

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 15/03/2021.

**Alene Côrtes de Queiroz e Silva**

Prospecção de metabólitos ativos em espécies de Fabaceae recomendadas para o  
reflorestamento no Estado de São Paulo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Química, do Instituto de Química -  
Universidade Estadual Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de DOUTORA  
EM QUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

**Araraquara 2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

S586p Silva, Alene Côrtes de Queiroz e  
Prospecção de metabólitos ativos em espécies de Fabaceae  
recomendadas para o reflorestamento no Estado de São  
Paulo / Alene Côrtes de Queiroz e Silva. –  
Araraquara : [s.n.], 2019  
178 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientador: Alberto José Cavalheiro

1. Reflorestamento. 2. São Paulo (Estado). 3. Leguminosa.  
4. Sustentabilidade. 5. Citotoxicidade. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação  
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA TESE: "Prospecção de metabólitos ativos em espécies de Fabaceae recomendadas para o reflorestamento no Estado de São Paulo"

AUTORA: ALENE CÔRTEZ DE QUEIROZ E SILVA


ORIENTADOR: ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO  
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS  
Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

  
Prof.ª. Dr.ª. ANGELA REGINA ARAUJO  
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof.ª. Dr.ª. MIRIAM SANNOMIYA  
Escola de Artes, Ciências e Humanidades / Universidade de São Paulo - USP - São Paulo

  
Prof. Dr. MARIA GORETTI DE VASCONCELOS SILVA  
Departamento de Química Analítica e Físico-Química / Centro de Ciências - UFCE - Ceará

Araraquara, 15 de março de 2019

## Dados Curriculares

### Alene Côrtes de Queiroz e Silva

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara – UNESP

Endereço: Rua Dr. Francisco Degni 55, CEP 14800-900, Araraquara/SP, Brasil

E-mail: alene\_cq@hotmail.com

#### Formação Acadêmica.....

##### 2014 – 2018 **Doutorado em Química**

- Área de Concentração: Química Orgânica
- Instituto de Química de Araraquara (IQ-UNESP)
- Projeto: Bioprospecção em espécies de Fabaceae recomendadas para o reflorestamento no Estado de São Paulo.
- Agência financiadora: CAPES
- Supervisor: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro ([albjcava@iq.unesp.br](mailto:albjcava@iq.unesp.br))

##### 2016 – 2016 **Licenciatura em Química**

- Instituição: Faculdade Polis das Artes

##### 2012 – 2014 **Mestrado em Química**

- Área de Concentração: Química Orgânica
- Instituição: Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (INQUI-UFMS)
- Dissertação: Estudo Químico de *Aeschynomene filosa* – Leguminosae
- Agência financiadora: CAPES
- Supervisor: Prof. Dr. Walmir Silva Garcez ([walmir.garcez@ufms.br](mailto:walmir.garcez@ufms.br))

##### 2010 – 2011 **Iniciação Científica**

- Instituição: Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (INQUI-UFMS)
- Projeto: Estudo químico e avaliação de atividades biológicas da fase acetato de etila proveniente do extrato das sementes de *Guarea guidonia* – Meliaceae
- Agência financiadora: CAPES

- Supervisor: Prof. Dr. Walmir Silva Garcez ([walmir.garcez@ufms.br](mailto:walmir.garcez@ufms.br))

#### 2008 – 2008 **Estágio Voluntário**

- Laboratório de Pesquisa 1 (PRONABIO/ LP1) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (INQUI-UFMS)
- Projeto: Estudo químico de um espécime de *Guarea guidonia*
- Supervisor: Prof. Dr. Walmir Silva Garcez ([walmir.garcez@ufms.br](mailto:walmir.garcez@ufms.br))

#### 2007 – 2011 - **Graduação em Química- Bacharelado em Química Tecnológica.**

- Instituição: Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (INQUI-UFMS)

#### **Títulos e Prêmios.....**

##### **2016 Primeiro lugar na 1ª edição do Concurso Biota Empreendedorismo para alunos de Pós-graduação de instituições paulistas: Estimulo a jovens criativos e empreendedores.**

- Título do trabalho: Fitoquímicos de plantas para áreas degradadas. São Paulo, 14 de setembro de 2016.

#### **Artigos Publicados.....**

Soares, L. R.; SILVA, A. C. Q.; Freire, T. V.; Garcez, F.R.; Garcez, W.S . Sesquiterpenos de Sementes de *Guarea guidonia* (Meliaceae). QUIMICA NOVA, 35, p. 323-326, 2012.

#### **Participação em Eventos Científicos.....**

- 2017 Pôster: 6th Brazilian Conference on Natural products and XXXII RESEM. Vitória/ ES, Brazil
- 2016 Ouvinte: II Workshop de Metabolômica. Auditório do CTBE/CNPEN. Campinas/ SP, Brasil.
- 2015 Ouvinte: 67ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC. Expositor da EXPOT&C (estande do CEPID / CIBFar – Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos). São Carlos/ SP, Brasil.
- 2013 Pôster: 4th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP) & XXXII Annual Meeting on micromolecular Evolution Systematics and Ecology (RESEM). Natal/RN, Brasil

- 2011          Poster: 3rd Brazilian Conference on Natural Products - 3rd BCNP / XXXIX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (RESEM). Ouro Preto/MG, Brasil
- 2011          Poster: 3rd Brazilian Conference on Natural Products - 3rd BCNP / XXXIX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (RESEM). Ouro Preto/MG, Brasil
- 2011          Apresentação oral: 11º Encontro de Divulgação de Pesquisas da Química (11º EnDiPeQ). Campo Grande/MS, Brasil.
- 2011          Pôster: XII Encontro de Iniciação Científica. Campo Grande/MS, Brazil.
- 2010          Apresentação oral: 10º Encontro de Divulgação de Pesquisa da Química (10º EnDiPeQ). Campo Grande/MS, Brasil
- 2009          Ouvinte: XXVIII Encontro Nacional dos Estudantes de Química (XXVIII Enequi). Salvador/ BA, Brasil
- 2009          Ouvinte: XXI SEMANA DA QUÍMICA. Campo Grande/MS, Brasil
- 2007          Ouvinte: Encontro de Divulgação de Pesquisas da Química (EnDiPEQ). Campo Grande/MS, Brasil
- 2007          Ouvinte: XIX SEMANA DE QUÍMICA. Campo Grande/MS, Brasil

**Idiomas.....**

Inglês (básico).

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Lília Côrtes de Queiroz, uma mulher guerreira, que teve uma participação fundamental neste trabalho, onde proporcionou a realização e continuidade deste doutorado no período que não tive bolsa.

Ao Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro, pela oportunidade concedida, pelas orientações, ensinamentos e experiências compartilhadas e por toda a disponibilidade demonstrada.

À Dra. Lucinéia Vizzotto Marconcini, pelos conselhos e por todo o apoio concedido para tornar possível a realização deste trabalho, e, particularmente, pelos ensinamentos prestados no âmbito do desenvolvimento da técnica analítica de RMNq.

À Professora Dra. Claudia O’Pessoa, pelo acolhimento e pelas facilidades concedidas para a realização de parte deste trabalho.

Ao Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) - UFC pela oportunidade dada, em especial a aluna Claudia Luciano, pelo ensinamento imprescindível para a execução deste trabalho de prospecção.

À Professora Dra. Maria Goretti pelo acolhimento e a oportunidade concedida.

As alunas Daniele Rodrigues, Criz Felix, Ima Teixeira e João Felipe da UFC pelas trocas de conhecimento.

Ao Nivaldo Borale, pela disponibilidade, atenção e pelos valiosos ensinamentos de RMN.

À aluna de iniciação científica Joana Galavotti, pela ajuda, dedicação e atenção na parte inicial deste trabalho.

À Lilian Cherubin Correia, pela amizade, ajuda prestada, palavras de incentivos, puxões de orelhas e parceira.

Aos técnicos especialistas Juliana Rodrigues e João Luiz Bronzel, pela disponibilidade e ajuda prestada no decorrer deste trabalho.

Ao Senhor Isael, pela presteza e conhecimentos transmitidos nas horas de coleta do material vegetal.

À Nicoll A. Escobar, Jorge Y. Tamashiro e Roseli B. Torres, pela identificação botânica das espécies coletadas.



Aos amigos mestrando, Karoline Mazuy e Luan Costa, pela ajuda constante e amizade.

Aos meus companheiros de Doutorado, Afif Monteiro, Isabella Gonçalves, André Carneiro, pela ajuda e amizade sempre presentes.

Ao José Augusto Teixeira, pelo carinho, amizade, apoio e paciência demonstrada, por ser um amigo sempre presente.

À minha família, pelo estímulo e apoio incondicional.

Ao meu namorado, Rafael Lacerda, pelo carinho e apoio no momento mais difícil deste trabalho.

Aos amigos, Fernando Henrique, Nariane Ferreira, Natascha Freitas, Mariana Fujita e Paulo Fernandes pelo apoio e amizade incondicional.

Aos professores do PPG em Química do IQ - Araraquara, em especial, aos professores do NUBBE, pelos conhecimentos transmitidos.

Agradeço também às agências de fomento à pesquisa FAPESP, CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, obrigada.

**A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”**

**(Arthur Schopenhauer)**

## RESUMO

A família Fabaceae é conhecida pelo seu valor econômico e ecológico, além de possuir reconhecida diversidade de metabolitos secundários. Esta família é amplamente distribuída no Estado de São Paulo, incluindo diversas espécies recomendadas para recuperação de áreas degradadas, sendo muitas delas produzidas em viveiros de mudas. O objetivo deste trabalho foi identificar em espécies de Fabaceae novas fontes de moléculas que já possuem valor significativo no mercado, além de prospectar novas substâncias com potencial citotóxico frente células tumorais e larvicida frente a larvas de *Aedes aegypti*. A triagem foi iniciada com mudas de 22 espécies. Os extratos aquosos e etanólicos de folhas de mudas destas 22 espécies foram analisados por UPLC-CAD-DAD e por RMN<sup>1</sup>H e esses dados indicaram a produção de substância majoritária em *Cassia ferruginea*. Essa substância foi identificada como (+)-ampelopsina, já com reconhecido valor de mercado por sua ação hepatoprotetora e combate a intoxicação e dependência de álcool. Teores elevados de (+) ampelopsina determinados por RMN de <sup>1</sup>H (padrão interno e ERETIC2) foram encontrados em folhas de mudas e matriz (11,6 % e 7,0 %, respectivamente), confirmando a viabilidade de *C. ferruginea* como nova fonte de (+) ampelopsina. O método de padrão interno foi validado de acordo com RDC n°- 166 da ANVISA Na etapa de prospecção de atividade citotóxica e larvicida dos extratos das 22 espécies de Fabaceae, destacaram-se duas espécies como promissoras para atividade larvicida contra *Aedes aegypti*: *Leucochloron incuriale* (Vell.) Benth (angico-rajado) e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (timburi) e três espécies com potencial citotóxico para as linhagens de células tumorais PC3 (próstata humano), HCT-116 (cólon humano) e SF-295/ SNB-19 (glioblastoma humano): *Albizia niopoides* (Benth) Burkat (farinha-seca), *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (timburi) e *Leucochloron incuriale* (Vell.) Benth (angico-rajado). Entre elas, os extratos de timburi apresentaram maior atividade citotóxica, além de seletividade, uma vez que foram pouco ativos em células não-tumoral L929 (fibroblasto de pulmão murinho). Assim, este trabalho realça o potencial econômico e terapêutico de espécies de Fabaceae indicadas para o reflorestamento no Estado de São Paulo, as quais constituem uma fonte valiosa de metabolitos com interesse econômico e de novas substâncias bioativas, que podem ser explorados de uma maneira sustentável.

**Palavras-chave:** *Cassia ferruginea*, (+)-ampelopsina, *Enterolobium contortisiliquum*, *Leucochloron incuriale*, citotóxico.

## ABSTRACT

The Fabaceae family is well known for its economic, biological and ecological value, besides the recognized functional and chemical diversity of secondary metabolites. This family is widely distributed in São Paulo state and includes several recommended species for the restoration of degraded areas of the state, many of them being produced in seedlings nurseries. Thus, the aim of this work was to discover new sources of novel bioactive metabolites or known metabolites with commercial value, besides prospecting new compounds with cytotoxic potential against tumor cells and, larvicidal activity against *Aedes aegypti*. The screening was carried out with seedlings of 22 species. The aqueous and ethanolic extracts from leaves were analyzed by UPLC-CAD-DAD and <sup>1</sup>H NMR and these data indicated the production of a major compound in *Cassia ferruginea*. This compound was identified as (+)-ampelopsin, known for its hepatoprotective action and against alcohol intoxication and dependence. High levels of (+)-ampelopsin were determined by <sup>1</sup>H NMR (internal standard and ERETIC2) in leaves of seedlings and the adult plant (11.6% and 7.0%, respectively), confirming the viability of *C. ferruginea* as a new source of (+)-ampelopsin. The internal standard method was validated based on ANVISA RDC N °166. During the prospection stage of cytotoxic and larvicidal activity of the extracts of the 22 species of Fabaceae, two species were highlighted as promising for larvicidal activity against *Aedes aegypti*: *Leucochloron incuriale*(Vell.) Benth (angico-rajado) and *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (timburi) and three species with cytotoxic potential against tumor cell lines PC3 (human prostate), HCT-116 (human colon) and SF-295/SNB-19 (human glioblastoma) were also detected: *Albizia niopoides* (Bentham) Burkat (farinha-seca), *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (timburi) and *Leucochloron incuriale*(Vell.) Benth (angico-rajado). Among them, timburi extracts increased cytotoxic activity in addition to selectivity, since they were little active in non-tumor cells L929 (murine lung fibroblast). Therefore, this work highlights the economic and therapeutic potential of native Fabaceae species indicated for the restoration in São Paulo state, which constitutes a valuable source of metabolites with economic interest and new bioactive substances, that can be exploited in a sustainable manner.

Keywords: *Cassia ferruginea*, (+)-ampelopsin, *Enterolobium contortisiliquum*, *Leucochloron incuriale*, cytotoxic.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO I - INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DE ESPÉCIES NATIVAS RECOMENDADAS PARA O REFLORESTAMENTO NO ESTADO DE SÃO PAULO

- Figura 1** - Gráfico de representatividade do número de espécies nativas por famílias no estado de São Paulo, indicadas para o reflorestamento. .... 26
- Figura 2** - Esquema do sistema de identificação das espécies estudadas..... 32
- Figura 3** - Fluxograma do método de extração do material vegetal de folhas de mudas de espécies de Fabaceae. .... 34
- Figura 4** - Espectro de comparação da ordem de extração dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos aquosos da matriz, (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )..... 38
- Figura 5** - Espectro de comparação da ordem de extração dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos etanólicos da matriz, (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )..... 38
- Figura 6** - Espectro de comparação da ordem de extração dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos hexânicos da matriz, (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )..... 39
- Figura 7** - Perfis cromatográficos dos extratos etanólicos do grupo 1. Detector: Somatória UV ..... 43
- Figura 8** - Perfis cromatográficos dos extratos etanólicos do grupo 1. Detector: CAD..... 43
- Figura 9** - Perfis cromatográficos dos extratos aquosos do grupo 1. Detector: Somatória UV ..... 43
- Figura 10** - Perfis cromatográficos dos extratos aquosos do grupo 1. Detector: CAD..... 44
- Figura 11** - Perfis cromatográficos dos extratos etanólicos do grupo 2. Detector: Somatória UV ..... 44
- Figura 12** - Perfis cromatográficos dos extratos etanólicos do grupo 2. Detector: CAD..... 44
- Figura 13** - Perfis cromatográficos dos extratos aquosos do grupo 2. Detector: Somatória UV ..... 45
- Figura 14** - Perfis cromatográficos dos extratos aquosos do grupo 2. Detector: CAD..... 45
- Figura 15** - Perfis cromatográficos dos extratos etanólicos do grupo 3. Detector: Somatória UV ..... 45
- Figura 16** - Perfis cromatográficos dos extratos etanólicos do grupo 3. Detector: CAD..... 46
- Figura 17** - Perfis cromatográficos dos extratos aquosos do grupo 3. Detector: Somatória UV ..... 46
- Figura 18** - Perfis cromatográficos dos extratos aquosos do grupo 3. Detector: CAD..... 46
- Figura 19** - Perfis cromatográficos dos extratos etanólicos do grupo 4 e 5. Detector: Somatória UV..... 47
- Figura 20** - Perfis cromatográficos dos extratos etanólicos do grupo 4 e 5. Detector: CAD.. 47
- Figura 21** - Perfis cromatográficos dos extratos aquosos do grupo 4 e 5. Detector: Somatória UV..... 47
- Figura 22** - Perfis cromatográficos dos extratos aquosos do grupo 4 e 5. Detector: CAD..... 48

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 23</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ dos extratos etanólicos do Grupo 1 (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).       | 49 |
| <b>Figura 24</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ dos extratos aquosos do Grupo 1 (600 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ).            | 49 |
| <b>Figura 25</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ dos extratos etanólicos do Grupo 2 (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).       | 49 |
| <b>Figura 26</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ dos extratos aquosos do Grupo 2 (600 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ).            | 50 |
| <b>Figura 27</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ dos extratos etanólicos do Grupo 3 (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).       | 50 |
| <b>Figura 28</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ dos extratos aquosos do Grupo 3 (600 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ).            | 50 |
| <b>Figura 29</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ dos extratos etanólicos dos Grupos 4 e 5 (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). | 51 |
| <b>Figura 30</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ dos extratos aquosos dos Grupos 4 e 5 (600 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ).      | 51 |

## CAPÍTULO II - Seleção de novas fontes de moléculas valiosas

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 31</b> - Mapa de biomas do Estado de São Paulo.  | 54 |
| <b>Figura 32</b> - Evolução histórica do desmatamento do Estado de São Paulo.  | 55 |
| <b>Figura 33</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato etanólico de <i>C. ferruginea</i> (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).  | 57 |
| <b>Figura 34</b> - <i>Cassia ferruginea</i> : (a) árvore adulta; (b) muda; (c) vagem; (d) flor; (e) folha; (f) distribuição geográfica no Brasil.  | 60 |
| <b>Figura 35</b> - Cromatograma do extrato etanólico das folhas de <i>C. ferruginea</i> , em escala semi-preparativa durante o isolamento de <b>S1</b> . Gradiente de eluição: 30-50% de B de 0 a 10 min, 50-100% de B até 12 min, mantendo-se a 100% até 15 min, retorno à condição inicial em 2 min e tempo de equilíbrio de 8 min. Vazão: 8,0 mL/min, 254 nm.   | 62 |
| <b>Figura 36</b> - Esquema da sequência de pulsos zgcppr, modificada com a adição de D2.   | 67 |
| <b>Figura 37</b> - Fórmula estrutural de (+)-ampelopsina ( <b>S1</b> ).  | 72 |
| <b>Figura 38</b> - Espectro de massas de alta resolução, ionização por electrospray no modo positivo de (+)-ampelopsina.   | 73 |
| <b>Figura 39</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de (+)-ampelopsina (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).  | 74 |
| <b>Figura 40</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de (+)-ampelopsina (150 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).   | 74 |
| <b>Figura 41</b> - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $J_{\text{CH}}$ - HSQC de (+)-ampelopsina ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 e 200 MHz).  | 75 |
| <b>Figura 42</b> - Comparação dos perfis cromatográficos dos órgãos de <i>Cassia ferruginea</i> , em escala analítica (Coluna NST C18, 250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ , 80 Å). Gradiente de eluição: 5-100% de B de 0 a 15 min, mantendo-se a 100% até 20 min, retorno à condição inicial em 1 min e tempo de equilíbrio de 9 min. Temperatura: 40 °C, vazão: 1,0 mL/min, injeção de 15 $\mu\text{L}$ , somatório de UV.                                | 75 |
| <b>Figura 43</b> - Regiões do espectro de RMN de $^1\text{H}$ das amostras utilizadas para o ensaio de seletividade. (A) região de 7,4 a 8,2 ppm referente aos hidrogênios de PI empregados para validação do ensaio de seletividade; (B) região de 5,5 a 9,0 ppm referente a todos os hidrogênios de PI e (+)-ampelopsina empregados para a quantificação; (C) região de 5,85 a 5,95 ppm referente ao hidrogênio de (+)-ampelopsina empregado |    |

para a quantificação (**PI**) padrão interno; (**F**) Extrato hidroetanólico da folha - muda; (**C**) Extrato hidroetanólico do caule – muda; (**FA**) Extrato hidroetanólico da folha – matriz; (**V**) Extrato hidroetanólico da vagem e (**FL**) Extrato hidroetanólico da flor.  
 ..... 77

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 44</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H das concentrações utilizadas na curva analítica do extrato hidroetanólico das folhas de muda de <i>C. ferruginea</i> , (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....   | 81  |
| <b>Figura 45</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H das concentrações utilizadas na curva analítica do extrato hidroetanólico do caule de muda de <i>C. ferruginea</i> , (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD). ....  | 82  |
| <b>Figura 46</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H das concentrações utilizadas na curva analítica do extrato hidroetanólico das folhas da matriz de <i>C. ferruginea</i> , (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD). ....  | 83  |
| <b>Figura 47</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H das concentrações utilizadas na curva analítica do extrato hidroetanólico da vagem da matriz de <i>C. ferruginea</i> , (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....   | 84  |
| <b>Figura 48</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H das concentrações utilizadas na curva analítica do extrato hidroetanólico das flores da matriz de <i>C. ferruginea</i> , (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....   | 85  |
| <b>Figura 49</b> - Curvas analíticas do padrão interno obtidas nos órgãos de <i>Cassia ferruginea</i> e no solvente puro (CD <sub>3</sub> OD) .....   | 86  |
| <b>Figura 50</b> - Gráfico de resíduos das curvas analíticas obtidas. ....  | 89  |
| <b>Figura 51</b> - Representação gráfica das curvas analíticas em solvente e na matriz para o padrão interno (benzoato de benzila).....   | 91  |
| <b>Figura 52</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H das concentrações empregadas para a validação do método - precisão (repetibilidade) .....   | 93  |
| <b>Figura 53</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H das concentrações e horas empregadas para a validação do método - precisão intermediária .....  | 95  |
| <b>Figura 54</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H comparando o parâmetro modificado (ns = 8) para a validação do método - robustez. Concentração utilizada: 0,5 mM.....   | 98  |
| <b>Figura 55</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H comparando o parâmetro modificado (T = 20 e 26 °C) para a validação do método - temperatura. Concentração utilizada: 0,5 mM. ....   | 99  |
| <b>Figura 56</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H obtido no software MestreNova para a validação do método - processamento de dados. Concentração utilizada: 0,5 mM.....  | 100 |
| <b>Figura 57</b> - Espectros de RMN de <sup>1</sup> H (600 MHz, MeOD- d <sub>4</sub> ): <b>A</b> ) (+)-ampelopsina; <b>B</b> ) Benzoato de Benzila (PI); <b>C</b> ) Nicotina. Sinais empregados para quantificação em análises de RMNq pelas abordagens de PI e ERETIC2. .... | 102 |
| <b>Figura 58</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H do extrato hidroetanólico das folhas de muda de <i>C. ferruginea</i> , pela abordagem de PI. (Tripicata 1).....   | 105 |
| <b>Figura 59</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H do extrato hidroetanólico das folhas de muda de <i>C. ferruginea</i> , pela abordagem de PI. (Tripicata 2).....   | 106 |
| <b>Figura 60</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H do extrato hidroetanólico das folhas de muda de <i>C. ferruginea</i> , pela abordagem de PI. (Tripicata 3).....   | 107 |
| <b>Figura 61</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H do extrato hidroetanólico do caule de muda de <i>C. ferruginea</i> , pela abordagem de PI. (Tripicata 1).....   | 108 |
| <b>Figura 62</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H do extrato hidroetanólico do caule de muda de <i>C. ferruginea</i> , pela abordagem de PI. (Tripicata 2).....   | 109 |
| <b>Figura 63</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H do extrato hidroetanólico do caule de muda de <i>C. ferruginea</i> , pela abordagem de PI. (Tripicata 3).....   | 110 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 64</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H do extrato hidroetanólico das folhas da matriz de <i>C. ferruginea</i> , pela abordagem de PI. (Tripicata 1)..... | 111 |
| <b>Figura 65</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H do extrato hidroetanólico das folhas da matriz de <i>C. ferruginea</i> , pela abordagem de PI. (Tripicata 2)..... | 112 |
| <b>Figura 66</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H do extrato hidroetanólico das folhas da matriz de <i>C. ferruginea</i> , pela abordagem de PI. (Tripicata 3)..... | 113 |
| <b>Figura 67</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H do extrato hidroetanólico das vagens da matriz de <i>C. ferruginea</i> , pela abordagem de PI. (Tripicata 1)..... | 114 |
| <b>Figura 68</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H do extrato hidroetanólico das vagens da matriz de <i>C. ferruginea</i> , pela abordagem de PI. (Tripicata 2)..... | 115 |
| <b>Figura 69</b> - Espectro de RMNq de <sup>1</sup> H do extrato hidroetanólico das vagens da matriz de <i>C. ferruginea</i> , pela abordagem de PI. (Tripicata 3)..... | 116 |

### **CAPÍTULO III - Prospecção de novos ativos citotóxicos e larvicidas**

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 70</b> - <i>Albizia niopoides</i> : (a) muda; (b) folha; (c) distribuição geográfica no Brasil....  | 121 |
| <b>Figura 71</b> - <i>Enterolobium contortisiliquum</i> : (a) árvore adulta; (b) muda; (c) fruto; (d) flor; (e) folha; (f) distribuição geográfica no Brasil.....   | 122 |
| <b>Figura 72</b> - <i>Leucochloron incuriale</i> : a) árvore adulta; (b) muda; (c) sementes e vagem; (d) flor; (e) folha; (f) distribuição geográfica no Brasil. ....   | 123 |
| <b>Figura 73</b> - Ensaio de MTT .....  | 126 |
| <b>Figura 74</b> - Cromatograma do fracionamento da fração <b>G2TFA-1B</b> , proveniente do extrato aquoso das folhas de timburi, em escala preparativa. Gradiente de eluição: 5 - 100 % de B de 0 a 20 min, mantendo-se a 100% até 25 min, retorno à condição inicial em 2 min e tempo de equilíbrio de 9 min. Vazão: 8,0 mL/min, 275 e 300 nm. .... | 130 |
| <b>Figura 75</b> - Cromatograma do fracionamento da fração <b>G2TFA-3B</b> , proveniente do extrato aquoso das folhas de timburi, em escala preparativa. Gradiente de eluição: 5 - 100 % de B de 0 a 30 min, mantendo-se a 100% até 45 min, retorno à condição inicial em 2 min e tempo de equilíbrio de 13 min. Vazão: 8,0 mL/min, 254 nm.....       | 132 |
| <b>Figura 76</b> - Sequência de fracionamento das folhas das mudas de timburi. ....   | 134 |
| <b>Figura 77</b> - Sequência de fracionamento do caule das mudas de timburi.....  | 137 |
| <b>Figura 78</b> - Sequência de fracionamento da raiz das mudas de timburi.....   | 140 |
| <b>Figura 79</b> - Perfil cromatográfico dos órgãos de timburi ( <b>1A</b> : extratos etanólicos dos órgãos de timburi; <b>1B</b> : extratos aquosos dos órgãos de timburi) e angico-rajado ( <b>2A</b> : extratos etanólico dos órgãos de angico-rajado e <b>2B</b> : extratos aquosos dos órgãos de angico-rajado). Detector: Somatória UV.....     | 146 |
| <b>Figura 80</b> - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras na concentração única de 50 µg/mL dos órgãos de angico-rajado e timburi. ....   | 147 |
| <b>Figura 81</b> - Perfil cromatográfico das frações provenientes do extrato aquoso das folhas (muda) de timburi. Detector: Somatória UV.....   | 148 |
| <b>Figura 82</b> - Atividade citotóxica – CI <sub>50</sub> (µg/mL) das frações obtidas do extrato aquoso das folhas (muda) de timburi. ....   | 149 |
| <b>Figura 83</b> - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras na concentração única de 25 µg/mL e 5 µg/mL das frações provenientes da fração <b>G2TFA-1B</b> ...  | 150 |



|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 84</b> - Perfil cromatográfico das subfrações provenientes da fração G2TFA-3B. Detector: Somatória UV. ....   | 150 |
| <b>Figura 85</b> - Atividade citotóxica – CI <sub>50</sub> (µg/mL) das frações obtidas do fracionamento da fração G2TFA-3B. ....  | 151 |
| <b>Figura 86</b> - Perfil cromatográfico das frações provenientes do extrato etanólico das folhas (muda) de timburi. Detector: Somatória UV. ....                                       | 152 |
| <b>Figura 87</b> - Atividade citotóxica – CI <sub>50</sub> (µg/mL) das frações obtidas do extrato etanólico das folhas (muda) de timburi. ....  | 152 |
| <b>Figura 88</b> - Perfil cromatográfico das frações ativas do extrato etanólico das folhas de mudas de timburi. Detector: Somatória UV. ....   | 153 |
| <b>Figura 89</b> - Concentração inibitória média (CI <sub>50</sub> ) das frações ativas triadas em três linhagens tumorais (HCT116, SNB19 e PC3) e linhagem não tumoral (L929). ....    | 153 |
| <b>Figura 90</b> - Perfil cromatográfico das frações provenientes do extrato aquoso do caule (muda) de timburi. Detector: Somatória UV. ....  | 154 |
| <b>Figura 91</b> - Atividade citotóxica – CI <sub>50</sub> (µg/mL) das frações obtidas do extrato aquoso do caule (muda) de timburi. ....   | 155 |
| <b>Figura 92</b> - Perfil cromatográfico das frações provenientes do extrato etanólico do caule (muda) de timburi. Detector: Somatória UV. ....   | 155 |
| <b>Figura 93</b> - Atividade citotóxica – CI <sub>50</sub> (µg/mL) das frações obtidas do extrato etanólico do caule (muda) de timburi. ....  | 156 |
| <b>Figura 94</b> - Atividade citotóxica – CI <sub>50</sub> (µg/mL) das frações obtidas do extrato hexânico do caule (muda) de timburi. ....   | 157 |
| <b>Figura 95</b> - Perfil cromatográfico das frações provenientes do extrato aquoso da raiz (muda) de timburi. Detector: Somatória UV. ....   | 158 |
| <b>Figura 96</b> - Ampliação entre 6,0 - 13,0 min dos perfis cromatográficos das frações ativas provenientes do extrato aquoso da raiz de mudas de timburi. Detector: UV (254 nm). .... | 158 |
| <b>Figura 97</b> - Espectros de UV das frações G2TRA-1e G2TRA-3 provenientes do extrato aquoso da raiz (muda) de timburi. ....  | 159 |
| <b>Figura 98</b> - Atividade citotóxica – CI <sub>50</sub> (µg/mL) das frações obtidas do extrato aquoso da raiz (muda) de timburi. ....  | 160 |
| <b>Figura 99</b> - Perfil cromatográfico das frações provenientes do extrato aquoso da raiz (muda) de timburi. Detector: Somatória UV. ....   | 161 |
| <b>Figura 100</b> - Atividade citotóxica – CI <sub>50</sub> (µg/mL) das frações obtidas do extrato etanólico da raiz (muda) de timburi. ....  | 162 |
| <b>Figura 101</b> - Atividade citotóxica – CI <sub>50</sub> (µg/mL) das frações obtidas do extrato hexânico da raiz (muda) de timburi. ....   | 163 |
| <b>Figura 102</b> - Comparação dos perfis cromatográficos das frações Ativas dos órgãos de timburi. Detector: Somatória de UV. ....   | 165 |

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I - INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DE ESPÉCIES NATIVAS RECOMENDADAS PARA O REFLORESTAMENTO NO ESTADO DE SÃO PAULO

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1-</b> Código RENASEM das espécies produzidas pelo Viveiro Camará. ....  | 30 |
| <b>Tabela 2</b> – Dados das matrizes coletadas. ....   | 31 |
| <b>Tabela 3</b> - Gradiente segmentado otimizado utilizado nas análises CLAE-UV-DAD-CAD, em coluna Kinitex XB-C18, 50 x 2.1 mm, 2,6 $\mu$ , 100 Å, vazão de 0,5mL/min, temperatura de 25° C. Volume injetado: 5 $\mu$ L..... | 35 |
| <b>Tabela 4</b> - Parâmetros espectrais empregados nas medidas espectroscópicas dos extratos aquosos e etanólicos das espécies estudadas. ....   | 36 |
| <b>Tabela 5</b> - Massas do material vegetal e massas e rendimentos dos extratos obtidos da Matriz vegetal das espécies estudadas.....   | 37 |
| <b>Tabela 6</b> - Massas e rendimento dos extratos obtidos em ordem decrescente de polaridade (Água, etanol, hexano) das folhas de mudas das 22 espécies de Fabaceae em estudo. ....   | 40 |
| <b>CAPÍTULO II - Seleção de novas fontes de moléculas valiosas</b>   |    |
| <b>Tabela 7</b> - Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade. ....  | 59 |
| <b>Tabela 8</b> - Gradiente utilizado para o isolamento de <b>S1</b> no extrato etanólico das folhas de mudas de <i>Cassia ferruginea</i> .....  | 61 |
| <b>Tabela 9</b> - Condições experimentais empregadas na extração por sonicação (Elmasonic S 60 Hz, Elma®) dos órgãos de <i>Cassia ferruginea</i> . ....  | 63 |
| <b>Tabela 10</b> - Massas e rendimento dos extratos hidroetanolicos obtidos de mudas e matriz de <i>Cassia ferruginea</i> .....  | 63 |
| <b>Tabela 11</b> - Gradiente exploratório utilizado na análise CLAE-UV-DAD, em coluna NST – C18 (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ , 80 Å), vazão de 1,0 mL/min. Volume injetado: 15 $\mu$ L...  | 63 |
| <b>Tabela 12</b> - Massas dos extratos hidroetanólicos dos órgãos de mudas e matriz de <i>Cassia ferruginea</i> .....  | 64 |
| <b>Tabela 13</b> - Massas dos extratos hidroetanólicos dos orgãos de mudas e matriz de <i>C. ferruginea</i> e volume adicionado e a massa equivalente de PI para as medidas de RMNq .....                                    | 65 |
| <b>Tabela 14</b> - Parâmetros de aquisição de espectros de RMN de <sup>1</sup> H (Bruker).....   | 68 |
| <b>Tabela 15</b> - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de <b>S1</b> e da (+)-ampelopsina (CHATURVEDULA & HUANG, 2013).....  | 73 |
| <b>Tabela 16</b> - Dados utilizados para as curvas analíticas em solvente e na matriz para o padrão interno (benzoato de benzila).....   | 78 |
| <b>Tabela 17</b> – Dados das curvas analíticas em solvente e na matriz para o padrão interno (benzoato de benzila).....  | 86 |
| <b>Tabela 18</b> - ANOVA da regressão. ....  | 88 |
| <b>Tabela 19</b> - Resultado do efeito matriz induzido pela matriz.....  | 90 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 20</b> - Resultados obtidos no ensaio de repetibilidade para validação do método de RMNq de <sup>1</sup> H. ....  | 92  |
| <b>Tabela 21</b> - Resultados obtidos no ensaio de precisão intermediária para validação do método de RMNq de <sup>1</sup> H.....   | 94  |
| <b>Tabela 22</b> – Resultados obtidos no ensaio de Exatidão para validação do método de RMNq de <sup>1</sup> H. ....  | 96  |
| <b>Tabela 23</b> – Resultados encontrados no ensaio de robustez para validação do método de RMNq de <sup>1</sup> H. ....  | 97  |
| <b>Tabela 24</b> - Teor de (+)-ampelopsina nos extratos hidroetanólicos de <i>Cassia ferruginea</i> determinados via RMNq, pela abordagem comparativa de PI e ERETIC2. .... | 103 |
| <b>Tabela 25</b> - Teor de (+)-ampelopsina no material seco de mudas e matriz de <i>Cassia ferruginea</i> . ....  | 104 |

### **CAPÍTULO III - Prospecção de novos ativos citotóxicos e larvicidas**

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 26</b> - Massas e rendimento dos extratos obtidos dos órgãos de mudas e matriz de timburi e angico rajado. ....  | 128 |
| <b>Tabela 27</b> - Frações provenientes do extrato aquoso das folhas de mudas de timburi.....  | 129 |
| <b>Tabela 28</b> - Gradiente exploratório utilizado na análise CLAE-UV-DAD, em coluna NST – C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ, 80 Å), vazão de 1,0 mL/min. Volume injetado: 15 μL. ....   | 130 |
| <b>Tabela 29</b> – Massas das frações provenientes da fração <b>G2TFA-1B</b> .....   | 131 |
| <b>Tabela 30</b> – Massas das frações provenientes da fração <b>G2TFA-3B</b> .....   | 132 |
| <b>Tabela 31</b> - Frações provenientes do extrato etanólico das folhas de mudas de timburi. ....  | 133 |
| <b>Tabela 32</b> - Frações provenientes do extrato aquoso do caule de mudas de timburi. ....   | 135 |
| <b>Tabela 33</b> - Frações provenientes do extrato etanólico do caule de mudas de timburi. ....  | 136 |
| <b>Tabela 34</b> - Frações provenientes do extrato aquoso da raiz de mudas de timburi. ....  | 138 |
| <b>Tabela 35</b> - Frações provenientes do extrato etanólico do caule de mudas de timburi. ....  | 139 |
| <b>Tabela 36</b> – Número de larvas mortas na concentração única de 1000 ppm. ....   | 141 |
| <b>Tabela 37</b> - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras na concentração única de 50 μg/mL. Valores são média ± DPM (Desvio Padrão da Média). Estão destacadas em vermelhos as amostras mais ativas. .... | 143 |
| <b>Tabela 38</b> - Índice de Seletividade (IS) da fração <b>G2TRA - 1</b> nas células estudadas, calculados em relação CI <sub>50</sub> linhagem não tumoral/ CI <sub>50</sub> linhagens tumorais. ....                              | 161 |
| <b>Tabela 39</b> - Índice de Seletividade (IS) da fração <b>G2TRE - 3</b> nas células estudadas, calculados em relação CI <sub>50</sub> linhagem não tumoral/ CI <sub>50</sub> linhagens tumorais. ....                              | 162 |
| <b>Tabela 40</b> - Índice de Seletividade (IS) da fração <b>G2TRH - FHM</b> nas células estudadas, calculados em relação CI <sub>50</sub> linhagem não tumoral/ CI <sub>50</sub> linhagens tumorais. ....                            | 164 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| ACN                         | Acetonitrila   |
| AcOEt                       | Acetato de etila   |
| ANOVA                       | Análise de variância   |
| ANVISA                      | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                     |
| ATCC                        | <i>American Type Culture Collection</i>                      |
| CAD                         | Detector de aerossol carregado                               |
| CLAE                        | Cromatografia líquida de alta eficiência                     |
| CV                          | Coefficiente de variação                                     |
| DAD                         | Detector de arranjo de diodos (Diode array detector)         |
| DMEM                        | Meio Eagle modificado por Dulbecco                           |
| DMSO                        | Dimetil sulfóxido  |
| DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> | Dimetil sulfóxido deuterado                                  |
| DPR                         | Desvio padrão relativo                                       |
| <i>d</i>                    | Dupleto  |
| <i>dd</i>                   | Duplo dupleto  |
| EFS                         | Extração em fase sólida                                      |
| ERETIC2                     | <i>Electronic to Access In Vivo Concentration 2</i>          |
| Hex                         | n-Hexano   |
| HCT-116                     | Linhagem celular de cólon humano                             |
| HPLC                        | <i>High performance liquid chromatography</i>                |
| HRMS                        | <i>High resolution mass spectrometry</i>                     |
| IS                          | Índice de seletividade                                       |
| IV                          | Infravermelho  |
| <i>J</i>                    | Constante de acoplamento                                     |
| L929                        | Linhagem celular de fibroblasto de pulmão murinho            |
| MTT                         | 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium |
| <i>m/z</i>                  | Razão massa/carga  |
| MeOH                        | Metanol  |
| MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> | Metanol deuterado  |
| MS/MS                       | Espectrometria de massas sequencial                          |
| ns                          | Número de scans/ número de transientes                       |
| PC3                         | Linhagem celular de próstata humano                          |
| PI                          | Padrão interno   |

|                  |   |
|------------------|---|
| PULCON           | <i>Pulse Length–based Concentration determination</i> |
| RMN <sub>q</sub> | Ressonância magnética nuclear quantitativa            |
| RPMI             | Meio de cultura de tecido animal desidratado          |
| s                | simpleto  |
| SF-295 /         | Linhagem celular de glioblastoma humano               |
| SNB-19           | Linhagem celular de glioblastoma humano               |
| TSP              | Trimetilsilil propiônico                              |
| tR               | Tempo de retenção                                     |
| UHPLC            | <i>Ultra high performance liquid chromatography</i>   |
| UV/Vis           | Ultravioleta/Visível                                  |
| δ                | Deslocamento químico                                  |

## SUMÁRIO

### CAPITULO I - INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DE ESPÉCIES NATIVAS RECOMENDADAS PARA O REFLORESTAMENTO NO ESTADO DE SÃO PAULO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>  | <b>25</b> |
| 1.1 Fabaceae como nova fonte de moléculas bioativas e/ou com valor agregado   | 26        |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>  | <b>28</b> |
| 2.1 Objetivos gerais  | 28        |
| 2.1 Objetivos específicos   | 28        |
| <b>3. PARTE EXPERIMENTAL GERAL .....</b>                                      | <b>29</b> |
| 3.1 Material botânico   | 29        |
| 3.2 Código de identificação das espécies estudadas                            | 32        |
| 3.3 Método de extração  | 33        |
| 3.4 Análises CLAE-UV-DAD-CAD dos extratos aquosos e etanólicos obtidos.       | 35        |
| 3.5 Medidas espectroscópicas de RMN dos extratos obtidos.                     | 36        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>37</b> |
| 4.1 Método de extração  | 37        |
| 4.2 Análises CLAE-UV-DAD-CAD dos extratos aquosos e etanólicos obtidos        | 42        |
| 4.3 Medidas espectroscópicas de RMN dos extratos aquosos e etanólicos obtidos | 48        |
| <b>5. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO .....</b>   | <b>52</b> |

### CAPÍTULO II - Seleção de novas fontes de moléculas valiosas

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA.....</b>  | <b>54</b> |
| 1.1 Análise quantitativa através de RMN de <sup>1</sup> H  | 58        |
| 1.2 Validação analítica  | 59        |
| 1.3 <i>Cassia ferruginea</i> (Schrad.) DC.   | 60        |
| <b>2. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>   | <b>61</b> |
| 2.1 Identificação do composto majoritário produzido por <i>Cassia ferruginea</i>                     | 61        |
| 2.2 Investigação de S1 em outros órgãos de <i>Cassia ferruginea</i> .                                | 62        |
| 2.3 Desenvolvimento da metodologia para RMNq   | 64        |
| 2.3.2 Preparo das soluções das amostras para a quantificação da (+)-ampelopsina pelo método de PI    | 65        |
| 2.3.3 Preparo das soluções das amostras para quantificação da (+)-ampelopsina pela abordagem ERETIC2 | 66        |
| 2.3.4 Análise por RMNq   | 66        |
| 2.3.4.1 Estimativa do tempo de relaxação longitudinal (T <sub>1</sub> )                              | 67        |
| 2.3.4.2 Definição de parâmetros de aquisição   | 67        |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 2.3.5     | Validação da metodologia   | 68         |
| 2.3.5.1   | Seletividade   | 68         |
| 2.3.5.2   | Linearidade, intervalo e efeito matriz                                   | 68         |
| 2.3.5.3   | Precisão (Repetibilidade e intermediária)                                | 69         |
| 2.3.5.4   | Exatidão   | 70         |
| 2.3.5.5   | Robustez   | 70         |
| <b>3.</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                       | <b>71</b>  |
| 3.1       | Identificação do composto majoritário produzido por <i>C. ferruginea</i> | 71         |
| 3.2       | Investigação de S1 em outros órgãos de <i>C. ferruginea</i>              | 75         |
| 3.3       | Validação do método analítico  | 76         |
| 3.3.1     | Seletividade   | 76         |
| 3.3.2     | Linearidade e intervalo  | 76         |
| 3.3.2.1   | Precisão (Repetibilidade)  | 92         |
| 3.3.2.2   | Precisão intermediária   | 94         |
| 3.3.2.3   | Exatidão   | 96         |
| 3.3.2.4   | Robustez   | 96         |
| 3.4       | Quantificação da (+)-ampelopsina pelas abordagens de PI e ERETIC2        | 101        |
| <b>4.</b> | <b>CONCLUSÃO DO CAPÍTULO.....</b>  | <b>117</b> |

### **CAPÍTULO III - Prospecção de novos ativos citotóxicos e larvicidas**

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| <b>1.</b> | <b>CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA.....</b>  | <b>119</b> |
| 1.1       | Espécies de Fabaceae que se destacaram como fonte de moléculas bioativas  | 120        |
| 1.1.1     | <i>Albizia hassleri</i> (Chodat) Burkart  | 120        |
| 1.1.2     | <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong   | 121        |
| 1.1.3     | <i>Leucochloron incuriale</i> (Vell.) Barneby & J.W.Grimes  | 123        |
| <b>2.</b> | <b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>  | <b>124</b> |
| 2.1       | Avaliação da atividade larvicida contra <i>Aedes aegypti</i> de extratos de espécies de Fabaceae  | 124        |
| 2.2       | Prospecção de novos ativos citotóxicos em linhagens tumorais humanas  | 124        |
| 2.3       | Índice de seletividade  | 126        |
| 2.4       | Investigação da atividade citotóxica em outros órgãos de espécies ativas  | 127        |
| 2.5       | Estudo fitoquímico e citotóxico dos extratos ativos dos órgãos das mudas de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong – timburi | 129        |
| 2.5.1     | Estudo químico e citotóxico do extrato aquoso das folhas  | 129        |
| 2.5.1.1   | Estudo químico e citotóxico da fração G2TFA-1B  | 130        |
| 2.5.1.2   | Estudo químico e citotóxico da fração G2TFA-3B  | 131        |
| 2.5.2     | Estudo químico e citotóxico do extrato etanólico das folhas de timburi.   | 132        |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 2.5.3     | Estudo químico e citotóxico do extrato aquoso do caule de timburi.  | 135        |
| 2.5.4     | Estudo químico e citotóxico do extrato etanólico do caule das mudas de timburi  | 135        |
| 2.5.5     | Estudo químico e citotóxico do extrato hexânico do caule de timburi.  | 136        |
| 2.5.6     | Estudo químico e citotóxico do extrato aquoso da raiz de timburi.   | 138        |
| 2.5.7     | Estudo químico e citotóxico do extrato etanólico da raiz de timburi   | 138        |
| 2.5.8     | Estudo químico e citotóxico do extrato hexânico da raiz de timburi  | 139        |
| <b>3.</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>141</b> |
| 3.1       | Avaliação da atividade larvicida contra <i>Aedes aegypti</i> de espécies de Fabaceae  | 141        |
| 3.2       | Prospecção de novos ativos citotóxicos  | 142        |
| 3.3       | Investigação da atividade citotóxica em outros órgãos de espécies ativas  | 145        |
| 3.4       | Estudo fitoquímico e citotóxico dos extratos ativos dos órgãos das mudas de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong – timburi | 148        |
| 3.4.1     | Estudo químico e citotóxico do extrato aquoso das folhas de mudas de timburi  | 148        |
| 3.4.1.1   | Estudo químico e citotóxico da fração G2TFA-1B  | 149        |
| 3.4.1.2   | Estudo químico e citotóxico da fração G2TFA-3B  | 150        |
| 3.4.2     | Estudo químico e citotóxico do extrato etanólico das folhas de mudas de timburi.  | 152        |
| 3.4.3     | Estudo químico e citotóxico do extrato aquoso do caule de mudas de timburi  | 154        |
| 3.4.4     | Estudo químico e citotóxico do extrato etanólico do caule de mudas de timburi   | 155        |
| 3.4.5     | Estudo químico e citotóxico do extrato hexânico do caule de mudas de timburi  | 157        |
| 3.4.6     | Estudo químico e citotóxico do extrato aquoso da raiz de mudas de timburi   | 157        |
| 3.4.7     | Estudo químico e citotóxico do extrato etanólico da raiz de mudas de timburi  | 161        |
| 3.4.8     | Estudo químico e citotóxico do extrato hexânico da raiz de mudas de timburi   | 163        |
| 3.4.9     | Comparação dos perfis cromatográficos das frações Ativas dos órgãos de timburi  | 164        |
| <b>4.</b> | <b>CONCLUSÃO DO CAPÍTULO.....</b>   | <b>166</b> |
| <b>5.</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>   | <b>167</b> |
| <b>6.</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>170</b> |



# Capítulo I

## Investigação do potencial de espécies nativas recomendadas para o reflorestamento no Estado de São Paulo

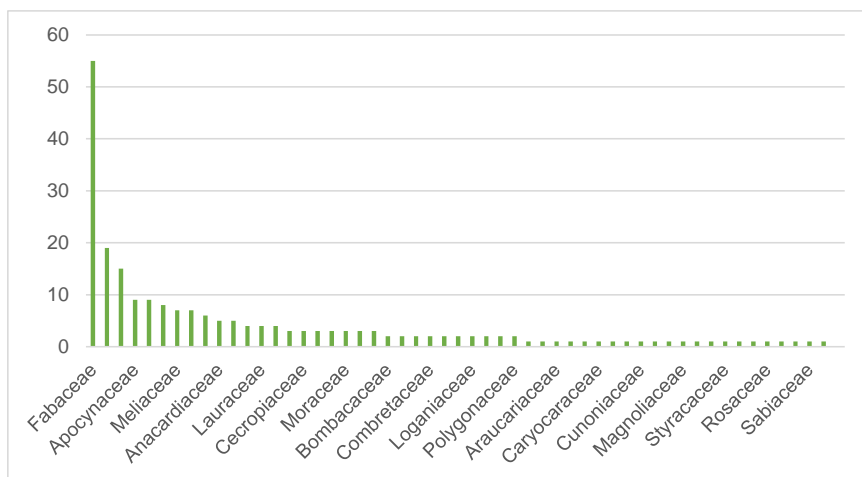


## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O estado de São Paulo era recoberto, até recentemente, por vegetação exuberante dividida principalmente em dois biomas: Mata Atlântica e Cerrado. Entretanto, devido ao rápido desenvolvimento agropecuário, industrial e populacional iniciado na segunda metade do século XIX, restam hoje APENAS 17,5% da vegetação original (INSTITUTO FLORESTAL, 2010), concentrados nas encostas da Serra do Mar. Problemas resultantes da exploração extensiva e mal planejada da terra começam a ser sentidos – redução dos níveis dos lençóis freáticos que abastecem a sociedade paulista, degradação de águas superficiais e perda de biodiversidade.

A legislação ambiental brasileira, particularmente o artigo 12 da LEI N° 12.651, de maio de 2012 (BRASIL, 2012), obriga os proprietários rurais a manter uma área com cobertura de vegetação nativa, denominada de Reserva Legal. No estado de São Paulo essa área deve corresponder a 20% da área total da propriedade rural. Neste sentido, o governo do estado vem realizando algumas ações que merecem destaque, como por exemplo, a resolução SMA/SP 32, de 03 de abril de 2014, que estabelece orientações, diretrizes e critérios sobre restauração ecológica no Estado de São Paulo, e dá providências correlatas. Nesta resolução, como nas anteriores, fica orientado o reflorestamento heterogêneo em áreas degradadas, com espécies nativas, as quais estão elencadas em uma lista oficial do Instituto de Botânica. Nesta lista, a família Fabaceae apresenta o maior número de espécies nativas recomendadas para o reflorestamento de áreas degradadas, cerca de 25% do total (**Figura 1**, pág. 25) (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2015).

Neste seguimento, o Viveiro de Mudanças Florestais Camará<sup>®</sup>, localizado em Ibaté, na região central do estado de São Paulo, dedica-se exclusivamente ao segmento florestal, tendo como principal objetivo fornecer mudas nativas de qualidade para o reflorestamento.



Fonte: Instituto de Botânica do Estado de São Paulo (<http://botanica.sp.gov.br/cerad/>)

**Figura 1** - Gráfico de representatividade do número de espécies nativas por famílias no estado de São Paulo, indicadas para o reflorestamento.

Ainda assim, apesar das políticas de incentivo para o reflorestamento de áreas degradadas do governo do estado de São Paulo, cerca de 80 % das propriedades rurais apresentam uma porcentagem menor do que a exigida nas áreas de reserva legal ( $\text{Área}_{\text{RL}} < 20\%$ ) (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2009). Tendo em vista, valorizar as áreas de reflorestamento, bem como, aprimorar o conhecimento dessas espécies e considerando a grande representatividade da família Fabaceae (Leguminosae) em termos de número de espécies nativas, e a disponibilidade de acesso a mudas e matrizes através do Viveiro Camará – Ibaté-SP, este trabalho propôs o estudo químico de algumas espécies de Fabaceae indicadas para reflorestamento no Estado de São Paulo.

### 1.1 Fabaceae como nova fonte de moléculas bioativas e/ou com valor agregado

Fabaceae (Leguminosae) é família vegetal reconhecida pela grande diversidade em metabólitos secundários, sendo ainda, uma fonte inspiradora para obtenção de moléculas que podem ser exploradas economicamente. Trata-se da terceira maior família das angiospermas, sendo representada por três subfamílias (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae), com 727 gêneros e 19.325 espécies descritas (MABBERLY, 1997; LEWIS et. al.,2005). O Brasil é o país da América do Sul onde está família é considerada uma das mais ricas em espécies, compreendendo cerca de 2.100 espécies e 188 gêneros, dos quais 31 são endêmicos, distribuídos em quase todas as formações vegetais brasileiras (BARROSO *et al.*, 1991; LIMA, 2000). Em 2011, Wanderley *et al.* concluíram um *checklist* das espermatófitas do Estado de São Paulo, no qual a família Fabaceae (Leguminosae) aparece em terceiro lugar, com 513 espécies, ficando atrás apenas das famílias Orchidaceae (797 espécies) e Asteraceae (676

espécies). Estas famílias juntamente com a Poaceae, foram as mais representativas, somando 34% das espécies de espermatófitas do estado de São Paulo.

Quimicamente Fabaceae é caracterizada pela diversidade funcional e química de metabólitos secundários, entre eles alcaloides guanidínicos (BOLZANI *et al.*, 1995), quinolizidínicos (LEI *et al.*, 2014), pirrolizidínicos (NETO, *et al.*, 2016); flavonoides (CARVALHO *et al.*, 2011), flavonolignanas (NASCIMENTO *et al.*, 2012), pterocarpanos (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2008), rotenoides (BIRCH *et al.*, 1985), cumarinas (Mebe & Makuhunga, 1992) e outros compostos fenólicos, além de terpenóides (SILVA *et al.*, 2006) e poliketídios (SOB *et al.*, 2008), entre outros.

Farmacologicamente esta família também apresenta um destaque considerável, devido aos usos populares e comerciais. Neste sentido, em 2009 o Ministério da Saúde divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennis), contendo 71 espécies de plantas para uso terapêutico. Destas aproximadamente 11% pertence à família Fabaceae, realçando o uso medicinal popular desta família, entre as quais pode-se citar *Bauhinia forficata* (Pata-de-vaca), utilizada para o tratamento de diabetes, *Caesalpinia férrea* (Pau-ferro), útil no tratamento de úlceras gástricas, *Dalbergia subcymosa* (Verônica), usada no tratamento para anemia ferropriva e *Trifolium pratenses* (Trevo-vermelho), usada no tratamento da gota. Cientificamente, já foram relatados diversos efeitos biológicos e/ou farmacológicos para espécies desta família, entre eles, o efeito citotóxico em células tumorais de crânio de pulmão (NGNINTEDO *et al.*, 2016), em carcinoma hepatocelular (HAGGAG *et al.*, 2011), crânio cervical e colón (LIU, *et al.*, 2015), entre outros. E também são relatados o efeito larvicida contra *Aedes aegypti* (RODRIGUES *et al.*, 2014; PLUEMPANUPAT *et al.*; 2013; YANG *et al.*, 2003).

Finalmente, além da grande importância química e farmacológica, esta família apresenta um potencial econômico bastante conhecido, incluindo variedades alimentícias, medicinais, madeiras, ornamentais, produtoras de fibras e óleos (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2004). Destacam-se também ecologicamente, por sua habilidade em associar-se a bactérias fixadoras de nitrogênio (SPRENT, 2001) e por recuperar áreas degradadas, utilizando a própria vegetação para proteger o solo da erosão (BERTONI & LOMBARDI NETO 2008). Portanto a opção por esta família é justificada pelo fato desta apresentar uma grande diversidade funcional e química de metabólitos secundários. Além disso, espécies de Fabaceae recomendadas para o reflorestamento no Estado de São Paulo são abundantes, o que facilita a coleta das mesmas.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram selecionadas para estudos químico e/ou biológico 22 espécies de Fabaceae recomendadas para reflorestamentos no Estado de São Paulo e disponíveis no Viveiro Camará ® (Ibaté, SP), com o objetivo de identificar novos metabólitos ativos e/ou novas fontes de substâncias com valor econômico já reconhecido, para assim favorecer o uso dessas espécies na recuperação de áreas devastadas, estimulando programas de uso sustentável e rentável dessas áreas.

Na primeira parte do trabalho foram obtidos extratos de baixa, média e alta polaridade (hexânico, etanólico e aquoso) das folhas de mudas cada espécie. Utilizou-se duas estratégias de extração: estratégia 1, com ordem crescente de polaridade de extração consecutiva (hexano, etanol e água) e estratégia 2, com ordem decrescente de polaridade de extração consecutiva (água, etanol e hexano). Os rendimentos das duas estratégias foram semelhantes, entretanto os perfis químicos observados por RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos de média polaridade (etanólicos) na segunda estratégia apresentaram menor complexidade na região característica de hidrogênios de açúcar, uma vez que a extração inicial com água remove esses compostos de menor interesse nesta abordagem.

Em seguida, os extratos de média e alta polaridade foram submetidos a análise cromatográfica por CLAE-UV-DAD-CAD e por RMN  $^1\text{H}$ . A análise minuciosa desses dados levou à seleção da espécie *Cassia ferruginea* para a realização da segunda etapa deste estudo, que consistiu na identificação e quantificação de seu composto majoritário presente nas folhas e outros órgãos da planta. O objetivo desta etapa foi agregar valor econômico à espécie em questão a partir da identificação do composto majoritário já com uso em produtos comerciais e desenvolvimento de metodologia simples e eficaz para sua identificação e quantificação. Assim, o composto majoritário foi isolado por CLAE semi-preparativa e analisado por RMN e espectrometria de massas, o que possibilitou identifica-lo como sendo a (+) ampelopsina, uma substância que apresenta importantes atividades farmacológicas e biológicas, incluindo anticancerígeno, efeitos cardioprotetores e hepatoprotetores.

Esta substância foi detectada em outros órgãos da muda e matriz e quantificada por RMN de  $^1\text{H}$  por dois métodos: Método 1 (com uso de padrão interno, benzoato de benzila) e Método 2 (abordagem ERETIC2 com padrão externo, nicotina). O extrato hidroetanólico da flor de *C. ferruginea* apresentou teor de (+) ampelopsina abaixo da faixa de trabalho, não podendo ser quantificado por nenhum dos dois métodos. Para os demais órgãos da planta os resultados obtidos com ambos os métodos foram semelhantes, mas recomenda-se o uso do

ERECTIC2 por ser mais simples, rápido e evitar a interação entre amostra e padrão de referência. O método de padrão interno foi validado de acordo com Resolução- RDC n°- 166 da ANVISA. Os teores de (+)-ampelopsina encontrados no material seco de folhas das mudas (11,6 %) e matriz (7,0 %) de *C. ferruginea* configuram esta espécie vegetal, tanto a muda quanto adulta, como uma nova fonte comercial para esta substância.

Na terceira etapa desse estudo foram avaliadas atividades biológicas (larvicida e citotóxica) com as folhas de mudas das 22 espécies selecionadas na primeira etapa. Dessas, apenas duas espécies, *Leucochloron incuriale*(Vell.) Benth (angico-rajado) e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (timburi), representando 9,1 % das espécies testadas, apresentaram atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. Quanto a atividade citotóxica, o *screening* indicou três espécies com potencial citotóxico: *Albizia niopoides* (Benth) Burkat (farinha-seca), *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (timburi) e *Leucochloron incuriale*(Vell.) Benth. (angico-rajado), representando 13,6% das plantas estudadas, sendo que as duas últimas foram selecionadas para avaliação citotóxica de outros órgãos além das folhas. Em geral, os órgãos de timburi apresentaram maior atividade que os órgãos de angico-rajado. Logo, timburi foi escolhido para realização do fracionamento cromatográfico e avaliação citotóxica de suas frações e/ou substâncias isoladas a partir de suas folhas, caule e raiz das mudas. Após o fracionamento, 17 frações dos órgãos de mudas apresentaram citotoxicidade interessantes, além de, apresentarem seletividade frente a linhagem não-tumoral L929 (fibroblasto de pulmão murinho). Destas frações, foi possível calcular o índice de seletividade frente as três células tumorais (HCT116, SNB-19 e PC3) para três frações obtidas das raízes: G2TRA- 1 ( $IS_{HCT116} = 10,08$ ;  $IS_{SNB-19} = 5,23$  e  $IS_{PC3} = 8,63$ ), G2TRE-3 ( $IS_{HCT116} = 16,01$ ;  $IS_{SNB-19} = 8,17$  e  $IS_{PC3} = 15,33$ ) e G2TRH-FHM ( $IS_{HCT116} = 21,60$ ;  $IS_{SNB-19} = 12,90$  e  $IS_{PC3} = 19,96$ ).

Portanto, através deste trabalho vários caminhos foram abertos para diversas pesquisas, como: isolamento e identificação dos compostos bioativos das frações que apresentaram citotoxicidade dos órgãos de timburi; investigação da ação desses compostos *in vitro* ou em modelos biológicos para futuras utilizações em indústrias farmacêuticas para produção de fitoterápicos; isolamento e identificação dos compostos bioativos das duas espécies que também apresentaram citotoxicidade (angico-rajado e farinha seca); isolamento de qualquer constituintes de interesse para uma melhor análise e futura utilização pelas indústrias alimentícias, farmacêuticas, entre outras.

Assim sendo, este estudo reforça o potencial econômico e/ ou biológico dessas plantas usadas em reflorestamento, as quais constituem uma fonte valiosa de metabolitos com interesse

econômico e novas substâncias bioativas, que podem ser explorados de uma maneira sustentável.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, S. S.; Medicinal wild plants from Lahore-Islamabad motorway (m-2). **Pakistan Journal of Botany**, 39 (2), 355-375, 2007
- ARAÚJO, A. P. & SOBRINHO, S. P. Germinação e produção de mudas de tamboril (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong) em diferentes substratos. **Revista Árvore**, 35(3), 581-588, maio/jun. 2011.
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F. & LIMA, H. C. Sistemática das angiospermas do Brasil. **UFV**, 2, p. 15-100, Viçosa, 1991.
- BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, 4, 14-19, 1996.
- BERTONI, J. & LOMBARDI NETO, F. **Conservação do solo**. 6.ed. São Paulo: Ícone, p.35, 2008.
- BIRCH, N.; CROMBIE, L.; CROMBIE, W. M. Rotenoids of *Lonchocarpus salvadorensis*: their effectiveness in protecting seeds against bruchid predation. **Phytochemistry**, 24(12), 2881-2883, 1985.
- BOLZANI, S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. **Journal of Natural Products**, 58, 1683, 1995.
- BRASIL. Código Florestal. Lei nº 12.651 de 25 de maio de 2012.
- Brasil. Ministério da Saúde. ANVISA. 2017. Resolução- RDC nº- 166. de 24 de julho de 2017.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, 55 (3), São Paulo, jul/set, 2003.
- CARMO, J.; MIRANDA, I.; QUILHÓ, T.; SOUSA, V.; CARMO, F.; LATORRACA, J.; PEREIRA, H.; Chemical and structural characterization of the bark of *Albizia niopoides* trees from the Amazon. **Wood Science and Technology**, 50(4), 677-692, 2016.
- CARVALHO, M. G. D.; GOMES, M. S.; DE OLIVEIRA, M. C.; SILVA, C. J. D.; CARVALHO, A. G. D. Chemical constituents from *Piptadenia rigida* Benth. Fabaceae, "angico". **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 21(3), 397-401, 2011.



CARVALHO, P. E. R. Angico-Rajado (*Leucochloron incuriale*). Circular Técnica 159. Embrapa Florestas. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2009-09/44606/1/circ-tec159.pdf>. Acesso em: 22 de janeiro de 2019.

CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, A. A. L.; SANTANA, E. W. P. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 99, 541-544, 2004.

CLARDY, J. & WALSH, C. Lessons from Natural Molecules. *Nature*, 432, 829-837, 2004.

CLARIDGE, T. D. Introducing high-resolution NMR. In: **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**. 2º ed. Oxford: Elsevier, Tetrahedron Organic Chemistry Series, 2009. Vol. 27, capítulo 2, 11 -34.

CHATURVEDULA, S. P.; HUANG, R. Isolation and NMR spectral studies of dihydromyricetin. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 2(4), 2013.

DELGADO, M. C. C.; DA SILVA, M. S.; BRAZ FILHO, R.; 3 $\beta$ -hydroxy-21 $\beta$ -*E*-cinnamoyloxyolean-12-en-28-oic acid, a triterpenoid from *Enterolobium contorstisillquum*. **Phytochemistry**, 23(10), 2289-2292. 1984.

DEMAIN, A. L. & SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, 62, 5–16, 2009.

DESAI, T. H. & JOSHI, S. V.; Anticancer activity of saponin isolated from *Albizia lebbek* using various in vitro models. **Journal of Ethnopharmacology**, 231, 494-502, 2019.

DEVI, D.R.; LAKSHNA, S. S.; PARVATHI, S.V.; HARI, B.N. V.; Investigation of wound healing effect of topical gel of *Albizia amara* leaves extract. **South African Journal of Botany**, 119, 400-409, 2018.

GONÇALVES, I. S.; DIAS, H. C. T.; MARTINS, S. V.; SOUZA, A. L.; Fatores edáficos e as variações florísticas de um trecho de Mata Ciliar do Rio Gualaxo do Norte, Mariana, MG. **Revista Árvore**, 35(6), 1235-1243. 2011.

GOVINDARAJAN M. Bioefficacy of *Cassia fistula* Linn. (Leguminosae) leaf extract against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **European Review for Medical Pharmacological Sciences**, 13(2), 99-103, 2009.

GUO, J. Z.; TANG, H. G.; YAO, H. J.; ZHANG, Y. M. Research on the extraction and purification of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata*. **Advanced Materials Research Vols** 1033-1034, 738-743, 2014.

HAGGAG, E. G.; KAMAL, A. M.; ABDELHADY, M. I.; EL-SAYED, M. M.; EL-WAKIL, E. A.; ABD-EL-HAMED, S. S. Antioxidant and cytotoxic activity of polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Leucenia leucocephala*. **Pharmaceutical biology**, 49(11), 1103-1113, 2011.

HAN, Q.; QIAN, Y.; WANG, X.; ZHANG, Q.; CUI, J.; TU, P.; LIANG, H.; Cytotoxic oleanane triterpenoid saponins from *Albizia julibrissin*. **Fitoterapia**, 121,183-193, 2017.

HARBORNE, J. B. & MABRY, T. J. **The Flavonoids: Advances in Research**. 1a ed. London: Chapman and Hall, p. 594-599, 1982.

HOLZGRABE, U.; DIEHL, B.; WAWER, I. **NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis**. 1º ed. Amsterdam: Elsevier, 2008.

HOSTETTMANN K, MARSTON A. Countercurrent chromatography in the preparative separation of plant-derived natural products. **Journal of Chromatography and Related Technologie**, 24, 1711-1721, 2001.

HOSTETTMANN K.; WOLFENDER, J-L.; RODRIGUEZ, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. **Planta Medica**, 63(1), 2-10, 1997.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro, 2007.

INSTITUTO FLORESTAL, 2010. **Inventário florestal do Estado de São Paulo**. Instituto Florestal, São Paulo. Disponível em: <http://www.iflorestal.sp.gov.br/sifesp/inventario.html>. Acesso em: 22 de janeiro de 2019.

IPEF – INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS. **Identificação de espécies florestais**. In: <http://www.ipef.br/identificacao/nativas/detalhes.asp?codigo=47>. Acessado em 10/01/2019.

JANCKE, H. NMR als primäre Methode. **Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium**, 46, 722, 1998.

JIN, M. Y.; DING, Y.; ZHANG, T.; CAI, Z. Z.; TAO, J. S. Simultaneous Determination of Dihydromyricetin and Resveratrol in *Ampelopsis sinica* (Miq.) W.T. Wang by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with a Diode Array Detection Methods. **Journal of Chromatographic Science**, 52, 339–343, 2014.

KOKILA, K.; ELAVARASAN, N.; SUJATHA, V.; Green Biosynthesis of AgNPs using *Albizia saman* Leaf Aqueous Extract and their Biological Applications. **Smart Science**, 5(3), 140-149, 2017.

KUBOTA, TAKASI. Constituents of "Haku-tya" (*Ampelopsis neliæfolia*Kudo). I. The two crystalline constituents. **Nippon Kagaku Kaishi**, (1921-47), 59, 1053-60, 1938.

LE, L.; JIANG, B.; WAN, W.; ZHAI, W.; XU, L.; HU, K.; XIAO, P. Metabolomics reveals the protective of Dihydromyricetin on glucose homeostasis by enhancing insulin sensitivity. **Scientific reports**, 6, 36184, 2016.

LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP. Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, 62, n.2, p. 217-248, 2013.

LEI, W.; XING-DE, W.; JUAN, H.; GEN-TAO, L.; LI-YAN, P.; YAN, L.; LIU-DONG, S.; QIN-SHI, Z. A New Quinolizidine Alkaloid from *Sophora flavescens*. **Chemistry of natural compounds**, 50(5), 876-879, 2014.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B. & LOCK, M. **Legumes of the World**. Richmond, Royal Botanic Gardens Kew, 2005.

Li, J. W.; Vederas, J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, 325(5937), 161-165, 2009.

LIMA, C. M. R. de; ZANOTTA, P. J. P.; RICART, C. A. O.; SOUSA, M. V. de. Presence of the cytolytic protein enterolobin in different developmental stages of *Enterolobium contortisiliquum* seeds. Brazilian. **Journal of Plant Physiology**, 19(2), 163-170, 2007.

LIMA. H. C. **Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica – uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro**. 2000. Tese de Doutorado- Universidade Federal do Rio de Janeiro/ UFRJ, Rio de Janeiro, p.122.

LIU, Q. B.; HUANG, L.; ZHANG, L.; LIU, Q.; XU, Q. Q.; QIN, X. J.; FANG, X. Y.; ZENG, Y. Two new cassane-type diterpenes from the seeds of *Caesalpinia crista*. **Journal of Asian natural products research**, 17(11), 1073-1078, 2015.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras. Manual de Identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 1992, 352p.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 544 p.

MABBERLY DJ. **The plant book**. Cambridge, UK: Camb University Press, 1997.

MAHLANGU, Z. P.; BOTHA, F. S.; MADOROBA, E.; CHOKOE, K.; ELGORASHI, E. E.; Antimicrobial activity of *Albizia gummifera* (J.F.Gmel.) C.A.Sm leaf extracts against four *Salmonella* serovars. **South African Journal of Botany**, 108, 132-136, 2017.

MEBE, P. P. & MAKUHUNGA, P. 11-(E)-p-coumaric acid ester of bergenin from *Peltophorum africanum*. **Phytochemistry**, 31(9), 3286-3287, 1992.

MINISTERIO DA SAÚDE. **Portal da saúde: MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Disponível em: [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br). Acessado em 08 de janeiro de 2019.

MIMAKI, Y.; HARADA, H.; SAKUMA, C.; HARAGUCHI, M.; YUI, S.; KUDO, T.; YAMAZAKI, M.; SASHIDA, Y.; Contortisiliosides A ± G: Isolation of Seven New Triterpene Bidesmosides from *Enterolobium contortisiliquum* and Their Cytotoxic Activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 13, 623-627, 2003.

MIMAKI, Y.; HARADA, H.; SAKUMA, C.; HARAGUCHI, M.; YUI, S.; KUDO, T.; YAMAZAKI, M.; SASHIDA, Y.; Contortisiliosides A ± G: Isolation of Seven New Triterpene Bidesmosides from *Enterolobium contortisiliquum* and Their Cytotoxic Activity. **Helvetica Chimica Acta**, 87, 851-865, 2004

MIRANDA, M. L. D.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; Triterpenos e Outros Constituintes dos Frutos de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae). **Revista Virtual Química**, 7 (6), 2597-2605, 2015.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunol. Methods**, 65: 55-63, 1983.

MURAKAMI, T.; MIYAKOSHI, M.; ARAHO, D.; MIZUTANI, K.; KAMBARA, T.; IKEDA, T.; IGARASHI, K. Hepatoprotective activity of tocha, the stems and leaves of *Ampelopsis grossedentata*, and ampelopsin. **Biofactors**, 21(1-4), 175-178, 2004.

NASCIMENTO, I. A. D.; BRAZ-FILHO, R.; CARVALHO, M. G. D.; MATHIAS, L.; FONSECA, F. D. A. Flavonolignoids and other compounds isolated from *Mimosa artemisiana* Heringer e Paula. **Química Nova**, 35(11), 2159-2164, 2012.

NETO, T. S. N.; GARDNER, D.; HALLWASS, F.; LEITE, A. J. M.; DE ALMEIDA, C. G.; SILVA, L. N.; ROQUE, A. A.; BITENCOURT, F. G.; BARBOSA, E. G.; TASCA, T.; MACEDO, A. J.; ALMEIDA, M. V.; MACEDO, A. J. Activity of pyrrolizidine alkaloids against biofilm formation and *Trichomonas vaginalis*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 83, 323-329, 2016.

NGNINTEDO, D.; FOTSO, G. W.; KUETE,; NANA, F.; SANDJO, L. P.; KARAOSMANOĞLU, O.; SIVAS, H.; KEUMEDJIO, F.; KIRSCH, G.; NGADJUI, B. T.; ANDRAE-MAROBELA, K. Two new pterocarpanes and a new pyrone derivative with cytotoxic activities from *Ptycholobium contortum* (NE Br.) Brummitt (Leguminosae): revised NMR assignment of mundulea lactone. **Chemistry Central Journal**, 10(1), 58, 2016.

NICOLAOU, K. C. & MONTAGNON, T. **Molecules that Changed the World**, Wiley-VCH: Weinheim, 2008, 385 P.

ODALIA-RÍMOLI, A.; ARRUDA, E. J.; RÍMOLI, J.; BUENO, N. R. B. biodiversidade, biotecnologia e conservação genética em desenvolvimento local. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, 1(1), 99-104, 2000.

PARK, J. S.; KIM, I. S.; REHMAN, S. U.; NA, C. S.; YOO, H. H. HPLC determination of bioactive flavonoids in *Hovenia dulcis* fruit extracts. **Journal of chromatographic science**, 54(2), 130-135, 2016.

PATERSON, I.; ANDERSON, E. A. The renaissance of natural products as drug candidates. **Science**, 310, 451-453, 2005.

PHUNG, T. V.; TRINH, Q.; DAO, H. P. Quantitative determination of two main compounds in total flavonoids from leaves of *Ampelopsis cantoniensis* Planch by high-performance liquid chromatography. **Tap Chi Duoc Hoc**, 2, 19-21, 1995.

PLUEMPANUPAT, S.; KUMRUNGSEE, N.; PLUEMPANUPAT, W.; NGAMKITPINYO, K.; CHAVASIRI, W.; BULLANGPOTI, K. O. Laboratory evaluation of *Dalbergia oliveri* (Fabaceae: Fabales) extracts and isolated isoflavonoids on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Industrial Crops and Products**, 44, 653-658, 2013.

QUEIROZ, E. F.; WOLFENDER, J.-L.; HOSTETTMANN K.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. 2ª edição. Eds EdUFSCar – Editora da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil, 2014.

RAHIMI, M.; A review: antidiabetic medicinal plants used for diabetes mellitus. **Bulletin of Environment Pharmacology and Life Sciences**, 4(2), 163-180, 2015.

RODRIGUES, E. C. R.; FERREIRA, A. M.; VILHENA, J. C.; ALMEIDA, F. B.; CRUZ, R. A.; FLORENTINO, A. C.; SOUTO, R. N. P.; CARVALHO, J. C. T.; FERNANDES, C. P. Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 24(6), 699-705, 2014.

RUKACHAISIRIKUL, T.; INNOK, P.; SUKSAMRARN, A. Erythrina alkaloids and a pterocarpan from the bark of *Erythrina subumbrans*. **Journal of natural products**, 71(1), 156-158, 2008.

SACCARO JUNIOR, N. L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**: Brasília, 2011.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Natural Products Isolation**. 2<sup>th</sup> edition, Humana Press, USA. 2005.

SANTOS, M. D. S.; COLNAGO, L. A. Validação de método quantitativo por RMN de <sup>1</sup>H para análises de formulações farmacêuticas. **Química Nova**, 36(2), 324-330, 2013.

SCHEIDEGGER, N.M.B.; RANDO, J.G. *Cassia* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB82785>. Acesso em: 29 de janeiro de 2019.

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2009. Decreto N° 53.939. Dispõe sobre a manutenção, recomposição, condução da regeneração natural, compensação e composição da área de Reserva Legal de imóveis rurais no Estado de São Paulo

e dá providências correlatas. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, Poder Executivo, São Paulo, 06-01-2009.

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2015. Resolução SMA N° 32, de 03-04-2014. Estabelece as orientações, diretrizes e critérios sobre restauração ecológica no Estado de São Paulo, e dá providências correlatas. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, Poder Executivo, São Paulo, 05-04-2014, seção I, p. 36-37.

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2017. Resolução SMA N° 146, de 08-11-2017. Institui o Mapa de Biomas do Estado de São Paulo, e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, Poder Executivo, São Paulo, 10-11-2017, seção I, p. 42.

SHAHAT, A. A.; EL-BAROUTY, G.; HASSA, R. A.; HAMMOUDA, F. M.; ABDEL-RAHMAN, F. H.; SALEH, M.A.; Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from the seeds of *Enterolobium contortisiliquum* (Leguminosae). **Journal of Environmental Science and Health Part B**, 43, 519–525, 2008.

SHEN, Y.; LINDEMAYER, A. K.; GONZALEZ, C.; SHAO, X. M.; SPIGELMAN, I.; OLSEN, R. W.; LIANG, J. Dihydromyricetin as a novel anti-alcohol intoxication medication. **Journal of Neuroscience**, 32(1), 390-401, 2012.

SILVA, C.; ALVES, A. N.; SANTANA, A.; CARVALHO, M. G.; SILVA, S. L. C.; SCHRIPSEMA, J. Constituintes fenólicos e terpenóides isolados das raízes de *Andira fraxinifolia* (Fabaceae). **Química Nova**, 29(6), 1184-1186, 2006.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, 82(13), 1107-1112, 1990.

SOB, S. V. T.; WABO, H. K.; TANE, P.; NGADJUI, B. T.; MA, DAWEI. A xanthone and a polyketide derivative from the leaves of *Cassia obtusifolia* (Leguminosae). **Tetrahedron**, 64, 7999–8002, 2008.

SOTO GONZALES, J. L.; VALIENGO VALERI, S.; DE PAULA, R. C. Germinación de semillas de *Albizia hassleri* a diferentes temperaturas, en condiciones de laboratorio. **Bosque (Valdivia)**, 31(1), 39-44, 2010.

SPRENT, J. I. **Nodulation in Legumes**. Royal Botanic Gardens Kew, 146, 2001.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. *Methods in Plant Biochemistry*. San Diego: Academic Press Inc, 1991.

TARAFDAR, R. G.; NATH, S.; TALUKDAR, A. D.; CHOUDHURY, M. D.; Antidiabetics plants used among the ethnic communities of Unakoti district of Tripura, India **Journal of Ethnopharmacology**, 160, 219-226, 2015.

VIANA, E. O. R.; CRUZ, M. J.; DA SILVA, M. J.; PEREIRA, G. M.; DA SILVA, B. P.; TINOCO, L. W.; PARENTE, J. P.; Structural characterization of a complex triterpenoid saponin from *Albizia lebbbeck* and investigation of its permeability property and supramolecular interactions with membrane constituents. **Carbohydrate Research**, 471, 105-114, 2019.

VICTOR, M. A. M.; CAVALLI, A. C.; GUILLAUMON, J. R.; FILHO, R. S. **Cem anos de devastação: revisitada 30 anos depois**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. 68p.

WANDERLEY, M. D. G. L.; SHEPHERD, G. J.; MARTINS, S. E.; ESTRADA, T. E. M. D.; ROMANINI, R. P.; KOCH, I.; PIRANI, J. R.; MELHEM, T. SANT'ANNA; HARLEY, A. M. G.; KINOSHITA, L. S.; MAGENTA, M. A. G.; WAGNER, H. M. L.; BARROS, F.; LOHMANN, L. G.; AMARAL, M. C. E.; CORDEIRO, I.; ARAGAKI, S.; BIANCHINI, R. S.; ESTEVES, G. L. *Checklist Checklist of Spermatophyta of the São Paulo State, Brazil*. **Biota Neotropica**, 11, 191-388, 2011.

WIDER, G. & DREIER, L. Measuring Protein Concentrations by NMR Spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, 128(8), 2571-2576, 2006.

WOJCIECHOWSKI MF, A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**. 91(11), 1846-1862, 2004.

ZROSTLÍKOVA, J., HAJŠLOVÁ, J., GODULA, M. & MAŠTOVSKÁ. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, 937 (1-2), 73-86, 2001.



YANG, Y. C.; LIM, M. Y.; LEE, H. S. Emodin isolated from *Cassia obtusifolia* (Leguminosae) seed shows larvicidal activity against three mosquito species. **Journal of agricultural and food chemistry**, 51(26), 7629-7631, 2003.