



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS



MAIANE DOS SANTOS NEVES

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTICOLINESTERÁSICA DE EXTRATOS DA CASCA DA
RAIZ DA *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret

MAIANE DOS SANTOS NEVES

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTICOLINESTERÁSICA DE EXTRATOS DA CASCA DA
RAIZ DA *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Neves Brandão

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Maurício David

Feira de Santana-BA
2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ademir Evangelista do Vale

Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves

Prof. Dr. Hugo Neves Brandão
Orientador e Presidente da Banca

Dedico este trabalho à minha família, em especial, à minha mãe pela pessoa que é, e exemplo de mãe sempre dedicada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Tupã (Deus)**, por ter me permitido realizar este trabalho, por ter guiado meus passos nessa longa caminhada, ter renovado minha fé e ter me fortalecido em todos os momentos.

Aos “**Mestres Encantados**”, pela proteção, força e sabedoria para enfrentar os desafios.

Aos meus pais **Matilde e Elidio**, pelo amor incondicional, por toda dedicação, apoio e esforço que demonstraram para que eu concluísse mais essa etapa, especialmente minha mãe, pelas orações, por sempre me dar forças e me acalmar dizendo que “tudo vai dar certo”, nos momentos difíceis. Agradeço também ao meu irmão **Elton**, por todo incentivo, apoio e carinho.

A toda a minha família, meus avós que não estão mais presentes fisicamente e os que continuam ao meu lado, aos meus tios, primos, e cunhada, pelo apoio e grande torcida.

Ao meu namorado **Marcelo**, pelo companheirismo, amor, carinho e palavras de incentivo em momentos difíceis.

Ao Prof. **Hugo Brandão**, meus sinceros agradecimentos, durante esses quatro anos que se dispôs ser meu orientador, desde a iniciação científica até o mestrado, obrigada pela orientação, paciência, pela confiança depositada em mim, pelos conhecimentos compartilhados e dedicação para que este e outros trabalhos dessem certo.

Ao meu co-orientador, Prof. **Jorge Maurício**, por ter aceitado nosso convite e pelo apoio e contribuições dados.

Agradeço ao Prof. **Clayton Queiroz**, pela disposição em sempre ajudar e pelas importantes contribuições dadas para realização deste trabalho.

Ao doutorando **Luiz Carneiro**, por todo auxílio dado na realização dos testes em HPLC e análise dos dados.

Ao Prof. **Luciano Paganucci** pela identificação da espécie e auxílio para depósito da exsicata no HUEFS.

Ao Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais – PRGV e a CAPES, pela oportunidade dada e pelo apoio financeiro.

Ao Horto Florestal, pelo espaço concedido e acolhimento.

Aos amigos de laboratório (LAEX/LABIV), em especial **Raissa, Dany, Jéssica e Juliana**, obrigada pelo incentivo, amizade e muitos momentos de descontração que tornaram os dias de trabalho mais leves.

À minha turma de mestrado, em especial **Luma, Flávia e Valéria** pela amizade construída durante esses anos e pelos momentos de estudos, descontração e alegrias.

A aluna de iniciação **Leane**, pelo auxílio dado no início do trabalho.

Aos meus amigos e parentes indígenas pelo apoio, amizade, pelos momentos compartilhados de alegrias, de lutas por nossa causa, conquistas e fortalecimento da nossa cultura.

Ao povo **Tuxá**, pelo pertencimento étnico e cultural e pela oportunidade de pesquisar sobre a “jurema”, planta sagrada e significativa para a nossa cultura e religião.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!!

“Quem alcança seu ideal, vai além dele”

(Friedrich Nietzsche, “Além do Bem e do Mal”, Cia das Letras, ano 2001, Aforismo

73, pág. 68)

RESUMO

Mimosa tenuiflora (Willd.) Poiret (jurema preta) é uma espécie da família Fabaceae nativa da Caatinga, encontrada largamente em todo nordeste brasileiro. Na medicina popular, as cascas do caule e da raiz da jurema preta são utilizadas no tratamento de diversas enfermidades, como queimaduras e inflamações, além de ser empregada tradicionalmente como bebida em rituais indígenas. Com relação à casca da raiz, há poucos estudos descritos na literatura sobre seu perfil químico e propriedades biológicas. Desta forma, o presente trabalho propôs realizar um estudo fitoquímico dos extratos da casca da raiz da *Mimosa tenuiflora*. Para isso, foi realizado o fracionamento do extrato clorofórmico a partir da cromatografia em coluna (CC), e as determinações estruturais das substâncias isoladas foram realizadas através da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , além da identificação e quantificação de substâncias fenólicas nos extratos clorofórmico e acetato de etila a partir da cromatografia a líquidos de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e consequente validação do método analítico aplicado. Também foram realizadas avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos pelo método de Ellman e quantificação do teor de flavonoides totais do extrato bruto através de método espectrofotométrico utilizando-se como reagente cloreto de alumínio (AlCl_3) e curva padrão com quercetina. Como resultado, foram obtidos do extrato clorofórmico uma mistura dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol e o triterpeno ácido betulínico. A partir da CLAE-DAD foram identificados polifenóis como a catequina, epicatequina e procianidina B2 além do ácido gálico no extrato acetato de etila e procianidina B2, no extrato clorofórmico desta espécie. Com a validação do método analítico, este se mostrou confiável e adequado para a quantificação das substâncias catequina e epicatequina no extrato acetato de etila, de acordo com critérios preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Com relação à atividade anticolinesterásica, entre os extratos testados da jurema preta, o bruto e o de acetato de etila foram os que demonstraram maior capacidade de inibição sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE) com relação aos demais, apresentando percentuais de $89\% \pm 0,31$ e $93,8\% \pm 0,4$, respectivamente, o que classifica esta espécie como potente inibidor. O teor de flavonoides totais quantificado no extrato bruto da *Mimosa tenuiflora* foi de 1,386g/100g extrato. Sendo assim, este trabalho indica que a espécie *Mimosa tenuiflora* é uma fonte promissora de substâncias bioativas de interesse químico-medicinal, além de ser uma forte candidata natural que pode auxiliar no tratamento do mal de Alzheimer. É importante mencionar que o presente estudo fornece uma contribuição inédita acerca da composição química da casca da raiz da jurema preta, uma vez que até o momento não foram encontrados registros na literatura sobre constituintes fenólicos desta parte da planta.

Palavras-chave: *Mimosa tenuiflora*. Fitoquímica. Cromatografia. Validação. Atividade anticolinesterásica.

ABSTRACT

Mimosa tenuiflora (Willd.) Poiret (jurema preta) is a species in the Fabaceae family, native to the Caatinga, found throughout the Brazilian Northeast. In folk medicine, the shells of the stem and root of jurema preta are used in treatment of several diseases, as burns and inflammations, besides being made traditionally as drink in indigenous rituals. Regarding to the root bark, there are few studies described in the literature about its phytochemical profile and biological properties. In this way, the present study has proposed perform a phytochemical study of the extracts from the root bark of *Mimosa tenuiflora*. For this, it was performed the fractionation of chloroformic extract from the column chromatography (CC), and the structural determinations of the isolated compounds were carried out by technique of nuclear magnetic resonance (NMR) of ^1H and ^{13}C , besides the identification and quantification of phenolic substances in the chloroformic extracts and the ethyl acetate from the high-efficiency liquid chromatography with diode arrangement detector (HPLC-DAD) and consequent validation of applied analytical method. Were also carried out assessment of anticholinesterasic activity of the extracts by the method of Ellman and quantification of the total flavonoid content of the crude extract through spectrophotometric method using as reactant aluminum chloride (AlCl_3) and standard curve with quercetin. As a result, were obtained from the chloroformic extract a mixture of the β -sitosterol and stigmasterol steroids and the betulinic acid triterpene. From of the HPLC-DAD were identified polyphenols such as catechin, epicatechin and procyanidin B2 beyond the gallic acid in the ethyl acetate extract and procyanidin B2, in the chloroformic extract of this species. With the validation of the analytical method, this proved to be reliable and suitable for the quantification of the substance catechin and epicatechin in the ethyl acetate extract, according to criteria recommended by the National Health Surveillance Agency – NHSA. Regarding the anticholinesterasic activity, among the tested extracts of black jurema, the gross and the ethyl acetate were the ones who showed greater inhibition capacity on the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in relation to other, presenting percentages of $89\% + 0,31$ and $93,8\% + 0,4$, respectively, what classifies this species as a potent inhibitor. The total flavonoids content quantified in the crude extract of *Mimosa tenuiflora* was of 1,386g/100g extract. Thus, this work indicates that the species *Mimosa tenuiflora* is a promising source of bioactive substances of chemical-medicinal interest, besides being a strong natural candidate that can aid in the treatment of Alzheimer's disease. It is important to mention that the present study provides an unprecedented contribution about the chemical composition of root bark of black jurema, since to date no records were found in the literature on phenolic constituents of this part of the plant.

Keywords: *Mimosa tenuiflora*. Phytochemistry. Chromatography. Validation. Anticholinesterasic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração da espécie <i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd) Poiret.....	23
Figura 2: Partes aéreas da <i>Mimosa tenuiflora</i>	24
Figura 3: Alcaloides isolados da <i>Mimosa tenuiflora</i>	25
Figura 4: Chalconas isoladas da casca do caule de <i>Mimosa Tenuiflora</i>	26
Figura 5: Saponinas esteroidais isoladas da casca do caule de <i>Mimosa Tenuiflora</i>	26
Figura 6: Saponinas triterpênicas isoladas da casca do caule de <i>Mimosa Tenuiflora</i>	27
Figura 7: Fenoxicromonas isoladas das folhas de <i>Mimosa Tenuiflora</i>	28
Figura 8: Estrutura básica dos flavonoides.....	32
Figura 9: Unidade de isopreno.....	33
Figura 10: Estrutura básica dos fitoesteroides.....	34
Figura 11: Reações envolvidas no método de Ellman.....	44
Figura 12: Preparo do extrato bruto seco a partir das cascas das raízes da <i>Mimosa tenuiflora</i>	46
Figura 13: Partição líquido-líquido do extrato bruto seco da <i>Mimosa tenuiflora</i>	47
Figura 14: Procedimento geral para a obtenção dos extratos da <i>Mimosa tenuiflora</i>	48
Figura 15: Fracionamento cromatográfico do extrato clorofórmico.....	49
Figura 16: Fracionamento cromatográfico da fração MTC ₉	51
Figura 17: Precipitados formados nas frações MTC ₉ ₁ e MTC ₉ ₂	52
Figura 18: Cromatógrafo Varian.....	53
Figura 19: Microplaca de Elisa após reação de inibição da AchE.....	57
Figura 20: Reação da amostra e concentrações de quercetina com AlCl ₃	58
Figura 21: Fracionamento em CC do extrato clorofórmico e isolamento de substâncias puras.....	59

Figura 22: Estruturas das substâncias identificadas em mistura de MTC ₄	60
Figura 23: Espectro de RMN de ¹ H de MTC ₄ [500 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)].....	60
Figura 24: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H de MTC ₄ [500 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)].....	61
Figura 25: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H de MTC ₄ [500 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)].....	61
Figura 26: Espectro de RMN de ¹³ C de MTC ₄ [125 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)].....	64
Figura 27: Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C de MTC ₄ [125 MHz, CDCl ₃ , δ (ppm)].....	64
Figura 28: Estrutura da substância identificada em MTC ₉ ₁ e MTC ₉ ₂	65
Figura 29: Espectro de RMN de ¹ H de MTC ₉ ₂ [500 MHz, Piridina-d ₅ , δ (ppm)].....	66
Figura 30: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H de MTC ₉ ₂ [500 MHz, Piridina-d ₅ , δ (ppm)].....	66
Figura 31: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H de MTC ₉ ₂ [500 MHz, Piridina-d ₅ , δ (ppm)].....	67
Figura 32: Espectro de RMN de ¹³ C de MTC ₉ ₂ [125 MHz, Piridina-d ₅ , δ (ppm)]..	69
Figura 33: Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C de MTC ₉ ₂ [125 MHz, Piridina-d ₅ , δ (ppm)].....	69
Figura 34: Cromatograma dos padrões analisados em CLAE-DAD a 280 nm, C-18 (250mm x 4,6mm i.d.; 5µm), volume injeção: 20µL, fluxo: 1mL/min.....	70
Figura 35: Cromatograma do extrato acetato de etila da <i>Mimosa tenuiflora</i> analisado em CLAE-DAD a 280 nm, C-18 (250mm x 4,6mm i.d.; 5µm), volume injeção: 20µL, fluxo: 1mL/min.....	71
Figura 36: Cromatograma do extrato clorofórmico da <i>Mimosa tenuiflora</i> analisado em CLAE-DAD a 280 nm, C-18 (250mm x 4,6mm i.d.; 5µm), volume injeção: 20µL, fluxo: 1mL/min.....	71
Figura 37: Espectros no UV e estruturas químicas das substâncias identificadas na <i>Mimosa tenuiflora</i>	73
Figura 38: Curva de calibração do padrão catequina.....	75

Figura 39: Curva de calibração do padrão epicatequina.....	75
Figura 40: Comparação entre os cromatogramas da amostra e dos padrões catequina e epicatequina.....	77
Figura 41: Curva de calibração do padrão quercetina.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Massas dos extratos obtidos da <i>Mimosa tenuiflora</i>	47
Tabela 2: Frações obtidas do extrato clorofórmico.....	50
Tabela 3: Frações obtidas da CC de MTC ₉	51
Tabela 4: Composição do gradiente de eluição.....	54
Tabela 5: Comparação de dados de RMN de ¹³ C de MTC ₄ [125 MHz (¹³ C), CDCl ₃ , δ (ppm)] com dados da literatura (ALVES, 2012) para estigmasterol e β-sitosterol.....	63
Tabela 6: Comparação de dados de RMN de ¹³ C de MTC ₉ ₂ [125 MHz (¹³ C), Piridina d ₅ , δ (ppm)] com dados da literatura (DALMARCO, 2012) para ácido betulínico.....	68
Tabela 7: Tempos de retenção dos padrões relativos às substâncias identificadas em <i>Mimosa tenuiflora</i>	70
Tabela 8: Máximos de absorção nos espectros no UV das substâncias fenólicas identificadas na <i>Mimosa tenuiflora</i>	73
Tabela 9: Desvio padrão relativo para a catequina.....	78
Tabela 10: Desvio padrão relativo para a epicatequina.....	78
Tabela 11: Percentuais de recuperação para a catequina.....	78
Tabela 12: Percentuais de recuperação para a epicatequina.....	79
Tabela 13: Percentuais de inibição enzimática de extratos da <i>Mimosa tenuiflora</i>	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AlCl₃	Cloreto de alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência
CMD	Concentração média determinada
DA	Doença de Alzheimer
DAD	Detector de arranjo de diodos
DMT	N, N – dimetiltriptamina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPa	Desvio padrão obtido
DPR	Desvio padrão relativo
DPPH	1,1 – difenil-2-picrilhidrazil
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico]
FDA	Food and Drug Administration
FR	Fase Reversa
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana
5-HT	5-hidroxitriptamina
IACHe	Inibidores da acetilcolinesterase
IC	Inclinação da curva de calibração
ICH	International Conference on Harmonization
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	International Standard Organization
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAO	Monoamina oxidase
MeOH	Metanol
MTC	<i>Mimosa tenuiflora</i> extrato clorofórmio
Pyr-d5	Piridina deuterada

QE	Quercetina equivalente
R²	Coeficiente de correlação
RE	Resolução
Rec%	Taxa de recuperação
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RNA	Ácido ribonucléico
S	Número quântico de spin
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SPE	Solid-Phase Extraction
SOD	Superóxido dismutase
TMS	Tetrametilsilano
UV/VIS	Ultravioleta/Vísivel
δ	Deslocamento químico
Ppm	Partes por milhão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Objetivos.....	20
1.1.1 Objetivo geral.....	20
1.1.2 Objetivos específicos.....	20
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Considerações sobre a família Fabaceae.....	21
2.2 Considerações sobre o gênero <i>Mimosa</i>	22
2.3 Considerações sobre a espécie <i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poiret.....	22
2.4 Pesquisa com plantas medicinais.....	29
2.4.1 Metabolismo secundário.....	30
2.4.1.1 Fenólicos.....	31
2.4.1.2. Flavonoides.....	32
2.4.1.3 Terpenoides e esteroides.....	33
2.4.2 Separação e identificação de metabólitos ativos.....	34
2.4.2.1 Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência (CLAE).....	35
2.4.2.1.1 Quantificação de fenólicos por CLAE.....	36
2.4.2.1.2 Validação de métodos analíticos.....	37
2.4.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	40
2.4.3 Considerações sobre atividade anticolinesterásica.....	42
3. METODOLOGIA	45
3.1 Coleta e identificação da espécie <i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poiret.....	45
3.2 Preparo do extrato bruto.....	45
3.3 Preparo dos extratos semi-purificados.....	46
3.4 Isolamento e identificação de constituintes químicos do extrato clorofórmico.....	49
3.4.1 Fracionamento do extrato clorofórmico.....	49
3.4.1.1 Purificação da fração MTC ₉	50
3.4.2 Determinação estrutural das substâncias isoladas.....	52
3.5 Identificação e quantificação de substâncias fenólicas por CLAE-DAD.....	52
3.6 Validação do método analítico de quantificação de catequina e epicatequina por CLAE-DAD.....	55

3.6.1 Seletividade.....	55
3.6.2 Lineariedade.....	55
3.6.3 Precisão.....	55
3.6.4 Exatidão.....	56
3.6.5 Limite de Detecção (LD)	56
3.6.6 Limite de Quantificação (LQ).....	56
3.7 Avaliação da atividade anticolinesterásica.....	57
3.8 Quantificação de flavonoides totais.....	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1 Isolamento e identificação de constituintes químicos do extrato clorofórmico.	59
4.1.1 Fracionamento do extrato clorofórmico.....	59
4.1.2 Determinação estrutural das substâncias isoladas.....	59
4.2 Identificação e quantificação de substâncias fenólicas por CLAE-DAD.....	69
4.3 Validação do método analítico de quantificação de catequina e epicatequina por CLAE-DAD.....	76
4.3.1 Seletividade.....	76
4.3.2 Lineariedade.....	77
4.3.3 Precisão.....	77
4.3.4 Exatidão.....	78
4.3.5 Limite de Detecção (LD)	79
4.3.6 Limite de Quantificação (LQ).....	79
4.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica.....	79
4.5 Quantificação de flavonoides.....	80
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
REFERÊNCIAS.....	84

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais no tratamento e na cura de várias enfermidades está presente na cultura de grande parte da população desde o início da civilização, sendo uma atividade muito comum e altamente difundida. Esta tendência tem contribuído significativamente para o consumo não só de plantas medicinais, como também de fitoterápicos, e isto se deve principalmente, dentre outros fatores, à falta de acesso a medicamentos sintéticos, devido muitas vezes ao alto custo (VEIGA JUNIOR *et al*, 2005; MACHADO, 2007).

É estimado que das 250.000 a 500.000 espécies de plantas superiores existentes no planeta, apenas 1% tem sido estudadas pelo seu potencial farmacológico. No Brasil, algumas pesquisas foram realizadas, não só quanto a aspectos fitoquímicos, mas também quanto à atividade biológica de plantas ocorrentes nos diferentes ecossistemas brasileiros. Desta forma, o estudo de plantas no país torna-se importante por contribuir com o conhecimento fitoquímico, comprovação das propriedades terapêuticas e segurança de muitas espécies utilizadas popularmente, uma vez que o Brasil oferece grande biodiversidade e muitas das quais ainda não foram estudadas (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; MELENDÉZ; CAPRILES, 2006).

No semiárido nordestino, cuja vegetação predominante é a caatinga, muitas plantas nativas ou exóticas são potencialmente ricas em propriedades medicinais, porém, pouco exploradas ainda pela ciência. A *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret, popularmente conhecida como jurema preta, é uma leguminosa da subfamília Mimosoideae (Fabaceae), muito utilizada para fins medicinais por comunidades indígenas e populações locais da região nordeste (MAIA, 2004; NUNES *et al*, 2008).

A composição química da *M. tenuiflora* tem atraído um considerável interesse, principalmente devido à presença de alcaloides indólicos, taninos e flavonoides (SOUZA *et al*, 2008). No entanto, com relação à casca da raiz desta espécie, há poucos estudos descritos na literatura sobre seu perfil fitoquímico e propriedades biológicas, que possam auxiliar na comprovação científica de seu uso na medicina popular.

Em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa *Estudos Químicos e Atividades Biológicas em Produtos Naturais* da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, avaliou-se a atividade antioxidante do extrato da casca da raiz da *M. Tenuiflora*. Tal atividade foi realizada em laboratório pelo teste do sequestro do radical livre 1,1 – difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), sendo um dos métodos mais comumente empregado que envolve a geração de espécies oxidantes, como no caso do radical DPPH (KUÇUK, 2007). A partir deste ensaio, a jurema preta demonstrou possuir capacidade antioxidante comparável ao padrão utilizado.

Extratos vegetais com ação anticolinesterásica também tem sido alvo de pesquisas por parte da comunidade científica, uma vez que inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) de origem natural tem representado fonte alternativa para o tratamento da doença de Alzheimer. Os AChE promovem um aumento na concentração e duração da ação da acetilcolina sináptica minimizando as perturbações na função cognitiva (SILVA et al, 2011).

Diante dessas informações e, considerando que a *Mimosa Tenuiflora* apresentou potencial antioxidante significativo, o presente trabalho propôs realizar estudo fitoquímico mais aprofundado com extratos da casca da raiz desta espécie, visando aprimorar o conhecimento e utilização desta propriedade farmacológica, a partir do uso popular da jurema preta, além de contribuir para o conhecimento da composição química da mesma e, por fim, avaliar a atividade anticolinesterásica de extratos desta espécie.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. OBJETIVO GERAL

Analisar quantitativamente substâncias fenólicas, isolar/identificar metabólitos e avaliar atividade biológica *in vitro* de extratos da casca da raiz da *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret.

1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar constituintes químicos presentes no extrato clorofórmico da *Mimosa tenuiflora* através de métodos cromatográficos como cromatografia em coluna (CC);
- Determinar a estrutura química das substâncias isoladas a partir de métodos espectroscópicos como RMN de ^1H e ^{13}C ;
- Identificar a presença de substâncias fenólicas nos extratos clorofórmico e acetato de etila da *Mimosa tenuiflora* por Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos – CLAE-DAD;
- Quantificar o teor de catequina e epicatequina presentes no extrato acetato de etila da *Mimosa tenuiflora* por CLAE - DAD;
- Validar o método analítico aplicado na quantificação de catequina e epicatequina;
- Avaliar quantitativamente a atividade anticolinesterásica *in vitro* do extrato bruto e dos extratos semi-purificados da jurema preta através do método de Ellman;
- Determinar o teor de flavonoides totais presente no extrato bruto de *Mimosa tenuiflora*;
- Contribuir com a quimiosistemática da família Fabaceae.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae constitui uma das maiores representantes de angiospermas, apresentando 727 gêneros, 36 tribos e aproximadamente 20.000 espécies. Apresenta distribuição ampla ao redor do globo, estando presente tanto nas florestas tropicais quanto desertos, planícies e regiões alpinas. No Brasil, é considerada uma das famílias que apresenta maior diversidade entre os biomas, com cerca de 3.200 espécies distribuídas em 176 gêneros, constituindo a família mais diversa no bioma caatinga, com 86 gêneros e 320 espécies (DOYLE; LUCKOW, 2003; LEWIS et al, 2005; QUEIROZ et al, 2009).

Esta família está distribuída em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae. Esta última é a maior das subfamílias com 13.800 espécies, apresentando-se preferencialmente, em regiões temperadas e a maior parte das espécies que a constitui é herbácea. A Mimosoideae e a Caesalpinioideae são subfamílias menores com 3.270 e 2.250 espécies, respectivamente sendo constituídas, em sua maioria, por árvores e arbustos tropicais e subtropicais (LEWIS et al, 2005; OLIVEIRA, 2011).

As espécies desta família apresentam uma grande diversidade morfológica, que varia desde pequenas ervas efêmeras e anuais, até árvores emergentes em florestas úmidas. De modo geral, as leguminosas dessa família apresentam características como: folhas alternas, compostas, com estípulas; flores pentâmeras, perígina ou hipógina, diclamídeas, diplostêmones, com um ovário súpero, unilocular, com óvulos inseridos de forma alterna em uma placenta marginal; fruto deiscente ou indeiscente (QUEIROZ, 2009).

As leguminosas da caatinga apresentam praticamente toda a diversidade de hábitos encontrada na família, variando desde árvores de grande porte até ervas anuais ou perenes ou ainda trepadeiras ou lianas (QUEIROZ, 2009; QUEIROZ et al, 2009).

Com relação à composição química, uma variedade de constituintes ativos já foi identificada em plantas dessa família, como alcaloides, flavonoides, taninos e terpenoides. Pesquisas mostram que atividades biológicas como analgésica, anti-

inflamatória e antimicrobiana relatadas em Fabaceas tem sido atribuídas a estes compostos químicos (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; VIEGAS JÚNIOR et al, 2006; SILVA et al, 2010; OLIVEIRA, 2011).

2.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Mimosa*

O gênero *Mimosa* faz parte da subfamília Mimosoideae, compreendendo cerca de 530 espécies distribuídas principalmente nas Américas, especialmente no Brasil, México, Paraguai, Uruguai e Argentina, sendo que muitas delas são nativas do Brasil. Entre as leguminosas, esse gênero é o que representa maior variedade na caatinga (BARNEBY, 1991; LEWIS et al, 2005; QUEIROZ, 2009).

Este gênero apresenta habitats que variam de florestas equatoriais macrotérmicas a savanas e campos, florestas tropicais e subtropicais de vegetação espinhenta, pastagens tropicais e desertos, onde há rápida adaptação das espécies quanto à forma de crescimento a esses diferentes ambientes (BARNEBY, 1991).

Além do papel ecológico, várias espécies de *Mimosa* possuem importância econômica sendo exploradas para diversos usos como, produção de madeira para construção e combustível, ornamentação, cercas vivas, recuperação de áreas degradadas, utilização na medicina popular, entre outros (DAHMER, 2011).

Várias pesquisas fitoquímicas demonstram a presença de metabólitos secundários de importância farmacológica, em plantas desse gênero, como alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos em *Mimosa pudica* L. e *Mimosa scabrella* Benth, alcaloides triptamínicos em *Mimosa ophthalmocentra* Mart. Ex Benth, cumarinas e esteróides em *Mimosa paraibana* Barneby e flavonoides e terpenos em *Mimosa caesalpinifolia* Benth (BATISTA et al, 1999; FABROWISKI et al, 2002; NUNES et al, 2008; GANDHIRAJA et al, 2009; PANDE; PATHAK, 2010; SILVA et al, 2012).

2.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret

Dentre as plantas mais abundantes do semiárido nordestino, destaca-se a leguminosa *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret conhecida popularmente como jurema preta. Está disseminada nos estados do nordeste do Brasil, do Piauí até a Bahia, no

norte da Venezuela e Colômbia e vales secos no Sul do México, Honduras e El Salvador (Figura 1) (BARNEBY, 1991; MAIA, 2004).

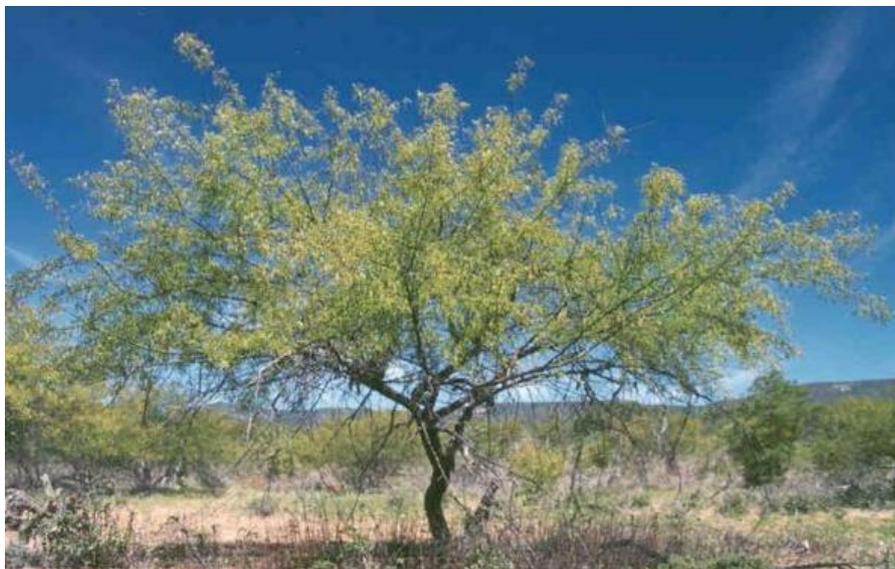


Figura 1: Ilustração da espécie *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret.
Fonte: APNE/CNIP, 2010.

É uma arvoreta ricamente aculeada, de 4 a 6 metros de altura, dotada de copa irregular, cujos ramos novos apresentam pêlos viscosos. Possui caule ereto ou levemente inclinado, de 20-30 cm de diâmetro, revestido por casca grosseira de cor castanho-escuro, rugosa que se desprende em lâminas estreitas, exibindo a madeira avermelhada. Suas folhas são compostas, bipinadas, de 1 a 3 cm de comprimento (pecíolo e raque) e com 4 a 7 pares de pinas constituídas de 15 a 33 duplas de folíolos brilhantes de 4 a 6 mm de comprimento. As inflorescências subterminais são em espigas isoladas ou geminadas, de 4 a 8 cm de comprimento, com flores esbranquiçadas. O fruto é do tipo vagem, tardiamente deiscente, de 2,5 a 5,0 cm de comprimento, que quando maduro se parte em pequenos pedaços (fruto tipo craspédio) contendo até 6 sementes. As sementes são ovóides, de cor castanha a marrom (Figura 2) (LORENZI, 1998; QUEIROZ, 2009).



Figura 2: Partes aéreas da *Mimosa tenuiflora*. (A) Caule, (B) Galho com acúleos, (C) Fruto, (D) Folhas e inflorescências. Fonte: APNE/CNIP, 2010.

A jurema preta apresenta alto grau de resistência à seca e cresce em solos rasos, sendo uma das primeiras espécies a se instalar em áreas degradadas. Com isso, esta espécie possui grande potencial como planta regeneradora de terrenos erodidos, indicando uma sucessão secundária progressiva ou de recuperação e sua tendência ao longo do processo é de redução da densidade. No início da sucessão formam matas quase puras, seus folíolos caem e se refazem continuamente cobrindo o solo com uma tênue camada que se decompõe formando ligeiras camadas de húmus e participa também da recuperação do teor de nitrogênio do solo, preparando, dessa forma, o solo para o aparecimento de outras plantas mais exigentes (LIMA, 1996; MAIA, 2004).

Esta planta tem sido explorada para produção de estacas, lenha e carvão vegetal, devido ao seu elevado potencial energético, sendo uma das principais espécies da caatinga empregada para este fim. Além disso, a espécie *Mimosa tenuiflora* apresenta importante valor como forrageira no semiárido nordestino, fazendo parte da dieta de caprinos, ovinos e bovinos, os quais pastejam as rebrotas mais jovens no início das chuvas, assim como as folhas e vagens secas durante o período de estiagem (ARAÚJO et al, 2004; PEREIRA FILHO et al, 2005).

Devido à sua importância como forrageira, estudos sobre a jurema preta que têm sido direcionados para os fatores que interferem diretamente na produtividade do animal, como o seu valor nutricional e seu caráter tóxico, uma vez que a jurema preta também faz parte do grupo de plantas tóxicas (BEZERRA, 2008). Riet-Corrêa e colaboradores (2006) relatam que a ocorrência de malformações congênitas em bovinos e mais frequentemente em caprinos e ovinos, podem ser causadas pela ingestão da jurema preta, sendo sugerido pela alta frequência da doença no semiárido e sua reprodução experimental mediante a administração desta planta.

A composição química da *M. tenuiflora* tem atraído considerável interesse, principalmente devido à presença de alcaloides indólicos e taninos (SOUZA et al, 2008).

Em estudos realizados por Meckes-Lozoya e colaboradores (1990), conseguiu-se identificar e isolar alguns dos constituintes químicos da jurema preta, como os alcaloides indólicos: 5-hidroxitriptamina (5-HT) e *N, N* – dimetiltriptamina (DMT). Este último é encontrado na casca da raiz desta planta, e está associado ao seu uso alucinógeno (Figura 3).

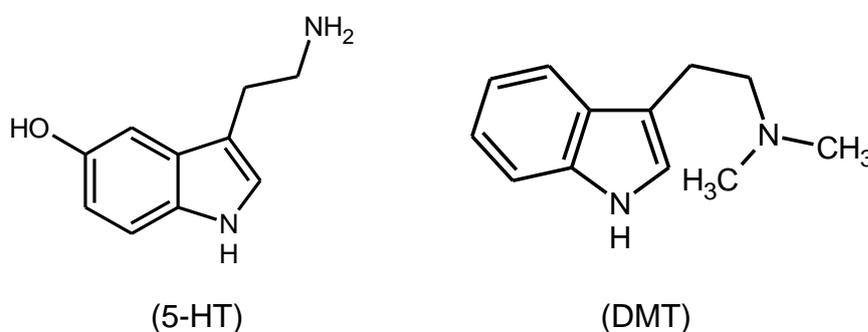


Figura 3: Alcaloides isolados da *M. tenuiflora*. Fonte: SOUZA et al, 2008.

Outros estudos identificaram a presença de duas chalconas: 2',4'-dihidroxi-3',4'-dimetoxichalcona e 2',4',4'-trihidroxi-3'-metoxichalcona (Figura 4), além de três saponinas esteroidais: 3-O-β-D-glicopiranosil campesterol, 3-O-β-D-glicopiranosil estigmasterol e 3-O-β-D-glicopiranosil β-sitosterol (Figura 5), e três saponinas triterpênicas: mimonoside A, mimonoside B e mimonoside C (Figura 6), os quais foram isolados a partir da casca do caule da *Mimosa Tenuiflora*. Além desses componentes, também foram identificadas e isoladas fenoxicromonas (flavonoides “incomuns”): tenuiflorina A, tenuiflorina B e tenuiflorina C a partir das folhas da

jurema preta (Figura 7) (JIANG et al, 1991; ANTON et al, 1993; CAMARGO-RICALDE, 2000; LEÓN et al, 2004).

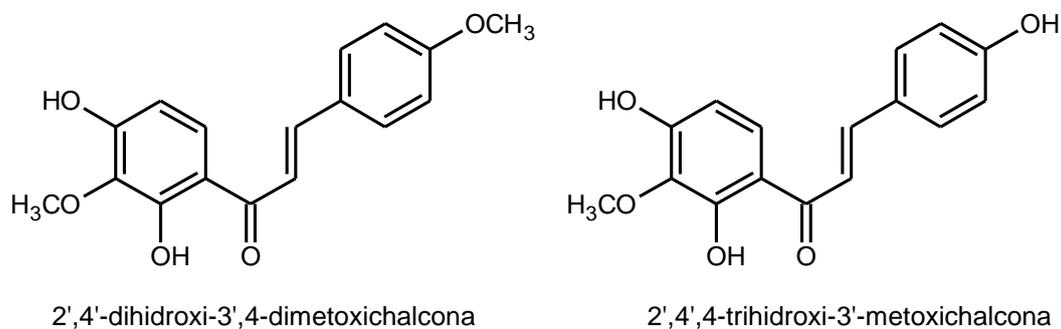


Figura 4: Chalconas isoladas da casca do caule de *Mimosa Tenuiflora*. Fonte: SOUZA et al, 2008.

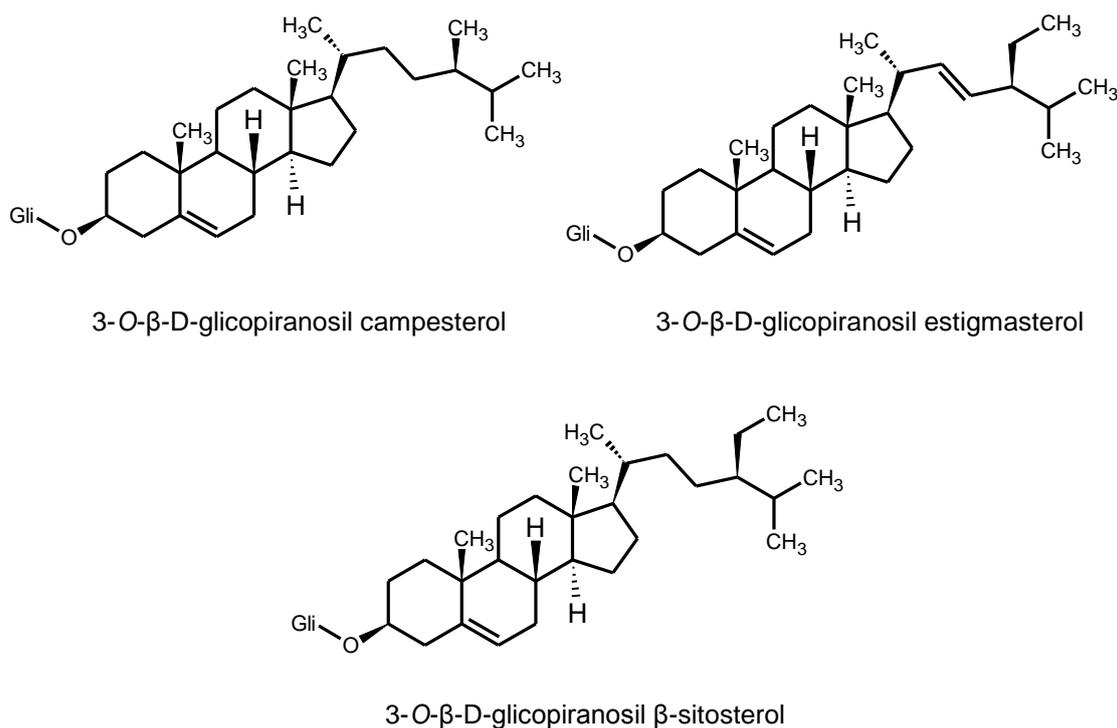


Figura 5: Saponinas esteroidais isoladas da casca do caule de *Mimosa Tenuiflora*. Fonte: SUZART, 2007.

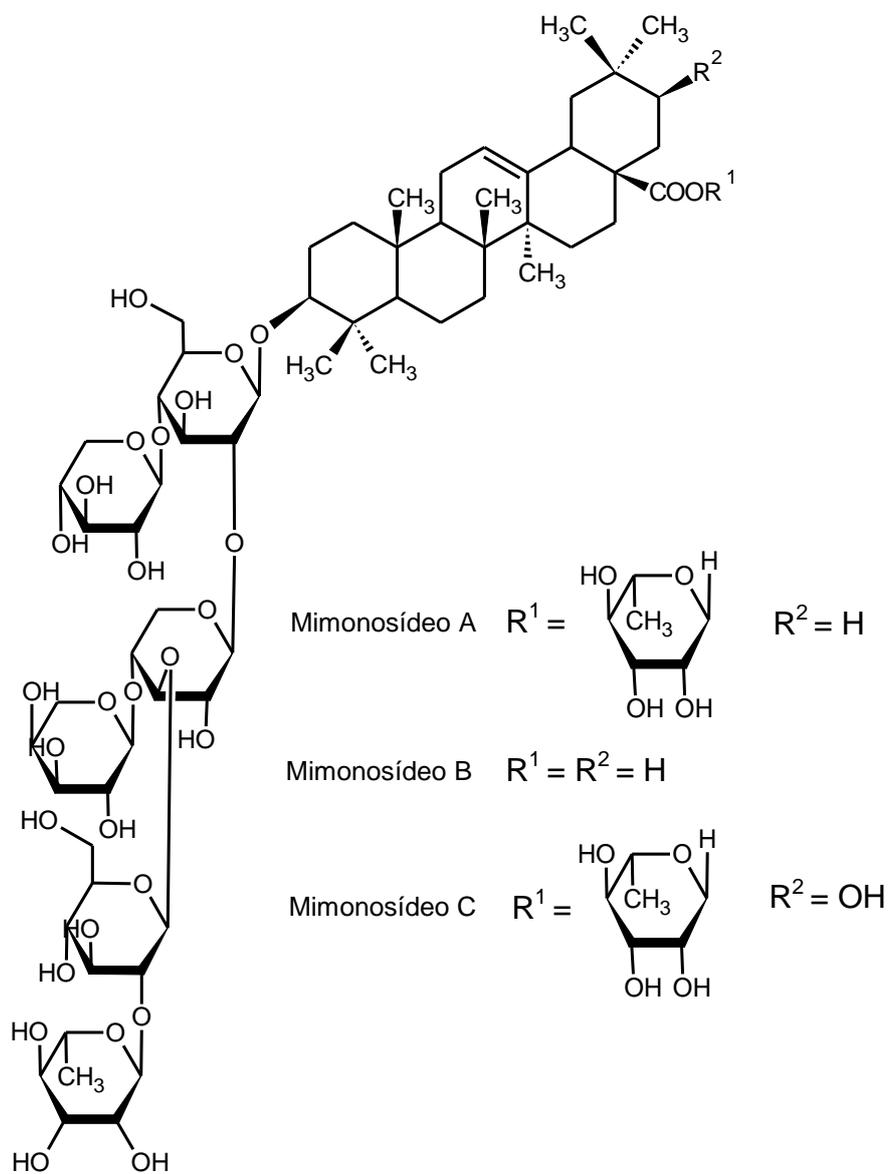


Figura 6: Saponinas triterpênicas isoladas da casca do caule de *Mimosa Tenuiflora*.
 Fonte: SOUZA et al, 2008.

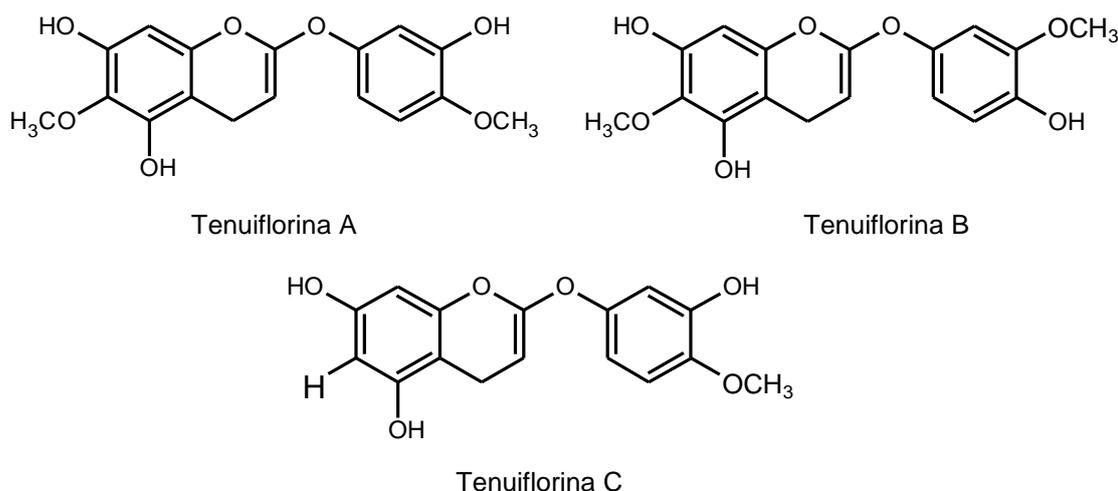


Figura 7: Fenoxicromonas isoladas das folhas de *Mimosa Tenuiflora*. Fonte: SOUZA et al, 2008.

No Brasil, porém, os estudos sobre essa espécie limitam-se à importância forrageira de suas folhas e, mais recentemente, do potencial tanífero das cascas do seu caule, não havendo muitos estudos sobre seus constituintes químicos (PAES et al, 2006).

Na medicina popular, as cascas do caule e da raiz da jurema preta são utilizadas principalmente por comunidades indígenas e populações da região nordeste do Brasil no tratamento de diversas enfermidades, como queimaduras e inflamações (BEZERRA, 2008). Segundo Maia (2004), há pesquisas que demonstram seu potencial antimicrobiano, analgésico, regenerador de células, antitérmico e adstringente peitoral. O uso das cascas, na forma de pó seco, tem-se mostrado eficaz no tratamento tópico de eczemas e inflamações bem como na cicatrização de feridas e até mesmo no tratamento de doença venosa e úlcera de perna (TELLEZ; DUPOY DE GUITARD, 1990; SOUZA et al, 2008).

A jurema preta é não somente designativa de uma espécie botânica, mas também de uma planta sagrada para os povos indígenas, sendo utilizada tradicionalmente como bebida ritual e religiosa, conhecida como “vinho da jurema” (CAMARGO, 2001). O seu uso em rituais indígenas se faz devido à presença do alcaloide *N, N*-dimetilriptamina, que confere propriedades psicoativas a esta planta (Figura 3). No entanto, quando administrada por via oral, esta substância é inativada pela enzima monoamina oxidase (MAO) no trato digestivo, sendo necessário o uso de um inibidor da MAO como as β -carbolinas presentes em *Passiflora incarnata* L, juntamente com a bebida à base da jurema preta, para que se tenha o efeito

neuroológico esperado. A *Mimosa tenuiflora*, bem como outras espécies do gênero *Mimosa*, têm sido usadas pelos povos indígenas nos cultos no Nordeste do Brasil desde muito antes da colonização portuguesa, e após a colonização foi também utilizada por afro-brasileiros (LABATE; GOULART, 2005; SOUZA et al, 2008).

2.4. PESQUISA CIENTÍFICA COM PLANTAS MEDICINAIS

O estudo com plantas medicinais tem despertado cada vez mais interesse por parte da comunidade científica, tendo em vista que as plantas constituem rica fonte para obtenção de moléculas ativas. Estas são exploradas terapêuticamente, na síntese de um grande número de fármacos, fornecendo respostas para inúmeras doenças. Além disso, as plantas fornecem matérias-primas vegetais não somente para obtenção de fármacos, como também para a obtenção de adjuvantes, utilizados na formulação de medicamentos e, ainda, para produção de medicamentos fitoterápicos, os quais são elaborados a partir de extratos vegetais e/ou drogas vegetais (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; ESTEVAM, 2006).

As investigações científicas com plantas medicinais envolvem várias áreas multidisciplinares, como a fitoquímica, que tem por objetivo o conhecimento, isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos; a etnobotânica e a etnofarmacologia, que buscam informações a partir do conhecimento de diferentes povos, incluindo todas as formas de percepção e apropriação dos recursos vegetais; e a farmacologia, que estuda os efeitos farmacológicos de extratos e dos constituintes químicos isolados a partir das plantas (MACIEL et al, 2002; MENDONÇA-FILHO; MENEZES, 2003; VENDRUSCOLO et al, 2005; ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos tanto sintéticos como fitoterápicos.

No Brasil, inúmeros trabalhos foram realizados com o objetivo de embasar, cientificamente, a utilização de plantas como recurso terapêutico, pois muitas espécies ainda são usadas empiricamente sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança. Desta forma, grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não tem estudos para permitir a elaboração de monografias completas e modernas (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; FOGGIO et al, 2006).

2.4.1. METABOLISMO SECUNDÁRIO

O interesse na diversidade molecular das plantas tem estimulado a busca pelo conhecimento do seu metabolismo secundário, o qual é responsável pela síntese de grande parte dos compostos vegetais com atividade biológica. Os metabólitos secundários despertam tal interesse, não só pelas atividades biológicas produzidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas pela imensa atividade farmacológica apresentada por estes componentes (ALVES, 2001).

Metabolismo secundário de plantas é definido como o conjunto de processos metabólicos que originam compostos de baixo peso molecular, que não possuem uma distribuição universal nos vegetais, por não serem necessários a todas as plantas. São substâncias que não são essenciais ao desenvolvimento do vegetal, diferentemente do metabolismo primário, mas é imprescindível para a sua sobrevivência dentro de um ecossistema, viabilizando a adaptação do indivíduo no ambiente em que vive (PERES, 2008).

Os metabólitos secundários apresentam diversas funções de defesa para as plantas contra agentes do meio ambiente, como luz, temperatura, contra predadores, como microorganismos patogênicos, insetos e animais herbívoros e radiação ultravioleta (UV), funcionando como protetores dos constituintes das células primárias mais vulneráveis como DNA, RNA entre outros. Atuam ainda na competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e microorganismos simbiontes e também em alelopatias (EVARISTO; LEITÃO, 2001; MONTANARI JÚNIOR, 2002; BRANDÃO, 2007; RODRIGUES, 2013).

Esses metabólitos apresentam grande diversidade, além de possuírem interessantes propriedades biológicas. Substâncias de estruturas complexas como alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos, bem como seus derivados tem sido alvo de investigação a respeito de suas propriedades medicinais, aromáticas e curativas, sendo importante para os setores alimentício, agrônômico, de perfumaria e principalmente farmacêutico. A diversidade, em termos de estruturas e propriedades químicas, na qual essas substâncias ocorrem na natureza, podem servir para o desenvolvimento de grande número de produtos naturais de interesse comercial, principalmente fitofármacos (ALVES, 2001; SANTOS, 2001).

2.4.1.1. FENÓLICOS

As substâncias fenólicas são metabólitos secundários amplamente encontrados no reino vegetal, abrangendo cerca de 8.000 substâncias com diferentes estruturas químicas. São substâncias que se caracterizam por possuírem anel aromático em sua estrutura, com uma ou mais hidroxilas, sendo denominados por fenólicos quando possuem apenas um anel aromático e por polifenólicos quando possuem mais do que um anel aromático (FERNANDEZ-PANCHON et al, 2011; RODRIGUES, 2011).

Estas substâncias apresentam-se nas plantas de forma livre ou ligadas a açúcares (glicosídeos) e proteínas e englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização sendo classificados em: poucos distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza (BRAVO, 1998; SOARES, 2002).

No primeiro grupo encontram-se os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol, incluindo-se também os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais como a vanilina. Os fenólicos que se apresentam sob a forma de polímeros estão os taninos e as ligninas. E por fim, no grupo das substâncias largamente distribuídas na natureza estão os fenólicos encontrados geralmente em todo o reino vegetal, os quais estão divididos em flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados), os ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (SOARES, 2002; ANGELO; JORGE, 2007).

Os fenólicos têm recebido muita atenção recentemente, devido à gama de efeitos biológicos, incluindo ações antioxidantes, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora, trazendo implicações benéficas na saúde humana, como na prevenção e tratamento do câncer, doenças cardiovasculares e outras patologias (EVARISTO; LEITÃO, 2001; RODRIGUES, 2013).

Entre as atividades biológicas apresentadas pelos metabólitos fenólicos, destaca-se a antioxidante, que por sua vez, dependerá das estruturas químicas desses compostos, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor devido à habilidade em doar hidrogênio ou elétrons; pela velocidade de inativação do radical livre e reatividade com outros antioxidantes, em virtude da

formação de radicais intermediários; e pelo potencial de quelação de metais (SILVA et al, 2010; OLDONI, 2010 *apud* RODRIGUES, 2013).

2.4.1.2. FLAVONOIDES

Os flavonoides são metabólitos secundários de baixo peso molecular com ampla distribuição na natureza e constituem uma importante classe de fenólicos. São biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenoides, ácidos graxos entre outros (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004; SHARMA et al, 2008; SILVA, 2013).

Estruturalmente, os flavonoides são constituídos por 15 átomos de carbono ($C_6-C_3-C_6$) no seu esqueleto básico, arranjados em um anel aromático ligado a um anel pirano, que por sua vez, está conectado por uma ligação carbono-carbono a um terceiro anel aromático (Figura 8) (SALA et al, 2003; SIMÕES et al, 2010).

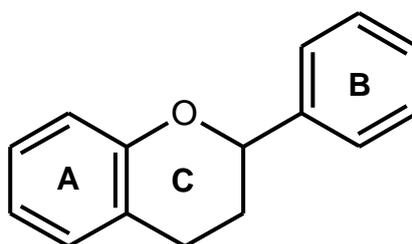


Figura 8: Estrutura básica dos flavonoides. Fonte: SIMÕES et al, 2010.

Os flavonoides podem ser agrupados em subclasses com base em suas características estruturais como flavonas, flavonóis, flavanóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonoides (SALA et al, 2003).

Estes metabólitos participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa de plantas contra raios ultravioleta e ataque de patógenos, além de atraírem animais responsáveis pela polinização (BONFILI et al, 2008). Além disso, diversas atividades biológicas são atribuídas aos flavonoides como antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, anticarcinogênica, cardioprotetora entre outras (ZUANASSI; MONTANHA, 2004; COUTINHO et al, 2009; MENG et al, 2009).

A quantificação de flavonoides em extratos vegetais pode ser realizada em laboratórios, a partir de vários métodos. O método espectrofotométrico utilizando o cloreto de alumínio é um dos mais empregados. Neste teste, o cátion alumínio forma um complexo estável com o flavonoide (flavonoide-Al) ocorrendo intensificação da absorção e desvio para comprimentos de onda maiores. Desta forma, é possível quantificar o teor de flavonoides evitando-se a interferência de outras substâncias como os ácidos fenólicos, uma vez que estes formam complexos com o alumínio e absorvem em comprimentos de onda bem inferiores (WOISKY; SALATINO, 1998; CHOMNAWANG et al 2009).

2.4.1.3. TERPENOIDES E FITOESTEROIDES

Os terpenoides compreendem uma variedade de substâncias vegetais e são biossintetizados pela via do acetato-mevalonato e da desoxixilulose fosfato a partir de uma unidade de isopreno (5 carbonos), o qual constitui o monômero básico no esqueleto isopentano dos terpenoides (Figura 9) (BUCHANAN et al, 2002; DEWICK, 2002; ALVES, 2012).

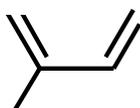


Figura 9: Unidade de isopreno. Fonte: ALVES, 2012.

Os terpenoides constituem a classe mais variada estruturalmente entre os produtos naturais, sendo classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas como, monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesteterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) sendo os triterpenos os mais comumente encontrados em plantas (SIMÕES et al, 2010).

Várias funções são atribuídas aos terpenoides nas plantas como, regulação do crescimento, proteção contra agentes patogênicos e herbívoros e participantes do processo fotossintético. Estes metabólitos fazem parte da composição de alguns óleos essenciais (monoterpenos) e muitos já são conhecidos e utilizados pelo homem pelas suas propriedades inseticidas e aromáticas (VIEGAS JÚNIOR, 2003; BEZERRA, 2008; OLIVEIRA, 2011).

Os fitoesteroides são substâncias esteroidais ou terpenoides tetracíclicas extraídas de vegetais, as quais são formadas por um esqueleto de 17-29 carbonos, com estrutura similar ao do colesterol, mas com algumas modificações. O núcleo fundamental dos fitoesteroides é o anel ciclopentanoperidrofenantrênico, o qual está ligado a uma cadeia lateral na posição C-17, além de apresentar dupla ligação entre C-5 e C-6 e um grupamento hidroxila na posição C-3 (Figura 10) (CANTRILL; KAWAMURA, 2008; SIMÕES et al, 2010).

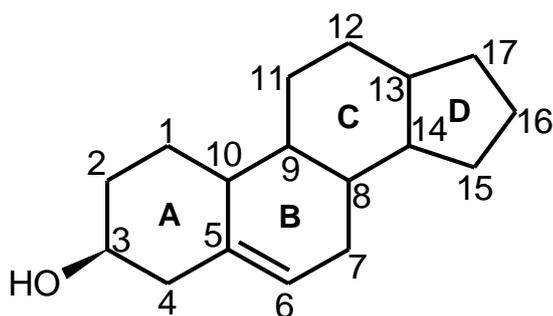


Figura 10: Estrutura básica dos fitoesteroides. Fonte: SIMÕES et al, 2010.

Dentre as atividades biológicas apresentadas pelos terpenoides destacam-se ações sobre o SNC como ansiolítica, antinociceptiva e sedativa, ação antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral, antidiurética entre outras (PATOCKA, 2003; VIEGAS JÚNIOR, 2003; PADUCH et al, 2007; CONNOLLY; HILL, 2008). Com relação aos fitoesteroides, a principal função atribuída a estes compostos é a redução de colesterol sanguíneo humano, os quais têm sido comercializados como aditivos alimentares anticolesterol em vários países (FERNANDES; CABRAL, 2007).

2.4.2. SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS ATIVOS

Dentre as várias técnicas analíticas de separação e identificação de metabólitos secundários no estudo com plantas, será dada ênfase nas que são mais empregadas e que também foram utilizadas no presente trabalho, que são a Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência (CLAE) e a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), respectivamente.

2.4.2.1. CROMATOGRAFIA A LÍQUIDOS DE ALTA EFICÊNCIA – CLAE

A CLAE é uma técnica cromatográfica que emprega pequenas colunas recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela permite realizar separações e análises quantitativas de grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (ASSIS, 2014; CEFET-QUIMICA, 2013).

Segundo Assis (2014), a CLAE é um dos métodos mais empregados em diversas indústrias como a alimentícia, farmacêutica, petroquímica, laboratório de análises clínicas, entre outras, onde é necessário purificar, isolar ou quantificar substâncias de misturas muito complexas.

Os cinco componentes principais desta técnica são eluição, injeção da amostra, as fases estacionária e móvel, o tipo de detector utilizado e a análise dos dados adquiridos (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007; MCMASTER, 2007).

A eluição dos analitos se dá pela fase móvel a qual é bombeada sob determinados fluxo e pressão passando de maneira consistente e reprodutível através da coluna cromatográfica (MARK, 2003; KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007; MCMASTER, 2007).

A amostra é introduzida na válvula de injeção, mediante micro seringa para dentro de uma pequena câmara, a alça de amostragem, de onde é eluída pela fase móvel. O volume de injeção deve ser o menor possível, sendo condicionado por fatores externos como as dimensões da coluna e a sensibilidade do detector utilizado. Normalmente, as válvulas de injeção apresentam alças de amostragem que mantêm fixos os volumes de 1 a 100 μL (RODRIGUES, 2011; CEFET-QUIMICA, 2013).

Na CLAE, as fases estacionárias mais comuns são constituídas por partículas microporosas de sílica com diâmetro de 1,5 a 5 μm que são empacotadas em colunas de aço inox muito mais estreitas que as convencionais, por onde passa a fase móvel e ocorre o processo de separação. Quanto menor for o tamanho da partícula, mais eficiente será a coluna cromatográfica, porém maior será a resistência à vazão (HARRIS, 2008; ASSIS, 2014).

A fase móvel é composta por solventes ou eluentes com alta pureza que atravessam a coluna permitindo a eluição dos compostos através da mesma. A

eluição pode ser do tipo isocrático ou de gradiente. No primeiro caso, o solvente terá a composição fixa durante todo tempo de eluição enquanto que no segundo caso, a composição dos eluentes é variável no decurso da corrida cromatográfica (MARK, 2003; KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007; MCMASTER, 2007; HARRIS, 2008).

De acordo com o tipo do recheio da coluna, a CLAE pode ser dividida em dois grupos: em fase normal e em fase reversa. Na cromatografia em fase normal tem-se uma fase estacionária polar e uma fase móvel menos polar. Já em fase reversa utiliza-se uma fase estacionária com características apolares e uma fase móvel polar. Desta forma, a seletividade, capacidade e eficiência das colunas dependem do material que as constitui (GOMES, 2010).

Após saírem da coluna, os compostos separados são detectados por um determinado tipo de sensor que produz um sinal elétrico com intensidade proporcional à concentração dos analitos. Os detectores utilizados podem ser universais, ou seja, detectam qualquer composto eluído da coluna, ou podem ser seletivos, que detectam apenas compostos com características estruturais e físico-químicas específicas. Os detectores empregados mais comuns são: de fotodiodos, fluorescência, índice de refração, eletroquímico e massas (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007; RODRIGUES, 2011).

O detector de fotodiodos (DAD – Diode-Array Detector) permite a absorção de luz no espectro ultravioleta/visível (UV/VIS) (190 – 700 nm), tendo como vantagem a possibilidade de monitorizar qualquer comprimento de onda (dentro dos limites UV-VIS) em um só cromatograma (MARK, 2003).

O cromatograma é a resposta do detector na forma de gráfico, em que aparecem diferentes picos com um tempo de retenção particular e um espectro de absorção próprio, correspondentes a cada um dos analitos eluídos. O tempo de retenção consiste no tempo decorrido entre a injeção da amostra na coluna e a detecção do analito eluído por parte do detector. Desta forma, o cromatograma representa a concentração do analito no efluente em função do tempo ou do volume de eluição (GOMES, 2010; RODRIGUES, 2011).

2.4.2.1.1. QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS POR CLAE

A CLAE tem sido nos últimos anos, a técnica mais empregada na quantificação e identificação de compostos fenólicos, devido a sua eficiência ao

realizar separações e análises quantitativas de substâncias em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (ASSIS, 2014).

Nas análises de fenólicos são utilizadas frequentemente colunas de fase reversa (FR) como as de octadecilsilano C18, que variam de 100 a 300 mm de comprimento com 4,6 mm de diâmetro interno. Esse tipo de coluna consiste num empacotamento de esferas de sílica em que se encontram ligadas à superfície, cadeias poliméricas de hidrocarboneto as quais vão adsorver, com maior ou menor afinidade, os compostos presentes na amostra (MERKEN; BEECHER, 2000; KAZAKEVICH; MARK, 2003; LOBRUTTO, 2007).

As diferenças nas características dos métodos de identificação e quantificação de fenólicos estão associadas com o sistema de detecção e eluição. Os sistemas de eluição são normalmente binário, formados por uma solução aquosa polar ácida (Fase A), a qual é acidificada geralmente com ácido acético, ácido perclórico, ácido fosfórico ou ácido fórmico; e por um solvente orgânico menos polar (Fase B) como metanol ou acetonitrila, podendo ser acidificada ou não (MERKEN; BEECHER, 2000; GOMES, 2010).

A faixa de pH utilizada para a análise de substâncias fenólicas em fase reversa é frequentemente baixa, entre 2 e 4, sendo que os tempos totais de análise são geralmente de no máximo 1 hora, com equilíbrio entre as execuções (MERKEN; BEECHER, 2000).

Os detectores mais utilizados em CLAE com colunas de fase reversa são UV/VIS, uma vez que as substâncias fenólicas apresentam regiões cromóforas que absorvem na região do ultravioleta (UV). A maioria delas possui valores de absorção entre 246 – 262 nm podendo ter um ombro entre 290 – 315 nm (LEE, 2000).

2.4.2.1.2. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de métodos analíticos é um processo usado para confirmar que a sua aplicação em uma análise específica é adequada para a finalidade pretendida. Com isso, a validação de um método assegura a qualidade, confiabilidade e consistência dos resultados analíticos (BURGESS et al, 2000; BRASIL, 2003).

No Brasil, os procedimentos para validação de métodos analíticos estão descritos em resoluções e guias disponibilizados por agências credenciadoras como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de

Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). A ANVISA regulamenta a validação de métodos analíticos e bioanalíticos através da Resolução nº 899, de 25 de maio de 2003 e o INMETRO disponibiliza o documento DOQ-CGCRE-008, de março de 2003 (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; RIBANI et al, 2004).

Além desses, outros órgãos como Food and Drug Administration (FDA), a International Conference on Harmonization (ICH), a International Standard Organization (ISO), a Farmacopéia Brasileira, a Farmacopéia dos Estados Unidos, entre outros, também estabelecem parâmetros para validação de métodos analíticos e podem ser consultados em um processo de validação (BEZERRA, 2012).

Os parâmetros de validação de métodos analíticos envolvem Seletividade, Linearidade, Exatidão, Precisão, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) (BRASIL, 2003).

Segundo a RE nº 899/2003, a seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Este parâmetro avalia o grau de interferência de espécies, como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas, produtos de degradação e substâncias de propriedades similares que possam estar, também presentes (BRASIL, 2003; RIBANI et al, 2004).

A linearidade corresponde à capacidade do método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um determinado intervalo. É recomendado que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes (BRASIL, 2003).

A relação matemática entre o sinal medido seja área ou altura do pico, e a concentração ou massa da substância de interesse, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. Os coeficientes de uma curva analítica, a partir de um conjunto de medições experimentais, podem ser estimados pelo método matemático de regressão linear. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (BARROS NETO et al, 2002; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; RIBANI et al, 2004).

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é

considerada em três níveis repetitividade; precisão intermediária; reprodutibilidade (BRASIL, 2003).

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, realizadas dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista, mesma instrumentação usada sob as mesmas condições. Já a precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. A reprodutibilidade representa a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica (BRASIL, 2003).

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança. A ANVISA e ICH estabelecem um mínimo de três concentrações baixa, média e alta, com três réplicas cada, perfazendo um total de nove determinações (ICH, 1995; BRASIL, 2003).

A recuperação ou fator de recuperação, R, é o principal método aplicado no estudo de exatidão, sendo definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (THOMPSON et al, 2002; RINABI et al, 2004).

O limite de detecção (LD) representa a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O LD é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (BRASIL, 2003).

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O LQ é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

2.4.2.2. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A espectroscopia de RMN consiste em uma técnica rápida, não destrutiva e não invasiva que permite a análise de substâncias orgânicas e algumas inorgânicas, auxiliando na identificação destas a partir da elucidação de suas estruturas químicas (CORREIA, 2002).

O fenômeno da RMN baseia-se no fato de os núcleos de determinados átomos possuírem propriedades magnéticas que podem ser utilizadas para fornecer informações químicas. Com isso, sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequências (rf) em uma frequência regida pelas características estruturais da amostra (SILVERSTEIN et al, 2007; CARNEIRO, 2013).

Os elétrons são partículas carregadas que giram com dois estados de spin permitidos [número quântico de spin (S)]: $+1/2$ ou $-1/2$, os quais descrevem o momento angular da rotação do elétron em torno do seu eixo. Assim como os elétrons, os núcleos de certos átomos também possuem spin diferente de zero, gerando momento magnético, como por exemplo ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{15}N , ^{19}F , ^{23}Na , entre outros. Dentre esses, os mais amplamente utilizados na espectroscopia de RMN são ^1H e ^{13}C (SILVERSTEIN et al, 2007).

Desta forma, esses núcleos giratórios carregados geram um campo magnético e se comportam como pequenos ímãs, sendo que na ausência de um campo magnético externo os spins nucleares são orientados ao acaso. No entanto, quando uma amostra é colocada em um campo magnético aplicado, o núcleo gira e os prótons tendem a alinhar-se a favor (paralelamente) ou contra (antiparalelamente) o campo de maior magnetismo. Prótons que se alinham a favor do campo estão no estado de spin α de menor energia, enquanto que os prótons que se alinham contra o campo estão no estado de spin β de maior energia. Sem campo magnético não há diferença de energia entre os prótons, e esta diferença de energia gerada pelo campo externo aplicado depende da intensidade desse campo. É então, necessária mais energia para fazer o próton passar do estado de energia mais baixa para o estado de maior energia (SILVERSTEIN et al, 2007; CARNEIRO, 2013).

O processo de ressonância magnética ocorre quando o núcleo passa de um estado de menor energia para o estado de maior energia ao absorver a energia

transferida da radiação eletromagnética (radiofrequência). Assim, há uma mudança na orientação dos spins, tornando-os excitados para níveis altos de energia. Quando os núcleos retornam a seus estados de origem (relaxação), emitem sinais eletromagnéticos que são detectados pelo espectrômetro de RMN que os apresenta como registro da frequência do sinal *versus* sua intensidade (espectro de RMN) (ESCHER, 2004).

Em uma substância orgânica, alguns núcleos estão em regiões de densidade eletrônica maior do que outros e absorvem energia em campos magnéticos de intensidades ligeiramente diferentes (efeitos de blindagem), ou seja, os prótons estão em diferentes ambientes eletrônicos fornecendo sinais em frequências diferentes em resposta a um campo magnético aplicado. Como resultado, os sinais no espectro de RMN aparecem em diferentes posições, apresentando assim, deslocamentos químicos diferentes, os quais são definidos de acordo com suas distâncias em relação ao sinal de uma substância de referência (posição 0). A substância de referência normalmente utilizada é tetrametilsilano (TMS). Com isso, o deslocamento químico [δ (ppm)] é a medida da distância entre o sinal observado e o sinal do TMS de referência (em hertz) (CORREIA, 2002).

Os efeitos de blindagem associados ao efeito dos outros núcleos magnéticos em uma molécula causam um desdobramento do sinal ou pico (acoplamento spin-spin). Desta forma, os prótons não são somente afetados pelo campo magnético externo, mas também pelos campos magnéticos de todos os prótons dos carbonos adjacentes. Prótons acoplados desdobram o sinal um do outro, de forma que o acoplamento de um próton com outro forma-se um pico duplo (duplete), entre três prótons forma-se um pico triplo (triplete) e assim por diante, sendo que sinais com múltiplos picos, formam-se multipletos. A separação entre estes picos é referida como sendo a constante de acoplamento, J , que é medida em Hz (CORREIA, 2002; SILVERSTEIN et al, 2007).

O acoplamento spin-spin é observado entre os átomos de ^1H , pois como apresentam uma abundância natural de 99,9% a probabilidade de esses prótons estarem ligados a carbonos diferentes é grande, ocorrendo assim, acoplamento e desdobramento dos sinais. Já átomos de ^{13}C apresentam abundância de 1,1% o que diminui significativamente a probabilidade de ocorrer acoplamento spin-spin entre eles. No entanto, pode ocorrer acoplamento entre ^{13}C e ^1H , o que faz com que os espectros de ^{13}C apresentem sobreposições complexas de vários picos (multipletos),

dificultando a interpretação dos mesmos. Desta forma, os espectros de ^{13}C são geralmente obtidos desacoplados dos ^1H , fazendo com que os picos apresentem-se na forma de singletos (ESCHER, 2004).

Os espectrômetros de RMN em geral utilizam imãs supercondutores com campos magnéticos muito intensos e pulsos curtos de radiação de radiofrequência, que provocam a absorção de energia pelos núcleos da amostra. A excitação dos núcleos provoca um fluxo de pequena corrente elétrica numa bobina receptora que envolve a amostra. O instrumento então amplifica a corrente exibindo o sinal no computador, que por sua vez efetua a premeditação dos sinais e depois de um cálculo matemático (transformada de Fourier), exibe um espectro legível. A amostra é normalmente dissolvida em solventes deuterados e introduzida no aparelho contida em um tubo de vidro de 5mm de diâmetro (CORREIA, 2002; ESCHER, 2004; SILVERSTEIN et al, 2007).

2.4.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

Com o aumento na expectativa de vida tem-se observado também um aumento de casos das patologias que acometem a população mais idosa, como as doenças neurodegenerativas, as quais são decorrentes da disfunção do sistema nervoso, como deficiências relativas à memória, à capacidade intelectual, à coordenação motora, ao equilíbrio, à postura, entre outras, destacando-se principalmente a Doença de Alzheimer (DA) (TREVISAN; MACEDO, 2003; AMORIM et al, 2013).

A demência, embora possa ocorrer nas idades jovens por enfermidades cerebrais variadas, está ligada ao fenômeno de envelhecimento cerebral, sendo que a doença de Alzheimer é a principal causa de demência entre os idosos. Estima-se que atinge cerca de 10% da população com idade acima de 65 anos. Essa doença está associada com “déficits” dos diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina (TREVISAN; MACEDO, 2003; SILVA et al, 2011).

A acetilcolina (ACh) é um dos neurotransmissores mais estudados no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). É sintetizada a partir da acetil coenzima A, resultante do processo de respiração celular, e da colina, formada através do metabolismo de lipídios (TAYLOR; BROWN, 1999).

Esse neurotransmissor encontra-se alojado em vesículas nas terminações nervosas, as quais são liberadas quando ocorre despolarização do neurônio colinérgico, fazendo com que a acetilcolina seja liberada e entre na sinapse para a transmissão do impulso nervoso. Ao ligar-se aos receptores, a acetilcolina apresenta efeitos principalmente excitatórios associados com as funções cognitivas, desempenhando papel fundamental no processo de memória e aprendizado (RANG et al, 2004; NIEWIADOMSKA et al, 2009).

A ACh possui meia-vida muito curta após sua liberação, uma vez que a mesma é degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) em ácido acético e colina na sinapse colinérgica, levando conseqüentemente à perda da sua ação. A AChE é uma glicoproteína globular (serina hidrolase) que é encontrada principalmente nas sinapses do SNC, SNP parassimpático e junção neuromuscular, sendo portanto, uma enzima regulatória que controla a transmissão de impulsos nervosos através da hidrólise do neurotransmissor ACh (MARCEL et al, 1998; MULLER et al, 2002; NIEWIADOMSKA et al, 2009).

Desta forma, o tratamento farmacológico para doenças neurodegenerativas que possuem a neurotransmissão colinérgica diminuída, como na Doença de Alzheimer, envolve primariamente a restauração da função colinérgica usando inibidores da AChE. Os inibidores da atividade desta enzima promovem um aumento na concentração e duração da ação da acetilcolina sináptica, minimizando as perturbações na função cognitiva (TREVISAN; MACEDO, 2003; BERTÉ, 2009; SILVA et al, 2011).

Atualmente, os fármacos inibidores da acetilcolinesterase têm demonstrado eficiência no tratamento clínico na doença de Alzheimer. Entretanto, a maioria apresenta limitações clínicas quanto ao seu uso, devido tanto à meia-vida curta quanto aos seus efeitos colaterais indesejáveis. Com isso, as pesquisas têm sido direcionadas para a busca de substâncias com atividade anticolinesterásica de origem natural, que por sua vez, tenham mais efetividade e menos efeitos colaterais do que os existentes (SUNG et al, 2002; TREVISAN; MACEDO, 2003; BERTÉ, 2009).

Dentre os bioensaios rápidos e sensíveis, o uso da enzima acetilcolinesterase utilizando acetiltiocolina ou moléculas afins como substrato tem sido uma alternativa para a detecção e seleção de amostras com ação anticolinesterásica. O método de Ellman avalia a atividade enzimática pelo teste

colorimétrico utilizando o reagente DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico]) ou reagente de Ellman. O princípio deste método baseia-se na medida da velocidade de produção da tiocolina através da hidrólise do análogo do substrato da AChE, a acetiltiocolina. A tiocolina reage com o DTNB formando uma mistura de dissulfetos e um ânion amarelo (5-tio-2-nitrobenzoato) com intensa absorção em 405 nm (Figura 11) (ELLMAN et al, 1961; TREVISAN; MACEDO, 2003; LIMA, 2011).

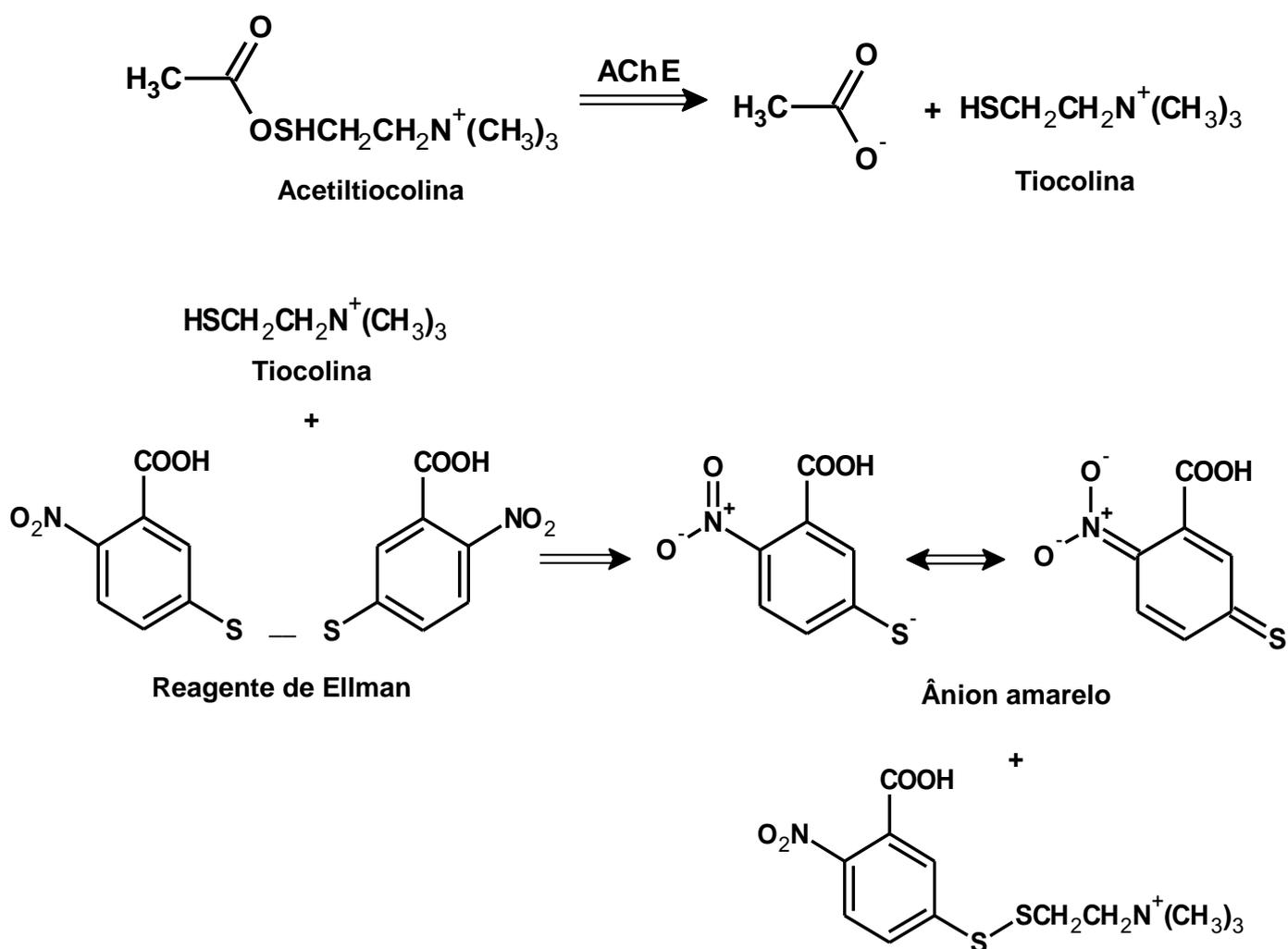


Figura 11: Reações envolvidas no método de Ellman. Fonte: LIMA, 2011.

3. METODOLOGIA

Os experimentos relacionados, como preparo do extrato bruto e dos extratos semi-purificados, fracionamento cromatográfico em coluna e quantificação do teor de flavonoides totais foram realizados no Laboratório de Extração de Produtos Naturais da Unidade Experimental Horto Florestal pertencente à Universidade Estadual de Feira de Santana- UEFS; a atividade anticolinesterásica foi avaliada no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal da Bahia - UFBA; a identificação e quantificação de compostos fenólicos por CLAE-DAD e validação do método analítico foram feitas no Laboratório de Bioprospecção de Vegetais da UEFS e as análises das substâncias isoladas para a detenção dos espectros por RMN ^1H e ^{13}C foram realizadas no Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear da UFBA.

3.1. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret

As partes aéreas e as raízes da espécie *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. foram coletadas no período da manhã, no município de Rodelas, Bahia, em janeiro de 2013, no Sub-Médio São Francisco, onde a mesma é facilmente encontrada. A identificação botânica da espécie foi realizada pelo professor Dr. Luciano Paganucci Queiroz, e em seguida foi depositada a exsicata (NEVES, M. S. 211045 - HUEFS) no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS.

3.2. PREPARO DO EXTRATO BRUTO

As cascas das raízes (3,6kg) da espécie *Mimosa tenuiflora* foram retiradas e colocadas para secagem em estufa com ar circulante a uma temperatura média de 40°C durante 5 dias, sendo em seguida, trituradas em macro-moinho de facas. O pó resultante foi pesado e transferido para erlenmeyers e posteriormente, submetido à técnica de extração a frio, em que foram realizadas 6 macerações, utilizando como solvente o metanol (MeOH).

O extrato metanólico obtido foi filtrado e posto para concentrar em rotaevaporador a 60°C e, em seguida, foi transferido para um frasco previamente pesado e identificado. O material concentrado foi colocado na capela para secagem à temperatura ambiente, dando origem ao extrato bruto seco (Figura 12).

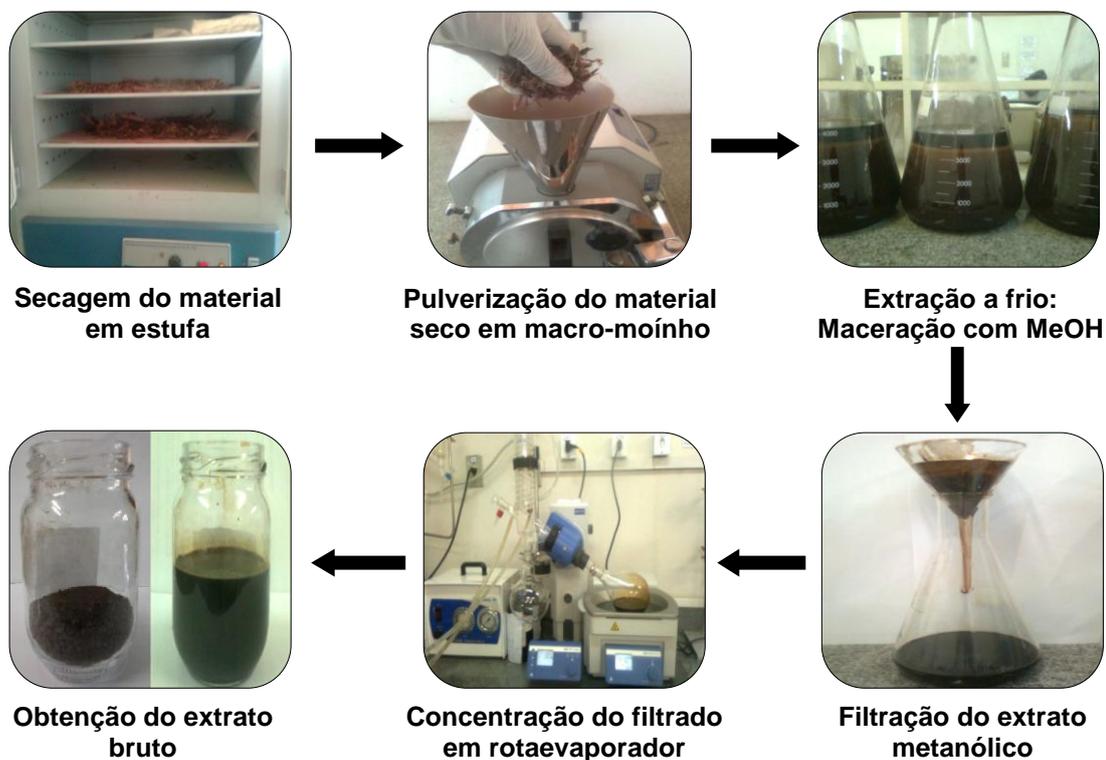


Figura 12: Preparo do extrato bruto seco a partir das cascas das raízes da *Mimosa tenuiflora*.

3.3. PREPARO DOS EXTRATOS SEMI-PURIFICADOS

A partição líquido-líquido do EBCR da *M. tenuiflora* foi realizada com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade como hexano, clorofórmio e acetato de etila, utilizando-se como fase aquosa, mistura de água e metanol nas proporções 9:1 e 6:4 para hexano e clorofórmio, respectivamente, e 100% de água para acetato de etila.

Desta forma, o extrato bruto seco foi dissolvido em água/metanol (fase aquosa) e posteriormente, transferido para funil de separação, adicionando-se o solvente orgânico, de acordo com o aumento da polaridade: hexano, clorofórmio e acetato de etila. Após agitação do funil de separação, formaram-se duas fases, as quais foram coletadas separadamente em frascos diferentes (Figura 13).



Acima: Fase hexânica
Abaixo: Fase aquosa



Acima: Fase aquosa
Abaixo: Fase clorofórmica



Acima: Fase acetato etila
Abaixo: Fase aquosa

Figura 13: Partição líquido-líquido do extrato bruto seco da *Mimosa tenuiflora*.

As frações particionadas resultantes, correspondentes às fases orgânicas, foram filtradas e concentradas em rotaevaporador e, por último, postas na capela para secar à temperatura ambiente, originando-se os extratos hexânico, clorofórmico e acetato de etila, os quais foram pesados e rotulados em frascos (Tabela 1) (Figura 14).

Tabela 1: Massas dos extratos obtidos da *Mimosa tenuiflora*.

Extratos	Massas (g)
Bruto	674,8
Hexânico	7,5
Clorofórmico	22,9
Acetato de etila	56,0

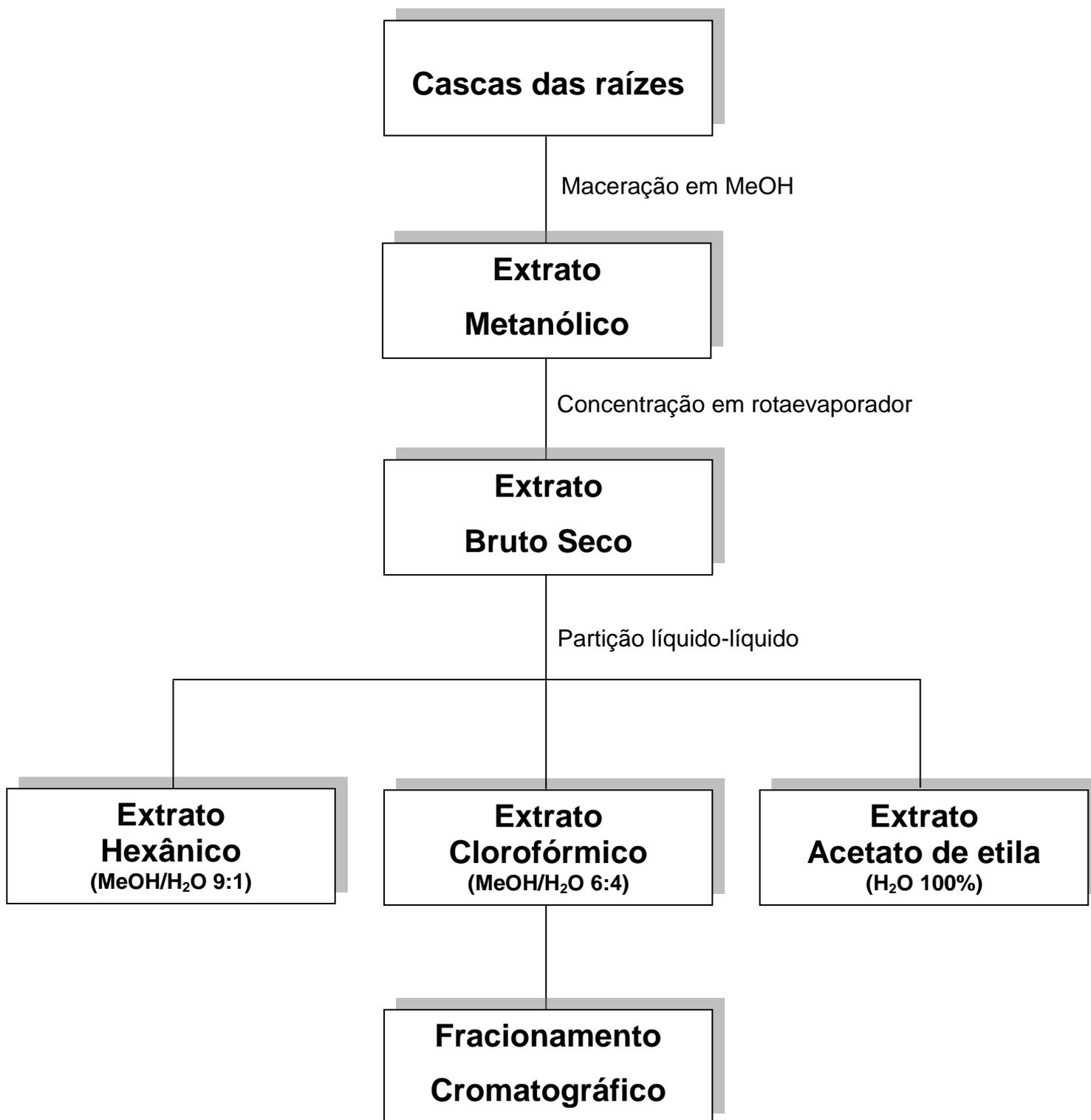


Figura 14: Procedimento geral para a obtenção dos extratos da *Mimosa tenuiflora*.

3.4. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO CLOROFÓRMICO

3.4.1. FRACIONAMENTO DO EXTRATO CLOROFÓRMICO

Uma quantidade do extrato clorofórmico da *Mimosa tenuiflora* (8,35g) foi fracionada em coluna cromatográfica utilizando-se sílica gel 60 (70-230 mesh) de partículas com dimensões entre 0,063-0,200mm (Merck) como fase estacionária. Utilizou-se como solução eluente uma mistura de clorofórmio e metanol em diferentes proporções de forma que se obtivesse uma ordem crescente de polaridade. A partir dessa coluna foram coletadas 18 frações codificadas como MTC₁ a MTC₁₈ (Figura 15).



Figura 15: Fracionamento cromatográfico do extrato clorofórmico.

As frações recolhidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas de sílica gel 60 PF₂₅₄ de alta resolução (Merck), as quais foram reveladas com luz ultravioleta (λ 254 e 365 nm) e vapores de iodo. Em seguida, as frações foram reunidas de acordo com a semelhança no seu perfil cromatográfico, resultando em 7 frações (Tabela 2).

Tabela 2: Frações obtidas da CC do extrato clorofórmico.

Código	Frações reunidas	Massa (g)
MTC 1	1	0,1050
MTC 2	2	0,1042
MTC 3	3	0,0903
MTC 4	4	0,0641
MTC 5	5	0,0948
MTC 9	6-9	6,6156
MTC 18	10-18	1,2122

Na fração MTC₄ observou-se a formação de cristais incolores na forma de ráfides, os quais foram raspados com auxílio de espátula e lavados com gotas dos solventes hexano e clorofórmio para retirada de impurezas. Em seguida, a amostra resultante (7,8mg) foi submetida à análise espectrométrica de RMN ¹H e ¹³C para identificação estrutural.

3.4.1.1. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO MTC₉

A fração MTC₉, por ter maior massa (6,6156g), foi selecionada para novo fracionamento em CC empregando-se como fase estacionária sílica gel 60 e como solução eluente uma mistura de hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 17 frações codificadas como MTC₉₁ a MTC₉₁₇, as quais foram reunidas em 11 frações após serem analisadas em CCD e reveladas em UV e iodo (Figura 16) (Tabela 3).

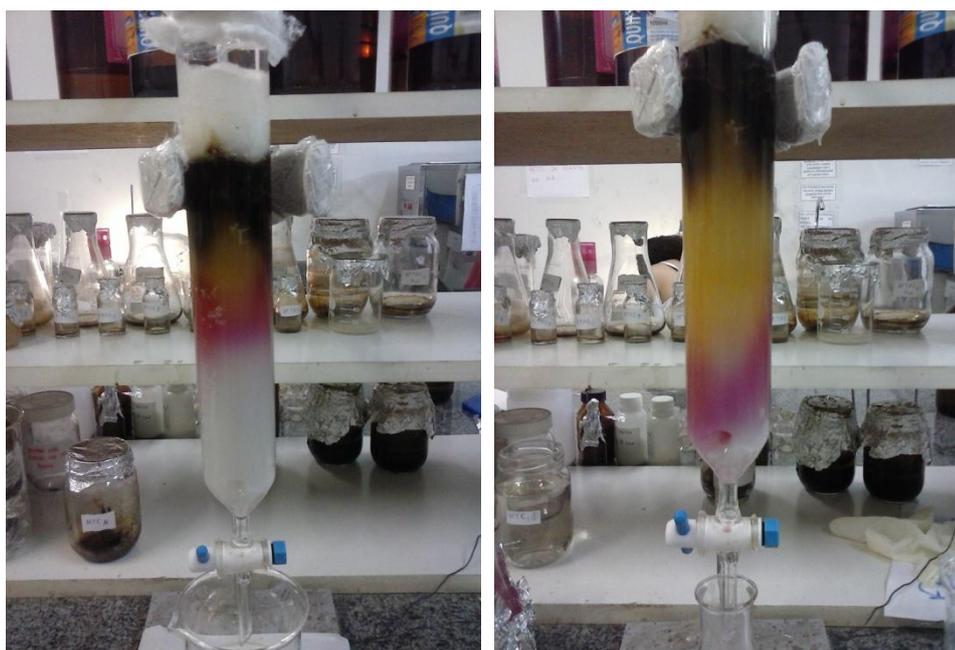


Figura 16: Fracionamento cromatográfico da fração MTC₉.

Tabela 3: Frações obtidas da CC de MTC₉.

Código	Frações reunidas	Massa (g)
MTC9 1	1	0,1723
MTC9 2	2	0,0264
MTC9 3	3	0,1345
MTC9 4	4	0,0548
MTC9 5	5	0,0570
MTC9 6	6	0,3397
MTC9 7	7	0,3745
MTC9 8	8	0,3318
MTC9 9	9	0,4293
MTC9 11	10-11	0,3755
MTC9 17	12-17	2,2746

Nas frações MTC9 1 e 2, formaram-se precipitados amorfos de coloração amarelada e rósea, respectivamente (Figura 17). Os mesmos foram raspados com auxílio de espátula e em seguida lavados com gotas de hexano e metanol para retirada de impurezas. As amostras resultantes MTC9₁ (31,7mg) e MTC9₂ (14,1mg)

foram submetidas à análise de RMN ^1H e ^{13}C para identificação estrutural das mesmas.



Figura 17: Precipitados formados nas frações MTC9₁ e MTC9₂.

3.4.2. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C das amostras analisadas foram obtidos em espectrômetro da marca Varian, modelo GEMINI 2000 e INOVA 500 operando a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C . A fração MTC₄ foi dissolvida em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e as frações MTC9₁ e MTC9₂ foram dissolvidas em piridina deuterada (Pyr-d_5) empregando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm, a constante de deslocamento (J) em Hz e a multiplicidade dos sinais foi indicada como s = singlete, d = duplete, dd = duplo duplete, ddd = duplo duplo duplete, t = tripleto, dt = duplo tripleto e m = multiplete.

3.5. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS POR CLAE-DAD

Para a identificação e quantificação de compostos fenólicos por CLAE-DAD nos extratos clorofórmico e acetato de etila da espécie *Mimosa tenuiflora* os padrões empregados foram ácido gálico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidina B2, ácido caféico, rutina, ácido *trans*-ferúlico, ácido *trans*-cinâmico, quercetina, canferol,

formononetina e canferide (Sigma-Aldrich) e o método analítico seguido foi desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa que realizou o presente estudo.

As análises cromatográficas foram feitas em cromatógrafo Varian equipado com uma bomba binária de alta pressão, equipado com detector de arranjo de diodo Varian ProStar e injetor manual de amostras (Figura 18). A separação cromatográfica foi realizada por meio de coluna LiChroCART Purospher StaR® RP18-e (250 mm x 4,6 mm i.d.) (5 μ m) (Merck, Darmstadt, Germany) combinado com pré-coluna apropriada da Merck. As condições cromatográficas incluíram: volume de injeção de 20 μ L e faixa de comprimento de onda de 220-400 nm, com aquisição em 280 nm.



Figura 18: Cromatógrafo Varian.

O gradiente de eluição utilizado foi composto pelas soluções de ácido acético 0,7% (Fase A) e acetonitrila:ácido acético 0,7% (8:2 v/v) (Fase B) de acordo com o sistema descrito na Tabela 4. As análises foram realizadas com tempo total de 41 minutos, a uma temperatura de 25°C e com fluxo de 1mL/min.

Tabela 4: Composição do gradiente de eluição.

Tempo (min)	Solvente A (% v/v)	Solvente B (% v/v)
0:00	95	5
1:00	95	5
5:00	90	10
12:00	83	17
19:32	56,6	43,4
19:55	55,3	44,7
30:00	20	80
30:01	0	100
35:00	0	100
38:00	95	5
41:00	95	5

As amostras a serem analisadas foram preparadas dissolvendo-se com o solvente orgânico (Fase B) e em seguida foram filtradas em cartucho de Extração de Fase Sólida (*Solid-Phase Extraction* -SPE) para remover partículas que pudessem interagir com a coluna cromatográfica ou danificá-la e, com isso, alterar os resultados. Após as amostras serem injetadas e ter sido feita análise preliminar, as mesmas foram fortificadas com os padrões e novamente injetadas. A identificação dos compostos foi realizada comparando-se o tempo de retenção e o espectro no UV das amostras em relação aos padrões.

A partir das substâncias identificadas, foram quantificados os teores de catequina e epicatequina no extrato acetato de etila. Para isso, foram construídas curvas de calibração com os padrões puros, em que foram preparadas seis concentrações do padrão catequina (2; 1,5; 1; 0,5; 0,25 e 0,1mg/mL) e seis concentrações do padrão epicatequina (1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,05mg/mL) bem como uma concentração da amostra (3mg/mL), as quais foram injetadas em triplicata no cromatógrafo. A partir das médias das áreas dos picos de cada concentração foram plotados gráficos (área do pico x massa em mg/mL) e através de regressão linear dos pontos originou-se a equação da reta ($y=ax+b$) que permitiu quantificar o teor de catequina e epicatequina identificadas.

3.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE QUANTIFICAÇÃO DE CATEQUINA E EPICATEQUINA POR CLAE-DAD

O método de quantificação de catequina e epicatequina no extrato acetato de etila da *M. tenuiflora* foi validado de acordo com a Resolução RE nº 899/2003 da ANVISA. Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

3.6.1. SELETIVIDADE

A seletividade do método foi determinada pela análise dos cromatogramas, em que foram comparados os picos do padrão e da amostra, levando-se em consideração tempo de retenção e espectro no UV para verificar a presença do composto puro.

3.6.2. LINEARIEDADE

A linearidade foi avaliada através da construção das curvas de calibração com os padrões catequina e epicatequina, levando-se em consideração o coeficiente de correlação (R^2). Estas curvas foram obtidas a partir de seis diferentes concentrações do padrão catequina numa faixa de 0,1 – 2mg/mL e seis diferentes concentrações do padrão epicatequina numa faixa de 0,05 – 1mg/mL, sendo que as injeções das concentrações foram realizadas em triplicatas.

3.6.3. PRECISÃO

A precisão foi determinada pela injeção em triplicata das diferentes concentrações do padrão catequina e epicatequina, como descrito anteriormente. Esse parâmetro foi expresso como o desvio padrão relativo da série de medidas, segundo a fórmula,

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Em que, DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada. O valor de DPR tem que ser menor ou igual a 5%.

3.6.4. EXATIDÃO

A exatidão foi realizada pelo método de recuperação por adição do padrão. Preparou-se a amostra dissolvendo-a com o solvente orgânico (Fase B) e logo após foi filtrada em cartucho SPE, e adicionado 1mL da mesma em quatro recipientes pequenos. Três dessas amostras foram fortificadas com concentrações conhecidas do padrão catequina (1; 0,5 e 0,2 mg/mL) e uma outra amostra foi utilizada como branco adicionando-se somente a Fase B. As amostras foram injetadas em triplicata no cromatógrafo. O mesmo procedimento foi realizado com o padrão epicatequina. A exatidão foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\text{Rec\%} = \frac{[\text{valor obtido} - \text{valor real}]}{\text{valor real}} \times 100$$

3.6.5. LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

No limite de detecção (LD), a estimativa feita é realizada com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. A partir dos dados obtidos da equação da reta das curvas de calibração dos padrões catequina e epicatequina foi possível estabelecer o limite de detecção seguindo a fórmula:

$$\text{LD} = \frac{\text{DP}_a \times 3}{\text{IC}}$$

Em que, DP_a é o desvio padrão obtido a partir da curva de calibração e IC é a inclinação da curva de calibração.

3.6.6. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

No limite de quantificação (LQ), a estimativa feita é realizada com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base. O limite de quantificação (LQ) foi estimado pela relação do desvio padrão e da inclinação da curva de calibração, segundo a fórmula:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Em que, DPa é o desvio padrão obtido a partir da curva de calibração e IC é a inclinação da curva de calibração.

3.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

A atividade anticolinesterásica dos extratos da *M. tenuiflora* foi avaliada quantitativamente através do método de Ellman (1961) com adaptações, em que se avaliou a capacidade de inibição da enzima AchE das amostras testadas.

Para a realização do teste foram depositados em todos os poços de uma microplaca de ELISA 140 µL de tampão fosfato pH 7,5, 10 µL de ácido 5-5'-ditiobis-[2-nitrobenzólico] (10 mM), 20 µL da enzima acetilcolinesterase (0,5 U/mL) e 20 µL da amostra a ser testada na concentração de 1 mg/mL. A placa foi então encubada em temperatura ambiente por 15 minutos sendo em seguida, adicionado 10 µL de iodeto de acetiltiocolina (15 mM). A reação foi monitorada em espectrofotômetro UV/VIS em $\lambda = 405\text{nm}$ por 60 minutos, sendo todo teste realizado em triplicata (Figura 19).

Os percentuais de inibição da enzima AchE para cada extrato foram comparados com o padrão comercial Eserina (fisiostigmina) e calculados a partir da seguinte fórmula: $\%I = (AChE - AChI) \times 100 / AChE$, onde AChI é a atividade obtida na presença do inibidor e AChE na ausência do inibidor.

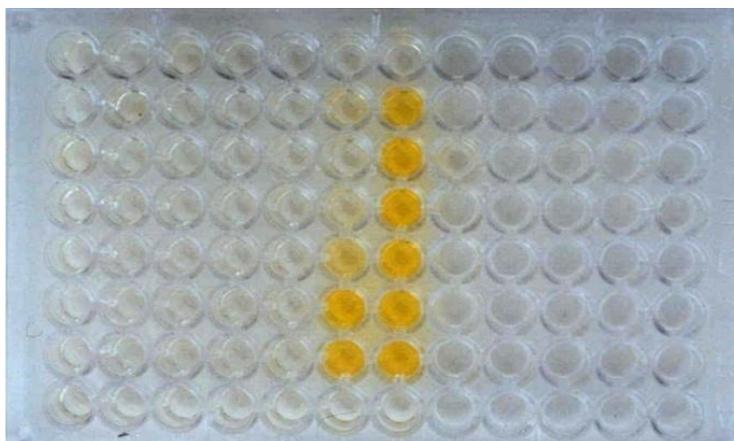


Figura 19: Microplaca de Elisa após reação de inibição da AchE.

3.8. QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS

Para determinação do conteúdo de flavonoides totais contido no extrato bruto da *Mimosa tenuiflora* foi empregado método espectrofotométrico, utilizando-se como reagente cloreto de alumínio (AlCl_3) e curva padrão com quercetina segundo metodologia descrita por Chomnawang et al (2009).

Inicialmente, foram preparadas as soluções de cloreto de alumínio a 2% e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da amostra a ser testada em metanol. Para a construção da curva de calibração foram preparadas soluções de 15, 12, 9, 6, 3 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de quercetina também em metanol. Em seguida, foi adicionado 5 mL da amostra e das diferentes concentrações de quercetina em tubos de ensaios e em cada um deles, adicionou-se o mesmo volume de cloreto de alumínio (Figura 20).

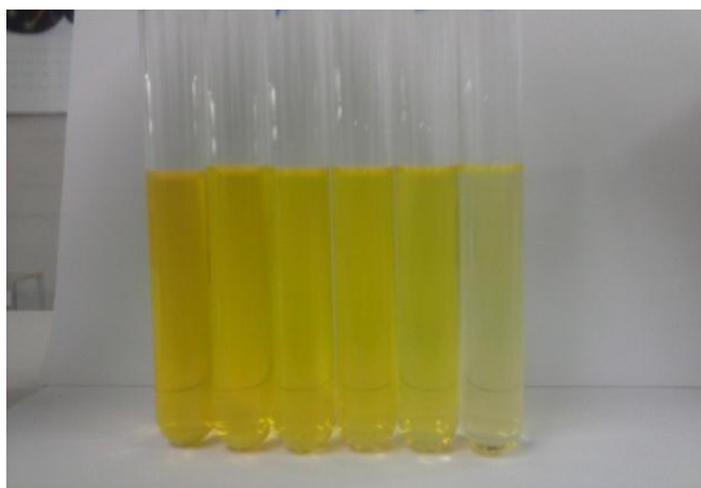


Figura 20: Reação da amostra e concentrações de quercetina com AlCl_3 .

Após 10 minutos de reação, os tubos foram submetidos à leitura em espectrofotômetro a $\lambda=415$ nm, utilizando-se como branco cloreto de alumínio e metanol, sendo que as leituras foram realizadas em triplicata. O teor de flavonoides foi determinado por interpolação da absorbância da amostra contra a curva padrão de quercetina, a partir da equação da reta obtida. O conteúdo de flavonoides foi expresso em gramas de quercetina equivalentes (QE)/100g do extrato.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO CLOROFÓRMICO

4.1.1. FRACIONAMENTO DO EXTRATO CLOROFÓRMICO

O fracionamento cromatográfico do extrato clorofórmico da jurema preta resultou no isolamento da substância codificada como MTC₄. A fração MTC₉ obtida foi submetida a novo fracionamento em CC obtendo-se duas substâncias isoladas, as quais foram codificadas como MTC_{9₁} e MTC_{9₂} (Figura 21).

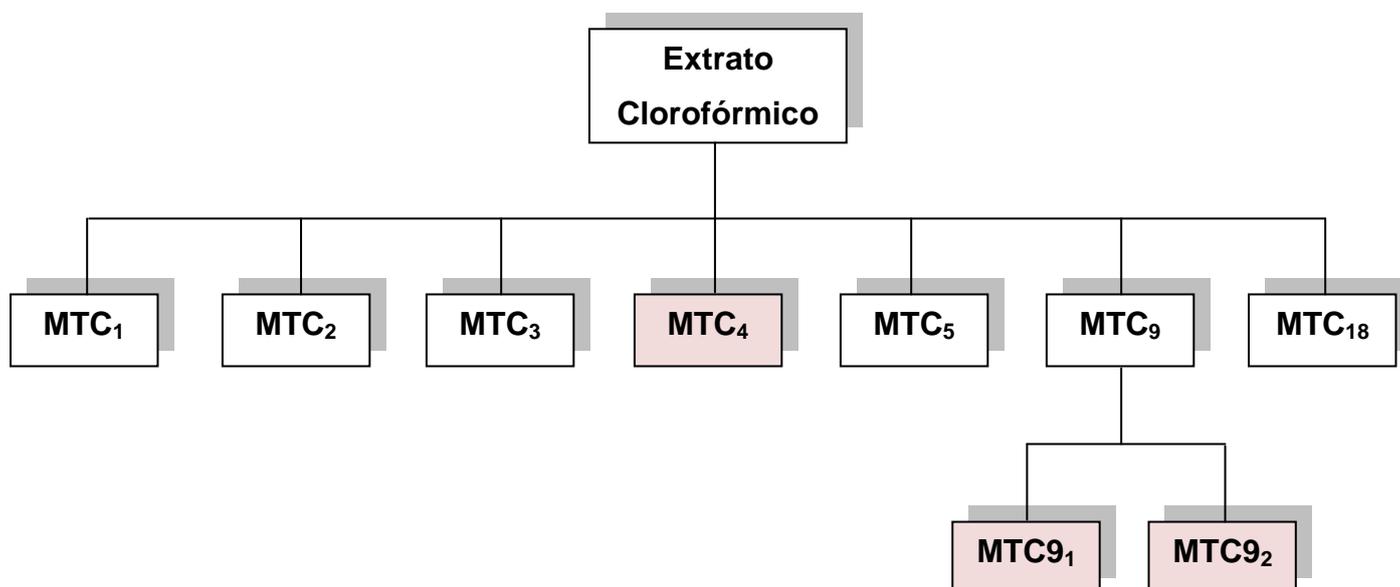


Figura 21: Fracionamento em CC do extrato clorofórmico e isolamento de substâncias.

4.1.2. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

A substância MTC₄ foi isolada como cristais incolores na forma de ráfides. A partir da análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C e posterior comparação com dados da literatura (ALVES, 2012), foi possível identificá-la como sendo uma mistura dos esteroides β-sitosterol e estigmasterol (Figura 22).

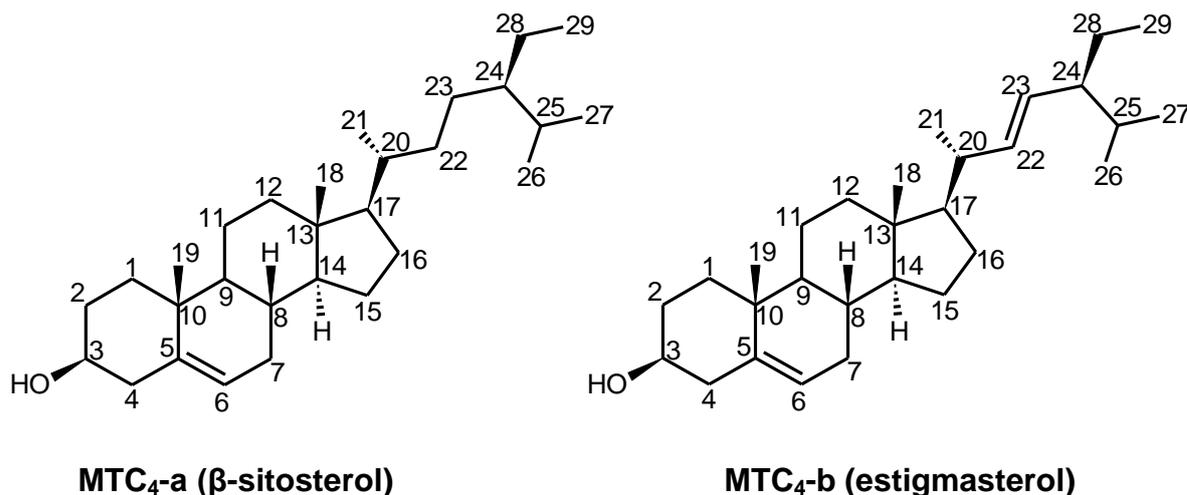


Figura 22: Estruturas das substâncias identificadas em mistura de MTC₄. Fonte: ALVES, 2012.

A análise do espectro de RMN de ¹H mostra a presença de sinais intensos entre δ 0,64 e δ 2,4 referentes a hidrogênios metílicos, metínicos e metilênicos, característicos de esteróides como β -sitosterol e estigmasterol. Verifica-se também um sinal em δ 5,35 ($J = 4,5$ Hz, *d*) atribuído a um hidrogênio olefínico (H-6) e um multiplete em δ 3,52 correspondente a hidrogênio ligado a carbono carbinólico (H-3) que caracterizam o β -sitosterol. Além destes, observa-se a presença de dois duplo dupletos em δ 5,15 ($J = 5,0$ e $10,0$ Hz, *dd*) (H-22) e δ 5,02 ($J = 5,0$ e $10,0$ Hz *dd*) (H-23), os quais são característicos dos hidrogênios olefínicos do estigmasterol (Figura 23, 24 e 25).

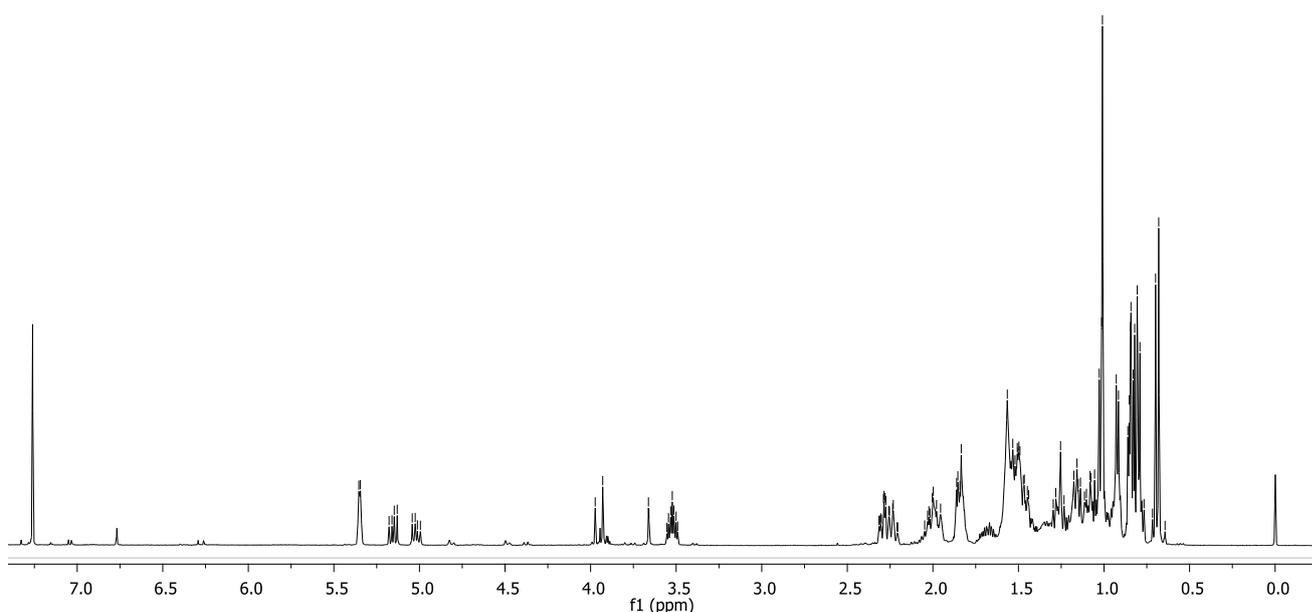


Figura 23: Espectro de RMN de ¹H de MTC₄ [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)].

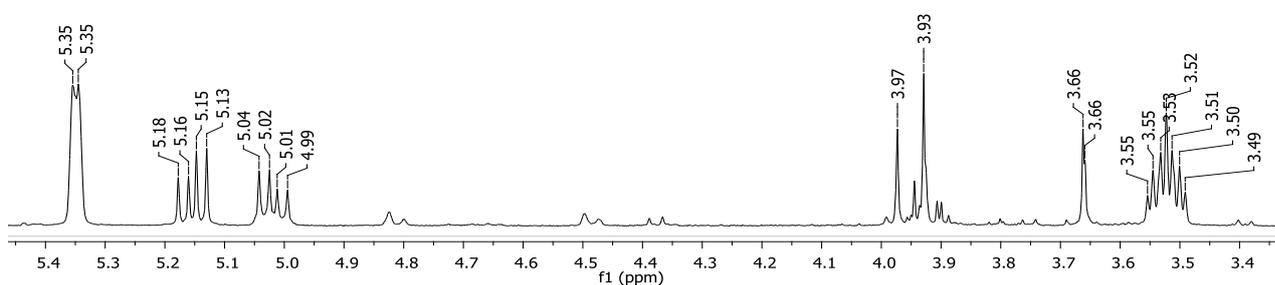


Figura 24: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de MTC₄ [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)].

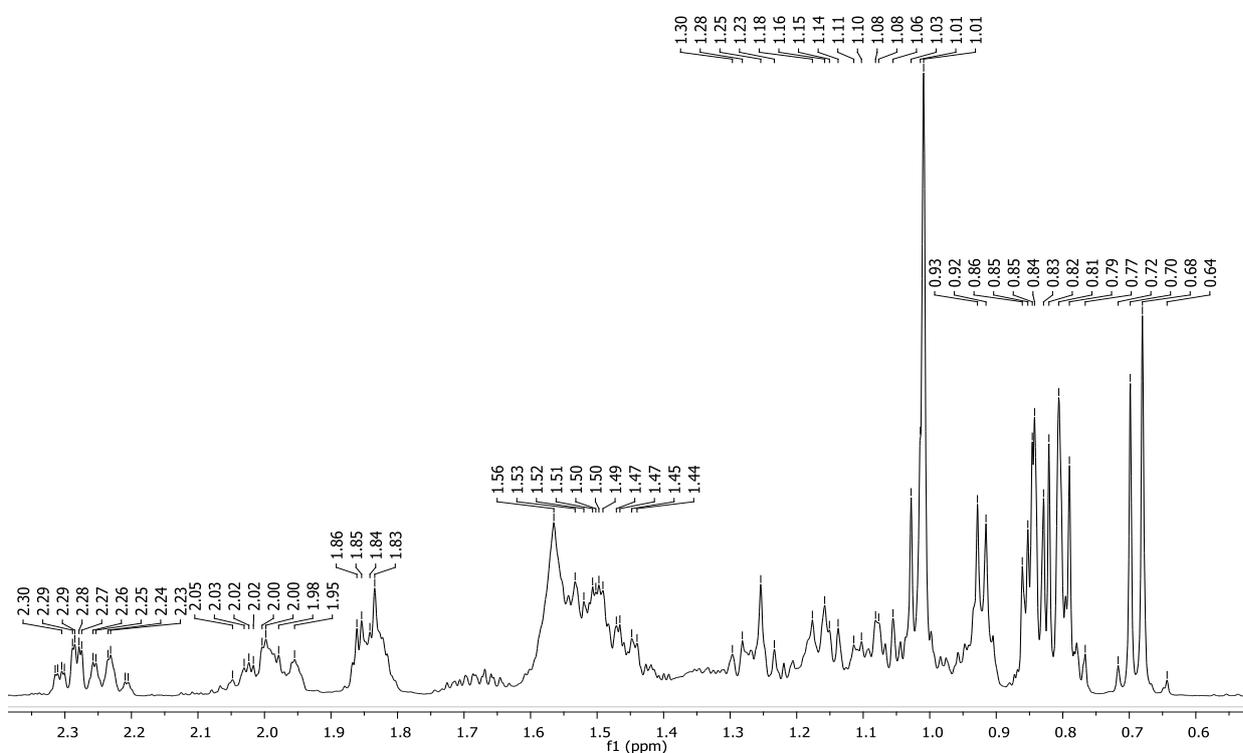


Figura 25: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de MTC₄ [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)].

Os dados obtidos no espectro de RMN de ^{13}C confirmaram as estruturas dos esteroides, a partir da comparação com dados descritos na literatura (Tabela 5) (ALVES, 2012). Foram observados 29 sinais de carbono, indicando a presença de estrutura de natureza esteroidal. Pode ser verificado sinais em δ 71,9 relativo a carbono cabinólico (C-3) e em δ 140,9 e δ 121,8 referentes aos carbonos olefínicos C-5 e C-6 característicos de esteroides, além de sinais em δ 138,4 e δ 129,4

atribuídos aos carbonos olefínicos C-22 e C-23 que caracterizam o estigmasterol (Figura 26 e 27).

Observa-se ainda que os sinais relativos aos carbonos da dupla ligação C-5 e C-6 apresentam intensidade relativamente maior que os sinais para os carbonos da dupla ligação C-22 e C-23 (Figura 27). Esta diferença ocorre devido ao fato do β -sitosterol e o estigmasterol possuírem uma insaturação em comum (Δ^5), o que faz com que os sinais no espectro de carbono se sobreponham, aparecendo mais intensos que os sinais para a insaturação em Δ^{22} .

Estes esteroides são isolados em mistura em grande número de plantas, e quase sempre o estigmasterol ocorre em maior proporção (RIEGER, 2011). Esteroides glicosilados como estigmasterol, β -sitosterol e campesterol já foram isolados em mistura a partir da casca do caule da *Mimosa tenuiflora* (ANTON et al, 1993).

Tabela 5: Comparação de dados de RMN de ^{13}C de MTC_4 [125 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm)] com dados da literatura (ALVES, 2012) para estigmasterol e β -sitosterol.

Nº (C)	MTC₄-a	MTC₄-b	β-sitosterol	Estigmasterol
1	37,4	37,4	37,2	37,2
2	29,3	29,3	31,6	31,6
3	71,9	71,9	71,8	71,8
4	40,6	40,6	42,3	42,3
5	140,9	140,9	140,7	140,7
6	121,8	121,8	121,7	121,7
7	31,8	31,8	31,9	31,9
8	31,8	31,8	31,9	31,9
9	50,3	50,3	50,1	50,1
10	36,7	36,7	36,5	36,5
11	21,2	21,2	21,1	21,1
12	39,9	39,9	39,8	39,8
13	42,4	42,4	42,3	42,3
14	56,9	57,0	56,7	56,9
15	24,4	24,4	24,3	24,3
16	28,4	28,4	28,2	28,2
17	56,1	56,1	56,1	55,9
18	12,0	12,1	11,8	12,0
19	19,5	19,9	19,4	19,8
20	36,3	40,6	36,1	40,5
21	19,1	21,2	19,0	21,2
22	34,1	138,4	33,9	138,3
23	29,1	129,4	29,1	129,3
24	46,0	51,3	45,8	51,2
25	26,2	32,0	26,1	31,9
26	18,9	19,2	18,8	19,0
27	19,9	19,1	19,8	19,0
28	23,2	25,5	23,0	25,4
29	12,0	12,3	12,0	12,2

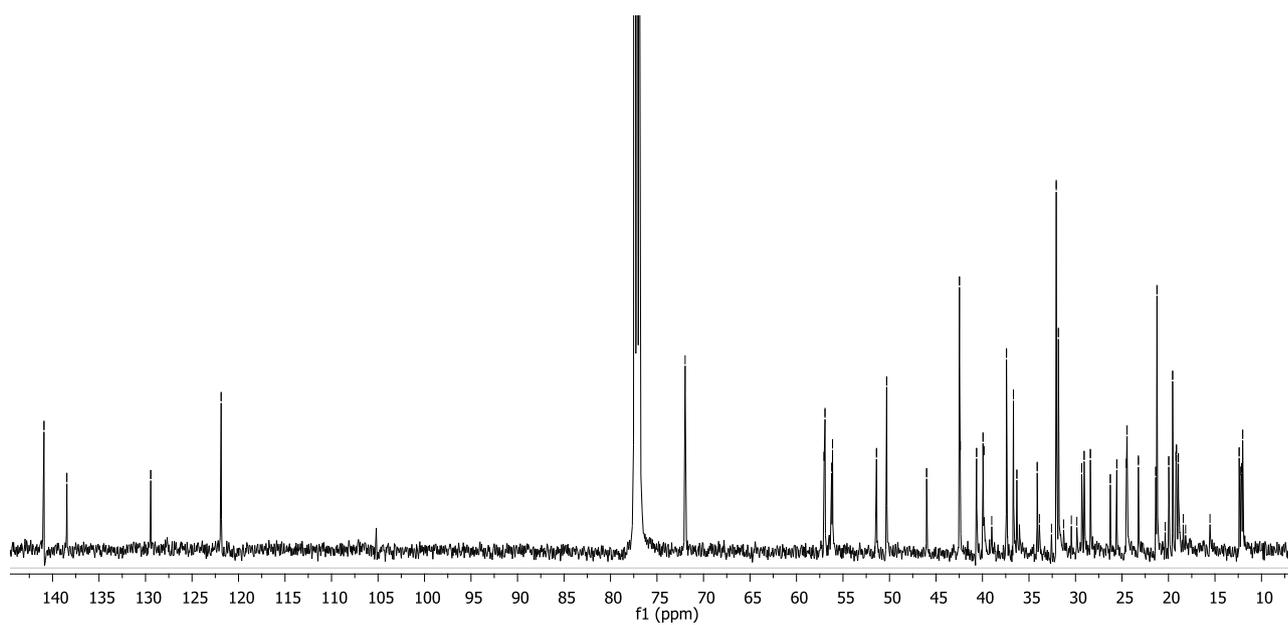


Figura 26: Espectro de RMN de ^{13}C de MTC_4 [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)].

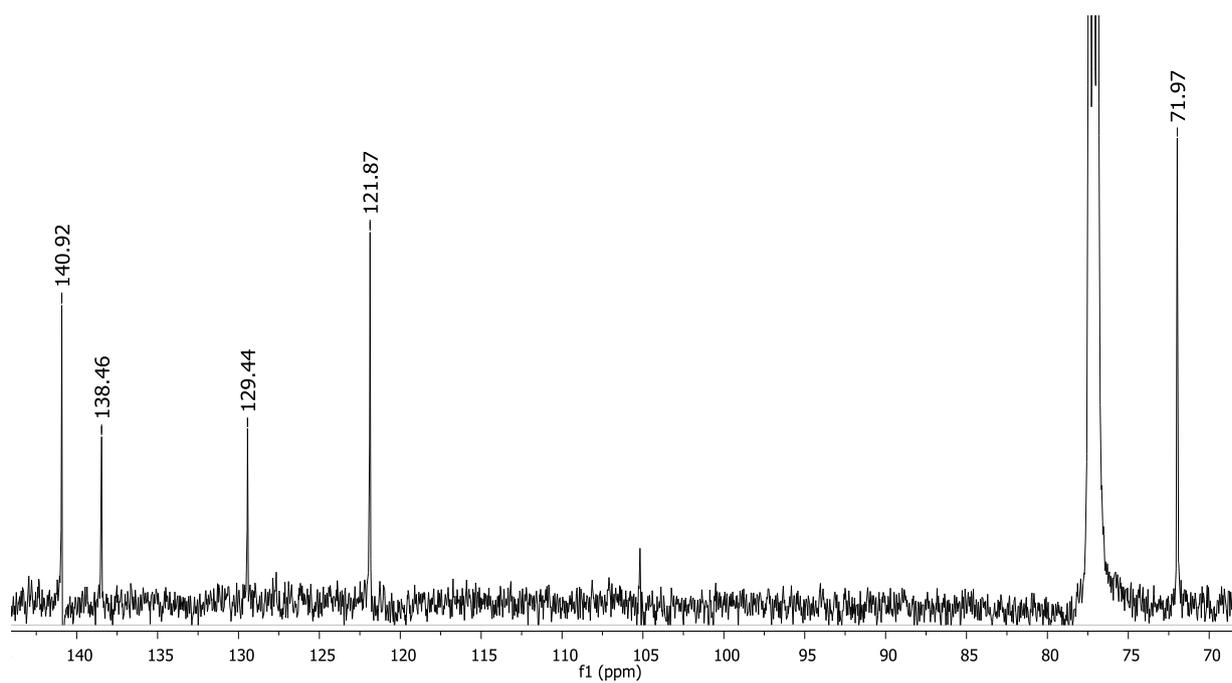
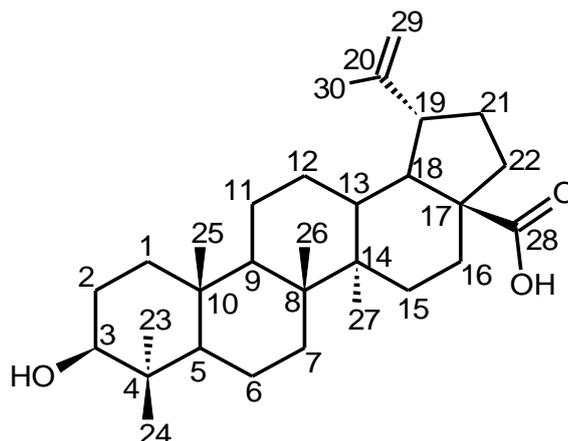


Figura 27: Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de MTC_4 [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)].

As substâncias MTC9₁ e MTC9₂ foram isoladas como precipitados amorfos de coloração amarelada e rosa, respectivamente. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C para as duas substâncias apresentaram-se iguais tratando-se, portanto, do mesmo composto. A análise dos espectros e posterior comparação com dados da literatura (DALMARCO, 2012) permitiram identificá-lo como sendo o ácido betulínico, um triterpeno pentacíclico pertencente ao grupo dos lupanos (Figura 28).



Ácido betulínico

Figura 28: Estrutura da substância identificada em MTC9₁ e MTC9₂. Fonte: DALMARCO, 2012.

O espectro de RMN de ¹H mostra sinais na região entre δ 0,8 a δ 2,8 característicos de estruturas terpenoídicas, destacando-se um duplo tripleto centrado em δ 2,64 ($J= 3,5$ e $3,0$ Hz *dt*) (H-13), um duplo duplo duplete em δ 2,76 ($J=7,0$, $4,0$ e $2,5$ Hz *ddd*) (H-21) e um multiplete em δ 3,48 (H-19). Observam-se também sinais para os seis grupos de metilas em δ 1,25 (H-23 *s*), δ 1,03 (H-24 *s*), δ 0,85 (H-25 *s*), δ 1,09 (H-26 *s*), δ 1,10 (H-27 *s*) e δ 1,82 (H-30 *s*). Além destes, pode-se verificar sinais referentes aos hidrogênios olefínicos geminais ligados ao carbono C-29 em δ 4,97 ($J= 1,5$ Hz *d*) (H-29 α) e δ 4,79 ($J= 1,5$ Hz *d*) (H-29 β) característicos de grupo metileno *sp*² (=CH₂) que juntamente com a metila alílica em δ 1,82 sugere a presença de um fragmento isopropenil. O duplo duplete em δ 3,56 ($J=5,0$ e $10,0$ Hz *dd*) indica a presença de hidrogênio (H-3) ligado a carbono carbinólico comum nos terpenos (Figura 29, 30 e 31).

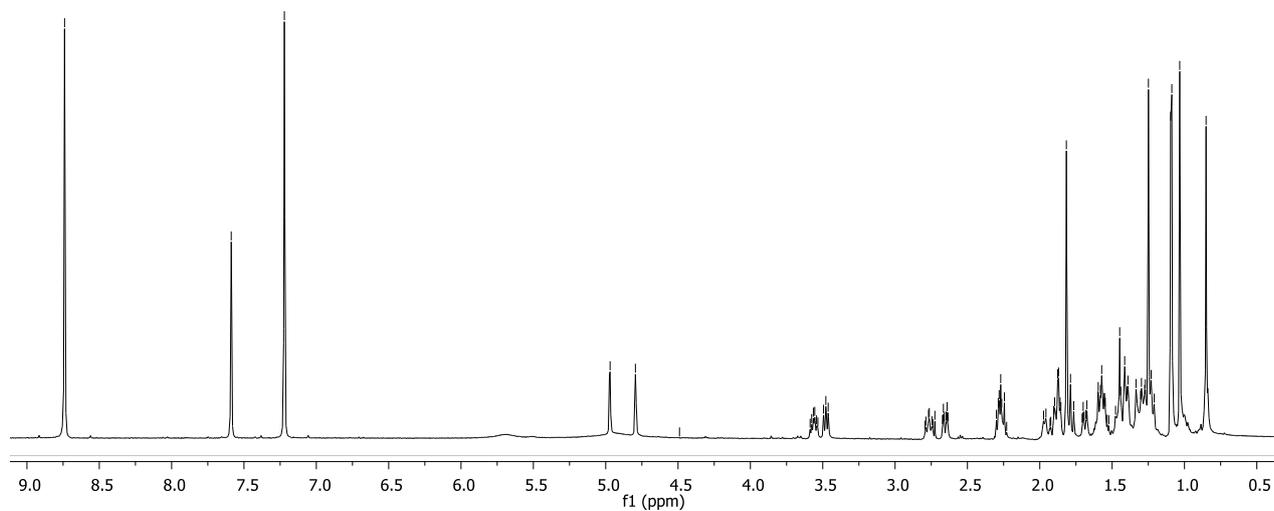


Figura 29: Espectro de RMN de ^1H de MTC9_2 [500 MHz, Piridina-d5, δ (ppm)].

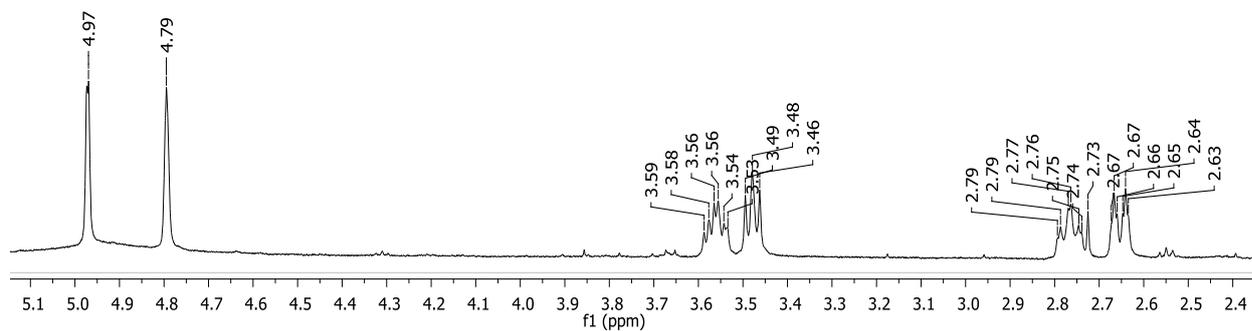


Figura 30: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de MTC9_2 [500 MHz, Piridina-d5, δ (ppm)].

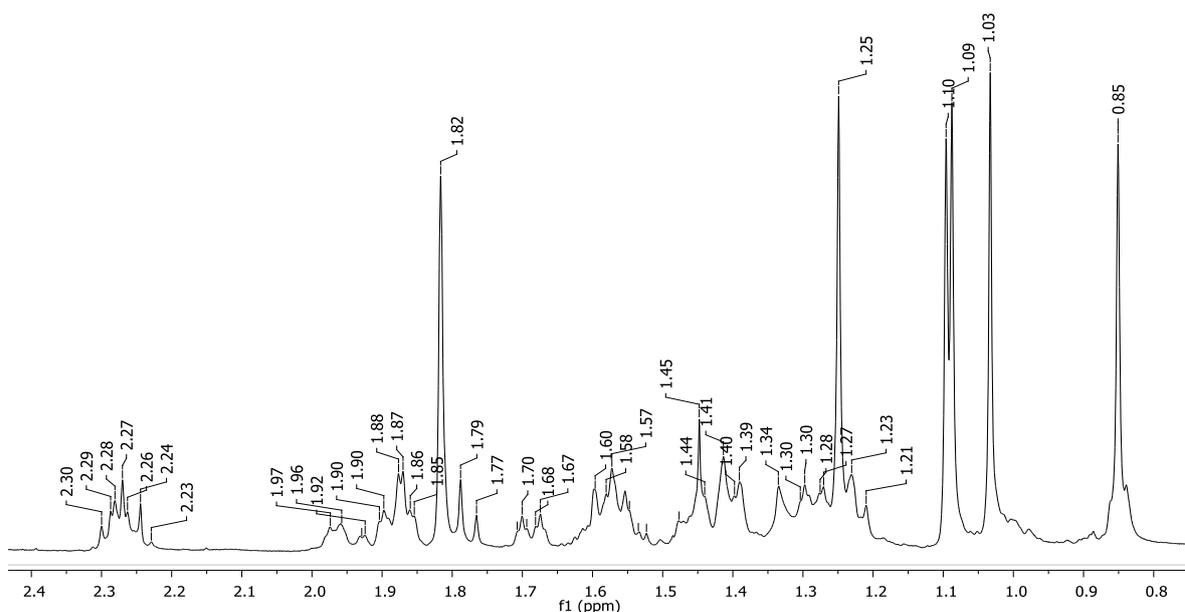


Figura 31: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de MTC9_2 [500 MHz, Piridina- d_5 , δ (ppm)].

No espectro de RMN ^{13}C são demonstrados sinais importantes que permitiram confirmar a estrutura triterpênica do ácido betulínico, através da comparação com dados da literatura (Tabela 6) (DALMARCO, 2012). Dentre os sinais observados, destacam-se aqueles em δ 110,4 (C-29) e δ 151,8 (C-20) característicos de carbonos olefínicos de triterpenos com esqueleto lupano, em δ 179,3 (C-28) que corresponde ao carbono carbonílico típico de grupo ácido, bem como em δ 78,5 indicando a presença de carbono oximetínico (C-3). Observam-se ainda, sinais para os carbonos metílicos em δ 14,7 (C-27) e δ 28,7 (C-23) (Figura 32 e 33).

O ácido betulínico é um triterpeno comumente encontrado nas espécies vegetais. Na *Mimosa tenuiflora* já foram isolados saponinas triterpênicas e um triterpeno da classe dos lupanos, o lupeol, a partir da casca do caule desta planta (JIANG et al, 1991; ANTON et al, 1993). Muitos trabalhos têm atribuído ao ácido betulínico inúmeras atividades biológicas, tais como inibição da carcinogênese, efeito antiviral com inibição da replicação do vírus HIV-1, potente agente citotóxico (melanoma), antiangiogênico e antihelmíntico (ENWEREM et al, 2001; MUKHERJEE et al, 2004; AIKEN; CHEN, 2005; VANDRESEN, 2005).

Tabela 6: Comparação de dados de RMN de ^{13}C de MTC9₂ [125 MHz (^{13}C), Piridina-d₅, δ (ppm)] com dados da literatura (DALMARCO, 2012) para ácido betulínico.

Nº (C)	MTC9₂	Ácido betulínico
1	35,3	35,5
2	29,1	28,3
3	78,5	78,1
4	39,7	39,3
5	56,3	55,9
6	19,2	18,8
7	33,4	34,8
8	41,5	41,4
9	51,4	50,9
10	38,0	37,5
11	21,6	21,2
12	26,5	26,1
13	38,1	38,6
14	43,3	42,8
15	30,4	30,3
16	32,6	32,9
17	57,1	56,6
18	50,2	49,7
19	48,2	47,8
20	151,8	151,3
21	31,6	31,2
22	37,6	37,6
23	28,7	28,7
24	16,8	16,4
25	16,9	16,4
26	15,3	16,3
27	14,7	14,9
28	179,3	178,9
29	110,4	110,0
30	19,9	19,5

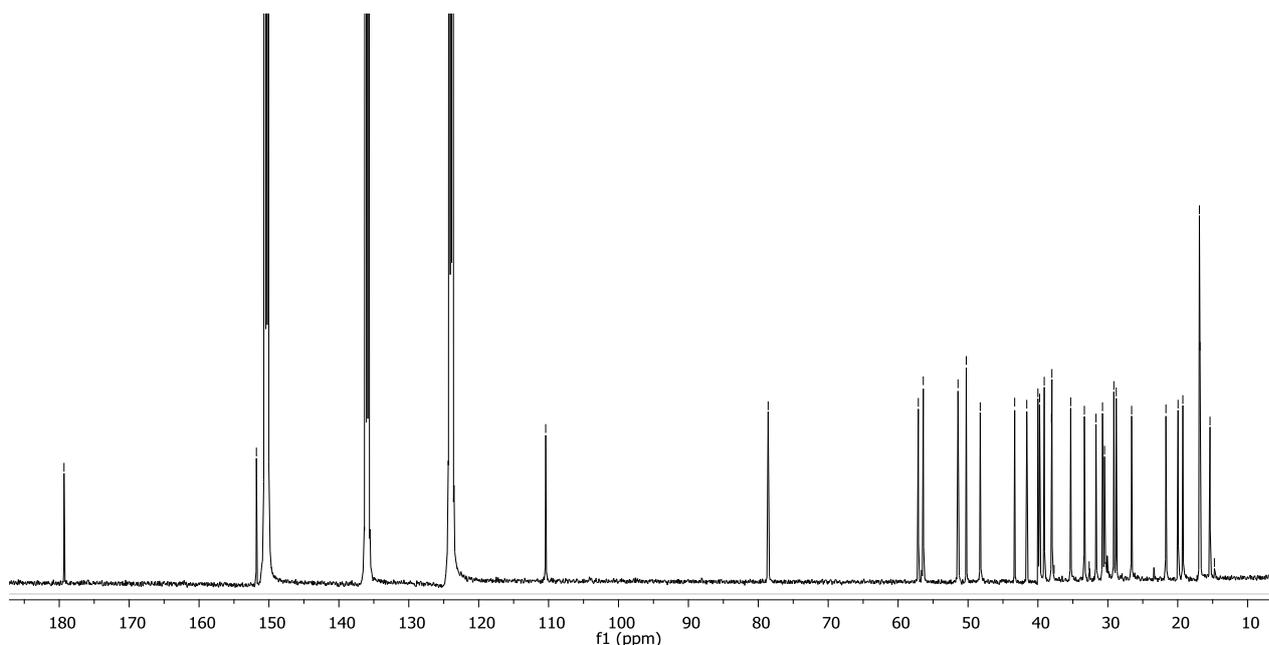


Figura 32: Espectro de RMN de ^{13}C de MTC $_9$ [125 MHz, Piridina-d $_5$, δ (ppm)].

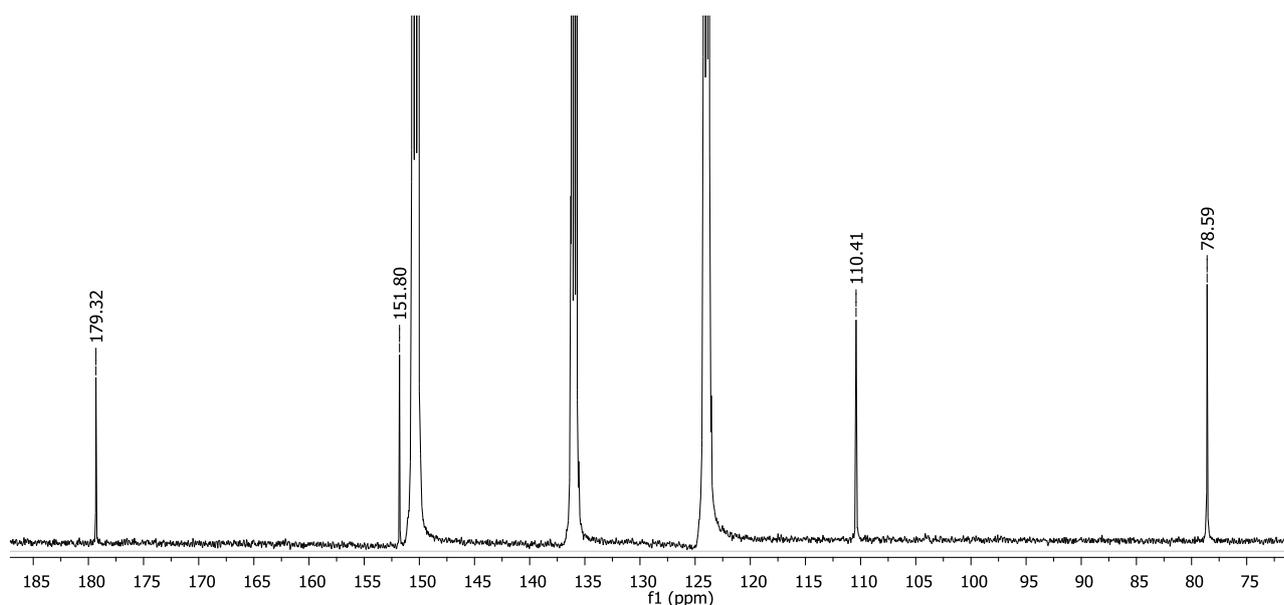


Figura 33: Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de MTC $_9$ [125 MHz, Piridina-d $_5$, δ (ppm)]

4.2. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS POR CLAE-DAD

A composição fenólica dos extratos clorofórmico e acetato de etila da espécie *M. tenuiflora* foi analisada por CLAE-DAD, por ser uma técnica muito utilizada na quantificação e identificação de compostos fenólicos, devido a sua eficiência ao realizar separações e análises quantitativas de substâncias em poucos minutos, com alta resolução e sensibilidade (ASSIS, 2014).

Inicialmente foi realizada uma análise preliminar dos cromatogramas dos extratos testados e dos padrões, comparando-se os tempos de retenção e espectros no UV das substâncias encontradas com relação aos padrões comerciais puros. A confirmação se deu através da co-injeção dos extratos adicionados dos padrões puros, em que se analisaram novamente seus tempos de retenção e perfis dos espectros no UV (Tabela 7; Figura 34 e 37).

A partir disso, foi possível identificar os compostos fenólicos catequina, epicatequina e procianidina B2 além do ácido gálico no extrato acetato de etila e procianidina B2, no extrato clorofórmico da *Mimosa tenuiflora* (Figuras 35, 36 e 37).

Tabela 7: Tempos de retenção dos padrões relativos às substâncias identificadas em *Mimosa tenuiflora*.

Padrões	Tempos de retenção (Tr)
Ácido gálico	4,97
(+)-Catequina	15,37
Procianidina B2	17,04
(-)-Epicatequina	19,19

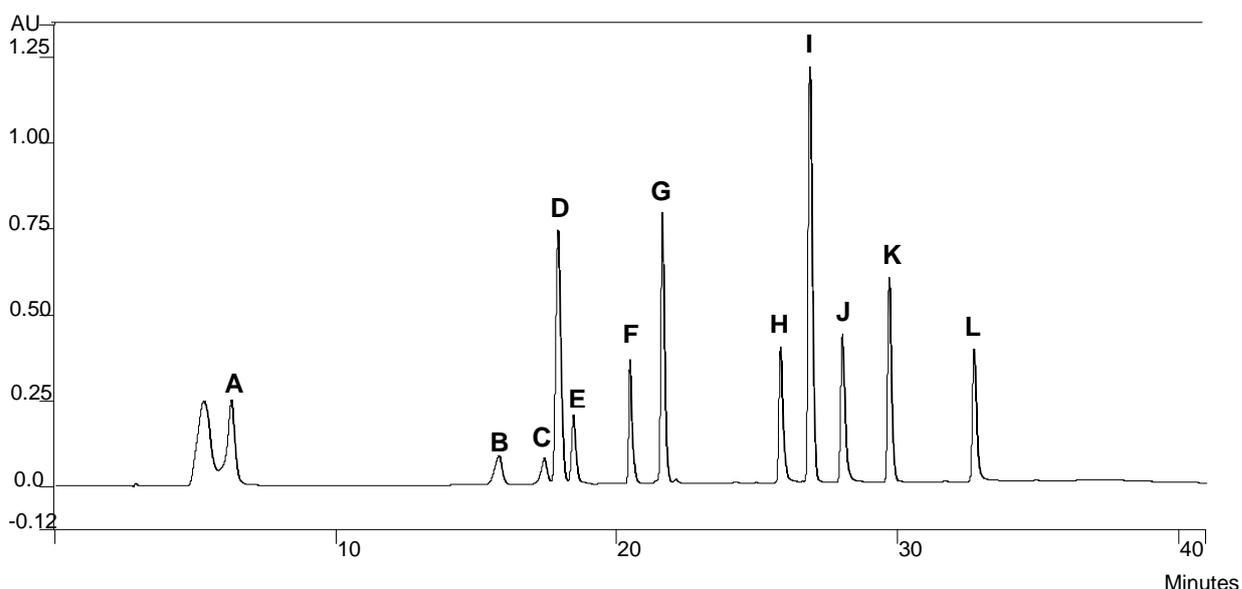


Figura 34: Cromatograma dos padrões analisados em CLAE-DAD a 280 nm, C-18 (250mm x 4,6mm i.d.; 5µm), volume injeção: 20µL, fluxo: 1mL/min. (A) Ácido gálico, (B) Catequina, (C) Procianidina B2, (D) Ácido caféico, (E) Epicatequina, (F) Rutina, (G) Ácido *trans*-ferúlico, (H) Quercetina, (I) Ácido *trans*-cinâmico, (J) Canferol, (K) Formononetina, (L) Canferide.

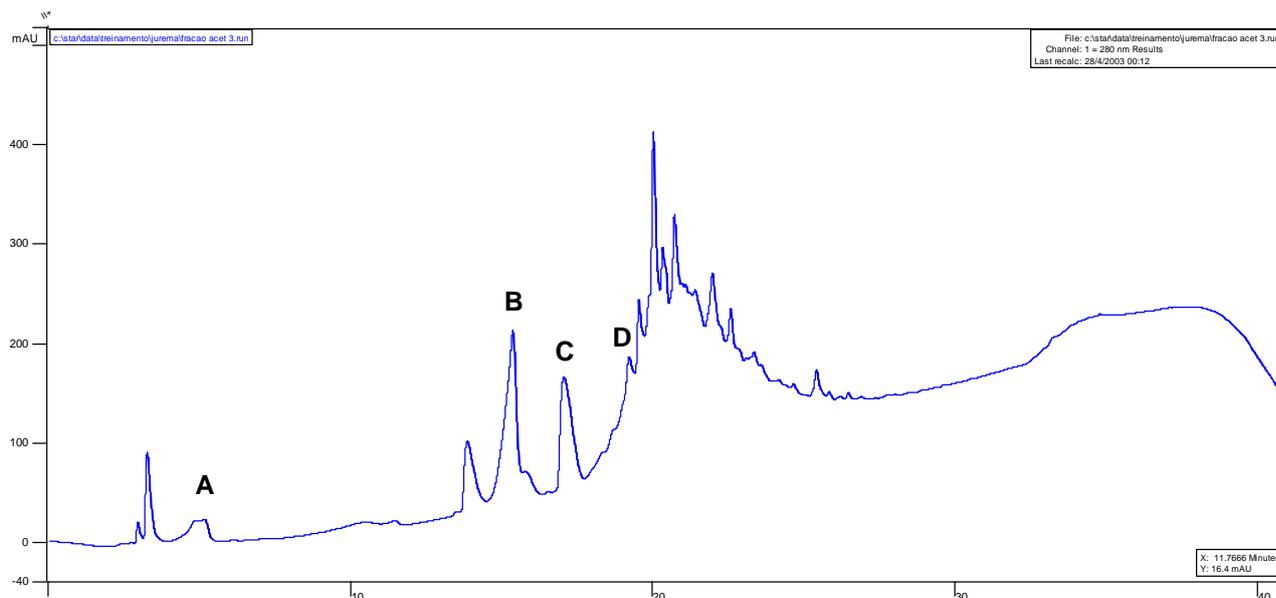


Figura 35: Cromatograma do extrato acetato de etila da *Mimosa tenuiflora* analisado em CLAE-DAD a 280 nm, C-18 (250mm x 4,6mm i.d.; 5 μ m), volume injeção: 20 μ L, fluxo: 1mL/min. (A) Ácido gálico, (B) Catequina, (C) Procianidina B2, (D) Epicatequina.

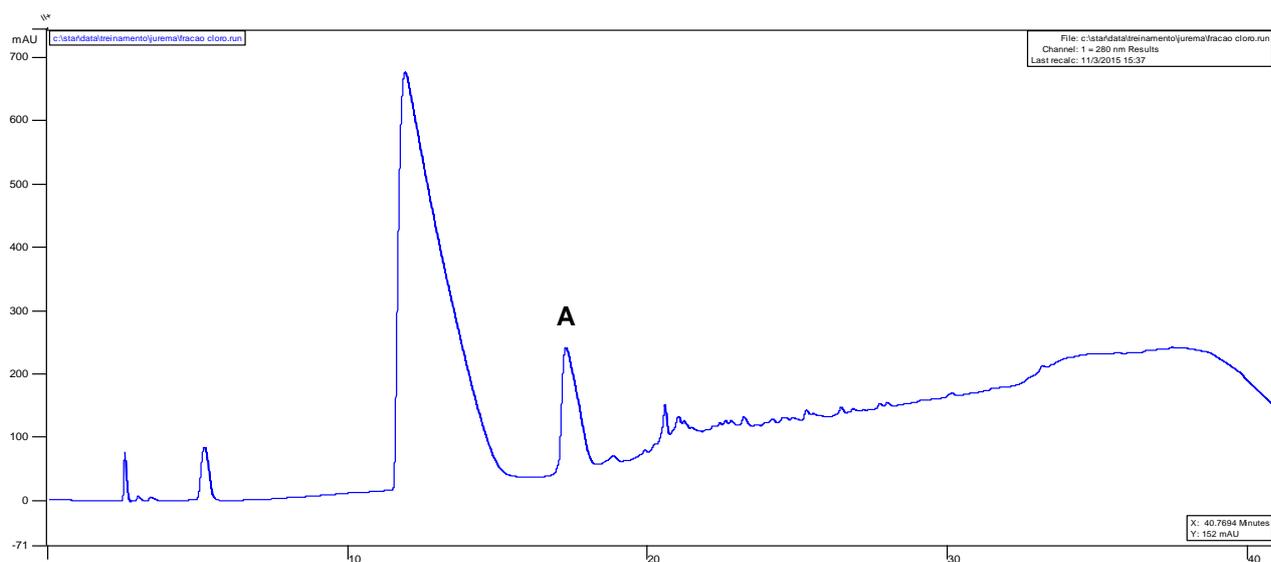
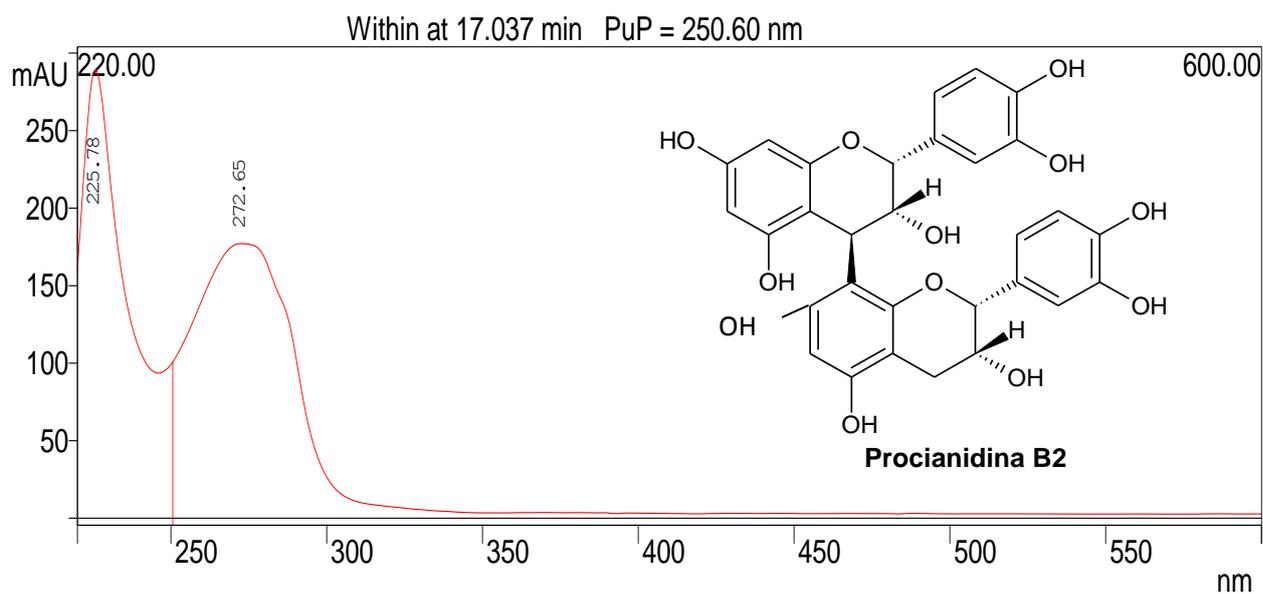
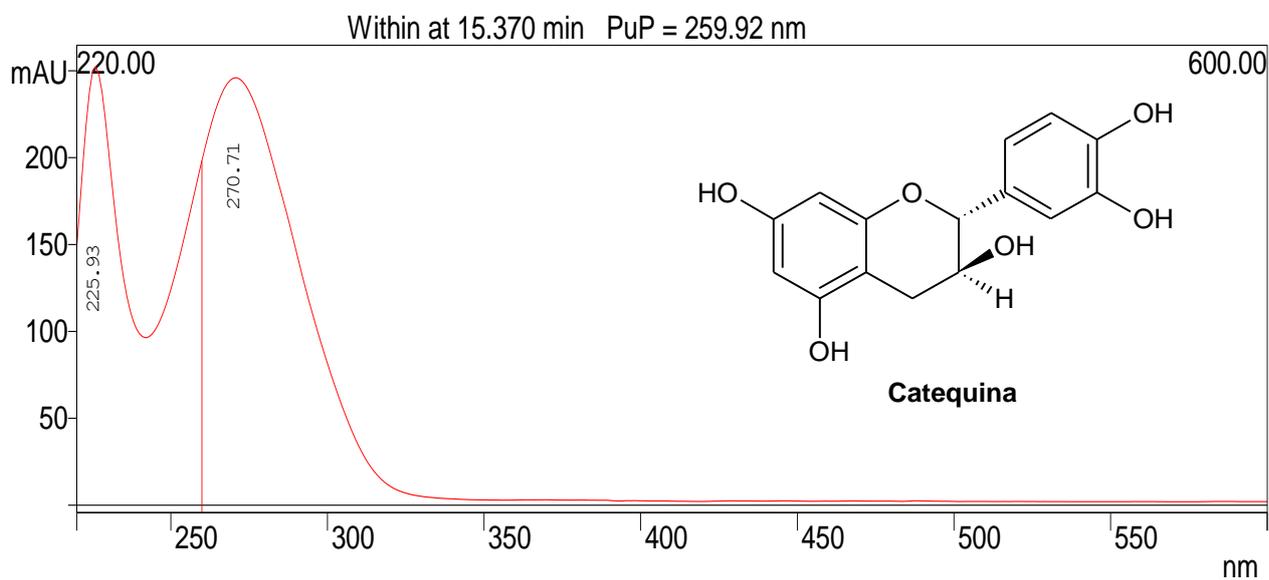
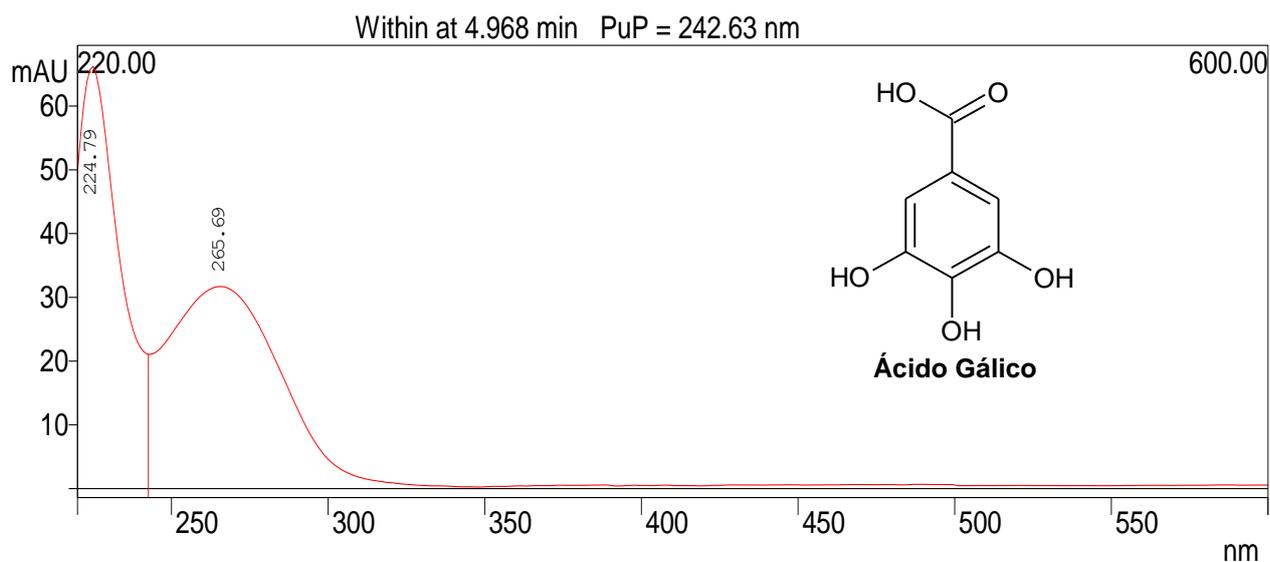


Figura 36: Cromatograma do extrato clorofórmico da *Mimosa tenuiflora* analisado em CLAE-DAD a 280 nm, C-18 (250mm x 4,6mm i.d.; 5 μ m), volume injeção: 20 μ L, fluxo: 1mL/min. (A) Procianidina B2.



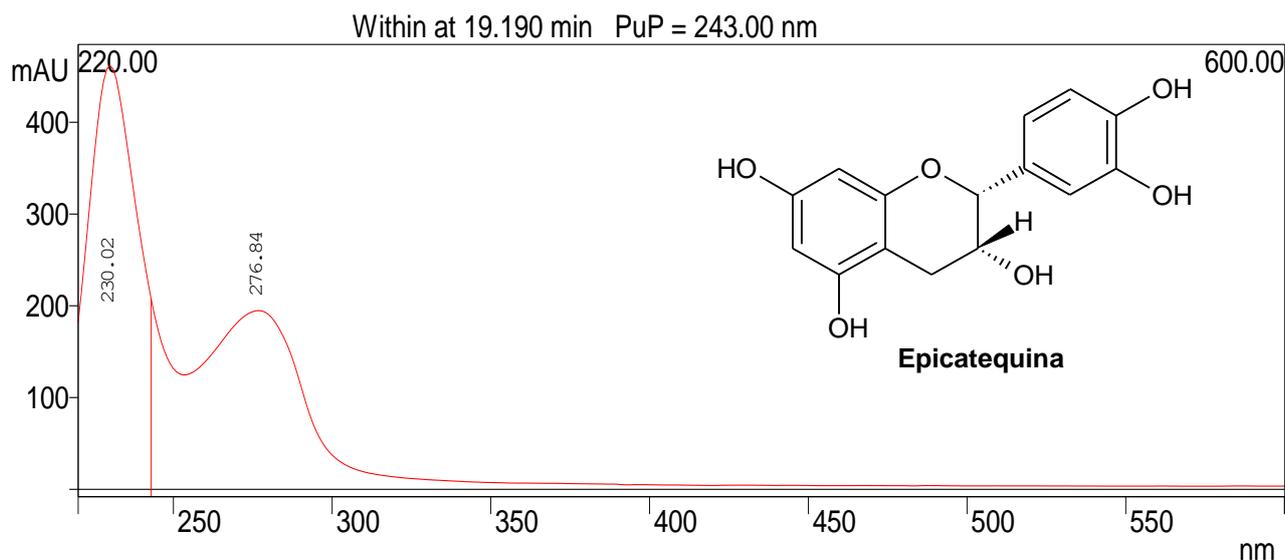


Figura 37: Espectros no UV e estruturas químicas das substâncias identificadas na *Mimosa tenuiflora*.

Analisando os perfis dos espectros no UV das substâncias identificadas nos extratos da *M. tenuiflora* observa-se que as mesmas apresentaram duas bandas de absorção máxima como pode ser visto na Tabela 8.

Segundo Harbone (1994) os fenólicos possuem núcleos aromáticos muitas vezes conjugados apresentando, espectros no UV característicos, com uma ou mais bandas de absorção entre 230 a 340 nm. Estes, por sua vez, podem sofrer ionização provocada por alguma substância básica e, com isso, sofrer desvio batocrômico, ou seja, desvio para maiores comprimentos de onda, entre 15 e 50 nm, acompanhado de aumento de absorbância (HARBONE, 1994; ASSIS, 2014). Desta forma, o comprimento de onda selecionado para aquisição dessas substâncias foi de 280 nm.

Tabela 8: Máximos de absorção nos espectros no UV das substâncias fenólicas identificadas na *Mimosa tenuiflora*.

Sustâncias fenólicas	Máximo I	Máximo II
Ácido gálico	224,79	265,69
Catequina	225,93	270,71
Procianidina B2	225,78	272,65
Epicatequina	230,02	276,84

Em estudos anteriores com a espécie *Mimosa tenuiflora* realizados pelo mesmo grupo de pesquisa, foi feita triagem fitoquímica através de testes colorimétricos e ensaios de precipitação, em que também foi indicada a presença de substâncias fenólicas. Realizou-se também quantificação de fenólicos totais através do reagente de Folin-Ciocalteu, em que esta espécie apresentou um alto teor de compostos fenólicos de 39,8g/100g de extrato.

Além disso, avaliou-se o potencial antioxidante da casca da raiz da jurema preta, em que a mesma demonstrou atividade comparável ao padrão. Desta forma, a presença de fenólicos demonstrada nos extratos da *M. tenuiflora* através da análise por CLAE-DAD mostra correlação positiva com a ação antioxidante apresentada por esta espécie.

A presença de fenólicos em plantas tem sido muito estudada por estes apresentarem atividades farmacológicas e também por inibirem a peroxidação lipídica e a lipoxigenase *in vitro* e a proliferação de fungos (SOARES, 2002; SOUSA *et al*, 2007). No entanto, até o momento não foram encontrados dados na literatura analisando a composição química fenólica da casca da raiz da *Mimosa tenuiflora*, o que mostra a importância deste trabalho em analisar substâncias dessa classe de metabólitos.

Das substâncias identificadas, realizou-se a quantificação apenas da catequina e epicatequina por não ter padrão suficiente para analisar os demais compostos. A quantificação dessas substâncias foi realizada construindo-se curvas de calibração a partir dos padrões puros. Os teores de catequina e epicatequina encontrados foram de 0,39 mg/mL e 0,014 mg/mL, respectivamente, os quais foram obtidos por interpolação da média das áreas dos picos do extrato acetato de etila testada contra curva de calibração da catequina e epicatequina (Figuras 37 e 38).

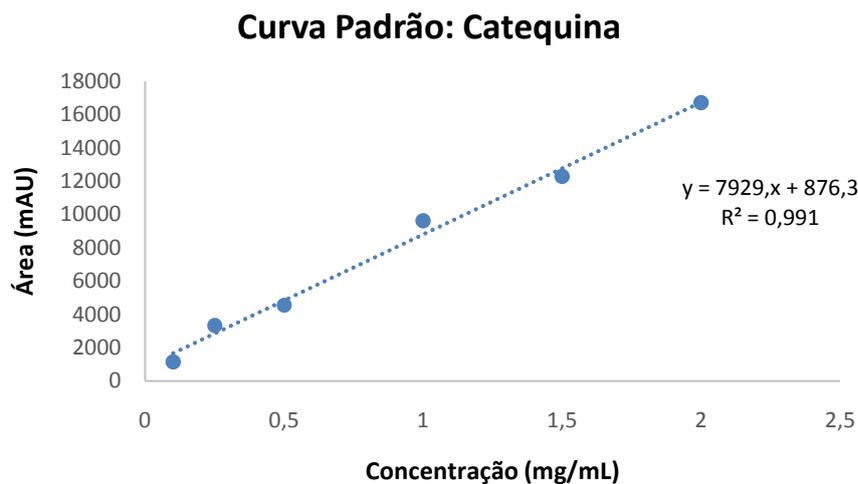


Figura 38: Curva de calibração do padrão catequina.

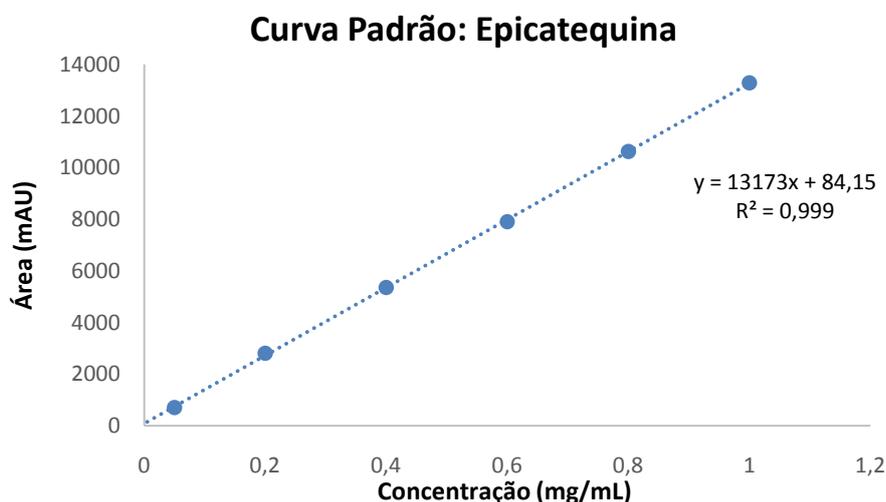


Figura 39: Curva de calibração do padrão epicatequina.

Existem trabalhos na literatura que descrevem análises de substâncias fenólicas por CLAE-DAD de espécies da mesma família (Fabaceae) que a *Mimosa tenuiflora* como, a *Copaifera langsdorffii* (Copaíba) e *Hymenaea stigonocarpa* (Jatobá) em que se quantificaram teores de ácido gálico, catequina e epicatequina, obtendo-se valores de 0,028 mg/mL de catequina para o Jatobá e de 0,088mg/mL e 0,11mg/mL de epicatequina para Jatobá e Copaíba, respectivamente., sendo estes últimos valores maiores com relação à jurema preta (MARÓSTICA JÚNIOR, 2013). Lage (2009) estudou outras espécies forrageiras da família Fabaceae como a *Stylosanthes guianensis* e *Arachis pintoi* em que também foram identificadas substâncias fenólicas como o ácido gálico, catequina e epicatequina, com condições cromatográficas semelhantes às do presente trabalho, como utilização de detector

de arranjo de diodos com aquisição em 280nm, volume de injeção de 20 µL e separação em coluna C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5µm).

Outro estudo realizado por Silva e colaboradores (2014) com *Mimosa caesalpiniiifolia*, espécie do mesmo gênero que a *Mimosa tenuiflora*, também revela a presença de catequina e procianidina B2 através de análise em CLAE-DAD.

O ácido gálico é o constituinte básico de taninos hidrolisáveis bem como a catequina, epicatequina e as procianidinas são precursores de taninos condensados (SIMÕES et al, 2004; BEZERRA, 2012). Com isso, a ocorrência dessas substâncias nos extratos da jurema preta pode indicar a presença de taninos.

Testes *in vitro* realizados em espécies ricas em taninos têm identificado várias atividades biológicas como ação bactericida e fungicida, antiviral, inibição da peroxidação de lipídeos e sequestro de radicais livres e ação antitumoral, sendo muito empregadas na medicina tradicional no tratamento de várias doenças como diarreias, hemorragias, feridas e queimaduras e processos inflamatórios em geral (DUFRESNE; FARNWORTH, 2001; SIMÕES et al, 2004; AMAROWICZ et al, 2008; MUTHUSAMY et al, 2008; SIQUEIRA, 2011; BEZERRA et al, 2012). Desta forma, os dados obtidos no presente estudo podem auxiliar na comprovação científica da utilização da *M. tenuiflora* na medicina popular.

4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE QUANTIFICAÇÃO DE CATEQUINA E EPICATEQUINA POR CLAE-DAD

4.3.1. SELETIVIDADE

O método utilizado para identificação e quantificação da catequina e epicatequina por CLAE-DAD mostrou-se capaz de separar as duas substâncias fenólicas. A seletividade do método foi observada pela comparação do tempo de retenção e a absorção no espectro no UV das substâncias com relação aos padrões puros (Figura 40 e 37).

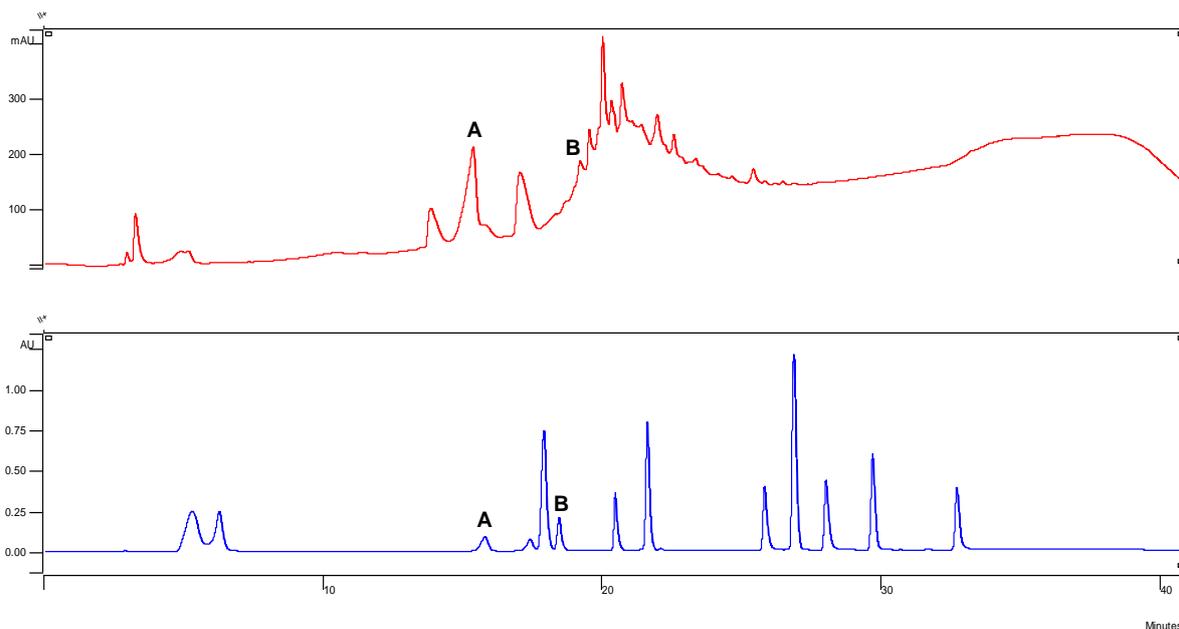


Figura 40: Comparação entre os cromatogramas da amostra e dos padrões catequina e epicatequina. (A) Catequina, (B) Epicatequina.

4.3.2. LINEARIEDADE

Os resultados obtidos a partir das curvas de calibração dos padrões catequina e epicatequina demonstram coeficientes de correlação linear adequados de $R^2=0,991$ para a catequina e $R^2=0,999$ para a epicatequina (Figuras 20 e 21). Estes valores estão dentro dos limites especificados pela ANVISA que determina $R^2 \geq 0,99$ para a validação de métodos cromatográficos (BRASIL, 2003).

4.3.3. PRECISÃO

A precisão do método foi determinada pelo desvio padrão relativo (DPR) das médias das diferentes concentrações dos padrões catequina e epicatequina, as quais foram injetadas em triplicata. Os resultados obtidos mostram-se inferiores a 5% conforme preconizado pela ANVISA, o que demonstra a precisão do método para as duas substâncias quantificadas (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9: Desvio padrão relativo para a catequina.

Média das áreas (mAU)	Desvio padrão	Desvio padrão relativo (%)
17687,33	103,72	0,59
22190	410,67	1,85
10615	186,97	1,76
4488	89,74	1,99
3337,66	63,37	1,89
1147,0	5,29	0,46

Tabela 10: Desvio padrão relativo para a epicatequina.

Média das áreas (mAU)	Desvio padrão	Desvio padrão relativo (%)
74073654	510793,56	0,69
59239043	298411,25	0,50
44074349,33	749560,19	1,70
29850321	380545,82	1,27
15660899,67	145950,81	0,93
3900764,33	1166,93	0,03

4.3.4. EXATIDÃO

A exatidão do método foi avaliada através de percentuais de recuperação de catequina e epicatequina em três níveis de concentrações (1; 0,5 e 0,2mg/mL) por adição do padrão à amostra. Observa-se que os percentuais de recuperação obtidos encontram-se dentro da faixa estabelecida pela ANVISA que determina entre 80 a 120%, o que demonstra a exatidão do método utilizado (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11: Percentuais de recuperação para a catequina.

Concentração (mg/mL)	Taxas de recuperação
1	81,7
0,5	108,3
0,2	116,9

Tabela 12: Percentuais de recuperação para a epicatequina.

Concentração (mg/mL)	Taxas de recuperação
1	80,7
0,5	83,5
0,2	87,9

4.3.5. LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

Os limites de detecção da catequina e epicatequina foram calculados a partir das curvas de calibração, sendo estabelecidos em 0,002mg/mL e 0,004mg/mL, respectivamente. Desta forma, o método mostrou-se bastante sensível para a detecção dessas substâncias.

4.3.6. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os limites de quantificação calculados para a catequina e epicatequina foram de 0,007mg/mL e 0,011mg/mL, respectivamente. A partir dos LQ, foi possível quantificar concentrações baixas de catequina e epicatequina, indicando que o método é suficientemente sensível.

4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

A atividade anticolinesterásica dos extratos da *M. tenuiflora* foi avaliada por método quantitativo fotolorimétrico segundo metodologia de Ellman (1961) com modificações.

A ação inibitória das amostras sobre a enzima foi avaliada através da formação da coloração amarela decorrente da hidrólise da acetilticolina, utilizada como substrato da AChE, em acetato e tiocolina. A tiocolina, por sua vez, reage com o DTNB produzindo um ânion amarelo, em que sua formação pode ser medida a 405 nm em espectrofotômetro.

Entre os extratos testados da jurema preta, o bruto e o de acetato de etila foram os que demonstraram maior capacidade de inibição sobre a enzima AChE com relação aos demais (Tabela 13). Segundo Vinutha e colaboradores (2007), os extratos cuja inibição da atividade acetilcolinesterásica for maior que 50% são

considerados potentes inibidores, moderados quando a inibição for entre 30 e 50% e fracos inibidores quando for abaixo de 30% de inibição.

Tabela 13: Percentuais de inibição enzimática de extratos da *Mimosa tenuiflora*.

Extrato (mg/mL)	Taxas de inibição enzimática (%)
Bruto	89 ± 0,31
Hexânico	15,8 ± 1,1
Clorofórmico	3,1 ± 0,35
Acetato de etila	93,8 ± 0,4

Amorim e colaboradores (2013) também avaliaram a atividade anticolinesterásica da espécie de *M. tenuiflora* e a consideraram a um potente inibidor apresentando um percentual de 65,5% para o extrato bruto. Já Borba (2012) em estudo com plantas da caatinga, avaliou a atividade inibitória sobre a enzima AChE da casca do caule da jurema preta, cujo percentual de inibição foi de 53,37%. Outro estudo realizado por Barroso e colaboradores (2009) verificou qualitativamente em CCD, o potencial de inibição enzimática da AChE de plantas do nordeste brasileiro, em que o extrato das folhas da espécie *M. tenuiflora* apresentou atividade anticolinesterásica próxima ao padrão utilizado.

Barbosa Filho e colaboradores (2006) relataram cerca de 260 substâncias de origem natural encontradas na literatura, com atividade anticolinesterásica, em que mais de 50% pertencem à classe de alcalóides, seguido de fenólicos. Desta forma, o potencial significativo de inibição da atividade acetilcolinesterásica apresentado pela *Mimosa tenuiflora* pode estar associado a essas duas classes de metabólitos, uma vez que alcalóides indólicos como 5-hidroxitriptamina (5-HT) e *N, N* – dimetilriptamina (DMT) já foram isolados da casca da raiz desta espécie (MECKES-LOZOYA et al, 1990; GAUJAC et al, 2013), e substâncias fenólicas também foram identificadas na casca da raiz da jurema preta neste trabalho.

4.5. QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS

O conteúdo de flavonoides contido no extrato bruto da *M. tenuiflora* foi determinado por método espectrofotométrico utilizando-se como reagente cloreto de alumínio (AlCl₃) e curva padrão com quercetina (CHOMNAWANG et al, 2009). O

valor encontrado foi de 1,386g/100g extrato, obtido por interpolação da absorbância da amostra testada contra curva de calibração construída com padrões de quercetina (1 a 15 µg/mL), em que os resultados foram expressos em gramas de quercetina equivalentes (QE)/100g do extrato (Figura 40).

Siqueira (2011) investigou o teor de flavonoides em plantas medicinais da caatinga e obteve um valor de 0,2g/100g extrato para a casca do caule da *M. tenuiflora*, teor inferior ao da casca da raiz encontrado no presente trabalho. Diversos flavonoides já foram isolados das partes aéreas e folhas da jurema preta, como 4',5-dihidroxi-3,3',7-trimetoxiflavona, 4',5-dihidroxi-7-metoxiflavanona, Tenuiflorin A, Tenuiflorin B, Tenuiflorin C, 6-metoxikaempferol, entre outros (SOUZA et al, 2008; NUNES et al, 2009; BAUTISTA et al, 2011) .

Dentre as atividades biológicas apresentadas pelos flavonoides a que se destaca é a antioxidante, uma vez que são considerados potentes antioxidantes naturais por apresentarem elementos estruturais que favorecem o sequestro de radicais livres, como a presença de hidroxilas, de grupo *o*-difenólico e duplas ligações conjugadas (COENTRÃO, 2005; SIQUEIRA, 2011). Desta forma, a presença de flavonoides no extrato bruto da *Mimosa tenuiflora* indica que estes metabólitos também podem contribuir para a ação antioxidante avaliada anteriormente.

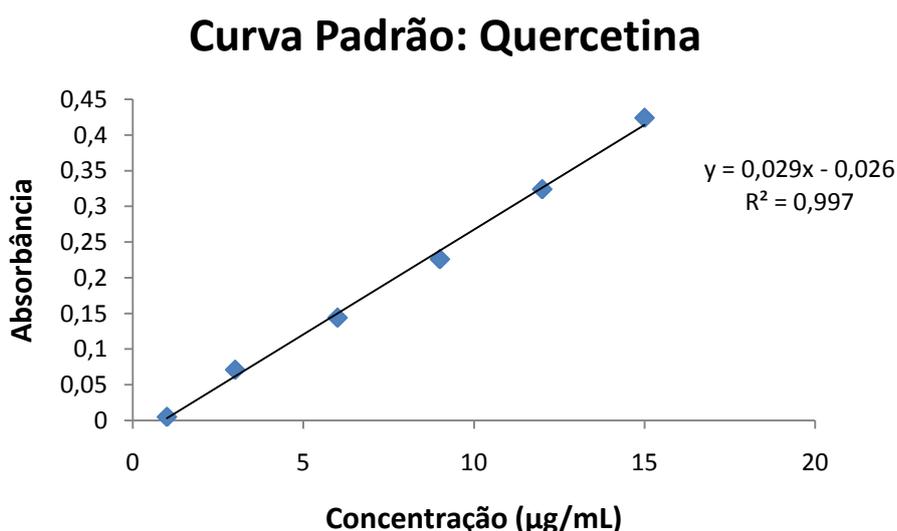


Figura 41: Curva de calibração do padrão quercetina.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho contribuiu com informações acerca da composição química e propriedade biológica da casca da raiz da *Mimosa tenuiflora*, podendo auxiliar na comprovação científica de sua utilização na medicina popular.

O estudo fitoquímico da casca da raiz da jurema preta resultou no isolamento e identificação de substâncias como o estigmasterol e β -sitosterol em mistura, e do ácido betulínico no extrato clorofórmico.

A partir da técnica de CLAE-DAD, foi possível identificar substâncias fenólicas como ácido gálico, catequina, epicatequina e procianidina B2 nos extratos clorofórmico e acetato de etila, bem como quantificar catequina e epicatequina no extrato acetato de etila da casca da raiz desta espécie. Através do processo de validação, o método analítico utilizado mostrou-se confiável e adequado para a quantificação dessas substâncias, de acordo com critérios preconizados pela ANVISA. Desta forma, os dados obtidos pela análise em CLAE, juntamente com o alto teor de fenólicos encontrado no extrato da *Mimosa tenuiflora* em trabalho anterior, sugere que esta classe de metabólitos secundários seja a principal responsável pelo potencial antioxidante significativo apresentada por esta espécie.

Além disso, no presente trabalho também foi quantificado o teor de flavonoides totais da casca da raiz da jurema preta, sugerindo que estes metabólitos também podem contribuir para a sua atividade antioxidante apresentada anteriormente.

Com relação à atividade anticolinesterásica, os resultados demonstraram a partir do extrato bruto e acetato etila que foram os mais ativos, que a espécie *Mimosa tenuiflora* é um potente inibidor da enzima AChE, o que a torna como forte candidata natural para auxiliar no tratamento do mal de Alzheimer.

Assim, este trabalho indica que a espécie *Mimosa tenuiflora* é uma fonte promissora de substâncias bioativas de interesse químico-medicinal, valorizando não somente o conhecimento tradicional a respeito da utilização medicinal desta planta, como também pode contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos, a exemplo de diversos medicamentos que foram desenvolvidos a partir da etnofarmacologia, além de valorizar a biodiversidade da caatinga.

Por fim, é importante mencionar que este trabalho fornece uma contribuição inédita acerca da composição química fenólica da casca da raiz da *Mimosa tenuiflora*, uma vez que até o momento não foram encontrados registros na literatura sobre constituintes fenólicos desta parte da planta.

REFERÊNCIAS

- AIKEN, C.; CHEN, C. H. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. **TRENDS in Molecular Medicine**, v. 11. p. 31-36, 2005.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.
- ALVES, Hélio de Matos. Plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. v. 3, p. 01-06, 2001.
- ALVES, Clayton Queiroz. **Estudo químico e avaliação biológica de duas espécies de Leguminosae: *Dioclea virgata* e *Cenostigma macrophyllum***. 2012. 227 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA, 2012.
- AMAROWICZ, R.; DYKES, G. A.; PEGG, R. B. Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. **Fitoterapia**, v. 79, p. 217 – 219, 2008.
- AMORIM, E. L. C.; CASTRO, V. T. N. A.; HOLANDA, E. A.; CORRÊA, A. J. C.; ARAÚJO, T. A. S.; PEIXOTO-SOBRINHO, T. J. S. Avaliação da atividade anticolinesterásica de plantas medicinais do agreste de Pernambuco. In: II Congresso Bionacional Brasil – Paraguai de Farmácia e Análises Clínicas. **Anais eletrônicos**. Ponta Porã, 2013. Disponível em: <<http://sistematus.com.br/portal/Modulos/processo/login.html>>. Acesso em: 08 dez. 2014.
- ANGELO, P. M., JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 1-9, 2007.
- ANTON, R.; JIANG, Y.; WENIGER, B.; BECKER, J. P.; RIVIER, L. Pharmacognosy of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, p. 153-157, 1993.
- ASSOCIAÇÃO PLANTAS DO NORDESTE. Centro Nordestino de Informações sobre Plantas - APNE/CNIP. ***Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.** 2010. Disponível em: http://www.cnip.org.br/banco_img/Jurema%20Preta/mimosatenuiflorawilldpoir3.html. Acesso em: 23 jan. 2014.
- ARAÚJO, L. V. C.; LEITES, J. A. N.; PAES, J. B. Estimativa da produção de biomassa de um povoamento de jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. com cinco anos de idade. **Revista Biomassa e Energia**, v. 1, p. 347-352, 2004.
- ASSIS, Maria Lucy Vieira de. **Determinação do potencial antioxidante e quantificação de compostos fenólicos por CLAE em acessos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum***. 2014. 139 f. Dissertação (Mestrado em Produção

Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ, 2014.

BARBOSA FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; SILVA ALMEIDA, J. R. G.; QUINTAS JUNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.16, n.2, p. 258-285, 2006.

BARNEBY, R. C. **Sensitivae censitae**: a description of the genus *Mimosa* Linnaeus (Mimosaceae) in the world. New York: The New York Botanical Garden, 1991.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v. 25, p. 856-865, 2002.

BARROSO, N. D.; MACHADO, L. K. A.; ACCIOLY, M. P.; DIAS, P. M. D.; BARROS, C. C.; MORAIS, S. M. Atividade anticolinesterásica de plantas do nordeste brasileiro. In: 49º Congresso Brasileiro de Química. **Anais eletrônicos**. Porto Alegre - RS, 2009. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2009/trabalhos/7/7-393-5862.htm>>. Acesso em: 11 nov. 2014.

BATISTA, L. M. et al. Isolation and identification of putative hallucinogenic constituents from the roots of *Mimosa ophthalmocentra*. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, n. 1, p. 50-53, 1999.

BAUTISTA, E.; CALZADA, F.; ORTEGA, A.; MULIA, L. Y. Antiprotozoal Activity of Flavonoids Isolated from *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae). **Journal of Mexican Chemical Society**, México, v. 55, n. 4, p. 251-253, 2011.

BERTÉ, Talita Elisa. **Estudo da atividade anticolinesterásica dos compostos taraxerol e ácido ursólico: implicações sobre o processo de memória**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Itajaí, Itajaí - SC, 2009.

BEZERRA, Denise Aline Casimiro. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB, 2008.

BEZERRA, Beatriz Pinheiro. **Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de teor de ácido gálico e catequina no fitoterápico sanativo por cromatografia líquida de alta eficiência**. 2012. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN, 2012.

BONFILI, L.; CECARINI, V.; AMICI, M.; CUCCIOLONI, M.; ANGELETTI, M.; KELLER, J. N.; ELEUTERI, A. M. Natural polyphenols as proteasome modulators and their role as anti-cancer compounds. **FEBS Journal**, v. 275, p. 5512-5526, 2008.

BORBA, Valéria Ferreira da Costa. **Avaliação *in vitro* da atividade anticolinesterásica de plantas medicinais nativas da caatinga**. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 2012.

BRANDÃO, Hugo Neves. **Testes de atividades biológicas e aplicação de cromatografia a líquidos (CLAE) no isolamento, síntese e identificação de produtos naturais**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-33, 1998.

BUCHANAN, B. B., GRUISSEM, W., JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, E. John Wiley & Sons, Rockville: American Society of Plant, p.1251-1258, 2002.

BURGESS, C.; O'DONOHUE, A.; GILL, M. Agony and ecstasy: a review of MDMA effects and toxicity. **European Psychiatry**, v. 15, p. 287-294, 2000.

CAMARGO, M. T. L. Contribuição ao estudo Etnofarmacobotânico de bebida ritual de religiões afro-brasileiras denominada “jurema”, à base de *Mimosa hostilis* Benth. Leguminosae – Mimosoideae e seus aditivos psicoativos. In: CONFERÊNCIA DO X SIMPÓSIO LATINOAMERICANO E VII SIMPÓSIO ARGENTINO DE FARMACOBOTÂNICA. Comodoro Rivadaria. **Anais eletrônicos**. Comodoro Rivadaria: Herbarium, 2001. Disponível em: <<http://www.aguaforte.com.br>>. Acesso em: 08 jan. 2012.

CAMARGO-RICALDE, S. L. Descripción, distribución, anatomía, composición química y usos de *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae) en México. **Revista Biologica Tropical**, v. 48, p. 939-954, 2000.

CANTRILL, R., KAWAMURA, Y., Phytosterols, Phytostanols and Their Esters, **Chemical and Technical Assessment**, CTA, p. 1-13, 2008.

CARNEIRO, Carla da Silva. **Aplicação da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de baixo campo para análise do pescado processado**. 2013. 89 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ, 2013.

CEFET-QUÍMICA. **Análise Instrumental Cromatografia Líquida de Alta Resolução**. Unidade Rio de Janeiro, 2013.

CHOMNAWANG, M. T., et al. Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the

mangosteen fruit rind at two stages of maturity. **Elsevier Journal**, v. 80, p. 442–447, 2009.

COENTRÃO, Patrícia de Abreu Marques. **Avaliação de três técnicas de isolamento de polifenóis: aplicação em amostras de chocolate meio amargo**. 2005. 109 f. Dissertação (Mestrado em Área de Concentração: Química Analítica) - Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ, 2005.

CONNOLLY, J. D., HILL, R. A., Triterpenoids, **Natural Product Report**, v.25, p.794–830, 2008.

CORREIA, Duarte Paulo. **Espectroscopia de RMN**. 2001. 54 f. Monografia (Graduação em Química) - Universidade da Madeira. Departamento de Química, Funchal, 2002.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009. Disponível em: <<http://www.uff.br/rvq>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

DAHMER, Nair. **Citotaxonomia do gênero *Mimosa* L. e variabilidade molecular em *Mimosa scabrella* Benth**. 2011. 169 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2011.

DALMARCO, Juliana Bastos. **Estudo das propriedades químicas e biológicas de *Rosmarinus officinalis* L.** 2012. 132 f. Tese (Doutorado em Química, área Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2012.

DEWICK, PAUL M. **Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach**. 2 ed. Nottingham: John Wiley & Sons, Ltd, p. 167-289, 2002.

DOYLE, J.J; LUCKOW, M. The rest of the iceberg- Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**, v. 131, p. 900-910, 2003.

DUFRESNE, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on health promotion properties of tea. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 404-421, 2001.

ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V. J., FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 88, 1961.

ENWEREM, N. M.; OKOGUN, J. I.; WAMBEBE, C. O.; OKORIE, D. A.; AKAH, P. A. Anthelmintic activity of the stem bark extracts of *Berlina grandiflora* and one of its active principles, Betulinic acid. **Phytomedicine**, v.8, p. 112 -114, 2001.

ESCHER, Fernanda Fontanari Nunes. **Determinação da microestrutura e relação com as propriedades dos terpolímeros de etileno-propileno- α -olefinas**. 2004. 156 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS, 2004.

ESTEVAM, Charles dos Santos. **Estudo fitoquímico biomonitorado da entrecasca de *Maytenus rígida* Mart. (Celastraceae)**. 2006. 189 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2006.

EVARISTO, I. M.; LEITÃO, M. C. Identificação de quantificação por DAD-HPLC, da fração fenólica de *Quercus súber* L. **Silva Lusitana**, Lisboa, v. 9, n. 2, p. 135-141, 2001.

FABROWISKI, F. J. et al. Caracterização químico-qualitativa das variedades populares da bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 44, p. 13-28, 2002.

FERNANDES, P., CABRAL, J. M. S., Phytosterols: Applications and recovery methods. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2335–2350, 2007.

FERNANDEZ-PANCHON, M. S. et al. Antioxidante activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, n. 7, p. 649-671, 2011.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. de O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **MultiCiência**, 2006.

GANDHIRAJA, N. et al. Phytochemical screening and antimicrobial activity of the plant extracts of *Mimosa pudica* L. against selected microbes. **Ethnobotanical Leaflets**, v. 13, p. 618-624, 2009.

GAUJAC, A.; MARTINEZ, S. T.; GOMES, A. A.; ANDRADE, S. J.; PINTO, A. C.; DAVID, J. M.; NAVICKIENE, S.; ANDRADE, J.B. Application of analytical methods for the structural characterization and purity assessment of N,N-dimethyltryptamine, a potent psychedelic agent isolated from *Mimosa tenuiflora* inner barks. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 78-83, 2013.

GOMES, S. M. da C. **Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Eletroquímica**. 2010. Tese (Mestrado em Química de Controle de Qualidade e Ambiente) – Universidade de Coimbra Coimbra, 2010.

HARRIS, Daniel C. **Análise química quantitativa**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**, DOQ-CGCRE-008, 2003. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf. Acesso em: 21 abr. 2015.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology**, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995. Disponível em: <<http://>

www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM128048.pdf.
Acesso em: 21 abr. 2015.

JIANG, Y.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C.; TEULON, J. M.; GUÉCHOT, C.; HAAGBERRURIER, M.; ANTON, R. Triterpenoid glycosides from the bark of *Mimosa tenuiflora*. **Phytochemistry**. v. 30, p. 2357-2360, 1991.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists – Part I – HPLC theory and practice**. Wiley and Sons, Inc. New Jersey, 2007.

KUÇUK, M. *et al.* Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. **Food Chemistry**. v. 100, p. 526–534, 2007.

LABATE, Beatriz Caiuby; GOULART, Sandra Lúcia (Org). **O uso ritual das plantas de poder**, Campinas- SP: Mercado de Letras, 2005.

LEE, H. S. HPLC analysis of phenolic compounds. **Food analysis by HPLC**, 2 ed. New York, Marcel Dekker Inc, 2000.

LEÓN, L.; MALDONADO, E.; CRUZ, A.; ORTEGA, A. Tenuiflorins A-C: new 2-phenoxychromones from the leaves of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. **Planta Medica**, v. 70, p. 536, 2004.

LIMA, J. L. S. **Plantas forrageiras das Caatingas – usos e potencialidades**. EMBRAPA-CPASA/PNE/RB-KEW, Petrolina, 1996.

LIMA, Letícia Bazeia. **Triagem da atividade antioxidante e anticolinesterásica de extratos naturais: seleção e estudo químico biomonitorado de *Streptomyces sp.* e de *Psychotria carthagenensis***. 2011. 149 f. Dissertação (Mestrado em Ciência - Área: Química) - Universidade de São Paulo – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto - SP, 2011.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Plantarum, v. 2. 1998.

MACHADO, Michel Mansur. **Perfil fitoquímico e avaliação dos principais efeitos biológicos e imunológicos *in vitro* da *Euphorbia tirucalli* L.**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAIA, G. N. **Caatinga - árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z Computação Gráfica e Editora, 2004.

MARCEL, V. et al. Two invertebrate acetylcholinesterases show activation followed by inhibition with substrate concentration. **Biochemistry Journal**, v.329, p.329-334, 1998.

MARK, H. **Encyclopedia of Polymer Science and Technology**, v. 1 - Chromatography – HPLC. 3 ed. John Wiley and Sons, Inc. New Jersey, p. 598-613, 2003.

MARÓSTICA JÚNIOR, Mário Roberto. **Potencial bioativo de frutas exóticas brasileiras**. Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2013.

MCMMASTER, M. **HPLC, A Practical User's Guide** – HPLC Primer. 2 ed. John Wiley and Sons, Inc. New Jersey, 2007.

MECKES-LOZOYA, M.; LOZOYA, X.; MARLES, R.; SOUCY-BREAU, C.; AVALOKITESVARASEN, A. J. N,N-Dimethyltryptamine alkaloid in *Mimosa tenuiflora* bark (Tepescohuite). **Archivos de Investigación Médica**, v. 21, p. 175-177, 1990.

MELENDÉZ, P. A., CAPRILES, V. A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. **Phytomedicine**. v.13, p. 272-276, 2006.

MENDONÇA FILHO, R. F. W.; MENEZES, F. S. Estudo da utilização de plantas medicinais pela população da Ilha Grande - RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 55-58, 2003.

MENG, Q.; NIU, Y.; NIU, X. ROUBIN, R. H.; HANRAHAN, J. R. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of the genus *Caragana* used in Traditional Chinese Medicine, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 350-368, 2009.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.

MONTANARI JÚNIOR, I. **Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas**. 2002. Disponível em: <<http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/index.html>>. Acesso em: 15 set. 2014.

MULLER, T.C. et al. Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1587, p.92-98, 2002.

MUKHERJEE, R.; JAGGI, M. RAJENDRAN, P.; SIDDIQUI, M. J. A.; SRIVASTAVA, S. K.; VARDHAN, A.; BURMAN, A. C. Betulinic acid and its derivatives as anti-angiogenic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 2181-2184, 2004.

MUTHUSAMY, V. S.; ANAND, S.; SANGEETHA, K. N.; SUJATHA, S; ARUN, B.; LAKSHMI, B. S. Tannins present in *Cichorium intybus* enhance glucose uptake and

inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through PTP1B inhibition. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, p. 69 – 78, 2008.

NIEWIADOMSKA, G.; BAKSALERSKA-PAZERA, M.; RIEDEL, G. The septohippocampal system, learning and recovery of function. **Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 2009.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. de F.. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.18, p. 718-723. 2008.

NUNES, X. P.; LIRA, D. P.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, D. A.; COSTA, V. C. O.; AGRA, M. F.; BRAZ FILHO, R.; BARBOSA FILHO, J. M. Flavonas e Flavanonas de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. **Anais eletrônicos**. Fortaleza - CE, 2009. Disponível em: <<http://sec.sbq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T1816-2.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2015.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luis de Quiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2010.

OLIVEIRA, Lucileide Batista de. **Avaliação de atividades farmacológicas de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.**. 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, 2011.

PADUCH, R. et al. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivus Immunologiae et therapiae experimentalis (Warsz)**, v.55, n. 5, p. 315-327, 2007.

PAES, J. B.; DINIZ, C. E. F.; MARINHO, I. V.; LIMA, C. R. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro. **Cerne**. v. 12, p. 232-238, 2006.

PANDE, M.; PATHAK, A. Preliminary pharmacognostic evaluations and phytochemical studies on roots of *Mimosa pudica* (Lajvanti). **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 1, n. 1, p. 50-52, 2010. Disponível em: <<http://www.globalresearch.online.net>>. Acesso em: 10 out. 2014.

PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 1, n. 7, p. 7 -12, 2003.

PEREIRA FILHO, J. M.; VIEIRA, E. L.; KAMALAK, A.; SILVA, A. M. A.; CEZAR M. F. E.; BEELEN, P. M. G. Correlação entre o teor de tanino e a degradabilidade ruminal da matéria seca e proteína bruta do feno de jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret) tratada com hidróxido de sódio. **Livestock Research for Rural Development**, v.17, 2005.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**, 2008. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/lazaropp>>. Acesso em: 14 fev. 2012.

QUEIROZ et al. Leguminosae. In: GIULIETTI et al. (Orgs.). **Plantas raras do Brasil**. Belo Horizonte: Conservação Internacional, p. 212 – 237, 2009.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da caatinga**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RUTTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIEGER, Sandy Cristina. **Constituintes químicos e atividades antioxidante, bacteriostática e anti-helmíntica de *Inga marginata* Willd.** 2011. 128 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RIET-CORRÊA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; DANTAS, A. F. M. **Plantas Tóxicas da Paraíba**. Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos, PB: SEBRAE/PB, 2006.

RODRIGUES, Joana Abreu. **Determinação da atividade antioxidante e composição fenólica de vinhos portugueses e correlação com parâmetros de cor.** 2011. 161 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar – Qualidade Alimentar) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2011.

RODRIGUES, Leonardo Milani Avelar. **Cachaças envelhecidas em diferentes tipos de madeiras: quantificação de compostos fenólicos, atividade antibacteriana e antifúngica.** 2013. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2013.

SALA, A.; RECIO, M. C.; SCHINELLA, G. R.; SALVADOR, M.; GINERA, R. M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; RÍOS, J. L. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. **European Journal of Pharmacology**, v. 461, p. 53-61, 2003.

SANTOS, R. I. Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da Universidade, p. 333-365, 2001.

SHARMA, B.; VISWANATH, G.; SALUNKE, R.; ROY, P. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. **Food Chemistry**, v. 110, p. 697-705, 2008.

SILVA, Edja Eliza de Souza. **Estudo fitoquímico e atividade biológica *in vitro* de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae).** 2013. 147 f. Dissertação

(Mestrado em Recursos Naturais) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, 2013.

SILVA, J. K. R.; NASCIMENTO, L. D.; ANDRADE, E. H.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. Composição química e atividade anticolinesterásica de óleos essenciais de *Piper* spp da Floresta nacional de Carajás (PA). In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. **Anais eletrônicos**. Florianópolis, 2011. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/34ra/resumos/T0629-1.pdf>>. Acesso em: 04 out. 2014.

SILVA, K. L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

SILVA, L. L. S. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 208-214, 2010.

SILVA, M. J. D., ENDO, L. H., DIAS, A. L. T., SILVA, G. A., SANTOS, M. H., SILVA, M. A. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, p. 267–274, 2012.

SILVA, M. J. D.; CARVALHO, A. J. S.; ROCHA, C. Q.; VILEGAS, W.; SILVA, M. A.; GOUVÊA, C. M. C. P. Ethanolic extract of *Mimosa caesalpinifolia* leaves: Chemical characterization and cytotoxic effect on human breast cancer MCF-7 cell line. **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 64–69, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 35 – 40, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis, Editora UFSC, 2010.

SIQUEIRA, Clarisse Fernanda de Queiroz. **Teores de taninos e flavonoides em plantas medicinais da caatinga**: avaliando estratégias de bioprospecção. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2011.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, v.15, n.1, p. 71-81, Campinas, 2002.

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, R. H.; JÚNIOR, G. M. V.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. da; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, R. S. O. de; ALBUQUERQUE, U. P. de; MONTEIRO, J. M.; AMORIM, E. L. C. de. Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 937-947, 2008.

SUNG, S.Y.; KANG S.Y.; LEE, K.Y.; PARK, M. J.; KIM, J. H.; PARK, J. H.; KIM, Y. C.; KIM, J.; KIM, Y. C. (+)- α -viniferin, a stilbene trimer from *Caranga chamlague* inhibits acetylcholinesterase. **Biol pharm bull**, v. 25, p. 125-127, 2002.

SUZART, Luciano Ramos. **Considerações sobre os gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia*, estudo químico de duas espécies de Ochnaceae: *Ouratea hexasperma* St. Hil e *Ouratea cuspidata* St. Hil e atividades biológicas**. 2007. 164 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. Acetylcholine. In: Siegel, G. J.; AGRANOF, B. W.; ALBERS, R. W.; MILLINOFF, P. B. **Basic Neuroch: Molec, cell Med Aspects**. Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, 1999.

TELLEZ, P. J.; DUPOY DE GUITARD, J. Pharmaceutical preparation containing *Mimosa tenuiflora* extract with skin-regenerating properties. **Patent Eur Pat Appl.**, v. 349, p. 469, 1990.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835-855, 2002.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para o tratamento da Doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301 – 304; 2003.

VANDRESEN, Fábio. **Constituição química, atividades antibacteriana, antiedematogênica e toxicidade frente à *Artemia salina* da espécie vegetal *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Troncoso (Verbenaceae)**. 2005. 182 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

VEIGA JÚNIOR, F. V.; PINTO, A. C. Plantas Medicinais: Cura Segura?. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 519-528, 2005.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 361-372, 2005.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

VIEGAS JÚNIOR, C. et al. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279-1286, 2006.

VINUTHA, B. et al. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p.359-63, 2007.

WOISKY, R. G.; SLATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: UFRGS, p. 577-614, 2004.