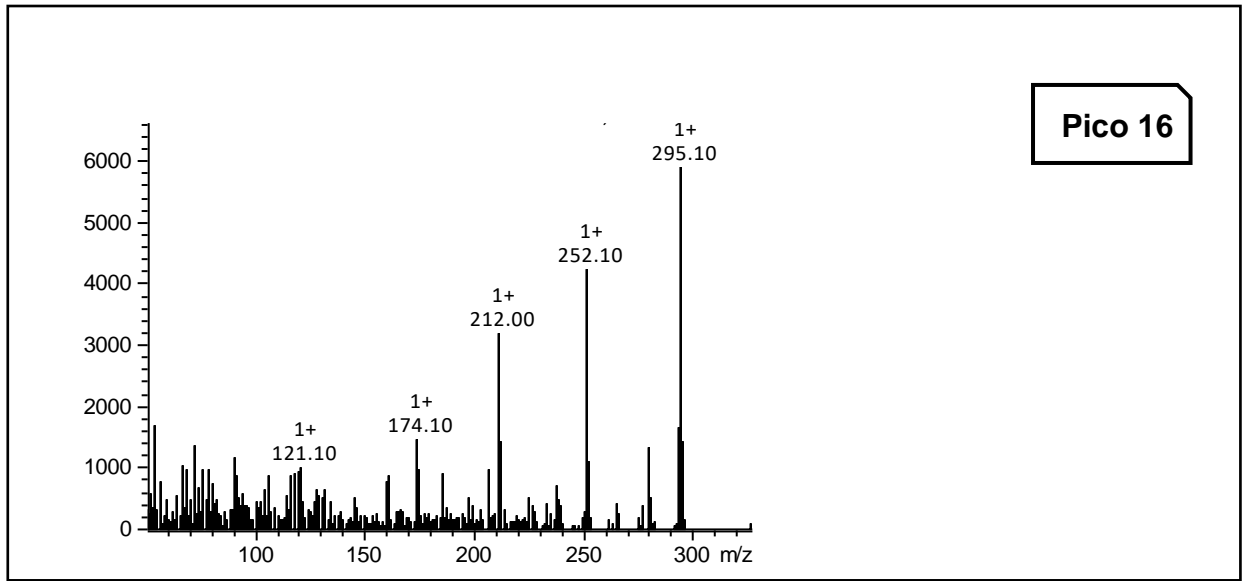


**Pico 9**

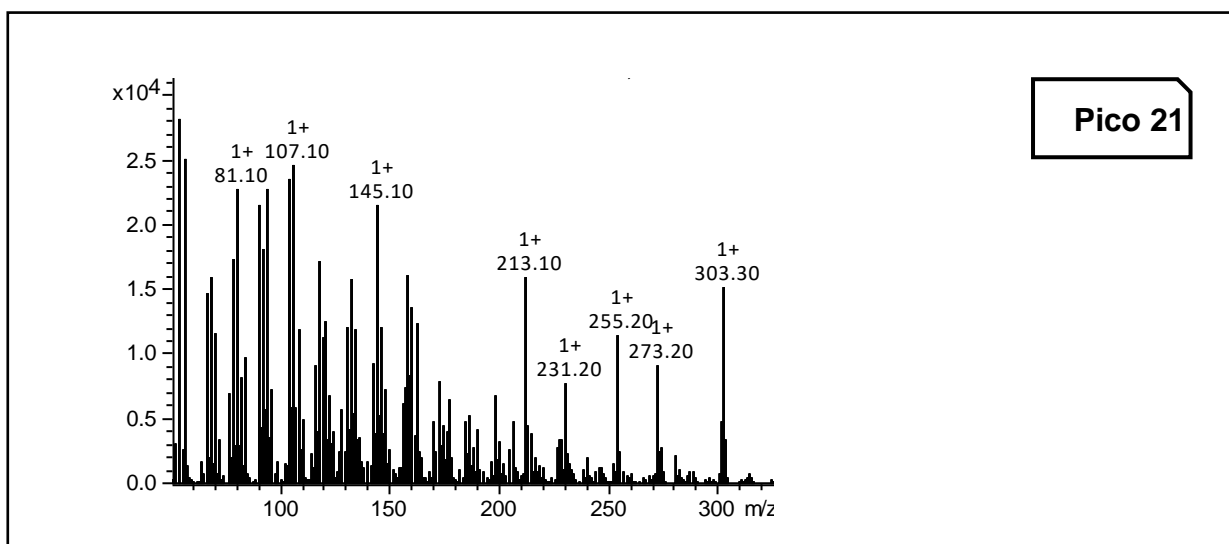
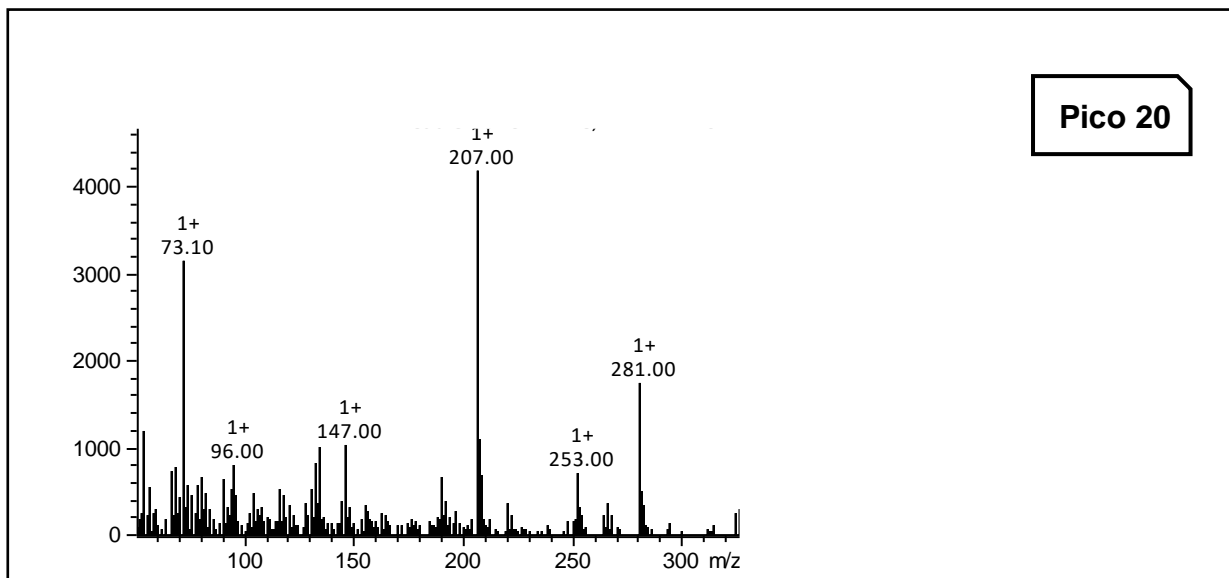
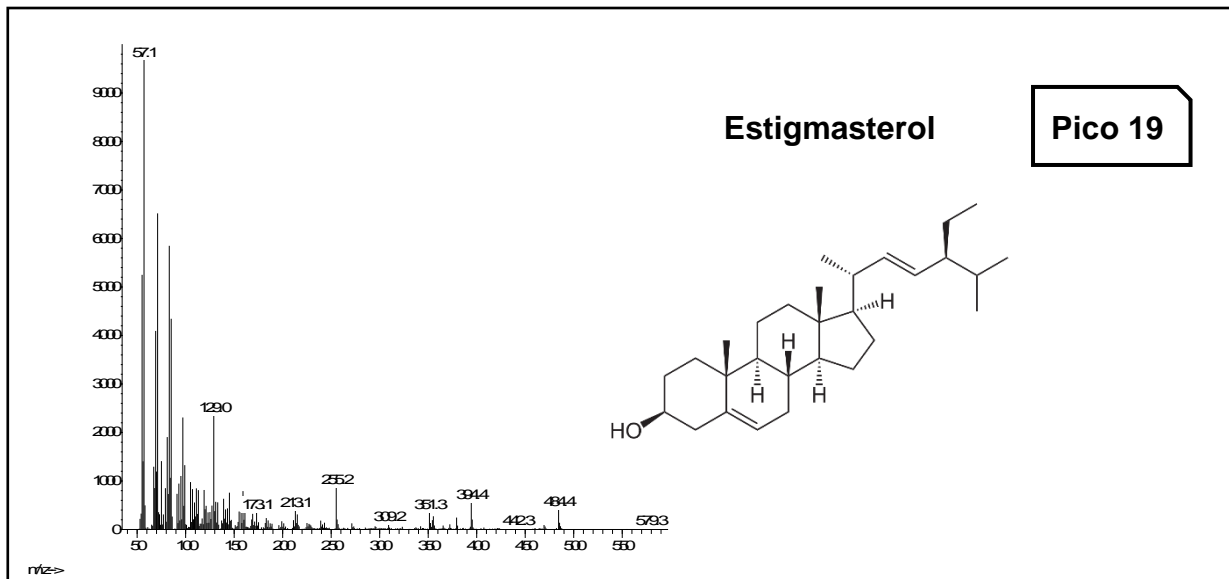


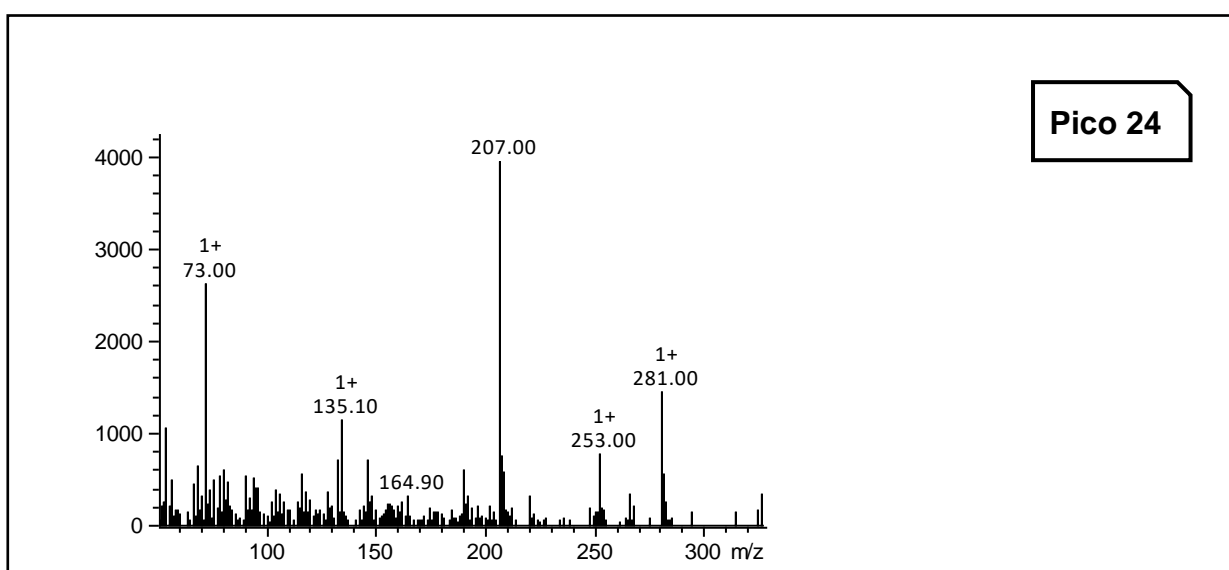
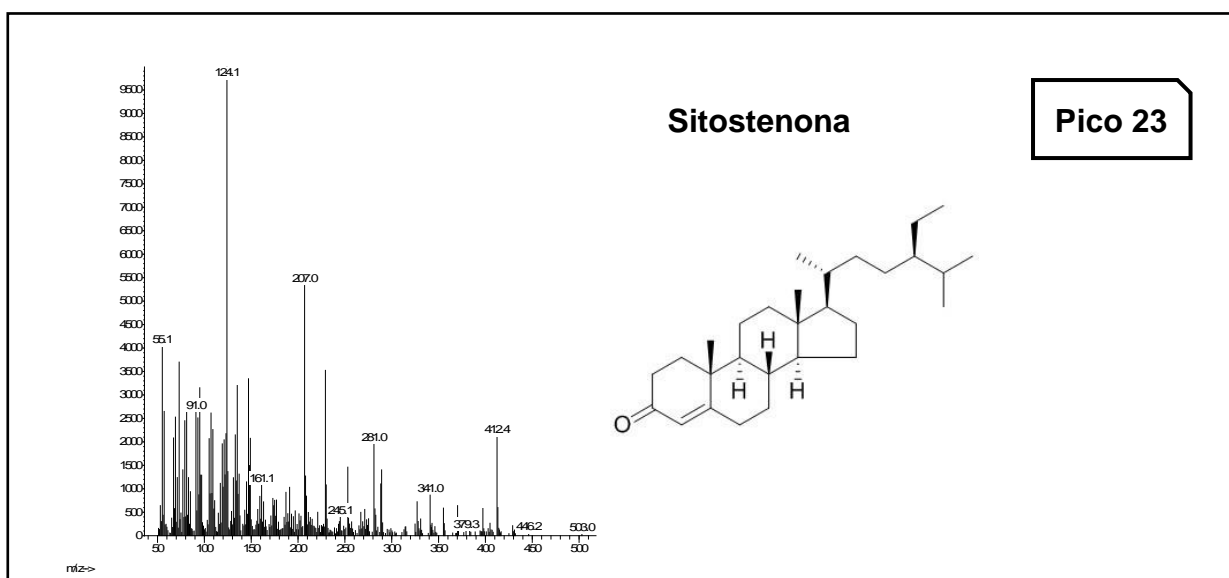
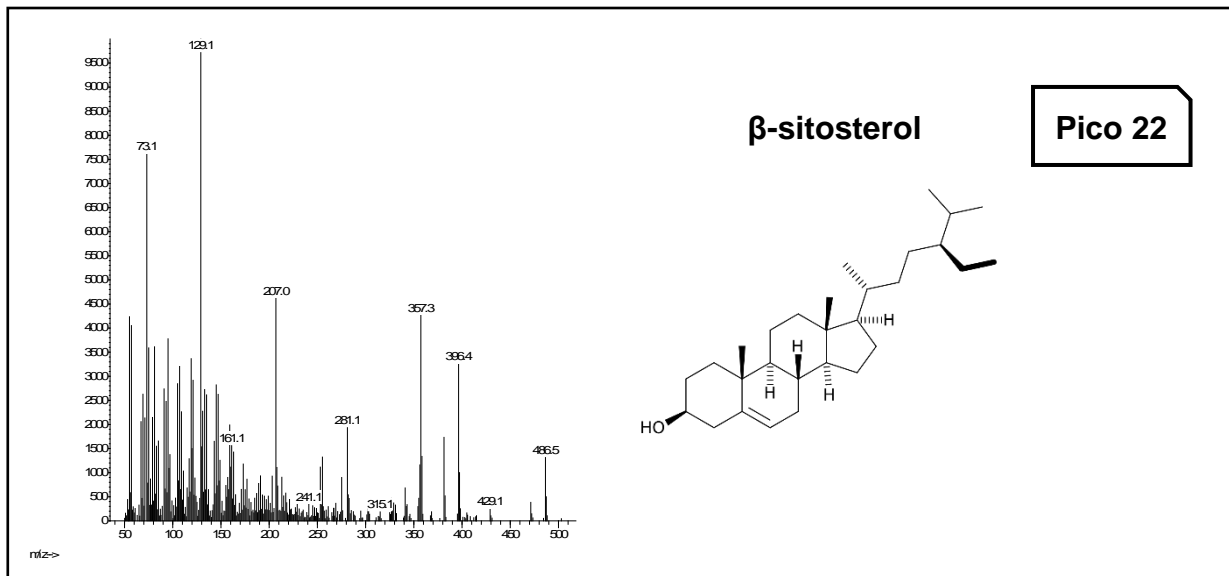


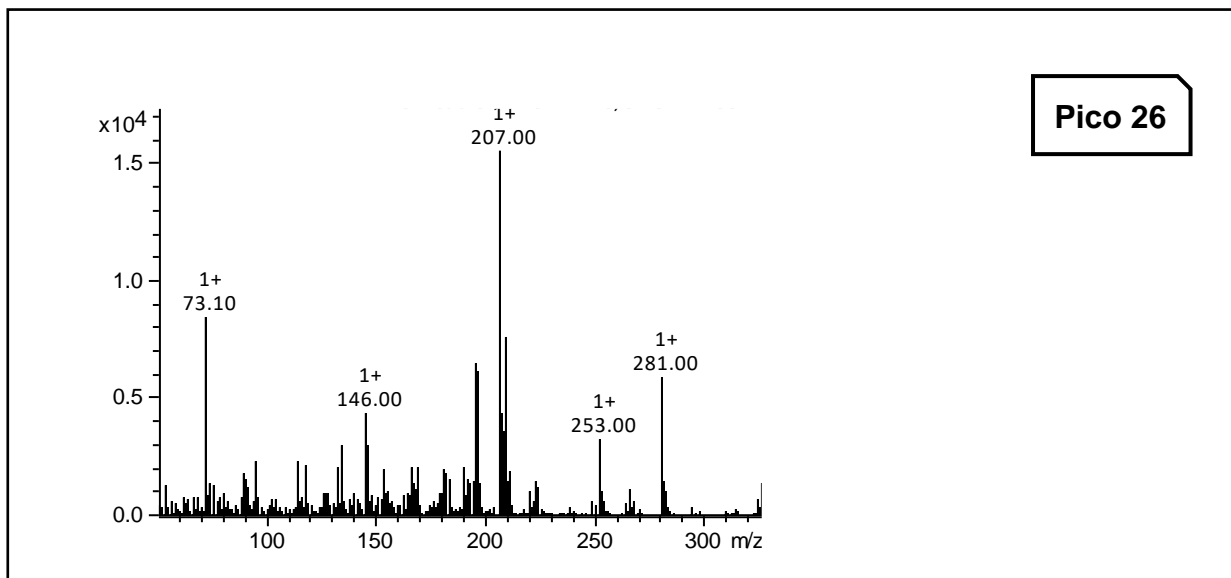
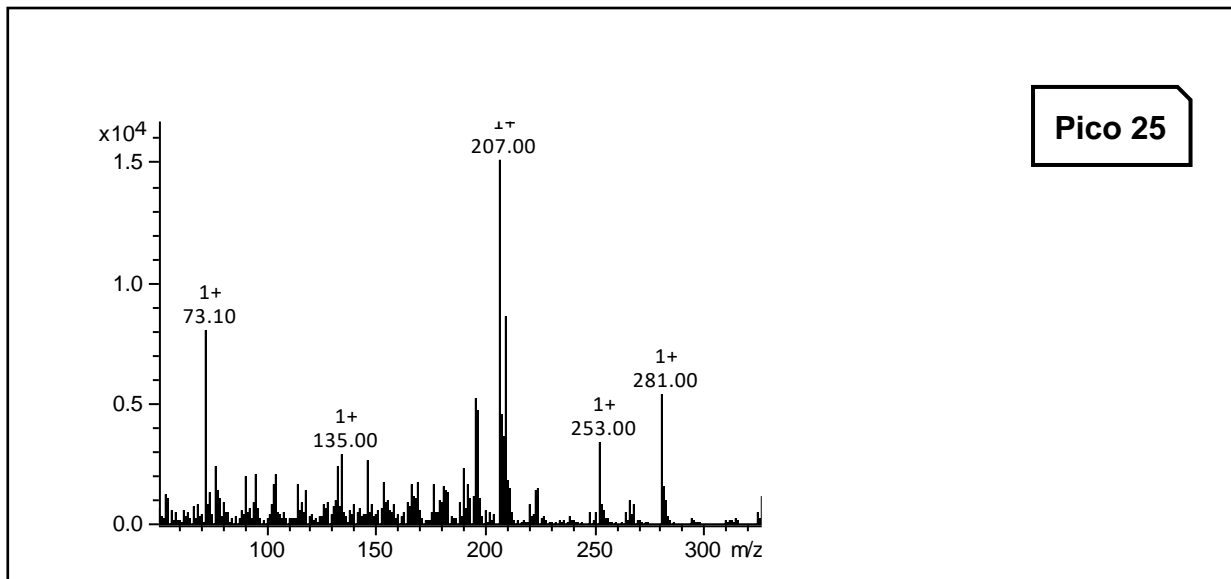














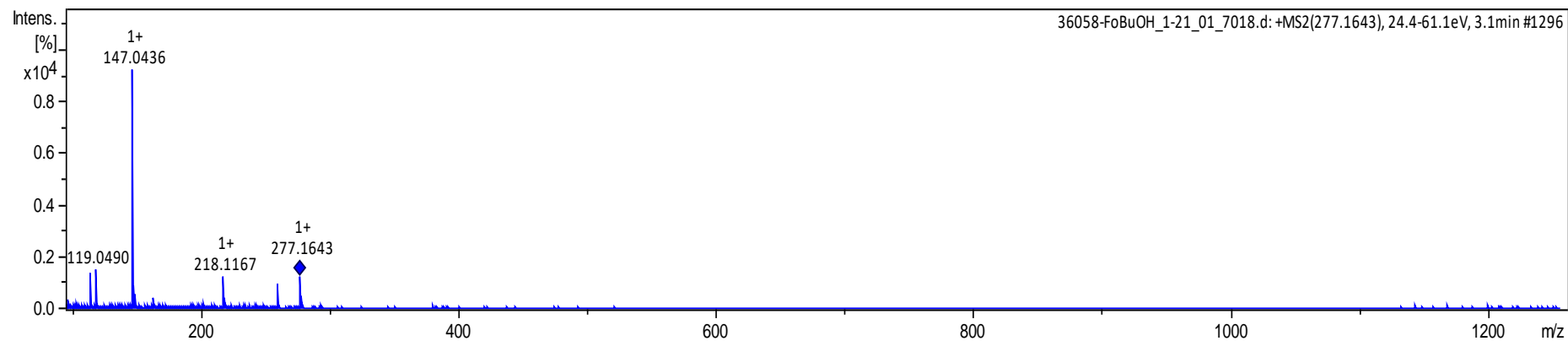
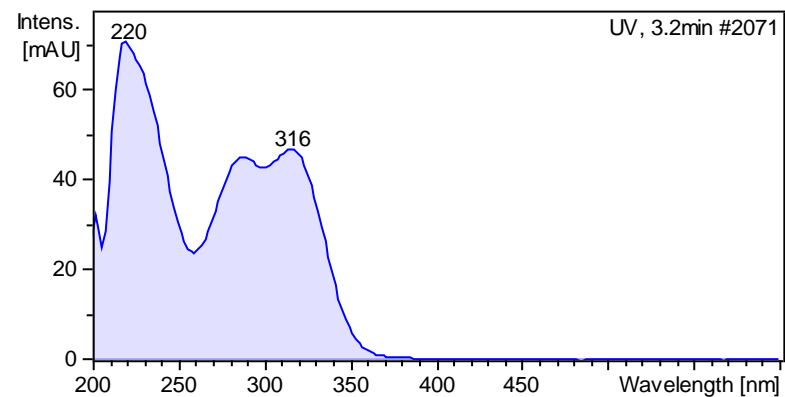
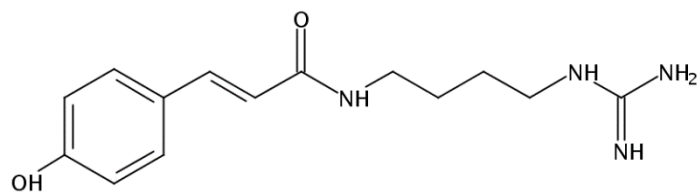
## *APÊNDICE B*

---



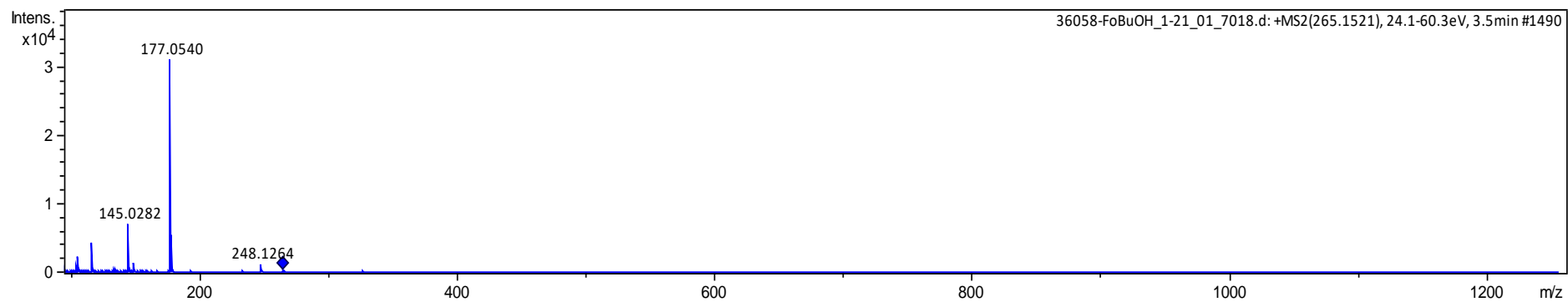
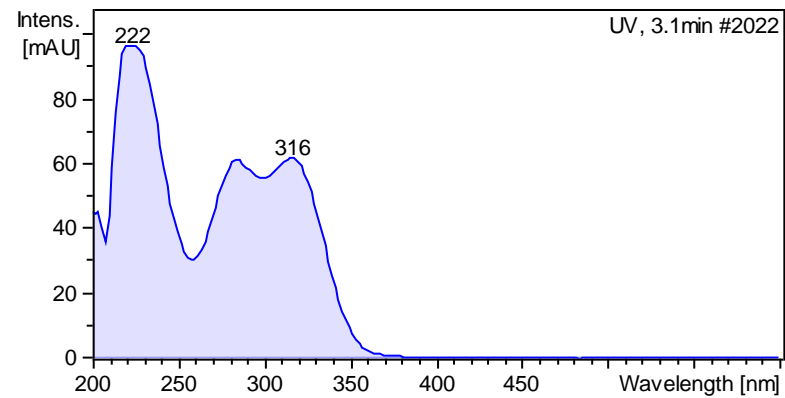
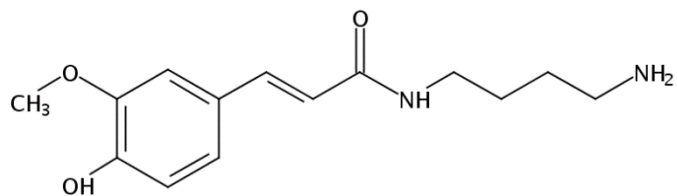
Pico 3

*p*-Coumaroyl agmatina



Pico 4

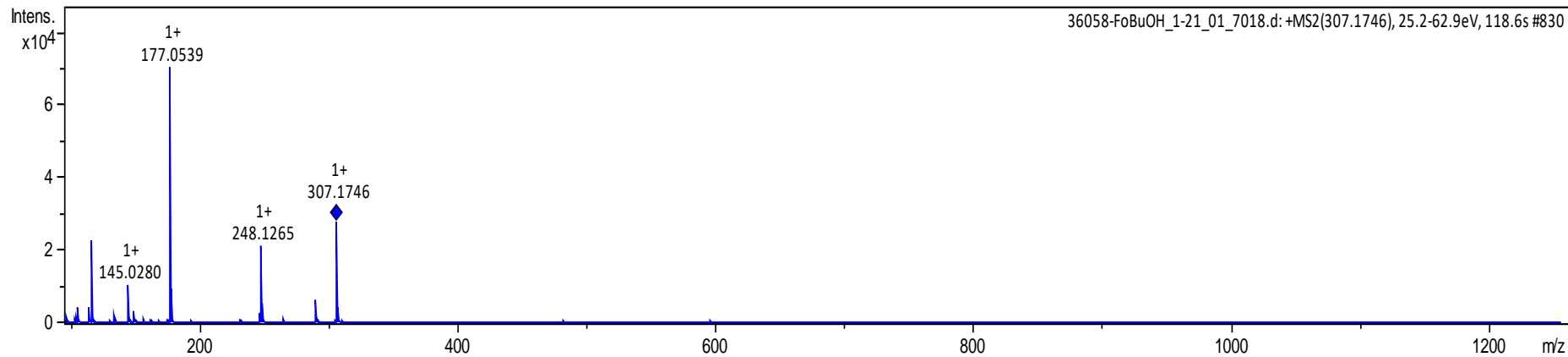
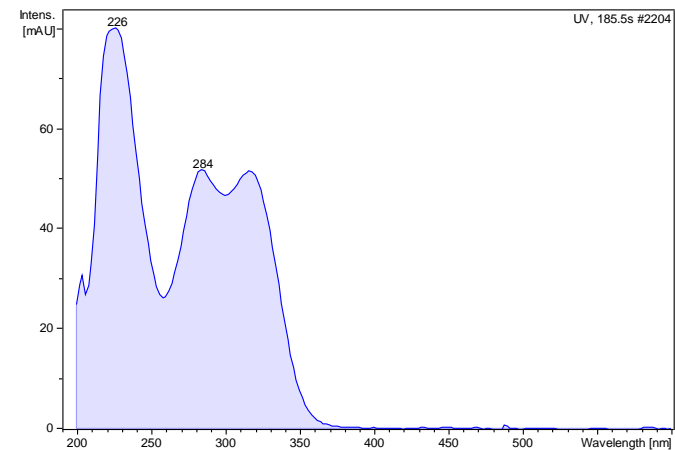
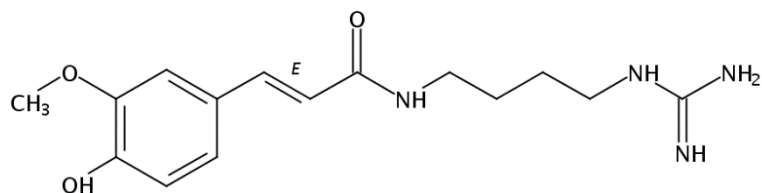
Feruloil putrescina





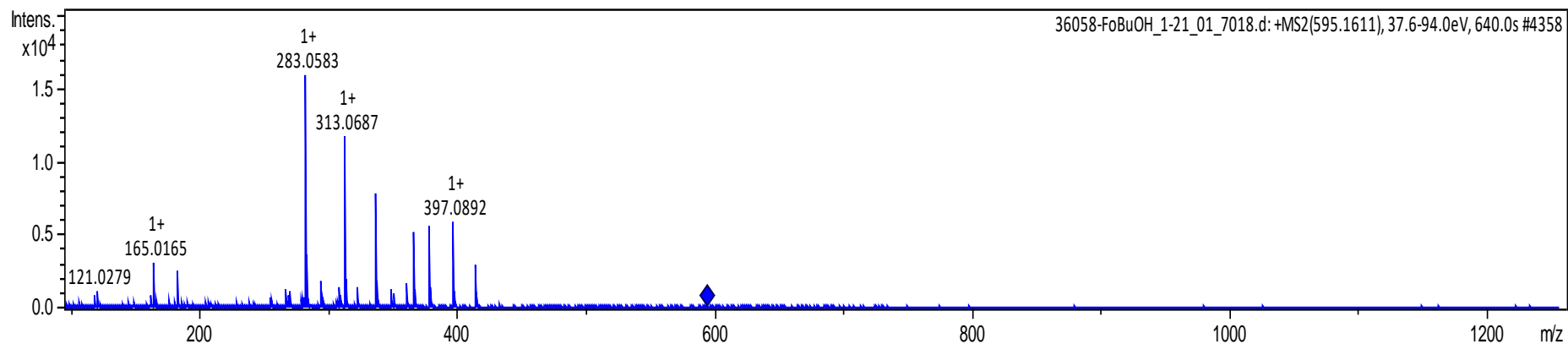
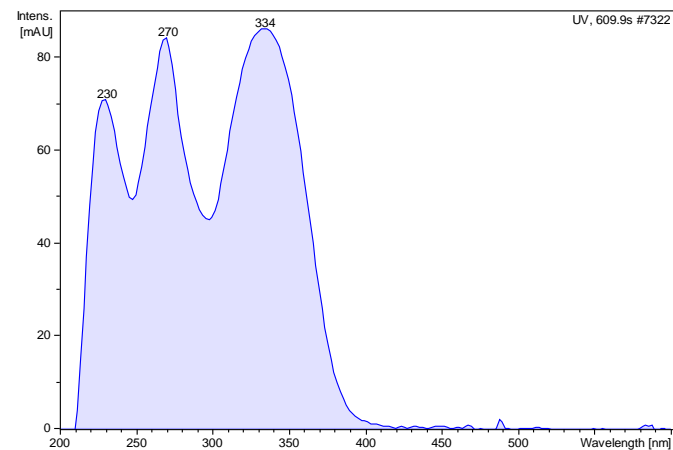
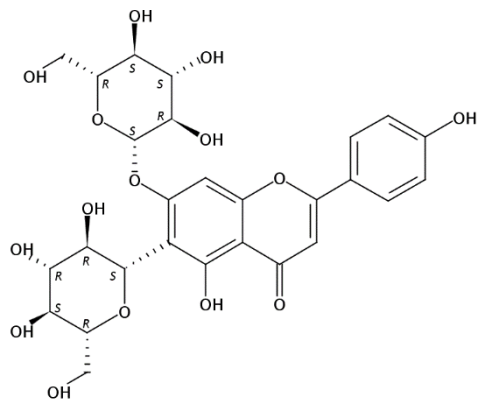
Pico 5

Feruloil agmatina



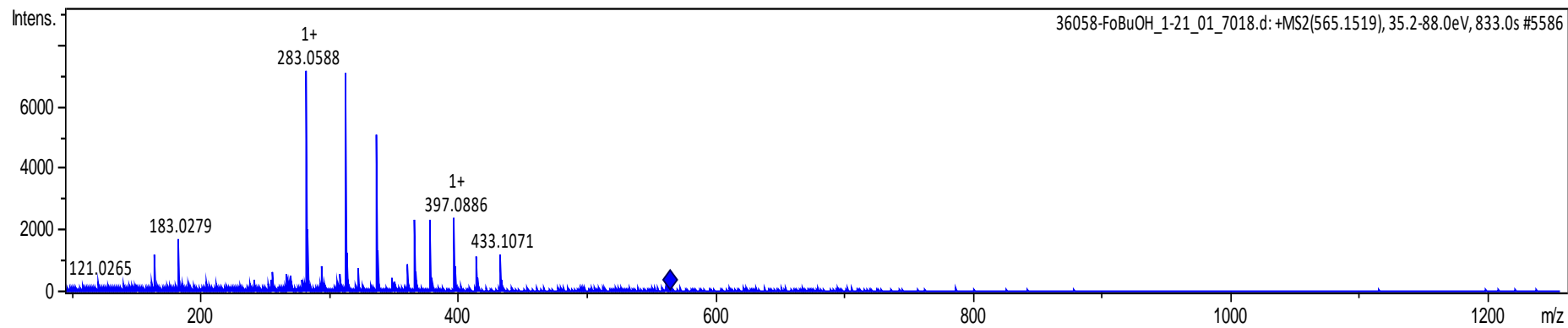
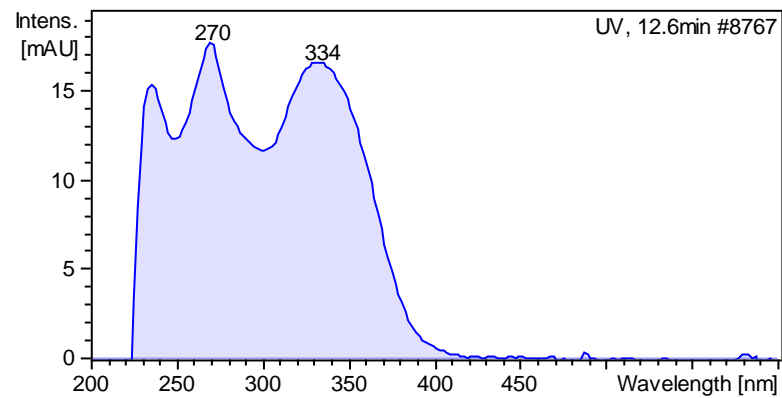
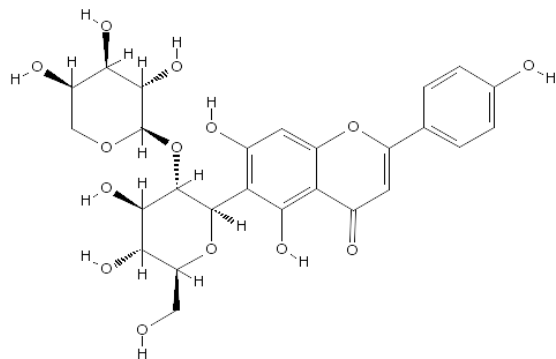
Pico 6

### Saporanina



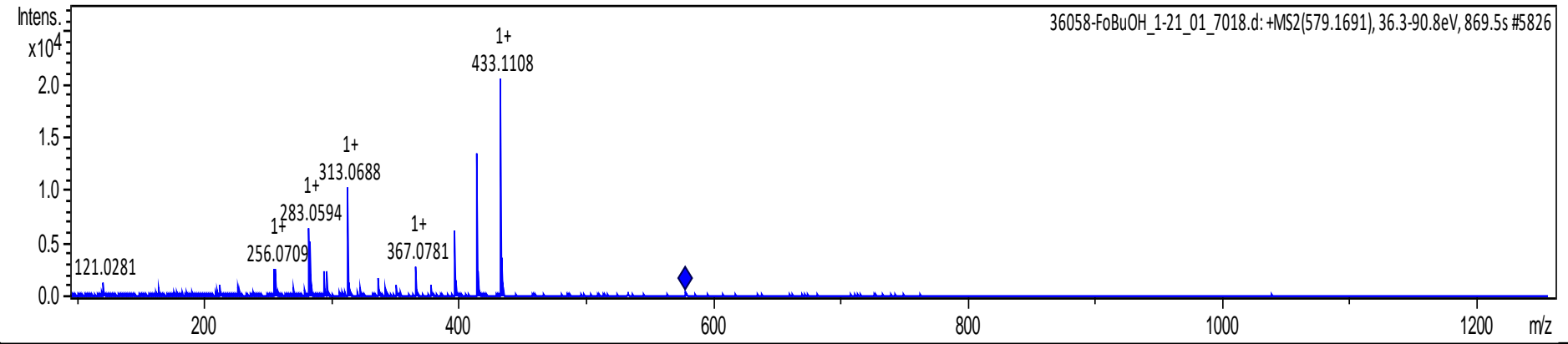
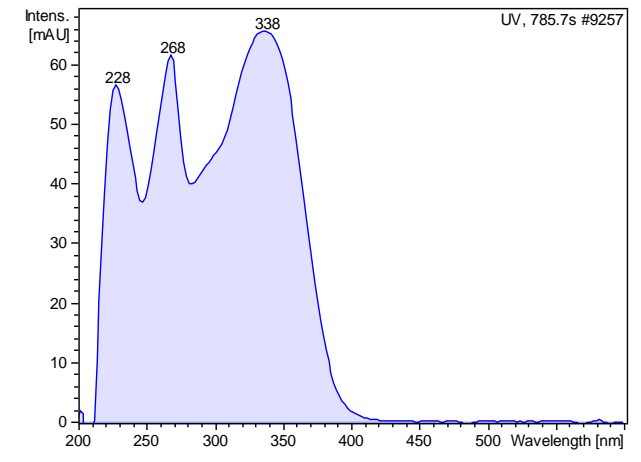
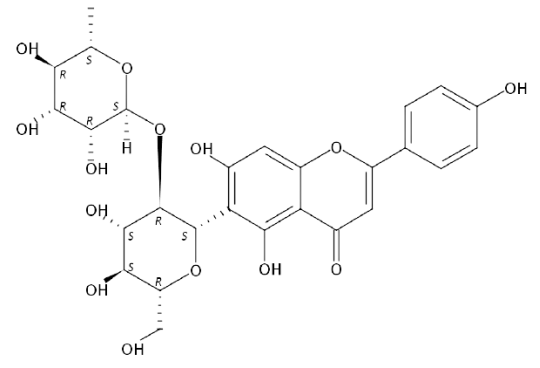
Pico 7

### Isovitexina 2-O-arabinoside



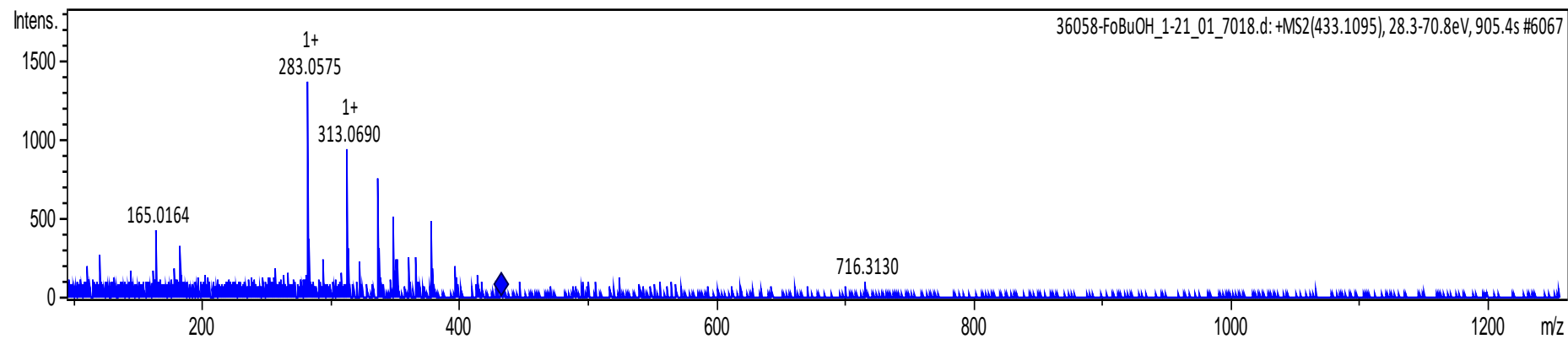
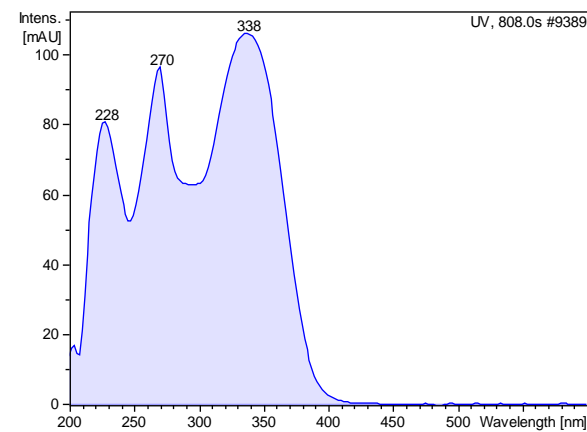
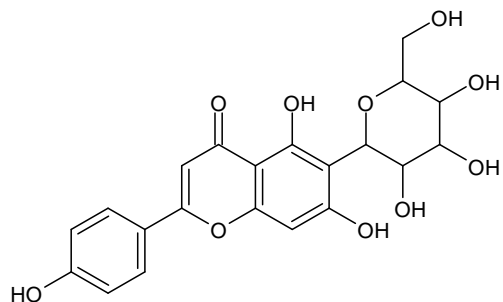
Pico 8

Isovitexina-2"-O-ramnosideo



Pico 9

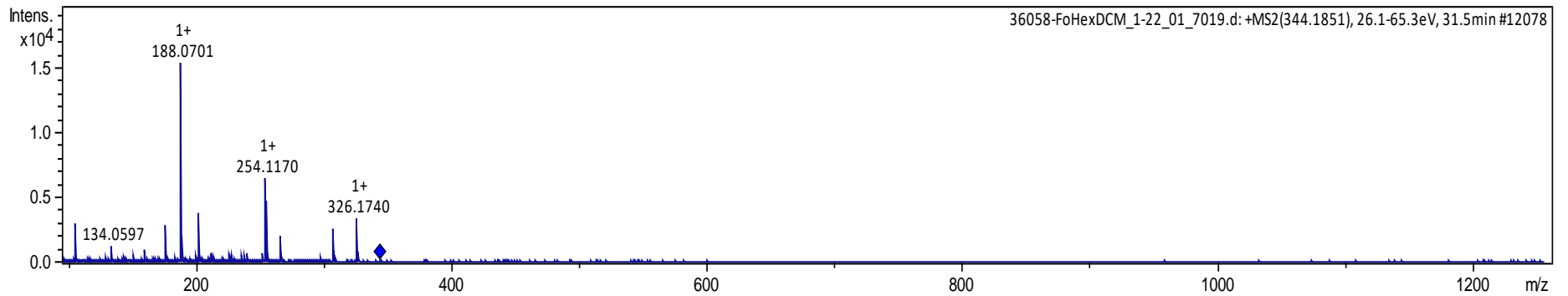
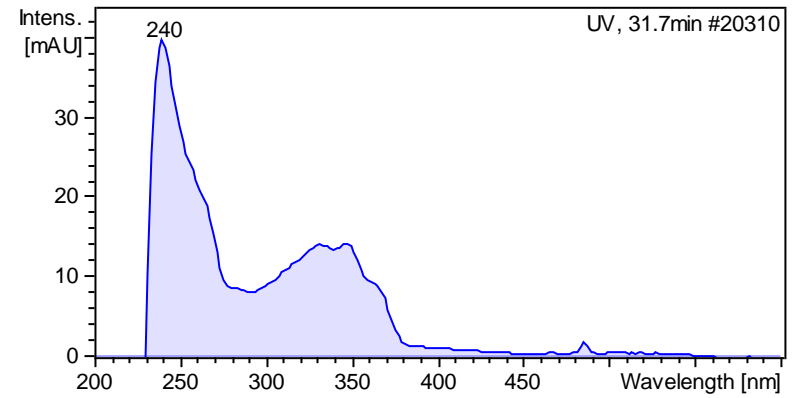
Vitexina



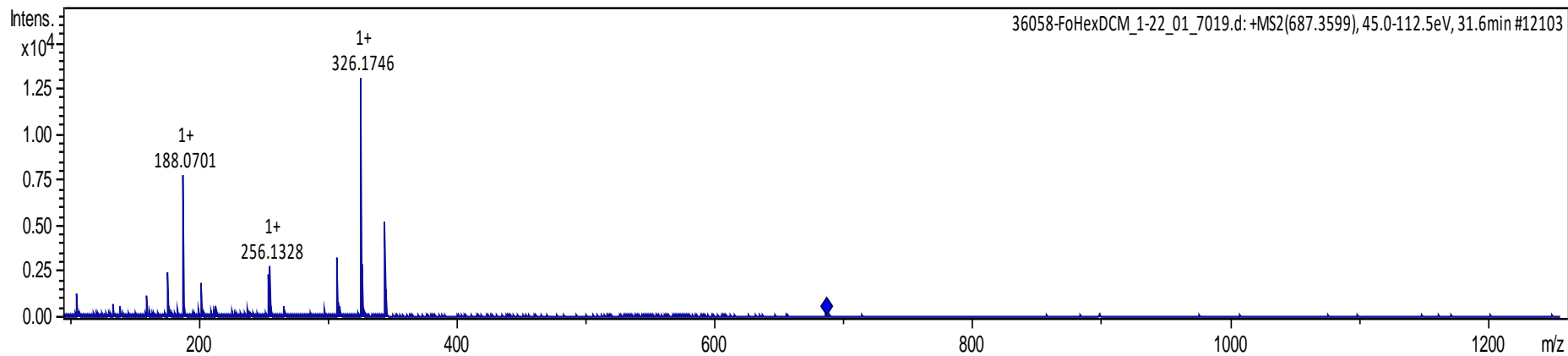
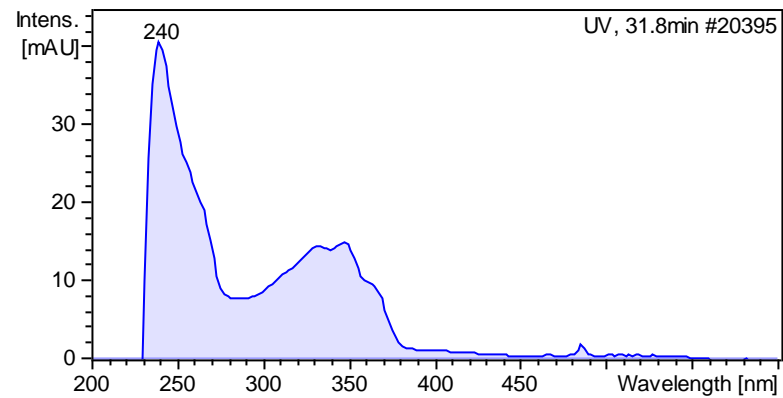
*APÊNDICE C*

---

Pico 3

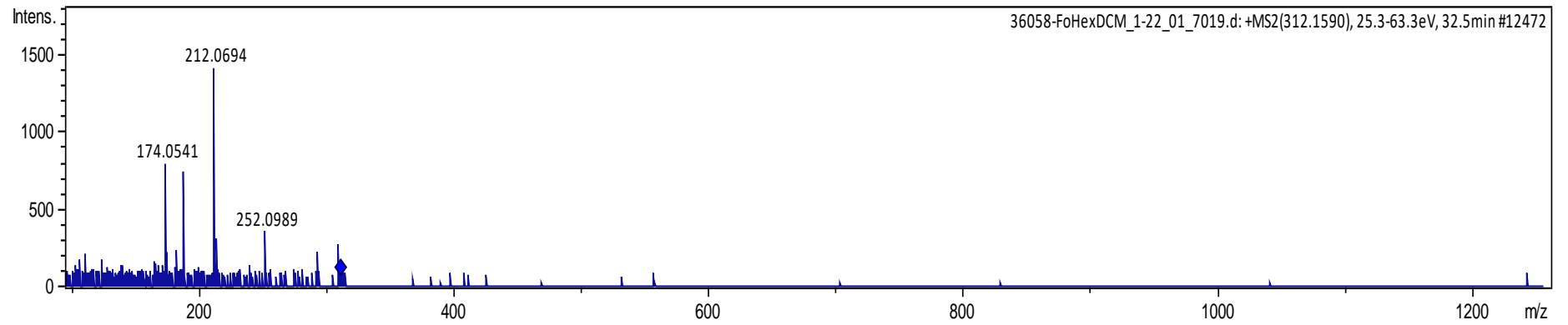
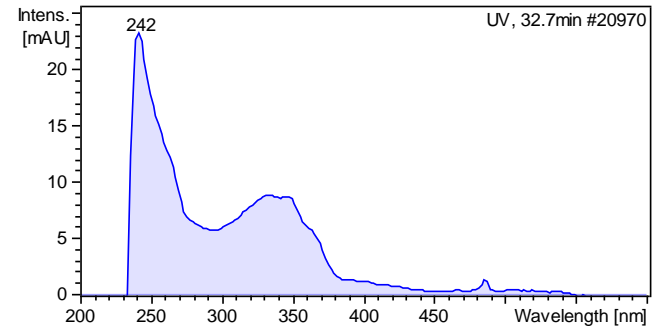


Pico 4

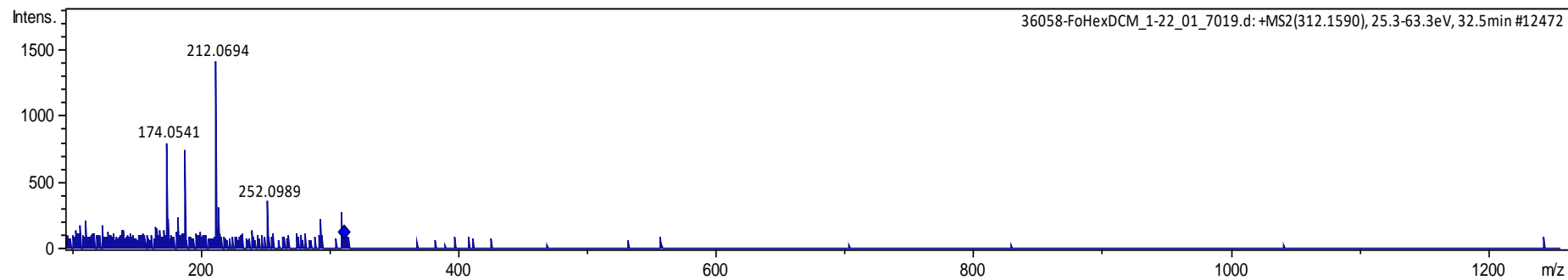
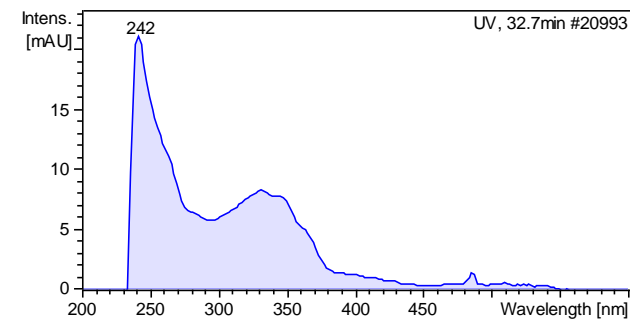




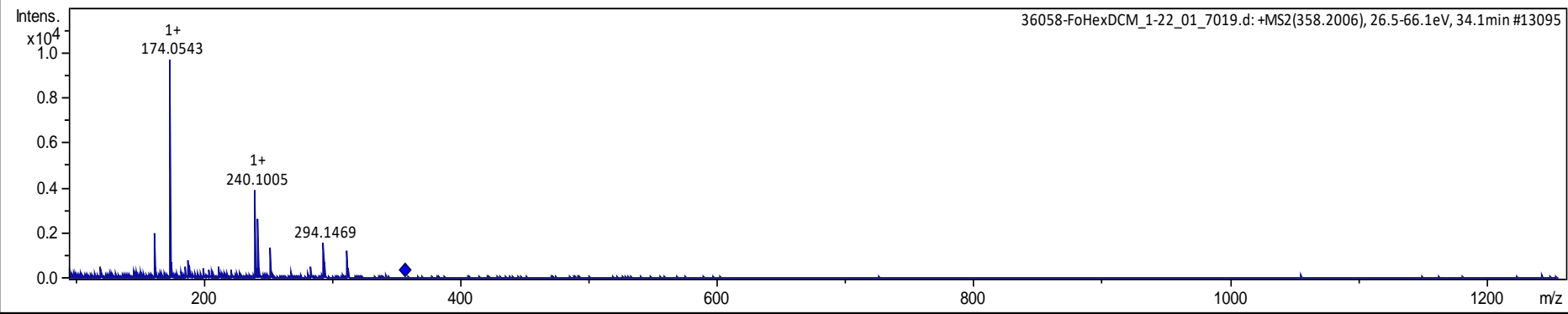
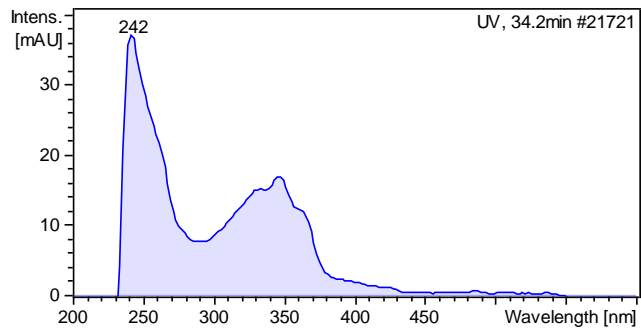
Pico 5



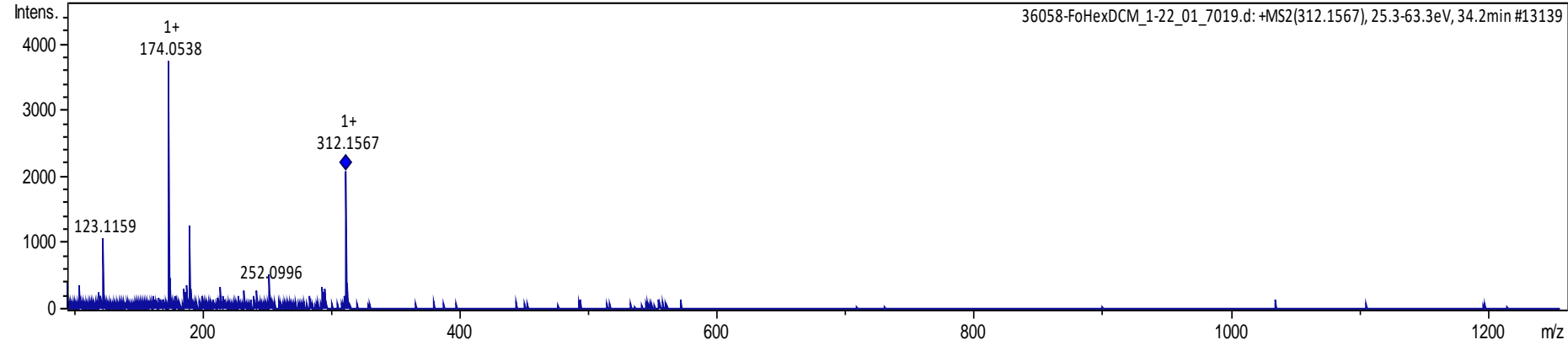
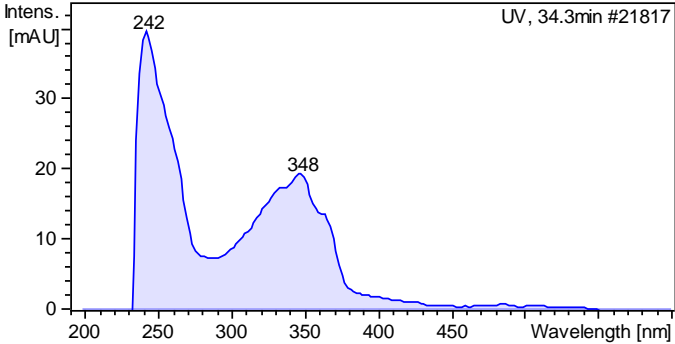
Pico 6



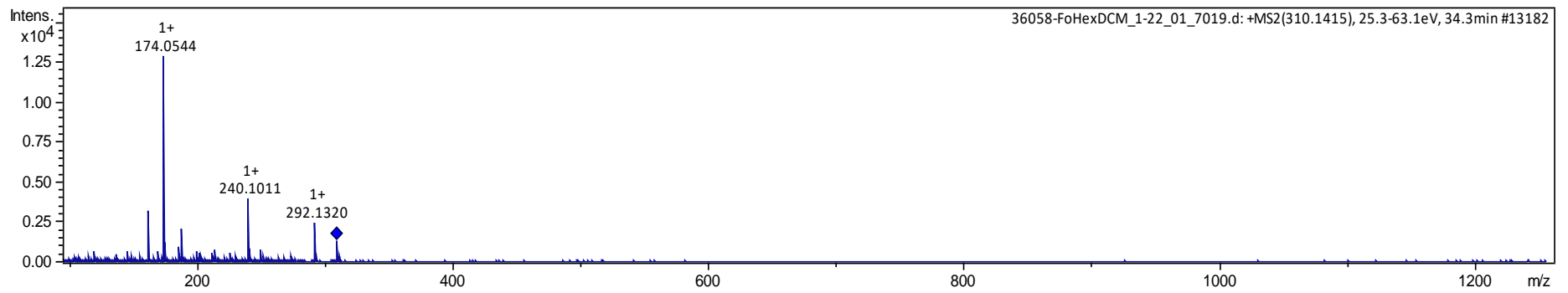
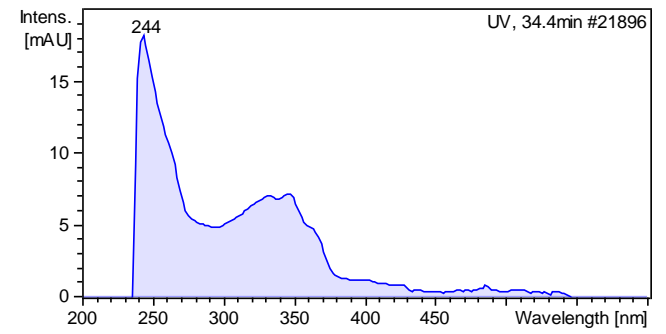
**Pico 8**



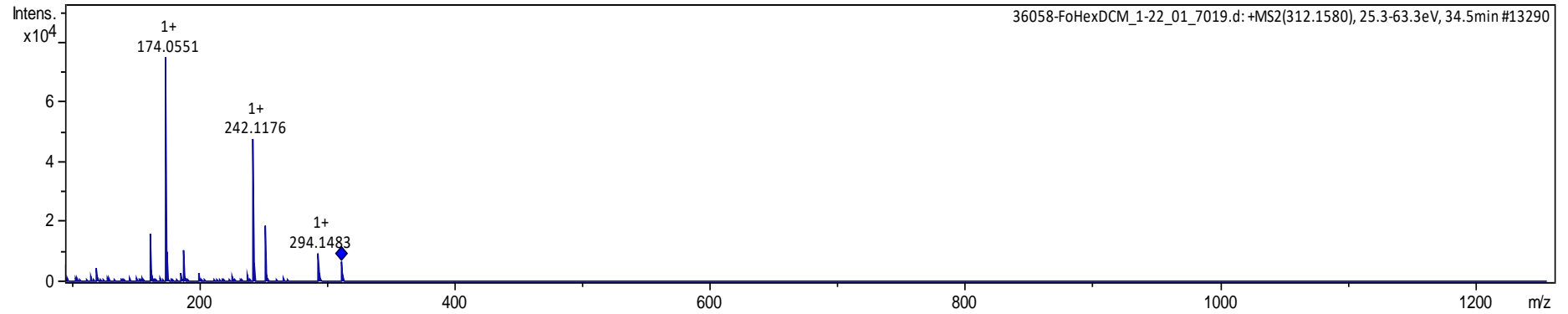
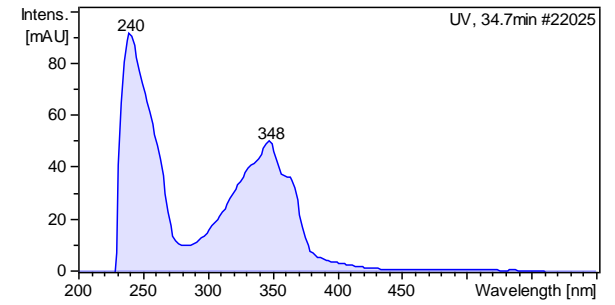
**Pico 9**



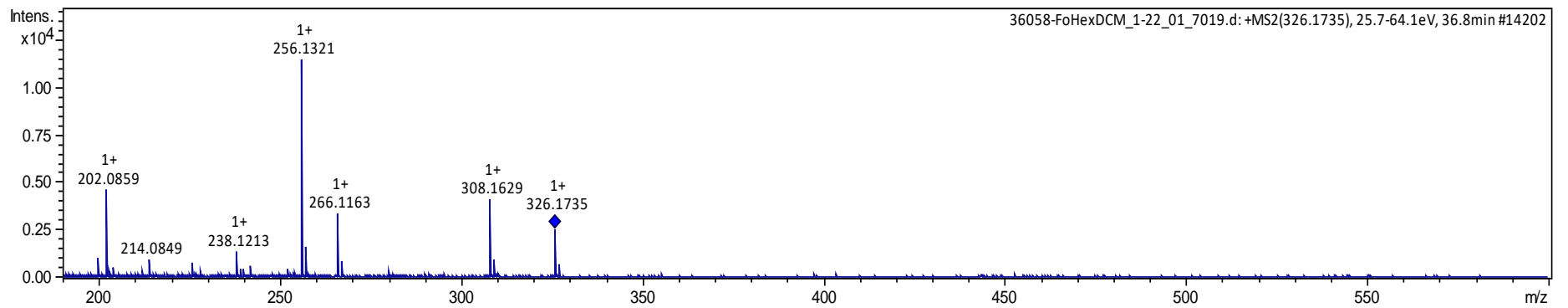
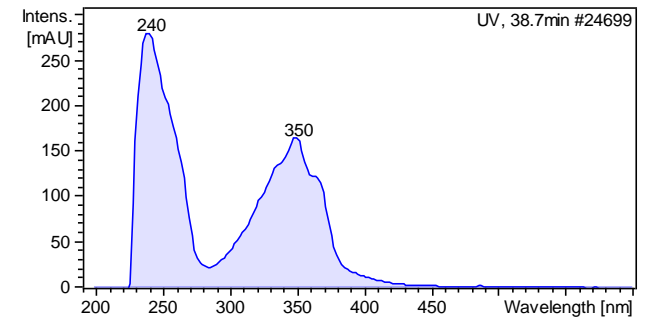
**Pico 10**



Pico 11



Pico 13



Pico 14

