

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS
ESPÉCIES *LONCHOCARPUS GUILLEMINIANUS* (FABACEAE) E
CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM (RUBIACEAE)

FERNANDA MENDES DE AZEVEDO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MAIO - 2017

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS
ESPÉCIES *LONCHOCARPUS GUILLEMINIANUS* (FABACEAE) E
CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM (RUBIACEAE)

FERNANDA MENDES DE AZEVEDO

Tese apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais.

Orientadora: Professora Doutora Leda Mathias

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MAIO - 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

60/2017

Azevedo, Fernanda Mendes de

Estudo fitoquímico e avaliação biológica das espécies *Lonchocarpus guilleminianus* (Fabaceae) e *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae) / Fernanda Mendes de Azevedo. – Campos dos Goytacazes, 2017.

250 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Naturais) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas. Campos dos Goytacazes, 2017.

Orientador: Leda Mathias.

Área de concentração: Bio-orgânica.

Bibliografia: f. 248-250.

1. *Lonchocarpus guilleminianus* 2. *Calycophyllum spruceanum* 3. FITOQUÍMICA 4. ANTIOXIDANTE 5. ANTIMICROBIANO I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas II. Título

CDD 581.19

Seja forte e corajoso! Não fique desanimado, nem tenha medo, porque Eu, o Senhor, seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for!

Josué 1:9.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado à oportunidade na vida.

A Professora e minha orientadora Dr^a Leda Mathias, pelos ensinamentos, compreensão, amizade e orientação neste trabalho, meu sincero respeito reconhecimento e gratidão.

Ao Professor Dr. Carlos Roberto Ribeiro Matos, pelos ensinamentos, indispensável ajuda e amizade.

Ao Professor Olney Vieira da Mota pela colaboração e sua esposa Solange Silva Samarão pela acolhida, amizade e ensinamentos em microbiologia.

Aos amigos de laboratório: Kissila Gomes Barreto, Tayná Simões, Jéssica Xarifa e Laysa Lannes.

Ao Meu esposo José Augusto de Souza Ribeiro, pelo companheirismo, pelo amor, paciência e pelo incentivo necessário para enfrentar este desafio.

Aos meus pais Marina Mendes Figueiredo e Ilson Martins de Azevedo, pelo apoio, incentivo e fé transmitidos em todos os momentos da minha vida, especialmente a minha mãe pelo exemplo de integridade, sabedoria e força.

Aos meus filhos Amanda Mendes Ribeiro, José Ribeiro da Costa Neto e Bárbara Mendes Ribeiro, pelo amor incondicional e por fazer tudo se tornar válido.

Agradeço a todos os professores, amigos e técnicos que direta e/ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Desde já, a banca examinadora, pelas sugestões e correções sugeridas a este trabalho.

À CAPES, UENF e FAPERJ pelos auxílios e bolsas concedidas.

Muito Obrigada!

RESUMO

AZEVEDO, Fernanda Mendes. **Estudo Fitoquímico e Avaliação Biológica das Espécies *Lonchocarpus guilleminianus* (fabaceae) e *Calycophyllum spruceanum* (rubiaceae)**. Tese (Doutorado em Química Orgânica, Química de Produtos Naturais). Centro de Ciência e Tecnologia, Programa de Pós Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

A espécie *Lonchocarpus guilleminianus* é conhecida popularmente como embira e a espécie *Calycophyllum spruceanum* como pau mulato. O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico, avaliação da atividade antioxidante, citotóxica, teor de flavonoides e fenóis totais e atividade antimicrobiana dos extratos da madeira da espécie *L. guilleminianus* e das cascas do tronco da espécie *C. spruceanum*. O isolamento dos metabólitos secundários foi realizado por meio de técnicas cromatográficas e resultou na identificação e isolamento das substâncias: ácido elágico (**LG-04**), ácido gálico (**LG-10**), 2,3- (R)- hexaidroxidifenoil-D-glicose (**LG-12**), β -1-O-galoil-3,6-(R)-hexahidroxidifenoil-D-glicose (**LG-20**), metil- β -D-glicopiranosídeo (**LG-14**), 1,2,3,4-Butanotetrol tetraacetato [**LG-14 Ac (a)**], Metil 2,3,4-tri-O-acetil- β -D-xilopiranosídeo tetraacetato [**LG-14 Ac (b)**], tetraacetil- β -L-ramnose [**LG-14 Ac (c)**], α -L-Manopiranosose,6-desoxi-tetraacetato [**LG-14 Ac (d)**], Lixopiranosose tetraacetato [**LG-14 Ac (e)**], L-Iditol, hexaacetato [**LG-14 Ac (f)**], Metil- β - D-glicopiranosídeo tetraacetato [**LG-14 Ac (g)**], D-Glicose, 2,3,4,5,6-pentaacetato [**LG-14 Ac (h)**], α -D-Glicopiranosose pentaacetato [**LG-14 Ac (i)**], D-Manitol hexaacetato [**LG-14 Ac (j)**], uma mistura de hidrocarbonetos: Hexadecano **LGA1(a)**, Heptadecano **LGA1(b)**, Pentadecano-2,6,10,14-tetrametil **LGA1(c)**, Octadecano **LGA1(d)**, Nonadecano **LGA1(e)**, Eicosano **LGA1(f)**, Heneicosano **LGA1(g)**, Docosano **LGA1(h)**, Tricosano **LGA1(i)**, Tetracosano **LGA1(j)**, Pentacosano **LGA1(k)**, Hexacosano **LGA1(l)**, Heptacosano **LGA1(m)**, Nonacosano **LGA1(n)**, friedelina **LGA2**, estigmasterol e γ -sitosterol **LGA3**, ácido 3-O- β -D-xilofuranosil-(1'→3)- β -D-glicopiranosil (1''→2')- α -ramnopiranosil(1'''→3')-hidroxiolean-12-en-28-oico **LG-5AC**, ácido protocatecuico **PM1** e o protocatecuato de metila **PM4**. A identificação estrutural dos metabólitos foi realizada através de técnicas cromatográficas clássicas e métodos espectrométricos tais como: UV, IV, EM, RMN de ^{13}C e ^1H uni e bidimensionais, além de informações obtidas na literatura. A atividade antioxidante foi avaliada através do método que utiliza o DPPH e o ABTS. O teor de flavonóides foi obtido através do método que utiliza o Cloreto de Alumínio. E a determinação do teor de fenólicos totais com base no método de Folin-Ciocalteu. Ensaio biológicos foram feitos através do ensaio da toxicidade frente às larvas de *Artemia salina* Leach. A atividade antibacteriana foi testada com extratos das duas espécies e substância isolada, verificando-se um bom resultado contra as bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Palavras-chave: *Lonchocarpus guilleminianus*, *Calycophyllum spruceanum*, fitoquímica, antioxidante, citotoxicidade, antimicrobiano.

ABSTRACT

AZEVEDO, Fernanda Mendes. **Phytochemical Study and Biological Evaluation of Species *Lonchocarpus guilleminianus* (fabaceae) and *Calycophyllum spruceanum* (rubiaceae)**. Thesis (Doctorate in Organic Chemistry, Chemistry of Natural Products). Center for Science and Technology, Graduate Program in Natural Sciences, Northern Fluminense State University Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

The species *Lonchocarpus guilleminianus* is popularly known as embira and the species *Calycophyllum spruceanum* as mulatto wood. The objective of this work was to carry out the phytochemical study, evaluation of the antioxidant activity, cytotoxicity, total flavonoid and phenol content and antimicrobial activity of *L. guilleminianus* wood extracts and *C. spruceanum* trunk bark. The isolation of the secondary metabolites was performed by means of chromatographic techniques and resulted in the identification and isolation of the substances: ellagic acid (**LG-04**), gallic acid (**LG-10**), 2,3- (S) -hexahydroxydiphenyl-D-glucose (**LG-12**), β -O-galoyl-3,6- (R) -hexahydroxydiphenyl-D-glucose (**LG-20**), methyl- β -D-glucopyranoside (**LG-14**)1,2,3,4-butanetetrol tetraacetate [**LG-14Ac (a)**], methyl 2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-xylopyranoside tetraacetate [**LG-14Ac (b)**], tetraacetyl- β -L-rhamnose [**LG-14 Ac (c)**], α -L-Mannopyranose-6-deoxy-tetraacetate [**LG-14 Ac (d)**], Lyxopyranose tetraacetate [**LG-14 Ac (e)**], L-Iditol, Hexaacetate [**LG-14 Ac (g)**], D-Glucose, 2,3,4,5,6-pentaacetate [**LG-14 Ac (f)**], Methyl- β -D-glucopyranoside tetraacetate [**LG-14 Ac (g)**], D-Glucose, 2,3,4,5,6-pentaacetate [**LG-14 Ac (h)**], α -D-Glycoproanose pentaacetate [**LG-14 Ac (i)**], D-Mannitol hexaacetate [**LG-14 Ac (j)**], a mixture of hydrocarbons: hexadecane **LGA1(a)**, heptadecane **LGA1(b)**, pentadecane-2,6,10,14-tetramethyl **LGA1(c)**, octadecane **LGA1(d)**, nonadecane **LGA1(e)**, Eicosane **LGA1(f)**, Henoicosane **LGA1(g)**, docosano **LGA1(h)**, Tricosan **LGA1(i)**, Tetracosan **LGA1(j)**, Pentacosane **LGA1(k)**, Hexacosane **LGA1(l)**, Heptacosane **LGA1(m)**, Nonacosano **LGA1(n)**, Friedelin **LGA2**, Stigmasterol and γ -Sitosterol **LGA3**, 3-O- β -D-xylofuranosyl-(1'→3)- β -D-glycopyranosyl-(1''→2')- α -rhamnopyranosyl(1'''→3')-hydroxy-12-en-28-oic acid **LG-5Ac**, protocatecuic acid **PM1** and the protocatecuate of methyl **PM4**. The structural identification of the metabolites was performed using classical chromatographic techniques and spectrometric methods such as: UV, IR, MS, ¹³C and ¹H uni and bidimensional ¹H NMR, besides information obtained in the literature. The antioxidant activity was evaluated by the method using DPPH and ABTS. The flavonoid content was obtained by the method using Aluminum Chloride. And the determination of the total phenolic content based on the Folin-Ciocalteu method. Biological assays were performed by testing the larvae toxicity of *Artemia salina* Leach. The antibacterial activity was tested with extracts of both species and isolated substance, verifying a good result against *S. aureus* and *S. epidermidis* bacteria.

Key words: *Lonchocarpus guilleminianus*, *Calycophyllum spruceanum*, phytochemistry, antioxidant, cytotoxicity, antimicrobial.

SUMÁRIO

Introdução.....	1
Referências Bibliográficas.....	5
1. Revisão da Literatura.....	7
1. 1. A Família Fabaceae.....	7
1. 2. O Gênero <i>Lonchocarpus</i>	8
1. 2. 1. Constituintes Químicos Isolados de Espécies do Gênero <i>Lonchocarpus</i>	11
1. 2. 2. Atividades Biológicas das Substâncias, Frações e Extratos de Espécies do Gênero <i>Lonchocarpus</i>	18
1. 3. A espécie <i>Lonchocarpus guilleminianus</i>	22
1. 4. A Família Rubiaceae.....	23
1. 4. 1. Gênero <i>Calycophyllum</i> e espécie <i>Calycophyllum spruceanum</i> (BENTH) HOOK F. EX SCHUM.....	24
1. 5. Referências Bibliográficas.....	27
2. Objetivos.....	35
2. 1. Objetivos Gerais.....	35
3. Materiais e Métodos.....	36
3. 1. Equipamentos e Materiais de Consumo.....	36
3. 2. Reagentes Utilizados.....	38
4. Estudo Químico de <i>L. guilleminianus</i> e <i>C. spruceanum</i>	39
4.1. Isolamento e Purificação dos constituintes Químicos da Espécie <i>L. guilleminianus</i>	
4. 1. 1. Operações Preliminares.....	39
4. 1. 2. Preparação dos extratos brutos.....	39
4. 1. 3. Testes químicos qualitativos para identificação de metabólitos secundários.....	40
4. 1. 4. Fracionamento dos extratos brutos e purificação das substâncias de <i>L.</i> <i>guilleminianus</i>	41
4. 1. 4. 1. Tratamento cromatográfico do extrato em MeOH/H ₂ O da madeira de <i>L.</i> <i>guilleminianus</i>	41
4. 1. 4. 2. Purificação da Fração LGMH-03.....	43
4. 1. 4. 3. Purificação da Fração LGMH-05.....	44

4. 1. 4. 4. Purificação da Fração LGMH-7.....	45
4. 1. 4. 5. Purificação da Fração LGMH-06.....	47
4. 1. 4. 6. Purificação da Fração em Acetato de Etila.....	49
4. 1. 5. Tratamento Cromatográfico do Extrato Metanólico de <i>L. guilleminianus</i> .	51
4. 1. 5. 1. Purificação da fase Aquosa.....	51
4. 1. 5. 2. Purificação da fração em BuOH.....	52
4. 1. 6. Tratamento cromatográfico do extrato em AcOEt da madeira de <i>L. guilleminianus</i>	53
4. 1. 6. 1. Purificação da Fração em AcOEt (LGMA ₃).....	54
4. 1. 6. 2. Purificação do Precipitado (LGMA ₁).....	54
4. 1. 7. Tratamento cromatográfico do extrato em Hexano da madeira de <i>L. guilleminianus</i>	55
4. 2. Isolamento e Purificação dos constituintes Químicos da Espécie	
<i>C. spruceanum</i>	56
4. 2. 1. Operações Preliminares.....	56
4. 2. 2. Preparação dos extratos brutos.....	56
4. 2. 3. Fracionamento dos extratos brutos e purificação das substâncias de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	58
4. 2. 3. 1. Tratamento cromatográfico do extrato em MeOH/H ₂ O da casca do tronco de <i>C. spruceanum</i>	58
4. 2. 3. 2. Purificação da Fração em Éter Etílico.....	58
4. 2. 3. 3. Purificação da Fração em Acetato de Etila.....	58
4. 3. Substâncias isoladas/identificadas de <i>Lonchocarpus guilleminianus</i> e <i>Calycophyllum spruceanum</i>	60
4. 4. Resultados e Discussão.....	64
4. 4. 1. Testes químicos qualitativos para identificação de metabólitos secundários.....	64
4. 4. 2. Determinação Estrutural dos Constituintes isolados de <i>Lonchocarpus guilleminianus</i> e <i>Calycophyllum spruceanum</i>	66
4. 4. 2. 1. Determinação estrutural da substância LG-04.....	66
4. 4. 2. 2. Determinação estrutural da substância LG-10.....	74
4. 4. 2. 3. Determinação estrutural da substância LG-12.....	82
4. 4. 2. 4. Determinação estrutural da substância LG-20.....	94

4. 4. 2. 5. Determinação estrutural do componente majoritário da fração LG-14...	106
4. 4. 2. 6. Determinação estrutural dos componentes majoritários dos derivados acetilados contidos na fração LG-14 (fração LG-14 Ac).....	112
4. 4. 2. 7. Determinação estrutural da substância LGA1.....	124
4. 4. 2. 8. Determinação estrutural da substância LGA2.....	127
4. 4. 2. 9. Determinação estrutural da substância LGA3.....	139
4. 4. 2. 10. Determinação estrutural da substância LG-5Ac.....	150
4. 4. 2. 11. Determinação estrutural da substância PM-1.....	164
4. 4. 2. 12. Determinação estrutural da substância PM-04.....	171
4. 5. Referências Bibliográficas.....	178
5. Atividade Antioxidante.....	181
5. 1. Introdução.....	181
5. 2. Atividade Seqüestradora de Radical Livre DPPH.....	182
5. 2. 1. Materiais e Reagentes Utilizados.....	183
5. 2. 2. Procedimento Experimental.....	183
5. 2. 3. Resultados e Discussão.....	186
5. 3. Método do Radical ABTS.....	188
5. 3.1. Materiais e Reagentes Utilizados.....	190
5. 3. 2. Procedimento Experimental.....	190
5. 3. 3. Resultados e Discussão.....	191
5. 4. Avaliação do Teor de Fenólicos Totais.....	194
5. 4. 1. Reagentes e Materiais Utilizados.....	196
5. 4. 2. Procedimento Experimental.....	196
5. 4. 3. Resultados e Discussão.....	197
5. 5. Avaliação do Teor de Flavonoides Totais.....	198
5. 5. 1. Reagentes e Materias Utilizados.....	199
5. 5. 2. Procedimento Experimental.....	199
5. 5. 3. Resultados e Discussão.....	200
5. 6. Referências Bibliográficas.....	203
6. Ensaio Biológicos.....	203
6. 1. Atividade Citotóxica.....	207
6. 1. 1. Introdução.....	207
6. 1. 2. Materiais e Reagentes Utilizados.....	208

6. 1. 3. Procedimento Experimental.....	208
6. 1. 4. Resultados e Discussão.....	209
6. 2. Atividade Antimicrobiana.....	210
6. 2. 1. Introdução.....	210
6. 2. 2. Materiais e Reagentes Utilizados.....	212
6. 2. 3. Procedimento Experimental.....	213
6. 2. 4. Resultados e Discussão.....	217
6. 3. Referências bibliográficas.....	239
7. Considerações Finais.....	245
7. 1. Referências Bibliográficas.....	248

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fármacos isolados de Plantas no Século XIX.....	2
Figura 2. Fármacos isolados de Plantas no Século XX.....	3
Figura 3. Estrutura básica de flavonoides característicos de <i>Lonchocarpus</i> . 1:estrutura linear; 2: estrutura angular.....	8
Figura 4. Chalconas Isoladas do Gênero <i>Lonchocarpus</i>	12
Figura 5. Flavonas Isoladas do Gênero <i>Lonchocarpus</i>	13
Figura 6. Flavanonas e Flavononols Isolados do Gênero <i>Lonchocarpus</i>	14
Figura 7. Flavanas e Flavonols Isolados do Gênero <i>Lonchocarpus</i>	14
Figura 8. Rotenoides isolados do Gênero <i>Lonchocarpus</i>	15
Figura 9. Pterocarpanos Isolados do Gênero <i>Lonchocarpus</i>	15
Figura 10. Auronas Isoladas do Gênero <i>Lonchocarpus</i>	15
Figura 11. Diterpenoides Isolados do Gênero <i>Lonchocarpus</i>	16
Figura 12. Triterpenoides e Esteroides isolados de <i>Lonchocarpus</i>	16
Figura 13. Estilbenos isolados do Gênero <i>Lonchocarpus</i>	17
Figura 14. Poliidroxialcaloides Isolados do Gênero <i>Lonchocarpus</i>	17
Figura 15. Outras Substâncias isoladas do Gênero <i>Lonchocarpus</i>	18
Figura 16. <i>Lonchocarpus guilleminianus</i>	22
Figura 17. <i>Calycophyllum spruceanum</i>	26
Figura 18. Estrutura de seco-iridoides e iridoides isolados de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	26
Figura 19. Preparação dos extratos brutos da madeira de <i>L. guilleminianus</i>	40
Figura 20. Fluxograma resumido do tratamento cromatográfico do extrato em MeOH/H ₂ O da madeira de <i>L. guilleminianus</i>	42
Figura 21. Fluxograma resumido de purificação da Fração LGMH-03	43
Figura 22. Fluxograma resumido de purificação da Fração LGMH-05	44
Figura 23. Fluxograma resumido de purificação da Fração LGMH-7	46
Figura 24. Fluxograma resumido de purificação da Fração LGMH-06	48
Figura 25. Fluxograma resumido de purificação da Fração em Acetato de Etila.....	50
Figura 26. Fluxograma resumido do tratamento cromatográfico do extrato metanólico de <i>L. guilleminianus</i>	51

Figura 27. Fluxograma resumido de purificação da fase Aquosa.....	52
Figura 28. Fluxograma resumido de purificação da fração em BuOH.....	53
Figura 29. Fluxograma resumido do tratamento cromatográfico do extrato em AcOEt da madeira de <i>L. guilleminianus</i>	55
Figura 30. Preparação dos extratos brutos da casca do tronco <i>Calycophyllum spruceanum</i>	57
Figura 31. Fluxograma resumido do procedimento realizado com o extrato bruto em metanol/água de <i>C. spruceanum</i>	59
Figura 32. Exemplo de reação do flavonoide com o FeCl ₃	64
Figura 33. Reação dos extratos brutos de <i>L. guilleminianus</i> com FeCl ₃	65
Figura 34. Exemplo de reação do flavonoide com o AlCl ₃	65
Figura 35. Reação dos extratos brutos de <i>L. guilleminianus</i> com AlCl ₃ , seguido da visualização sob luz ultravioleta a 254 nm.....	66
Figura 36. Espectro de absorção na região do UV-vis da substância LG-04	67
Figura 37. Espectro na região do infravermelho da substância LG-04	68
Figura 38. Cromatograma da substância LG-04	68
Figura 39. Espectro de massas (inserção direta) da substância LG-04	69
Figura 40. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO) da substância LG-04	69
Figura 41. Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, DMSO) da substância LG-04	70
Figura 42. Espectro de RMN de ¹³ C - APT (125 MHz, DMSO) da substância LG-04	71
Figura 43. Espectro de HMQC da substância LG-04	72
Figura 44. Espectro de HMBC da substância LG-04	73
Figura 45. Estrutura da substância LG-04 (ácido elágico).....	73
Figura 46. Espectro de absorção na região do UV-vis da substância LG-10	75
Figura 47. Espectro na região de infravermelho da substância LG-10	76
Figura 48. Espectro de massas da substância LG-10 (ESI – modo negativo)....	77
Figura 49. Proposta mecanística de fragmentação para a substância LG-10 ...	77
Figura 50. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD) da substância LG-10	78
Figura 51. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, MeOD) da substância LG-10	79
Figura 52. Espectro de RMN de ¹³ C - APT (125 MHz, MeOD) da substância	

LG-10	79
Figura 53. Espectro de HMQC da substância LG-10	80
Figura 54. Espectro de HMBC da substância LG-10	81
Figura 55. Estrutura da substância LG-10 (Ácido gálico)	81
Figura 56. Espectro na região de infravermelho da substância LG-12	83
Figura 57. Espectro de massas da substância LG-12 (ESI – modo negativo)....	84
Figura 58. Espectro (MS/MS) do pico do íon molecular Espectro de massas da substância LG-12 [EM/EM do pico a $m/z = 481,0667$ (M- H)].....	84
Figura 59. Proposta mecanística de fragmentação da substância LG-12	85
Figura 60. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância LG-12	86
Figura 61. Ampliação das regiões entre (6,4 – 7,5 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância LG-12	86
Figura 62. Ampliação das regiões entre (4,8 – 5,7 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância LG-12	87
Figura 63. Ampliação das regiões entre (3,45 - 4,20 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância LG-12	87
Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD) da substância LG-12	88
Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C - APT (125 MHz, MeOH) da substância LG-12	89
Figura 66. Espectro de HMQC da substância LG-12	90
Figura 67. Espectro de HMBC da substância LG-12	91
Figura 68. Estrutura da substância (LG-12) 2,3- (S)- hexaidroxidifenoil-D-glicose.....	92
Figura 69. Espectro na região de infravermelho da substância LG-20	94
Figura 70. Espectro de massas da substância LG-20 (ESI – modo negativo)	95
Figura 71 Espectro de massas da substância LG-20 [EM/EM do pico a $m/z = 633$ (M- H)].....	95
Figura 72 . Principais fragmentos verificados no EM da substância LG-20	96
Figura 73. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância LG-20	96
Figura 74. Ampliação das regiões entre (6,2 – 7,3 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância LG-20	97
Figura 75. Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOH) da substância LG-20	97

Figura 76. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD) da substância LG-20	98
Figura 77. Ampliação das regiões entre (105 – 170 ppm) do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD) da substância LG-20	99
Figura 78. Espectro de RMN ^{13}C - APT (125 MHz, MeOD) da substância LG-20	99
Figura 79. Espectro de HMQC da substância LG-20	100
Figura 80. Ampliação do Espectro de HMQC da substância LG-20	101
Figura 81. Espectro de HMBC da substância LG-20	102
Figura 82. Ampliação do espectro de HMBC da substância LG-20	103
Figura 83. Estrutura da substância (LG-20) β -1-O-galoil-3,6-(R)-hexahidroxidifenoil-D-glicose, (corilagina).	104
Figura 84. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância LG-14	106
Figura 85. Ampliação das regiões entre (3,3 – 4,2 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da amostra LG-14	107
Figura 86. Ampliação das regiões entre (3,13 – 3,28 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da amostra LG-14	107
Figura 87. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD) da substância LG-14	108
Figura 88. Espectro de RMN de ^{13}C - APT (125 MHz, MeOD) da substância LG-14	109
Figura 89. Espectro de HMQC da substância LG-14	110
Figura 90. Espectro de HMBC da substância LG-14	111
Figura 91. Estrutura da substância (LG-14) metil- β -D-glicopiranosídeo.....	112
Figura 92. Cromatograma da fração LG-14 Ac	113
Figura 93. Principais componentes identificados na fração LG-14 Ac	114
Figura 94. Espectro de infravermelho da amostra LG-14 Ac	115
Figura 95. Espectro de Massa CG-EM da substância LG-14 Ac(g)	115
Figura 96. Proposta mecanística de fragmentação da substância LG-14 Ac(g)	116
Figura 97. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra LG-14 Ac	117
Figura 98. Ampliação das regiões entre (3,5 – 5,5, ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra LG-14 Ac	117
Figura 99. Ampliação das regiões entre (1,9 – 2,7 ppm) do espectro de RMN	118

^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra LG-14 Ac	
Figura 100. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da amostra LG-14 Ac	119
Figura 101. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) da amostra LG-14 Ac	120
Figura 102. Espectro de HMQC da amostra LG-14 Ac	121
Figura 103. Espectro de HMBC da amostra LG-14 Ac	122
Figura 104. Cromatograma da amostra LGA1	124
Figura 105. Constituintes identificados da amostra LGA1	125
Figura 106. Espectro de massas do Pentacosano LGA1 (k)	126
Figura 107. Espectro de massas do Heptacosano LGA1(m)	126
Figura 108. Espectro na região de infravermelho da substância LGA2	127
Figura 109. Cromatograma da substância LGA2	128
Figura 110. Espectro de massas da substância LGA2	129
Figura 111. Proposta mecanística de fragmentos de massas para a substância LGA2	129
Figura 112. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CHCl_3) da substância LGA2	130
Figura 113. Ampliação das regiões entre (1,9 – 3,0 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância LGA2	131
Figura 114. Ampliação das regiões entre (0,5 – 1,8 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância LGA2	131
Figura 115. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância LGA2	132
Figura 116. Ampliação das regiões entre (5 – 65 ppm) do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância LGA2	133
Figura 117. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) da substância LGA2	133
Figura 118. Espectro de HMQC da substância LGA2	134
Figura 119. Ampliação do espectro de HMQC da substância LGA2	135
Figura 120. Espectro de HMBC da substância LGA2	136
Figura 121. Ampliação do espectro de HMBC da substância LGA2	137
Figura 122. Estrutura da Substância LGA2 (Friedelina).....	137
Figura 123. Espectro na região de infravermelho da amostra LGA3	139
Figura 124. Cromatograma da amostra LGA3	140
Figura 125. Espectro de massas da amostra LGA3 (estigmasterol).....	141

Figura 126. Proposta mecanística de fragmentação para a amostra LGA3 (estigmasterol).....	141
Figura 127. Espectro de massas da amostra LGA3 (γ -sitosterol).....	142
Figura 128. Proposta mecanística de fragmentação para a amostra LGA3 (γ -sitosterol).....	143
Figura 129. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra LGA3	144
Figura 130. Ampliação das regiões entre (3,5 – 5,3 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra LGA3	144
Figura 131. Ampliação das regiões entre (0,6 – 2,5 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra LGA3	145
Figura 132. Espectro de RMN ^{13}C (125MHz, CDCl_3) da amostra LGA3	146
Figura 133. Espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl_3) da amostra LGA3	146
Figura 134. Estrutura da Substância LGA2 os esteroides estigmasterol e γ -sitosterol.....	147
Figura 135. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância LG5-Ac	151
Figura 136. Ampliação das regiões entre (80 – 192 ppm) do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância LG-5Ac	151
Figura 137. Espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl_3) da substância LG-5Ac	152
Figura 138. Espectro de massa da substância LG-5Ac ES/EM (modo negativo).	153
Figura 139. Espectro de massa da substância LG-5Ac ES/EM (modo positivo).....	153
Figura 140. Espectro de massa/massa modo positivo do pico a m/z 817,2256 da substância LG-5Ac.....	154
Figura 141. Espectro de massa/massa modo positivo do pico a m/z 817,2256 da substância LG-5Ac.....	155
Figura 142. Proposição mecanística de fragmentação da substância LG-5Ac....	156
Figura 143. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância LG-5Ac	157
Figura 144. Mapa de correlação homonuclear ^1H x ^1H (COSY) da substância LG-5Ac	158
Figura 145. Espectro de HMQC da substância LG-5Ac	159

Figura 146. Espectro de HMBC da substância LG-5Ac	160
Figura 147. (a) estrutura da saponina ácido 3-O-β-D-xilofuranosil-(1'→3)-β-D-glicopiranosil (1''→2')-α-ramnopiranosil(1'''→3')-hidroxiolean-12-en-28-oico) (LG – 5Ac); (b) correlações a longa distância verificadas no espectro de HMBC.....	161
Figura 148. Espectro na região de infravermelho da substância PM-1	164
Figura 149. Espectro de massas da substância PM-1 (ESI – modo negativo).....	165
Figura 150. Proposta mecanística de fragmentação para a substância PM-1	165
Figura 151. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD) da substância PM-1	166
Figura 152. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, MeOD) da substância PM-1	167
Figura 153. Espectro de RMN de ¹³ C - APT (125 MHz, MeOD) da substância PM-1	167
Figura 154. Espectro de HMQC da substância PM-1	168
Figura 155. Espectro de HMBC da substância PM1	169
Figura 156. Estrutura da substância PM-1 (ácido protocatecuico).....	170
Figura 157. Espectro na região do infravermelho da amostra PM-4	171
Figura 158. Espectro de massas da amostra PM-4 (ESI – modo negativo).....	172
Figura 159. Proposta mecanística de fragmentação para a amostra PM-4	172
Figura 160. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD) da amostra PM-4	173
Figura 161. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, MeOD) da amostra PM-4	174
Figura 162. Espectro de RMN ¹³ C - APT (125 MHz, MeOD) da amostra PM-4 ...	174
Figura 163. Espectro de HMQC da amostra PM4	175
Figura 164. Espectro de HMBC da amostra PM4	176
Figura 165. Estruturas das substâncias PM-4 ácido protocatecuico e o éster metílico do ácido protocatecuico, (protocatecuato de metila).....	177
Figura 166. Possível interação entre o DPPH e o flavonoide Rutina.....	183
Figura 167. Procedimento Experimental realizado na atividade sequestradora de radicais livres DPPH.....	185
Figura 168. Estabilização do radical ABTS ⁺ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. Adaptada de Souza et al, 2007.....	189
Figura 169. Exemplo de substâncias fenólicas.....	194
Figura 170. Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.....	195

Figura 171. Reação do reagente Folin-Ciocalteu com o ácido gálico e o extrato em MeOH de <i>L. guilleminianus</i> em diferentes concentrações.....	198
Figura 172. Formação do complexo Flavonóide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio.....	199
Figura 173. Esquema do experimento realizado para a avaliação da atividade citotóxica	209
Figura 174. Fluxogramas da partição realizada com os extratos em MeOH/H ₂ O de <i>L. guilleminianus</i> e <i>C. spruceanum</i>	214
Figura 175. Esquema do experimento realizado para a avaliação da atividade antibacteriana.....	217
Figura 176. Experimento realizado com a substância LG-12 frente à bactéria <i>S.epidermidis</i> ATCC 12228.....	220
Figura 177. Experimento realizado com a fração LGH frente à bactéria <i>S.epidermidis</i> ATCC 12228.....	220
Figura 178. Experimento realizado com a fração LGB frente à bactéria <i>S.epidermidis</i> ATCC 12228.....	221
Figura 179. Experimento realizado com o extrato 4 frente à bactéria <i>S.epidermidis</i> ATCC 12228.....	221
Figura 180. Experimento realizado com a substância LG-12 frente à bactéria <i>S.aureus</i> ATCC 33591.....	222
Figura 181. Experimento realizado com a fração em água LGH de <i>L. guilleminianus</i> frente à bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	223
Figura 182. Experimento realizado com a fração em BuOH LGB de <i>L. guilleminianus</i> frente à bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	223
Figura 183. Experimento realizado com o extrato 4 de <i>L. guilleminianus</i> frente à bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	224
Figura 184. Experimento realizado com o extrato 4 de <i>L. guilleminianus</i> frente à bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 33591.....	224
Figura 185. Experimento realizado com a fração em H ₂ O LGH de <i>L. guilleminianus</i> frente à bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 33591.....	225
Figura 186. Experimento realizado com a fração em H ₂ O LGB de <i>L. guilleminianus</i> frente à bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 33591.....	225
Figura 187. Experimentos realizados com as frações em H ₂ O e BuOH LGH ,	226

(LGB), (PMH), (PMB) de <i>L. guilleminianus</i> e <i>C. spruceanum</i> , os extratos 4 e 5 e a substância (LG-12) frente à bactéria <i>E. coli</i>	
Figura 188. Antibiograma realizado com a LG-12 frente à cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 33591.....	228
Figura 189. Antibiograma realizado com a fração LGH frente à cepa de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	230
Figura 190. Antibiograma realizado com a fração LGB frente à cepa de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	231
Figura 191. Antibiograma realizado com o extrato 4 frente à cepa de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	231
Figura 192. Antibiograma realizado com a LG-12 frente à cepa de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	232
Figura 193. Substâncias isoladas do gênero <i>Lonchocarpus</i> com potencial atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i>	236
Figura 194. Estrutura do 2,3-(S) hexaidrodifenoil-D- glicose LG-12	237

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Material Botânico mais estudado de <i>Lonchocarpus</i>	9
Gráfico 2. Proporção dos constituintes químicos de <i>Lonchocarpus</i>	10
Gráfico 3. Flavonoides x Material Botânico.....	10
Gráfico 4. Classes de Flavonoides Encontradas no Gênero.....	11
Gráfico 5. Curva de calibração do DPPH.....	184
Gráficos 6. Gráfico da porcentagem de Atividade Antioxidante <i>versus</i> concentração dos extratos brutos em <i>L. guilleminianus</i>	187
Gráfico 7. Gráfico da porcentagem de Atividade Antioxidante <i>versus</i> concentração dos extratos brutos em <i>C. spruceanum</i>	187
Gráfico 8. Curva de calibração do Trolox.....	192
Gráfico 9. Equação da reta para o extrato em MeOH/H ₂ O de <i>L. guilleminianus</i>	193
Gráfico 10. Equação da reta para o extrato em MeOH de <i>L. guilleminianus</i>	193
Gráfico 11. Curva de calibração do ácido gálico.....	197
Gráfico 12. Curva de calibração da Rutina.....	200

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais atividades biológicas de alguns compostos isolados das espécies de <i>Lonchocarpus</i>	19
Tabela 2. Enquadramento Taxonômico de <i>Lonchocarpus guilleminianus</i>	23
Tabela 3. Deslocamentos e absorções máximas na região do UV- vis da substância LG-04	67
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LG-04, utilizando DMSO como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).	74
Tabela 5. Deslocamentos e absorções máximas na região do UV- vis da substância LG-10	75
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LG-10, utilizando MeOD como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).....	82
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LG-12, utilizando MeOD como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).	93
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LG-20 , utilizando MeOD como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).....	104
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LG-14, utilizando MeOD como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).....	112
Tabela 10. Tempos de retenção (T_R), relação massa/carga (m/z) e porcentagem de área (Área %) dos componentes da fração LG-14Ac.....	113
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LG-14 Ac, utilizando CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).	123
Tabela 12. Tempos de retenção (T_R), relação massa/carga (m/z) e porcentagem de área (Área %) dos componentes da fração LGA1.....	125
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LGA2, utilizando CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).....	138

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LGA3 (estigmasterol) utilizando CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).....	148
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LGA3 (γ -sitosterol), utilizando CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).....	149
Tabela 16. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LG-5Ac, utilizando CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).....	162
Tabela 17. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) obtidos para a aglicona da substância LG-5Ac utilizando CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).....	163
Tabela 18. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância PM1, utilizando MeOD como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).....	170
Tabela 19. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da mistura PM4, utilizando MeOD como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).....	177
Tabela 20. Porcentagem de Atividade Antioxidante dos extratos brutos de <i>L. guilleminianus</i>	186
Tabela 21. Porcentagem de Atividade Antioxidante dos extratos brutos de <i>C. spruceanum</i>	187
Tabela 22. Valores de EC_{50} para os extratos em AcOEt, MeOH e MeOH/ H_2O de <i>L. guillemininus</i> e MeOH e MeOH/ H_2O de <i>C. spruceanum</i> ...	188
Tabela 23. Teor de fenóis totais dos extratos brutos de <i>L. guilleminianus</i> e <i>C. spruceanum</i>	197
Tabela 24. Teor de flavonoides totais dos extratos brutos de <i>L. guilleminianus</i> e <i>C. spruceanum</i>	201
Tabela 25. Valores de DL_{50} dos extratos de <i>L. guilleminianus</i> e <i>C. spruceanum</i>	209
Tabela 26. Microrganismos utilizados no Ensaio Biológico.....	215

Tabela 27. Média do número de colônias da cepa <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 tratadas com o extrato 4, as frações LGB, LGH e a substância 2,3-(S)-hexaidroxidifenoil-D-glicose (LG-12).....	218
Tabela 28. Média do número de colônias das cepas <i>S. aureus</i> ATCC 33591 e <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 tratadas com a substância 2,3-(S)-hexaidroxidifenoil-D-glicose (LG-12).....	219
Tabela 29. Resumo dos resultados obtidos da Avaliação da Atividade Antibacteriana.....	227
Tabela 30. Antibiograma da cepa <i>S. aureus</i> ATCC 33591, tratado com a substância 2,3-(S)-hexaidroxidifenoil-D-glicose (LG-12) e dez drogas, avaliada por método da difusão em ágar (diâmetro do halo medido em mm).....	229
Tabela 31. Antibiograma da cepa <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228, tratado com a fração aquosa (LGH) a fração butanólica (LGB), a substância (LG-12) e o extrato em MeOH/H ₂ O (Ext.4) e dez drogas, avaliada por método da difusão em ágar (diâmetro do halo medido em mm).....	233
Tabela 32a. Comparação da inibição entre as cepas <i>S. aureus</i> (ATCC 33591) e <i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228), tratadas com a substância LG-12 e submetidos a antibiograma com cinco drogas, avaliados por método da difusão em ágar (diâmetro do halo medido em mm).....	235
Tabela 32b. Comparação da inibição entre as cepas <i>S. aureus</i> (ATCC 33591) e <i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228), tratadas com a substância LG-12 e submetidos a antibiograma com cinco drogas, avaliados por método da difusão em ágar (diâmetro do halo medido em mm).....	235

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
δ_C	Deslocamento químico do carbono
δ_H	Deslocamento químico do hidrogênio
AA	Atividade antioxidante
AAT	Atividade antioxidante total
ABTS	2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico
AcOEt	Acetato de Etila
APT	Attached proton test
BuOH	Álcool butílico
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CG/EM	Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas
MeOH	Metanol
CMI	Concentração Mínima inibitória
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo-dubleto
<i>ddd</i>	Duplo-duplo-dubleto
DL ₅₀	Dose letal mínima responsável pela morte de 50% da população em teste
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2'-difeníl-1-picrihidrazil
EAG	Equivalente de ácido gálico
EC ₅₀	Quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de radical livre no meio reacional em 50%
ESI	Massa de alta resolução
EtOH	Etanol
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MeOD	Metanol deuterado
MHz	Megahertz
MPLC	Cromatografia Líquida de Média Pressão
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
ppm	Parte por milhão
R _f	Fator de retenção
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
<i>s</i>	Singleto
<i>t</i>	Triplete
TEAC	Capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta



INTRODUÇÃO

Introdução

A descoberta de fármacos a partir de produtos naturais juntamente com a constante ameaça a biodiversidade através da destruição dos ecossistemas e uma pequena parcela de entidades químicas envolvidas, justifica indiscutivelmente uma maior colaboração multidisciplinar e internacional na exploração da natureza como uma fonte para geração de novos fármacos e agentes bioativos. Neste contexto, a diversidade extremamente rica do Brasil e países vizinhos oferecem um potencial singular (Yunes, 2016).

O Brasil, que possui uma diversidade de vegetais com aproximadamente 45 mil espécies, tem contribuído na geração de novas substâncias e na produção de princípios ativos em diversos grupos de pesquisa, que atuam em inúmeras áreas. Apesar de expressiva produção científica, o país ainda tem muito a avançar na produção de novos medicamentos (Cechinel Filho, 2015; Dutra et al., 2016).

Os biomas brasileiros como a Mata Atlântica, Cerrado e Floresta Amazônica tem sido fonte de plantas que são utilizadas pela população no tratamento de doenças tropicais como a esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções fúngicas e bacterianas (Duarte, 2006).

O Brasil é detentor de seis biomas terrestres – a Amazônia, a Caatinga, o Pantanal, os Pampas, a Mata Atlântica e o Cerrado, sendo os dois últimos considerados *hotspots* de biodiversidade, devido à perda de diversidade decorrentes da urbanização, agricultura e pecuária, sendo ameaçados e de extinção de suas espécies em um futuro próximo, conferindo assim um grande dano a riqueza que esses ecossistemas constituem (Ministério do Meio Ambiente, 2011; Myers et al; 2000).

O uso do potencial terapêutico das plantas no tratamento de doenças é de conhecimento de diferentes culturas dos mais distintos lugares desde a pré-história (Coutinho *et al.*, 2004). A relevante farmacopeia desenvolvida até o século XIX e empregada na medicina tradicional foi base para o desenvolvimento de fármacos isolados de plantas, como: Emetina (1817), Colchicina (1820), Quinina (1820), Salicina (1827), Atropina (1831), Morfina (1832), Quinidina (1833), Codeína (1848), Efedrina (1887), conforme mostra a (Figura 1, p. 2.) (Yunes, 2016).

Outras substâncias isoladas posteriormente (Figura 2, p. 3) também confirmam a importância dos produtos naturais de origem vegetal no desenvolvimento e descoberta de novos fármacos, como a Tubocurarina (1935), Reserpina (1952), ginkgolido-B(1967), Taxodiona (1968), Paclitaxel (1971) e a Colforsina (1977) (Barreiro, 1990).

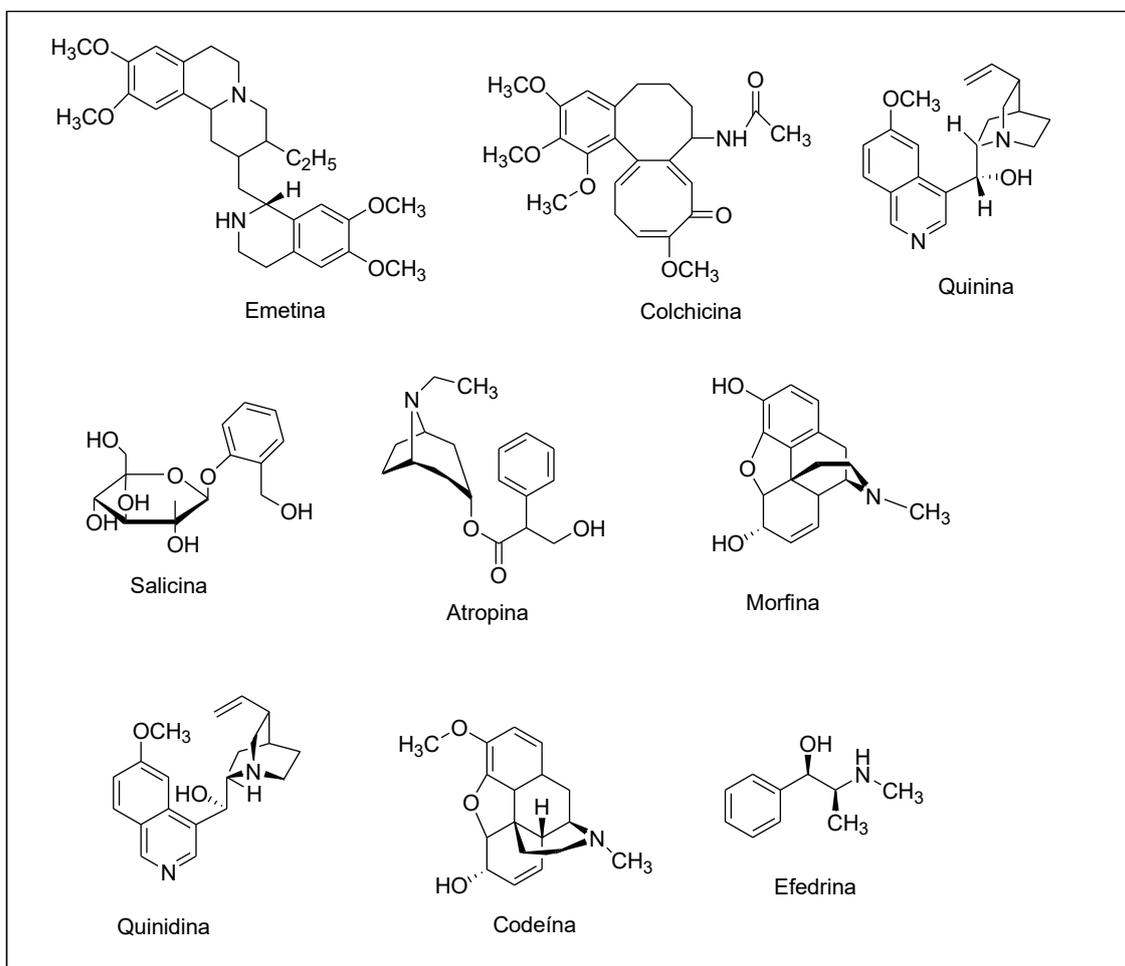


Figura 1. Fármacos isolados de Plantas no Século XIX.

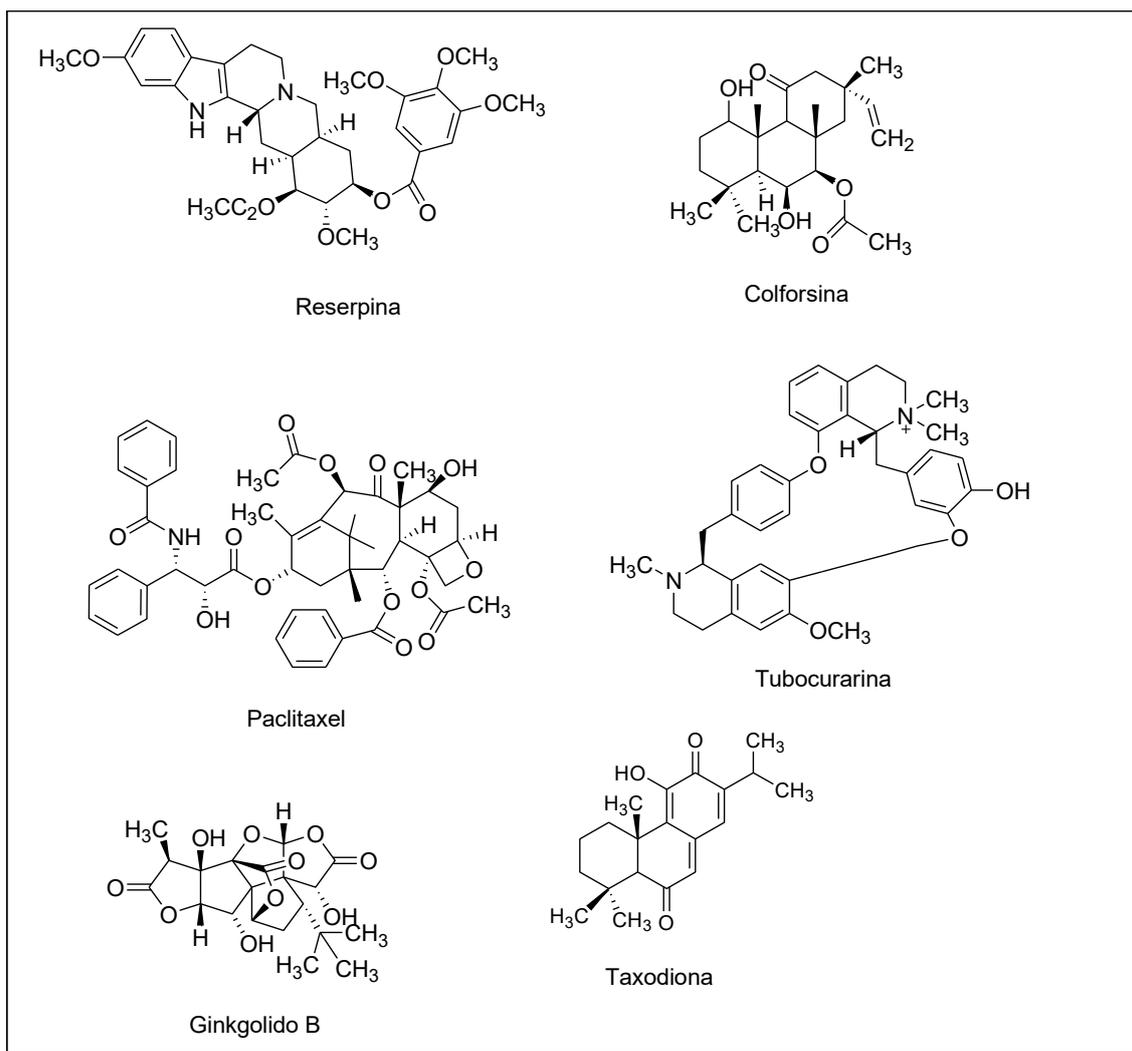


Figura 2. Fármacos isolados de Plantas no Século XX.

Pela capacidade que as plantas possuem de biossintetizar os mais variados tipos de estruturas moleculares, aumenta o interesse por essas substâncias das indústrias farmacêuticas (fonte de novos fármacos), indústria agroquímica (fonte de inseticidas e fungicidas naturais, que causam menos danos à saúde humana), indústria alimentícia (substâncias naturais para conferir cor, como os corantes e sabor aos alimentos) e indústria cosmética (produtos antioxidantes que combatem o envelhecimento, entre outros) (Scheuermann & Cunha, 2006).

Os metabólitos especiais presentes em plantas, frequentemente, apresentam atividades biológicas interessantes. Entre as atividades biológicas atribuídas as plantas medicinais, podemos citar: antifúngica, antibacteriana, antiparasitária, anti-inflamatória, alelopática, antioxidante, e outras (Simões *et al.*, 2001). Sendo assim espera-se que por meio de estudos fitoquímicos que

envolvam isolamento, identificação estrutural e atividade biológica possam contribuir na descoberta de novas substâncias bioativas (Duarte, 2006).

Dentro deste contexto e motivado pela classe de metabólitos especiais peculiares a cada família ou gênero as espécies selecionadas para este estudo são:

- *Lonchocarpus guilleminianus*, família Fabaceae
- *Calycophyllum spruceanum*, família Rubiaceae

Referências Bibliográficas:

BARREIRO, E. J. (1990). Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. *Química nova*, 13(1).

CECHINEL FILHO, V. (2015). Medicamentos de origem vegetal: atualidades desafios e perspectivas. Ed. Univali – Itajaí-SC, p.191.

DUARTE, M.C.T. (2006). Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Construindo a História dos produtos naturais. *Multiciência*. V.7. p.16.

DUTRA, R. C., CAMPOS, M. M., SANTOS, A. R. S., CALIXTO, J. B. (2016) Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, In press.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. (2011) Quarto Relatório Nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica, Brasília.

MYERS, N., MITTERMELER, R. A., MITTERMELER, C. G., FONSECA, G. A. B., KENT, J.(2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403 p.853.

SCHEUERMANN, G. N.; CUNHA, Jr. A. (2006). Perspectivas para a utilização de produtos de origem vegetal como aditivos alternativos na alimentação de aves. *Embrapa suínos e aves*. Disponível em http://engormix.com/perspectivas_a_utilização_produtos_p_artigos_16_AVG.htm/ (acesso em 23/01/2014).

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (2001). Farmacognosia: da planta ao medicamento 3ªed. Editora da UFSC.

YUNES, R. A., CECHINEL FILHO, V. (2016) Química de Produtos Naturais novos fármacos e a moderna farmacognosia. 5ª edição, Ed. Univali- Itajaí-SC. p.14, 59.



CAPÍTULO 1
REVISÃO DA LITERATURA

1. Revisão da Literatura

1. 1. A Família Fabaceae

A família Fabaceae também conhecida como leguminosae (leguminosas) possui ampla distribuição geográfica e é uma das maiores dentre as dicotiledôneas, sendo superada apenas pela Asteraceae. Compreende aproximadamente 727 gêneros e 19.325 espécies, estando representada em todos os biomas brasileiros. Esta subdividida em três subfamílias muito distintas: Papilionoideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae (Lewis et al. 2005).

A família também apresenta grande importância econômica pela produção de alimentos, uma característica típica dessa família é apresentar o fruto do tipo legume, também conhecido como vagem.

Segundo Alexandre e colaboradores (1988), quase todas as espécies da família apresentam simbiose de suas raízes com bactérias fixadoras de nitrogênio (*Rhizobium*). Esta característica é de extrema importância ecológica e é mais frequente na subfamília Mimosoideae. Além disso, fatores químicos, físicos e biológicos do solo podem limitar a nodulação de espécies capazes de formar esta simbiose.

São de hábito variado podendo ser herbáceas, trepadeiras, arbustivas e arbóreas. Essa família possui uma ampla distribuição nas regiões temperadas e tropicais.

✓ Hábito e folhas

Possui hábito bastante variável, desde minúsculas ervas arbustos, trepadeiras até árvores de grande porte. Seus representantes apresentam folhas alternas e compostas, podendo ser pinadas, bipinadas, trifoliolares e digitadas. Há presença de estípulas que podem ser de tamanho variado, muitas vezes a estípula é transformada em espinho. Na base da folha e dos folíolos existem articulações chamadas, respectivamente, de pulvinos e pulvínulos, espécies do gênero *Mimosa* usam essas articulações para movimentarem-se rapidamente em resposta a agentes externos, essas plantas são denominadas sensitivas (Alexandre et al, 1998).

✓ Frutos

O fruto mais comum da espécie da família Fabaceae é do tipo legume, monocarpelar, seco e deiscente, a vagem. Entretanto, algumas espécies de leguminosas formam frutos indeiscentes, como o amendoim (*Arachis* spp.), sâmara (*Machaerium* spp.), entre outros (Fernandes, 2007).

Algumas atividades biológicas são descritas na literatura para os extratos e substâncias isoladas das diferentes espécies de Fabaceae, entre elas atividades antitumoral, antiviral, antitérmica, anti-inflamatória e estimulante (De Oliveira, 2016).

A classe dos flavonoides e dos alcaloides são conhecidas como marcadores taxonômicos na química da família Fabaceae. Entre os flavonoides são encontrados flavonóis, flavonóis glicosilados, flavonas, isoflavonas, chalconas entre outros. Enquanto que na classe dos alcalóides encontram-se derivados de fenilalanina, tirosina e do triptofano entre outros (Harboner, 1981).

1. 2. O Gênero *Lonchocarpus*

O gênero *Lonchocarpus*, é um dos representantes da família Fabaceae, este representado por cerca de 100 espécies, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre.

No Brasil, são reconhecidas aproximadamente 23 espécies. Estudos sobre a fitoquímica do gênero mostram a presença de substâncias fenólicas, das quais podemos destacar as flavonas, chalconas, cromonas, flavanas, flavononas e auronas (Lima et al., 2009; Magalhães et al., 2007, Lawson et al., 2008).

Uma característica dos flavonóides produzidos por *Lonchocarpus* é sua baixa polaridade e a presença de anéis furânicos ou pirânicos que podem estar ligados ao núcleo flavonoídico em C-6/C-7 ou C-7/C-8 (Figura 3) formando sistemas lineares e angulares respectivamente.

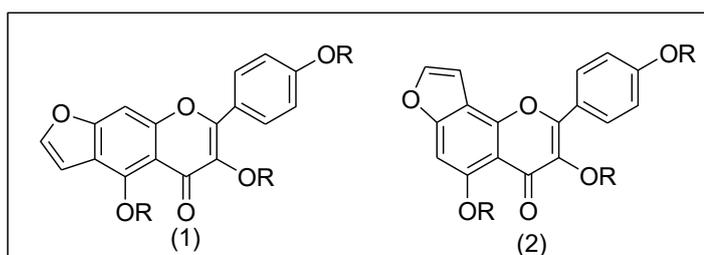


Figura 3. Estrutura básica de flavonoides característicos de *Lonchocarpus*. 1:estrutura linear; 2: estrutura angular.

Várias atividades são atribuídas aos flavonoides isolados no gênero, onde destacamos a atividade antimicrobiana (Magalhães et al., 2007), gastroprotetora (Campos et al., 2008), citotóxica (De Andrade et al., 2003), anti agregação plaquetária (Fontenelle et al., 2005) e antimalárica (Khaomeck et al., 2008), entre outras.

Até o momento encontra-se descrito na literatura o estudo químico e biológico de cerca de 30 espécies do gênero *Lonchocarpus*, dentre as quais podemos citar: *L.aff. fluvialis*, *L. araripenses*, *L. atropurpureus*, *L. campestris*, *L. castilloi*, *L. chiricanus*, *L. costaricensis*, *L. cyanescens*, *L. cultratus*, *L. filipes*, *L. floribundus*, *L. latifolius*, *L. minimiflorus*, *L. oaxacensis*, *L. obtusos*, *L. orotinus*, *L.sericeus*, *L.yucatanenses*, *L. urucu*, *L. xuul*, *L. montanus*, *L. subglaucescens*, *L. nicou*, *L. muehlbergianus*, *L.euriocaulinalis*, *L. unifoliatus*, *L. salvadorensis*, *L. laxiflorus* e *L. peninsulares*.

No presente trabalho foi realizado um levantamento bibliográfico dos constituintes químicos do gênero *Lonchocarpus*, podem ser agrupados de acordo com material botânico da planta (folhas, madeira, sementes e raízes) mais investigado. No gráfico 1, verifica-se que o material botânico mais estudado no gênero são as raízes em seguida o caule, folhas e sementes.

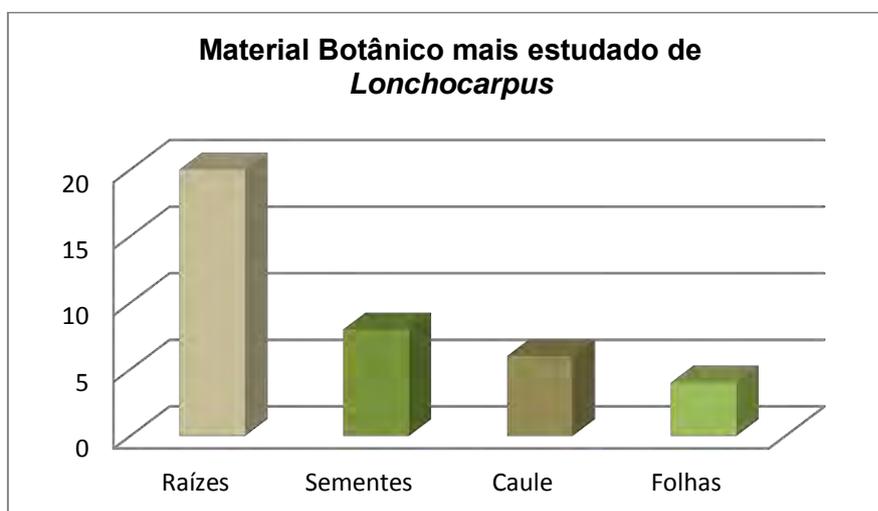


Gráfico 1. Material Botânico mais estudado de *Lonchocarpus*

O estudo fitoquímico das espécies do gênero *Lonchocarpus* permitiu a identificação de aproximadamente 229 diferentes substâncias, que estão distribuídas entre flavonoides (70,74%), diterpenoides (1,31%), triterpenoides e esteroides

(5,24%), estilbenos (3,49%), poliidroxialcaloides (2,18%) e outros compostos (17,03%) que caracterizam o perfil químico do gênero (Gráfico 2, p. 10).

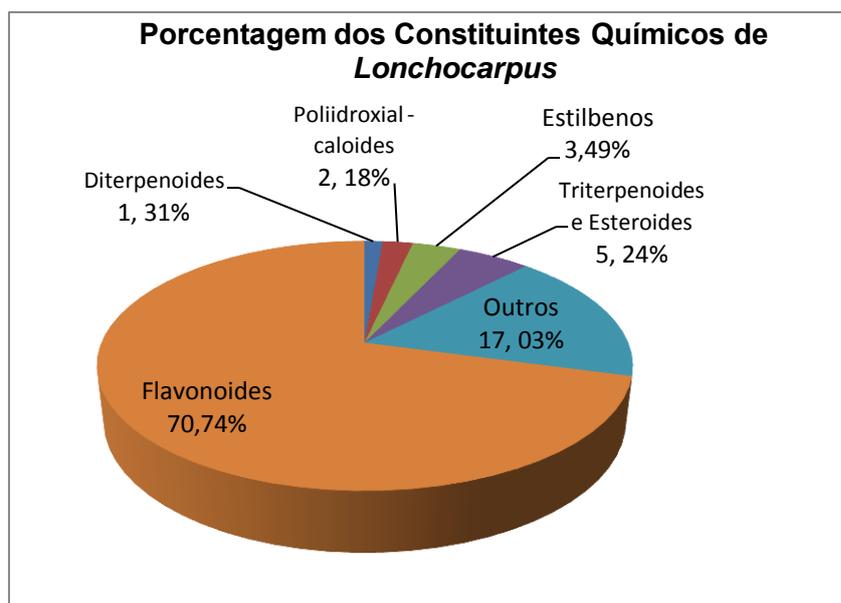


Gráfico 2. Proporção dos constituintes químicos de *Lonchocarpus*

A via biossintética dos flavonoides foi a mais representativa no fornecimento de substâncias isoladas e identificadas em diversos materiais botânicos de espécies do gênero. Verificou-se também que os mesmos foram relatados em maior quantidade nas raízes das plantas (Gráfico 3).

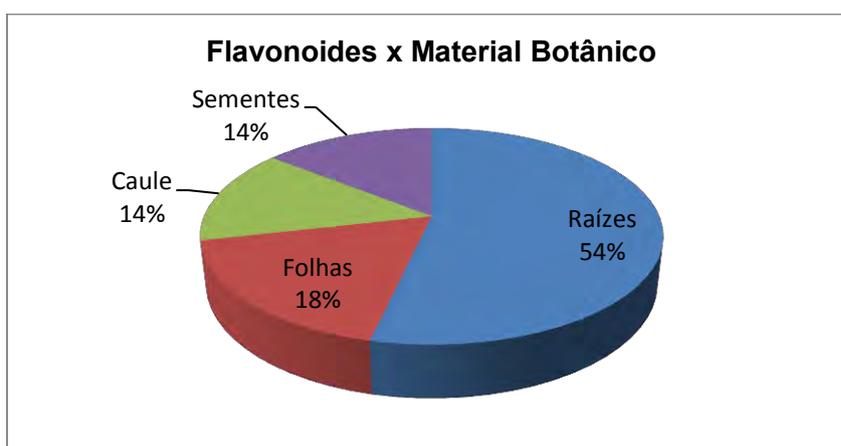


Gráfico 3. Flavonoides x Material Botânico

Entre os diferentes tipos de flavonoides encontrados a classe das chalconas e flavonas foi a mais significativa (24,07%) e (23,45%) respectivamente, flavanonas e flavanonois (20,37%), flavanas e flavonois (15,43%), rotenoides (9,87%), auronas (4,32%) pterocarpanos (2,46%), conforme mostra o Gráfico 4, p.11.

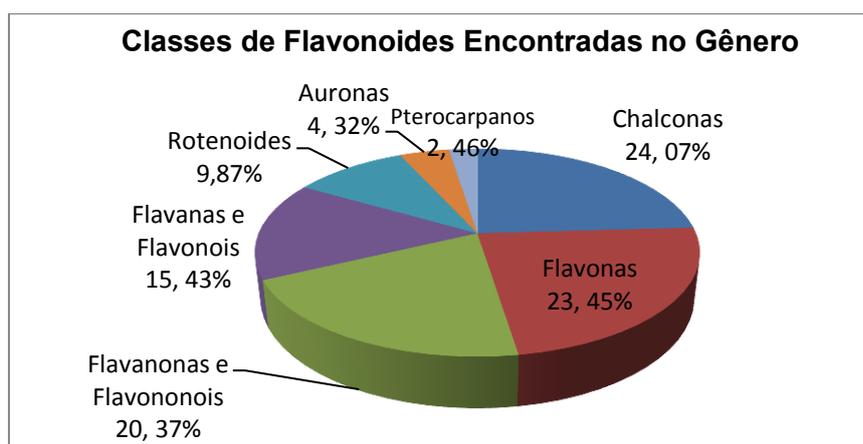


Gráfico 4. Classes de Flavonoides Encontradas no Gênero

1. 2. 1. Constituintes Químicos Isolados de Espécies do Gênero *Lonchocarpus*

Nas figuras abaixo estão apresentadas as estruturas dos constituintes químicos mais encontrados em *Lonchocarpus*, onde se destaca a classe dos flavonoides como a mais abundante, chalconas (Figura 4, p. 11 e 12), flavonas (Figura 5, p. 12 e 13), flavanonas e flavononois (Figura 6, p.n13 e 14), flavanas e flavonols (Figura 7, p. 14), rotenóides (Figura 8, p. 15), pterocarpanos (Figura 9, p.15), auronas (Figura 10, p. 15), diterpenoides (Figura 11, p. 16), triterpenoides e esteroides (Figura 12, p. 16), estilbenos (Figura 13, p. 17), poliidroxialcaloides (Figura 14, p. 17) e outras substâncias (Figura 15, p. 17 e 18).

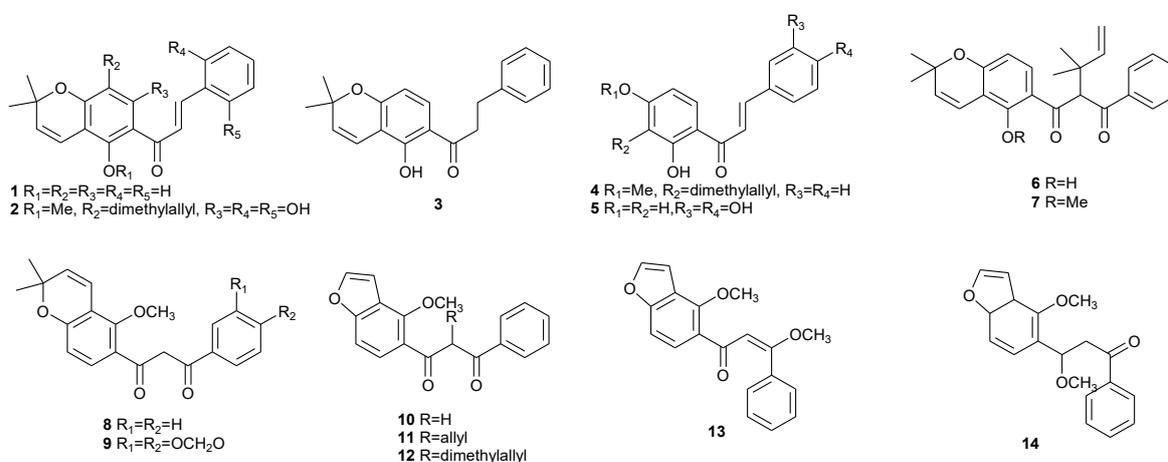


Figura 4. Chalconas Isoladas do Gênero *Lonchocarpus*

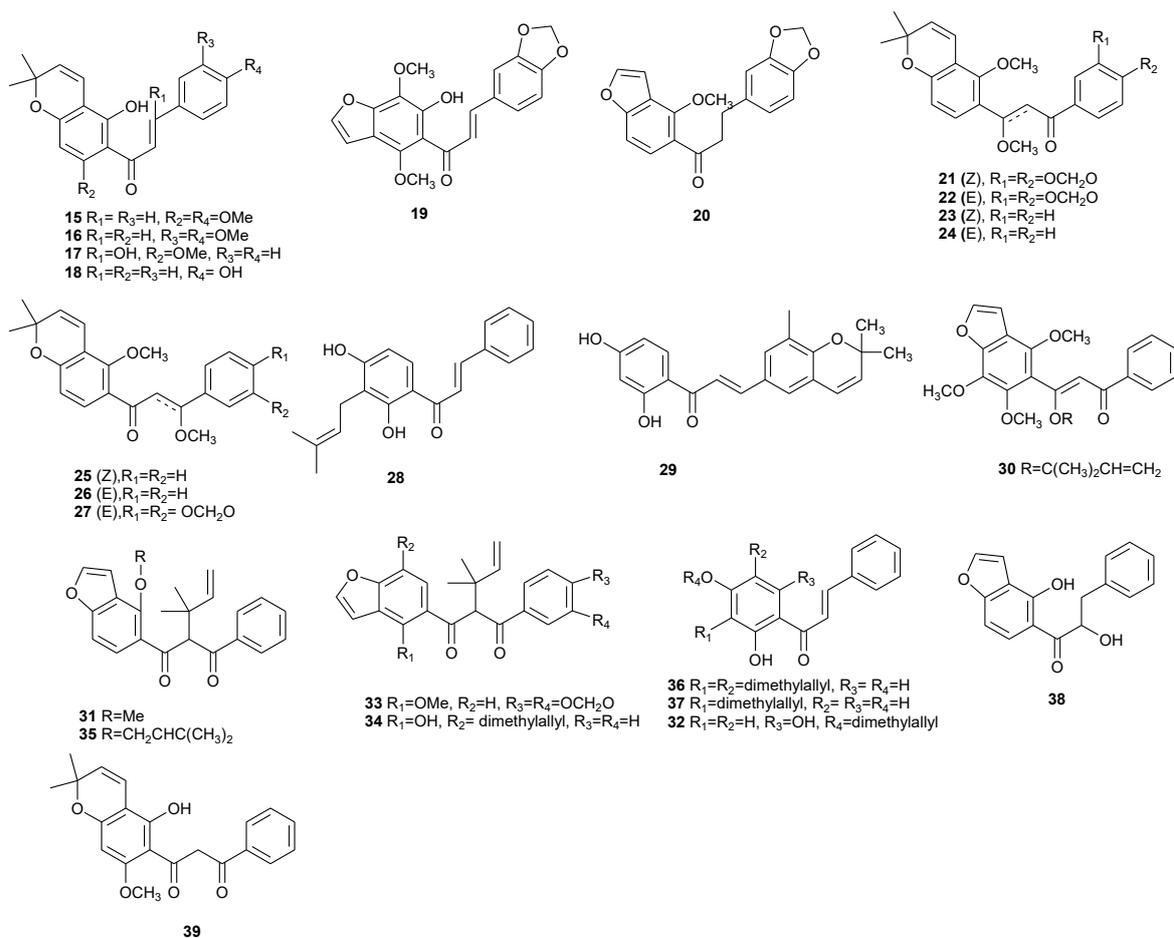
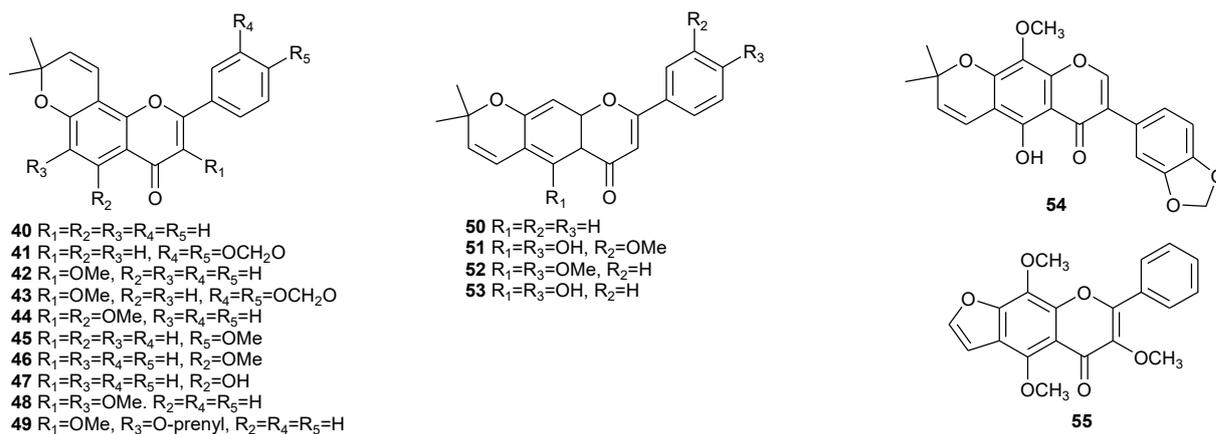


Figura 4. Continuação


 Figura 5. Flavonas Isoladas do Gênero *Lonchocarpus*

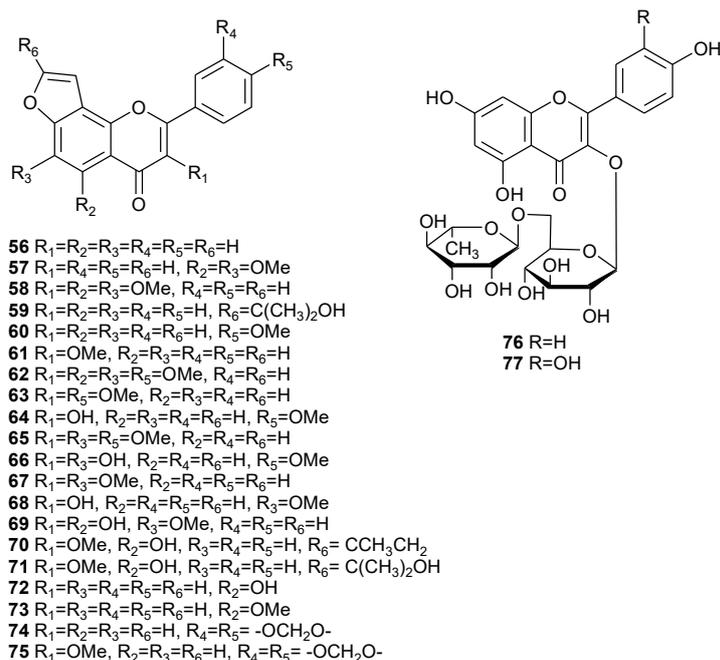
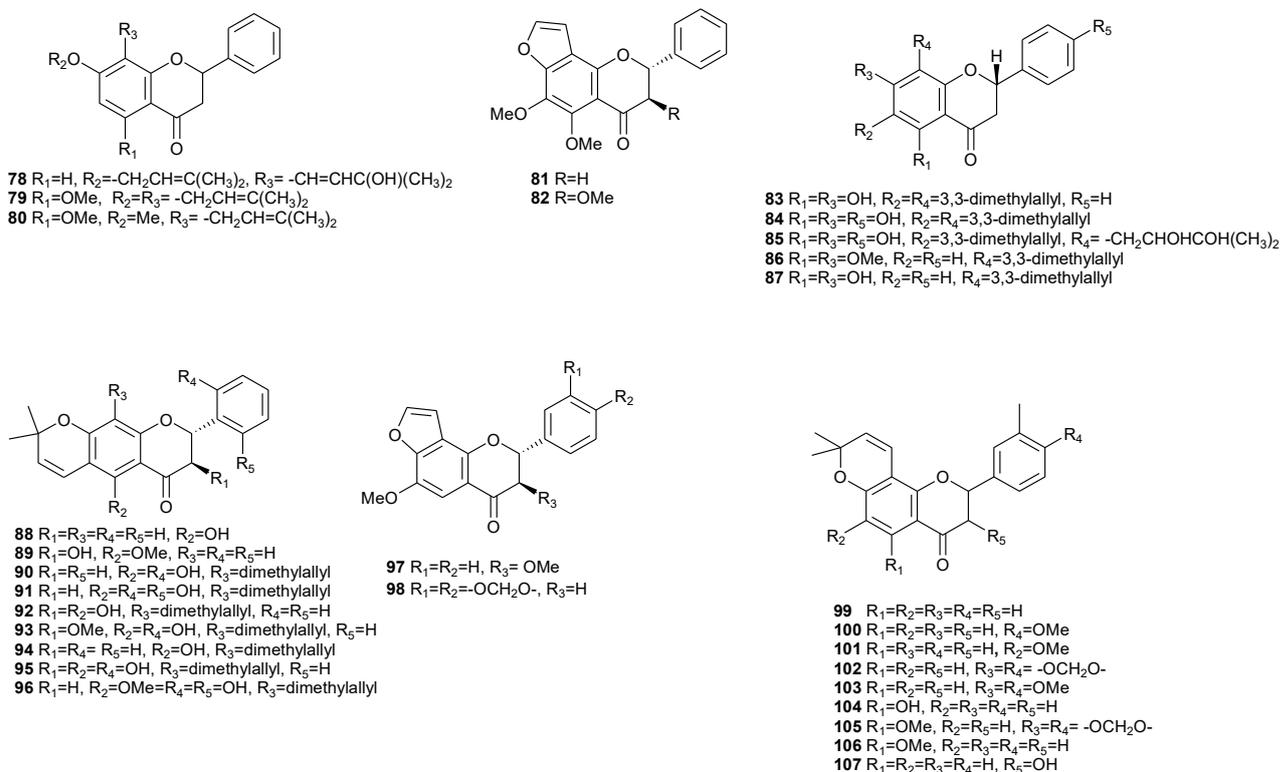


Figura 5. Continuação


 Figura 6. Flavanonas e Flavononóis Isolados do Gênero *Lonchocarpus*

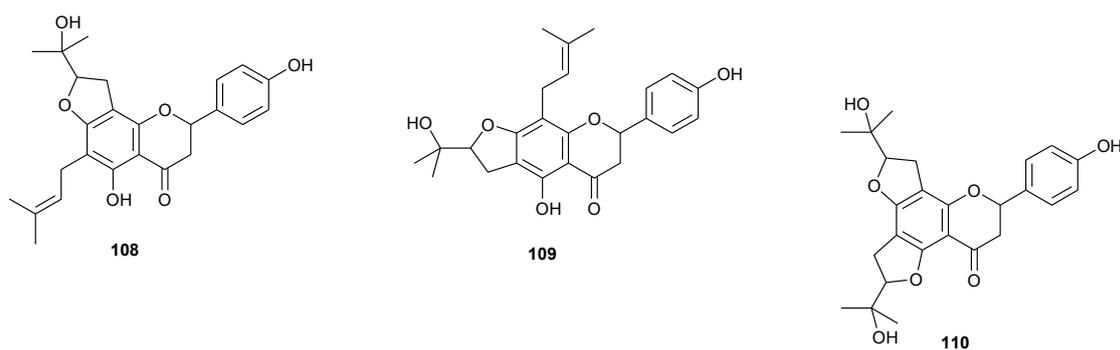
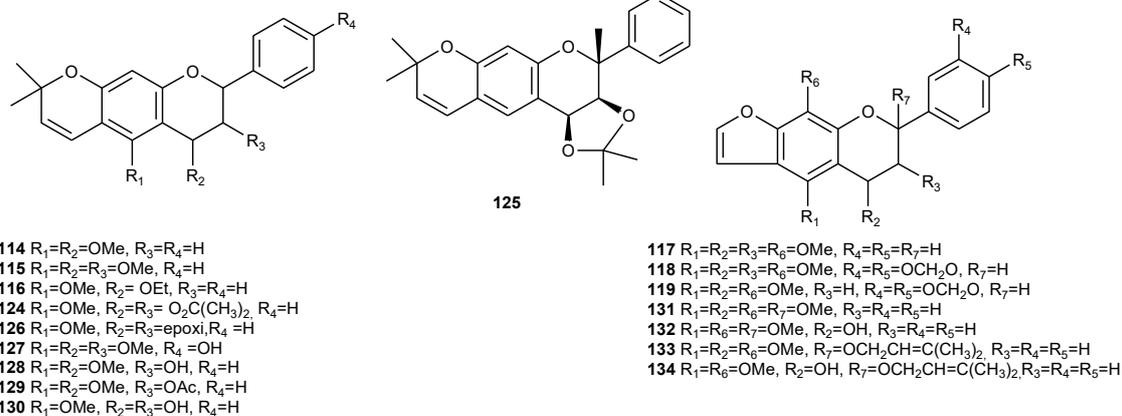
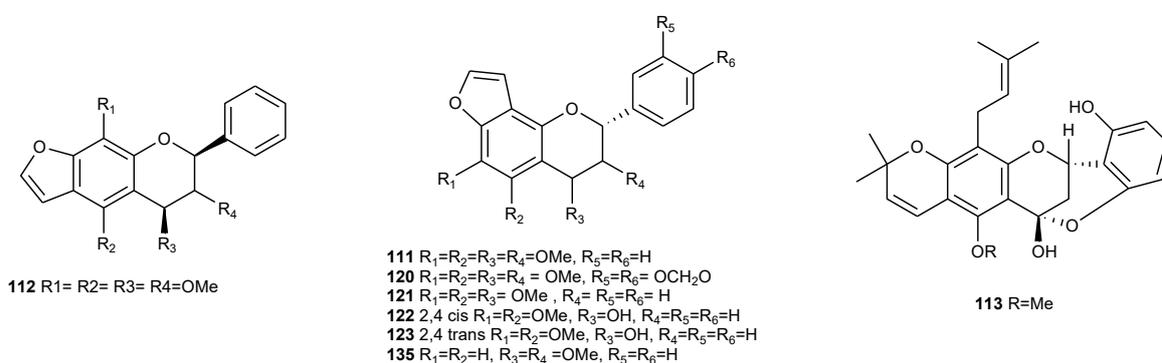


Figura 6. Continuação


 Figura 7. Flavanos e Flavonóis Isolados do Gênero *Lonchocarpus*

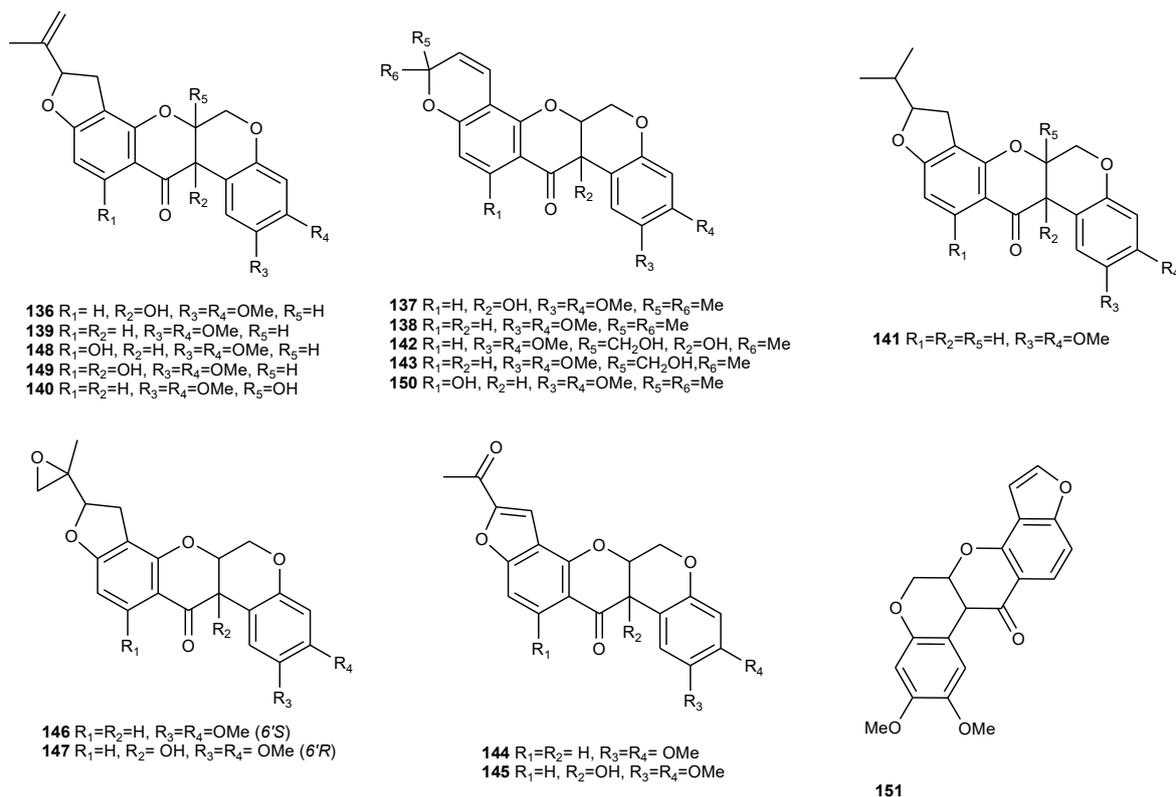


Figura 8. Rotenoides isolados do Gênero *Lonchocarpus*

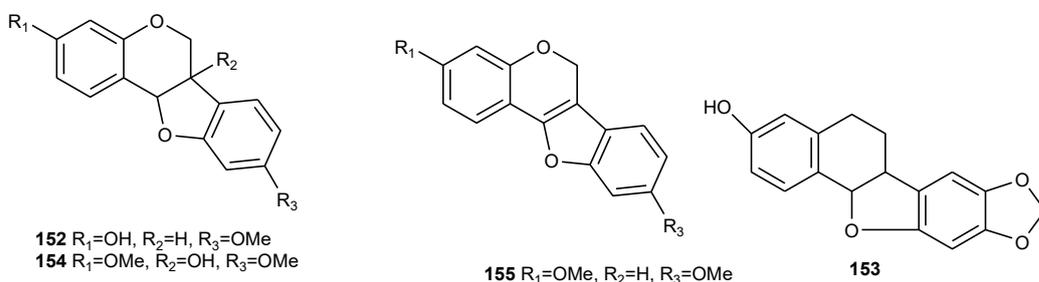


Figura 9. Pterocarpanos Isolados do Gênero *Lonchocarpus*

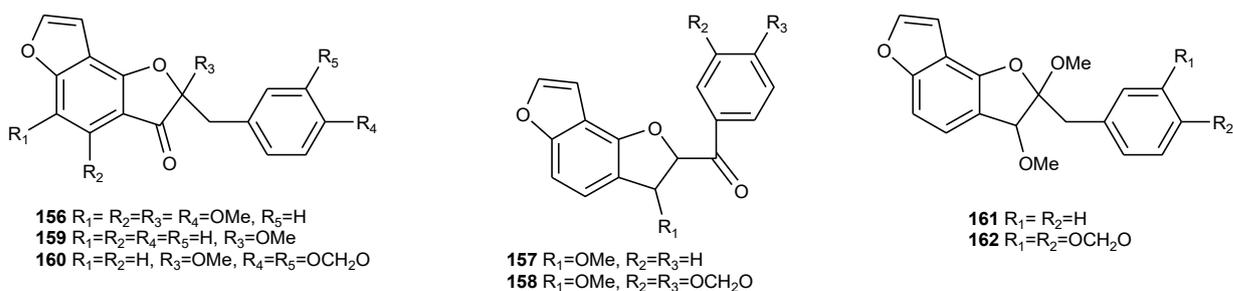
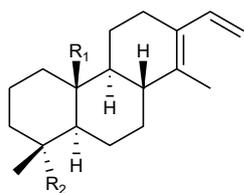


Figura 10. Auronas Isoladas do Gênero *Lonchocarpus*



- 163 R₁=R₂ = COOH
 164 R₁=CHO, R₂=COOH
 165 R₁=COOH, R₂=COOMe

Figura 11. Diterpenoides Isolados do Gênero *Lonchocarpus*

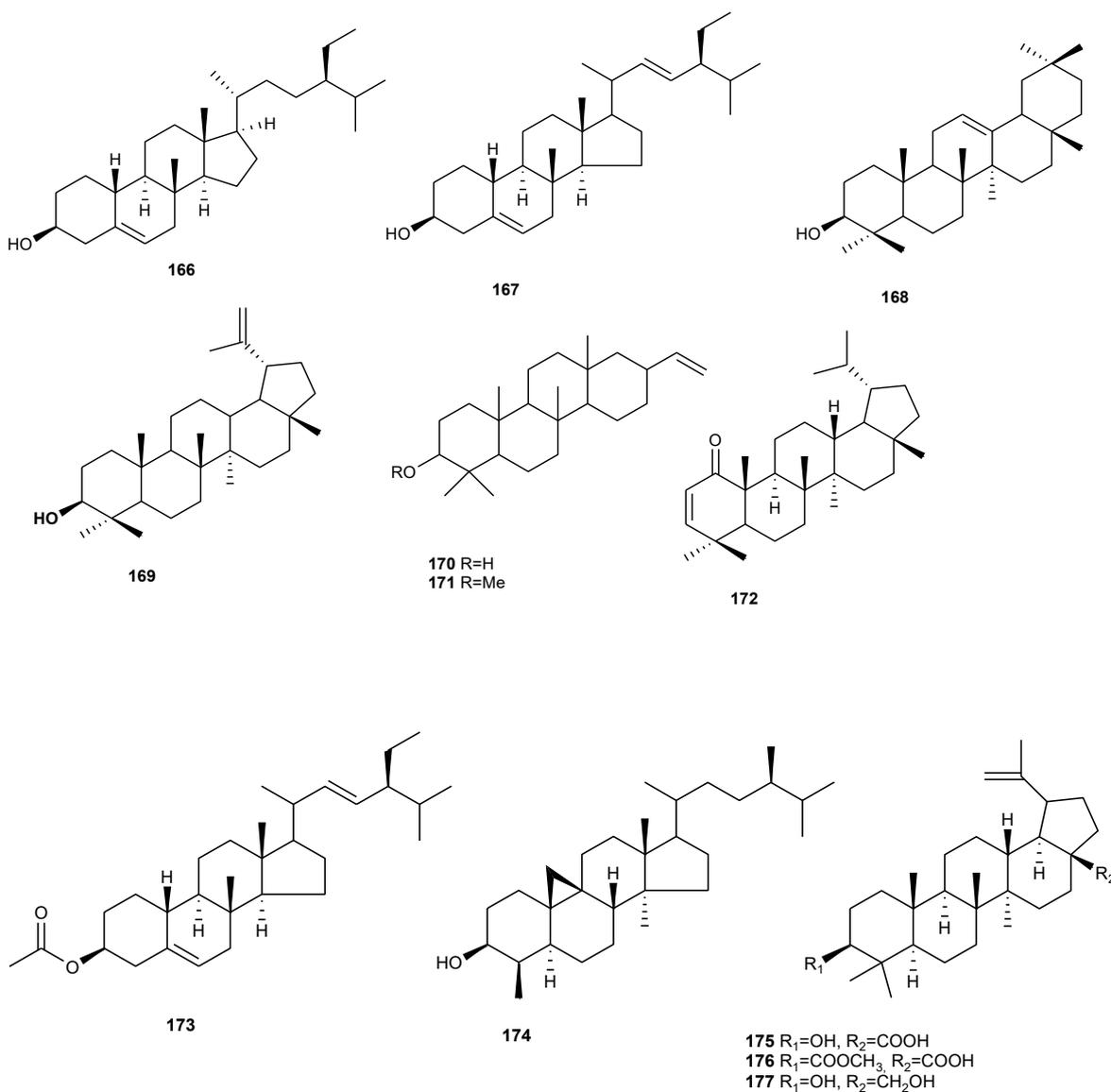


Figura 12. Triterpenoides e Esteroides isolados de *Lonchocarpus*

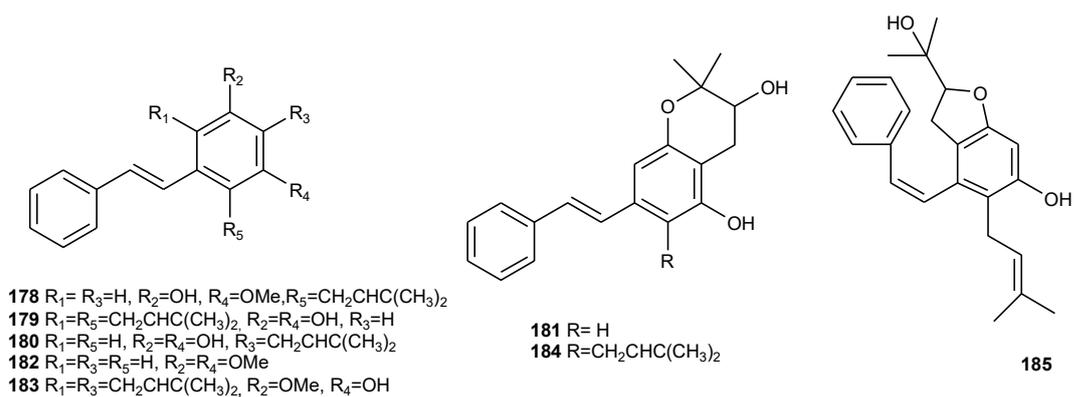


Figura 13. Estilbenos isolados do Gênero *Lonchocarpus*

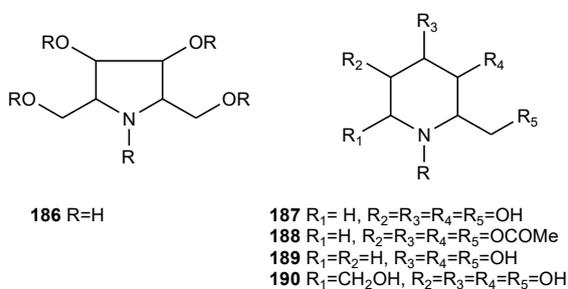


Figura 14. Poliídrolxialcaloides Isolados do Gênero *Lonchocarpus*

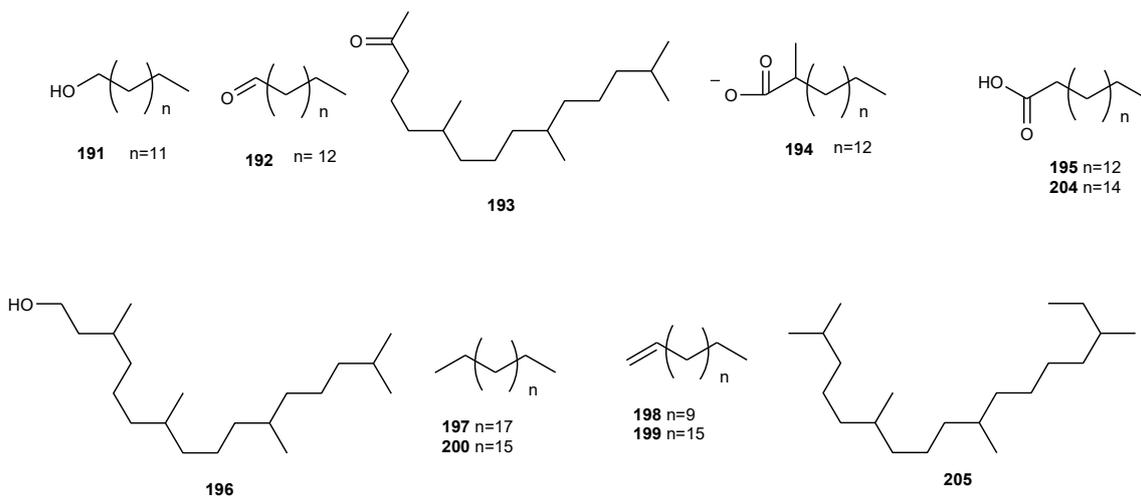


Figura 15. Outras Substâncias isoladas do Gênero *Lonchocarpus*

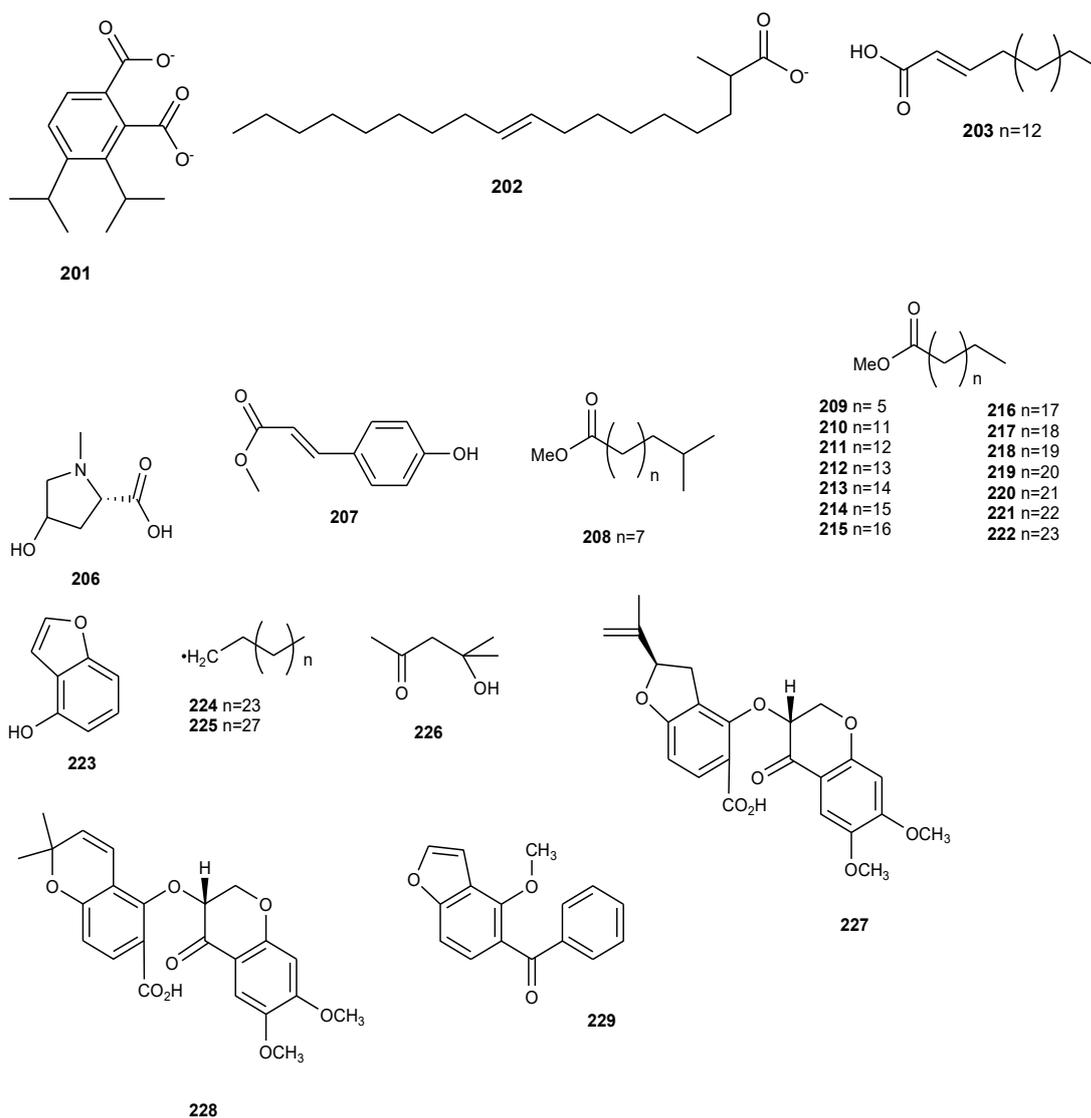


Figura 15. Continuação

1. 2. 2. Atividades Biológicas das Substâncias, Frações e Extratos de Espécies do Gênero *Lonchocarpus*

As principais atividades biológicas encontradas para algumas substâncias isoladas de *Lonchocarpus* estão descritas na Tabela 1, p.19. Dentre as atividades encontradas destacam-se a antimicrobiana, larvicida, gastroprotetora e antitumoral.

2'-methoxy-(2'',3'',4',3')- furanodibenzoilmetano 31		
2'-O-(3,3-dimetilalil)-8- α , α - dimetilalil)-furano-(4'',5'':3'4')- dibenzoilmetano 35		
Jaiacanol 95	Ativo contra o fungo causador do apodrecimento da madeira <i>Postia placenta</i> ;	(Alvez-Solano et al.,2000)
Dihidrosplinocalcona-A 36 Iso-cordoína 37	Induz significativo efeito relaxante de uma maneira dependente da concentração em anéis da aorta de ratos pré-contraídos com noradrenalina;	(Avila-Villarreal et al., 2013)
Sumatrol 148 Rotenona 139 Villosinol 149 12 α -Hidroxirotenona 136 Tefrosina 137 Maackiaina 153	Atividade contra o cancro do pulmão;	(Blatt et al., 2002)
Sumatrol 148	Atividade contra células humanas astrocitoma;	(Blatt et al., 2002)
Rotenona 139	Atividade contra linhas celulares do cancro humano;	(Blatt et al., 2002)
Isoglabracromeno 105	Atividade contra as linhas de células do câncer: do pulmão, de pele, de próstata, carcinoma epidermóide, ovário e neuroblastoma;	(Blatt et al., 2002)
3-metoxi-6-O-prenil- 2'',2''dimetilpirano- (5'',6'':8,7)-flavona 49	Efeito gastroprotetor;	(Campos et al., 2008)
Chiricanina A 180	Efeito antifúngico contra <i>Cladosporium cucumerinum</i> ;	(Ioset et al., 2001)

Longistilina C 178	Propriedades tóxicas contra	(loset et al., 2001)
Longistilina D 179	larvas de <i>Aedes aegypti</i>	
Chiricanina A 180		
3,5-dimetoxistilbeno 182		
Pongamol 10	Atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH	(Santos, 2008)

Na literatura encontram-se também diversos relatos de atividades biológicas em extratos brutos e frações de espécies de *Lonchocarpus*. Fontenele e colaboradores (2005) trabalhando com o extrato em hexano das cascas das raízes de *L. sericeus* mostraram seu efeito inibitório sobre o desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*), atividade antiedematogênica nos modelos de edema de pata induzidos por carragenina, e redução do dano tissular induzido por ácido acético em ratos, evidenciado através de seu efeito inibitório sobre a atividade da mieloperoxidase. Foi verificada também a presença de atividade citotóxica, antiinflamatória, analgésica e antiagregante plaquetária. Estes efeitos podem estar relacionados com a presença das chalconas lonchocarpina e derricina, presentes no extrato.

Garcia e colaboradores (2013) verificaram o efeito alelopático do extrato aquoso de folhas de *L. cultratus* (Vell.) secas em estufa, onde foi observado seu efeito inibitório sobre o crescimento de *Lactuca sativa* (alface).

Gusmão e colaboradores (2002) verificaram a atividade larvicida do extrato em etanol de *L. urucu* sobre a estrutura da matriz peritrófica do mosquito de *Aedes aegypti*. A suspensão aquosa desse extrato mostrou uma $LC_{50} = 17,6 \mu\text{g/mL}$ após 24h de tratamento sobre as larvas do quarto estágio do mosquito.

Alécio e colaboradores (2011) verificaram a atividade fagorepelente de *L. floribundus* do extrato em acetona das raízes. O extrato na concentração de 1% (m/v) reduziu ingestão de folhas pelos indivíduos adultos de *Cerotoma tingomarianus* (praga de maior importância para a cultura do feijoeiro).

Magalhães e colaboradores (2002), verificaram que os extratos em metanol das raízes de *L. cultratus*, *L. latifolius* e *L. subglaucescens*, espécies nativas do Brasil, mostraram atividade citotóxica sobre as larvas de *Artemia salina*. Esse efeito também foi verificado por Santos (2008) nos extratos de éter de petróleo, diclorometano e metanol das cascas e do cerne das raízes de *L. filipes*. O extrato de

éter de petróleo das cascas das raízes de *L. filipes*, também foi ativo contra a bactéria *Rhodococcus equi*.

1. 3. A espécie *Lonchocarpus guilleminianus*

A espécie *L. guilleminianus* apresenta os seguintes nomes populares: embira de porco, embira de sapo, falso timbó, pau de canzil. Possuindo uma altura média de 10 a 18 metros, suas folhas são compostas imparipinadas, sete folíolos com 8 cm de comprimento, suas flores se apresentam em cacho roxo ou róseo, seus frutos são vagens de 4 a 6 cm de coloração marrom claro e possuem 3 a 5 sementes por vagem (Figura 16). Esta árvore é mais encontrada no nordeste de Minas (Vale do Jequitinhonha), região de cerrado. Apresenta uma floração exuberante. Bastante rústica, é mais comum em áreas desmatadas, entre a vegetação rasteira, (árvores do Brasil, informações e estudos sobre árvores nativas brasileiras, disponível em <http://www.arvores.brasil.nom.br/embira1/index.htm>).



Figura 16. *Lonchocarpus guilleminianus*

Fonte: http://www.viveiroflorestal.com.br/produtos_detalhes.php?produto=828

O posicionamento sistemático da espécie *Lonchocarpus guilleminianus* esta descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Enquadramento Taxonômico de *Lonchocarpus guilleminianus*

Enquadramento Taxonômico	
Divisão	Angiospermae
Clado	Eurosídeas I
Ordem	Fabales (em Cronquist (1981) é classificada em Rosales)
Família	Fabaceae (em Cronquist (1981) é classificada em Leguminosae)
Subfamília	Faboideae (Papilionoideae)
Gênero	<i>Lonchocarpus</i>
Espécie	<i>Lonchocarpus guilleminianus</i> (Tul.) Malme
Sinonímia botânica	<i>Lonchocarpus neuroscapha</i> Benth

Fonte: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore

1. 4. A Família Rubiaceae

A família possui distribuição cosmopolita, inclui aproximadamente 550 gêneros e 9000 espécies sendo que no Brasil ocorrem cerca de 120 gêneros e 2000 espécies, está concentrada nos trópicos e corresponde a uma das principais famílias da nossa flora, como um importante componente em quase todas as formações naturais.

Uma das principais espécies de interesse econômico da família é o café (*Coffea arabica*), mas também é a família do jenipapo (*Genipa americana*), do pau mulato (*Calycophyllum spruceanum*) e de várias espécies ornamentais, como o jasmim-do-cabo (*Gardenia jasminoides*), a ixora (*Ixora spp.*), a mussaenda (*Mussaenda spp.*), a pentas (*Pentas lanceolata*) e a serissa (*Serissa foetida*). A família possui espécies daninhas que provocam prejuízos ao setor agropecuário brasileiro, conhecidas popularmente como erva-de-rato, entre elas podemos citar *Borreria*, *Richardia* e *Diodia*, que são espécies causadoras de intoxicação ao gado, pertencentes principalmente aos gêneros *Psycotria* e *Palicourea* (Vinicius, 2000).

A espécie *Psychotria viridis* é muito difundida entre os indígenas e os adeptos do movimento religioso Santo Daime, pois quando é utilizada em associação com o cipó malpighiáceo *Banisteriopsis caapi*, obtém-se uma bebida conhecida como ayahuasca.

Na literatura existem estudos fitoquímicos de representantes desta família que revelam uma grande variedade de metabólitos especiais, tais como iridoides (Moura, 2006), alcaloides (Henriques *et al*, 2004), antraquinonas (Ling *et al*, 2002), lignanas (Silva *et al*, 2006), flavonoides, derivados fenólicos, triterpenos, diterpenos, cumarinas (Luciano *et al*, 2004), etc., possuindo um significativo potencial biológico. A *Uncaria tomentosa* espécie da família e conhecida popularmente como unha de gato utilizada no tratamento de reumatismo e artrite, por conseguinte as espécies dessa família são amplamente utilizadas na medicina popular e na fabricação de fitoterápicos.

1. 4. 1. Gênero *Calycophyllum* e espécie *Calycophyllum spruceanum* (BENTH) HOOK F. EX SCHUM.

Segundo Brako & Zaruchi (1993), o gênero *Calycophyllum* está representado por 46 espécies. O nome *Calycophyllum* é derivado do grego κάλυξ (Kalos), que significa bonito e φύλλον (Phyllum) o que significa folha. O nome da espécie *spruceanum* é uma homenagem ao naturalista Inglês, Richard Spruce (1817-1983) (Marieta, 2011).

C. spruceanum apresenta a sinonímia *Eukylista spruceana* Benth., e os seguintes nomes populares: pau-mulato-da-várzea, pau-mulato, mulateiro, mulateiro-da-várzea, escorrega-macaco, pau-marfim e capirona. Sua distribuição geográfica é principalmente na Região Amazônica e a sua altura é em média de 20 a 35 m.

✓ Características morfológicas

Um tronco retilíneo e esguio, ramificado apenas na ponta, com casca fina de coloração esverdeada quando nova, tornando-se marrom ou castanho-escuro (Figura 17); seu tronco descasca anualmente em longas tiras, deixando exposta a camada interna avermelhada e sua textura lisa, com aparência de ter sido envernizada. Pode atingir de 20 a 30 metros de altura com caule extremamente decorativos, por apresentar essas qualidades tornou-se uma das melhores

opções de plantio em alamedas na entrada de propriedade, uma das mais famosas alamedas plantadas com essa árvore da família das rubiáceas esta localizada no Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

✓ Flores

São aromáticas, branco-esverdeadas, de 10-12 mm de comprimento.

✓ Frutos

Trata-se de uma cápsula elipoidal deiscente de 10 mm de comprimento, pelos esparsos e duas valvas, suas sementes aladas muito pequenas, de cor parda escura e dispersa pelo vento. As sementes começam a germinar em 20-40 dias e o índice é baixo. As mudas ficam prontas para o plantio em local definitivo entre 7 a 8 meses. O desenvolvimento das plantas no campo é moderado, o tronco rebrota com facilidade. O seu período de florescimento e frutificação acontece durante os meses de junho-julho, já a maturação dos frutos ocorre nos meses de outubro-novembro.

Por possuir uma madeira pesada, dura, resistente à deterioração e de fácil manuseio possui significativa aplicabilidade sendo empregada em molduras, artigos torneados, cabos de ferramentas, raquetes de tênis e ping-pong, vigas, caibros, esquadrias, pisos, compensados, construção naval e lenha. É uma árvore extremamente ornamental, empregada na formação de aléias, alamedas e cercas vivas e indicada para plantio misto em áreas ciliares degradadas.

Suas principais propriedades medicinais são: a cicatrizante, a antimicótica, a antibacteriana, a antioxidante, a antiparasítica, a repelente e a inseticida, sendo empregada inclusive em cosméticos (Santos et al, 2016)



Figura 17. *Calycophyllum spruceanum*

Fonte: <http://www.safarigarden.com.br/muda-de-pau-mulato-calycophyllum-spruceanum>.

Estudos realizados por Zuleta e colaboradores (2003) com a espécie revelaram o isolamento de três seco-iridoides (3, 4 e 5), inéditos à época, juntamente com outros dois iridoides (6 e 7) e 3 seco-iridoides (8, 9 e 10) conhecidos. Todas as substâncias isoladas demonstraram atividade antitripanossômica semelhantes à da secologanina (11) (Figura 18).

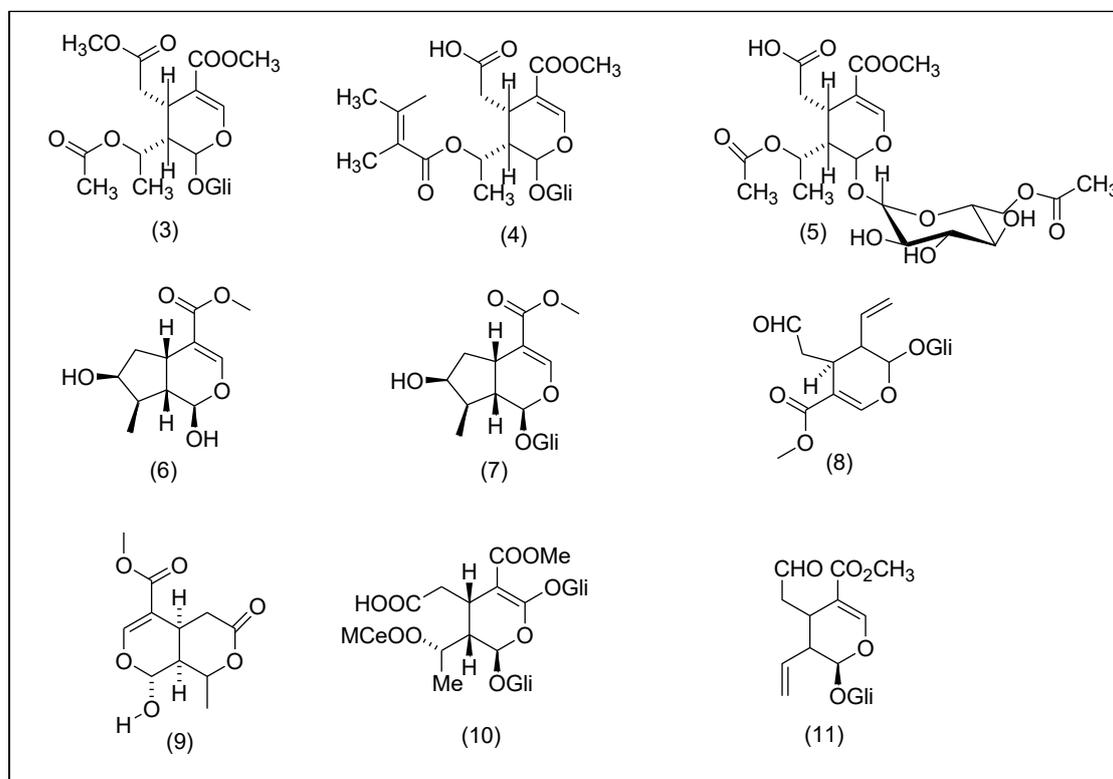


Figura 18. Estrutura de seco-iridoides e iridoides isolados de *Calycophyllum spruceanum*

1. 5. Referências Bibliográficas

ALAVEZ-SOLANO, D.; REYES-CHILPA, R.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; GÓMEZ-GARIBAY, F.; CHAVEZ-URIBE, I.; SOUSA-SÁNCHEZ, M. (2000). Flavanones and 3-hydroxyflavanones from *Lonchocarpus oaxacensis*. *Phytochemistry*, 55: 953-957.

ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; VASCONCELOS, A. A.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R. (2009). Chalconas isoladas da casca da raiz de *Lonchocarpus sericeus*, Resumo, 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

ALÉCIO, M. R.; FAZOLIN, M.; JÚNIOR, V. F. V.; ESTRELA, J. L. V.; ALVES, S. B. S.; NETO, R. C. A.; PAIVA, F. F.G.; MONTEIRO, A. F. M.; DAMACENO, J. E. O.; CAVALCANTE, A. S. S. ; ALBUQUERQUE, E. S.; OLIVEIRA, P. A. (2011) Ação inseticida do extrato de *Lonchocarpus floribundus* Benth para *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). Embrapa Acre, Resumo em anais de congresso (ALICE).

ALEXANDRE, B., MARCO, A. C., CARNEIRO, F. M. S., MOREIRA, J. O. S. (1998). Nodulação em Leguminosas Florestais em Viveiros no Sul de Minas Gerais, *Cerne* 1 (4): 145-153.

AVILA-VILLARREALA, G.; HERNÁNDEZ-ABREUA, O.; HIDALGO-FIGUEROA, S.; NAVARRETE-VÁZQUEZA, G.; ESCALANTE-EROSAB, F.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M.; VILLALOBOS-MOLINAC, R.; ESTRADA-SOTOA, S. (2013). Antihypertensive and vasorelaxant effects of dihydrospinochalcone-Aisolated from *Lonchocarpus xuul* Lundell by NO production:Computational and ex vivo approaches. *Phytomedicine*, 20: 1241– 1246.

BIRCH, N.; CROMBIE, L.; CROMBIE, W. M. (1985). Rotenoids of *Lonchocarpus salvadorensis*: their effectiveness in protecting seeds against bruchid predation. *Phytochemistry*, 24, (12), 2881-2883.

BLATT, C. T. T.; CHÁVEZ, D.; CHAI, H.; GRAHAM, J. G.; CABIESES, F.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M. A.; KINGHORN, D. (2002). Cytotoxic Flavonoids from the Stem Bark of *Lonchocarpus aff.fluvialis*. *Phytotherapy Research*, 16: 320-325.

BORGES-ARGÁEZ, R.; DÍAZA M. E. P.; WATERMAN, P. G.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. (2005). Additional Flavonoids from *Lonchocarpus yucatanensis* and *L. xuul*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 16 (5):1078-1081.

BORGES-ARGÁEZ, R.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M.; WATERMAN, P. G. (2000). Flavonoids from the stem bark of *Lonchocarpus xuul*. *Phytochemistry* 54: 611-614.

BORGES-ARGÁEZ, R.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M.; WATERMAN, P. G. (2002). Flavonoids from two *Lonchocarpus* species of the Yucatan Peninsula. *Phytochemistry* 60:533–540.

BRAKO, LOIS. ZARUCHI, JAMES. (1993). Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru. Missouri, US. *Missouri Botanical Garden*. 1286 p.

CAMPOS, D. A.; LIMA, A. F.; RIBEIRO, S. R. L.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. (2008). Gastroprotective effect of a flavone from *Lonchocarpus araripensis* Benth. (Leguminosae) and the possible mechanism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60: 391– 397.

CAVALCANTE, M. G. B.; SILVA, R. M.; BANDEIRA, P. N.; SANTOS, H. S. PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R. (2012). Furanoflavones and other Chemical Constituents of *Lonchocarpus obtusos*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 23 (2): 301-305.

DE ANDRADE CUNHA, G. M.; FONTENELE, J. B.; NOBRE JUNIOR, H. V.; DE SOUSA, F. C. M.; SILVEIRA, E. R.; NOGUEIRA, N. A. P.; MORAES, M. O.; VIANA, G. S. B.; COSTA-LOTUFO, L. V. (2003). Citotoxic Activity of Chalcones isolated from *Lonchocarpus sericeus* (Pocr.) Kunth. *Phytotherapy Research*., 17: (2), 155-159.

DE OLIVEIRA, J. C. S., DAVIDA, J. M., DAVID, J. P. (2016). Composição química das cascas das raízes e flores de *poincianella pyramidalis* (fabaceae). *Química nova*, Vol. 39, Nº. 2, 189-193.

FERNANDES, J. M. (2007). Taxonomia e etnobotânica de leguminosae Adans. em fragmentos florestais e sistemas agroflorestais na zona da mata mineira. 240 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa.

FONTENELE, J. B.; LEAL, L. K. A. M.; FERREIRA, M. A. D.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, G. S. B.; (2005), Antiplatelet effect of lonchocarpin and derricin isolated from *Lonchocarpus sericeus* .*Pharmaceutical Biology*. 43, 726.

FONTENELE, J. B. (2004). Estudo Farmacológico da Fração Hexânica de *Lonchocarpus sericeus* (poir.) kunth e seus Constituintes Químicos, Lonchocarpina e Derricina. Tese de doutorado em farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

GARCIA, L. M.; PASTORINI, L. H.; SOUZA, L. A. (2013). Efeito Alelopático do Extrato Aquoso de *Lonchocarpus cultratus* (fabaceae) sobre a germinação de *lactuca sativa* (asteraceae). Resumo 64º Congresso Nacional de Botânica.

GUSMÃO, D.S.; PÁSCOA, V.; MATHIAS, L.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, F. J. A. (2002) Derris (*Lonchocarpus*) urucu (*Leguminosae*) Extract Modifies the Peritrophic Matrix Structure of *Aedes aegypti* (*Diptera: Culicidae*). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 371-375.

HARBONER, J.B. (1981). chemataxonomy of the leguminosae. ed. academic press inc. (london) ltd.

http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore (acesso em 13/06/2012)

<http://www.arvores.brasil.nom.br/embira1/index.htm> (Acesso em 10/07/2015).

<http://www.safarigarden.com.br/muda-de-pau-mulato-calycophyllum-spruceanum> (acesso em 13/02/2017).

http://www.viveiroflorestal.com.br/produtos_detalhes.php?produto=828(acesso em 02/03/2017).

IGOLIA, J. O.; ONYIRIUKAB, S. O.; LETZELC, M. C., NWAJIB, M. N.; GRAY, A. I. (2008). Cassane diterpenoids from *Lonchocarpus laxiflorus*. *Natural Product Communications*. 3 (1): 5-10.

IOSET, J.; MARSTON, A.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. (2001). Five New Prenylated Stilbenes from the Root Bark of *Lonchocarpus chiricanus*. *Journal of Natural Products*, 64: 710-715.

KHAOMEK, P.; ICHINO, C.; ISHIYAMA, A.; SEKIGUCHI, H.; NAMATAME, M.; RUANGRUNGSI, N.; SAIFAH, E.; KIYOHARA, H.; OTOGURO, K.; OMURA, S.; YAMADA, H.; (2008). In vitro antimalarial activity of prenylated flavonoids from *Erythrina fusca*. *Journal of Natural Medicines.*, 62, 217.

LAWSON, M. A.; KAUUADJI, M.; CHULIA, A. J. (2008) A Single Chalcone and Additional Rotenoids from *Lonchocarpus nicou*. *Tetrahedron letters*. 49, 2407.

LAWSON, M. A.; KAUUADJI, M.; ALLAIS, D. P.; CHAMPAVIER, Y.; CHULIA, A. J. (2006) Substituted tubaic acids, new oxidative rotenoid metabolites from *Lonchocarpus nicou*. *Tetrahedron letters*. 47, 451-454.

LEWIS, G.P., SCHRIRE, B., MACHINDER, B. & LOCK, M. (2005). Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew.

LIMA, A. F.; FERREIRA, D. A.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R. (2014). Flavonoides de *lonchocarpus araripensis* (leguminosae) - Isolamento, Atribuição Inequívoca dos Sinais de RMN ^1H e ^{13}C e Análise Conformacional. *Química Nova* XV:00.

LIMA, A. F.; MILEO, P. G. M.; ANDRADE-NETO, M.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. P.; (2009). ^1H and ^{13}C assignments of new methoxylated furanoflavonoids from *Lonchocarpus araripensis*., *Magnetic Resonance in Chemistry*., 47, 16.

LIMA, A. F.; FERREIRA, D. A.; MONTE, F. J. Q. BRAZ-FILHO, R. (2014). Flavonoids from *Lonchocarpus araripensis* (Leguminosae): Identification and Total ^1H and ^{13}C Resonance Assignment. *American International Journal of Contemporary Research* 4(2).

LING, S-K.; LOMORITA, A.; TANAKA, T.; FUJIOKA, T.; MIHASHI, K.; KOUNO, (2002). Iridoids and Anthraquinones from the Malaysian Medicinal Plant, *Saprosma scortechinii* (Rubiaceae). *Chem. Pharm. Bull.* v. 50, n. 8, p. 1035-1040.

LUCIANO, J. H. S.; LIMA, M. A. S.; SOUZA, E. B.; SILVEIRA, E. R. Chemical constituents of *Alibertia myrciifolia* Spruce ex K. Schum. (2004). *Biochemical systematics and ecology*. v. 32, p. 1227-1229.

MAGALHÃES A. F.; RUIZ, A. L. T.G.; TOZZI, A. M. G.A., MAGALHÃES, E. G. (1999). Dihydroflavonols and Flavanones from *Lonchocarpus atropurpureus* Roots. *Phytochemistry*.52: 1681- 1685.

MAGALHÃES, A. F.; SANTOS, C. C.; MAGALHÃES, E. G.; NOGUEIRA, M. A. (2002). Detection of Polyhydroxyalkaloids in *Lonchocarpus* Extracts by GC-MS of Acetylated Derivatives. *Phytochemical Analysis*, 13:215-221.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; MAGALHÃES, E. G.; BLANCO, I. S.; SORIANO, M. D.P. C. (2004). Flavonoids from *Lonchocarpus muehlbergianus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 76(4): 651-661.

MAGALHÃES A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; MAGALHÃES, E. G.; NOGUEIRA, M. A.; QUEIROZ, S. C.N. (2000). Flavonoids from *Lonchocarpus latifolius* roots. *Phytochemistry* 55: 787-792.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M.G.A.; MAGALHÃES, E.G.; SANNOMIYA, M.; SORIANO, M. D. P. C.; PEREZ, M. A. F. (2007). Flavonoids of *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo and biological activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 79:3.

MAGALHÃES A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; SALES, B. H. L. N.; MAGALHÃES, E. G. (1996). Twenty-three Flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens*. *Phytochemistry*, 42(5): 1459-1471.

MARIETA, P. de L. D. (2011). Flora Mato Grossense: Motivação dos nomes científicos. Universidade Federal de Mato Grosso. UFMT/Campus de Cinop. Vol.16, ano: 35, nº2.

MONACHE, F. D.; SUAREZ, L. E. C.; MARINI-BETTOLO, G.B. (1978) Flavonoids from the seeds of six lonchocarpus species. *Phytochemistry*, 17: 1812-1813.

MORONKOLA, D. O.; OLADOSU, I. A. (2013). Chemical Compositions of *Lonchocarpus cyanescens* Benth., (Fabaceae) Case Study of Its Volatile Oils, and Two Triterpenoids. *American Journal of Plant Sciences*, 4:1653-1659.

MOURA, V. M.; SANTOS, D. P.; SANTIN, S. M. O. (2006). Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (Rubiaceae). *Química Nova*. v. 29, n. 3, p. 452-455.

PEREIRA, A. S.; SERRANO, M. A. A.; NETO F. R. A.; PINTO, A. C. (2000). Analysis and Quantitation of Rotenoids and Flavonoids in *Derris* (*Lonchocarpus urucu*) by High-Temperature High-Resolution Gas Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 38.

PIRES, A. M. L.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. (2011). Flavonoides de *Lonchocarpus campestris* (Leguminosae). *Química Nova*, 34: 268-271.

REYES-CHILPA, R.; VIVEROS-RODRIGUEZ, N.; GOMEZ-GARIBAY, F.; ALAVEZ-SOLANO, D. (1995). Antitermitic Activity of *Lonchocarpus castilloi* Flavonoids and Heartwood Extracts. *Journal of Chemical Ecology*, 21(4).

ROUSSIS V.; AMPOFO, S. A.; WIEMER, D. F. (1987). Flavanones from *Lonchocarpus minimzflorus*. *Phytochemistry*, 26(8) 2371-2375. (*minimzflorus*) *Pharmaceutica Scientia*, 1(1): 25 – 41.

SANTOS, A.B.; RIBEIRO-OLIVEIRA, J.P.; CARVALHO, C.M.(2016). Sobre a botânica, a etnofarmacologia e a química de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18, 1. p.383-389.

SANTOS, E. L.; COSTA, E. V.; MARQUES, F. A., VAZ, N. P.; MAIA, B. H. L. N.S. (2009). Toxicidade e Atividade Antioxidante de Flavonoides das Cascas das Raízes de *Lonchocarpus filipes*. 32 (9): 2255-2258.

SANTOS, E. L.; (2008). Dibenzoilmetanos de *Lonchocarpus filipes*. Dissertação de mestrado em Ciências da Universidade Federal do Paraná.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (2001). Farmacognosia: da planta ao medicamento 3ed. Editora da UFSC.

SILVA, F. M.; KATO, L.; OLIVEIRA, C. M. A.; SILVA, C. C.; TANAKA, C. M. A.; SOARES, P. R. O.; GUILLO, L. A. (2006) Vallesiachotamina e atividade citotóxica de *Palicourea rigida* Kunth. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ Águas de Lindóia, SP. QB-050.

SILVA, E. M. B. M; SANTIN, S. M. O.; PASTORINI, L. H. (2015). Estudo químico bioguiado das partes aéreas de *lonchocarpus cultratus* visando a determinação e isolamento de substâncias aleloquímicas. Resumo 24º Encontro Anual de Iniciação Científica , 4º Encontro Anual de Iniciação Científica Jr, Universidade Estadual de Maringá.

VINÍCIUS, C.S., HARRI, L. (2000). Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. 2ª Edição, p. 521.

WATERMAN, P. G.; MAHMOUD, E. (1985). Flavonoids from the seeds of *Lonchocarpus costaricensis*. *Phytochemistry*, 24(3): 571-574.

WATERMAN, P. G.; MAHMOUD, E. (1987). Unusual Flavonoids from *Lonchocarpus orotinus* seeds. *Phytochemistry*, 26 (4): 1189-1193.

ZULETA, L. M., CAVALHEIRO, A., SILVA, D., FURLAN, M., YOUNG, M. C. ALBURQUERQUE, S., CASTRO-GAMBOA, I. BOLZANI, V. (2003). Seco-iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae). *Phytochemistry* 64 (2): 549-553.



CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2. Objetivos

2. 1. Objetivos Gerais

O trabalho proposto tem por objetivo contribuir para o conhecimento do perfil químico das espécies *L. guillemianus* e *C. spruceanum*. Assim como, avaliar as atividades antioxidante e biológica de seus extratos e substâncias puras.

2. 2. Objetivos Específicos

- Elaborar extratos brutos, empregando os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e metanol/água;
- Realizar o fracionamento cromatográfico dos extratos;
- Isolar e identificar os metabólitos especiais contidos nas frações, utilizando técnicas cromatográficas clássicas e métodos espectrométricos tais como: UV, IV, EM, RMN de ^{13}C e ^1H uni e bidimensionais;
- Submeter os extratos, frações e substâncias puras a ensaios biológicos, envolvendo a citotoxicidade, frente às larvas de *Artemia salina*, e a atividade antibacteriana (bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Burkholderia* e *Staphylococcus*);
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos brutos, utilizando-se métodos indiretos (redução dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilidrazila e $\text{ABTS}^{\bullet+}$);
- Quantificar o teor de fenóis e flavonoides totais dos extratos brutos.



CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3. 1. Equipamentos e Materiais de Consumo

No processo de extração, fracionamento e purificação foram utilizados os seguintes equipamentos e materiais de consumo:

- Na etapa de extração bem como no fracionamento e purificação os solventes utilizados foram de grau P. A. e procedência Merck, Sigma-Aldrich, Synth e Vetec. Nas análises por RMN utilizou-se solventes deuterados de procedência Cil (Cambridge Isotope Laboratories, Inc).
- Nas separações cromatográficas em coluna, foram utilizadas, sílica gel 60 (0,063-0,200 mm), sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) e sílica gel 60 (0,2 – 0,5 mm) de procedência Merck e Vetec; Diaion HP-20 e XAD-2, procedência Supelco; sílica de fase reversa RP-2 e RP-18, procedência Merck e Sephadex LH-20, procedência Pharmacia.
- Nas análises comparativas através de cromatograma em camada delgada analítica (CCDA) utilizou-se cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ e RP-18 F₂₅₄ ambas de procedência Merck, cromatofolhas de celulose, Merck.
- A revelação das cromatoplasmas foi efetuada através de irradiação com luz na região do ultravioleta em comprimento de onda 254 e 366 nm e/ou com reveladores cromogênicos (vanilina sulfúrica, sulfato cérico, solução alcoólica de cloreto férrico, orcinol sulfúrico).
- O critério de pureza inicial adotado foi à observação de uma única mancha em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA), variando-se a fase móvel e reveladores.
- A concentração dos extratos e frações foi efetuada sob pressão reduzida em evaporador rotativo, Büchi B-480 e Fisatom 802. As soluções aquosas foram liofilizadas em liofilizador Thermo Savant.

- Na obtenção dos pontos de fusão foi utilizado o aparelho manual MQAPF – 301 da Microquímica. O equipamento é composto por uma lupa para acompanhamento da fusão da substância, através do bloco metálico aquecido, sobre o qual é depositada a amostra entre lamínulas.
- Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em pastilhas de KBr grau espectroscópico, com leituras na região de 4000 a 400 cm^{-1} em um espectrômetro IRAffinity-1 Shimadzu.
- Os espectros na região do ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro Bel Photonics 1105 com faixa espectral de 320 -1000 nm e espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu, com varredura entre 200 e 1000 nm com amostras dissolvidas em MeOH ou BuOH ou EtOH em cubetas de 1cm.
- Os espectros de gás acoplados ao massas (CG-EM), foram obtidos em aparelhos GC-MS QP 5050 Shimadzu e CG-MS 5975C Inert XL EI/CI/MS Agilent Technologies. Espectrômetro de massas de alta resolução LCMS-IT-TOF equipado com fonte de ionização por *electronspray*, Shimadzu.
- Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono-13 para as substâncias foram realizados à temperatura ambiente e dissolvidas em metanol ou clorofórmio ou dimetilsufóxido deuterados, empregando-se tetrametilsilano (TMS) como referência. Utilizou-se espectrômetro Bruker Ascend 500 MHz em campo de 500 MHz (RMN ^1H) e 125 MHz (RMN ^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) foram indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).
- Balança analítica, AG-2000, Gehaka;
- Câmara escura com lâmpada de luz ultravioleta (254 e 365nm), Cienlab
- Micropipetas de volume ajustável de 10 a 100 μL – LABMATE;
- Moinho tipo Wiley
- Centrifuga Daiki, modelo 80-2B

3. 2. Reagentes e Solventes Utilizados:

- Acetato de etila;
- Álcool etílico;
- Anidrido acético;
- Cloreto de alumínio hexaidratado;
- Clorofórmio;
- Clorofórmio deuterado;
- Diclorometano;
- Éter etílico;
- Éter de petróleo;
- Hexano;
- Metanol;
- Metanol deuterado;
- N-butanol;
- DMSO (dimetilsulfóxido) deuterado;
- Solução de Sulfato de Cobre (CuSO_4);
- Solução de Cloreto Férrico (FeCl_3);
- Sulfato de Sódio anidro (Na_2SO_4).

O levantamento bibliográfico foi realizado através de pesquisas bibliográficas de periódicos em bibliotecas e sítios disponíveis na INTERNET.

Todos os fracionamentos cromatográficos foram monitorados por cromatografia em camada delgada analítica de sílica gel (CCDA). As cromatofolhas foram observadas sob luz visível e ultravioleta (254 e 365 nm) antes e após revelação com vanilina sulfúrica e ou cloreto férrico. As frações foram reunidas conforme os seus perfis cromatográficos e transferidas para frascos previamente tarados e mantidas em capela de exaustão, para eliminação do solvente remanescente.



CAPÍTULO 4

Estudo Químico de
Lonchocarpus guilleminianus e
Calycophyllum spruceanum

4. Estudo Químico de *L. guilleminianus* e *C. spruceanum*

4.1. Isolamento e Purificação dos constituintes Químicos da Espécie

L. guilleminianus

4. 1. 1. Operações Preliminares

✓ Coleta e Identificação do Material Botânico

A madeira de um espécime de *L. guilleminianus* foi coletada na Reserva Florestal do Vale, em Linhares – ES, onde se encontra uma exsicata de nº 6463 no herbário CVRD (Herbário da Reserva Natural Vale).

✓ Secagem e moagem do material vegetal

A madeira de *L. guilleminianus* após seca a temperatura ambiente foi cortada em pequenos pedaços e moída em moinho de facas tipo Willey. O procedimento resultou em 800 g de material vegetal seco e moído.

4. 1. 2. Preparação dos extratos brutos

O material vegetal seco e moído (800 g) foi submetido à extração por maceração exaustiva em ordem decrescente de polaridade, utilizando os seguintes solventes: hexano, acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol/ água [MeOH/H₂O (8:2)]. As soluções obtidas foram evaporadas em evaporador rotatório, e deixadas em capela de exaustão até peso constante ou então liofilizadas para remoção de traços de água.

O procedimento resultou em 668,4 mg de extrato em hexano (0,08 % da massa do material seco), 4,03 g de extrato em AcOEt (0,5 % da massa do material seco), 13,17 g de extrato em MeOH (1,72 % da massa do material seco), 26,73 g de extrato em MeOH/H₂O (3,34% da massa do material seco). O resumo do procedimento realizado para a obtenção dos extratos esta descrito na Figura 19, p.40.

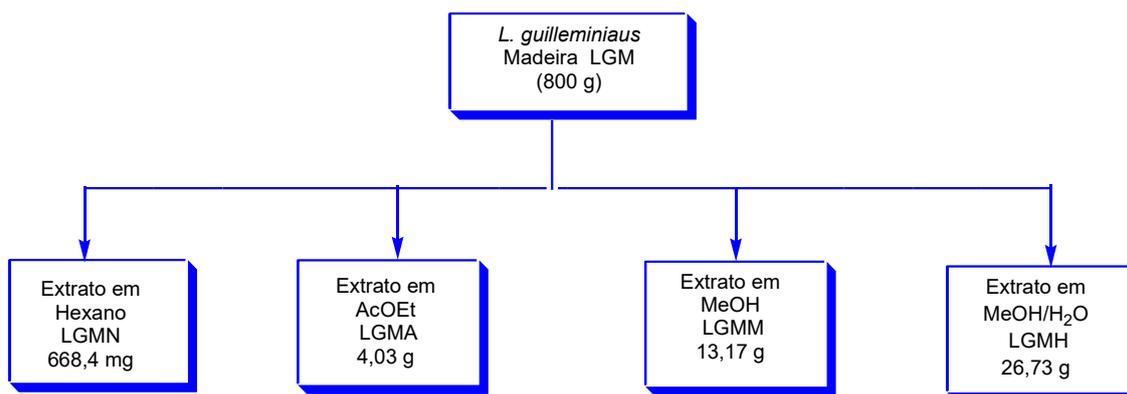


Figura 19. Preparação dos extratos brutos da madeira de *L. guilleminianus*

4. 1. 3. Testes químicos qualitativos para identificação de metabólitos secundários

Teste para identificação de fenólicos em geral, flavonoides e taninos

Visto que o gênero *Lonchocarpus* revela a presença de substâncias fenólicas (Lima et al., 2009; Magalhães et al., 2007, Lawson et al., 2006), preliminarmente ao isolamento e determinação estrutural dos constituintes químicos dos extratos brutos de *L. guilleminianus*, foram realizados testes químicos qualitativos para identificação de fenólicos em geral. Para tal, foram realizados testes com Cloreto Férrico (FeCl_3) e Cloreto de Alumínio (AlCl_3).

✓ **Reação com FeCl_3**

Dilui-se o extrato com água na proporção de 1:5, em seguida colocou-se em tubos de ensaio 5 mL do extrato diluído, adicionou-se pela parede dos tubos 1 gota de cloreto férrico 2%. O desenvolvimento de coloração pode variar entre verde, amarelo castanho e violeta de acordo com o tipo de composto (Mouco, Bernardino & Cornélio, 2003).

✓ **Reação com AlCl_3**

Sobre uma placa de toque, depositou-se em cada cavidade algumas gotas dos extratos AcOEt, MeOH e MeOH/ H_2O . Em seguida, colocou-se em cada cavidade 1 gota de solução de AlCl_3 5% em etanol. Verificou-se o comportamento dos extratos sob a luz ultravioleta. Como padrão utilizou-se o flavonóide quercetina. O aparecimento de fluorescência indica a presença de

substâncias fenólicas e flavonóides em geral (Mouco, Bernardino & Cornélio, 2003).

4. 1. 4. Fracionamento dos extratos brutos e purificação das substâncias de *L. guilleminianus*

4. 1. 4. 1. Tratamento cromatográfico do extrato em MeOH/H₂O da madeira de *L. guilleminianus*

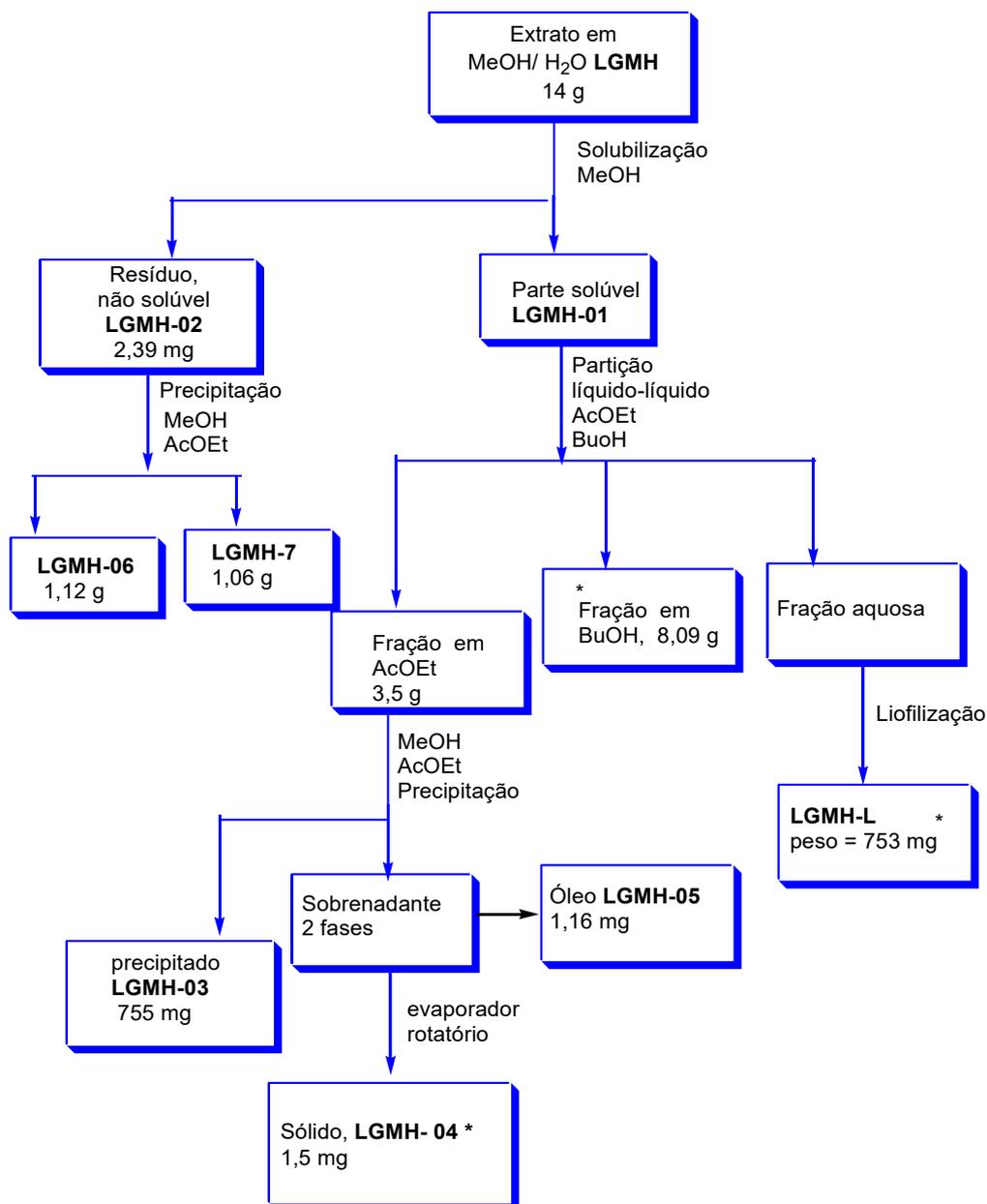
O extrato em MeOH/H₂O da madeira de *L. guilleminianus* foi dividido em duas partes. Uma alíquota de 14,0 g foi ressuspensa em MeOH/H₂O (1:1). Uma parte do extrato não foi solúvel e após um tempo em repouso houve a formação de um precipitado (parte insolúvel, **LGMH-02**) e um sobrenadante (parte solúvel, **LGMH – 01**). O precipitado (**LGMH-02**) foi cuidadosamente separado do sobrenadante através de filtração sobre papel de filtro e deixado em capela de exaustão para evaporação de traços de solventes, originando 2,39 g de material sólido. Em seguida foi adicionado uma mistura de MeOH e AcOEt o que ocasionou em formação de um novo precipitado que foi submetido ao mesmo tratamento descrito anteriormente. O procedimento resultou nas frações **LGMH-06** (precipitado; 1,12 g) e **LGMH-7**, que foi obtida após redução do volume em evaporador rotatório e capela de exaustão até para produzir 1,06 g de material sólido.

A fração **LGMH-01** foi submetida à partição líquido/líquido, com AcOEt e em seguida *n*-butanol (BuOH). Esse procedimento resultou em três frações: as frações orgânicas em AcOEt (3,5 g) e em BuOH (8,09 g) e a aquosa (**LGMH-L**) que foi submetida à liofilização originando 753 mg de material sólido.

A fração em AcOEt foi resolubilizada com uma pequena quantidade de MeOH e em seguida adicionou-se AcOEt até formação de precipitado (**LGMH-03**; 755 mg) que foi cuidadosamente separado do sobrenadante através de filtração em papel de filtro. O sobrenadante obtido apresentou uma fase oleosa mais pesada que a mistura MeOH/AcOEt e que foi separada utilizando-se um funil de separação. A mistura MeOH/AcOEt teve seu volume reduzido em evaporador rotatório e o resíduo de solvente remanescente foi deixado em capela de exaustão até produzir um sólido codificado de (**LGMH-04**; 1,5 g). O

óleo (**LGMH-5**; 1,16 mg) também foi deixado em capela de exaustão para eliminar resíduo de solvente.

O fluxograma resumido do tratamento cromatográfico do extrato em MeOH/ H₂O esta descrito na Figura 20.



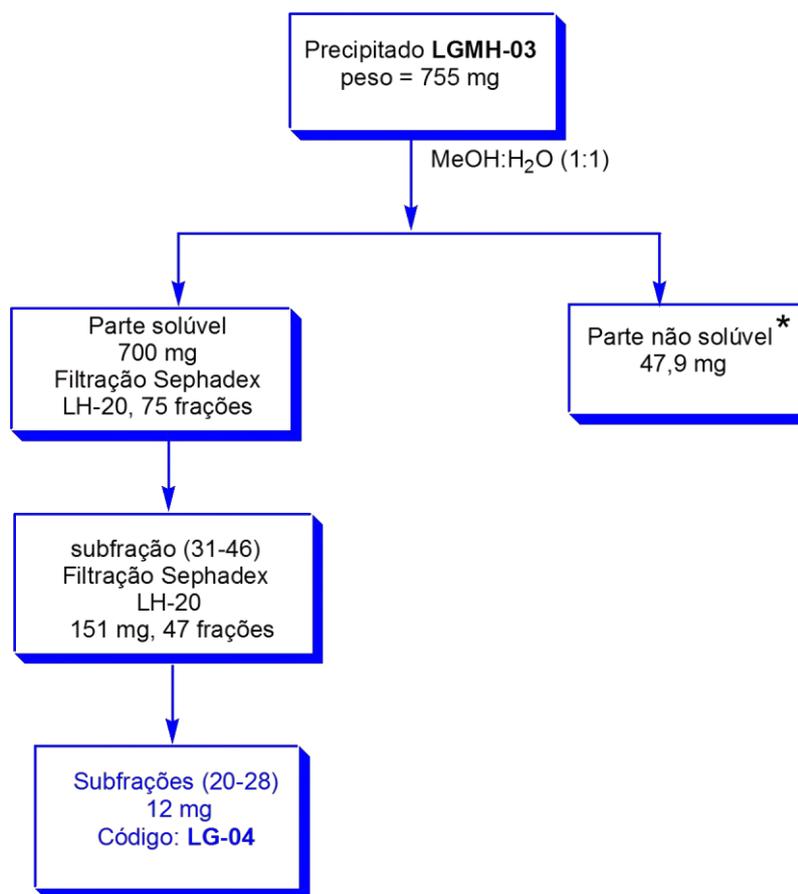
* Frações não trabalhadas devido à complexidade do tratamento cromatográfico em CCDA

Figura 20. Fluxograma resumido do tratamento cromatográfico do extrato em MeOH/H₂O da madeira de *L. guilleminianus*

4. 1. 4. 2. Purificação da Fração LGMH-03

A fração **LGMH-03**; (755 mg) foi adicionada uma mistura de MeOH:H₂O (1:1). O procedimento resultou em duas fases. A parte solúvel teve seu volume reduzido em evaporador rotatório e o resíduo de solvente remanescente foi deixado em capela de exaustão até produzir um sólido (700 mg) que foi submetido à filtração em coluna de vidro empacotada com Sephadex LH-20, utilizando como eluente: MeOH e em seguida MeOH/CHCl₃ (70:30). Esse procedimento resultou em 75 frações que foram reunidas por semelhança de R_f em CCDA.

A subfração (31- 46, 151 mg) foi submetida ao mesmo procedimento anterior resultando em 47 frações, que foram reunidas por semelhança de R_f em CCDA. As frações (20 - 28, 12 mg) apresentaram-se como um sólido amarelo, codificada como **LG-04**. O fluxograma resumido para a obtenção da substância **LG-04**, esta descrito na Figura 21.



* Frações não trabalhadas, devido a dificuldades de solubilização.

Figura 21. Fluxograma resumido de purificação da Fração **LGMH-03**

4. 1. 4. 3. Purificação da Fração LGMH-05

A fração **LGMH-05** (1,16 g) foi submetida à filtração em coluna de vidro aberta empacotada com Sephadex LH-20, utilizando como eluente MeOH e H₂O, em gradiente de polaridade crescente, obtendo-se 86 frações. Após comparação do perfil cromatográfico utilizando CCDA, as mesmas foram reunidas gerando as subfrações (34 – 37; 66,7 mg) que foram submetidas a mesmo procedimento anterior utilizando-se como eluente MeOH. O procedimento resultou em 23 frações que foram reunidas com base na semelhança de R_f em CCDA. As frações 12-17 foram reunidas e codificada como **LG-20** (27 mg). A Figura 22 descreve o procedimento realizado para obtenção da substância **LG-20**.

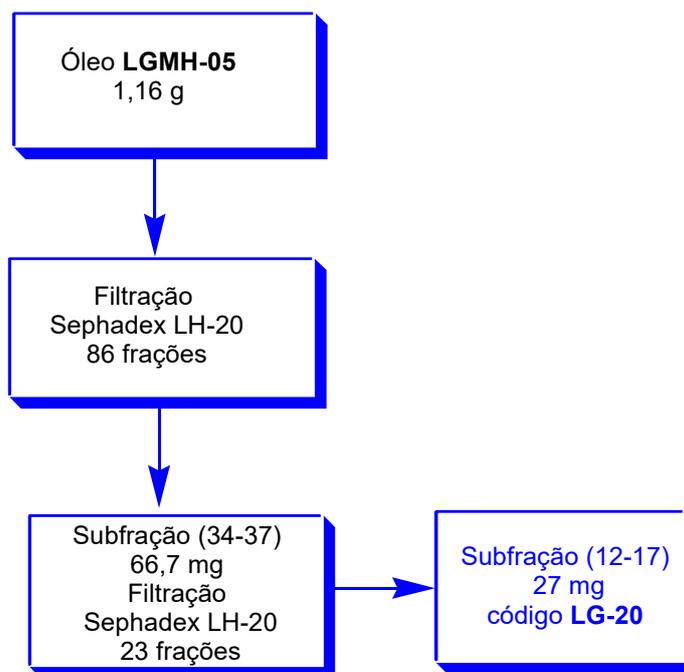


Figura 22. Fluxograma resumido de purificação da Fração **LGMH-05**

4. 1. 4. 4. Purificação da Fração LGMH-7

A fração (**LGMH-7**; 1,06 g), foi submetida à cromatografia líquida de média pressão (MPLC, *Medium Pressure Liquid Chromatography*) segundo o procedimento descrito a seguir: 1,06 g da fração solúvel em MeOH foi dissolvida em 5 mL da mistura CHCl₃: MeOH: n- propanol (PrOH): H₂O, (5:4:1:4). Uma coluna de vidro Buchi (15 mm x 230 mm) empacotada com sílica de fase reversa RP-2 foi condicionada com o sistema de solventes citado acima. A amostra foi injetada na coluna através de um loop de 5 mL de capacidade. A eluição da amostra foi feita com a mesma mistura utilizada na solubilização, com fluxo de 8 mL/min. A detecção das frações foi feita através do detector de UV a 280 nm. Foram coletadas 289 frações de 20 mL que foram reunidas por semelhança de fator de retenção em CCDA.

As subfrações (81-96; 104,3 mg) foram submetidas a filtração em coluna de gel de Sephadex LH-20, utilizando como solvente MeOH. Esse procedimento resultou em 36 frações, após comparação do perfil cromatográfico utilizando CCDA, as mesmas foram reunidas, gerando assim as subfrações (19-25; 26,3 mg). Essa subfração apresentou-se como um sólido branco, porém de difícil visualização em CCDA, por isso uma alíquota foi submetida a uma reação de acetilação, o procedimento para a reação esta descrito abaixo.

- **Reação de acetilação da subfração (19 – 25)**

Preparou-se uma solução de anidrido acético e piridina na proporção (9:1) respectivamente.

A alíquota da subfração (14 mg) foi colocada em um Becker e adicionou-se aproximadamente 2 mL da solução anterior, aqueceu-se levemente a mistura reacional e deixou-se em repouso por uma noite. Após este período adicionou-se água gelada e submeteu-se a extração em funil de separação utilizando AcOEt por três vezes .

A fase orgânica foi lavada com solução de Sulfato de Cobre (CuSO₄) em água, várias vezes para retirar resíduos de ácido e piridina. Em seguida adicionou-se Sulfato de Sódio anidro (Na₂SO₄), seguido de filtração em papel de filtro para retirar resíduos de água.

O solvente do filtrado teve seu volume reduzido em evaporador rotatório e o resíduo deixado em capela de exaustão até produzir 20 mg de derivado acetilado. Este foi submetido à cromatografia em coluna de vidro empacotado com sílica gel 60 (0,063 – 0,2 mm) e utilizado como eluente: CHCl₃, AcOEt e MeOH em ordem crescente de polaridade. Esse procedimento resultou em 26 frações que foram reunidas por semelhança de R_f em CCDA. A subfração (18-20; 7 mg) foi obtida e codificada como **LG-5 Ac**. O fluxograma resumido para a obtenção da substância **LG-5 Ac** esta descrito na Figura 23.

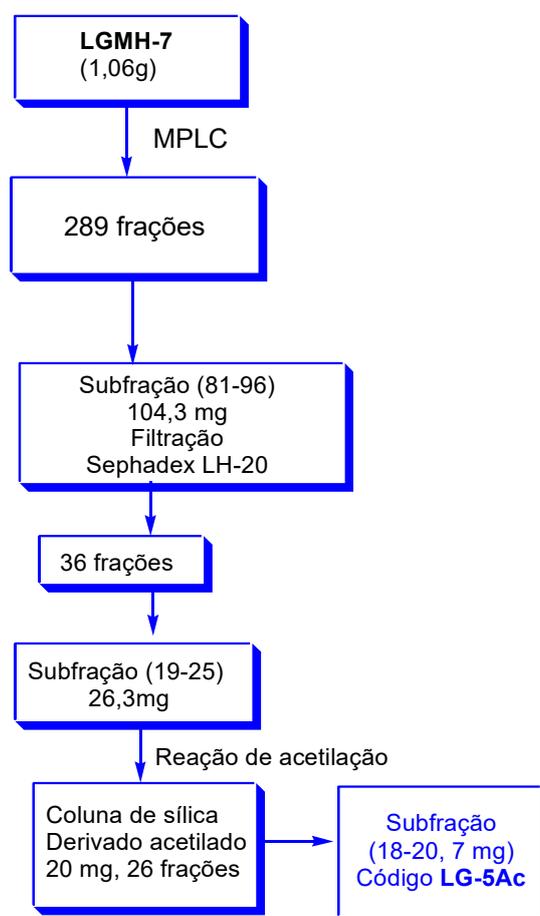


Figura 23. Fluxograma resumido de purificação da Fração **LGMH-7**

4. 1. 4. 5. Purificação da Fração LGMH-06

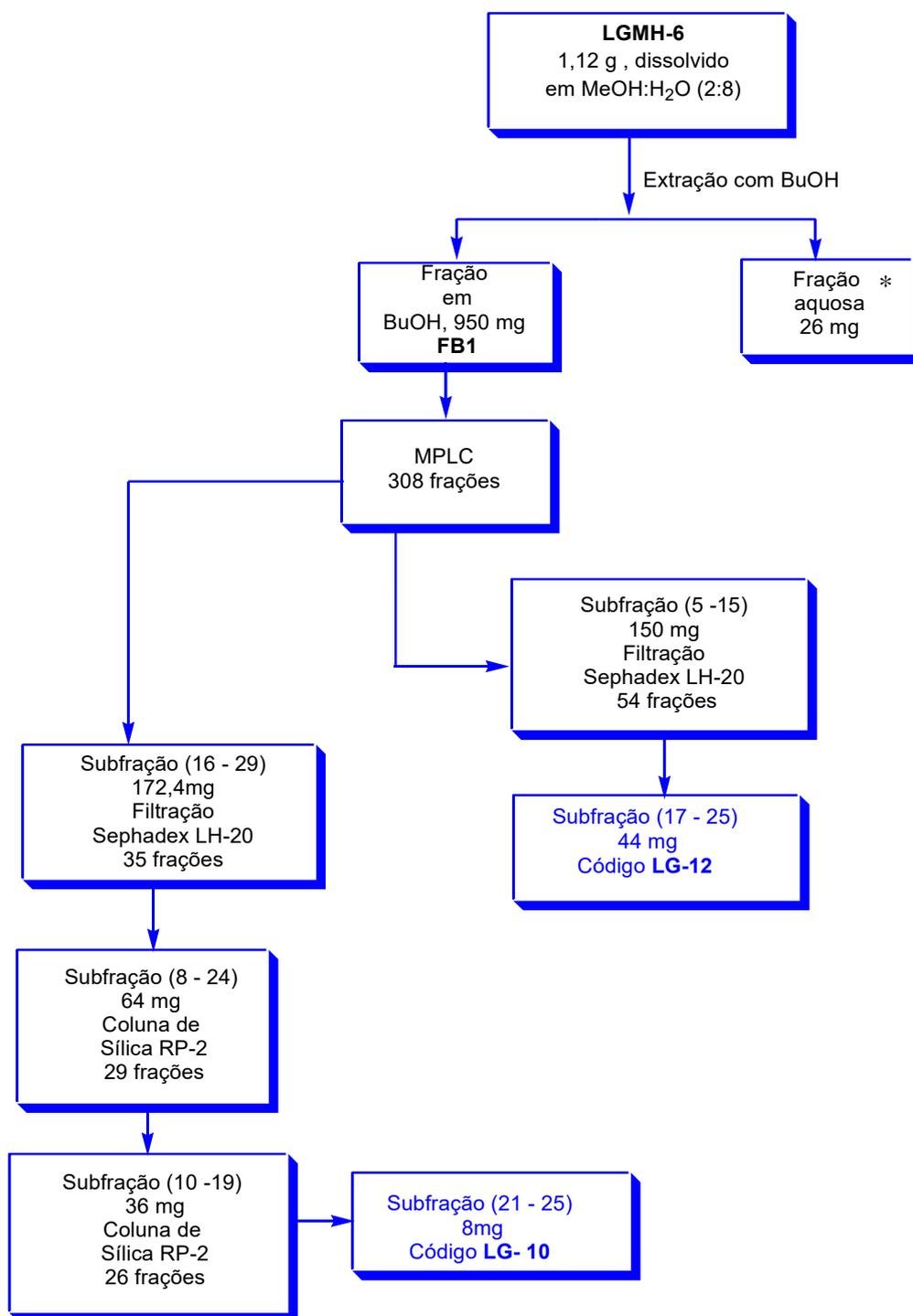
A fração **LGMH-6** (1,12 g) foi dissolvida em MeOH/H₂O (2:8) e em seguida submetida a partição líquido/líquido com n-BUOH.

A fração em BuOH **FB1** teve seu volume reduzido em evaporador rotatório e o resíduo de solvente remanescente foi deixado em capela de exaustão até produzir aproximadamente 1g de material sólido, que foi submetido à cromatografia líquida de média pressão (MPLC, *Medium Pressure Liquid Chromatography*), segundo o procedimento descrito a seguir: 1 g amostra foi dissolvida em 5 mL da mistura MeOH/ H₂O (8:2). Uma coluna de vidro Buchi (15 mm x 230 mm) empacotada com sílica tipo *Flash* (0,04 – 0,063 mm) foi condicionada com o sistema de solventes citado acima. A amostra foi injetada na coluna através de um loop de 5 mL de capacidade. A eluição da amostra foi feita com a mesma mistura utilizada na solubilização da mesma, com fluxo de 8 mL/min. A detecção das frações foi feita através do detector de UV a 280 nm. Foram coletadas 308 frações de 20 mL que foram reunidas por semelhança de R_f em CCDA.

A subfração (16 - 29, 172,4 mg) foi submetida à filtração em coluna de vidro aberta empacotada com Sephadex LH-20, utilizando como solvente MeOH, esse procedimento resultou em 35 frações. As mesmas foram analisadas por CCDA e de acordo com perfil cromatográfico foram reunidas. A subfração (8 - 24; 64 mg) foi submetida a uma coluna de vidro aberta empacotada com sílica de fase reversa RP-2 utilizando como solvente MeOH:H₂O (1:1). Esse procedimento resultou em 29 frações que foram reunidas por semelhança de R_f em CCDA. A subfração (10-19, 36 mg) foi submetida ao mesmo procedimento anterior e resultou em 26 frações que foram reunidas por semelhança de R_f em CCDA. A subfração (21 - 25, 8 mg), apresentou-se como um sólido amarelo, revelando apenas uma mancha em CCDA, e codificado como **LG-10**.

A subfração (5 -15, 150 mg) da MPLC foi submetida à filtração em coluna de vidro aberta empacotada com Sephadex LH-20, utilizando como solvente MeOH, esse procedimento resultou em 54 frações que foram reunidas por semelhança de R_f em CCDA. A subfração (17-25, 44 mg) foi codificada como **LG-12**.

O tratamento cromatográfico realizado com a fração **LGMH-6** para a obtenção das substâncias **LG-10** e **LG-12** esta descrito resumidamente na Figura 24.



* Frações não trabalhadas devido a dificuldades de solubilização da amostra.

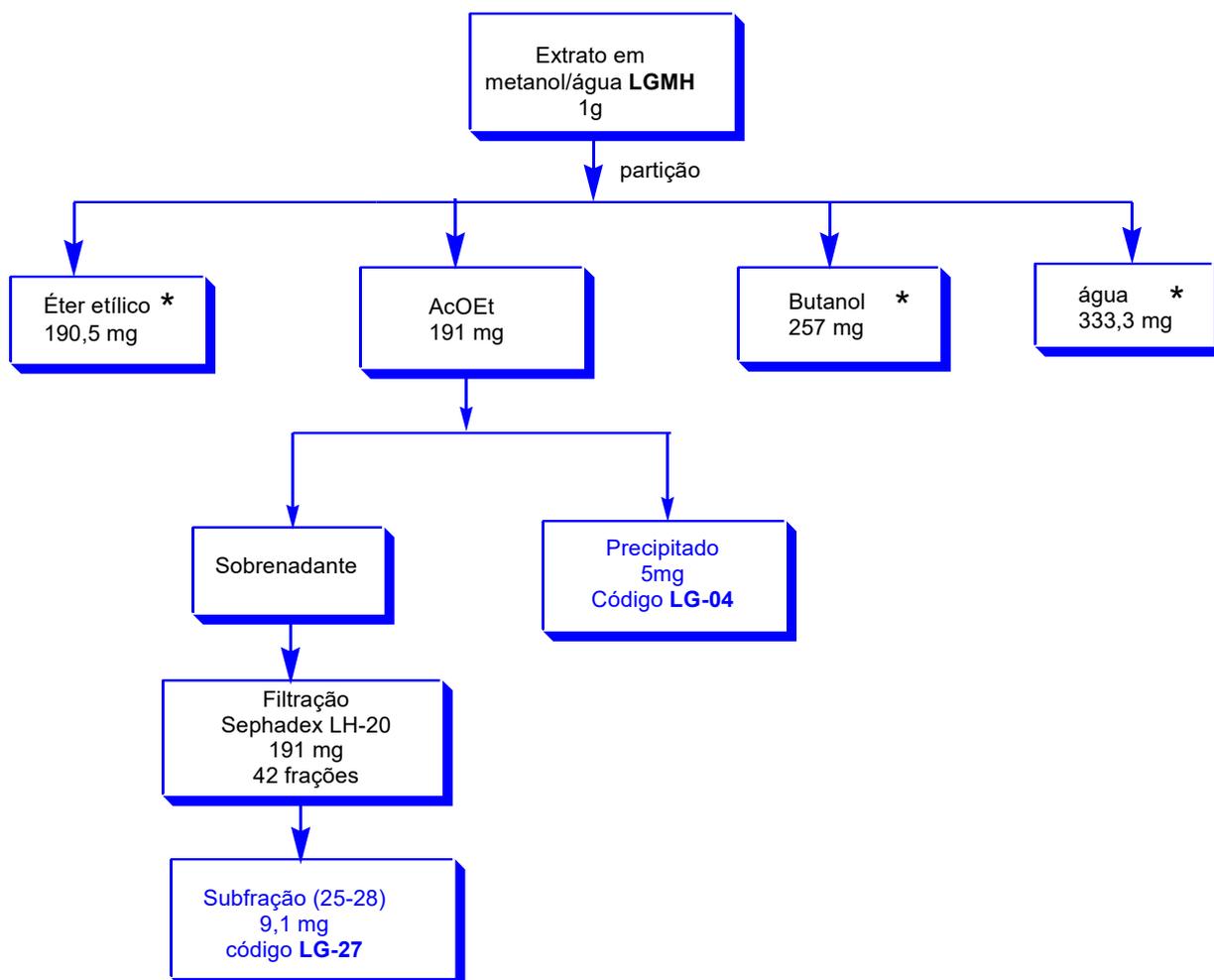
Figura 24. Fluxograma resumido de purificação da Fração **LGMH-06**

Outra alíquota (1g) do extrato em MeOH/H₂O (**LGMH**;) foi solubilizada em MEOH/H₂O (2:8) e submetido a partição líquido/líquido com éter etílico, AcOET e *n*-BuOH.

4. 1. 4. 6. Purificação da Fração em Acetato de Etila

A fração em AcOEt (191 mg) foi solubilizada com MeOH e AcOEt formando um precipitado e produzindo quantidades adicionais da substância **LG-04** (5 mg).

O sobrenadante teve seu volume reduzido em evaporador rotatório e o resíduo de solvente remanescente foi deixado em capela de exaustão até produzir um sólido (191 mg) que foi submetido à filtração em coluna de vidro aberta empacotada com Sephadex LH-20, utilizando como eluente MeOH e CHCl₃ em gradiente de polaridade decrescente. Esse procedimento resultou em 42 frações que foram reunidas por semelhança de R_f em CCDA, produzindo a subfração (25 - 28; 9,1 mg) codificada como **LG-27**. O fluxograma resumido do procedimento experimental para a obtenção das substâncias **LG-27** e **LG-04**, esta descrito na Figura 25, p. 50.



* Frações não trabalhadas devido à complexidade de seu perfil cromatográfico, quando analisadas em CCDA.

Figura 25. Fluxograma resumido de purificação da Fração em Acetato de Etila

4. 1. 5. Tratamento Cromatográfico do Extrato Metanólico de *L. guilleminianus*.

O extrato metanólico de *L. guilleminianus* **LGMM** (2 g), foi dissolvido com *n*-propanol/ água (35:65) e submetido a uma extração líquido-líquido com os seguintes solventes orgânicos: AcOEt e *n*-BuOH (Figura 26).

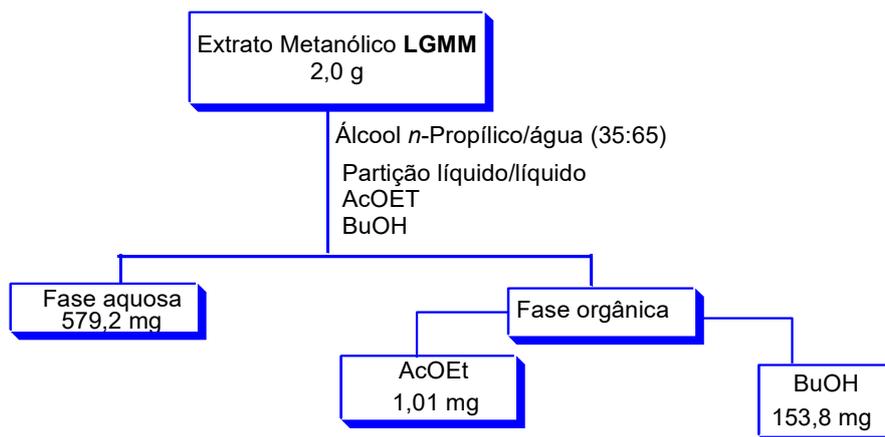


Figura 26. Fluxograma resumido do tratamento cromatográfico do extrato metanólico de *L. guilleminianus*

4. 1. 5. 1. Purificação da fase Aquosa

A fase aquosa (579,2 mg), depois de liofilizada foi submetida a uma coluna de vidro aberta empacotada com DIAION HP-20 e utilizando-se como eluente, gradiente de: água, *n*-propanol e hexano. Esse procedimento resultou em 32 frações que foram reunidas por semelhança de R_f em CCDA. A subfração (21 - 26, 123,9 mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH-20, utilizando como solvente MeOH, esse procedimento resultou em 51 frações que foram reunidas por semelhança de R_f em CCDA, a subfração (48 - 51; 5,6 mg) produziu quantidades adicionais da substância **LG-20**. O fluxograma resumido do tratamento cromatográfico do extrato bruto em MeOH, e consequente isolamento da substância **LG-20**, esta descrito na Figura 27, p. 52.

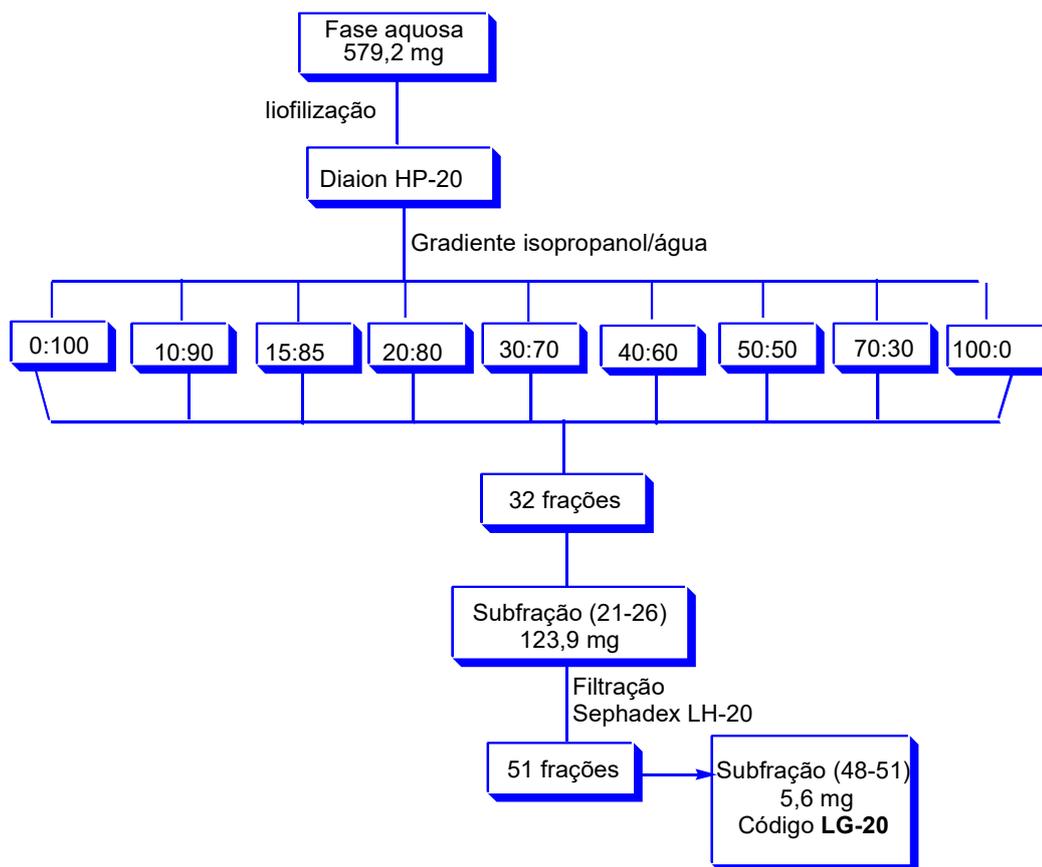
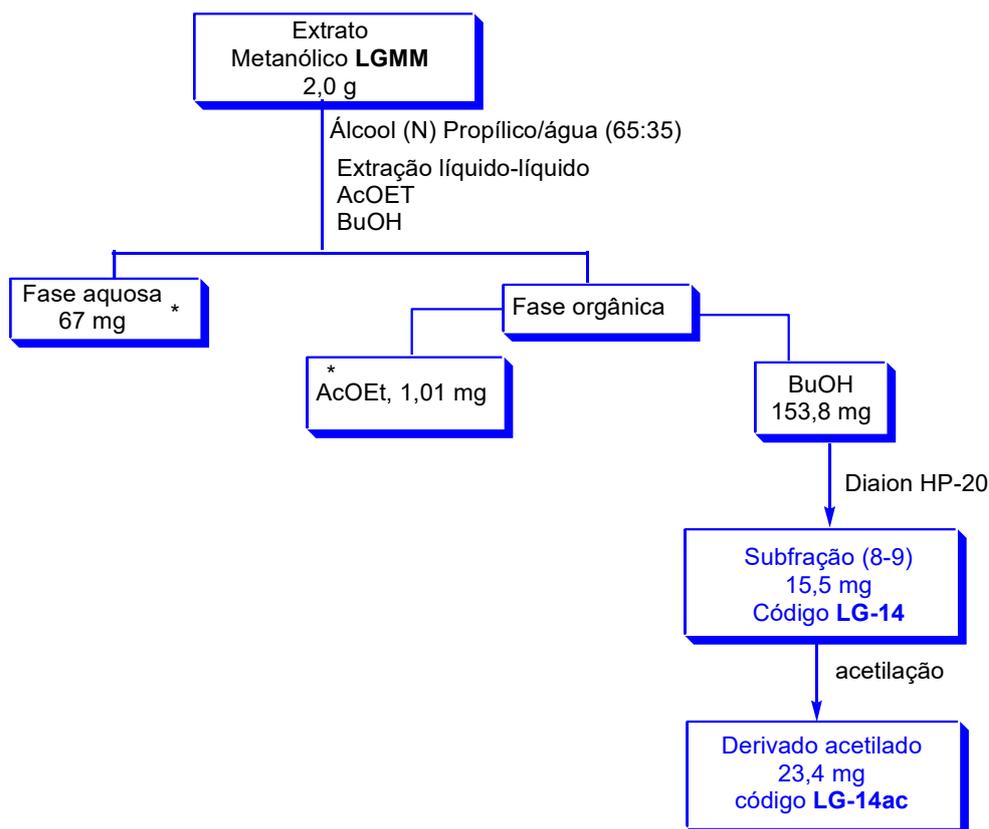


Figura 27. Fluxograma resumido de purificação da fase Aquosa

4. 1. 5. 2. Purificação da fração em BuOH

A fração em *n*-BuOH (153,8 mg) foi submetida a uma coluna de DIAION HP-20, utilizando como solvente: início água e quantidades crescentes de *n*-prOH até 100%. Esse procedimento resultou em 55 frações que foram reunidas por semelhança de *R_f* em CCDA e a subfração (8 - 9, 15,5 mg) foi codificada como **LG-14**. Uma alíquota dessa fração (23,4 mg) foi submetida a uma reação de acetilação conforme o (procedimento descrito no item 4. 1. 4. 4. p. 45.) o derivado acetilado foi codificado como **LG-14 Ac**. O fluxograma resumido para a o isolamento das substâncias **LG-14** e **LG-14 Ac**, esta descrito Figura 28, p. 53.



* Frações não trabalhadas devido à complexidade de seu perfil cromatográfico, quando analisadas em CCDA

Figura 28. Fluxograma resumido de purificação da fração em BuOH

4. 1. 6. Tratamento cromatográfico do extrato em AcOEt da madeira de *L. guilleminianus*

Ao extrato em AcOEt (**LGMA**, 1g), foi adicionado uma mistura de MeOH:H₂O (1:1). Parte do extrato foi solúvel e a outra precipitou. A solução então foi centrifugada e o precipitado (LGMA₁) resultante foi separado do sobrenadante. O sobrenadante foi posteriormente submetido a partição líquido/líquido com os solventes orgânicos CH₂Cl₂, AcOEt e BuOH até produzir as frações em CH₂Cl₂ (**LGMA**₂), AcOEt (**LGMA**₃) e BuOH (**LGMA**₄).

4. 1. 6. 1. Purificação da Fração em AcOEt (LGMA₃)

A fração em AcOEt (95,9 mg), foi submetida a cromatografia em coluna de vidro aberta empacotada com DIAION HP-20 utilizando como solvente H₂O e MeOH em ordem decrescente de polaridade. Esse procedimento resultou em 100 frações, que foram analisadas por CCDA e de acordo com o perfil cromatográfico foram reunidas. As subfrações 9 – 15 (3 mg) produziram quantidades adicionais de **LG-10**.

4. 1. 6. 2. Purificação do Precipitado (LGMA₁)

A **LGMA₁** foi adicionado uma mistura de MeOH/H₂O (x:y) e em seguida procedeu-se a partição líquido/líquido utilizando os seguintes solventes orgânicos: CH₂Cl₂ e AcOEt.

A fração em CH₂Cl₂ (240 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de vidro aberta empacotada com gel de sílica tipo *flash* (0,04 – 0,063 mm) eluída com os solventes orgânicos: CHCl₃, AcOEt e MeOH. Esse procedimento resultou em 54 frações, que foram reunidas por semelhança de R_f em CCDA.

A subfração 1 (55,3 mg) foi submetida ao mesmo procedimento anterior utilizando-se sílica gel 60 (0,063 – 0,2 mm). Esse procedimento resultou em 47 frações que foram reunidas por semelhança de R_f em CCDA. As frações 2 - 11; (8,5 mg), 29 - 30; (16,6 mg) e 40 - 44; (20,4 mg) apresentaram-se como uma única mancha em CCDA e foram codificadas como **LGA1**, **LGA2** e **LGA3** respectivamente.

O fluxograma resumido do tratamento cromatográfico do extrato em AcOEt esta descrito na Figura 29, p. 55.

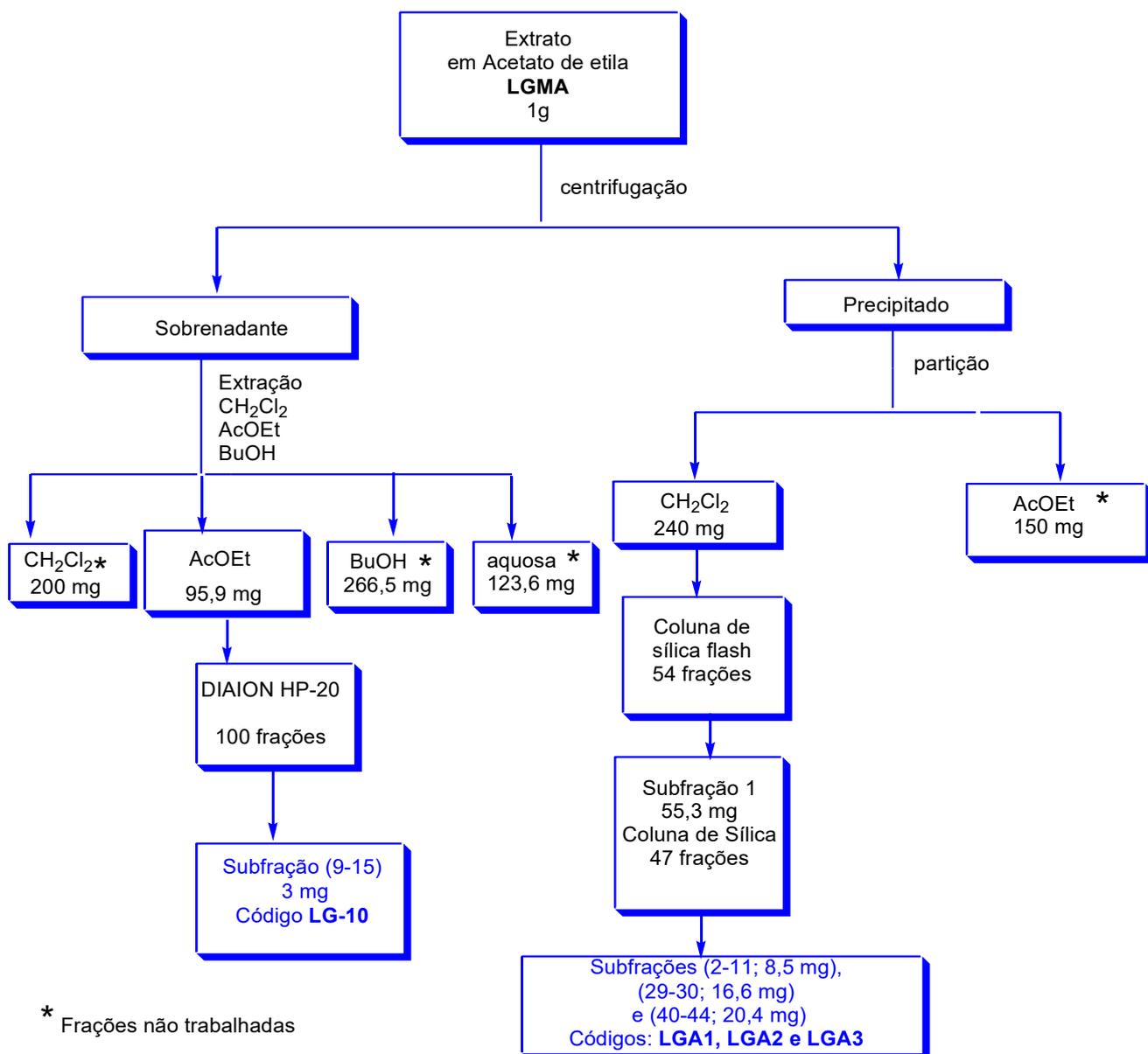


Figura 29. Fluxograma resumido do tratamento cromatográfico do extrato em AcOEt da madeira de *L. guilleminianus*

4. 1. 7. Tratamento cromatográfico do extrato em Hexano da madeira de *L. guilleminianus*

O extrato em hexano (LGMN; 668,4 mg) foi submetido a cromatografia em coluna de vidro aberta empacotada com gel de sílica (0,063 – 0,2 mm) utilizando como eluentes: CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade. Esse procedimento resultou em 60 frações que foram reunidas por semelhança de R_f em CCDA.

As frações 8 - 12; (7,8 mg) apresentaram-se como um sólido branco produzindo quantidades adicionais de (LGA2). As frações remanescentes apresentaram grande quantidade de material graxo e não foram trabalhadas.

4. 2. Isolamento e Purificação dos constituintes Químicos da Espécie *C. spruceanum*

4. 2. 1. Operações Preliminares

✓ Coleta e Identificação do Material Botânico

As cascas do tronco de *C. spruceanum* foram coletadas no campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense, onde se encontra uma exsicata de nº H 10151 no herbário da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

✓ Secagem e moagem do material vegetal

As cascas do tronco de *C. spruceanum* após seca a temperatura ambiente foi cortada em pequenos pedaços e moída em moinho de facas tipo Willey. O procedimento resultou em 500 g de material vegetal seco e moído.

4. 2. 2. Preparação dos extratos brutos

O material vegetal seco e moído (500 g) foi submetido a extração por maceração exaustiva em ordem crescente de polaridade utilizando os seguintes solventes: hexano, CH₂Cl₂, MeOH e MeOH/H₂O (8:2). As soluções obtidas foram evaporadas em evaporador rotatório, e deixadas em capela de exaustão até peso constante ou então liofilizadas para remoção de traços de água.

O procedimento resultou em 2,35 g de extrato em hexano (0,47% da massa do material seco), 2,66 g de extrato em CH₂Cl₂ (0,53% da massa do material seco), 13,22 g de extrato em MeOH (2,64 % da massa do material seco), 6, 0 g do extrato em MeOH/H₂O (1,2 % da massa do material seco). O

resumo do procedimento realizado para a obtenção dos extratos esta descrito na Figura 30.

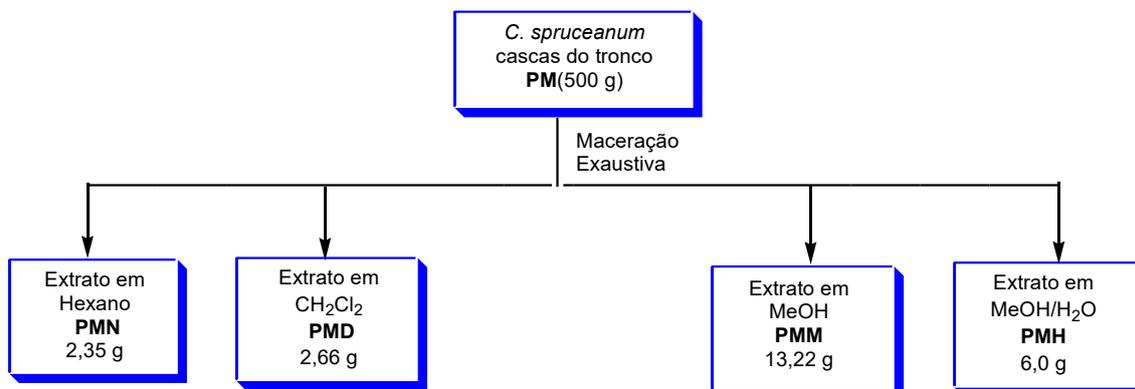


Figura 30. Preparação dos extratos brutos da casca do tronco *Calycophyllum spruceanum*

4. 2. 3. Fracionamento dos extratos brutos e purificação das substâncias de *Calycophyllum spruceanum*

4. 2. 3. 1. Tratamento cromatográfico do extrato em MeOH/H₂O da casca do tronco de *C. spruceanum*.

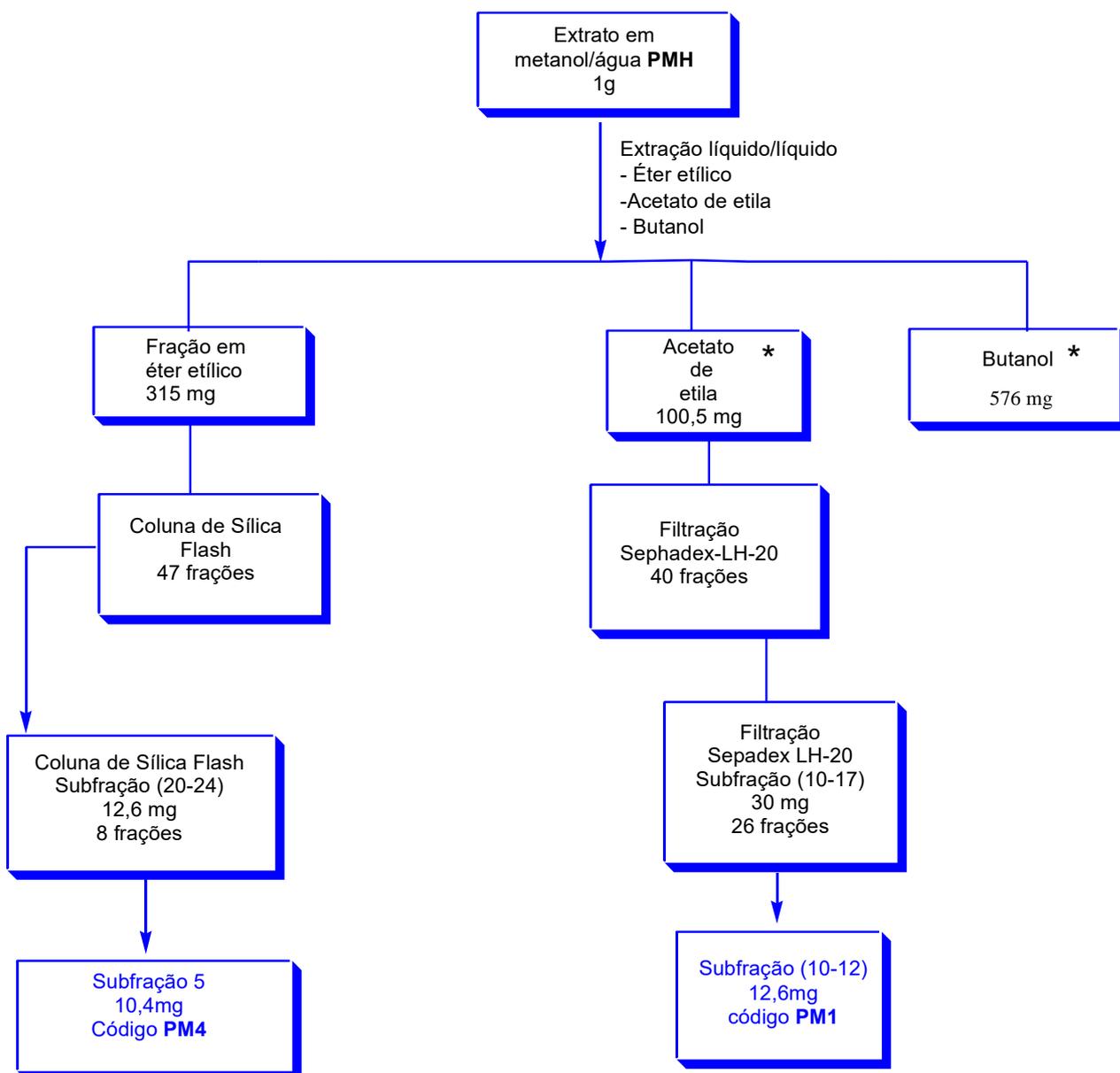
O extrato em MeOH/H₂O **PM** (1g) foi diluído com metanol e água na proporção (1:9) e depois submetido a extração com os seguintes solventes: éter etílico, AcOEt e BuOH.

4. 2. 3. 2. Purificação da Fração em Éter Etilico

A fração em éter etílico (315 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de vidro empacotada com gel de sílica *flash* (0,04 – 0,063 mm) utilizando como eluentes: CHCl₃ e gradiente de polaridade crescente, até MeOH 100%. O que resultou em 47 frações, que foram reunidas por semelhança de R_f em CCDA. A subfração 20 - 24; (12,6 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de vidro utilizando o mesmo procedimento anterior. Esse procedimento resultou em 8 frações que foram reunidas por semelhança de R_f em CCDA. A subfração 5 produziu um sólido marrom escuro, codificado como **PM4**.

4. 2. 3. 3. Purificação da Fração em Acetato de Etila

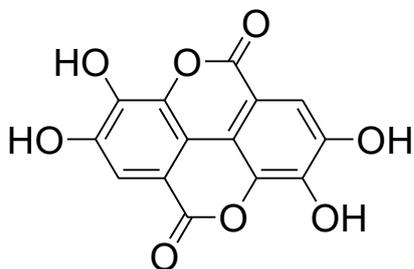
A fração em AcOEt (65,5mg) foi submetida à filtração em coluna de vidro empacotada com Sephadex LH-20 utilizando como eluente o MeOH. O procedimento resultou em 40 frações, que foram reunidas por semelhança de R_f em CCDA. A subfração (10-17, 30mg) foi submetida ao mesmo procedimento anterior resultando em 26 frações. As subfração 10 – 12; (12,6 mg) produziu um sólido marrom escuro, codificado como **PM1**. O fluxograma resumido do tratamento cromatográfico do extrato em MeOH/H₂O da espécie *C. spruceanum* esta descrito na Figura 31, p. 59.



* Frações não trabalhadas devido à complexidade de seu perfil cromatográfico, quando analisadas em CCDA

Figura 31. Fluxograma resumido do procedimento realizado com o extrato bruto em metanol/água de *C. spruceanum*

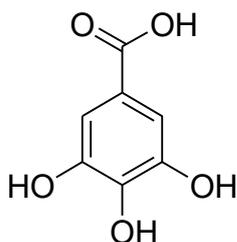
4. 3. Substâncias isoladas/identificadas de *Lonchocarpus guilleminianus* e *Calycophyllum spruceanum*



Ácido elágico (LG-04)

Massa = 17 mg

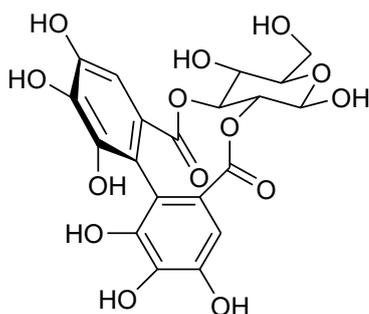
Procedência: Extrato em MeOH/H₂O de *L. guilleminianus*



Ácido gálico (LG-10)

Massa = 11 mg

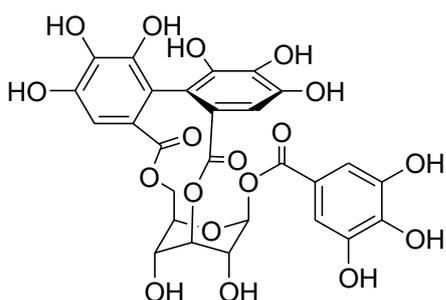
Procedência: Extrato em MeOH/H₂O e acetato de Etila de de *L. guilleminianus*



2,3- (R)- Hexaidroxidifenoil- D-glicose (LG12)

Massa = 44 mg

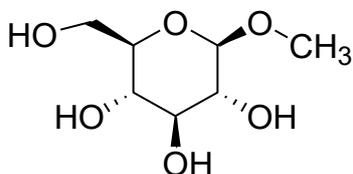
Procedência: Extrato em MeOH/H₂O de *L. guilleminianus*



Corilagina (LG 20)

Massa = 32,6 mg

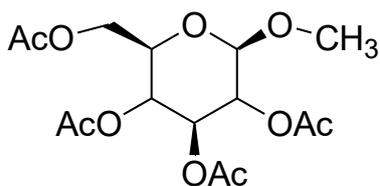
Procedência: Extrato em MeOH e MeOH/H₂O de *L. guilleminianus*



Metil-β-D-glicopiranosídeo (LG-14)

Massa = 15,5 mg

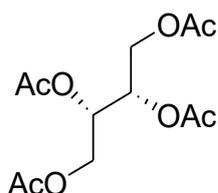
Procedência: Extrato em MeOH de *L. guilleminianus*



Metil- β -D-glicopiranosídeo tetraacetato LG-14 Ac(g)

Massa = 23,4 mg

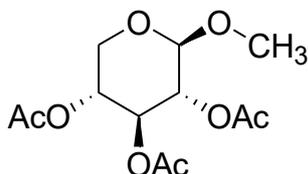
Procedência: Extrato em MeOH de *L. guilleminianus*



1,2,3,4-Butanotetrol tetraacetato LG-14 Ac(a)

Massa = 23,4 mg

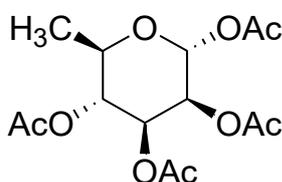
Procedência: Extrato em MeOH de *L. guilleminianus*



Metil 2,3,4-tri-O-acetil- β -D-xilopiranosídeo LG-14 Ac(b)

Massa = 23,4 mg

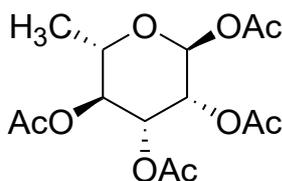
Procedência: Extrato em MeOH de *L. guilleminianus*



Tetraacetil- β -L-ranose LG-14 Ac(c)

Massa = 23,4 mg

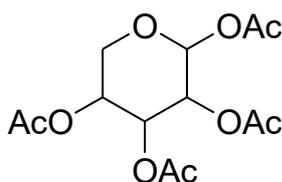
Procedência: Extrato em MeOH de *L. guilleminianus*



α -L-Manopiranosose -6-desoxi-tetraacetato LG-14 Ac(d)

Massa = 23,4 mg

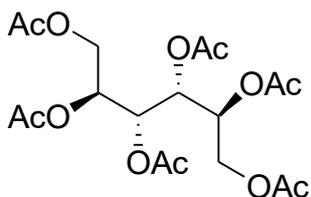
Procedência: Extrato em MeOH de *L. guilleminianus*



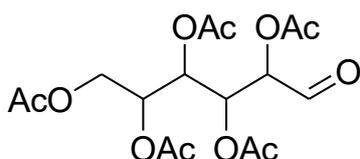
Lixopiranosose tetraacetato LG-14 Ac(e)

Massa = 23,4 mg

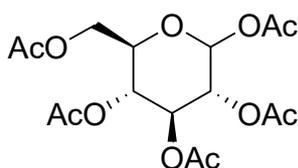
Procedência: Extrato em MeOH de *L. guilleminianus*



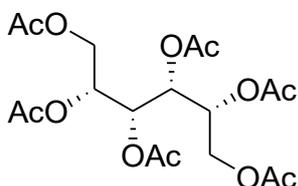
L-Iditol hexaacetato LG-14 Ac(f)
Massa = 23,4 mg
Procedência: Extrato em MeOH de *L. guilleminianus*



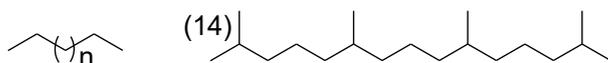
D-Glicose, 2,3,4,5,6-pentaacetato LG-14 Ac(h)
Massa = 23,4 mg
Procedência: Extrato em MeOH de *L. guilleminianus*



α -D-Glicopiranosose pentaacetato LG-14 Ac(i)
Massa = 23,4 mg
Procedência: Extrato em MeOH de *L. guilleminianus*

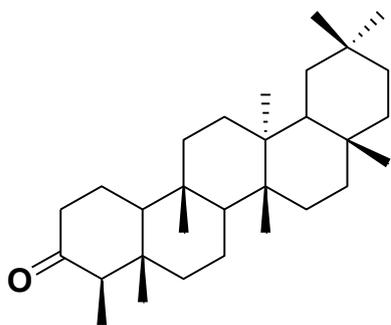


D-Manitol hexaacetato LG-14 Ac(j)
Massa = 23,4 mg
Procedência: Extrato em MeOH de *L. guilleminianus*



- | | |
|------------|-------------|
| (1) n = 12 | (8) n = 19 |
| (2) n = 13 | (9) n = 20 |
| (3) n = 14 | (10) n = 21 |
| (4) n = 15 | (11) n = 22 |
| (5) n = 16 | (12) n = 23 |
| (6) n = 17 | (13) n = 25 |
| (7) n = 18 | |

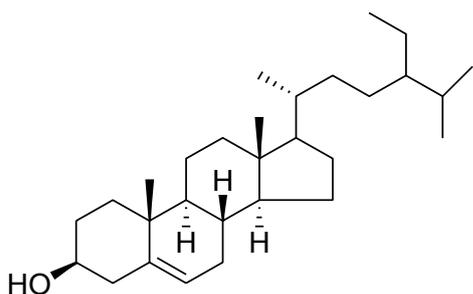
Hexadecano (1), Heptadecano (2), Octadecano (3), Nonadecano (4), Eicosano (5), Heneicosano (6), Docosano (7), Tricosano (8), Tetracosano (9), Pentacosano (10), Hexacosano (11), Heptacosano (12), Nonacosano (13), Pentadecano - 2, 6, 10, 14-tetrametil (14) (LGA1)
Massa = 8,5 mg
Procedência: extrato em acetato de etila de *L. guilleminianus*



Fridelan-3-ona (LGA2)

Massa = 24,4 mg

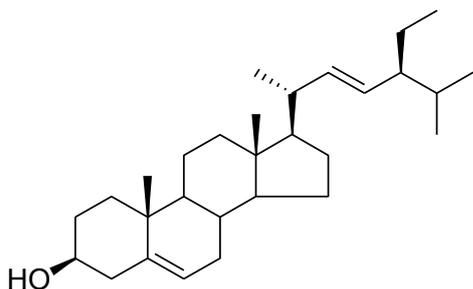
Procedência: Extrato em acetato de etila de *L. guilleminianus*



γ - Sitosterol (LGA3)

Massa = 20,4 mg

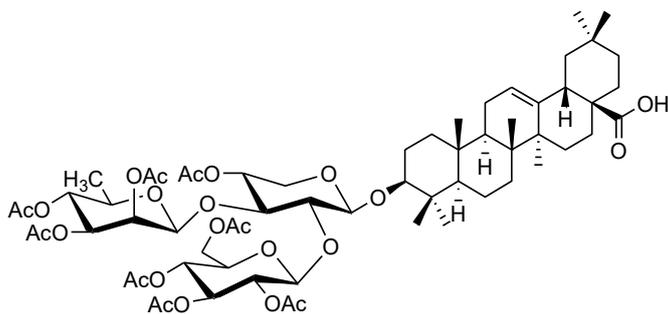
Procedência: Extrato em acetato de etila de *L. guilleminianus*



Estigmasterol (LGA3)

Massa = 20,4 mg

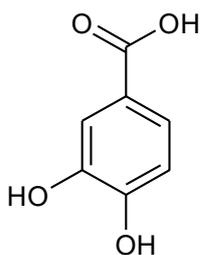
Procedência: Extrato em acetato de etila de *L. guilleminianus*



ácido 3-O- β-D-xilopiranosil-(1'→3)- β-D-glicopiranosil (1''→2')-α -ramnopiranosil(1'''→3')-hidroxiolean-12-en-28-oico (LG5-Ac)

Massa = 7 mg

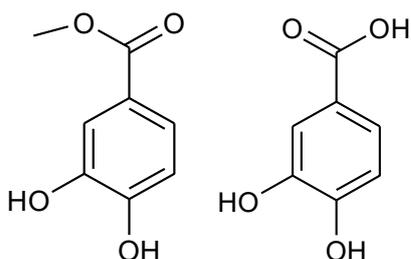
Procedência: Extrato em MeOH/H₂O de *L. guilleminianus*



Ácido protocatecuico (PM1)

Massa = 12,6 mg

Procedência: Extrato em MeOH/H₂O de *C. spruceanum*



Protocatecuato de metila e ácido protocatecuico (PM4)

Massa = 10,4 mg

Procedência: Extrato em MeOH/H₂O de *C. spruceanum*

4. 4. Resultados e Discussão

4. 4. 1. Testes químicos qualitativos para identificação de metabólitos secundários

✓ **Reação com FeCl₃**

O teste baseia-se na identificação da presença de substâncias fenólicas em consequência da formação de complexos coloridos com o cloreto férrico (Figura 32). O desenvolvimento da coloração depende do esqueleto do flavonoide presente, podendo diversificar entre amarelo-castanho, azul, verde e violeta (Mouco, Bernardino & Cornélio, 2003).

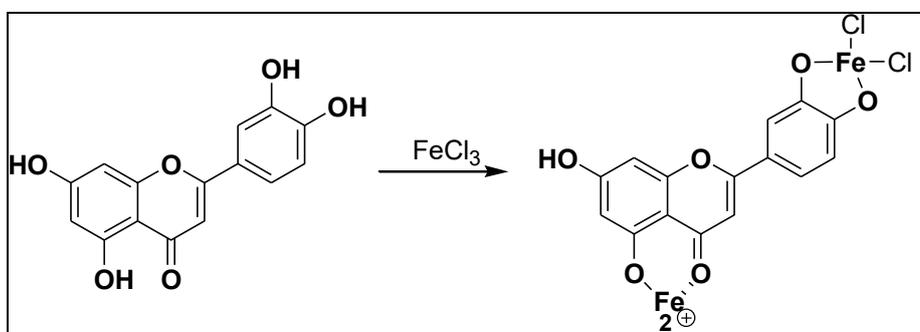


Figura 32. Exemplo de reação do flavonoide com o FeCl₃

Nos extratos de *L. guilleminianus* (AcOEt, MeOH e MeOH/H₂O) Observou-se a mudança de coloração (Figura 33). Os tubos a esquerda representam os extratos antes da adição de FeCl₃ e os da direita após a adição de FeCl₃. Após um período de repouso nos tubos contendo os extratos em MeOH e MeOH/H₂O ocorreu a formação de um precipitado escuro. No tubo contendo o extrato em AcOEt notou-se somente a mudança de coloração. Os resultados são consistentes com a presença de substâncias fenólicas em todos os extratos testados.

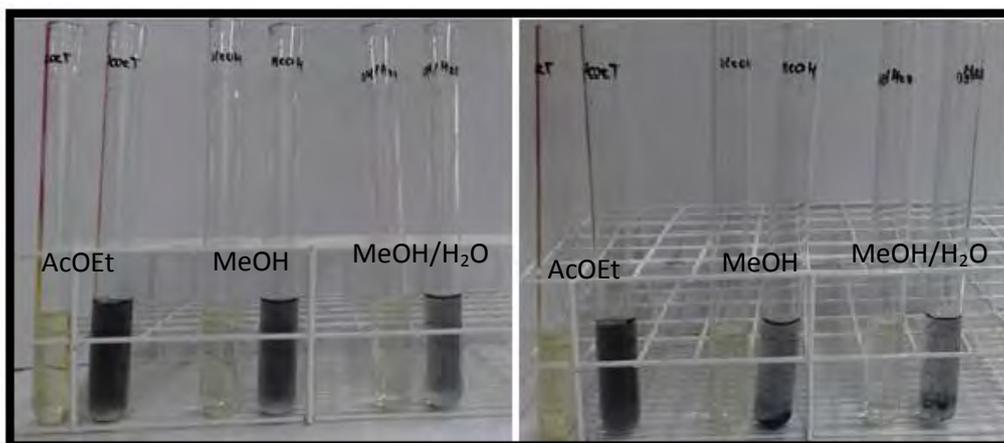


Figura 33. Reação dos extratos brutos de *L. guilleminianus* com FeCl₃

✓ **Reação com AlCl₃**

A reação com cloreto de alumínio identifica a presença de flavonoides através da fluorescência visualizada no ultravioleta, uma vez que os cátions Al³⁺ formam complexos estáveis com as hidroxilas em posição *orto* presentes no esqueleto flavonoídico, aumentando seu sistema conjugado (Buriol *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2012; Mouco, Bernardino & Cornélio, 2003) (Figura 34).

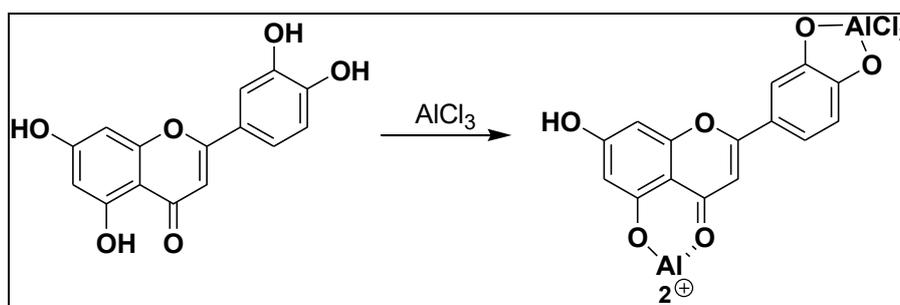


Figura 34. Exemplo de reação do flavonoide com o AlCl₃

Os extratos testados (AcOEt, MeOH e MeOH/H₂O) foram comparados com o flavonoide quercetina e visualizados sob luz ultravioleta (254 nm) (Figura 35). Somente o extrato em AcOEt apresentou leve fluorescência indicando a presença de fenólicos em geral e/ou flavonóides. Nos outros extratos não observou-se nenhuma modificação.

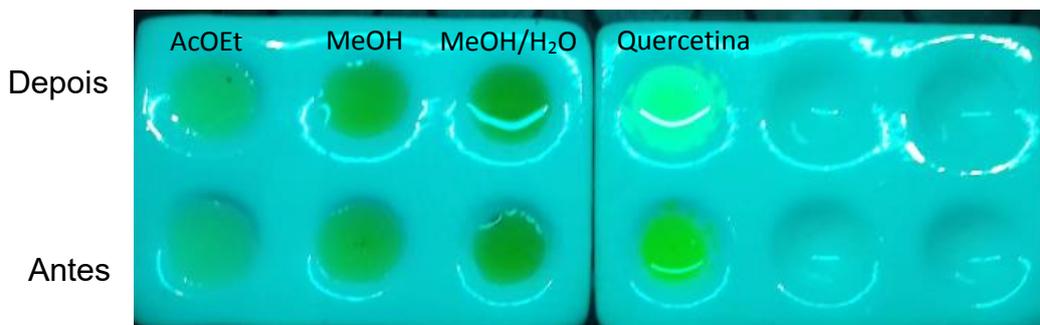


Figura 35. Reação dos extratos brutos de *L. guilleminianus* com AlCl_3 , seguido da visualização sob luz ultravioleta a 254 nm

4. 4. 2. Determinação Estrutural dos Constituintes isolados de *Lonchocarpus guilleminianus* e *Calycophyllum spruceanum*

4. 4. 2. 1. Determinação estrutural da substância LG-04

A substância LG-04 isolada do extrato em MeOH/H₂O (8:2) de *L. guilleminianus* apresentou-se como cristais amorfos de coloração amarelo claro, solúvel em DMSO e com faixa de ponto de fusão acima de 360°C.

A análise do espectro em MeOH na região do ultravioleta da substância LG-04 mostra a presença de duas bandas de absorção em $\lambda_{\text{máx}}=256$ e 364 nm, característico da presença de hidroxilas fenólicas (Williams & Fleming, 1995). A adição de AlCl_3 (2% em MeOH) a solução em MeOH promoveu um deslocamento batocrômico em ambas as bandas e uma diminuição da intensidade da absorção (efeito hipocrômico) da banda a $\lambda_{\text{máx}}=364$ nm, evidenciando a formação de um complexo entre as hidroxilas em posição *orto* com o AlCl_3 . A adição de HCl a solução não provocou nenhum efeito sobre a aparência do espectro evidenciando assim a estabilidade do complexo formado (Figura 36. Tabela. 3, p. 67).

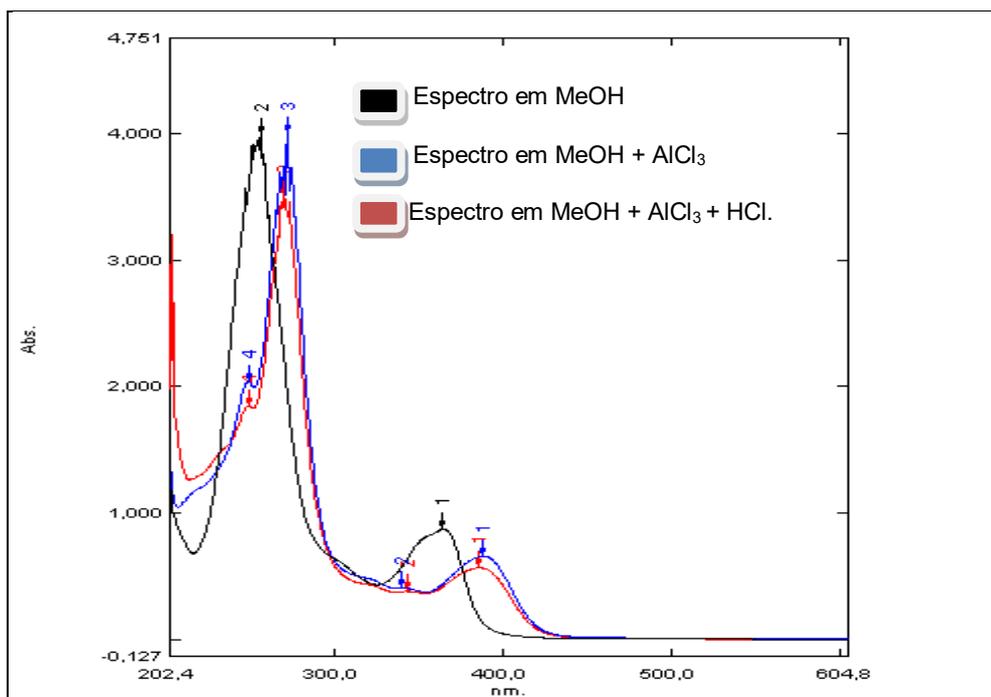


Figura 36. Espectro de absorção na região do UV-vis da substância **LG-04**

Tabela 3. Deslocamentos e absorções máximas na região do UV- vis da substância **LG-04**.

Solvente	LG-04	
	$\lambda_{\text{máx}}$	$\lambda_{\text{máx}}$
MeOH	364,0	256,5
MeOH + AlCl ₃	388,0	272,0
MeOH + AlCl ₃ + HCl	386,0	270,0

O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) da substância LG-04 apresentou banda larga em 3072 cm^{-1} relativa a deformação axial do grupo hidroxila (OH); $1583 - 1612\text{ cm}^{-1}$ relativa a deformação axial de ligação C-C de anel aromático e $1058 - 1195\text{ cm}^{-1}$ relativa a deformação da ligação C-O de fenol (Ar-C-O). Além dessas absorções o espectro também apresentou absorções intensas a 1350 cm^{-1} relativas ao estiramento de ligação C-O (carbinólico) e a 1697 cm^{-1} relativa a deformação axial de grupo carbonila (C=O) (Figura 37, p. 68) (Silverstein & Webster, 2000).

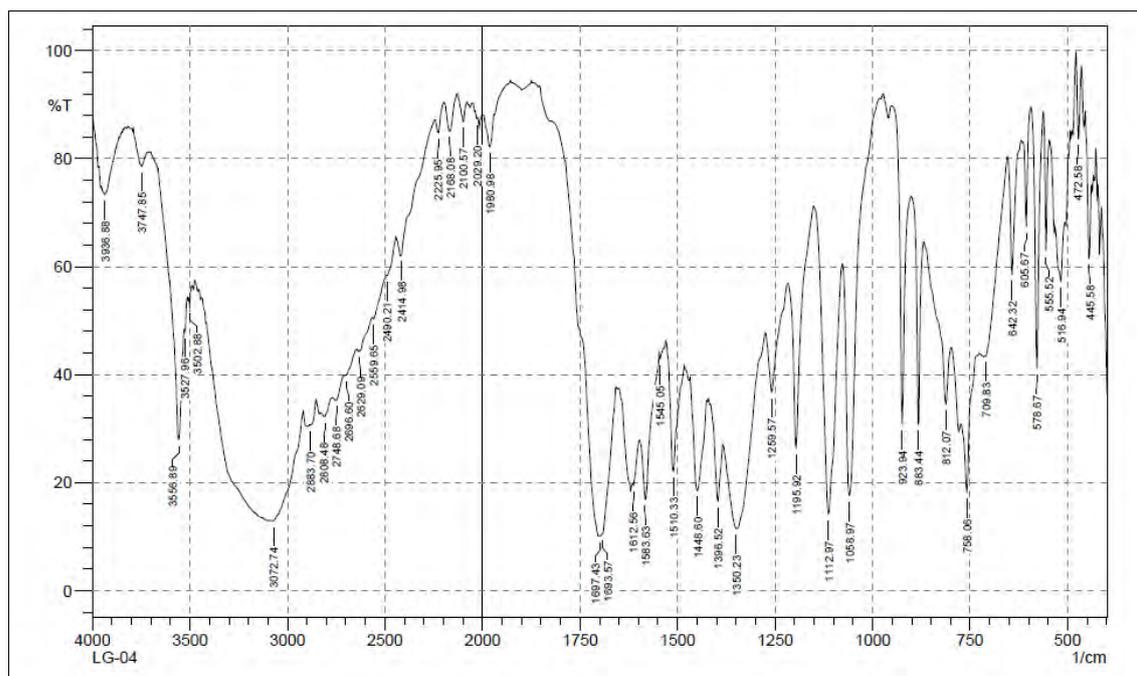


Figura 37. Espectro na região do infravermelho da substância **LG-04**

O espectro de massas da substância LG-04, via inserção direta (Figuras 38 e 39) apresentou um único pico em $m/z = 302$ ($M^{+•}$, 100%) compatível com a fórmula molecular $C_{14}H_6O_8$.

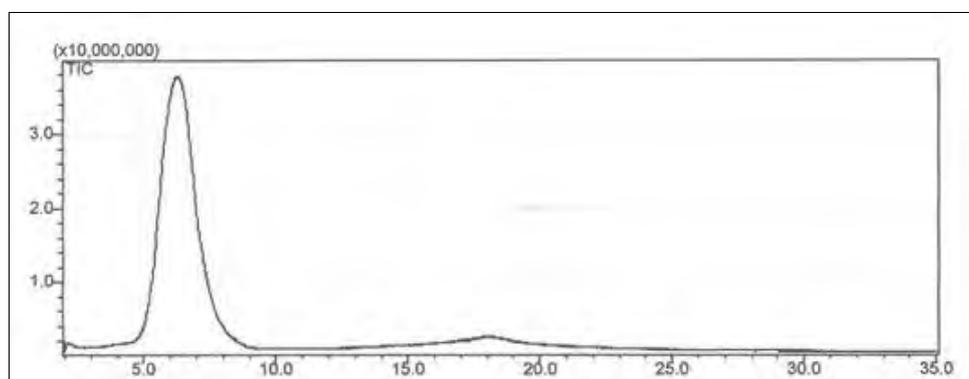


Figura 38. Cromatograma da substância **LG-04**

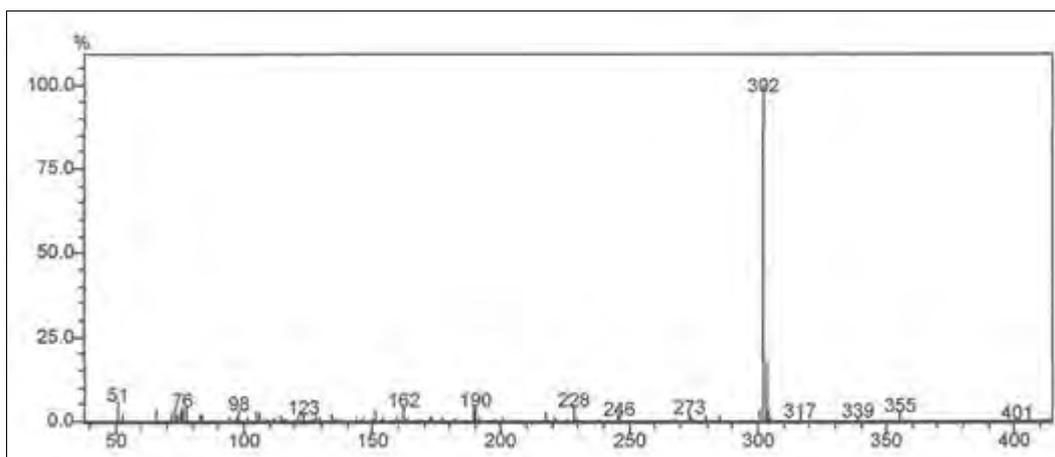


Figura 39. Espectro de massas (inserção direta) da substância **LG-04**

As evidências espectrais encontradas para LG-04 sugerem tratar-se de um ácido fenólico. O espectro de RMN ^1H da substância LG-04 (Figura 40) apresentou apenas um sinal simples intenso a δ_{H} 7,42 (H-5), evidenciando a presença de anel aromático e caracterizando que todos os hidrogênios da estrutura são equivalentes.

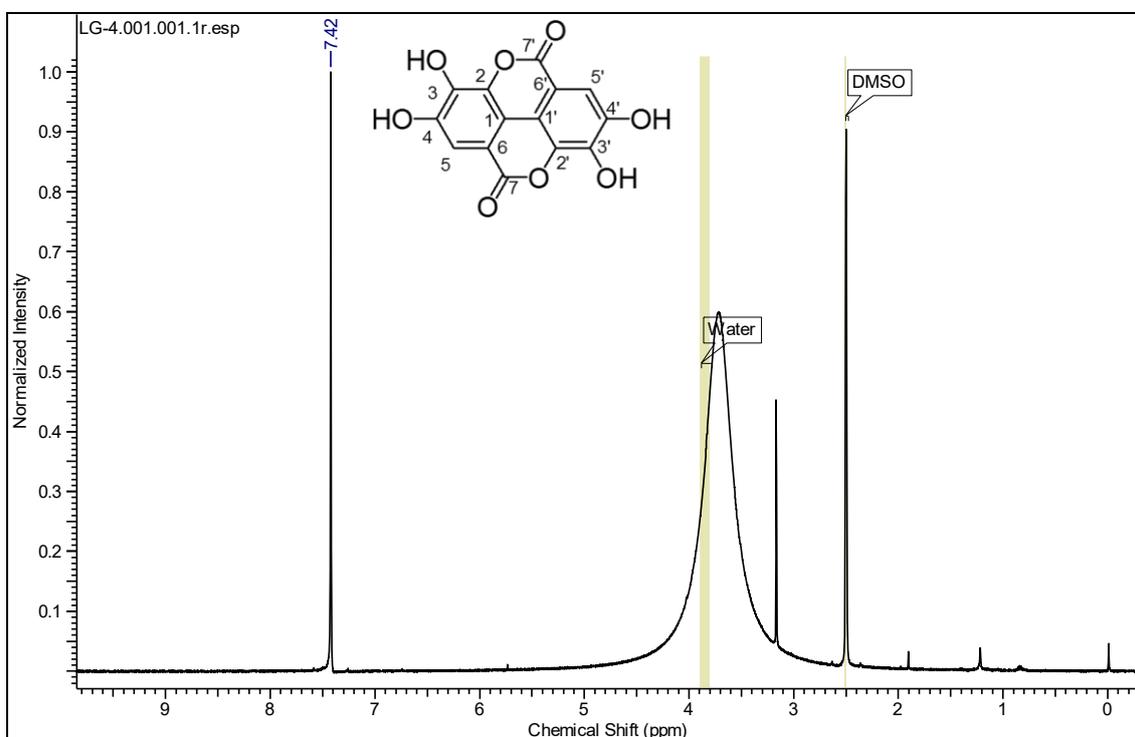


Figura 40. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO) da substância **LG-04**

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 41, p. 70) pode se verificar a presença sete sinais na região entre δ_{C} 106,56 – 159,34. O sinal em frequência mais alta

em δ_C 159,34 foi atribuído a carbonila (C-7 e C-7'). Através do espectro de RMN- ^{13}C utilizando a técnica de APT (Figura 42), foi possível atribuir que o sinal a δ_C 109,74 pertence a um carbono metínico (C-5 e C-5') e os demais sinais aos carbonos não hidrogenados a δ_C 159,34 (C-7 e C-7'); δ_C 148,35 (C-4 e C-4'); δ_C 140,88 (C-3 e C-3'); δ_C 136,33 (C-2 e C-2') δ_C 112,57 (C-1 e C-1') e δ_C 106,56 (C-6 e C-6').

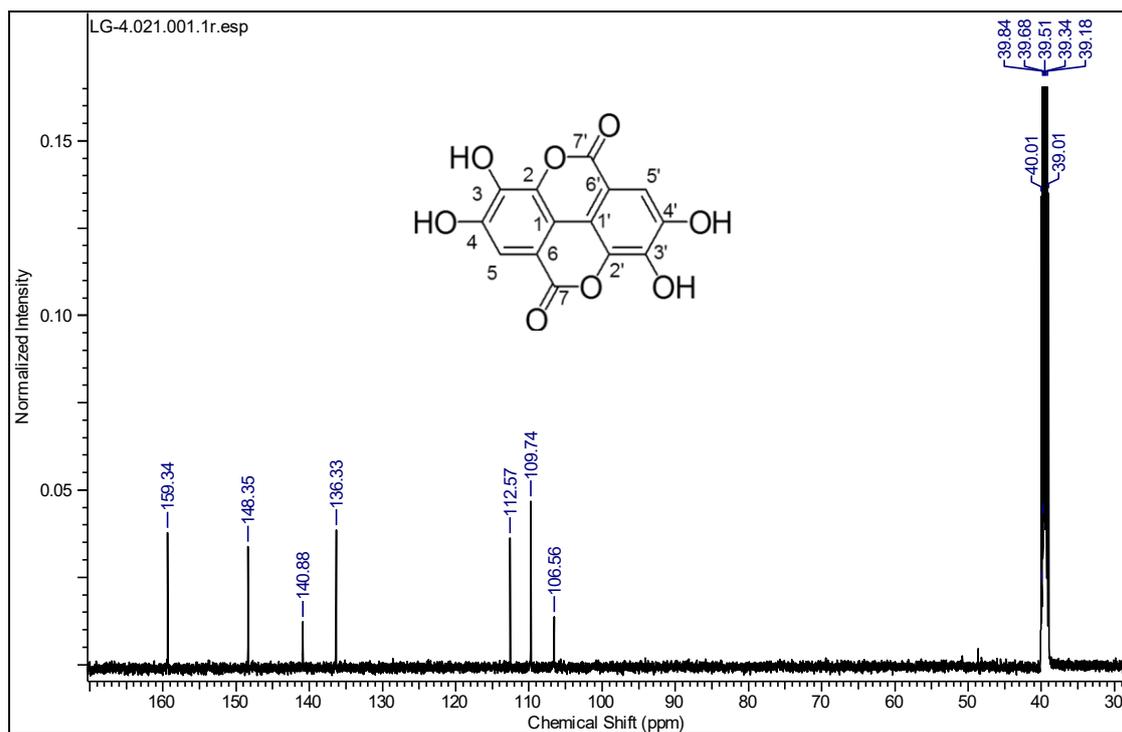


Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO) da substância LG-04

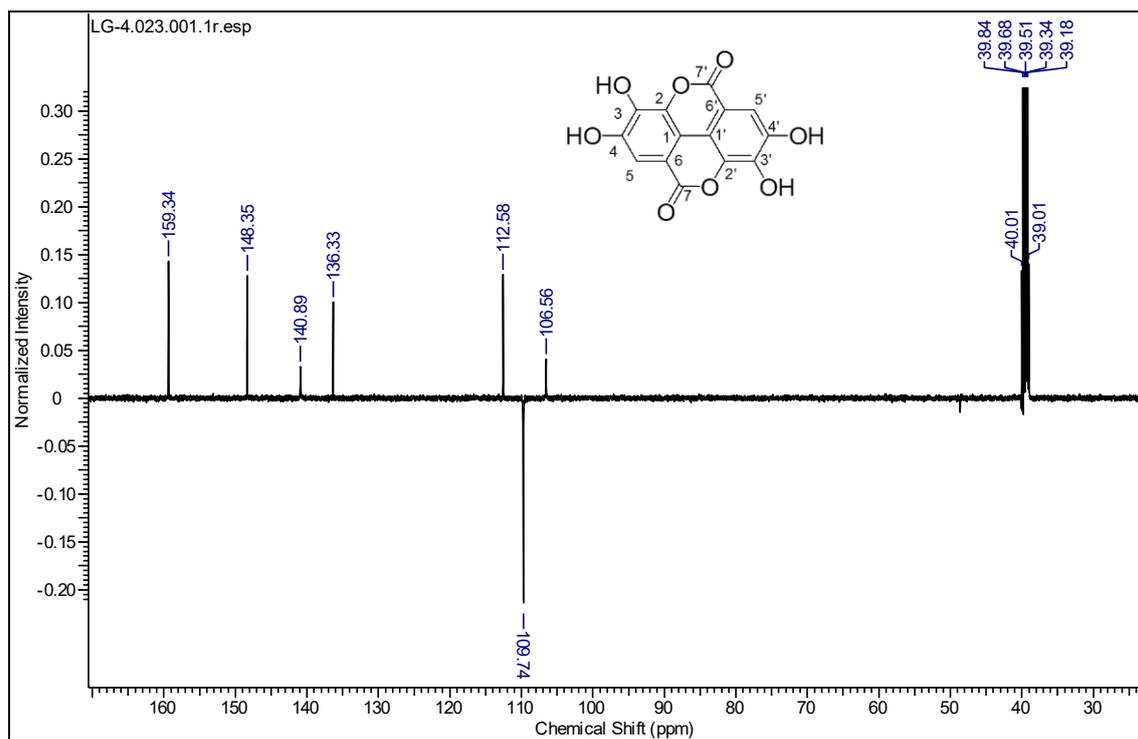


Figura 42. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO) da substância **LG-04**

O mapa de correlação heteronuclear a uma ligação HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) (Figura 43, p. 72) confirmou que o sinal a δ_{C} 109,74 (C-5 e C-5') apresenta correlação direta com os hidrogênio a δ_{H} , 7,42 (H-5 e H-5').

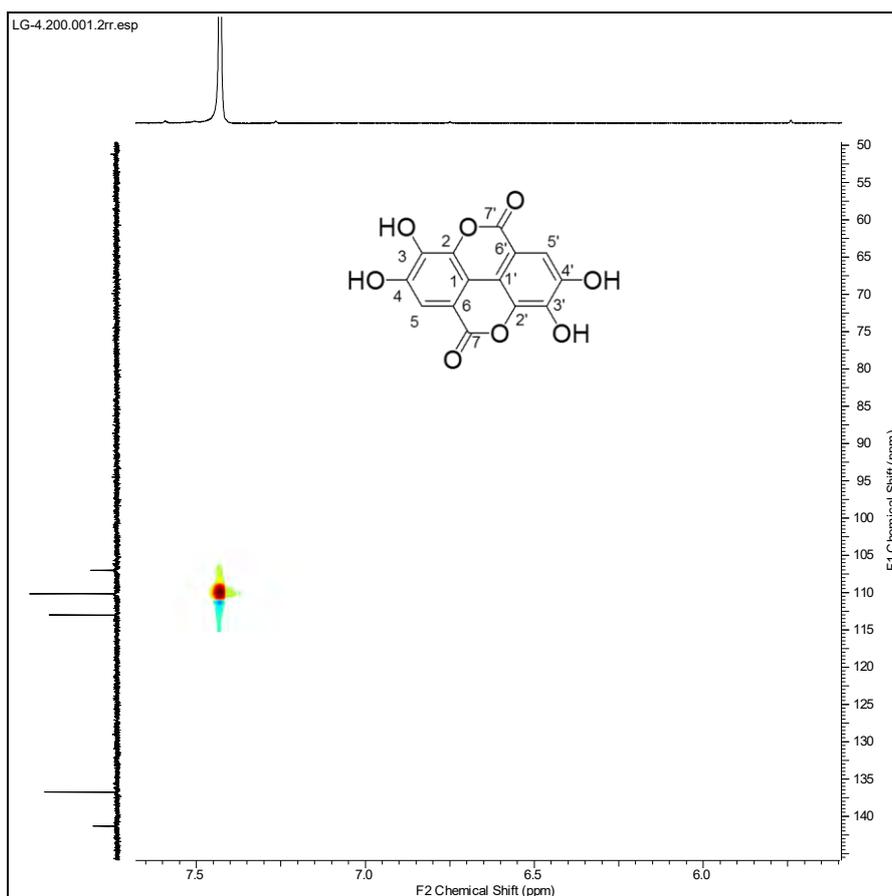


Figura 43. Espectro de HMQC da substância **LG-04**

O mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC ($^nJ_{CH}$, $n=2$ e $n=3$) (Figura 44, p. 73) nos auxiliou na determinação estrutural da substância devido as correlações observados entre os hidrogênios (H-5 e H5') em δ_H 7,42 com os carbonos (C-6 e C-6') em δ_C 106,56 e os carbonos (C4 e C-4') em δ_C 148,35 a duas ligações. Correlações entre os hidrogênios (H-5 e H5') em δ_H 7,42 e os carbonos (C-3 e C-3') em δ_C 140,88; (C-1 e C-1') em δ_C 112,57 e (C-7 e C-7') em δ_C 159,34 a três ligações e a correlação entre o os hidrogênios (H-5 e H5') em δ_H 7,42 com os carbonos (C-2 e C-2') em δ_C 136,33 a quatro ligações.

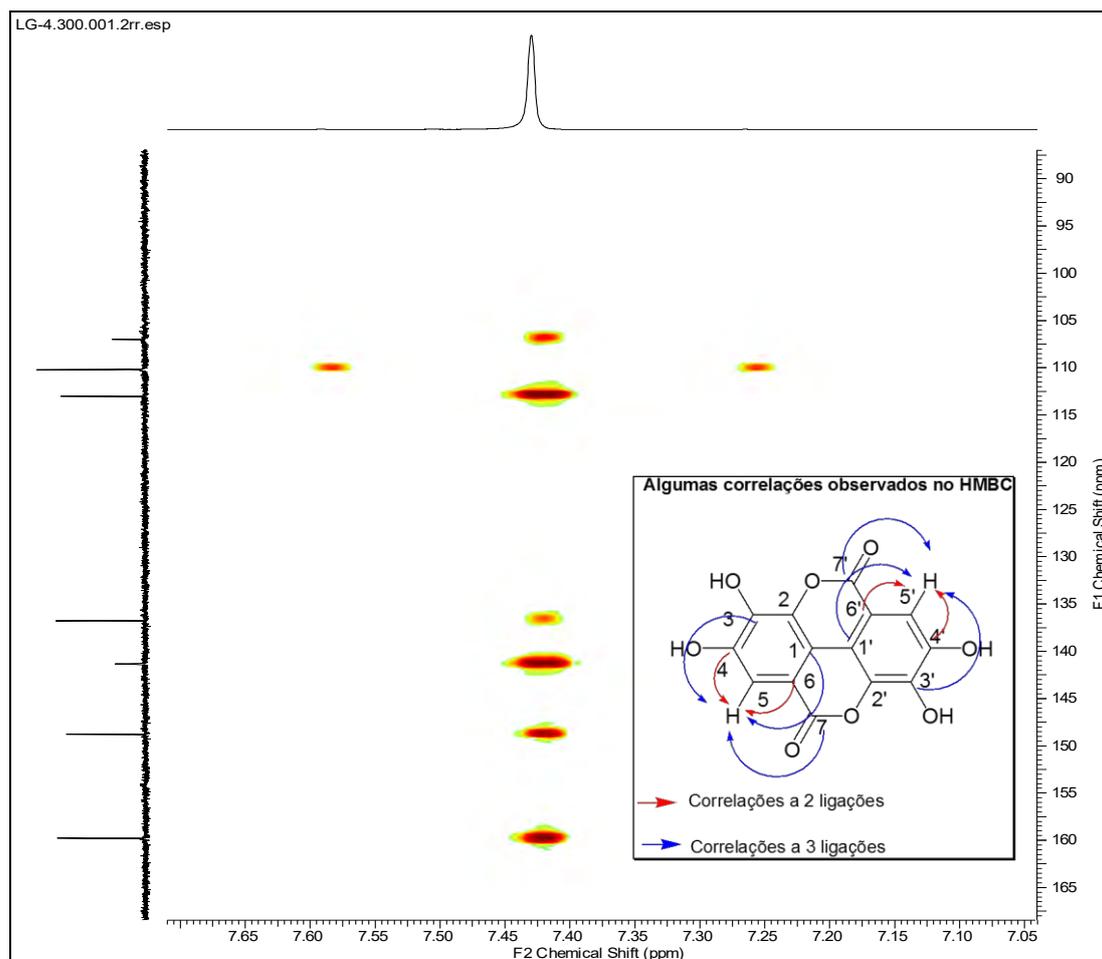


Figura 44. Espectro de HMBC da substância **LG-04**

Os dados espectrais apresentados para a substância **LG-04** e a comparação com os dados da literatura, possibilitou confirmar a estrutura do ácido elágico (Figura 45). Os deslocamentos químicos atribuídos para a substância LG-04 estão resumidos na Tabela 4, p. 74.

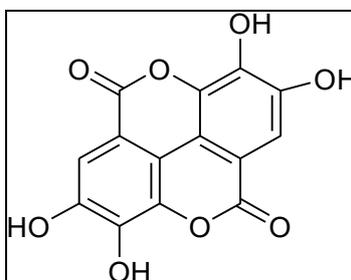


Figura 45. Estrutura da substância **LG-04** (ácido elágico)

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LG-04, utilizando DMSO como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).

C	LG-04					*Literatura (DMSO-d ₆)	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$^4J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
1	112,57	-	-	H-5	-	112,4	-
1'	112,57	-	-	H-5	-	112,4	-
2	136,33	-	-	-	H-5	136,4	-
2'	136,33	-	-	-	H-5	136,4	-
3	140,88	-	-	H-5	-	139,7	-
3'	140,88	-	-	H-5	-	139,7	-
4	148,35	-	H-5	-	-	148,5	-
4'	148,35	-	H-5	-	-	148,5	-
5	109,74	7,42 (1H, s)	-	-	-	110,2	7,4 (1H, s)
5'	109,74	7,42 (1H, s)	-	-	-	110,2	7,4 (1H, s)
6	106,56	-	H-5	-	-	107,5	-
6'	106,56	-	H-5	-	-	107,5	-
7	159,34	-	-	H-5	-	159,2	-
7'	159,34	-	-	H-5	-	159,2	-

*Moura et al., 2011.

4. 4. 2. 2. Determinação estrutural da substância LG-10

A substância LG-10 isolada do extrato em MeOH/H₂O (8:2) e em AcOEt apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarela, solúvel em MeOH.

Na análise do espectro em MeOH na região do ultravioleta da substância LG- 10 observou-se a presença de duas bandas de absorção em $\lambda_{\text{máx}} = 215$ e 271 nm, característico da presença de hidroxilas fenólicas (Williams & Fleming, 1995). A adição de solução AlCl₃ (2% em MeOH) a solução metanólica promoveu um deslocamento batocrômico e a diminuição da intensidade da absorção (efeito hipocrômico) de ambas as bandas, evidenciando a presença de um complexo formado entre hidroxilas em posição *orto* e o AlCl₃. A adição de HCl à solução, promoveu um deslocamento para menor comprimento de onda da banda em $\lambda_{\text{máx}} = 283$ (efeito hipsocrômico) e um aumento na

intensidade de absorção, característico da quebra do complexo formado anteriormente. (Figura 46, Tabela. 5).

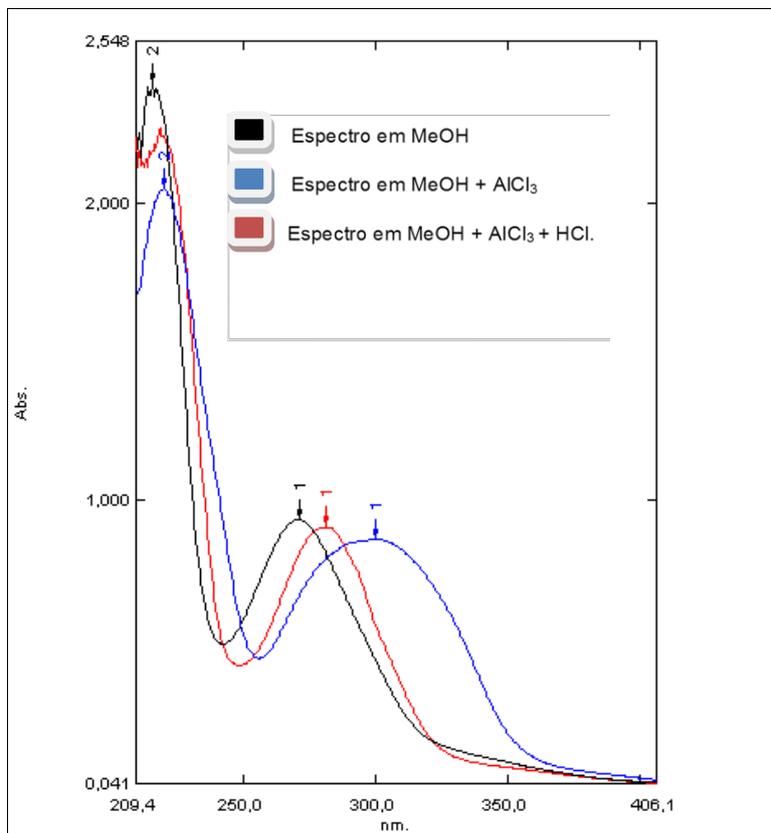


Figura 46. Espectro de absorção na região do UV-vis da substância **LG-10**

Tabela 5. Deslocamentos e absorções máximas na região do UV- vis da substância **LG-10**.

Solvente	LG-10	
	$\lambda_{\text{máx}}$	
MeOH	271,0	215,5
MeOH + AlCl ₃	300,0	220,0
MeOH + AlCl ₃ + HCl	283,0	218,5

O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) da substância LG-10 (Figura 47, p. 76), apresentou banda larga em 3400 cm⁻¹ relativa a deformação axial de ligação de OH em ligação de hidrogênio intramolecular, banda intensa em 1691 cm⁻¹ relativa a deformação axial da ligação dupla carbono-oxigênio (C=O) de ácido carboxílico, 1446 cm⁻¹ deformação axial de ligação dupla carbono-carbono (C=C) de anel aromático, 1030 cm⁻¹

deformação angular da ligação C-H de anel aromático no plano e 871 cm^{-1} de deformação angular fora do plano da ligação C-H de anel aromático tetra substituído (Bergamini, 2008).

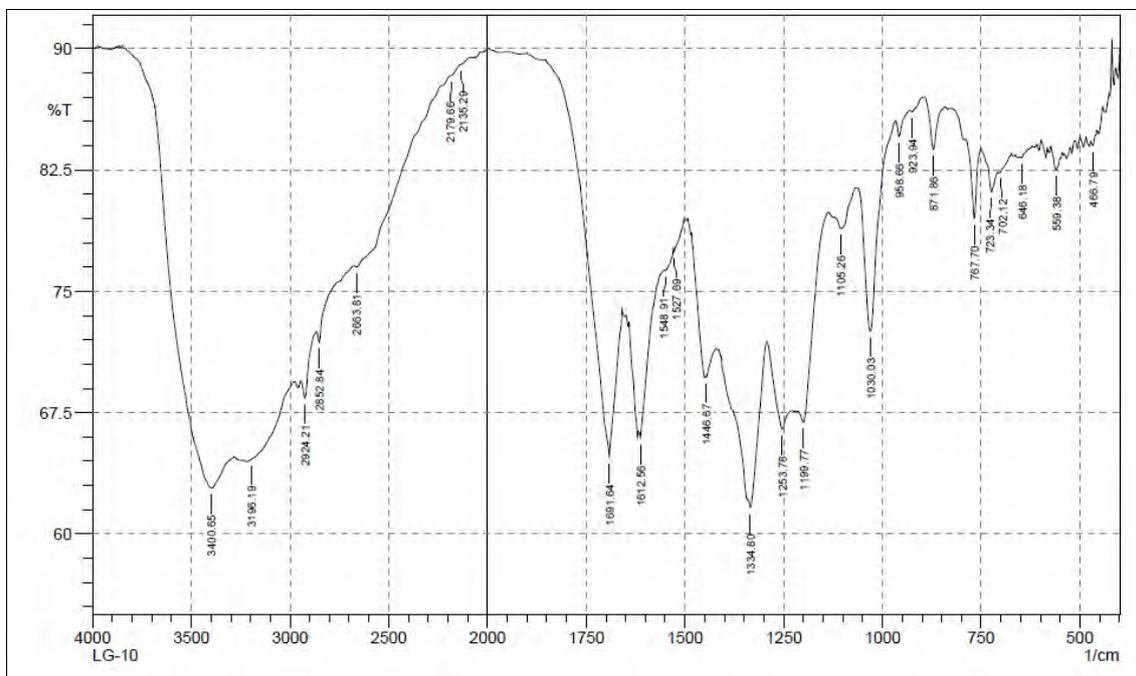


Figura 47. Espectro na região do infravermelho da substância **LG-10**

A análise através de espectrometria de massas com ionização *electrospray* (ESI-MS) da substância LG-10 registrado no modo negativo mostrou o pico do íon molecular em m/z 169,0144 $[M - H]^-$ (Figura 48, p. 77), compatível com a fórmula molecular $C_6H_7O_5$. A fragmentação do íon molecular pode produzir os fragmentos a m/z 153 (perda de OH) e m/z 125 (perda de CO). A proposta do mecanismo de fragmentação da substância esta descrita na Figura 49, p. 77. Os dados confirmam a presença dos grupos funcionais observados nos espectros de ultravioleta e infravermelho.

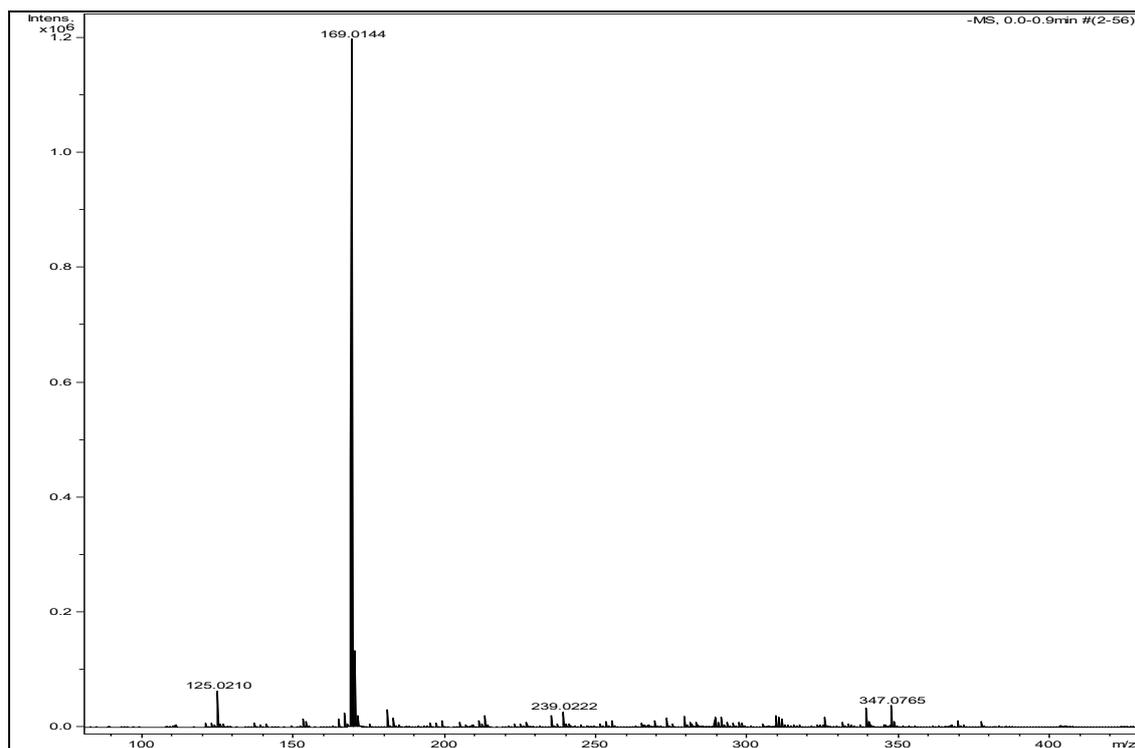


Figura 48. Espectro de massas da substância **LG-10** (ESI – modo negativo)

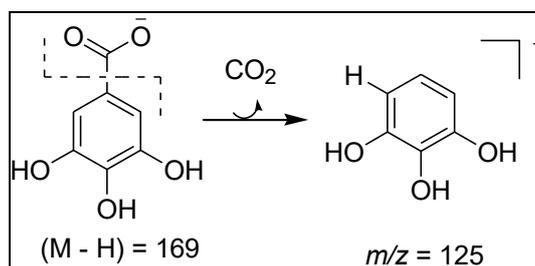


Figura 49. Proposta mecânica de fragmentação para a substância **LG-10**

O espectro de RMN ^1H da substância LG-10 (Figura 50, p. 78) apresentou um sinal simples em δ_{H} 7,06 atribuído aos dois hidrogênios equivalentes do anel aromático (H-2 e H-6).

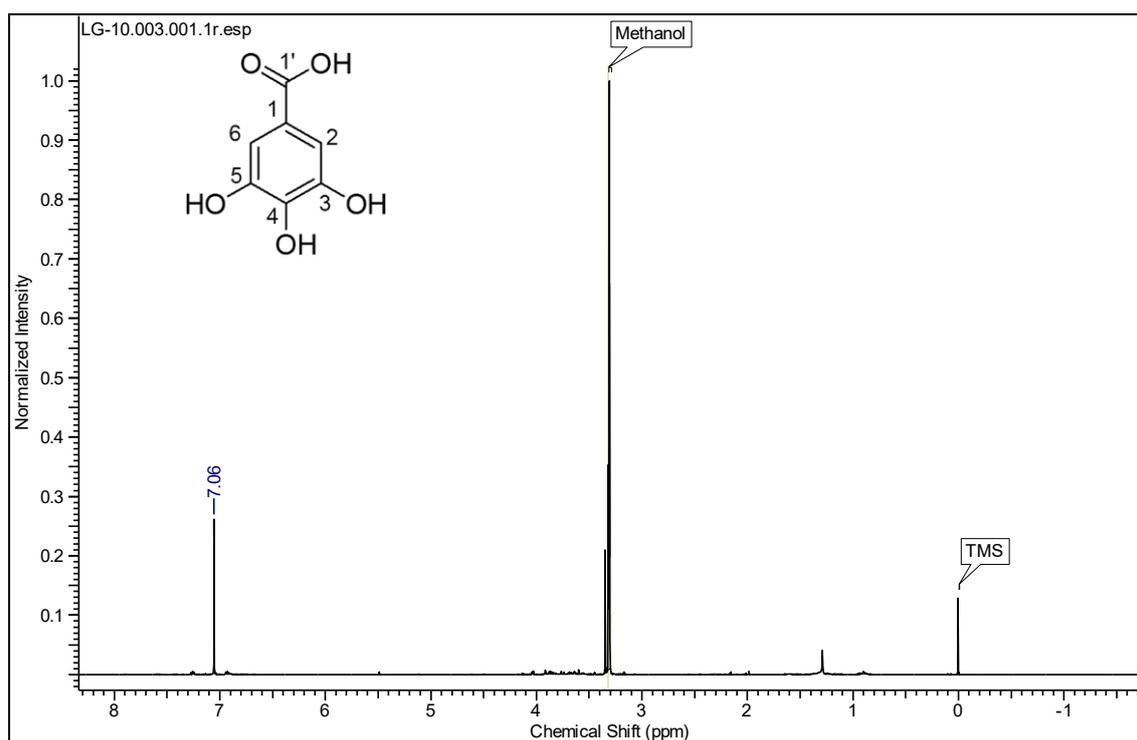


Figura 50. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância **LG-10**

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 51, p. 79) da substância LG-10 evidenciou a presença de cinco sinais na região entre δ_{C} 110,47 – 170,80. O sinal em frequência mais alta a δ_{C} 170,80 foi atribuído a carbonila (C-1') e os outros sinais a C-1 (δ_{C} 122,46); C-2 (δ_{C} 110,47); C-3 (δ_{C} 146,51); C-4 (δ_{C} 139,68); C-5 (δ_{C} 146,51); C-6 (δ_{C} 110,47) confirmam o caráter aromático da substância.

Através do número de linhas espectrais revelado pelo espectro de RMN ^{13}C - APT (Figura 52, p. 79), foi possível atribuir que o sinal a δ_{C} 110,47 pertence aos carbonos metínicos, (C-2 e C-6') e os demais, aos carbonos não hidrogenados da molécula.

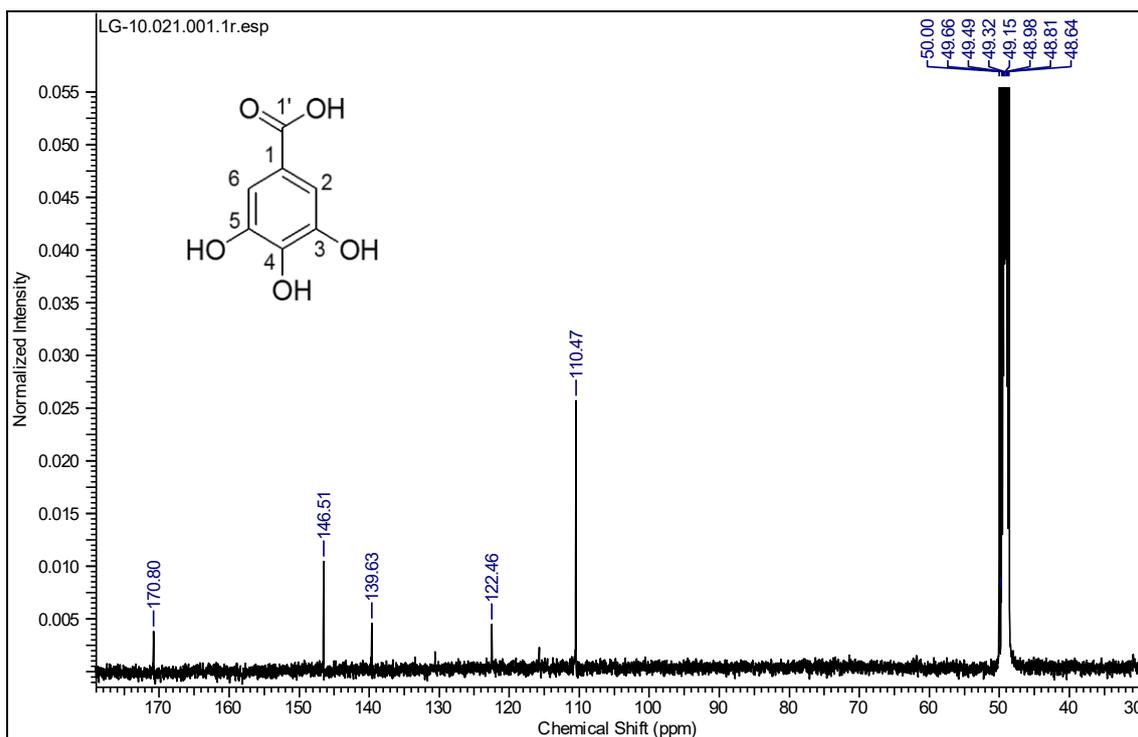


Figura 51. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD) da substância LG-10

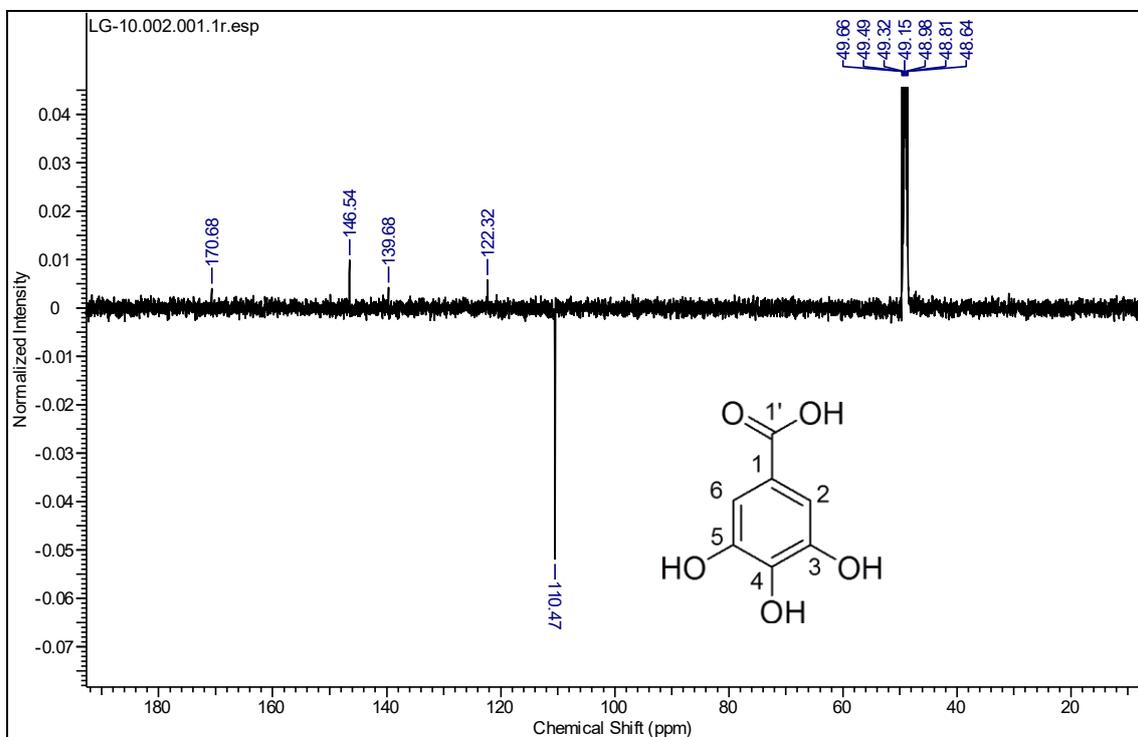


Figura 52. Espectro de RMN de ^{13}C – APT (125 MHz, MeOD) da substância LG-10

O mapa de correlação heteronuclear a uma ligação HMQC ($^1J_{CH}$) (Figura 53) auxiliou nas correlações dos carbonos metínicos com os respectivos hidrogênios, o sinal de carbono a δ_C 110,47 do (C-2 e C6') esta ligado diretamente ao hidrogênio (H-2 e H-6) em δ_H , 7,06. Sugerindo a existência de simetria no anel aromático, que apresenta somente dois carbonos hidrogenados.

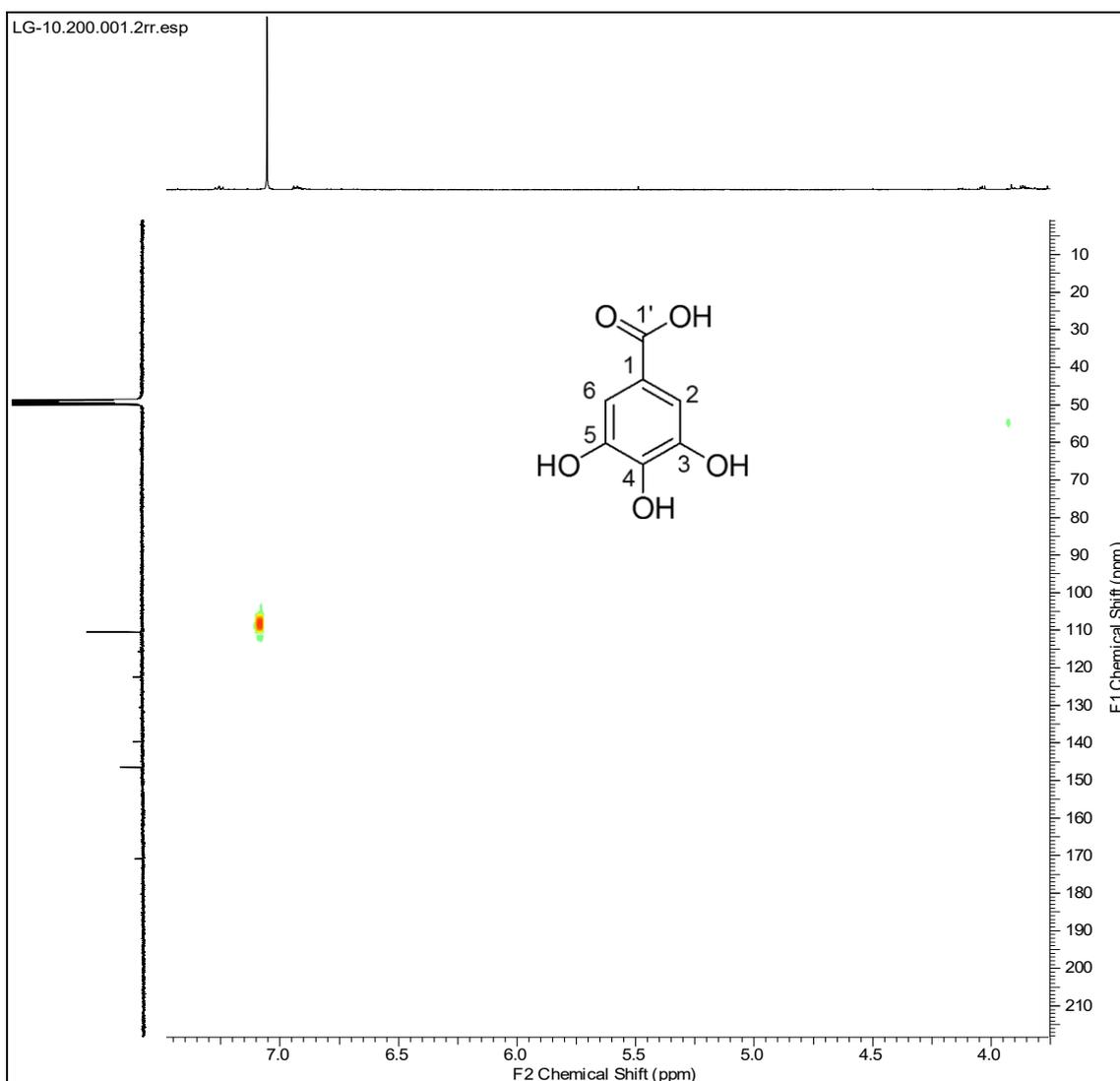


Figura 53. Espectro de HMQC da substância **LG-10**

Pelo mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC ($^nJ_{CH}$ n= 2 e n=3) (Figura 54, p. 81) foi possível correlacionar os sinais dos carbonos (C-1', C-3, C-4 e C-5) da molécula com os hidrogênios a δ_H , 7,06, (H-2 e H-6).

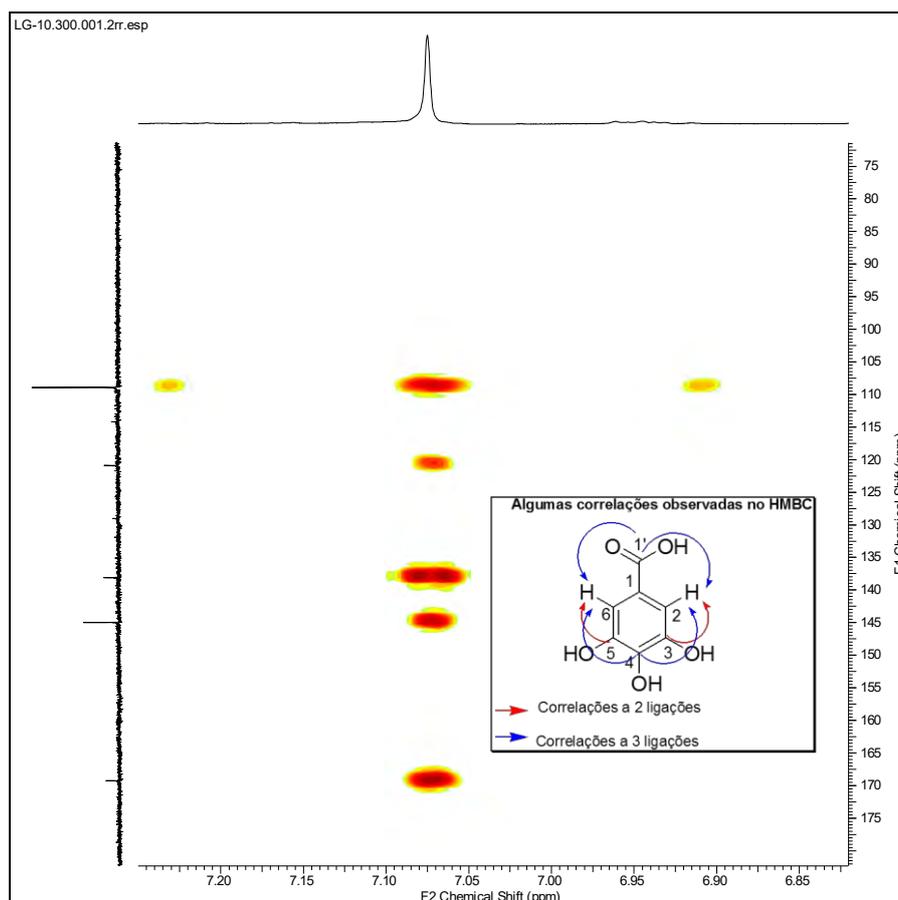


Figura 54. Espectro de HMBC da substância **LG-10**

O conjunto de dados obtidos para a substância LG-10 quando comparados com aqueles descritos na literatura permitiram atribuir a estrutura do ácido gálico para a substância (Figura 55). Os deslocamentos químicos atribuídos para a substância LG-10 estão resumidos na Tabela 6, p. 82.

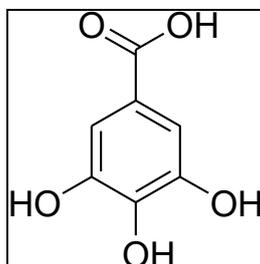


Figura 55. Estrutura da substância **LG-10** (Ácido gálico)

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LG-10, utilizando MeOD como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).

C	LG-10				*Literatura (DMSO-d ₆)	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
1	122,46	-	-	-	120,7	-
2	110,47	7,06 (1H, s)	-	-	108,8	6,92 (1H, s)
3	146,51	-	H-2	-	145,4	-
4	139,68	-	-	H-2/H-6	138,0	-
5	146,51	-	H-6	-	145,4	-
6	110,47	7,06 (1H, s)	-	-	108,8	6,92 (1H, s)
1'	170,80	-	-	H-2/H-6	167,6	-

*Moura et al., 2001

A substância **LG-27** obtida do extrato em MeOH/H₂O (8:2) de *L. guilleminianus*, através da análise dos dados espectrais obtidos, apresentou-se como uma mistura do ácido elágico e ácido gálico, já discutidos anteriormente.

4. 4. 2. 3. Determinação estrutural da substância LG-12.

A substância LG-12 isolada do extrato em MeOH/H₂O (8:2) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarelo escuro, solúvel em MeOH e com coloração azul escuro na presença de solução alcoólica de cloreto férrico, quando revelada em CCDA.

O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) (Figura 56, p. 83) da substância LG-12 apresentou intensa banda de absorção na região de 3500 - 3100 cm⁻¹ de estiramento de OH, bandas de absorção em 1350 cm⁻¹ (C-O) e em 1736 cm⁻¹ indicativa da função éster (Lopes, 2004).

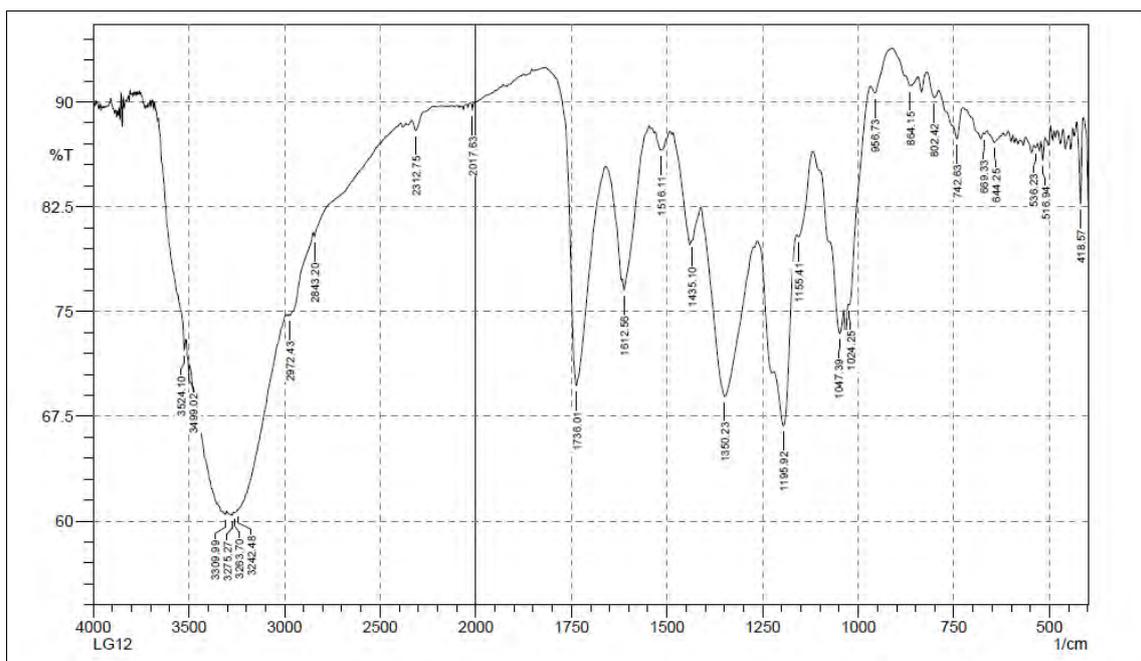


Figura 56. Espectro na região de infravermelho da substância **LG-12**

A análise do espectro de alta resolução para a substância LG-12 através da técnica de ionização *electrospray* (ESI-MS) registrado no modo negativo apresentou o pico do íon molecular em m/z 481,0667 $[M - H]^-$ (Figura 57 e 58, p. 84) compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{18}O_{14}$.

Através dos espectros de massas de alta resolução foi possível observar alguns fragmentos característicos da estrutura em ($m/z = 301,0087$ e $275,0239$). O fragmento a m/z 319,0096 foi obtido através do fechamento do anel para formação da lactona e subsequente perda de 162 u.m.a ($M^{+•} - C_6H_{10}O_5$). O fragmento a m/z 275,0239 resultante da perda de um fragmento neutro (m/z 275,0239 – CO_2). O fragmento a 300,9990 é resultante da perda de dois fragmentos neutros de 162 e 18 u.m.a ($M^{+•} - C_6H_{10}O_5 - H_2O$). A proposta de fragmentação para a substância LG-12 esta descrita na Figura 59, p. 85.

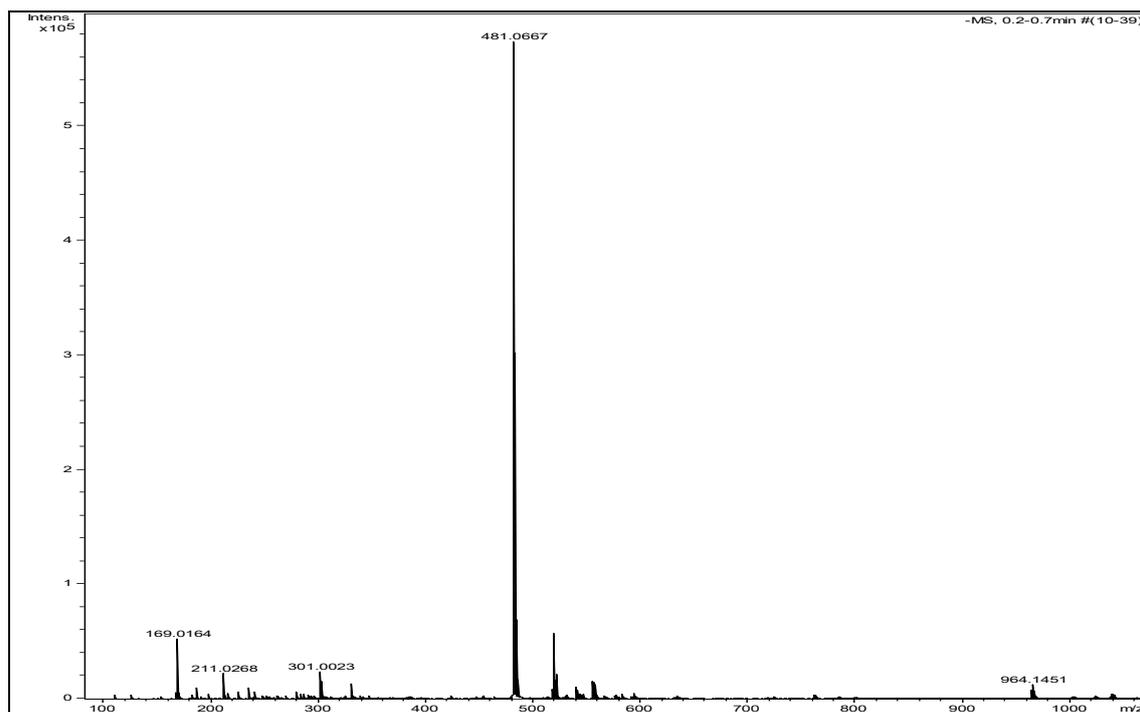


Figura 57. Espectro de massas da substância LG-12 (ESI – modo negativo)

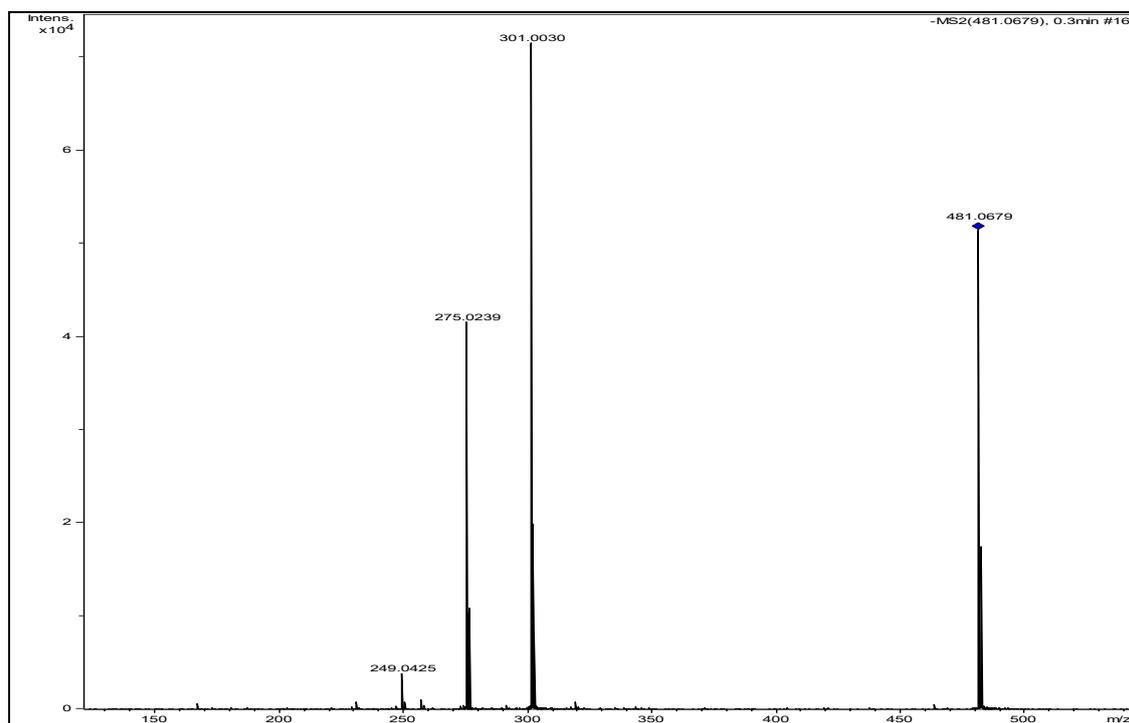


Figura 58. Espectro de massas da substância LG-12 [EM/EM do pico a $m/z = 481,0667$ (M- H)]

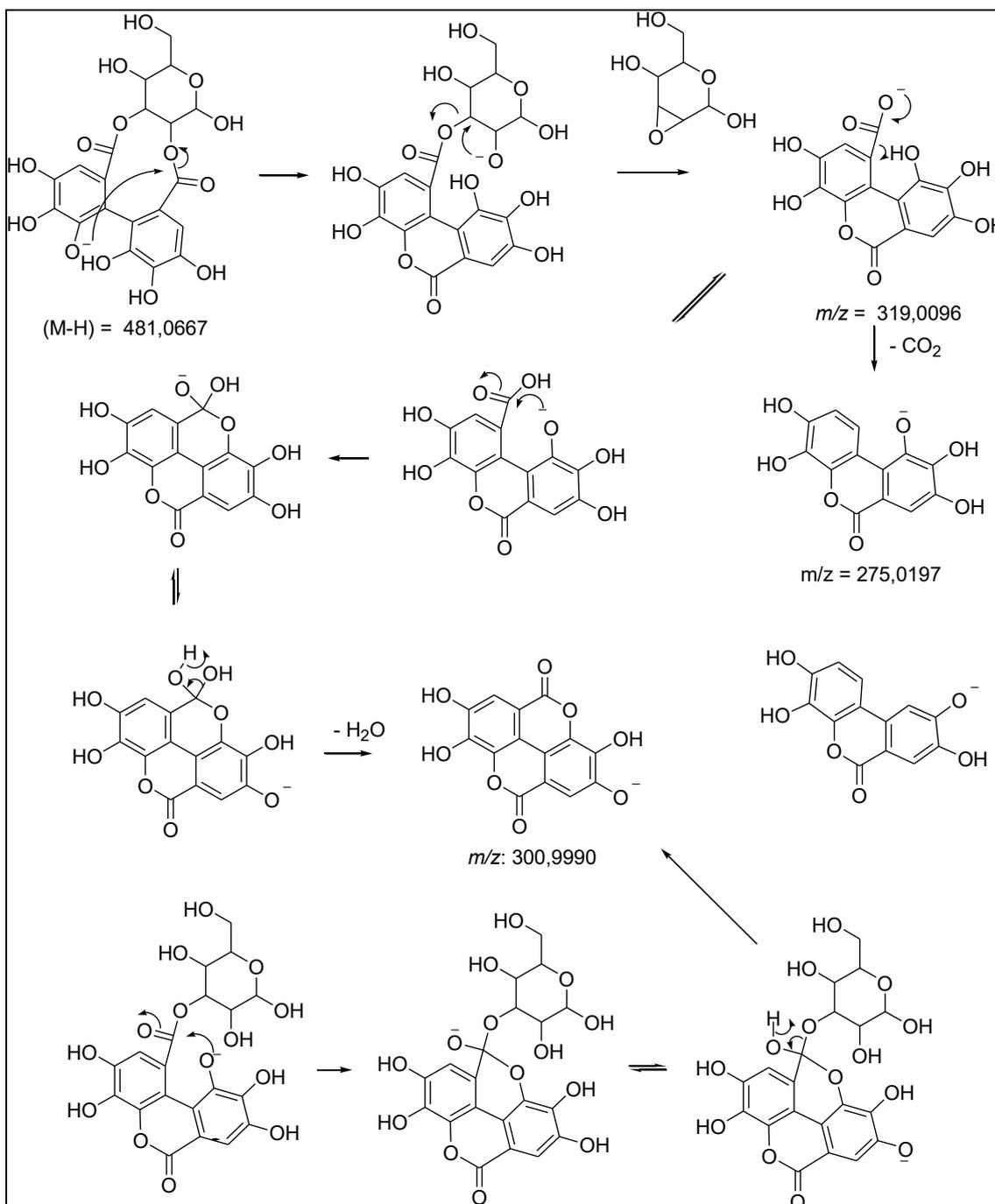


Figura 59. Proposta mecânica de fragmentação da substância **LG-12**

A análise do espectro de RMN¹H (Figura 60 a 63, p. 86 - 87) evidenciou sinais característicos de hidrogênios de resíduo de açúcar a δ_H 5,33/5,35; 4,96/4,73; 5,04; 3,75; 3,92; 3,86; e 3,46. Os sinais relativos aos hidrogênios do anel aromático a δ_H 6,68/6,67 e 6,59 /6,61 foram atribuídos aos hidrogênios H-3' e H-3".

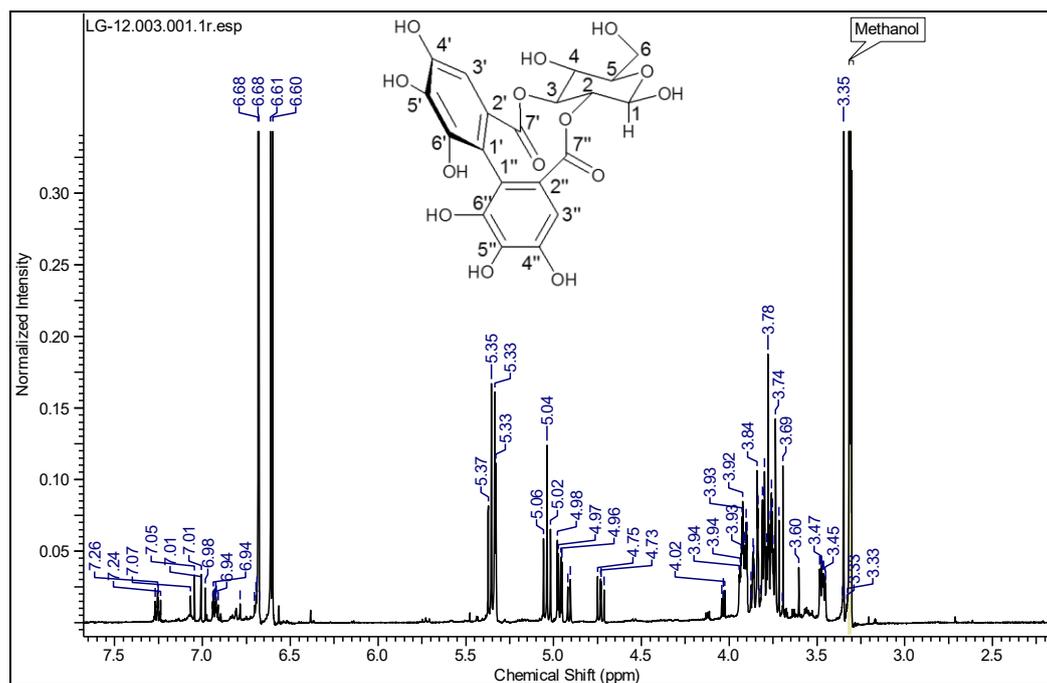


Figura 60. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância LG-12

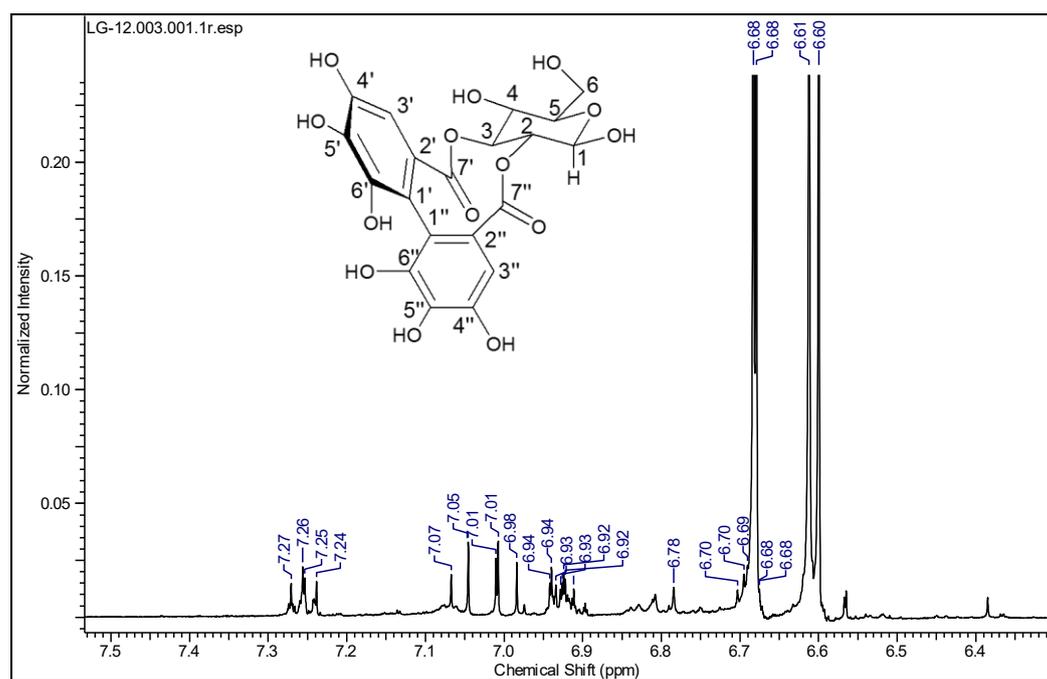


Figura 61. Ampliação das regiões entre (6,4 – 7,5 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância LG-12

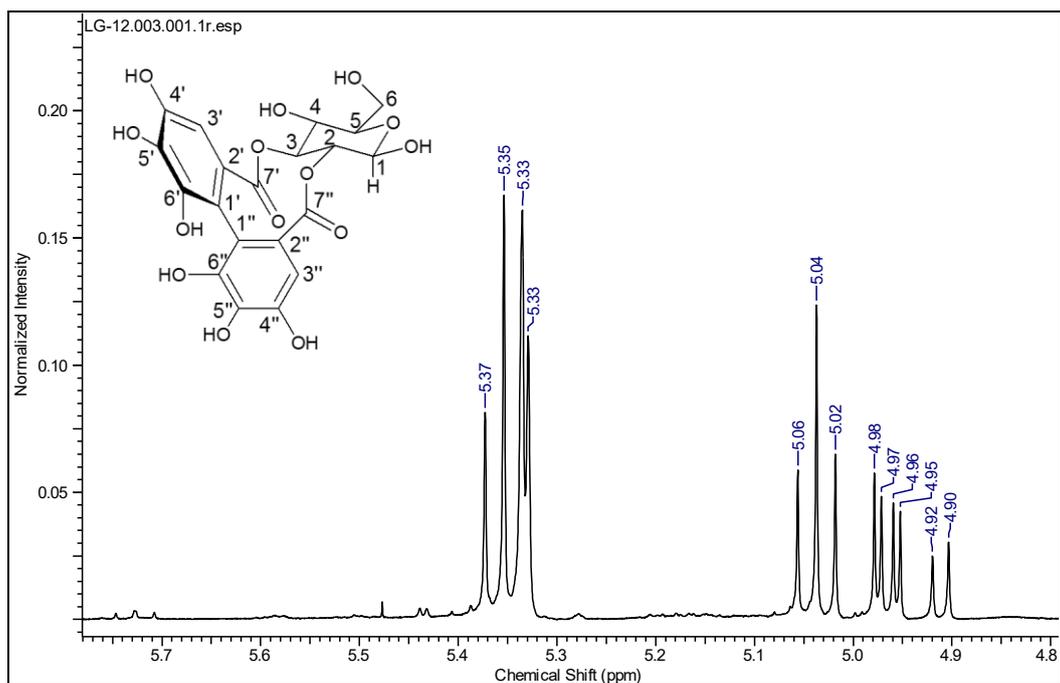


Figura 62. Ampliação das regiões entre (4,8 – 5,7 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância **LG-12**

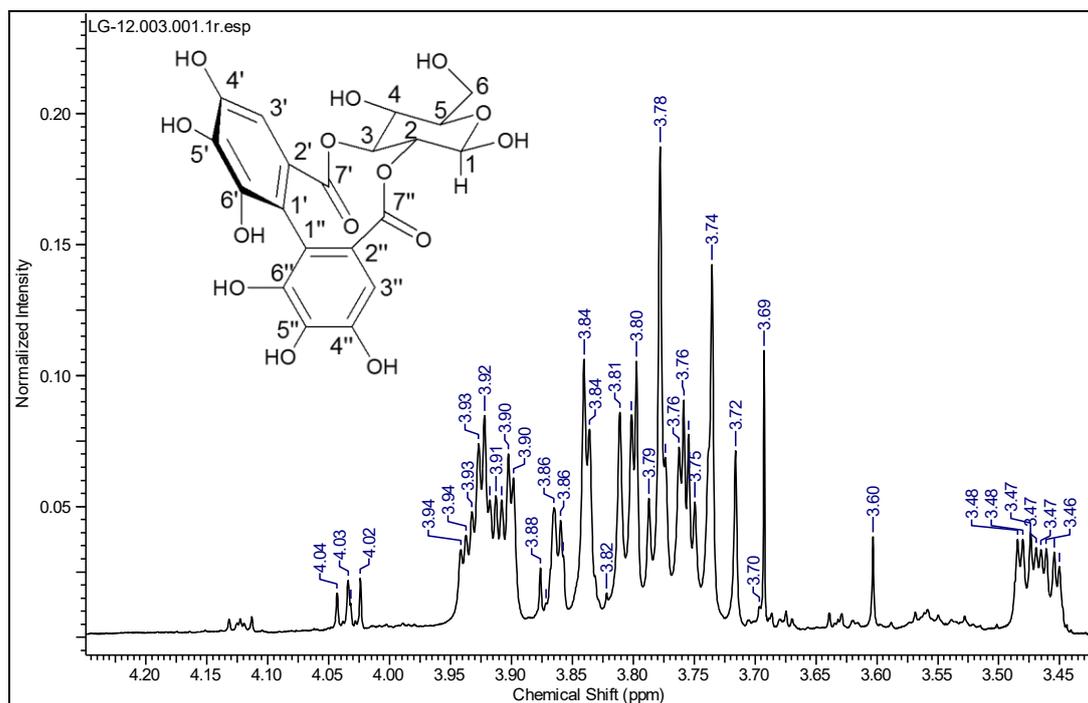


Figura 63. Ampliação das regiões entre (3,45 - 4,20 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância **LG-12**

O espectro de RMN¹³C (Figura 64) da substância LG-12 evidenciou a presença de sinais na região entre δ_C 62,22 – 171,51. Os sinais em frequência mais alta a δ_C 171,42/ 171,51 e 170,70/170,83 foram atribuídos a carbonila (C-7'e C-7''), os sinais na região entre δ_C 107,89 e 145,99 atribuídos a carbonos de anel aromático, enquanto que os na região entre δ_C 62,22 e 95,29 a resíduos de glicose.

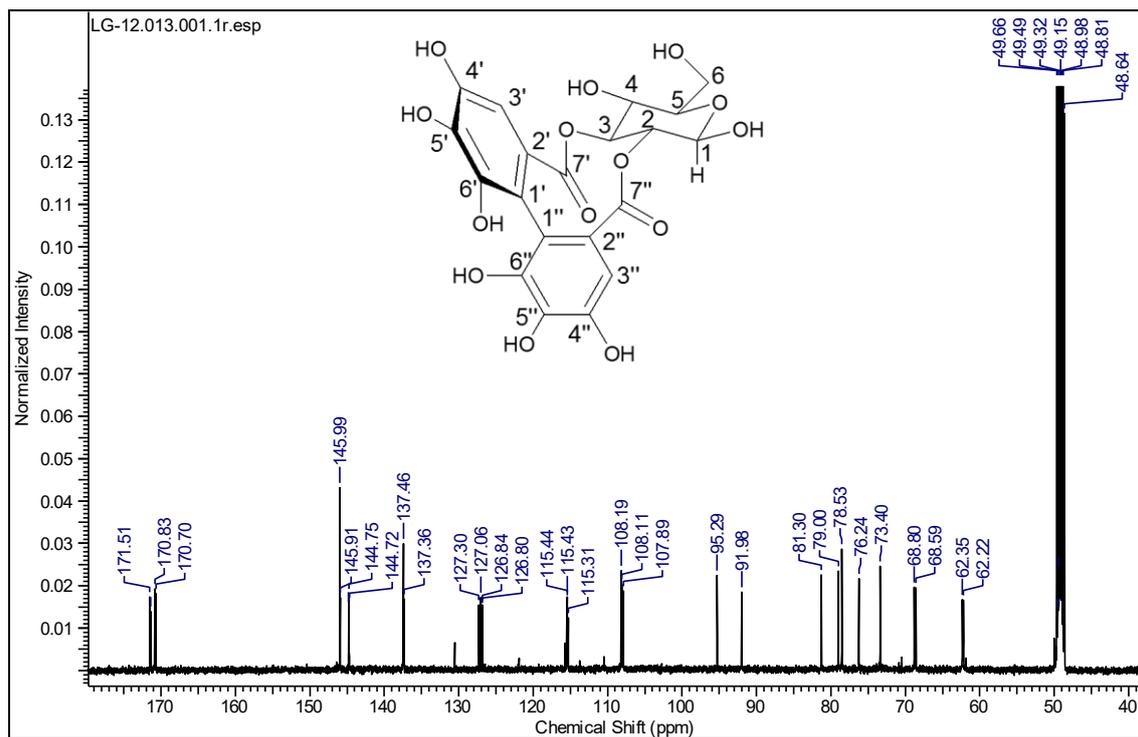


Figura 64. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, MeOD) da substância **LG-12**

Através do espectro de RMN¹³C utilizando a técnica de APT (Figura 65, p.89), foi possível atribuir o sinal a δ_C 107,89/108,11 e 108,16/108,19 aos carbonos metínicos da molécula C-3'' e C-3'. Ao resíduo de glicose foram atribuídos os sinais a δ_C 91,98/ 95,29; δ_C 73,40/76,24; δ_C 78,53/79,00; δ_C 68,59 e δ_C 68,80 relativos aos carbonos metínicos C-1; C-2; C-3; C-4 e C-5 respectivamente. O sinal a δ_C 62,22/62,35 foi atribuído ao carbono metilênico C-6 da glicose.

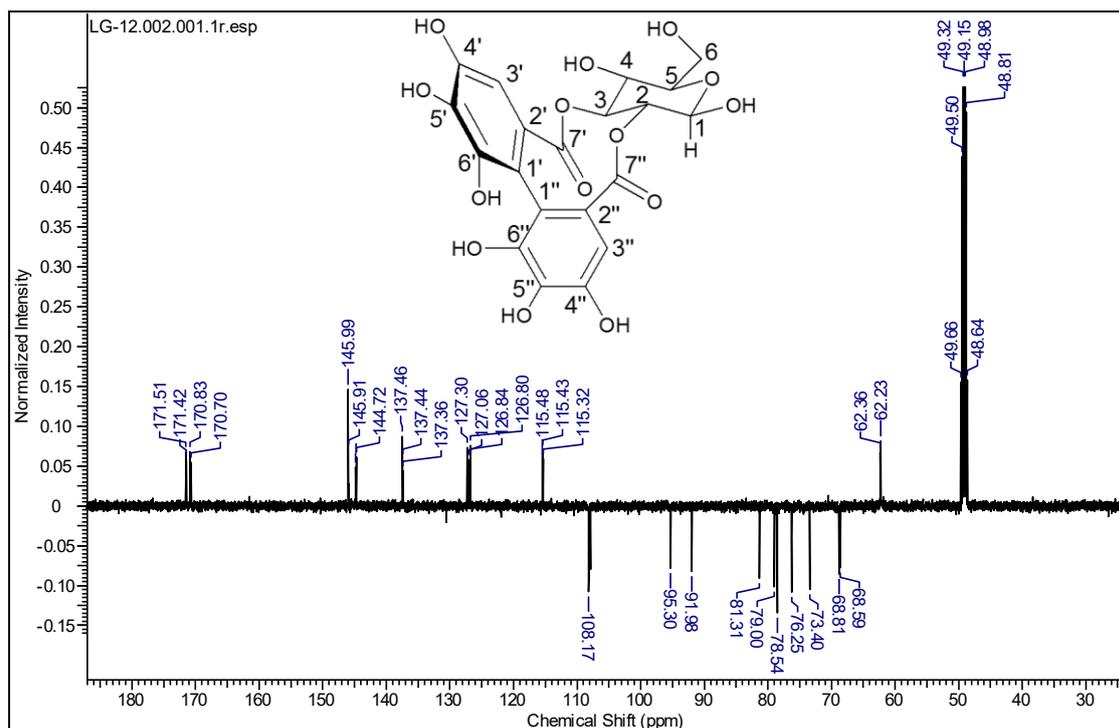


Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C - APT (125 MHz, MeOD) da substância **LG-12**

Através do mapa de correlação heteronuclear a uma ligação HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) (Figura 66, p. 90) foi possível confirmar a atribuição feita para o C-3'' (δ_{C} 107,89/108,11) através da correlação com os hidrogênios H-3'' (δ_{H} 6,59 /6,61). Foram observadas também correlações entre os carbonos C-3' (δ_{C} 107,89/108,11) e os hidrogênios H-3' (δ_{H} 6,68/6,67). Para o resíduo de glicose foram observadas as seguintes correlações: C-1 (δ_{C} 91,98) e H-1 (δ_{H} 5,35; 1H, *d*, $J = 9, 6$ Hz), C-2 δ_{C} 73,40 e H-2 (δ_{H} 4,96, *dd*, $J = 3,5$ e 9,6 Hz), C-3 (δ_{C} 79,00) e H-3 (δ_{H} 5,04, *t*, $J = 9,45$ Hz), C-4 (δ_{C} 68,59) e H-4 (δ_{H} 3,75), C-5 (δ_{C} 68,80) e H-5 (δ_{H} 3,92), C-6 (δ_{C} 62,22/62,35) e H-6 (δ_{H} 3,86/3,46).

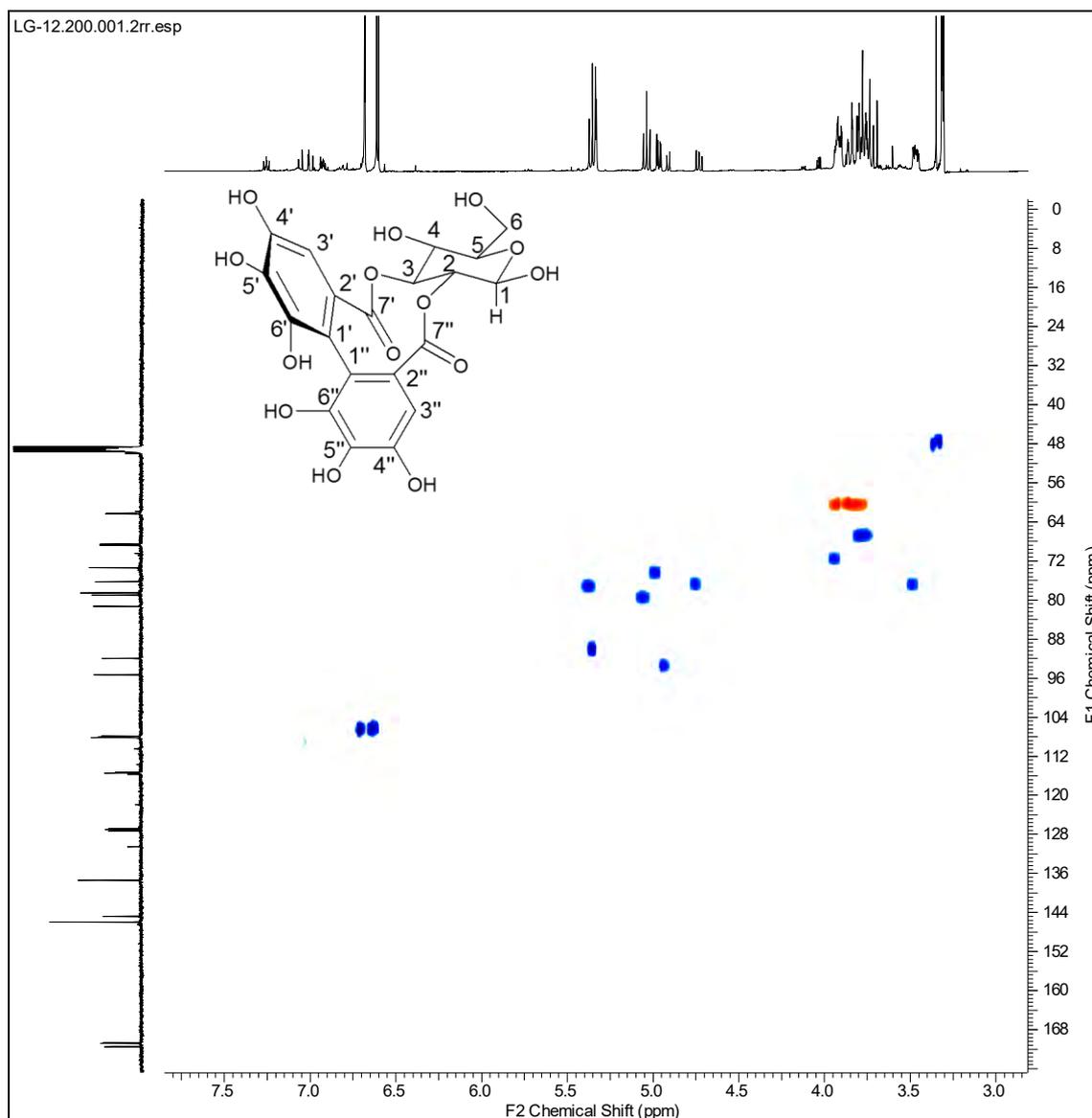


Figura 66. Espectro de HMQC da substância **LG-12**

Pelo mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC (${}^nJ_{CH}$ n= 2 e n=3) (Figura 67, p. 91) verificou-se as correlações existentes a três ligações entre os C-1' (δ_C 115,31/115,43) com o H-3' (δ_H 6,68/6,67); C-1'', (δ_C 115,44/115,47) com o H-3'' (δ_H 6,59/6,61); C-5' (δ_C 137,36/137,44) com o H3' (δ_H 6,68/6,67); C-5'' (δ_C 137,46) com o H-3'' (δ_H 6,59/6,61). Também foram observadas correlações a duas ligações entre o C-2 (δ_C 76,24) e H-1 (δ_H 5,33); C-4 (δ_C 68,59) e o H-3 (δ_H 5,04), C-3 (δ_C 78,53/79,00) e o H-2 (δ_H 4,96). Além dessas também foram observadas correlações a três ligações entre o carbono da carbonila C-7' (δ_C 171,42/ 171,51) com o hidrogênio H-3 (δ_H 5,04). As correlações observadas auxiliaram na confirmação da estrutura da molécula.

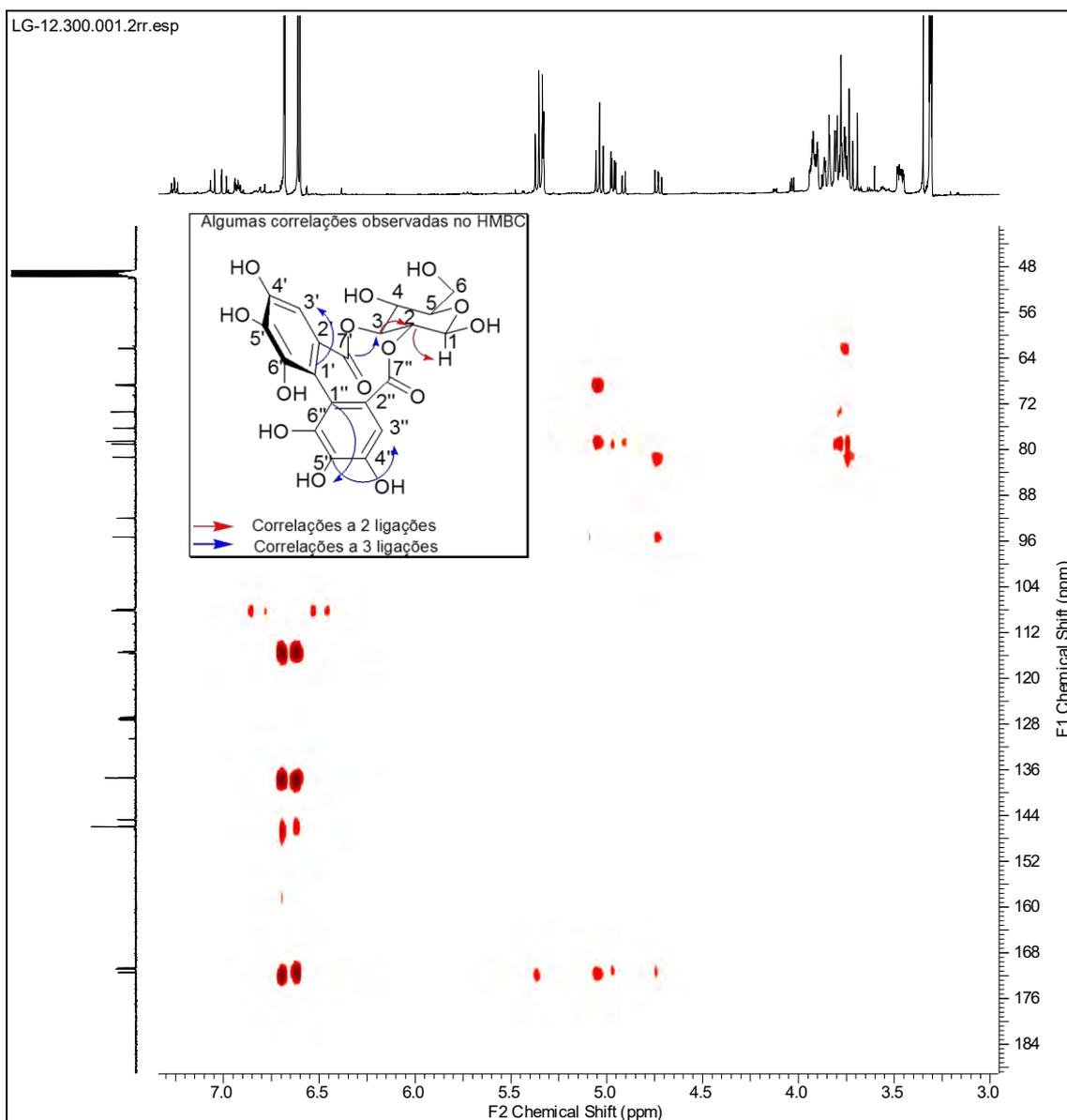


Figura 67. Espectro de HMBC da substância LG-12

Com base na discussão acima, e dos dados descritos na literatura (Jossang et al., 1994) foi proposto para a substância LG-12 a estrutura do 2,3-(S)-hexaidroxidifenoil-D-glicose (Figura 68). Os deslocamentos químicos atribuídos para a substância LG-12, estão resumidos na Tabela 7, p. 93.

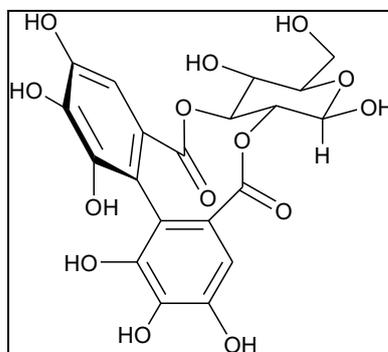


Figura 68. Estrutura da substância (LG-12) 2,3- (R)- hexaidroxidifenoil-D-glicose

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LG-12, utilizando MeOD como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).

LG- 12					*Literatura (Me ₂ CO-d ₆)	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
Glicose (isômero 1 α / isômero β)						
1	91,98/ 95,29	5,33/5,35 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,9 e 9, 6 Hz)	-	-	89,7	5,35 (<i>d</i>) <i>J</i> = 3,5 Hz
2	73,40/ 76,24	4,96/4,73 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,5 e 9,6/1,4 e 8,1 Hz)	H-1	-	73,1	4,85 (<i>dd</i>) <i>J</i> = 3,5 e 9 Hz/ 4,63 (<i>t</i>) <i>J</i> =9 Hz
3	78,53/ 79,00	5,04 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9,45 Hz)	H-2	-	75,6	5,22 (<i>t</i>) <i>J</i> = 9 Hz/ 4,95 (<i>t</i>) <i>J</i> = 9 Hz
4	68,59	3,75 (<i>m</i>)	H-3	-	70,7	3,73 (<i>t</i>) <i>J</i> = 9 Hz/ 3,69 (<i>t</i>) = 9 Hz
5	68,80	3,92 (<i>m</i>)	-	-	70,8	3,90 (<i>m</i>)/ 3,50 (<i>m</i>)
6	62,22/ 62,35	3,86 (<i>m</i>), 3,46 (<i>m</i>)	-	-	64,8	3,87 (<i>m</i>) e 3,37 (<i>m</i>)
2,3-hexaidroxidifenoil (isômero 1 α / isômero β)						
1'	115,31/ 115, 43	-	-	H-3'	114,3	
1''	115,44/ 115,47	-	-	H-3''	114,6	
2'	127,06/ 127,30	-	-	-	126,1	
2''	126,80/ 126,84	-	-	-	123,9	
3'	107,89/ 108,11	6,68/6,67 (1H, <i>s</i>)	-	-	107,1	6,64/6,98 (<i>s</i>)
3''	108,16/ 108,19	6,59 /6,61(1H, <i>s</i>)	-	-	107,9	6,58/6,59 (<i>s</i>)
4'	145,91/ 145,99	-	-	-	145,1	
4''	145,91/ 145,99	-	-	-	145,1	
5'	137,36/ 137,44	-	-	H-3'	136,2	
5''	137,46	-	-	H-3''	136,2	
6'	145,91/ 145,99	-	-	-	145,1	
6''	144,72/ 144,85	-	-	-	144,2	
7'	171,42/ 171,51	-	-	H-3	168,1	
7''	170,70/ 170,83	-	-	-	168,6	

*(Jossang et al., 1994)

4. 4. 2. 4. Determinação estrutural da substância LG-20

A substância LG-20 isolada do extrato em MeOH/H₂O e do extrato em MeOH apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarela, solúvel em MeOH.

No espectro de infravermelho (Figura 69) da substância LG-20 foi observada, bandas em 3385 e 1722 cm⁻¹, referentes à absorção de grupos OH e de C=O, respectivamente.

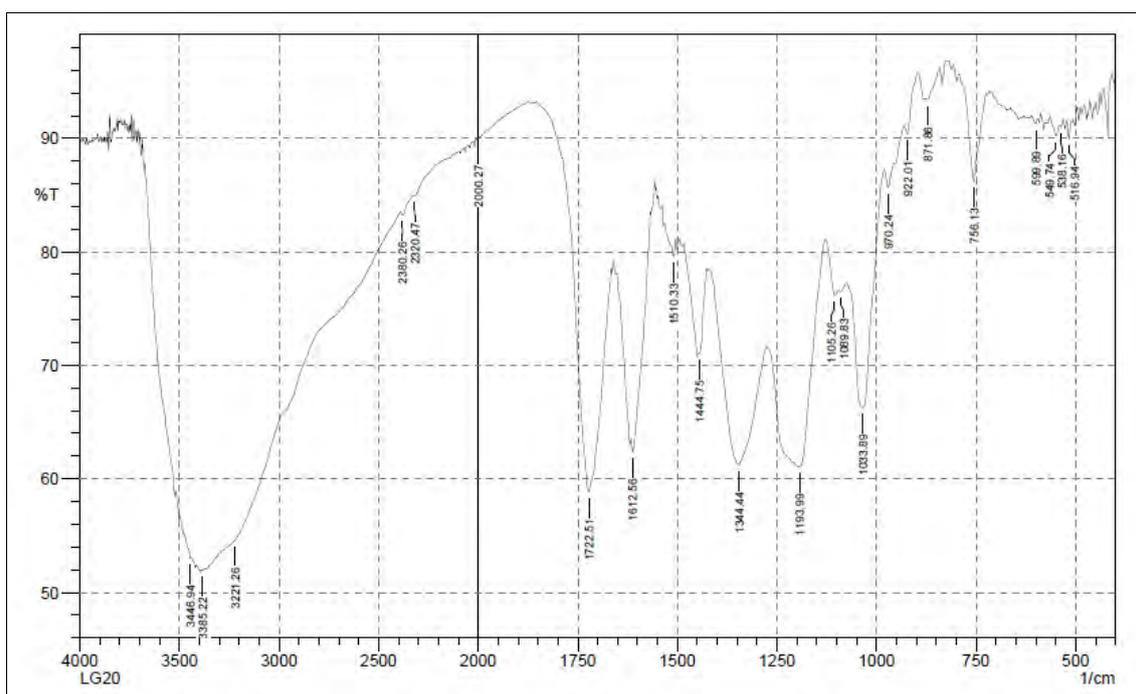


Figura 69. Espectro na região de infravermelho da substância **LG-20**

O espectro de massas ESI-EM/EM da substância LG-20 apresentou padrão de fragmentação característico de taninos elágicos. O espectro de massas apresentado na Figura 70, p. 94, mostra um fragmento iônico $[M - H]^-$ a $m/z = 633, 0810$ compatível com a fórmula molecular C₂₇H₂₂O₁₈. O espectro de EM/EM (Figura 71, p. 94) da substância mostra um fragmento iônico a $m/z = 463$ $[M - 170 - H]^-$ relativo à perda de uma molécula de ácido gálico (C₇H₅O₅) e a $m/z = 301$ $[M - 332 - H]^-$ relativo a perda de uma molécula de galoilglicose (C₁₃H₁₆O₁₀). Na Figura 72, p. 96, apresenta-se a proposta de fragmentação da substância LG-20.

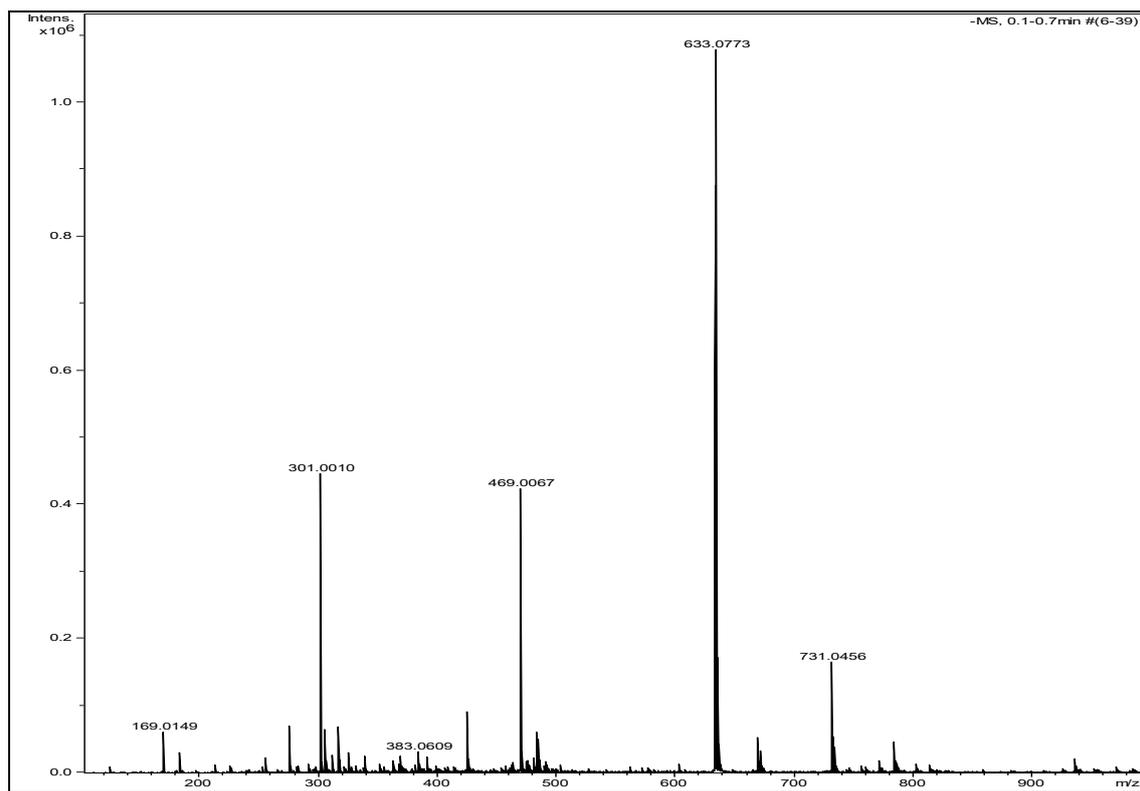


Figura 70. Espectro de massas da substância **LG-20** (ESI – modo negativo)

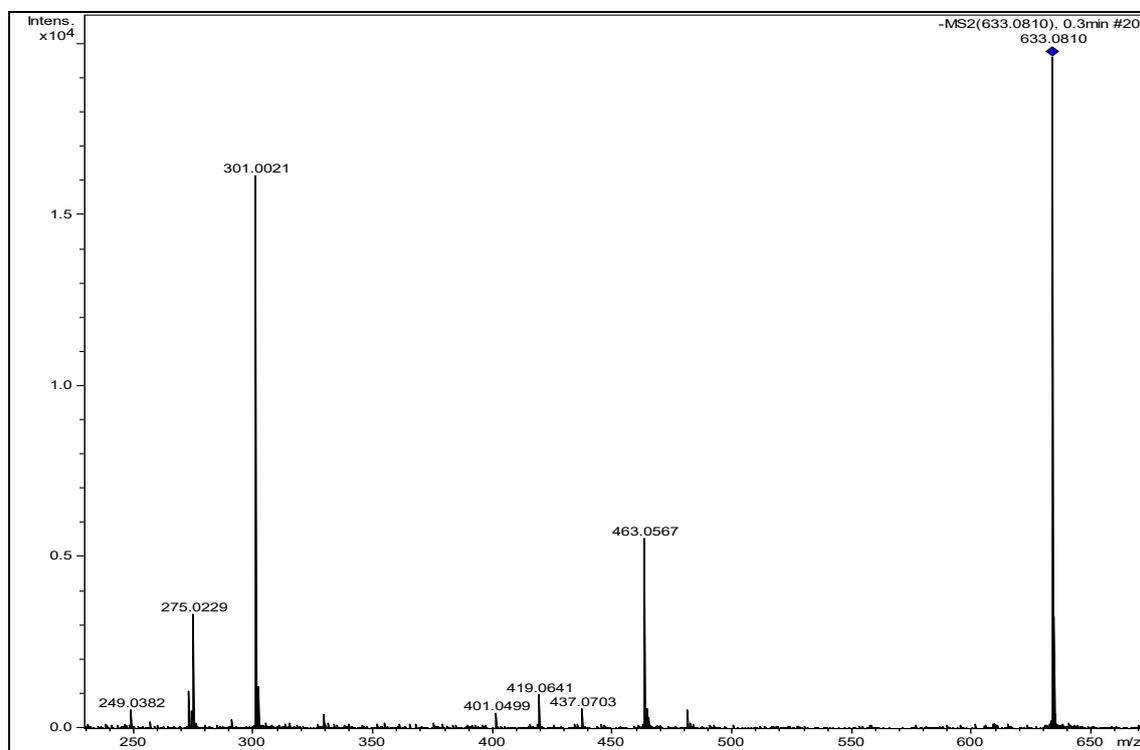


Figura 71. Espectro de massas da substância **LG-20** [EM/EM do pico a m/z = 633 ($M-H$)⁻]

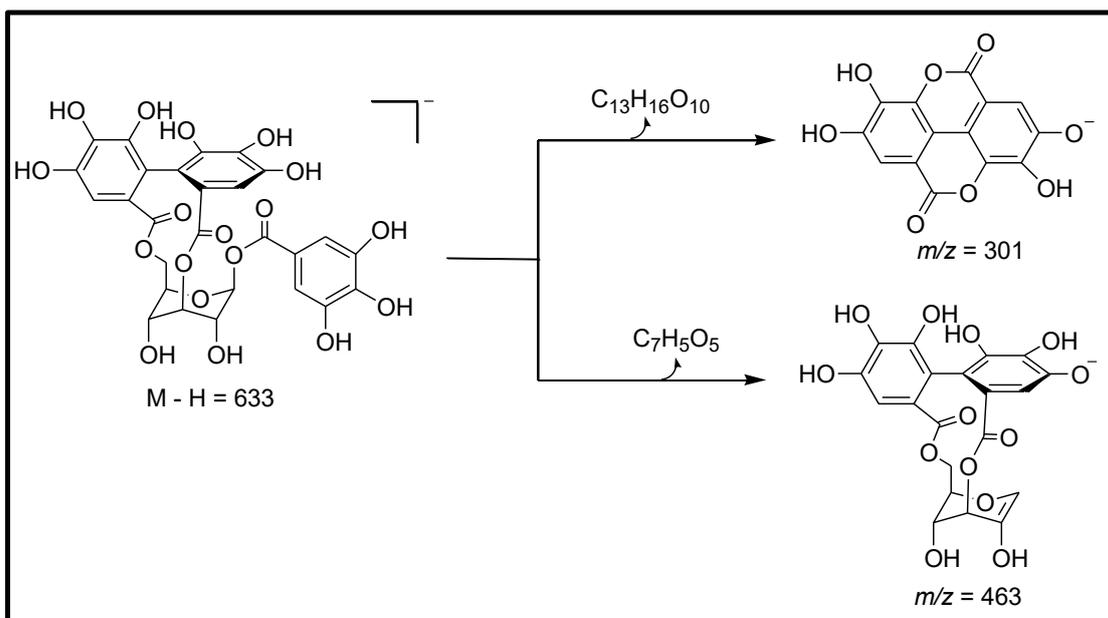


Figura 72. Principais fragmentos verificados no EM da substância **LG-20**

O espectro de RMN 1H (Figura 73 a 75, p. 96 e 97) apresenta sinais de hidrogênios aromáticos a δ_H 7,06, 6,69 e 6,66. Foram observados também sinais característicos de resíduos de glicose na região entre (δ_H 3,99 - 4,17) além de um sinal duplo a (δ_H 6,36, *d*, $J = 1,6$) atribuído a hidrogênio anomérico.

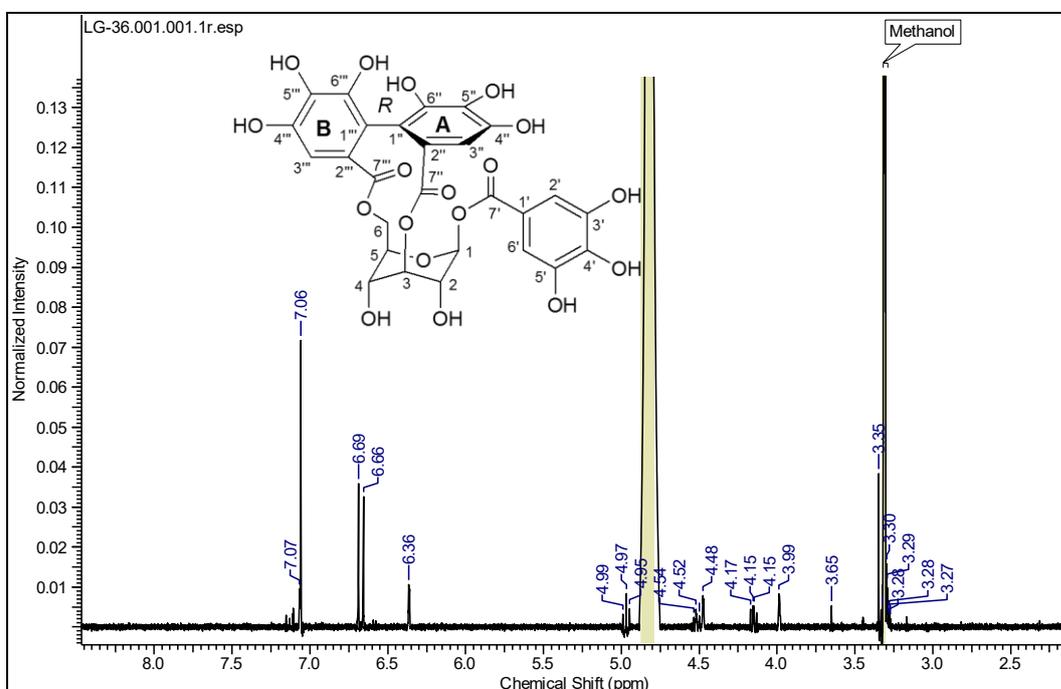


Figura 73. Espectro de RMN 1H (500 MHz, MeOD) da substância **LG-20**

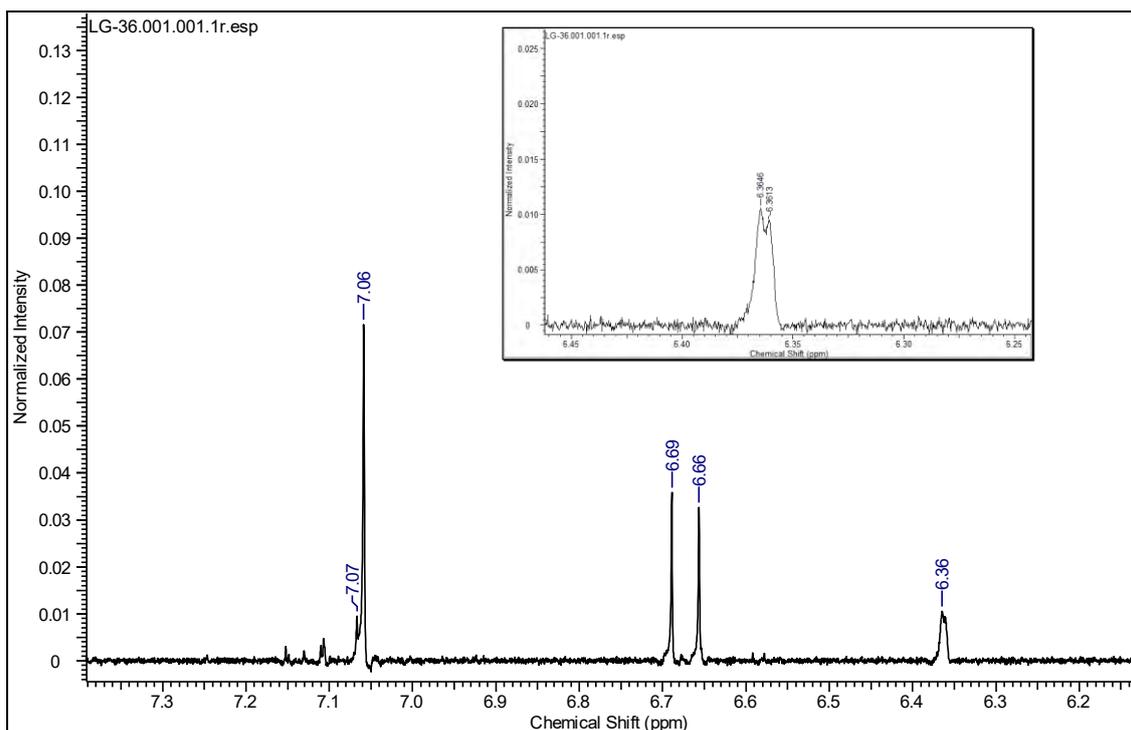


Figura 74. Ampliação das regiões entre (6,2 – 7,3 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância **LG-20**

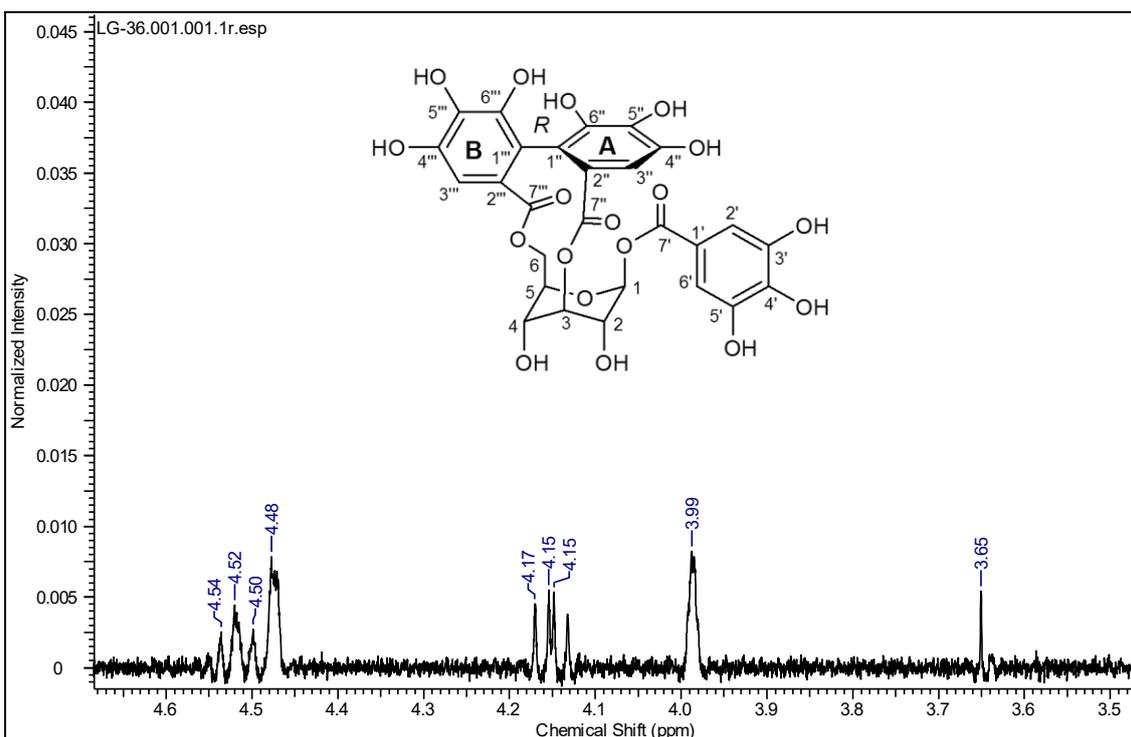


Figura 75. Ampliação das regiões entre (3,5 – 4,6 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância **LG-20**

A presença dos grupos galoi e hexaidrodifenoi foi evidenciada através do espectro de RMN de ^{13}C e RMN ^{13}C - APT (Figura 76 - 78, p. 98 e 99)

através dos sinais característicos de carbonila de ésteres a δ_C 170,31; 168,14 e 166,88 além de apresentar também sinais relativos a carbonos fenólicos na região entre (δ_C 145,61 - 146,55).

O espectro de RMN¹³C - APT (Figura 78, p. 99) revelou os sinais dos carbonos metínicos do resíduo de glicose a C-1 (δ_C 95,16); C-2 (δ_C 69,62); C-3 (δ_C 71,77); C-4 (δ_C 62,63) e C-5 (δ_C 76,36). Observou-se também o sinal de carbono metilênico (δ_C 65,15) atribuído ao carbono C-6 do resíduo de glicose além dos sinais de carbonos metínicos C-3'' (δ_C 110,32) e C-3''' (δ_C 108,42).

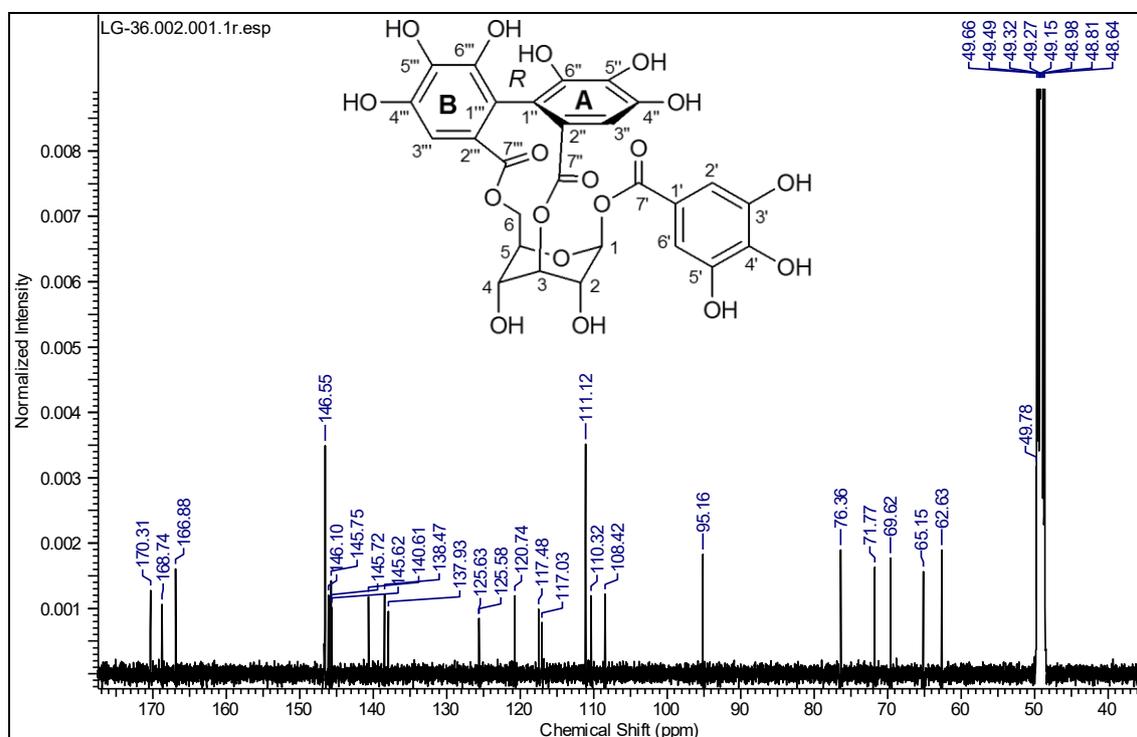


Figura 76. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, MeOD) da substância LG-20

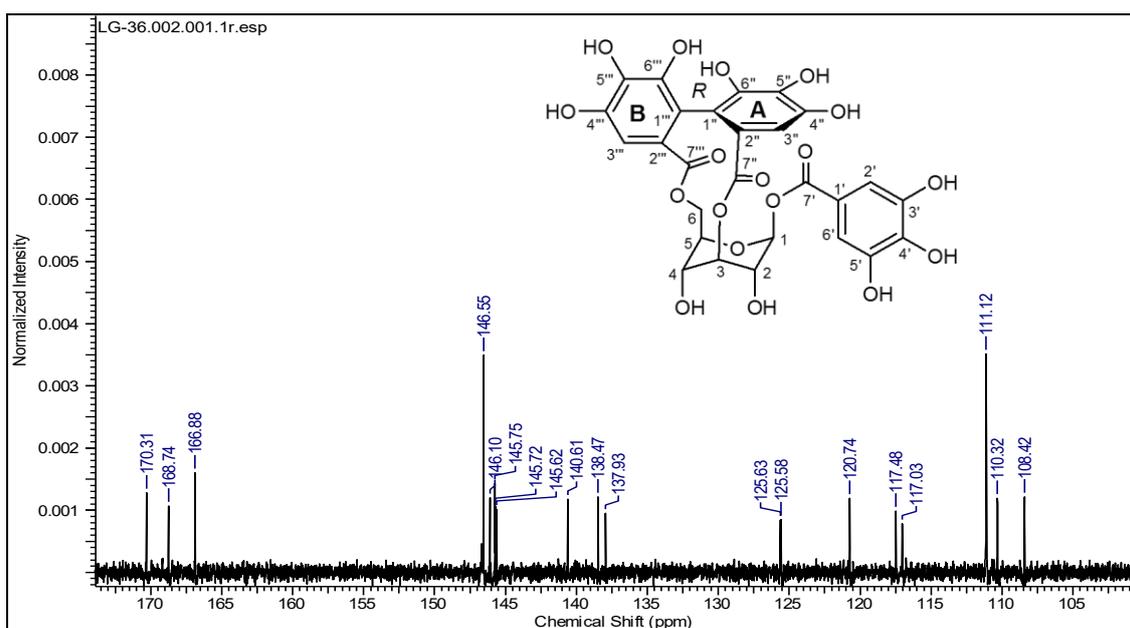


Figura 77. Ampliação das regiões entre (105 – 170 ppm) do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD) da substância LG-20

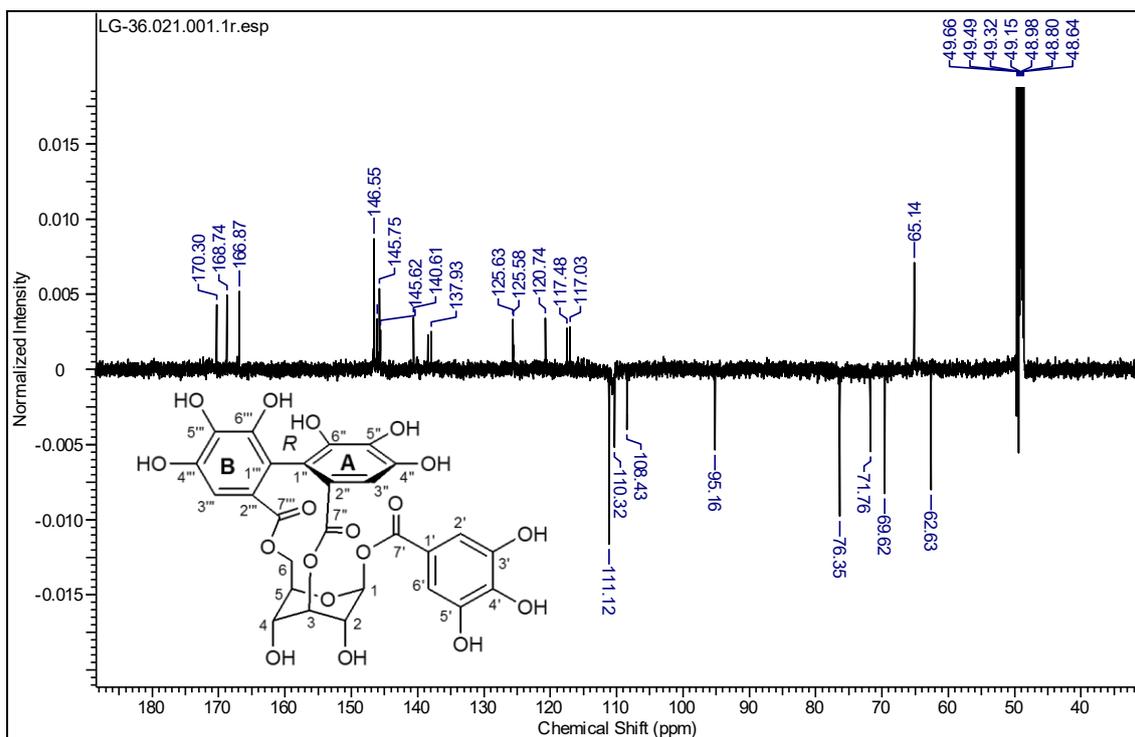


Figura 78. Espectro de RMN ^{13}C - APT (125 MHz, MeOD) da substância LG-20

O mapa de correlação heteronuclear HMQC a uma ligação ($^1J_{\text{CH}}$) (Figura 79 e 80, p. 100 e 101) traz informações da correlação entre o hidrogênio

diretamente ligado ao carbono, o que permitiu confirmar as atribuições feitas com base nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C – APT por meio das correlações observadas entre os carbonos e hidrogênios do resíduo de glicose: C-1 (δ_{C} 95,16) e H-1 (δ_{H} 6,36), C-2 (δ_{C} 69,39) e H-2 (δ_{H} 3,99), C-3 (δ_{C} 71,77) e H-3 (δ_{H} 4,81), C-4 (δ_{C} 62,63) e H-4 (δ_{H} 4,47), C-5 (δ_{C} 76,36) e H-5 (δ_{H} 4,52).

Foi possível observar também correlações entre os carbonos metilênicos C-6 (δ_{C} 65,15) e H-6 (δ_{H} 4,15 / 4,97). Além das correlações entre: C-2' (δ_{C} 111,12) e H-2' (δ_{H} 7,06); C-3'' (δ_{C} 110,32) e H-3'' (δ_{H} 6,68); C-3''' (δ_{C} 108,42) e H-3''' (δ_{H} 6,66).

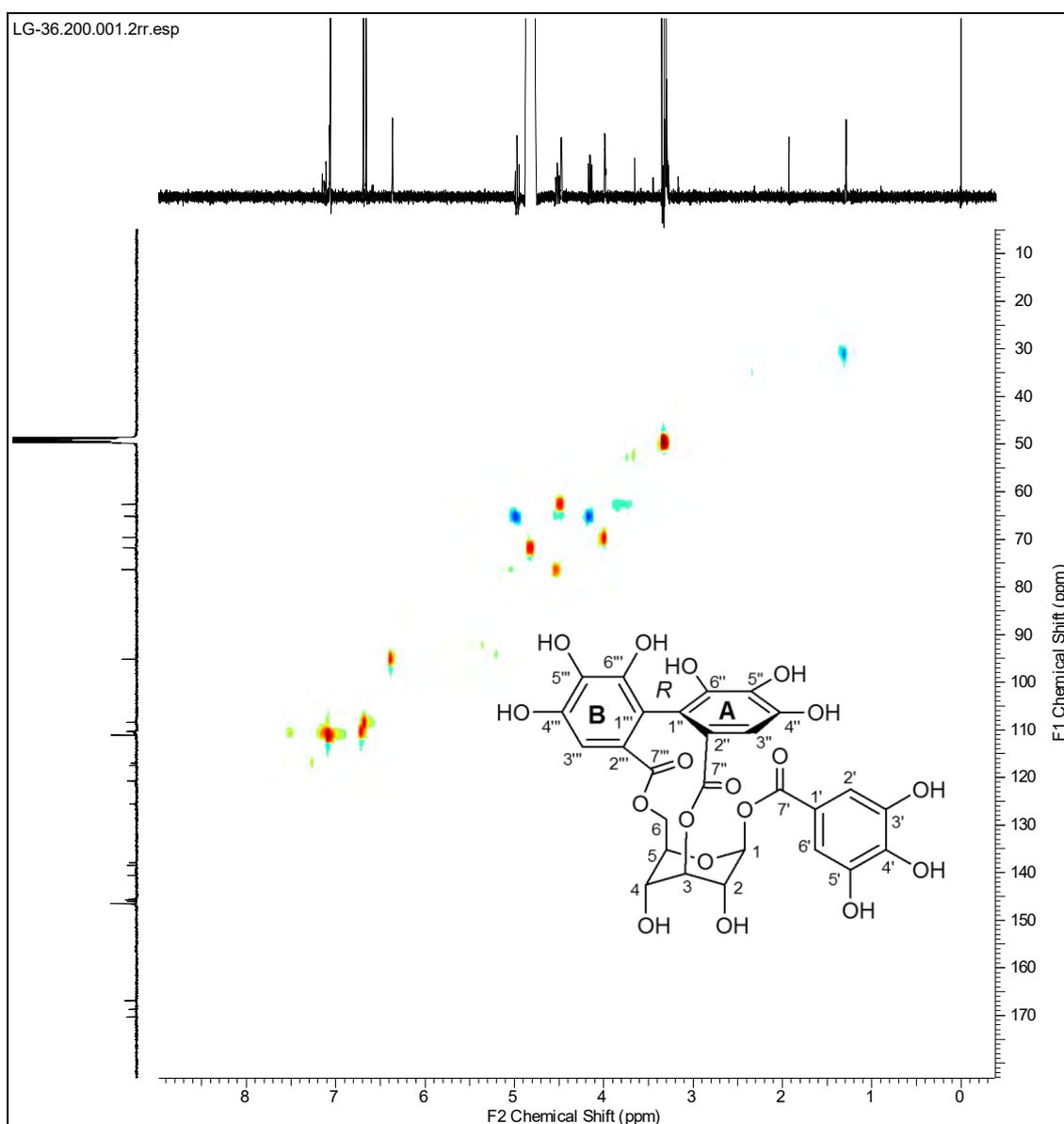


Figura 79. Espectro de HMQC da substância LG-20

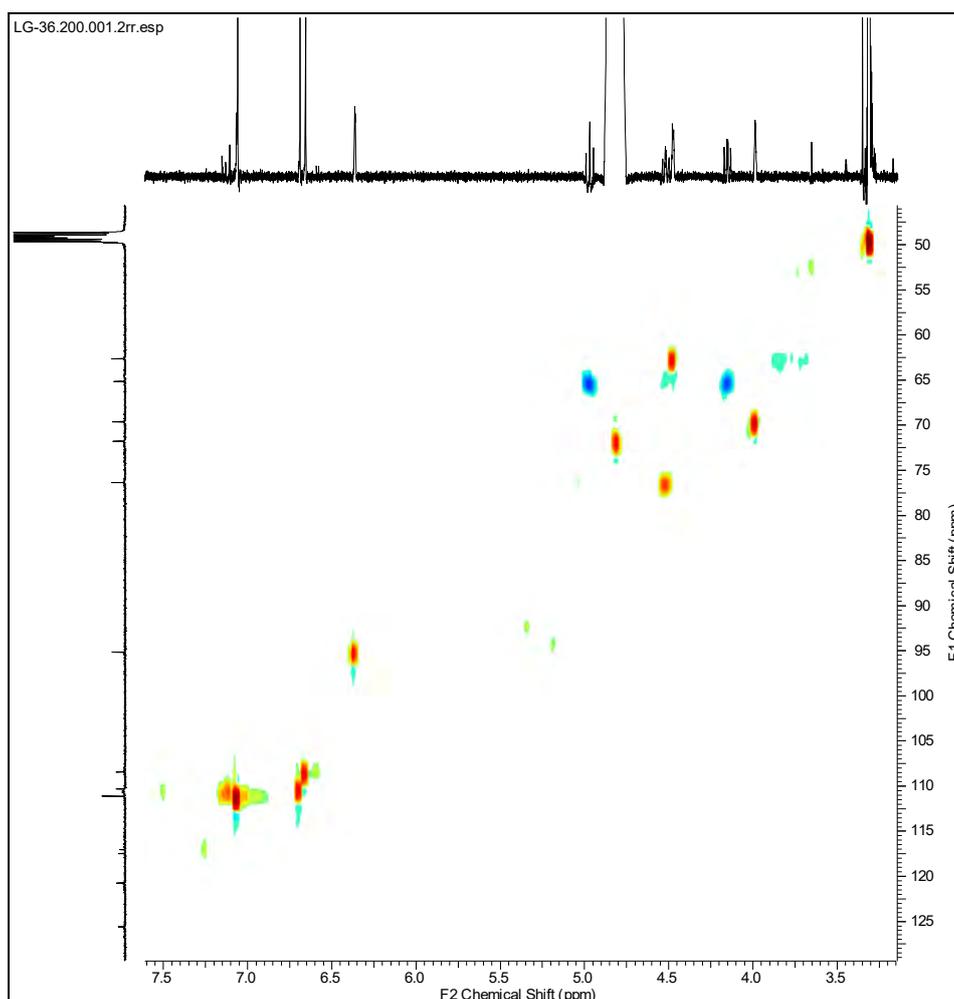


Figura 80. Ampliação do Espectro de HMQC da substância **LG-20**

O mapa de contorno de correlação heteronuclear a longa distância HMBC ($^nJ_{\text{CHn}} = 2$ e $n=3$) (Figura 81 e 82, p.102 e 103) permitiu correlacionar de os pontos de ligação da substância através de correlações a duas ligações entre: C-3' ($\delta_{\text{C}} 146,10$) e H-2' ($\delta_{\text{H}} 7,06$). Observaram-se correlações do resíduo de glicose entre C-5 ($\delta_{\text{C}} 76,36$) e H-6 ($\delta_{\text{H}} 4,97$), C-4 ($\delta_{\text{C}} 62,63$) e H-5 ($\delta_{\text{H}} 4,52$), C-6 ($\delta_{\text{C}} 65,15$) e H-5 ($\delta_{\text{C}} 4,52$), C3 ($\delta_{\text{C}} 71,77$) e H2 ($\delta_{\text{H}} 3,99$).

Foi possível verificar correlações a três ligações entre C5'' ($\delta_{\text{C}} 138,47$) e H3'' ($\delta_{\text{H}} 6,68$), C1'' ($\delta_{\text{C}} 117,48$) e H3'' ($\delta_{\text{H}} 6,68$), C1''' ($\delta_{\text{C}} 117,03$) e H3''' ($\delta_{\text{H}} 6,66$), C7'' ($\delta_{\text{C}} 168,74$) e H3'' ($\delta_{\text{H}} 6,68$), C7''' ($\delta_{\text{C}} 170,31$) e H3''' ($\delta_{\text{H}} 6,66$). Verificou-se a correlações entre o C7''' ($\delta_{\text{C}} 170,31$) da carbonilla e o H6 ($\delta_{\text{H}} 4,97$) da glicose indicando o ponto de ligação da molécula de glicose com o

hexaidrodifenol, além das correlações da glicose a três ligações entre C6 (δ_C 76,36) e H1 (δ_H 6,36), C1 (δ_C 95,16) e H5 (δ_H 4,52) e o C4 (δ_C 62,13) e H6 (δ_H 4,15).

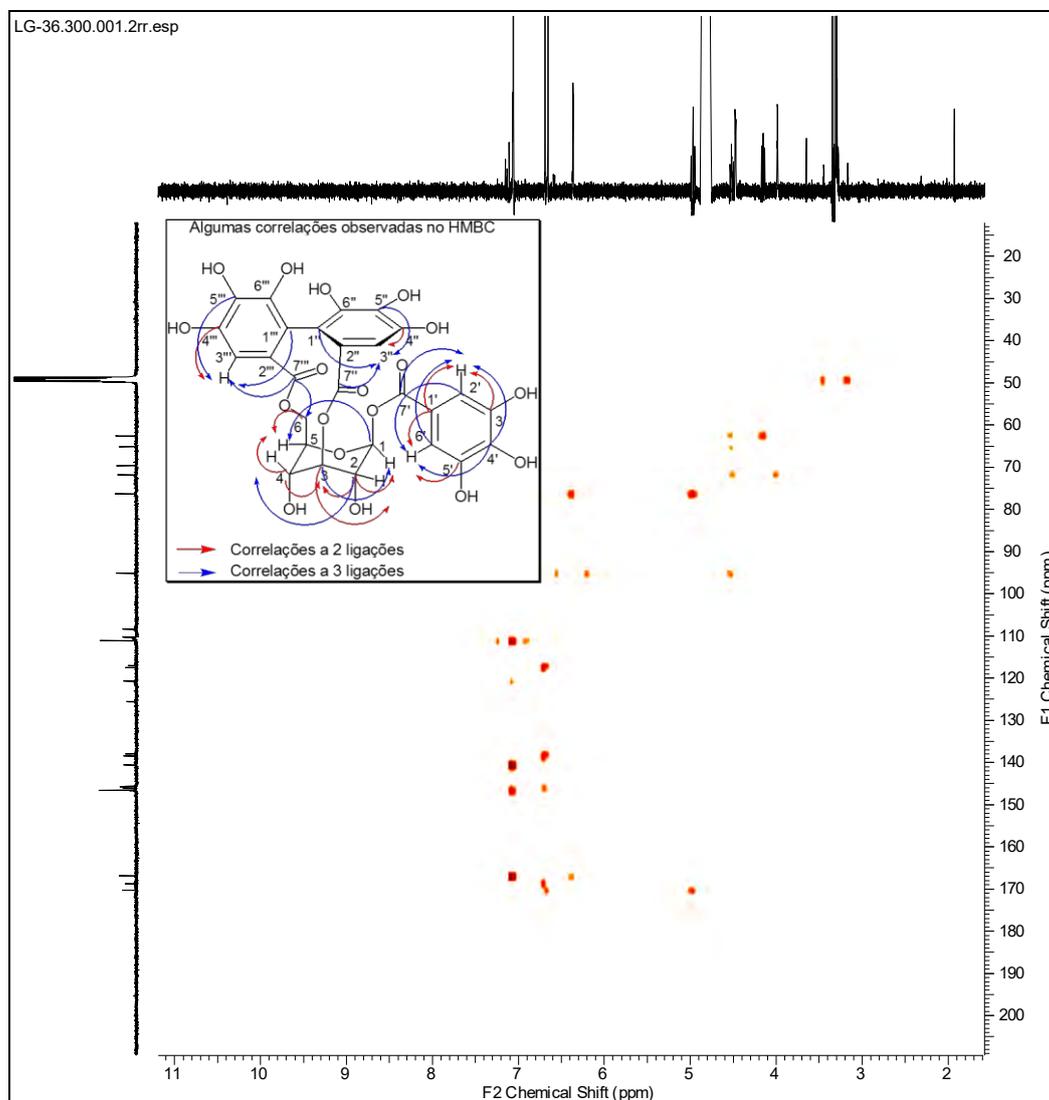


Figura 81. Espectro de HMBC da substância LG-20

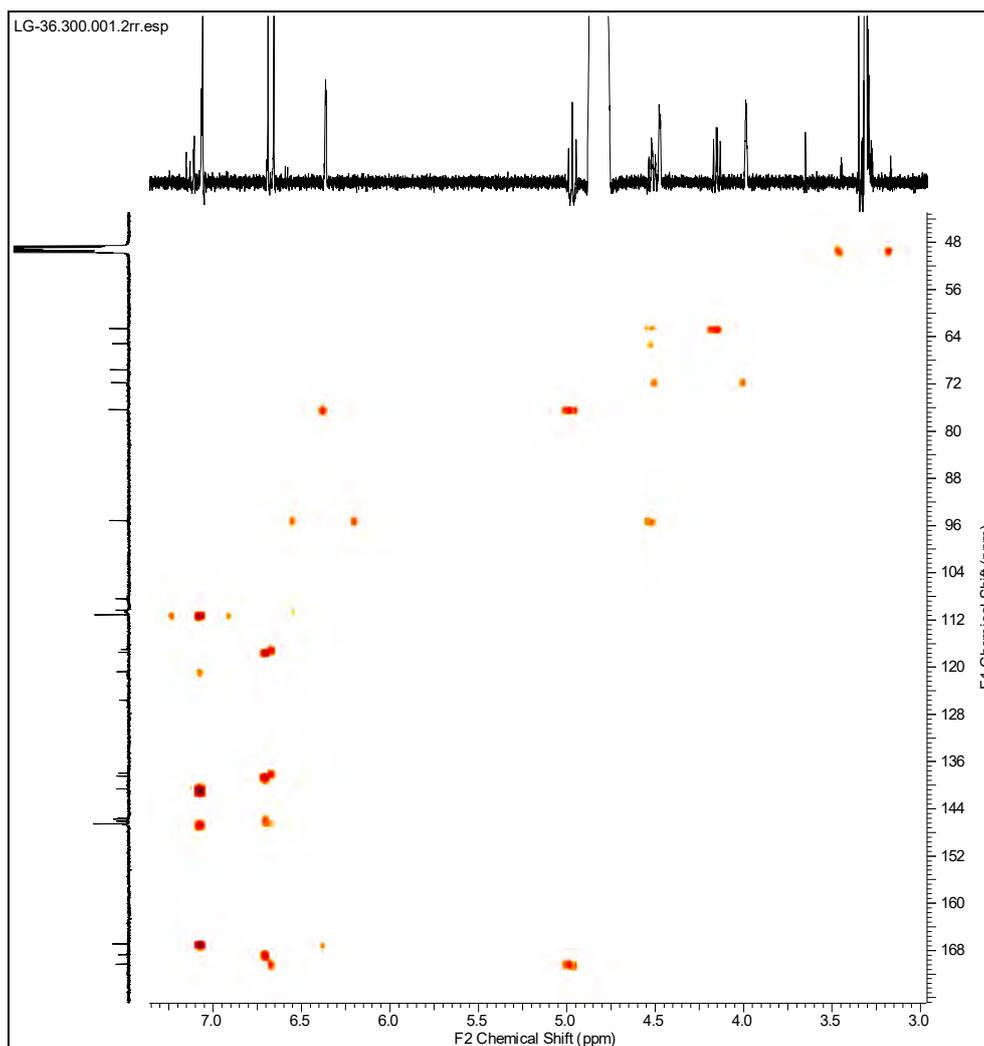


Figura 82. Ampliação do espectro de HMBC da substância **LG-20**

Os sinais relativos a hidrogênios aromáticos e resíduos de glicose, observados no espectro de RMN¹H, com a análise dos dados de RMN¹³C onde se observou os sinais dos grupos galoiil e hexaidroxidifenoil, dados da literatura e juntamente com o espectro de massas que exibiu pico do íon molecular a m/z 633,0773 [M – H]⁻ entre outros, permitiram confirmar a estrutura da substância LG-20 como sendo a do elagitanino β-1-O-galoiil-3,6-(R)-hexaidroxidifenoil-D-glucose conhecida como corilagina (Figura 83, p. 104). Os deslocamentos químicos atribuídos para a substância LG-20 estão resumidos na Tabela 8, p. 104.

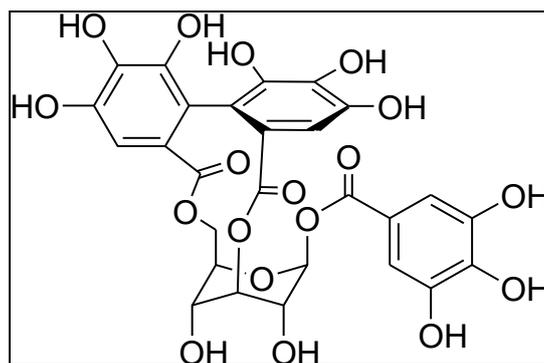


Figura 83. Estrutura da substância (**LG-20**) β -1-O-galoil-3,6-(R)-hexahidroxidifenoil-D-glicose, (corilagina).

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância **LG-20**, utilizando MeOD como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).

LG-20					*Literatura (MeOD/CD ₃ OD)	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
Glicose						
1	95,16	6,36 (1H, <i>d</i> , $J = 1,9$ Hz)	-	H-5, H-3, H-2	95,1	6,36 (<i>s</i>)
2	69,62	3,99 (1H, <i>dd</i> , $J = 1,99$ e $3,84$ Hz)	H-1, H-3	H-4	69,4	4,05 (<i>s</i>)
3	71,77	4,81 (1H, <i>s</i>)	H-4, H2	H-1, H5	71,6	4,82 (<i>s</i>)
4	62,63	4,47 (1H, <i>s</i>)	H-3, H-5	1H-6, H-2	62,5	4,45 (<i>s</i>)
5	76,36	4,52 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,15$ e $10,7$ Hz)	2H-6, H-4	H-1, H-3	76,2	4,52 (<i>dd</i> , $J = 9,5$ e 11,5)
6	65,15	4,97 (1H, <i>t</i> , $J =$ $10,9$ Hz)	H-5	-	75,0	4,96 (<i>t</i> , $J = 11,5$ Hz)
		4,15 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,0$ e $11,05$ Hz)				4,09 (<i>dd</i> , $J = 8,0$ e 11 Hz)
Galoil						

1'	120,744	-	H-2', H-6'	-	120,7	-
2'	111,12	7,06 (2H, s)	-	H-6'	111,0	7,10 (2H, s)
3'	146,10	-	H-2'	-	146,4	-
4'	140,61	-	-	H-2', H-6'	140,4	-
5'	146,55	-	H-6'	-	146,4	-
6'	111,12	-	-	H-2'	111,0	-
7'	166,88	-	-	H-1, H-2', H-6'	-	-
Anel A e Anel B						
1''	117,48	-	-	H-3''	117,3	-
2''	125,58*	-	-	-	125,5	-
3''	110,32	6,68 (1H, s)	-	-	110,3	6,68
4''	145,72	-	H-3''	-	145,7	-
5''	138,47	-	-	H-3''	138,3	-
6''	145,62**	-	-	-	145,5	-
7''	168,74	-	-	H-3, H-3''	168,7	-
1'''	117,03	-	-	H-3'''	116,8	-
2'''	125,58*	-	-	-	125,6	-
3'''	108,42	6,66 (1H, s)	-	-	108,4	6,65
4'''	146,10	-	H-3'''	-	146,0	-
5'''	137,93	-	-	H-3'''	137,8	-
6'''	145,75**	-	-	-	145,4	-
7'''	170,31	-	-	H-6, H-3'''	170,2	-

(Sprenger, et al. 2016/ Moreira, et al. 2013)/ (), (**) Valores intertrocáveis

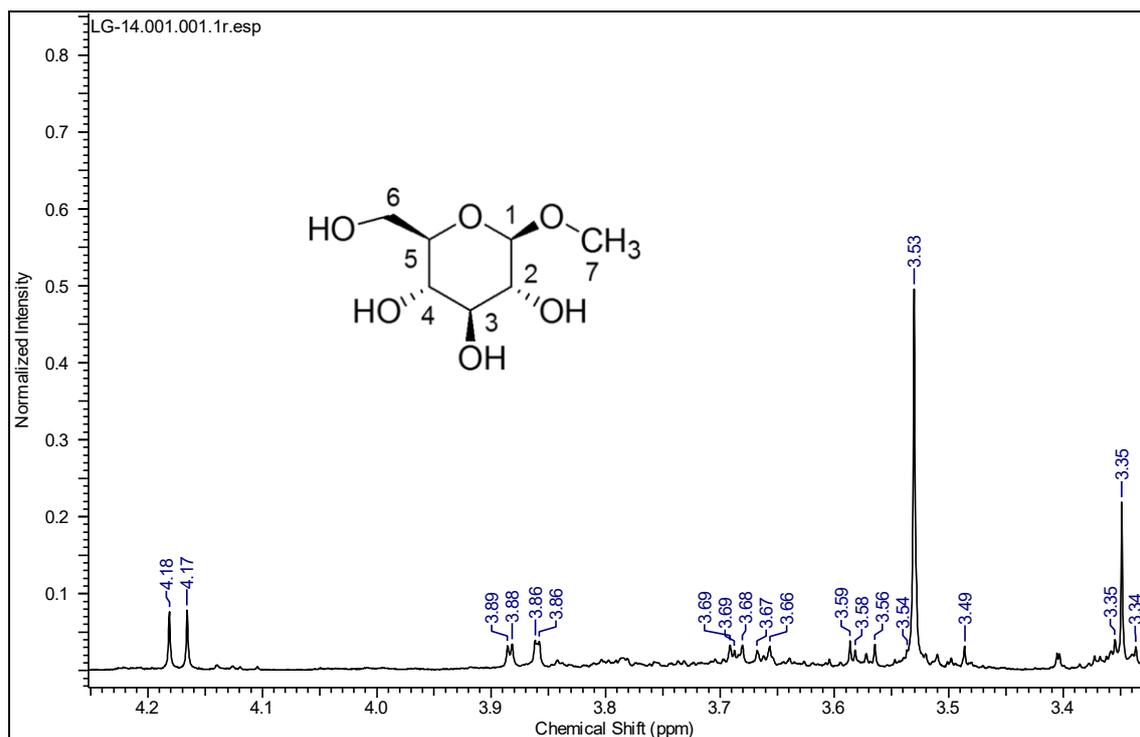


Figura 85. Ampliação das regiões entre (3,3 – 4,2 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da amostra **LG-14**

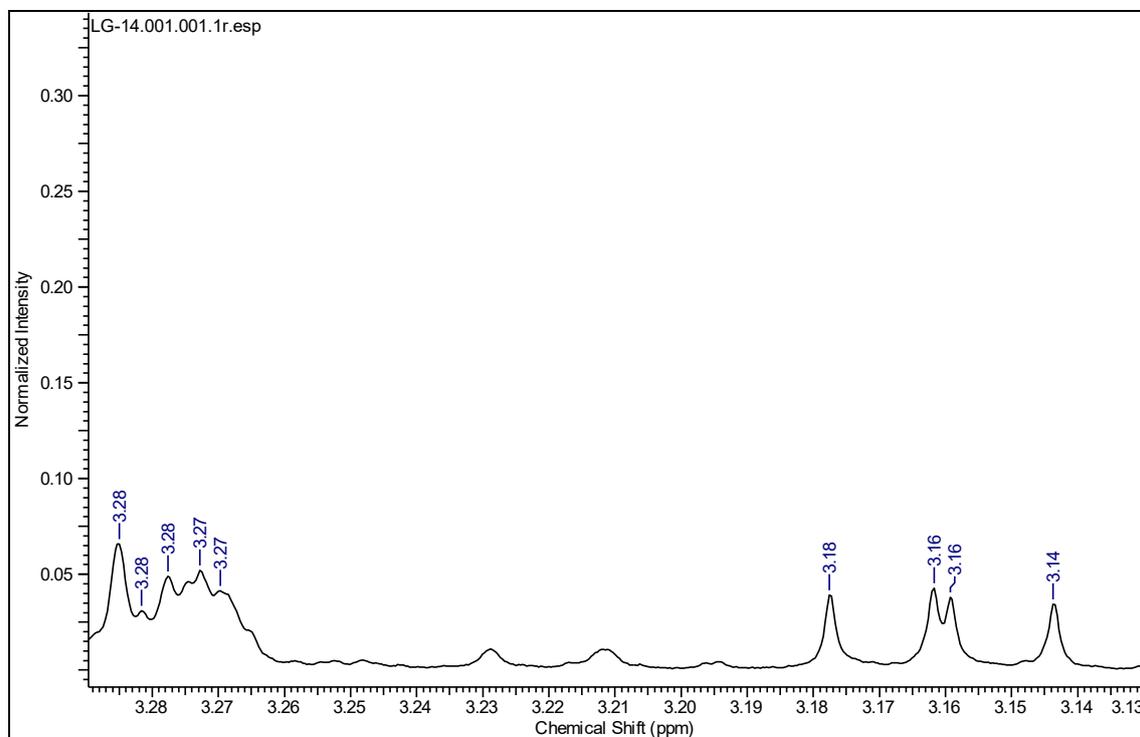


Figura 86. Ampliação das regiões entre (3,13 – 3,28 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da amostra **LG-14**

O espectro de RMN¹³C juntamente com o espectro de RMN¹H utilizando a técnica de APT (Figura 87 e 88) da amostra LG-14 evidenciou a presença de sete sinais na região entre (δ_C 105,52 – 57,48), sendo o sinal a (δ_C 105,52) atribuído ao carbono anomérico C-1 e o sinal a (δ_C 57,48) referente ao carbono metílico OCH₃.

Observou-se também o sinal de carbono metilênico C-6 (δ_C 62,85) além de outros sinais: C-2 (δ_C 78,18); C-3 (δ_C 78,06); C-4 (δ_C 75,20) e C-5 (δ_C 71,76) dos carbonos metínicos. Os dados de RMN da substância em conjunto com os valores descritos na literatura confirmam a estrutura do metil- β -D-glicopiranosídeo.

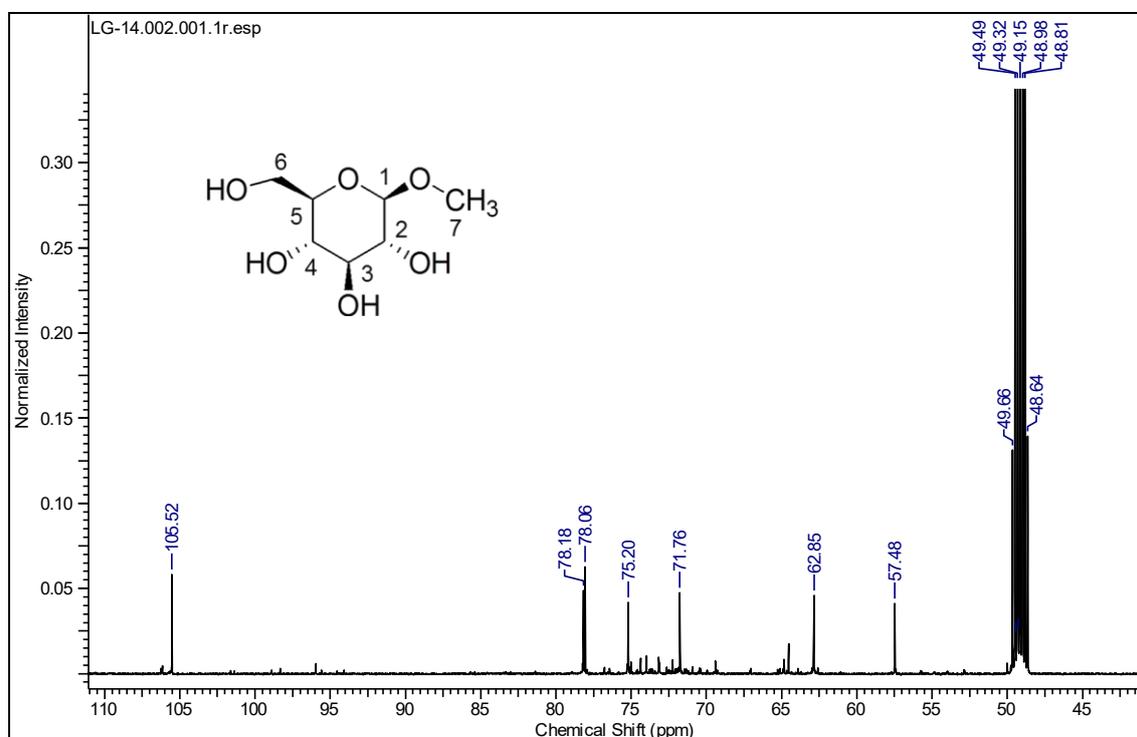


Figura 87. Espectro de RMN ¹³C da amostra LG-14 (125 MHz, MeOD) da substância **LG-14**

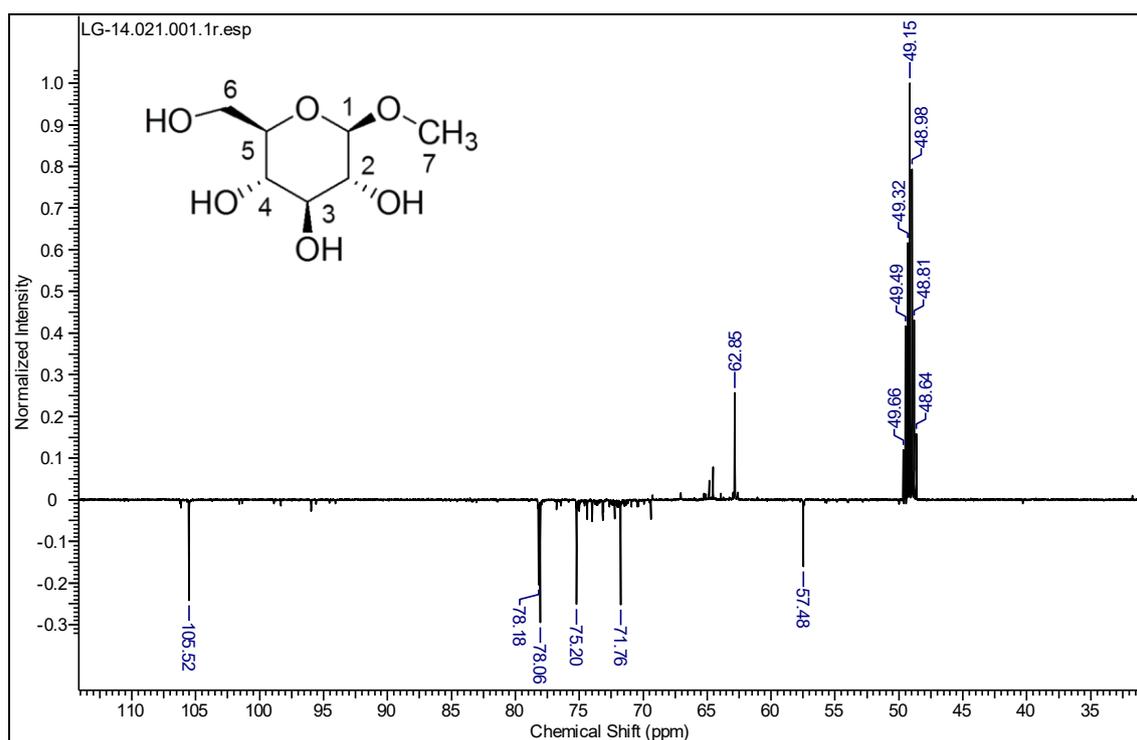


Figura 88. Espectro de RMN de ^{13}C - APT (125 MHz, MeOD) da amostra **LG-14**

O mapa de correlação heteronuclear a uma ligação HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) (Figura 89, p. 110) permitiu confirmar as atribuições feitas com base nos espectros de RMN ^1H , RMN e ^{13}C APT, através das correlações observadas entre os H-1 (δ_{H} 4,18) com o C-1 (δ_{C} 105,52). Correlações também foram observadas entre C-7 (δ_{C} 57,48) e os hidrogênios H-7 (δ_{H} 3,53). As outras correlações observadas foram: C-6 (δ_{C} 62,85) e os hidrogênios H-6 (δ_{H} 3,88/3,68) relativos ao grupo metilênico da molécula, C-5 (δ_{C} 71,76) e H-5 (δ_{H} 3,28), C-4 (δ_{C} 75,20) e H-4 (δ_{H} 3,16), C-3 (δ_{C} 78,18) e H-3 (δ_{H} 3,27) e C-2 (δ_{C} 78,06) e H-2 (δ_{H} 3,35).

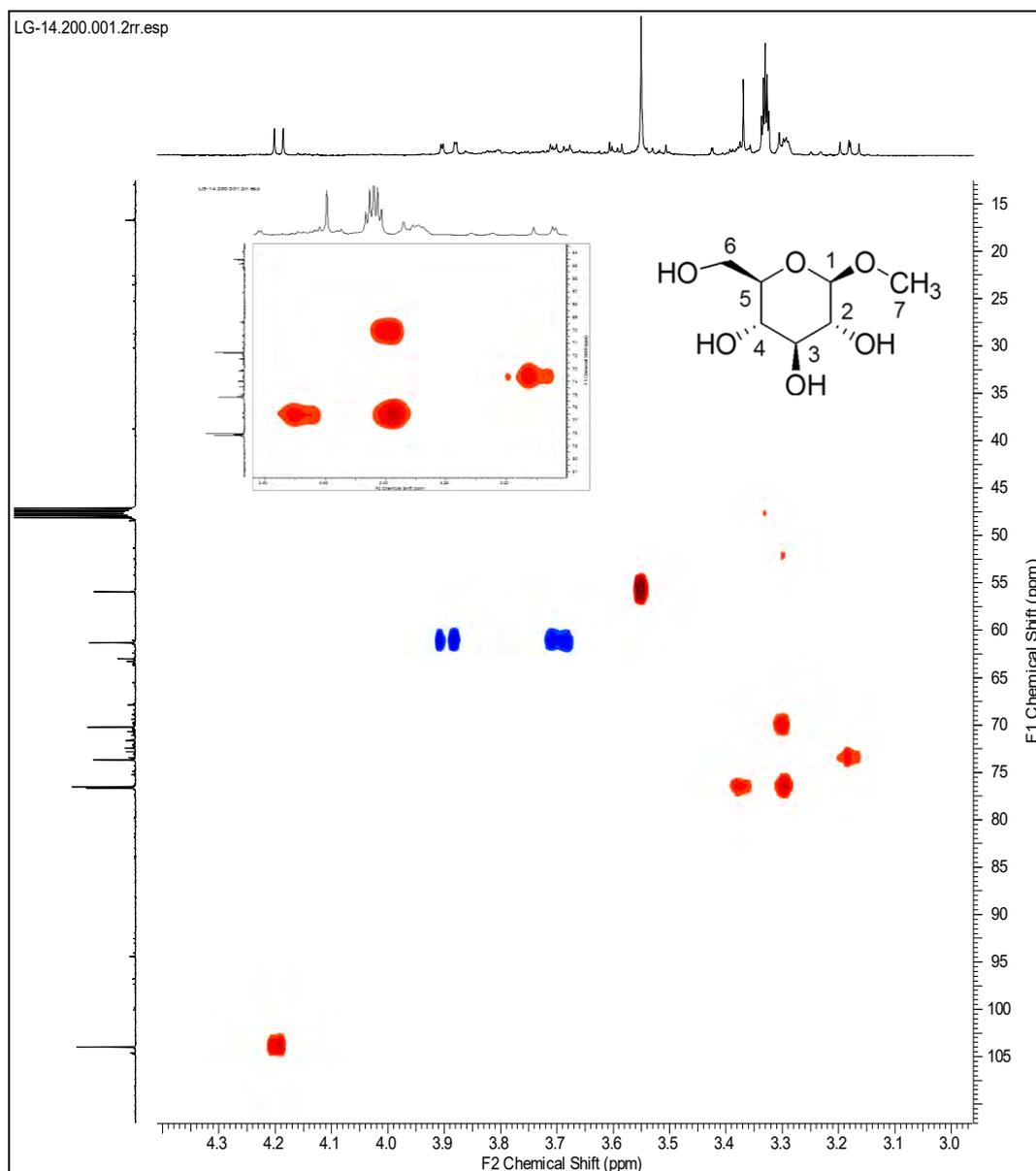


Figura 89. Espectro de HMQC da amostra **LG-14**

Pelo mapa de correlação a longa distância HMBC ($^nJ_{\text{CH}n} = 2$ e $n=3$) (Figura 90) foi possível correlacionar o sinal do carbono da metoxila C-7 (δ_{C} 57,48) com o hidrogênio H-1 (δ_{H} 4,18). Também foi possível verificar correlações a duas ligações do carbono C-3 (δ_{C} 78,06) com o hidrogênio H-4 (δ_{H} 3,16), C-2 (δ_{C} 78,18) com H-3 (δ_{H} 3,27) e a três ligações do carbono anomérico C-1 (δ_{C} 105,52) com os hidrogênios H-7 (δ_{H} 3,53).

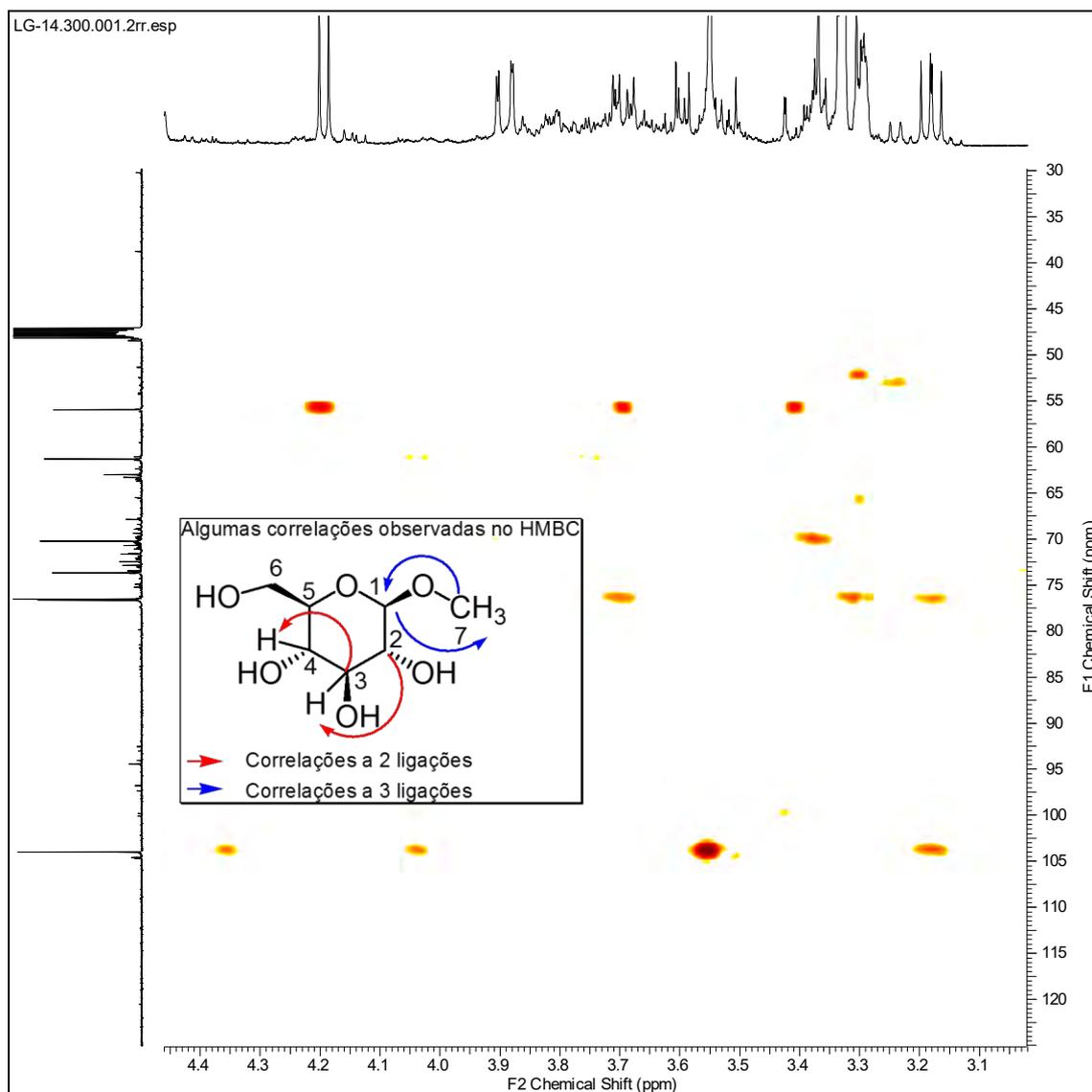


Figura 90. Espectro de HMBC da amostra **LG-14**

O conjunto de dados de RMN obtidos para substância LG-14 conferidos com os dados descritos na literatura permitiram confirmar a estrutura da substância como sendo o metil- β -D-glicopiranosídeo (Figura 91). Os deslocamentos químicos atribuídos para a substância LG-14 estão resumidos na Tabela 9, p.112.

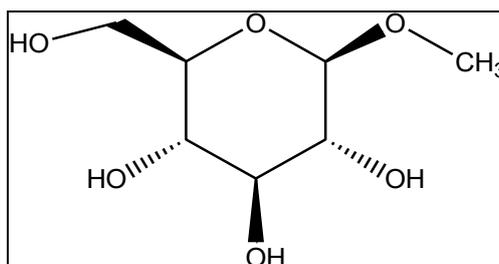


Figura 91. Estrutura da amostra (LG-14) metil- β -D-glicopiranosídeo

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LG-14, utilizando MeOD como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).

LG - 14					*Literatura (D ₂ O)	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
1	105,52	4,18 (1H, <i>d</i> , $J=7,8$ Hz)	-	H-7	104,27	4,38
2	78,18	3,35 (<i>s</i>)	H-3	-	74,19	3,26
3	78,06	3,27	H-4	-	76,95	3,48
4	75,20	3,16 (1H, <i>dd</i> , $J=9,15$ e $7,95$)	-	-	70,76	3,38
5	71,76	3,28	-	-	76,95	3,46
6	62,85	3,88 (1H, <i>dd</i> , $J=1,95$ e $12,05$ Hz); 3,68(<i>m</i>)	-	-	61,87	3,93; 3,72
OCH ₃	57,48	3,53 (3H, <i>s</i>)	-	H-1	58,24	3,57

*http://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_709-50-2_1HNMR.htm

*https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl_beta-D-glucoside

4. 4. 2. 6. Determinação estrutural dos componentes majoritários dos derivados acetilados contidos na fração LG-14 (fração LG-14 Ac).

A fração LG-14 Ac foi obtida a partir da acetilação da substância LG-14, apresentou-se como um sólido gelatinoso de coloração amarela, solúvel em clorofórmio.

A análise através de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM) mostrou que a amostra LG-14 Ac trata-se de uma mistura de 12 substâncias. Na Figura 92, apresenta-se o cromatograma da amostra LG-14 Ac.

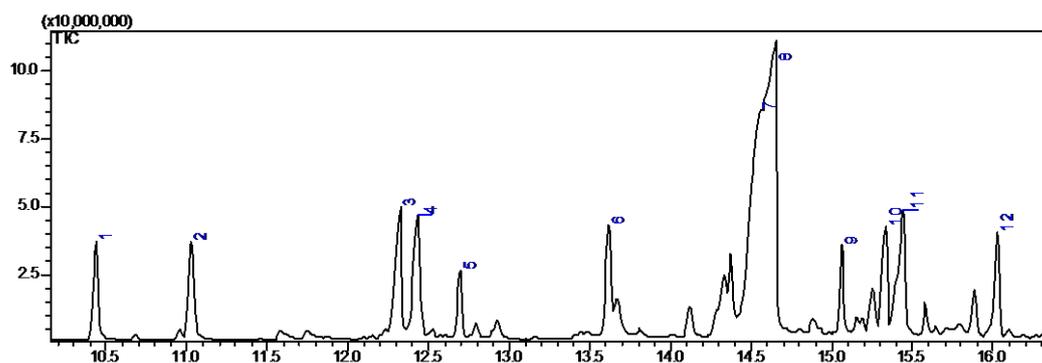


Figura 92. Cromatograma da amostra **LG-14 Ac**

Através da comparação dos tempos de retenção e razão massa/carga (m/z) dos componentes da mistura com a biblioteca NIST do equipamento de CG/EM foi possível identificar os componentes da mistura como sendo uma mistura de açúcares (Figura 93, p.114) e o Metil- β - D-glicopiranosídeo tetraacetato como componente majoritário (Tabela 10).

Tabela 10. Tempos de retenção (T_R), relação massa/carga (m/z) e porcentagem de área (Área %) dos componentes da fração LG-14Ac

Pico*	T_R **	m/z	Area%	Substância (código)
1	10,44	290	4,37	1,2,3,4-Butanotetrol tetraacetato LG-14 Ac(a)
2	11,03	290	4,34	Metil-2,3,4-tri-O-acetil- β -D-xilopiranosídeo LG-14 Ac(b)
3	12,32	332	6,81	Tetraacetil- β -L-ramnose LG-14 Ac(c)
4	12,43	332	6,80	α -L-Manopiranosose-6-desoxi- tetraacetato LG-14 Ac(d)
5	12,70	316	2,74	Lixopiranosose tetraacetato LG-14 Ac(e)
6	13,62	434	4,35	L-Iditol hexaacetato LG-14 Ac(f)
7	14,55	362	32,27	Metil-β-D-glicopiranosídeo tetraacetato LG-14 Ac(g)
8	14,65	362	17,52	Metil-β-D-glicopiranosídeo tetraacetato LG-14 Ac(g)
9	15,06	-	3,24	<i>nd</i>
10	15,33	390	5,30	D-Glicose, 2,3,4,5,6-pentaacetato LG-14 Ac(h)
11	16,44	390	8,63	α -D-Glicopiranosose pentaacetato LG-14 Ac(i)
12	16,02	434	3,62	D-Manitol hexaacetato LG-14 Ac(j)

nd = não determinado.

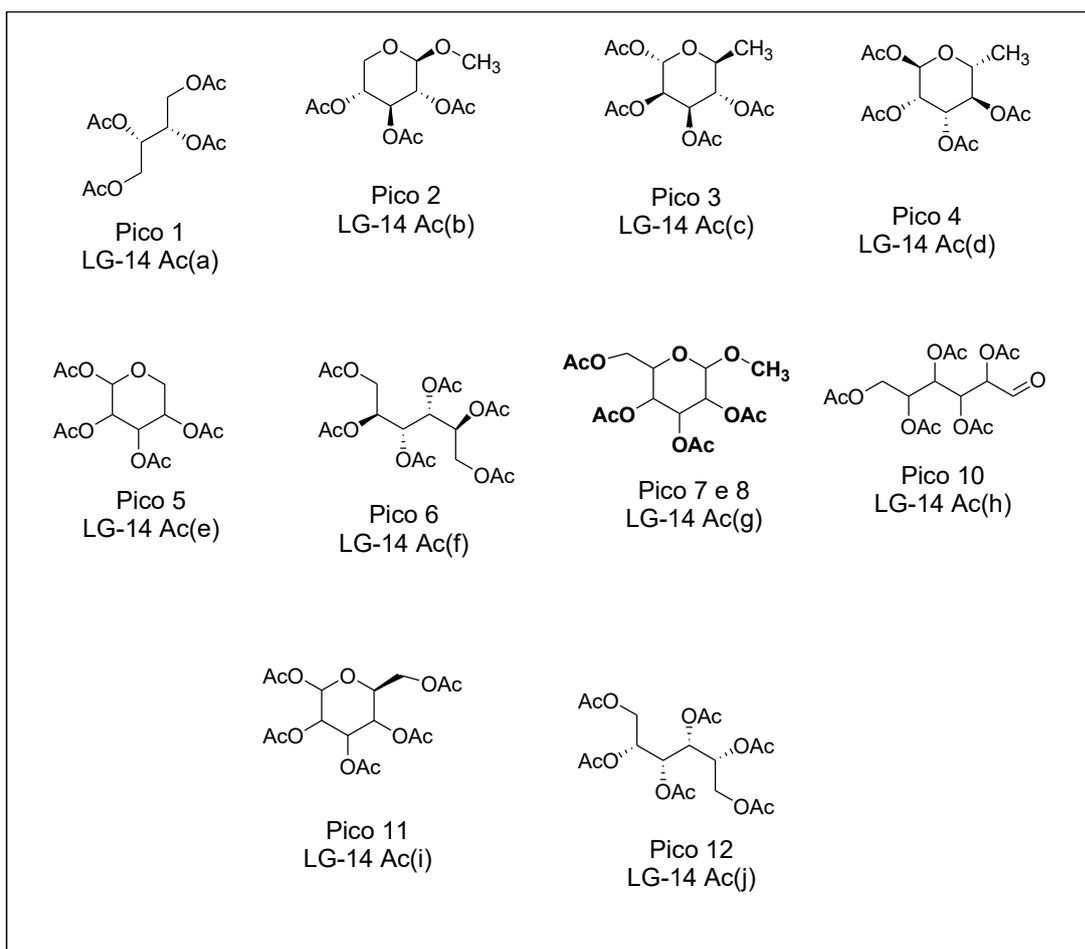


Figura 93. Principais componentes identificados na amostra **LG-14 Ac**

A análise do espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 94, p. 115) da amostra LG-14 Ac mostrou forte absorção em 1755 cm^{-1} característica estiramento de grupo carbonila de éster confirmando os derivados acetilados. Verificou-se também uma torção de 1041 cm^{-1} atribuída ao estiramento vibracional de C-O-C inerentes à ligação glicosídica característica dos monossacarídeos (Silverstein & Webster, 2000).

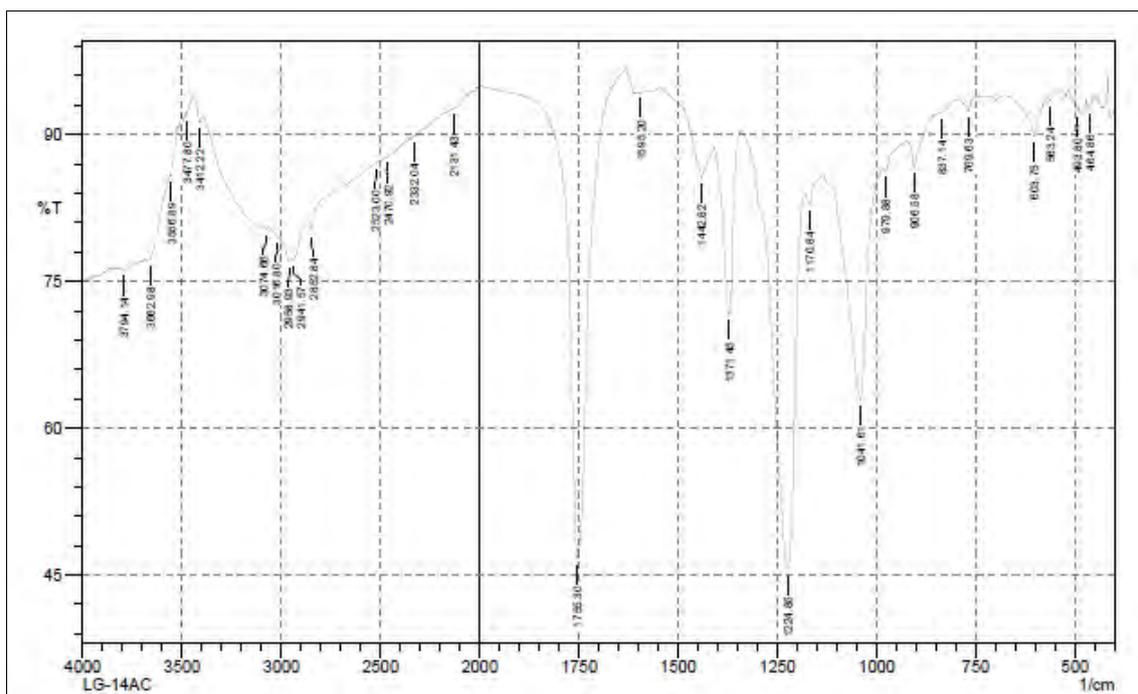


Figura 94. Espectro de infravermelho da amostra **LG-14 Ac**

No espectro de massas do componente majoritário da mistura **LG-14 Ac** (Figura 95), não foi possível observar o pico do íon molecular, porém foi possível identificar fragmentos em $m/z = 331$ [$M^+ - 31$ ($-OCH_3$)] e $m/z = 289$ [$M^+ - 73$ ($-CH_2OAc$)], cujas propostas de fragmentação estão descritas na Figura 96, p. 116.

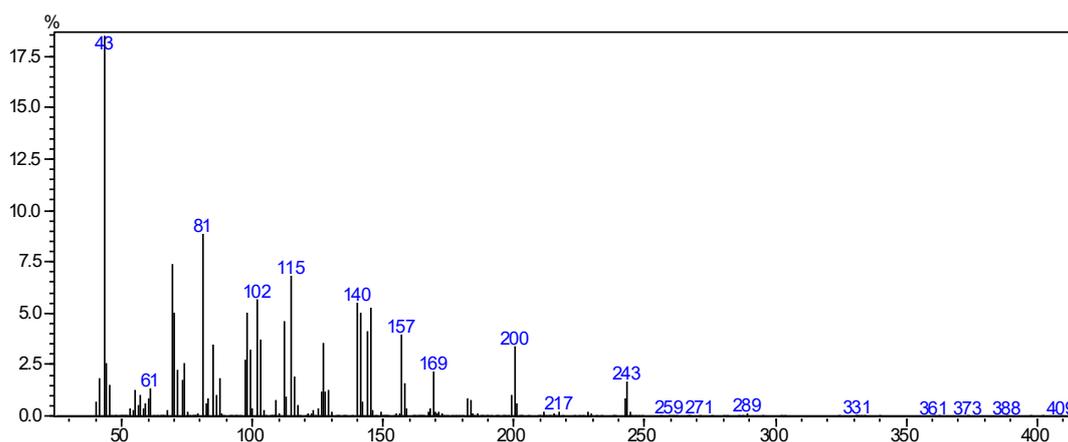


Figura 95. Espectro de Massa CG-EM da substância **LG-14 Ac(g)**

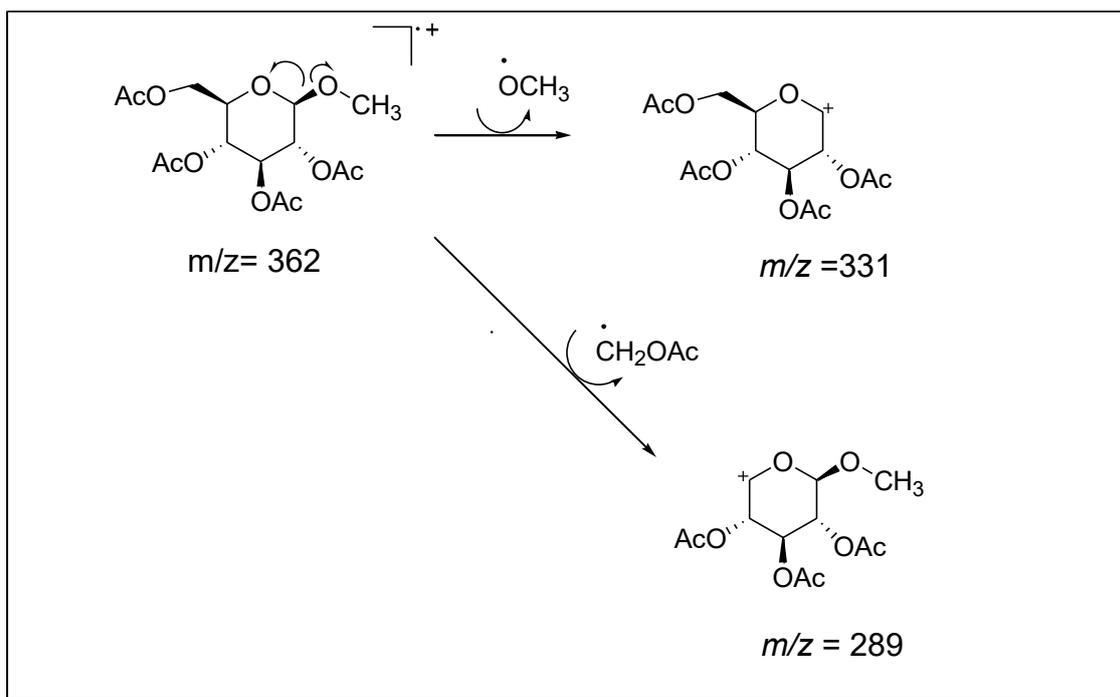


Figura 96. Proposta mecanística de fragmentação da substância **LG-14 Ac(g)**

O espectro de RMN¹H da mistura LG-14 Ac (Figura 97 a 99, p. 117 e 118) apresentou absorções referentes ao hidrogênio anomérico H-1 (δ_{H} 4,45, 1H, *d*, $J = 7,95$ Hz), hidrogênio H-2 (δ_{H} 3,71), sinal do H-3 (δ_{H} 4,98), H-4 (δ_{H} 5,21, 1H, *t*, $J = 9,45$ Hz); H-5 (δ_{H} 5,09, 1H, *t*, $J = 9,9$ Hz) e H-6 (δ_{H} 4,28 e 4,16). As metilas dos grupos acetila mostraram absorções características entre (δ_{H} 2,01 e 2,09).

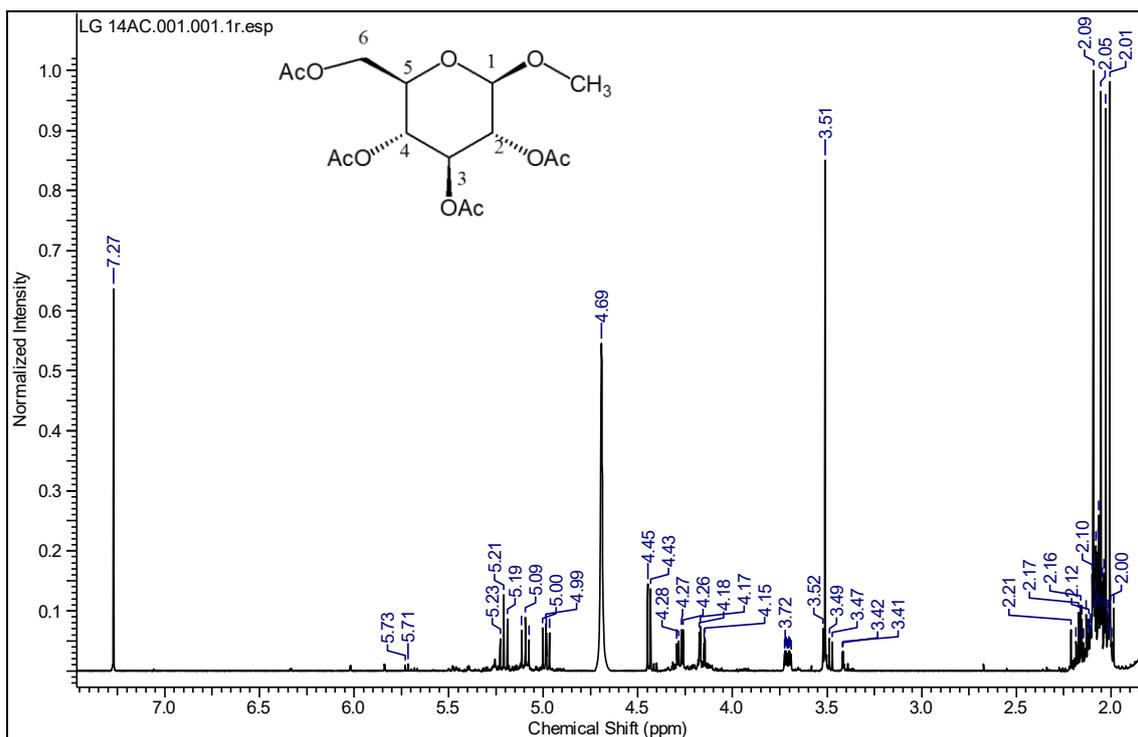


Figura 97. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) da amostra LG-14 Ac

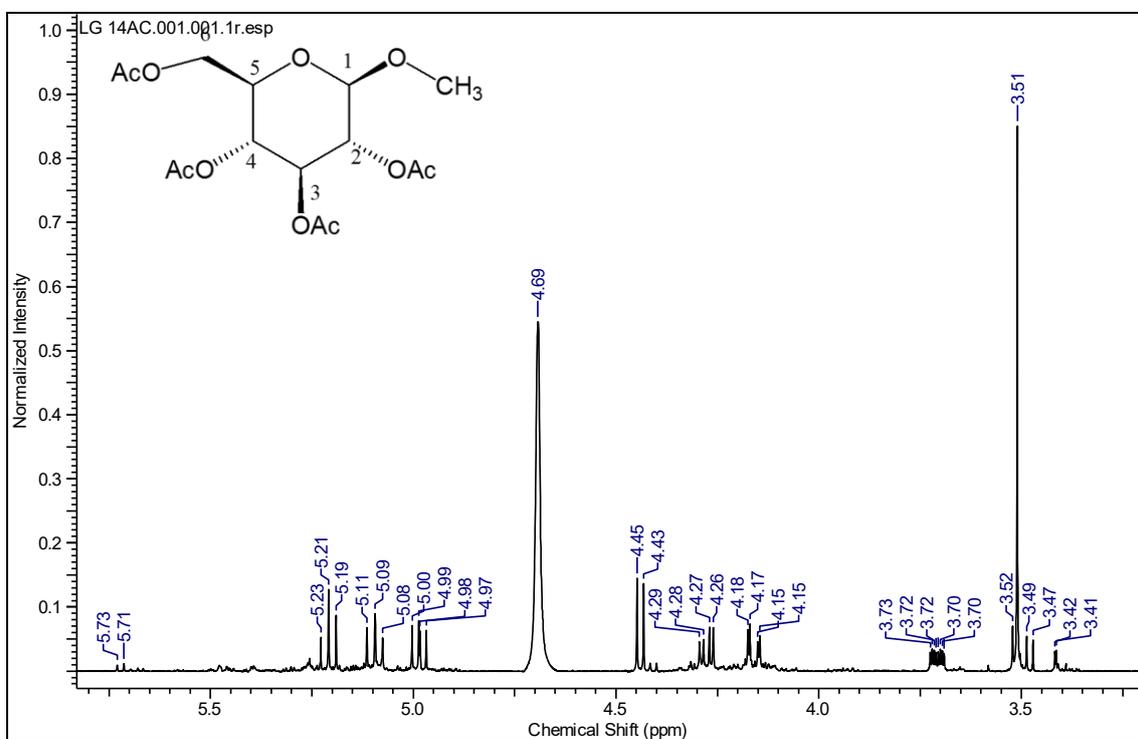


Figura 98. Ampliação das regiões entre (3,4 – 5,7 ppm) do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) da amostra LG-14 Ac

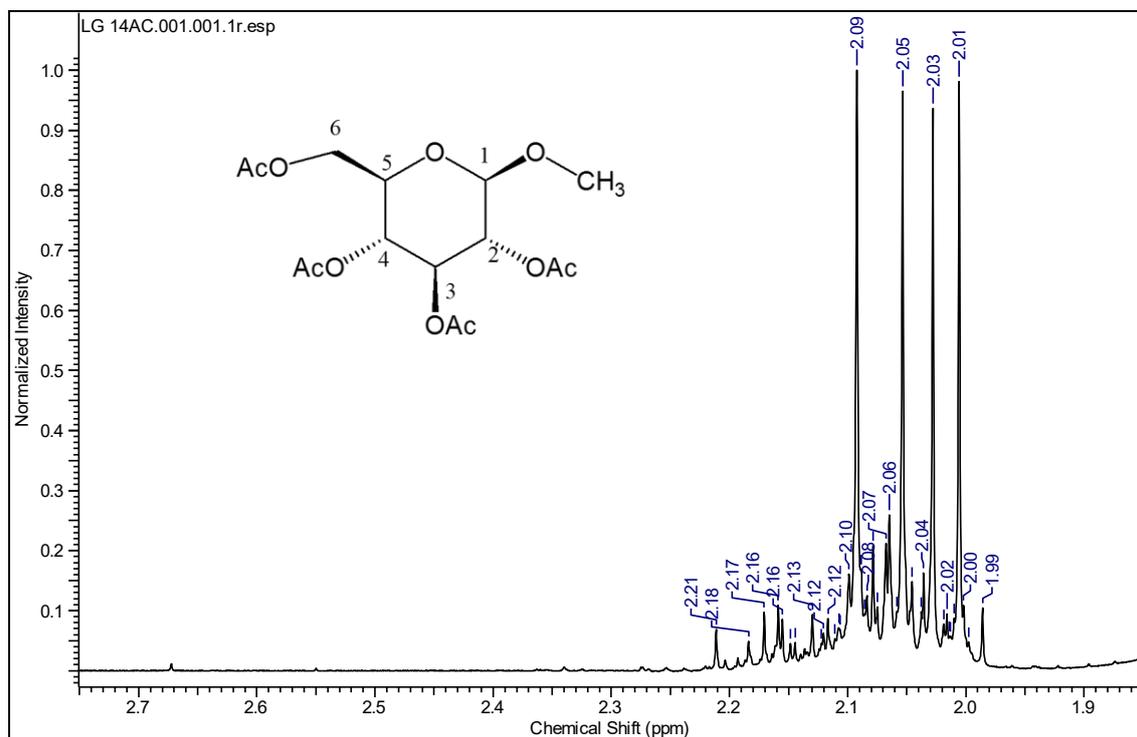


Figura 99. Ampliação das regiões entre (1,9 – 2,7 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra **LG-14 Ac**

No espectro de ^{13}C (Figura 100, p. 119), os sinais entre (δ_{C} 20,56 e 20,75) e os sinais entre (δ_{C} 169,41 e 170,69) foram atribuídos aos carbonos grupo acetil ($\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}-\text{CH}_3$), respectivamente. Para o restante da molécula foram feitas as seguintes atribuições: C-1 (δ_{C} 101,61), C-2 (δ_{C} 71,81), C-3 (δ_{C} 71,29), C-4 (δ_{C} 72,90), C-5 (δ_{C} 68,49), C-6 (δ_{C} 61,96), e OCH_3 (δ_{C} 56,97).

Através do espectro de RMN ^{13}C – APT da mistura LG-14 Ac (Figura 101, p. 120), foi possível confirmar os sinais referentes aos carbonos metínicos entre (δ_{C} 68,49 e 72,90) C-2 a C-5. O sinal do carbono metilênico C-6 (δ_{C} 61,96). Além dos sinais característicos dos grupos acetil e sinal do carbono da metoxila a δ_{C} 56,97.

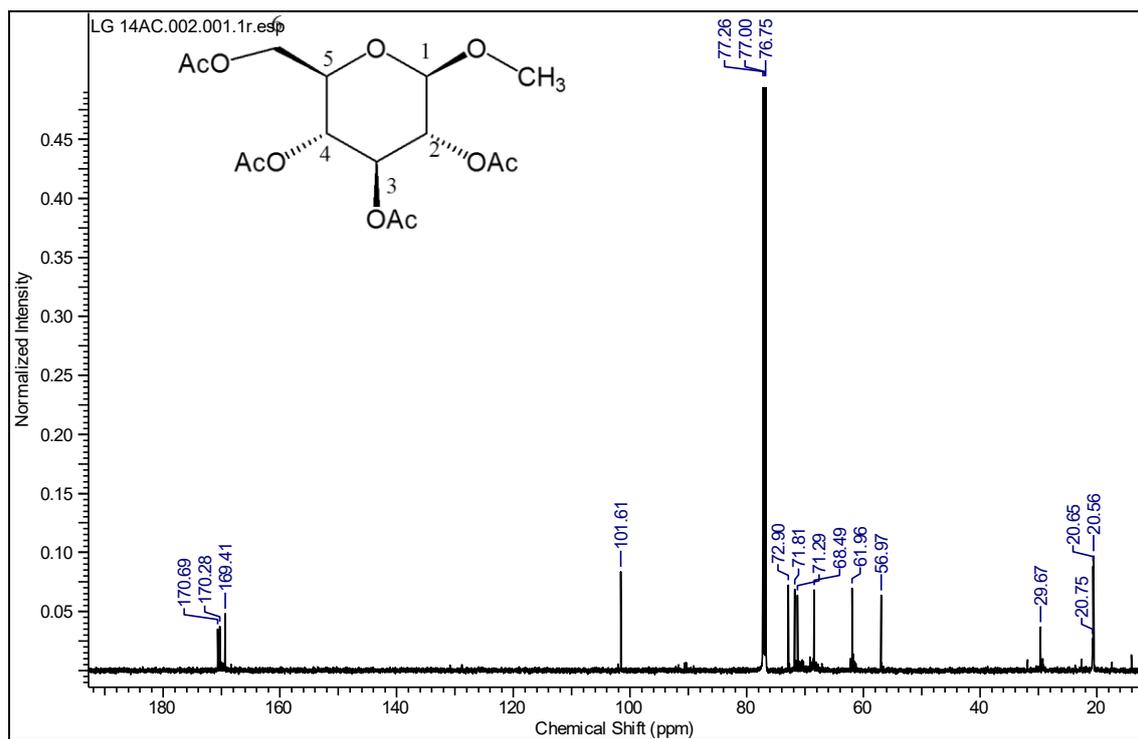


Figura 100. Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) da amostra LG-14 Ac

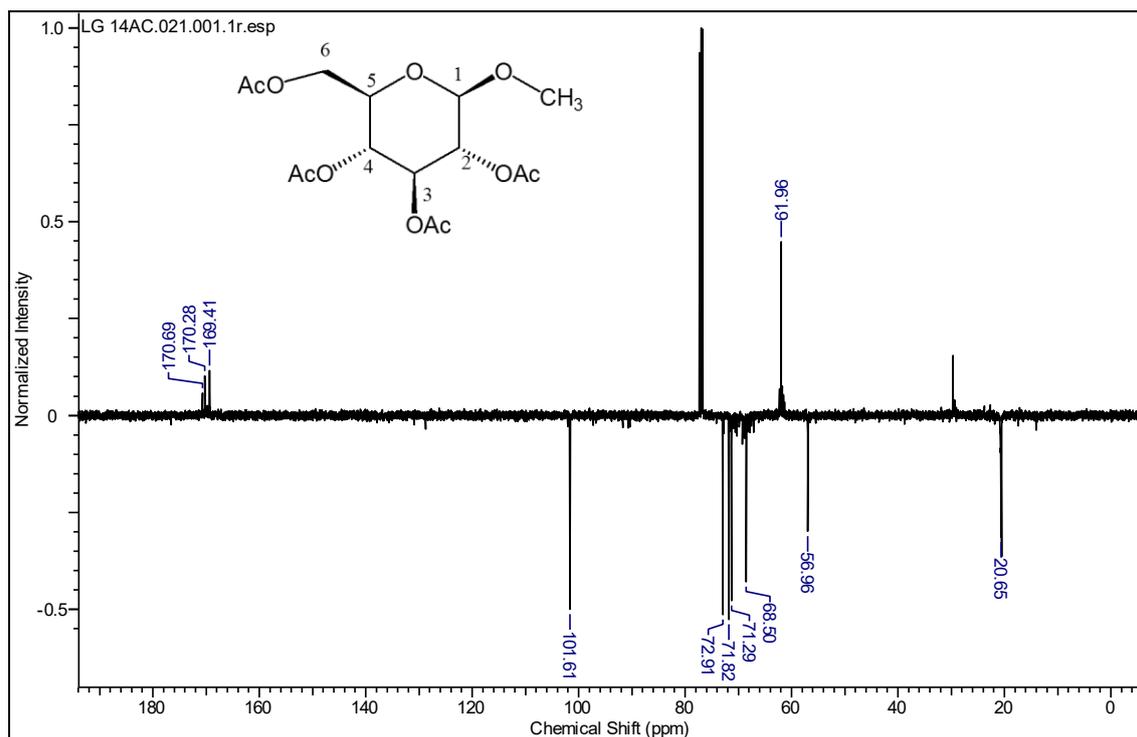


Figura 101. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) da amostra **LG-14 Ac**

O mapa de contorno de correlação heteronuclear a uma ligação HMQC (Figura 102, p. 121) revela as correlações existentes entre o carbono C-1 (δ_{C} 101,61) e o hidrogênio anomérico H-1 (δ_{H} 4,44). Verificou-se também correlações entre C-2 (δ_{C} 71,81) e H-2 (δ_{H} 3,7), C-3 (δ_{C} 71,29) e H-3 (δ_{H} 4,98), C-4 (δ_{C} 72,92) e H-4 (δ_{H} 5,21) e C-5 (δ_{C} 68,48) e H-5 (δ_{H} 5,09). Além dessas verificou-se também correlações entre C-6 (δ_{C} 61,96) e os hidrogênios H-6 (δ_{H} 4,16/4,28).

Observou-se que o carbono da metoxila a (δ_{C} 56,97) apresentou correlação com os hidrogênios OCH_3 (δ_{H} 3,51) enquanto que os carbonos das metilas do grupo acetil (δ_{C} 20,56 – 20,75) apresentaram correlações com hidrogênios entre (δ_{H} 2,01- 2,09).

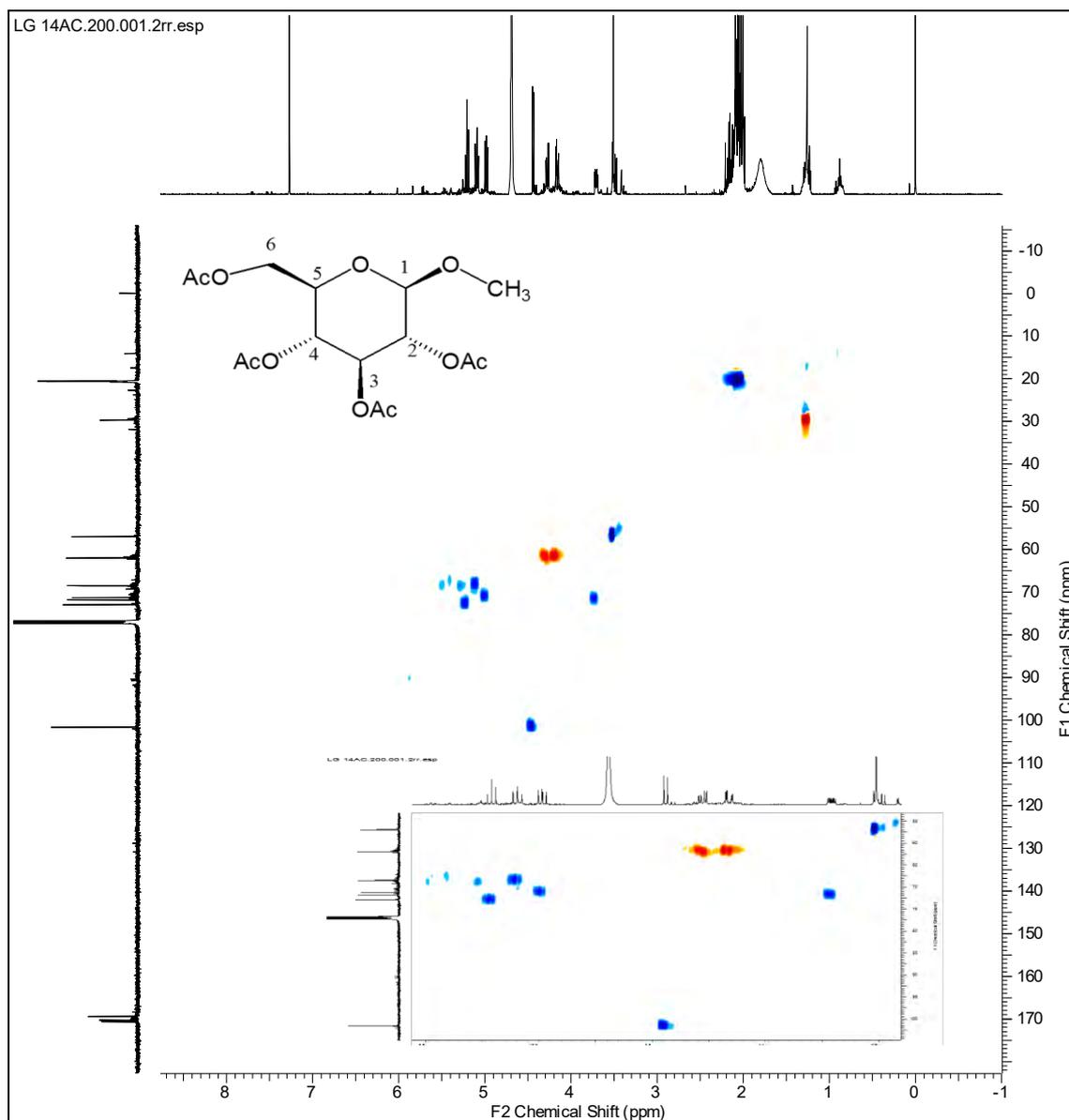


Figura 102. Espectro de HMQC da amostra **LG-14 Ac**

No mapa de contorno de correlação a longa distância HMBC (Figura 103) pode-se confirmar a localização da metoxila devido a correlação a três ligações entre o carbono OCH_3 (δ_{C} 56,97) e H-1 (δ_{H} 4,44). Foram observadas também correlações a duas ligações entre C-5 (δ_{C} 68,49) e C-3 (δ_{C} 71,29) com H-4 (δ_{H} 5,21), C-6 (δ_{C} 61,96) e C-4 (δ_{C} 72,90) com H-5 (δ_{H} 5,09) e C-4 (δ_{C} 72,90) com o H-3 (δ_{H} 4,98), entre outras.

Pode se também confirmar as posições dos grupos acetil através das correlações do carbono das carbonilas com os respectivos hidrogênios, a três

ligações: δ_C 170, 28 com o H-4 (δ_H 4,98), δ_C 170,69 com o H-6 (δ_H 4,28), δ_C 169,41 com o H-3 (δ_C 4,98).

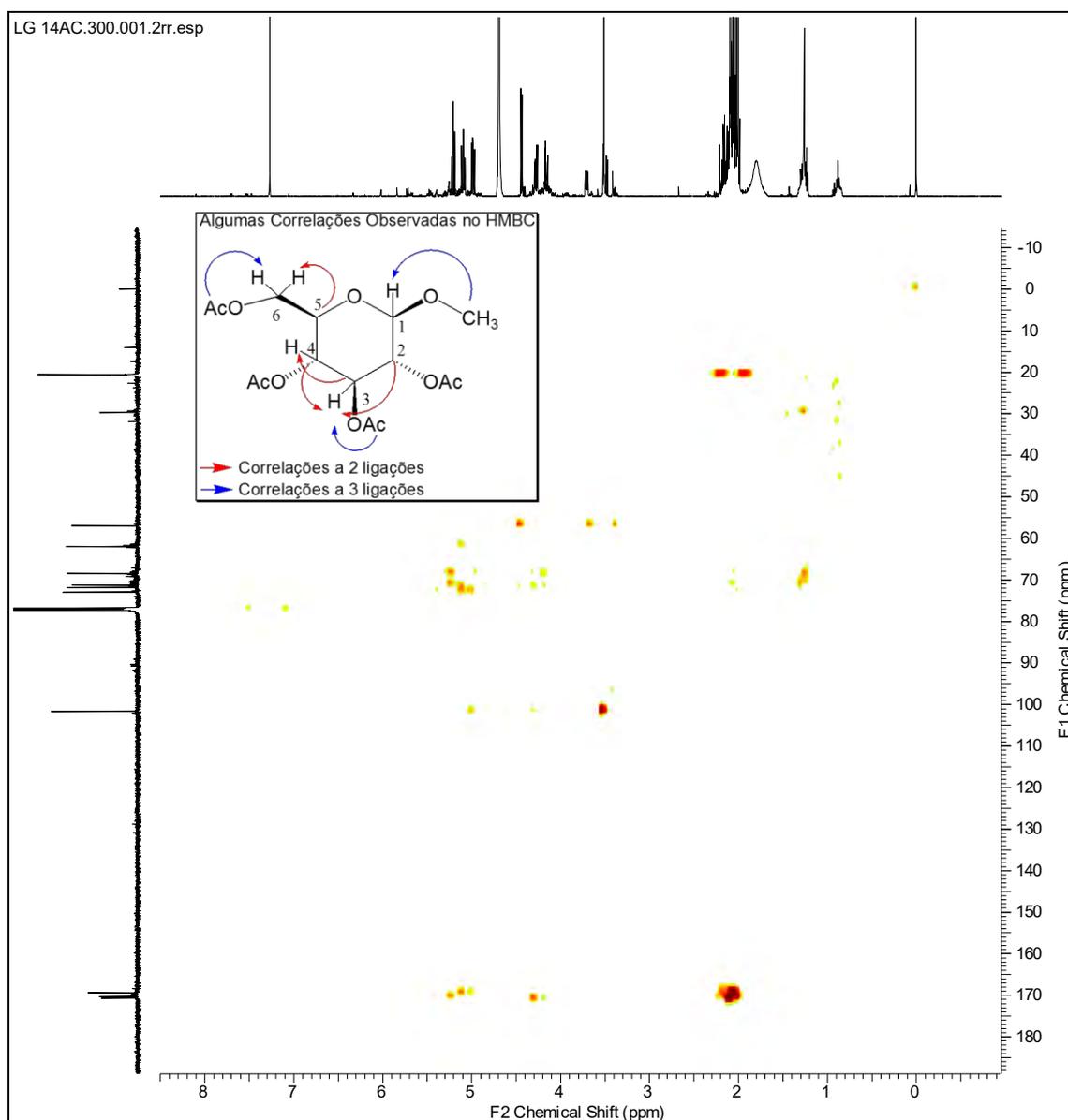


Figura 103. Espectro de HMBC da amostra **LG-14 Ac**

Os dados obtidos anteriormente para a substância LG-14, juntamente com os dados espectrais obtidos para o seu derivado acetilado LG-14 Ac, nos permite concluir que a reação de acetilação ocorreu de forma satisfatória e que constituinte majoritário da fração LG-14Ac trata-se do metil- β -D-

glicopiranosídeo tetraacetato cujos deslocamentos químicos estão resumidos na Tabela 11.

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LG-14 Ac, utilizando CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).

LG- 14 Ac				
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	101,61	4,45 (1H, <i>d</i> , $J = 7,95$ Hz)		OCH ₃
2	71,81	3,71 (<i>m</i>)	H-3	-
3	71,29	4,98 (<i>m</i>)	H-4	-
4	72,90	5,21 (1H, <i>t</i> , $J = 9,45$ Hz)	H-3, H-5	-
5	68,49	5,09 (1H, <i>t</i> , $J = 9,9$ Hz)	H-6, H-4	-
6	61,96	4,28 (<i>dd</i> , $J = 12,2$ e $4,75$ Hz) 4,16 (<i>dd</i> , $J = 2,6$ e $12,35$ Hz)	H-5	-
OCH ₃	56,97	3,51 (3H, <i>s</i>)	-	H-1
CH ₃	20,75	2,09 (3H, <i>s</i>)	-	-
CH ₃	20,67	2,05 (3H, <i>s</i>)	-	-
CH ₃	20,65	2,02 (3H, <i>s</i>)	-	-
CH ₃	20,56	2,01 (3H, <i>s</i>)	-	-
C=O	170,69	-	-	H-6
C=O	170,28	-	-	H-4
C=O	169,41	-	-	H-3
C=O	169,41	-	-	-

4. 4. 2. 7. Determinação estrutural da substância LGA1

A substância LGA1 isolada do extrato em Acetato de etila de *L. guilleminianus* apresentou-se como um sólido branco amorfo, solúvel em diclorometano.

A análise através de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM) mostrou que a amostra LGA1 trata-se de uma mistura de 14 substâncias. Na Figura 104, apresenta-se o cromatograma da amostra LGA1.

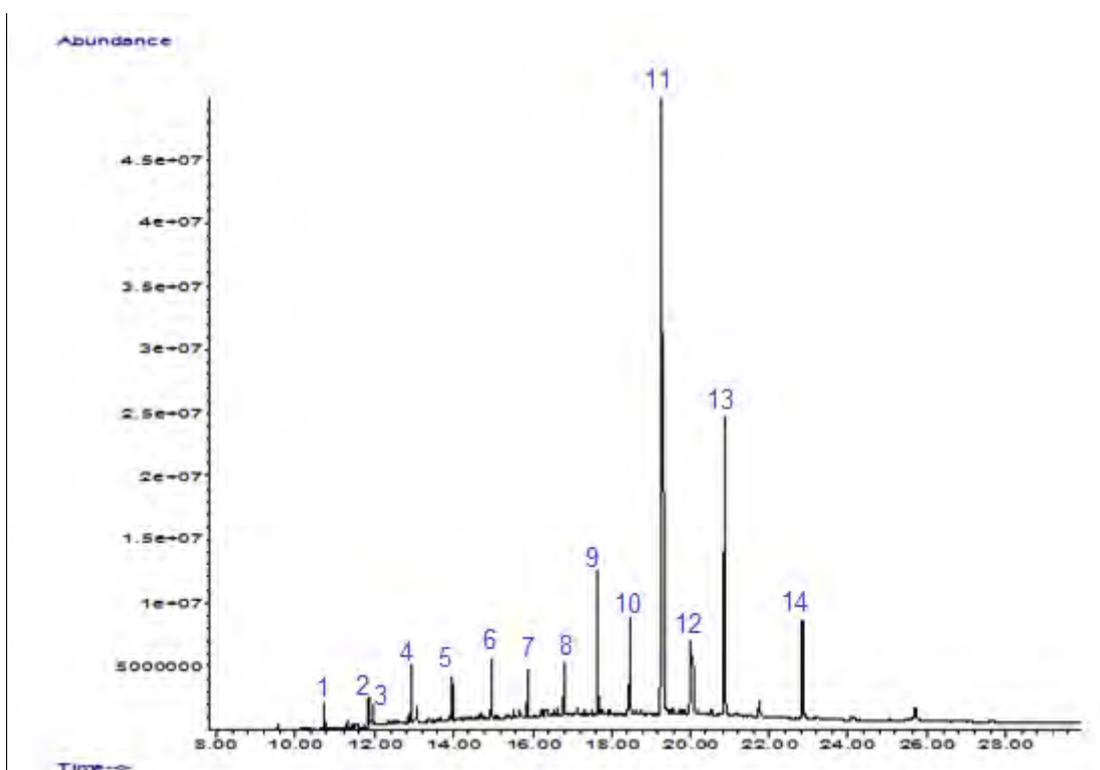
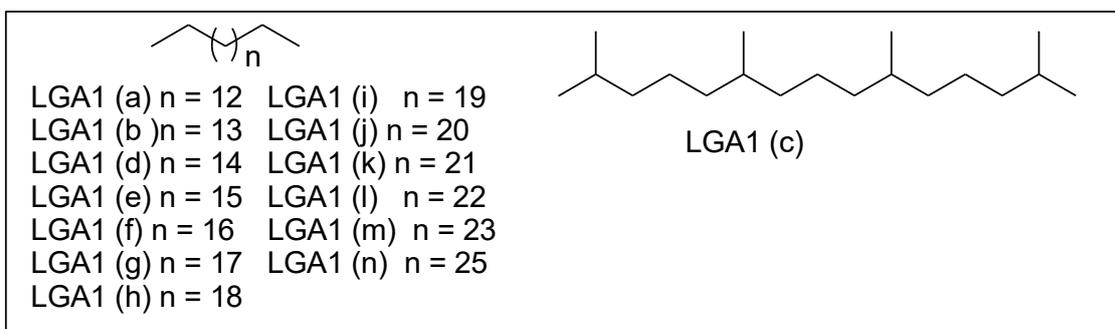


Figura 104. Cromatograma da fração LGA1

Através da comparação dos tempos de retenção e razão massa/carga (m/z) dos componentes da mistura com a biblioteca NIST do equipamento de CG/EM foi possível identificar os componentes da mistura como sendo uma mistura de hidrocarbonetos saturados. O pentacosano e heptacosano foram os componentes majoritários (Figura 105 e Tabela 12, p. 125).

Tabela 12. Tempos de retenção (T_R), relação massa/carga (m/z) e porcentagem de área (Área %) dos componentes da fração LGA1

Pico*	T_R^{**}	m/z	Area%	Substância (código)
1	10,74	226	1,04	Hexadecano LGA1(a)
2	11,87	240	1,24	Heptadecano LGA1(b)
3	11,93	268	0,99	Pentadecano-2,6,10,14-tetrametil LGA1(c)
4	12,94	254	2,38	Octadecano LGA1(d)
5	13,97	268	1,84	Nonadecano LGA1(e)
6	14,95	282	2,42	Eicosano LGA1(f)
7	15,89	296	2,14	Heneicosano LGA1(g)
8	16,79	310	2,17	Docosano LGA1(h)
9	17,65	324	6,36	Tricosano LGA1(i)
10	18,48	338	4,37	Tetracosano LGA1(j)
11	19,30	352	44,71	Pentacosano LGA1(k)
12	20,04	366	4,10	Hexacosano LGA1(l)
13	20,85	380	18,46	Heptacosano LGA1(m)
14	22,84	408	7,71	Nonacosano (LGA1n)


Figura 105. Constituintes identificados da fração **LGA1**

Nas Figuras 106 e 107, p. 126, são apresentados os espectros de massas das substâncias LGA1(k) e LGA1(m) realizado através de ionização química com CH_4 em modo positivo.

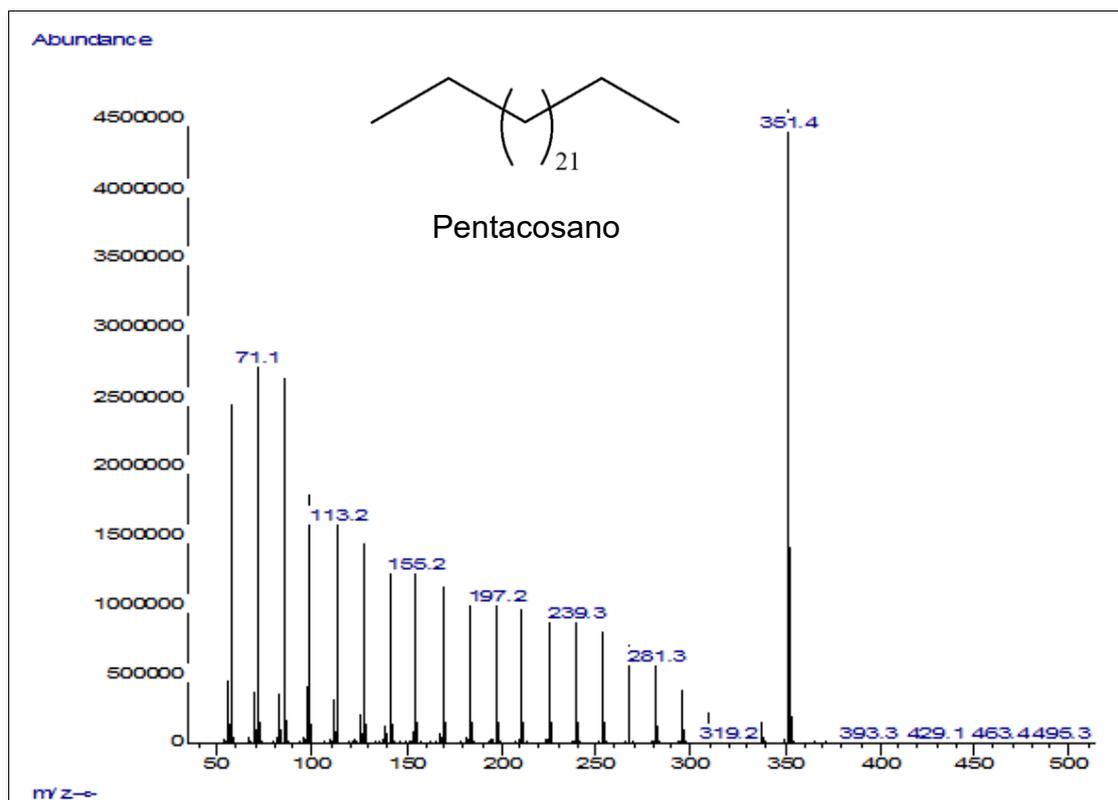


Figura 106. Espectro de massas do Pentacosano LGA1(k)

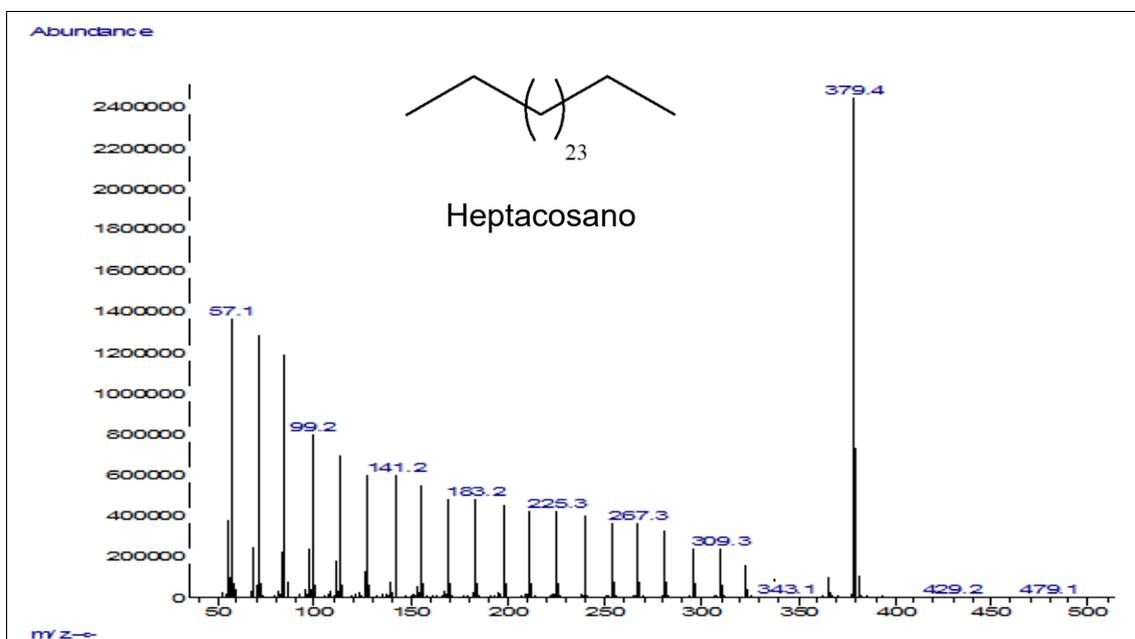


Figura 107. Espectro de massas do Heptacosano LGA1(m)

4. 4. 2. 8. Determinação estrutural da substância LGA2

O tratamento cromatográfico do extrato em acetato de etila e do extrato em hexano possibilitou o isolamento da substância LGA2, apresentando-se como um sólido branco e amorfo, solúvel em clorofórmio.

O espectro obtido na região do infravermelho (Figura 108) apresenta bandas de absorção em 2926 e 2868 cm^{-1} , que evidenciam o caráter alifático da amostra. Apresenta ainda banda em 1714 cm^{-1} referente ao grupo carbonílico e banda na região de 3500 cm^{-1} (Silverstein & Webster, 2000).

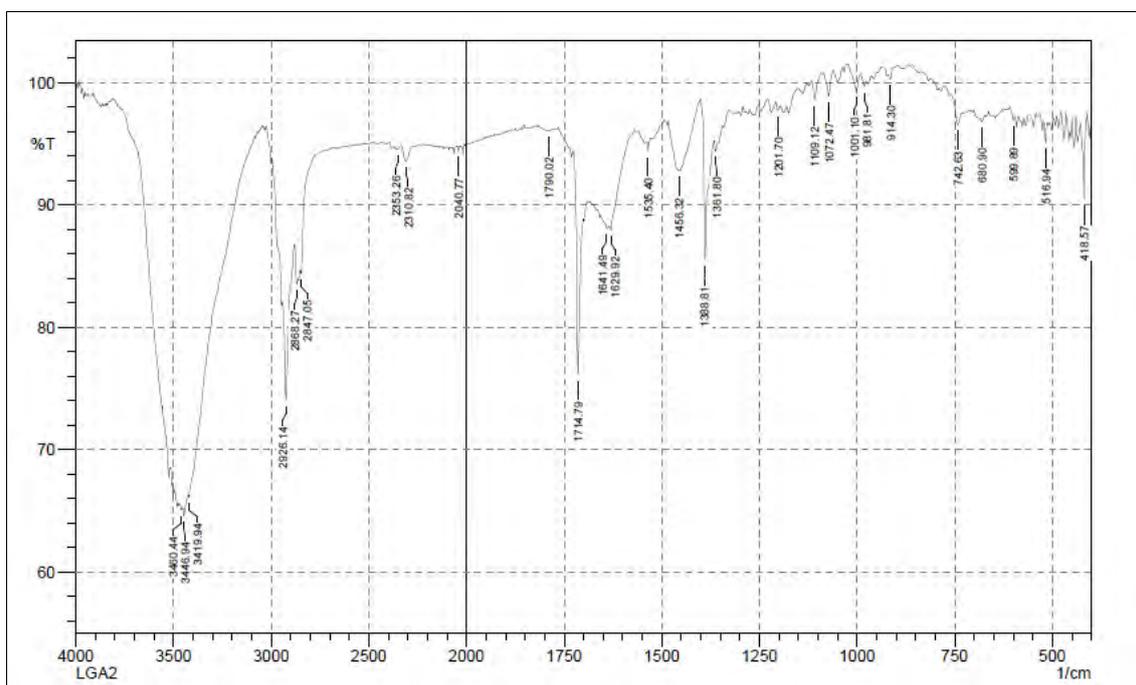


Figura 108. Espectro na Região de infravermelho da substância **LGA2**

A análise da substância LGA2 através de cromatografia de gás acoplada ao massas (CG-EM) revelou a existência de um único pico com $t_r = 38,00$ min (Figura 109, p. 128).

O espectro de massas apresentou pico do íon molecular a m/z 426, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ (Figura 110, p. 129). De acordo com comparação dos dados da biblioteca NIST do equipamento de CG/EM, sugere-se para a substância LGA2 a estrutura do triterpeno pentacíclico, friedelan-3-ona.

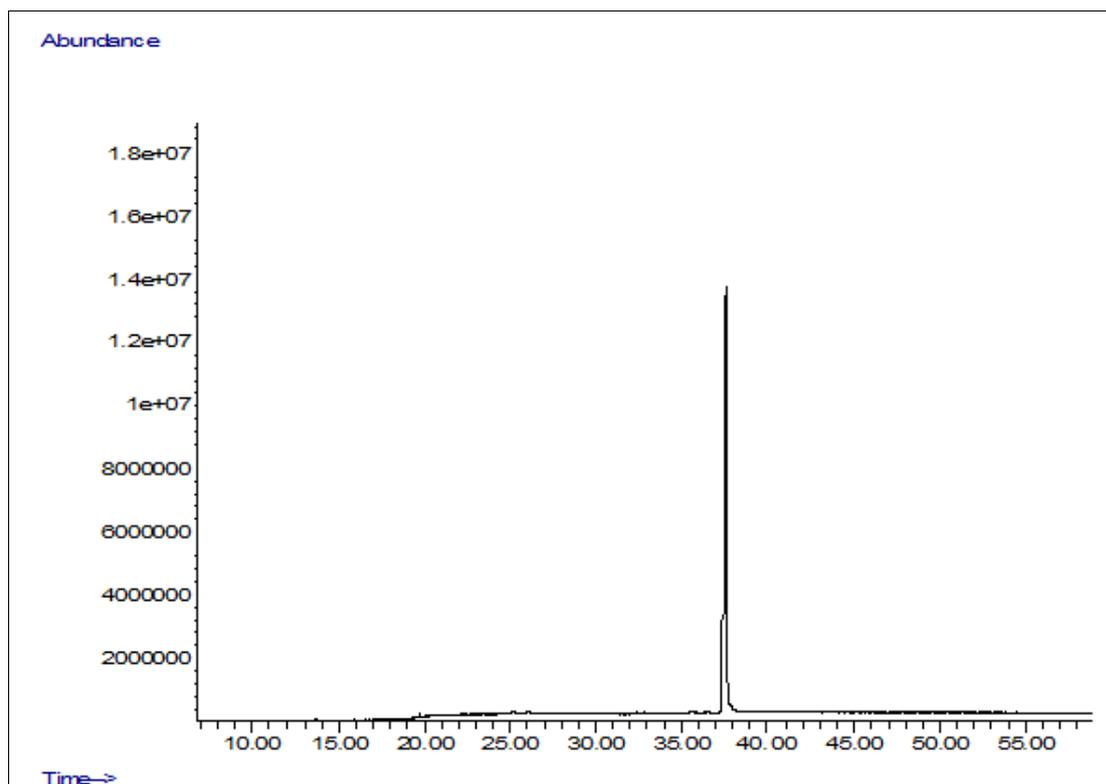


Figura 109. Cromatograma da substância **LGA2**

A substância LGA-2 apresentou IDH de seis equivalentes de deficiência de hidrogênio, sendo proposta a presença de uma dupla ligação e cinco anéis de seis membros, típicos de estrutura terpênica pentacíclica.

O espectro de massas apresentou fragmentos a m/z : 411 ($M^{+\bullet} - \bullet CH_3$), 302 ($M^{+\bullet} - C_9H_{16}$), 274 ($- C_2H_4$), 273 ($- \bullet H$). Esse padrão de fragmentação é característico triterpenos pentacíclicos de esqueleto de friedelano (Hirota et al., 1975) (Figura 110). Uma sugestão de esquema de fragmentação é mostrada na Figura 111, p. 129.

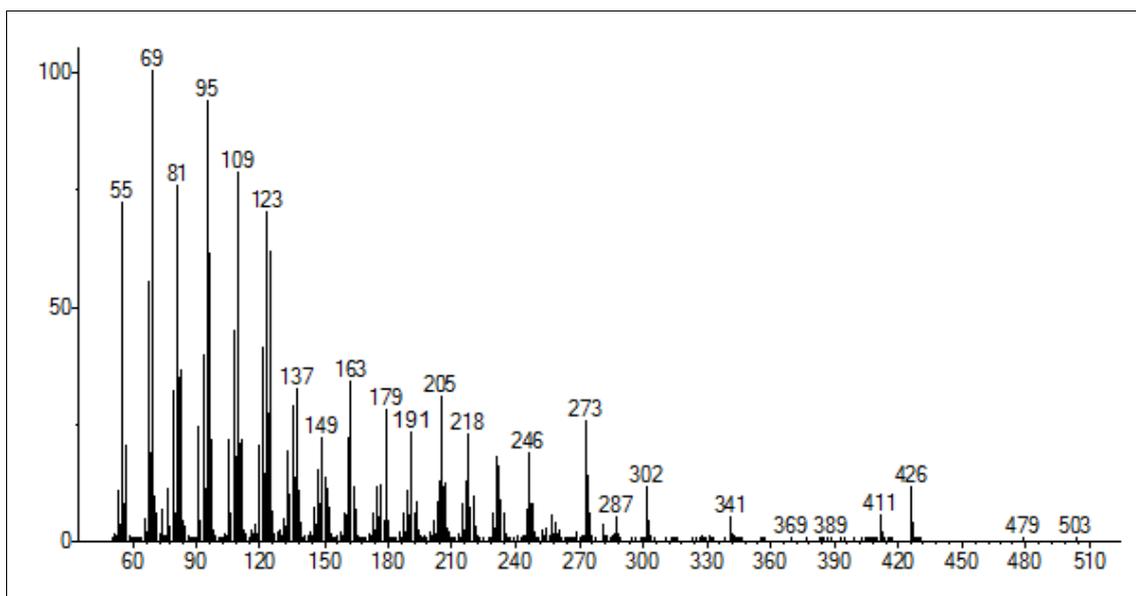


Figura 110. Espectro de massas da substância **LGA2**

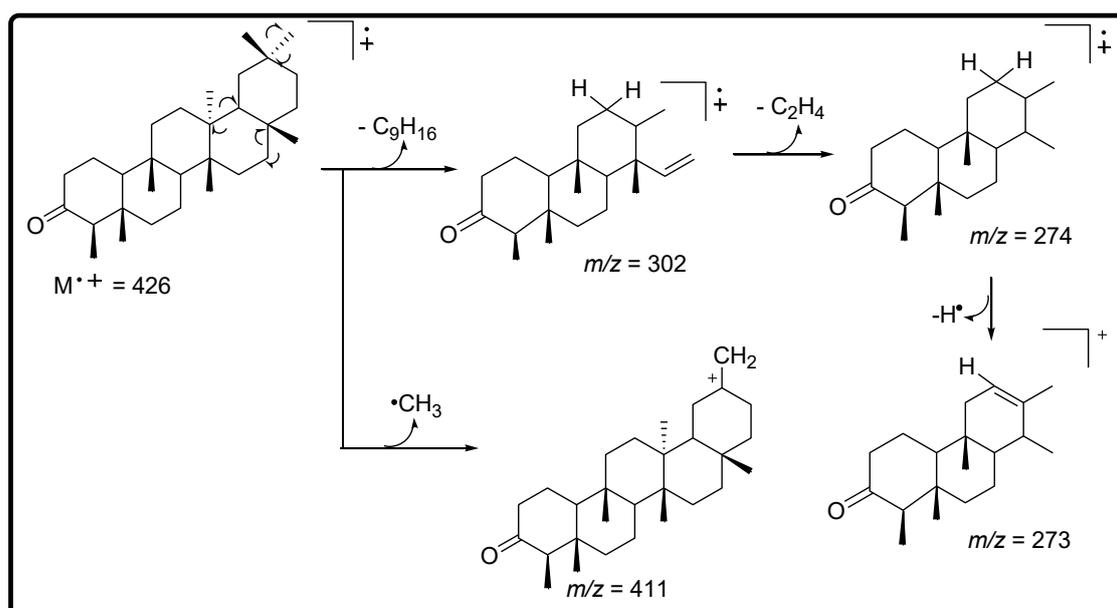


Figura 111. Proposta mecânica de fragmentação da substância **LGA-2**

O espectro de RMN¹H (Figuras 112 a 114, p. 130 e 131) da substância LGA2 apresentou valores de deslocamentos químicos semelhantes aos descritos na literatura para friedelina (Shiojima *et al.*, 1992). Também foi observado um duplo dubleto duplo em δ_H 2,39 (*ddd*, $J = 13,75; 5,15$ e $2,1$ Hz, H-2), multipletos entre δ_H 2,23 - 2,33 (*m*, 2H), além de sinais intensos entre (δ_H

0,73 - 1,26) atribuídos a hidrogênios dos grupos metila, de acordo com dados da literatura registrados para friedelina, (Abreu et al., 2011).

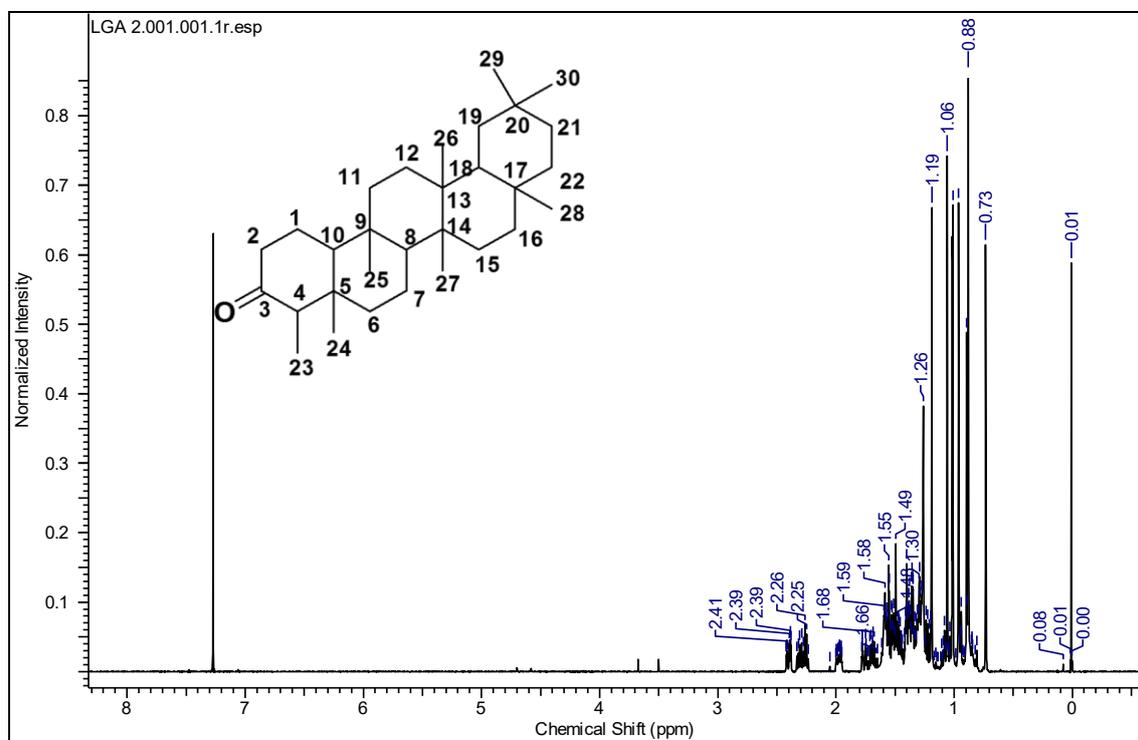


Figura 112. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) da substância LGA2

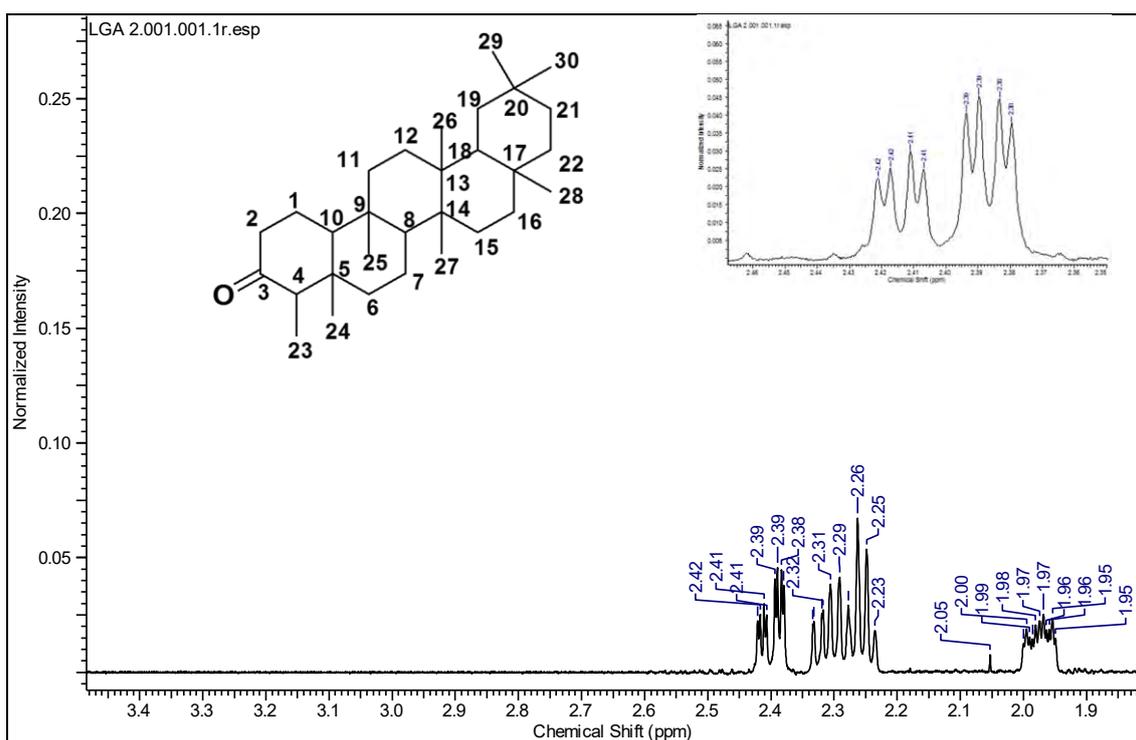


Figura 113. Ampliação das regiões entre (1,9 – 3,4 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **LGA2**

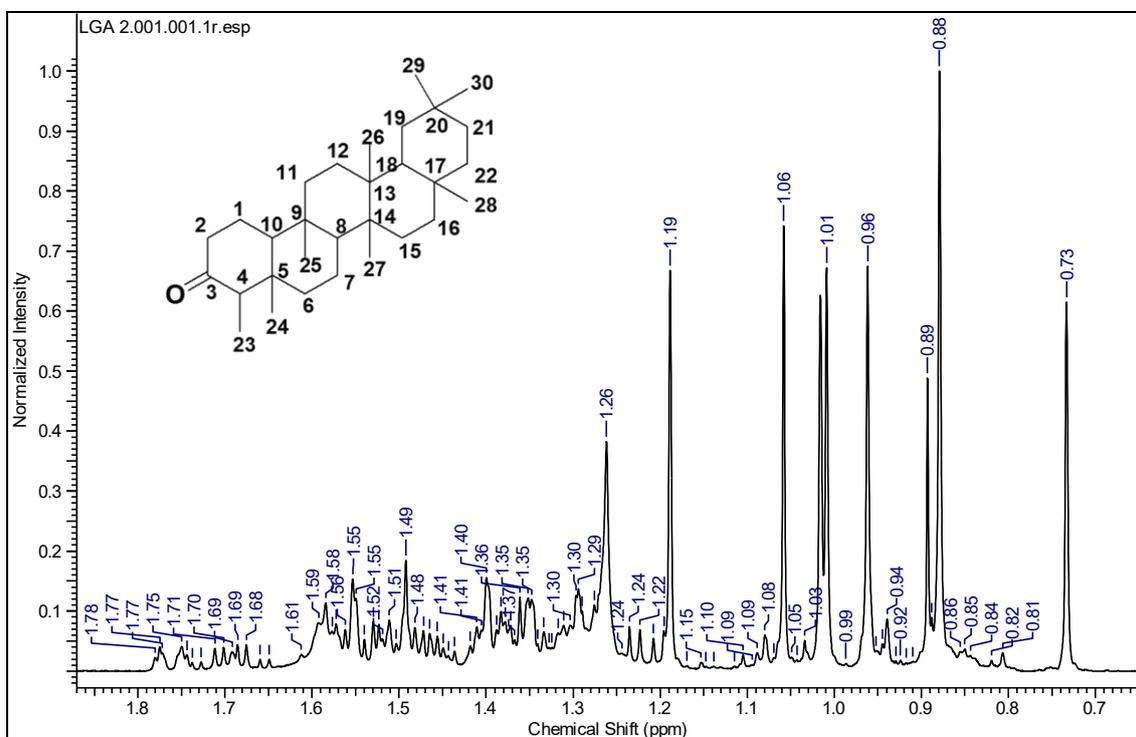


Figura 114. Ampliação das regiões entre (0,7 – 1,8 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **LGA2**

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 115 e 116, p. 132 e 133), apresentou um sinal em (δ_{C} 213,25) C-3 característico de carbonila de cetona. Observou-se um sinal em δ_{C} 6,8 referente a metila C-23, essa absorção referente à metila foi atribuída com base no efeito protetor γ -gauche exercido pela carbonila C-3

O espectro de RMN ^{13}C -APT da substância LGA2 (Figura 117, p. 133) apresentou dezoito sinais relativos à CH_2 e carbono quaternário e doze sinais referentes à CH_3 e CH . Observaram sinais em C-24 (δ_{C} 14,64), C-25 (δ_{C} 17,93), C-26 (δ_{C} 18,65), C-27 (δ_{C} 20,25), C-28 (δ_{C} 32,08), C-29 (δ_{C} 35,01), C-30 (δ_{C} 35,33) atribuídos aos grupos metila da série friedelano (Mahato e Kundu, 1994).

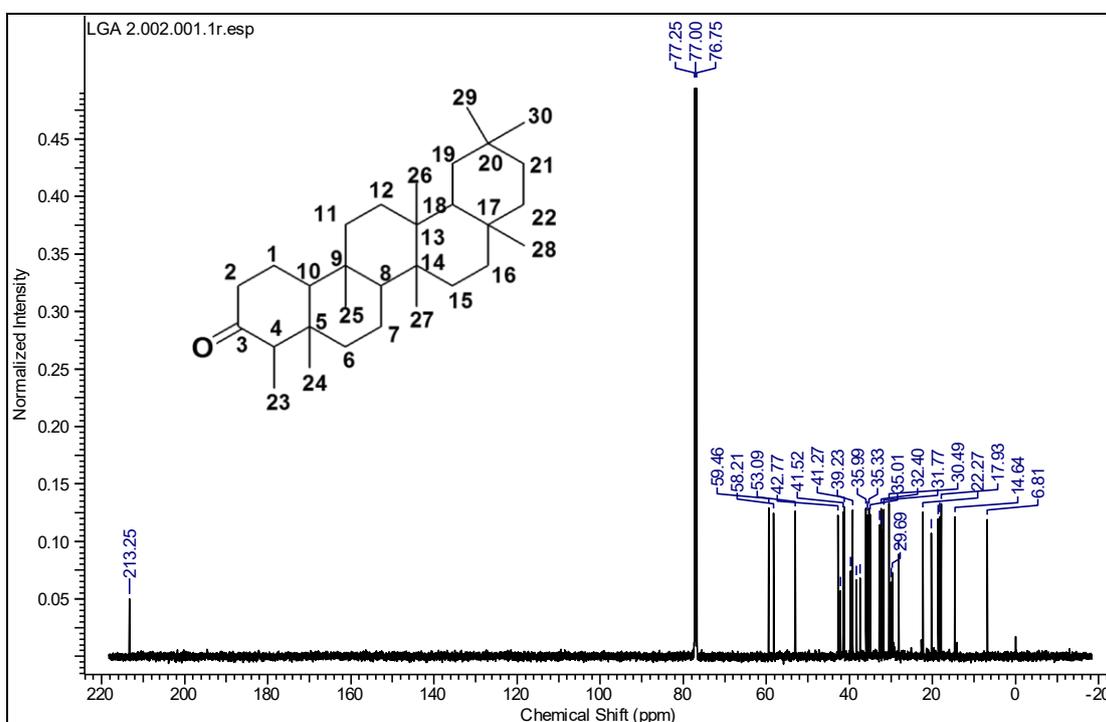


Figura 115. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância LGA2

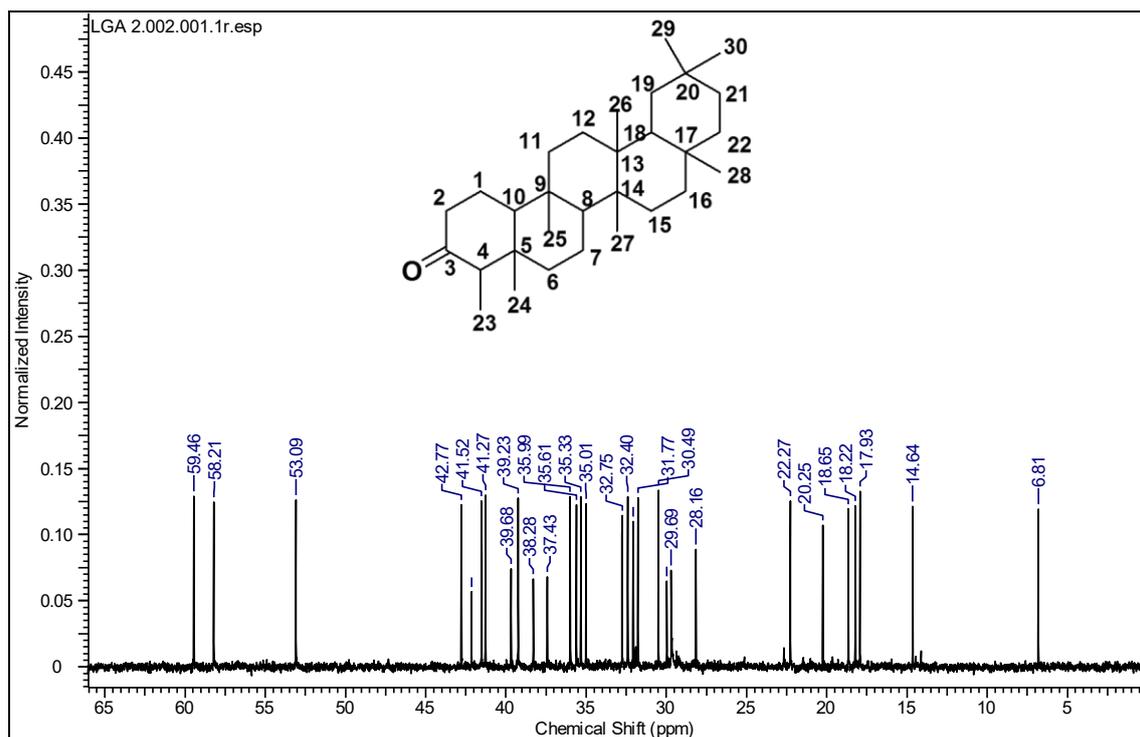


Figura 116. Ampliação das regiões entre (5 – 65 ppm) do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância **LGA2**

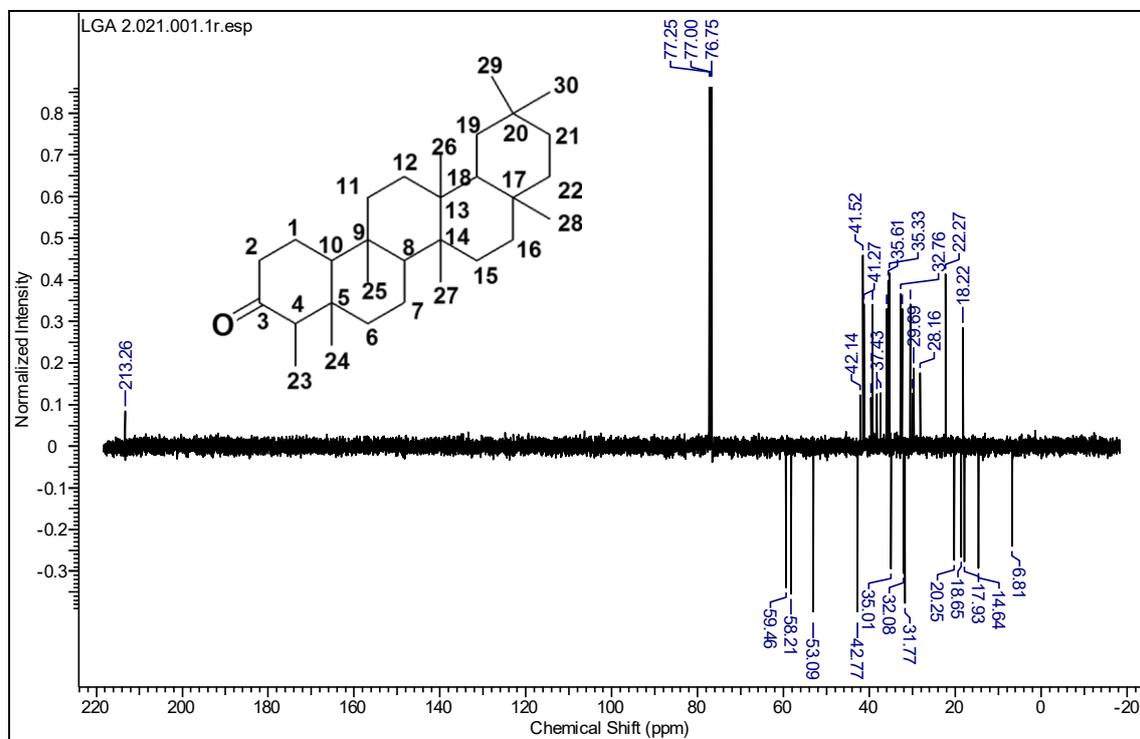


Figura 117. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) da substância **LGA2**

A partir da análise do espectro de correlação a uma ligação (HMQC) ($^1J_{CH}$) (Figura 118 e 119, p. 134 e 135) pode se confirmar a localização das metilas da substância LGA2 através das correlações entre C-23 (δ_C 6,81) e H-23 (δ_H 0,89), C-24 (δ_C 14,64) e H-24 (δ_H 0,73), C-25 (δ_C 17,93) e H-25 (δ_H 0,88), C-26 (δ_C 18,65) e H-26 (δ_H 1,06), C-27 (δ_C 20,25 e H-27 (δ_H 1,01), C-28 (δ_C 32,08) e H-28 (δ_H 1,19), C-29 (δ_C 35,01) e H-29 (δ_H 1,00), C-30 (δ_C 35,33) e H-30 (δ_H 0,96).

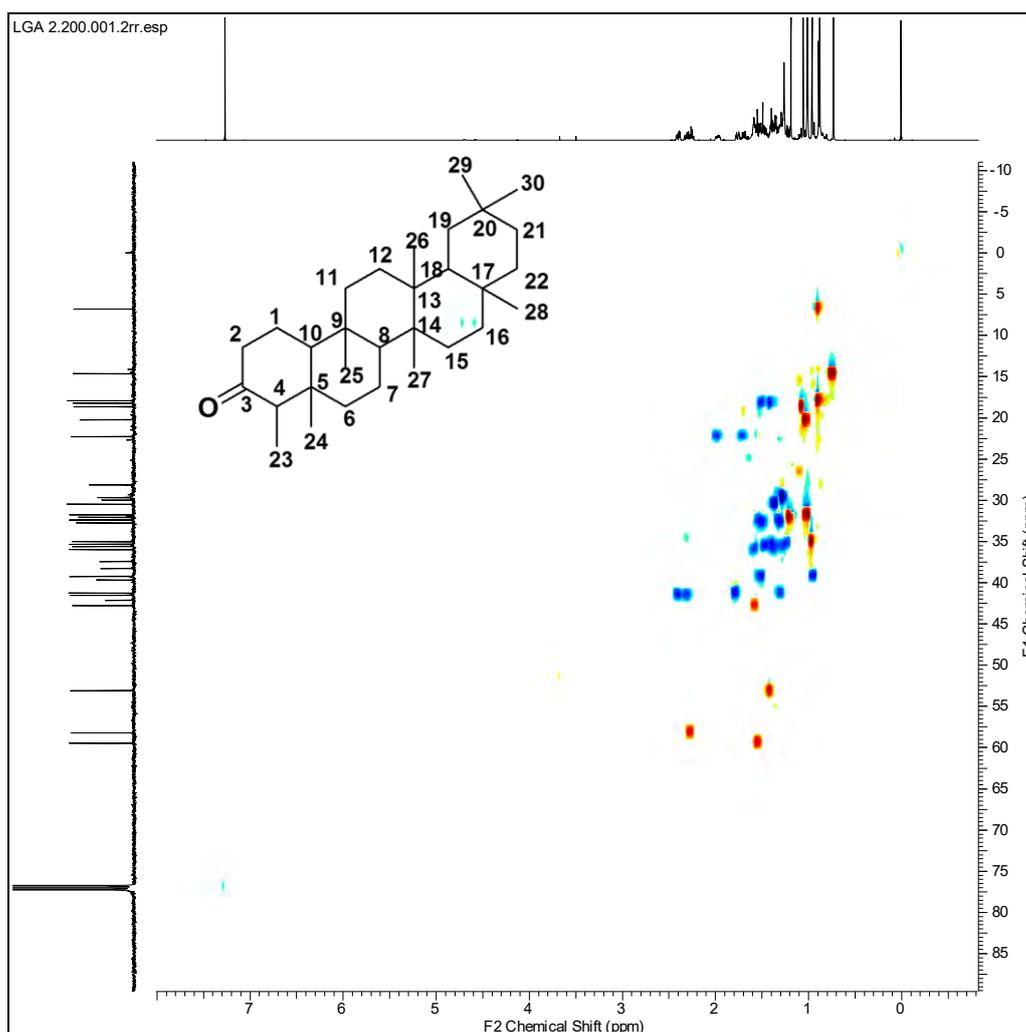


Figura 118. Espectro de HMQC da substância **LGA2**

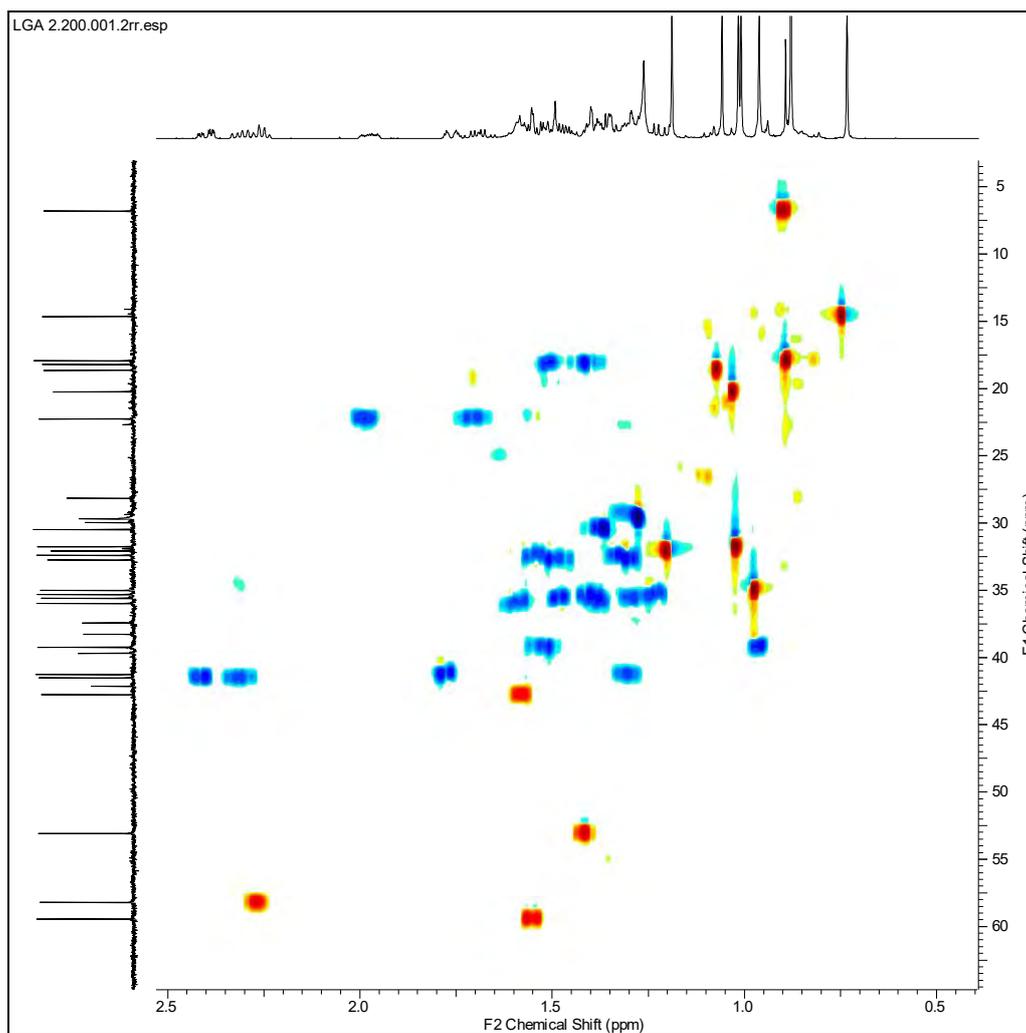


Figura 119. Ampliação do espectro de HMQC da substância **LGA2**

A partir da análise do espectro de correlação a longa distância (HMBC) as seguintes correlações a três ligações foram observadas: C-3 (δ_{C} 213) e H-23 (δ_{H} 0,89), C-12 (δ_{C} 30,49) e H-26 (δ_{H} 1,06), C-10 (δ_{C} 59,46) e H-24 (δ_{H} 0,73), C-8 (δ_{C} 53,09) e H-25 (δ_{H} 0,88), C-10 (δ_{C} 59,46) e H-25 (δ_{H} 0,88), C-18 (δ_{C} 42,77) e H-26 (δ_{H} 1,06) (Figura 120 e 121 p. 136 e 137).

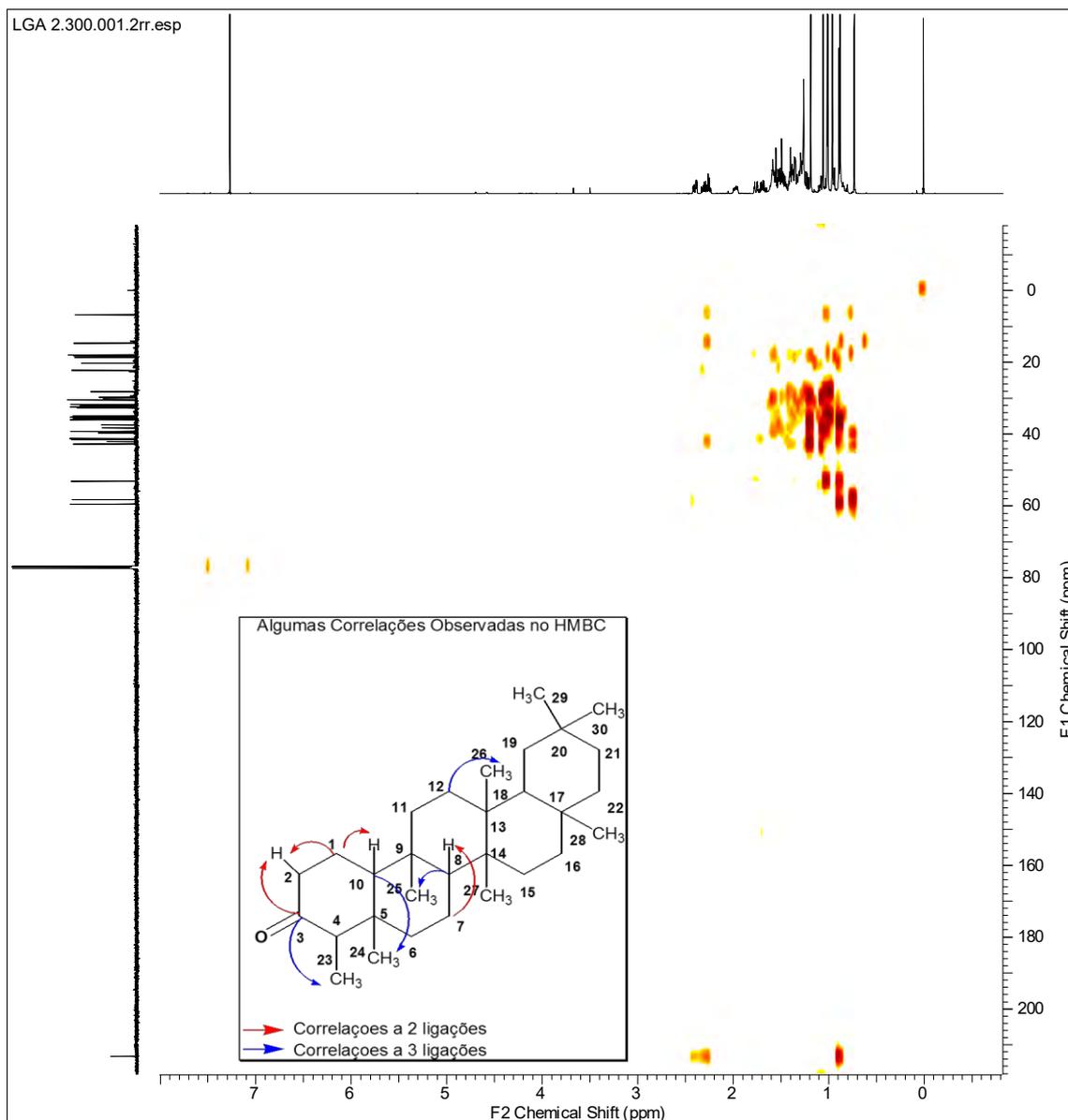


Figura 120. Espectro de HMBC da substância **LGA2**

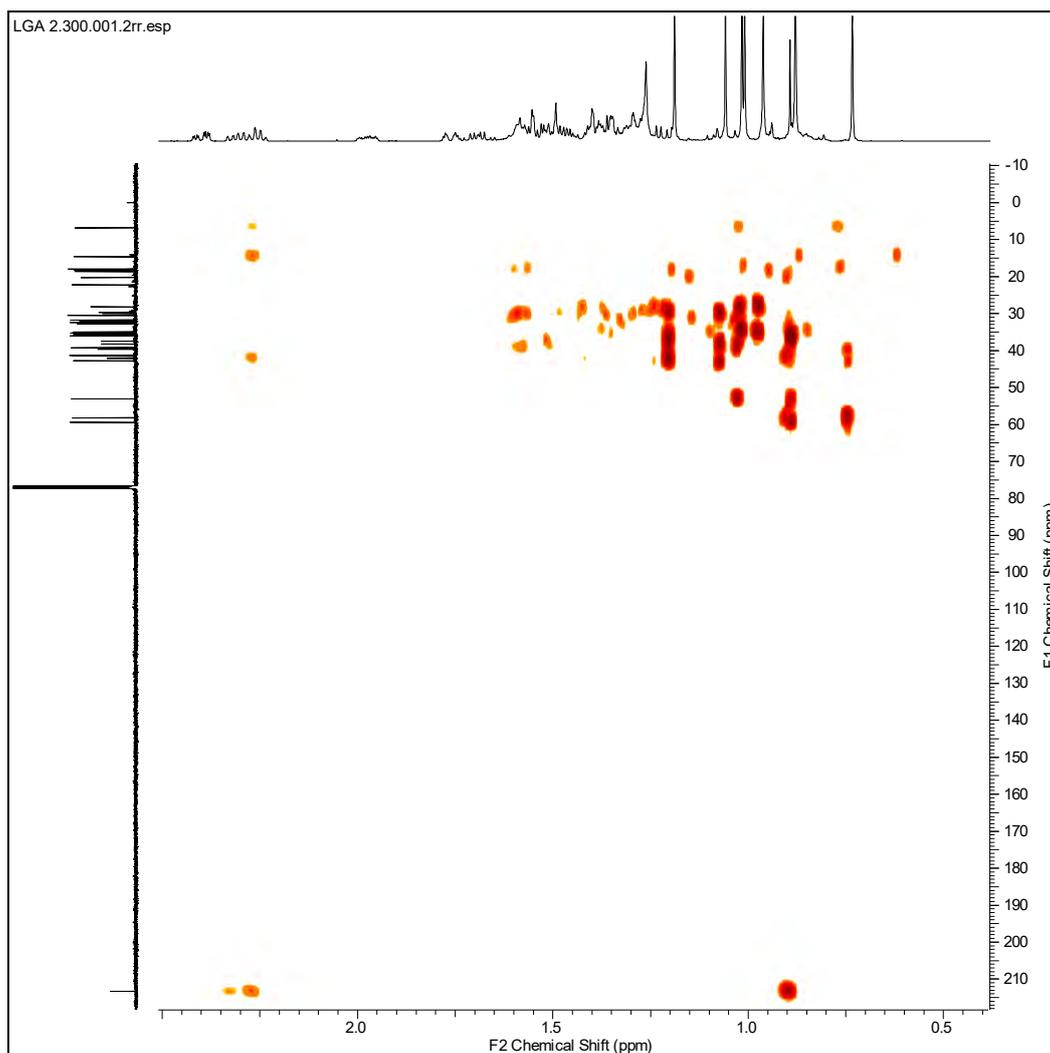


Figura 121. Ampliação do espectro de HMBC da substância **LGA2**

A comparação do padrão de fragmentação de massas e os dados obtidos de RMN ^1H e ^{13}C com os descritos na literatura permitiu a identificação da substância LGA2 como sendo a friedelina (Figura 122). Os deslocamentos químicos atribuídos para a substância **LGA2** estão resumidos na Tabela 13, p. 138.

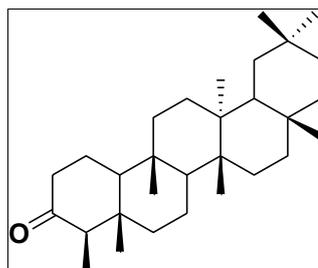


Figura 122. Estrutura da Substância LGA2 (Friedelina)

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LGA2, utilizando CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).

LGA2					*Literatura CDCl_3	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
1	22,27	1,97 (m), 1,69 (m)	H-2, H-10		22,3	1,96 (m) 1,68 (dq, $J = 13,0$; 5,1)
2	41,52	2,39 (ddd, $J = 13,75, 5,15$ e 2,1 Hz)	-	-	41,5	2,39 (ddd, $J = 13,7$; 5,1; 1,9) 2,29 (m; $J = 13,8$; 13,6; 6,5)
3	213,25	-	H2, H4	H-23	213,2	-
4	58,21	2,26 (m)	-	-	58,2	2,24 (q, $J = 6,5$)
5	42,14	-	H-4	-	42,1	-
6	41,27	1,75 (m) 1,26 (m)	-	-	41,3	1,75 (m) 1,27 (m)
7	18,22	1,58 (m) 1,49 (m)	H-8	-	18,2	1,59 (m) 1,47 (m)
8	53,09	1,40 (m) 1,39 (m)	-	H-25	53,3	1,44 (m), 1,39 (m)
9	37,43	-	-	-	37,5	-
10	59,46	1,55 (m)	-	H-24/ H-25	59,5	1,55 (m)
11	35,61	1,38 (m)	-	-	35,6	1,38 (m)
12	30,49	1,35 (m)	-	H-26	30,5	1,35 (m)
13	39,68	-	-	-	39,7	-
14	38,28	-	-	-	38,3	-
15	32,08	1,47 (m) 1,26 (m)	-	-	32,8	1,47 (m) 1,27 (m)
16	35,99	1,55 (m) 1,36 (m)	-	-	36,0	1,54 (m) 1,36 (m)
17	29,98	-	-	-	30,0	--
18	42,77	1,57 (m)	-	H-26	42,8	1,56 (m)
19	35,33	1,36 (m)	-	-	35,4	1,37 (m)
20	28,16	-	-	-	28,2	-
21	32,40	1,49 (m)	-	-	32,4	1,49 (m)
22	39,23	1,48 (m)	-	-	39,3	1,48 (m)
23	6,81	0,89 (s)	H-4	-	6,8	0,87 (d, $J = 6,5$ Hz)
24	14,64	0,73 (s)	-	-	14,7	0,73 (s)
25	17,93	0,88 (s)	-	-	17,9	0,88 (s)
26	18,65	1,06 (s)	-	-	18,7	1,05 (s)
27	20,25	1,01 (s)	-	-	20,3	1,01 (s)
28	32,08	1,19 (s)	-	-	32,1	1,18 (s)
29	35,01	1,09 (s)	-	-	35,0	1,00 (s)
30	35,33	0,96 (s)	-	-	35,0	0,95 (s)

*(Mahato e Kundu, 1994)

4. 4. 2. 9. Determinação estrutural da substância LGA3

A substância LGA3 isolada do extrato em Acetato de etila de *L. guilleminianus* apresentou-se como um sólido branco amorfo, solúvel em diclorometano.

No espectro na região do infravermelho (Figura 123) foi possível identificar bandas de absorção relativas a esteroides, pois os mesmos exibem uma banda intensa e larga de absorção em torno de 3400 cm^{-1} característica do estiramento da ligação O–H, uma banda intensa em 2930 cm^{-1} correspondentes a estiramentos de C–H. Os estiramentos C=C aparecem em torno de 1637 cm^{-1} (Silverstein & Webster, 2000).

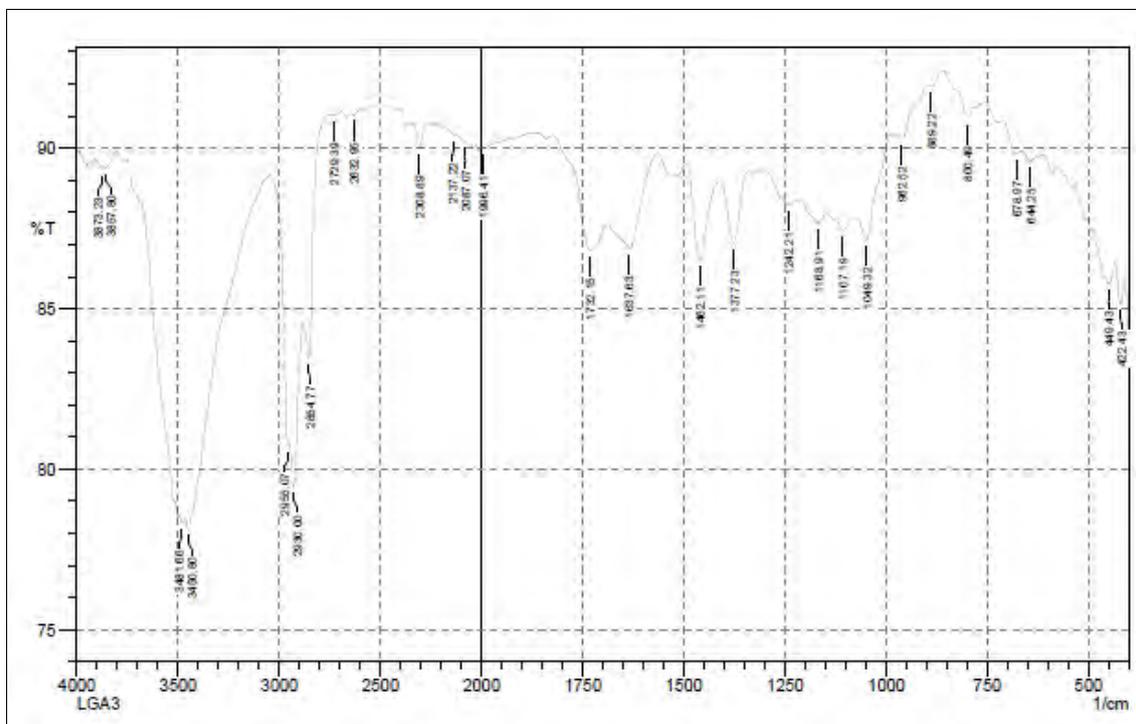


Figura 123. Espectro na região de infravermelho de LGA3

A análise do cromatograma da amostra LGA3 (Figura 124) apresentou dois picos, sendo um em maior proporção, evidenciando a presença de uma mistura de duas substâncias.

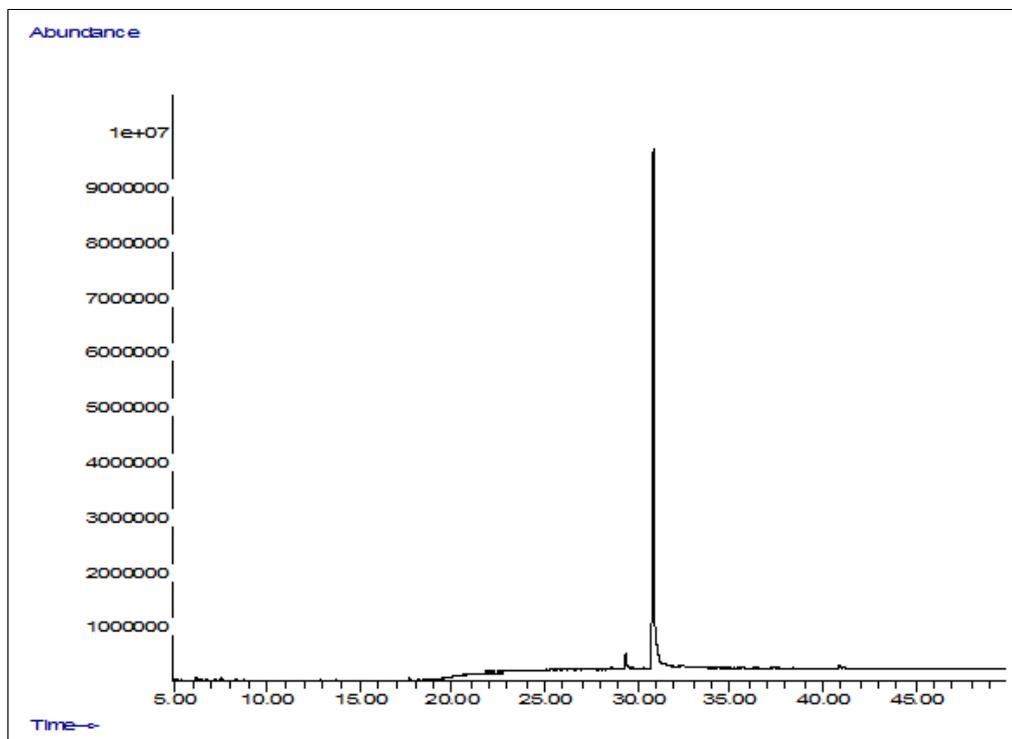


Figura 124. Cromatograma da amostra **LGA3**.

A partir da comparação dos espectros de massas com a biblioteca do aparelho (NIST) sugeriu-se que a substância LGA3 trata-se dos esteroides estigmasterol e γ -sitosterol.

Os espectros de massas da amostra LGA3 mostrou pico do íon molecular a $M^{+\bullet}$ 412 u.m.a compatível com a fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$ referente ao esteroide estigmsterol. O espectro de massas (Figura 125, p. 141) mostrou, entre outros, fragmentos a $m/z = 394 (M^{+\bullet} - H_2O)$, $273 (M^{+\bullet} - \bullet C_{10}H_{19})$, $255 (M^{+\bullet} - H_2O)$, $231 (M^{+\bullet} - \bullet C_{13}H_{25})$ e $213 (M^{+\bullet} - H_2O)$.

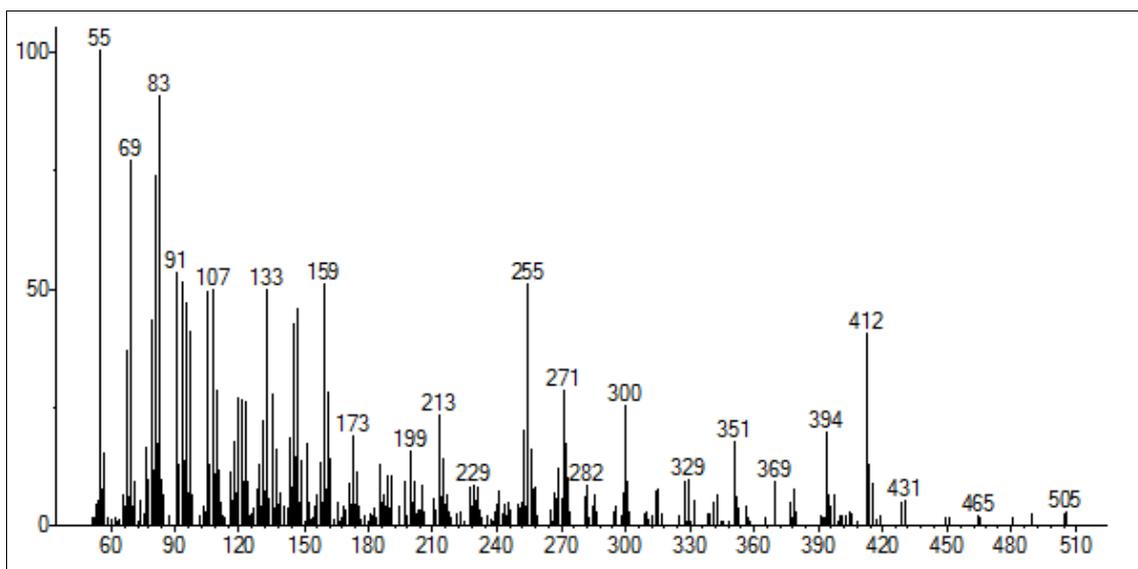


Figura 125. Espectro de massas da amostra **LGA3** (estigmasterol)

Na Figura 126 apresenta-se a proposta de fragmentação para o esteroide estigmasterol.

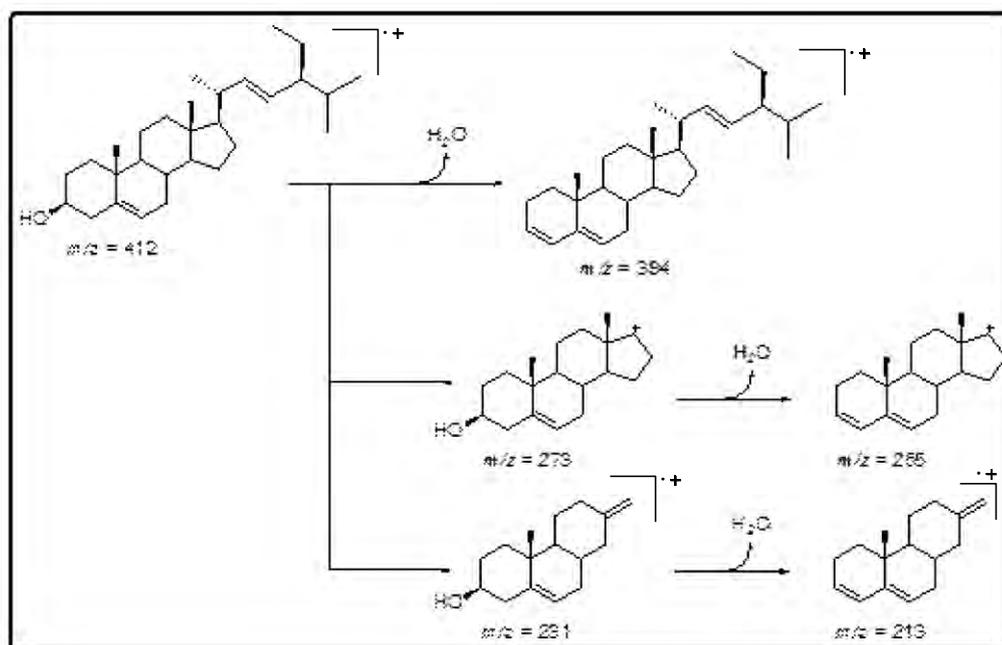


Figura 126. Proposta mecânica de fragmentação para a amostra **LGA3** (estigmasterol)

A análise do espectro de massas do esteroide γ -sitosterol revelou pico do íon molecular a $M^{+\bullet}$ 414 u.m.a. compatível com a fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$. O espectro de massas (Figura 127) mostrou, entre outros, fragmentos a $m/z = 399$ ($M^{+\bullet} - \bullet CH_3$), 381 ($M^{+\bullet} - H_2O$), 329 ($M^{+\bullet} - \bullet C_6H_{13}$), 273 ($M^{+\bullet} - \bullet C_4H_9$), 255 ($M^{+\bullet} - H_2O$), 231 ($M^{+\bullet} - \bullet C_{13}H_{27}$), 213 ($M^{+\bullet} - H_2O$).

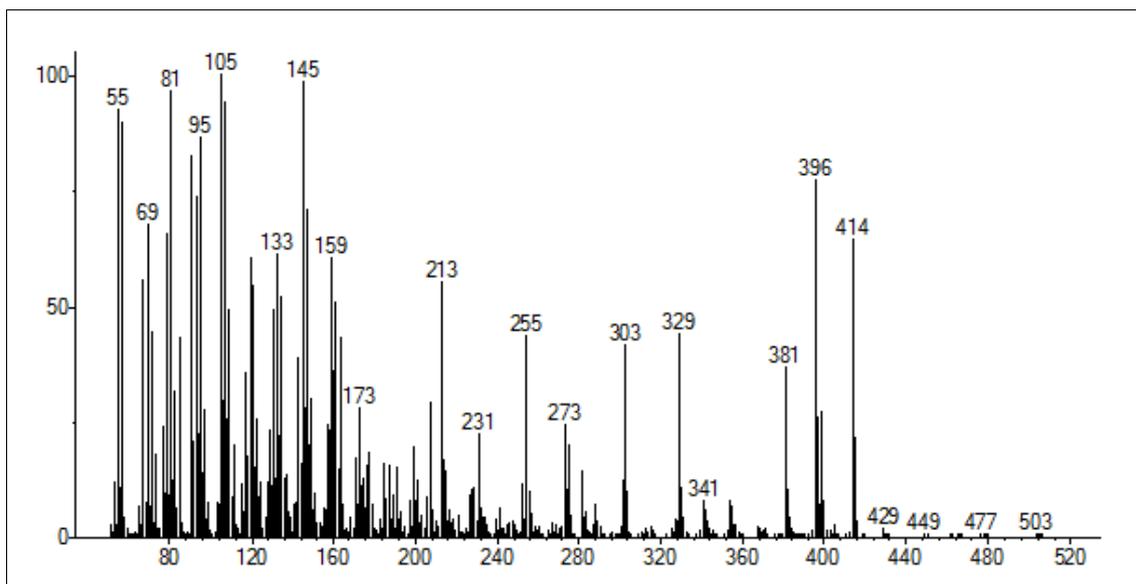


Figura 127. Espectro de massas da amostra **LGA3** (γ -sitosterol)

A proposta de fragmentação do esteroide γ -sitosterol consiste na perda de uma molécula de H_2O ($m/z = 381$). Também pode ser observada a perda de 85 u.m.a ($m/z = 329$), consistente com um radical $\bullet C_6H_{13}$, com subsequente eliminação de $\bullet C_4H_9$ ($m/z = 273$) e H_2O ($m/z = 255$). O íon m/z 213 foi atribuído a perda de 183 u.m.a ($m/z = 231$), referente ao radical $\bullet C_{13}H_{27}$, seguido da eliminação de H_2O (Gonçalves, 2011).

Na Figura 128 p. 143, está ilustrado a proposta de fragmentação para o γ -sitosterol

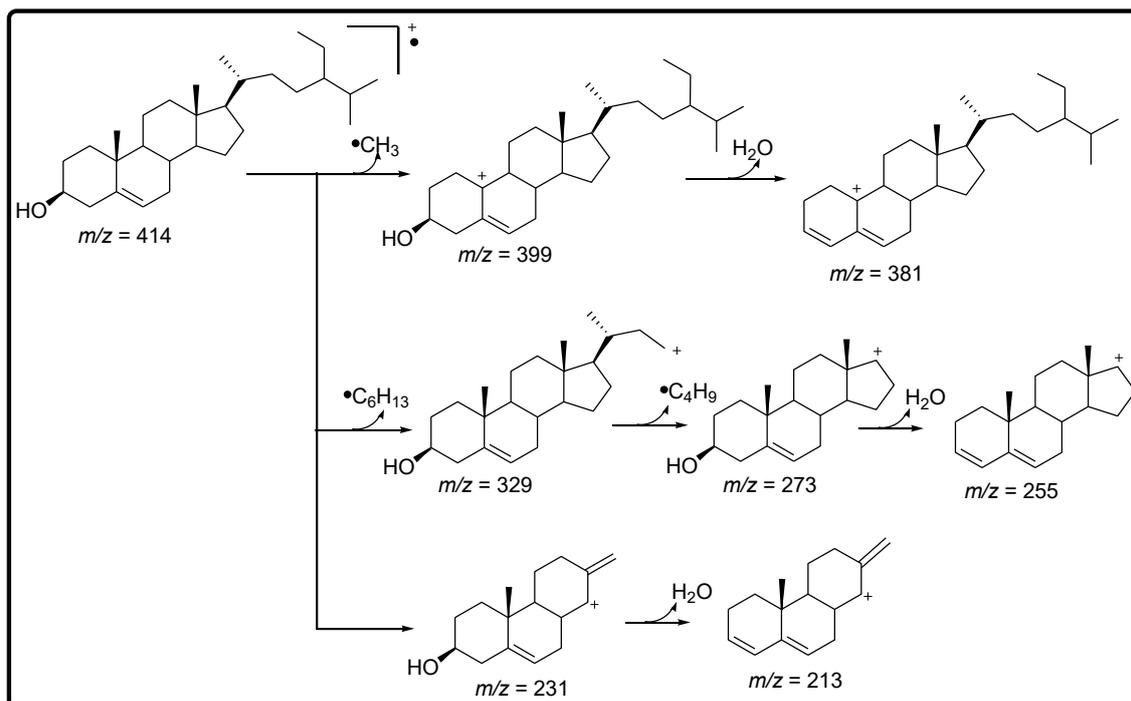


Figura 128. Proposta mecânica de fragmentação para a amostra **LGA3** (γ -sitosterol)

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 129 a 131, p. 144 e 145) da mistura apresentou um grande acúmulo de sinais entre as regiões (δ_{H} 0,69-2,32), referentes à absorção de grupos metílicos, metilênicos e metínicos de esteroides. O espectro ainda revelou a presença de um multipletto entre (δ_{H} 3,50-3,56) atribuído ao hidrogênio H- 3 verificou-se um dubleto largo em (δ_{H} 5,36, *dl*, $J= 5,2$ Hz) comum em ambos os compostos, relativo ao hidrogênio H- 6.

Observou-se também os duplo-dubletos a (δ_{H} 5,02) H-22 e (δ_{H} 5,15) H- 23, que caracterizam os hidrogênios olefínicos do estigmasterol (Zanon et al., 2008).

Fitoesteroides ocorrem largamente nos vegetais, normalmente eles aparecem como mistura de difícil separação por apresentarem propriedades espectroscópicas semelhantes.

O estigmasterol é facilmente identificado no espectro de RMN ^1H , pelos sinais referentes aos hidrogênio vinílicos (H-22 e H-23) que aparecem como sinais duplos.

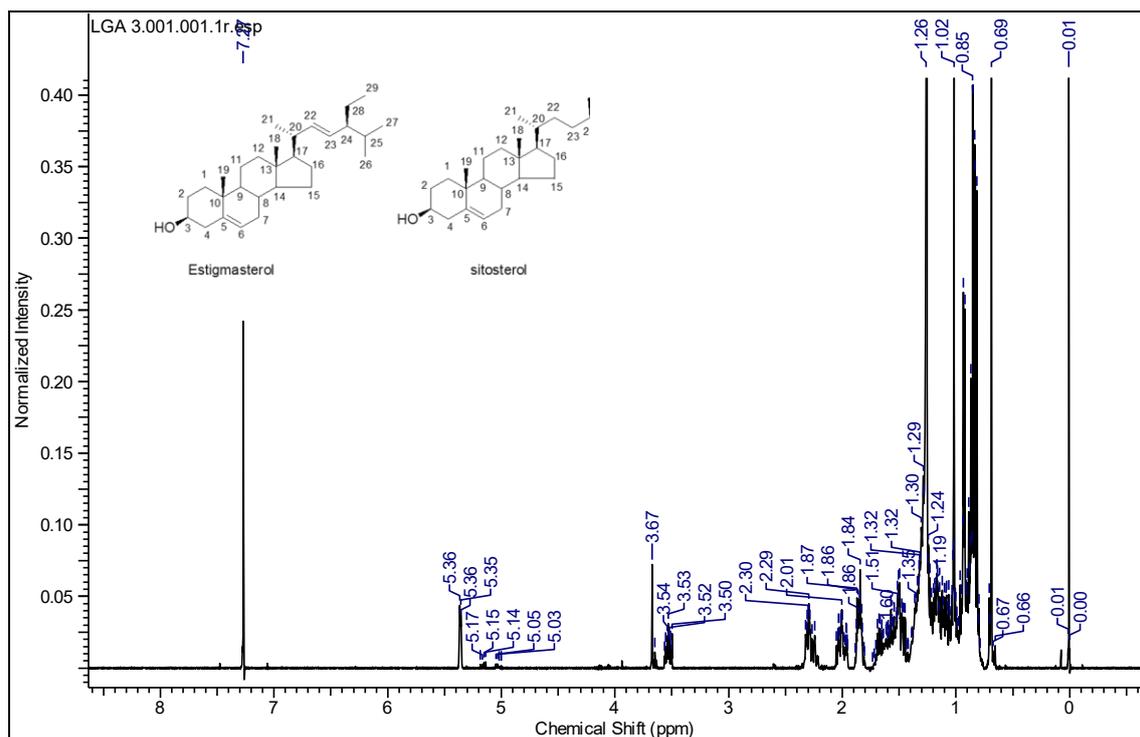


Figura 129. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra **LGA3**

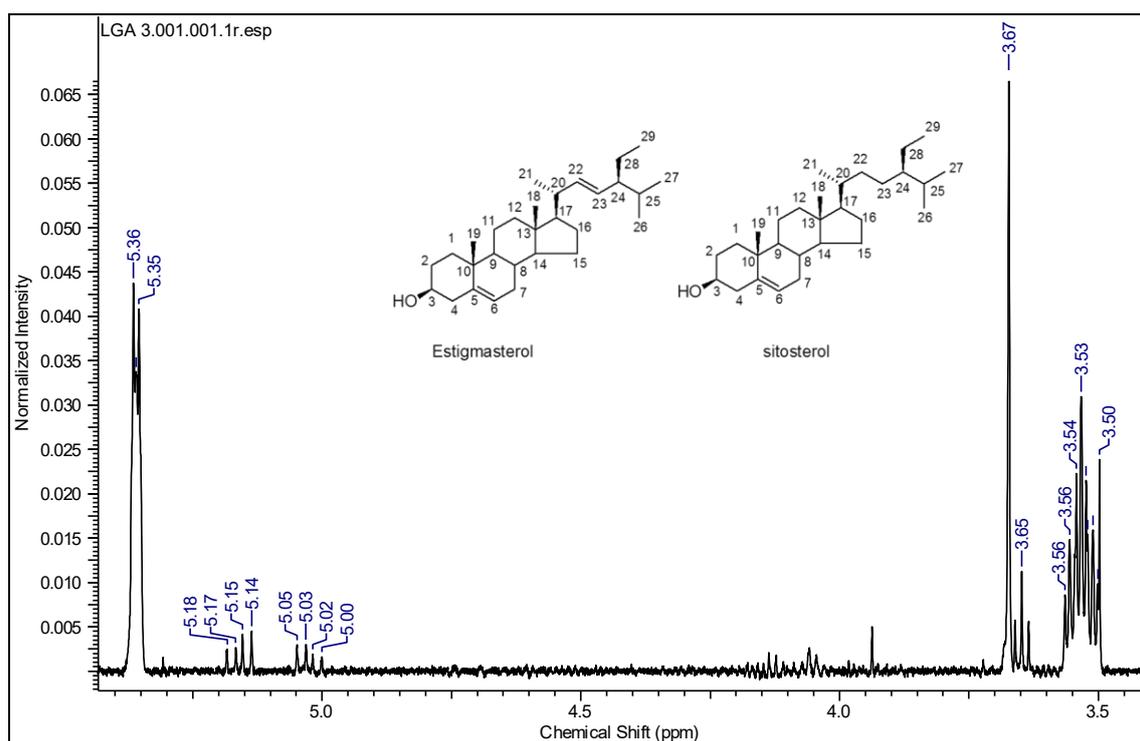


Figura 130. Ampliação das regiões entre (3,5 – 5,3 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra **LGA3**

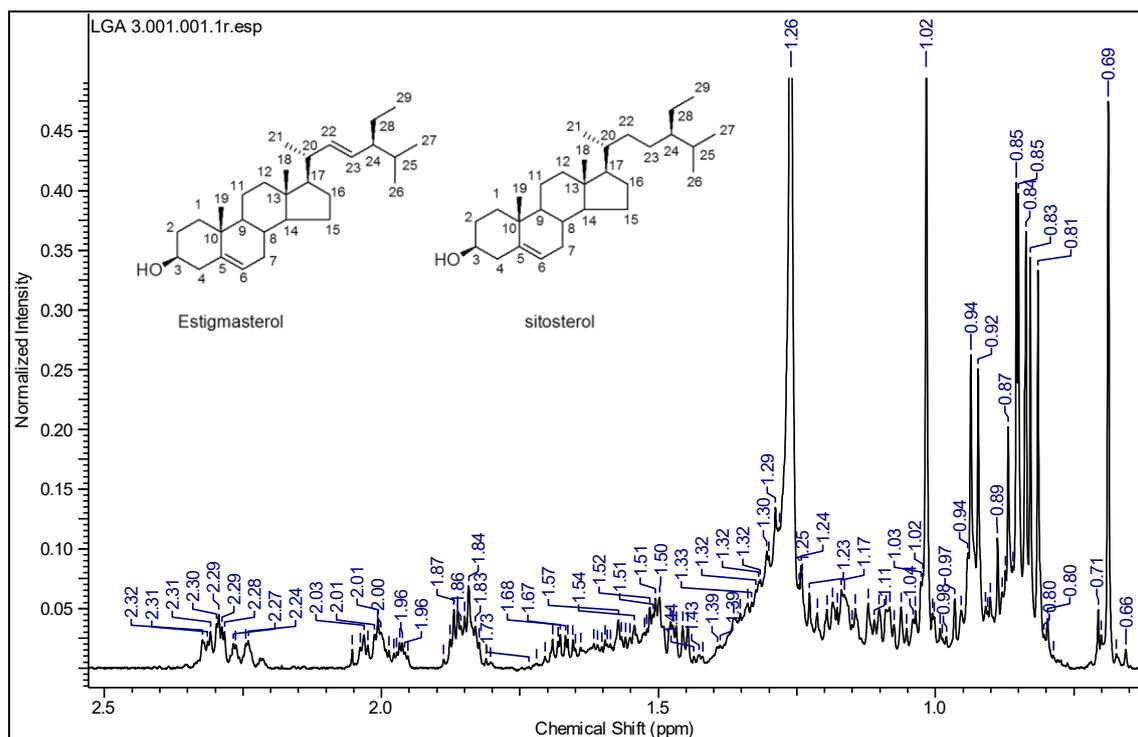


Figura 131. Ampliação das regiões entre (0,6 – 2,5 ppm) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra **LGA3**

O espectro de RMN de ^{13}C da mistura (Figura 132, p. 146) indicou a presença de 31 átomos de carbonos. Quatro sinais na região de carbonos sp^2 (δ_{c} 121,71, 129,26, 138,30 e 140,74) indicam duas ligações duplas. Os sinais em (δ_{c} 121,71 e 140,74) são característicos de esteróides com uma ligação dupla entre C-5 e C-6 e os sinais em (δ_{c} 129,30 e 138,30) são característicos de uma ligação dupla entre C-22 e C-23 presente apenas no estigmaterol. (Seo et al., 1988).

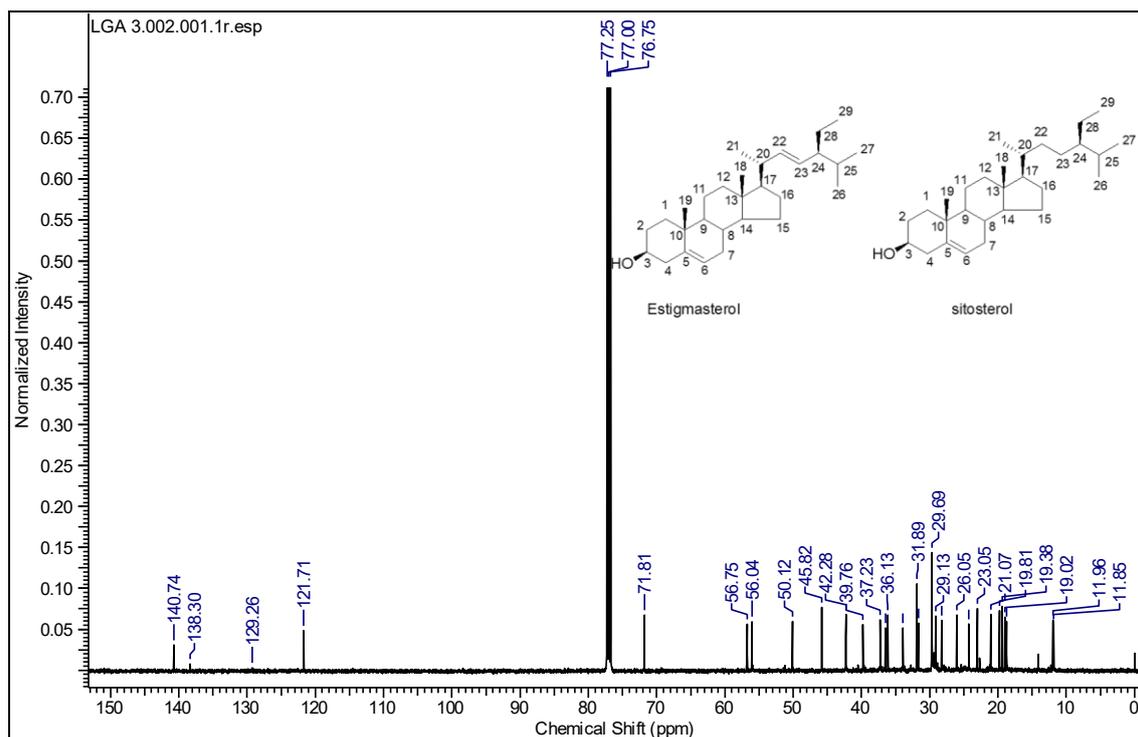


Figura 132. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da amostra LGA3

A análise do espectro de RMN ^{13}C – APT permitiu identificar o padrão de hidrogenação dos átomos de carbono presentes nas estruturas dos dois esteroides (Figura 133).

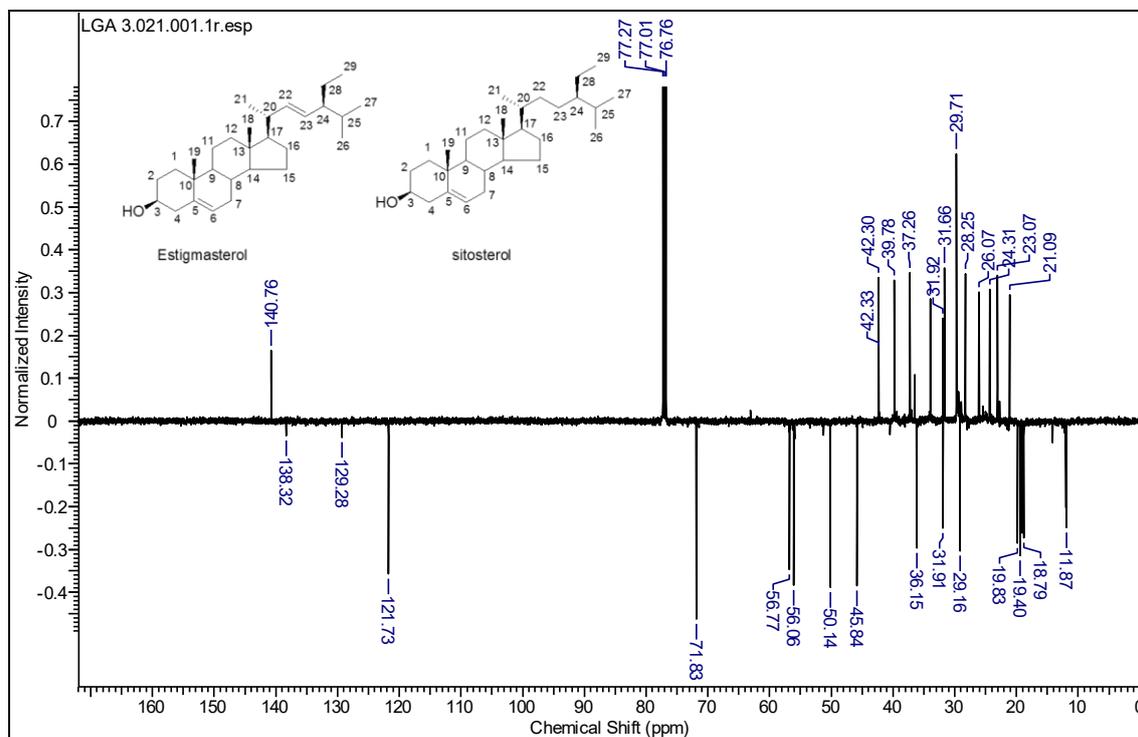


Figura 133. Espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl_3) da amostra LGA3

A distinção entre as substâncias foi feita principalmente pela análise de CG/EM e espectros de RMN¹H e ¹³C. O conjunto de dados obtidos para a substância LGA3 quando comparados com aqueles descritos na literatura permitiram atribuir a estrutura dos esteroides estigmasterol e γ -sitosterol (Figura 134). Os deslocamentos químicos atribuídos para a substância LGA3 estão resumidos na Tabela 14 e 15 p. 148 e 149.

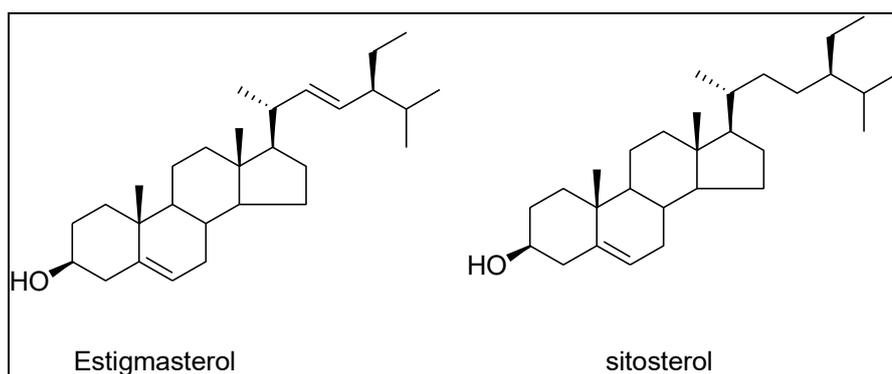


Figura 134. Estrutura da Substância **LGA3** os esteroides estigmasterol e γ -sitosterol

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LGA3 (estigmasterol) utilizando CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm)

LGA3 (estigmasterol)			*Literatura CDCl_3	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	37,23	-	37,2	-
2	31,89	-	31,9	-
3	71,81	3,53 (m)	71,8	3,49 (m)
4	42,28	-	42,2	-
5	140,74	-	140,7	-
6	121,71	5,36 (dl, $J= 5,2$ Hz)	121,7	5,36 (dl)
7	33,93	-	33,9	-
8	31,64	-	31,6	-
9	50,12	-	50,1	-
10	36,13	-	36,2	-
11	21,07	-	21,1	-
12	39,76	-	39,8	-
13	42,28	-	42,2	-
14	56,75	-	56,8	-
15	24,29	-	24,3	-
16	28,23	-	28,2	-
17	56,04	-	56,1	-
18	11,96	1,02 (s)	11,9	1,03 (s)
19	19,38	0,68 (s)	19,4	0,71 (s)
20	39,76	-	39,8	-
21	19,81	0,93 (d, $J= 6,55$ Hz)	19,8	0,91 (d, $J= 6,2$ Hz)
22	138,30	5,03 (dd, $J= 8,7$ e 15,1 Hz)	138,3	5,02 (dd, $J= 8$ e 16 Hz)
23	129,26	5,16 (dd, $J=8,05$ e 14,95 Hz)	129,3	5,16 (dd, $J= 8$ e 15 Hz)
24	50,12	-	51,2	-
25	31,64	-	31,6	-
26	21,07	-	21,1	-
27	19,81	-	19,8	-
28	26,05	-	26,1	-
29	11,85	0,83 (t, $J= 6,8$ Hz)	11,8	0,83 (t, $J= 7,1$ Hz)

*(Mahato e Kundu, 1994)

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LGA3 (γ -sitosterol), utilizando CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).

C	LGA3 (sitosterol)		*Literatura CDCl_3	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	37,23	-	37,3	-
2	31,89	-	31,9	-
3	71,81	-	71,8	-
4	42,31	3,53 (m)	42,4	3,49 (m)
5	140,74	-	140,7	-
6	121,71	-	121,7	-
7	33,93	5,36 (dl, J= 5,2 Hz)	34,0	5,36 (dl)
8	31,89	-	31,9	-
9	50,12	-	50,1	-
10	36,13	-	36,1	-
11	21,07	-	21,1	-
12	39,76	-	39,8	-
13	42,31	-	42,3	-
14	56,75	-	56,8	-
15	24,29	-	24,3	-
16	28,23	-	28,9	-
17	56,04	-	56,0	-
18	11,96	1,02 (s)	12,3	1,01 (s)
19	19,38	0,68 (s)	19,4	0,68 (s)
20	39,76	-	39,8	-
21	18,77	0,93 (d, J = 6,55 Hz)	18,8	0,93 (d, J = 6,5Hz)
22	31,89	-	32,0	-
23	26,05	-	26,0	-
24	45,82	-	45,8	-
25	29,13	-	29,0	-
26	19,02	-	19,1	-
27	19,81	-	19,8	-
28	23,05	-	23,0	-
29	11,85	0,83 (t, J= 6,8 Hz)	11,8	0,84 (t. J = 7,2 Hz)

*(Mahato e Kundu, 1994)

4. 4. 2. 10. Determinação estrutural da substância LG-5Ac

A substância LG-5Ac foi obtida a partir da acetilação da fração LG-5 do extrato em MeOH/H₂O, apresentou-se como um sólido branco solúvel em CHCl₃.

A substância quando analisada através de CCDA seguida de pulverização com vanilina sulfúrica e aquecimento, apresentou desenvolvimento de coloração azulada, característica de esqueleto triterpenoidal e R_f maior do que o da fração LG-5, confirmando a reação de acetilação.

A estrutura da substância LG-5Ac foi caracterizada a partir da análise dos dados espectrométricos (RMN de ¹H e ¹³C, APT, COSY, HMQC, HMBC e ESI- EM/EM) e por comparação com os dados disponíveis na literatura.

A análise do espectro de RMN-¹³C desacoplado de hidrogênio e RMN-¹³C utilizando a técnica de APT (Figura 135, 136 e 137, p. 151 e 152), permitiu reconhecer a presença de dezesseis sinais correspondentes a dezesseis carbonos não hidrogenados [(C)₁₆: seis *sp*³ e dez *sp*² (incluindo oito carbonilas entre δ_C 169,01 – 170,77; relativas a oito grupos acetila e uma a δ_C 181,23, correspondente ao carbono carbonílico C-28 e um *sp*² vinílico a δ_C 143,51, correspondente ao C-13)], 19 metínicos [(CH)₁₉: dezoito *sp*³ (13 ligados a átomos de oxigênio, um *sp*² olefínico a δ_C 122,64 (CH-12) e três a δ_C 104,44; 99,43 e 96,37 ligados aos carbonos anoméricos CH-1', CH-1'' e CH-1''' respectivamente)], doze metilênicos [(CH₂)₁₂, todos *sp*³] e 16 metílicos [(CH₃)₁₆: oito ligados aos grupos acetilas, permitindo deduzir, com base na presença de seis ligações éter envolvendo três unidades de resíduo de açúcar, oito grupos acetil e uma função ácido carboxílico, a fórmula molecular expandida para (C)₁₆(CH)₁₉(CH₂)₁₂(CH₃)₁₆, ou seja, C₆₃H₉₂O₂₄, correspondente a 18 graus de insaturação, nove grupos carbonilas, uma ligação dupla e oito anéis (cinco da aglicona triterpênica e três correspondentes aos resíduos de açúcar).

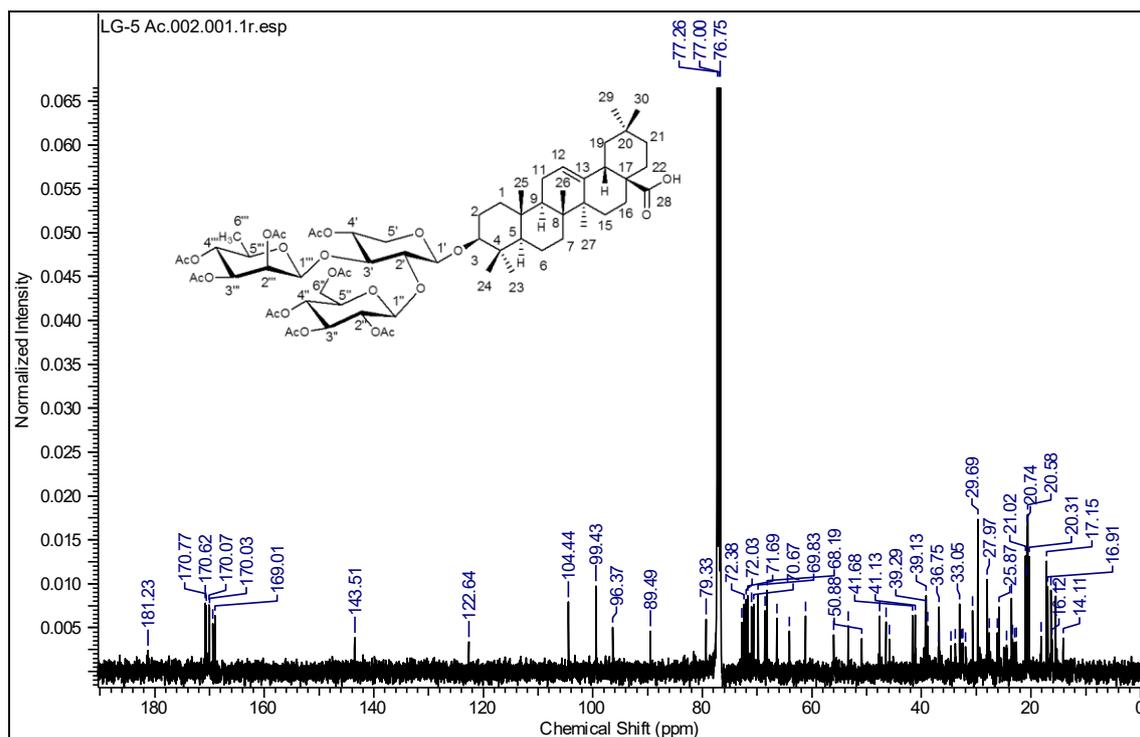


Figura 135. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância **LG5-Ac**

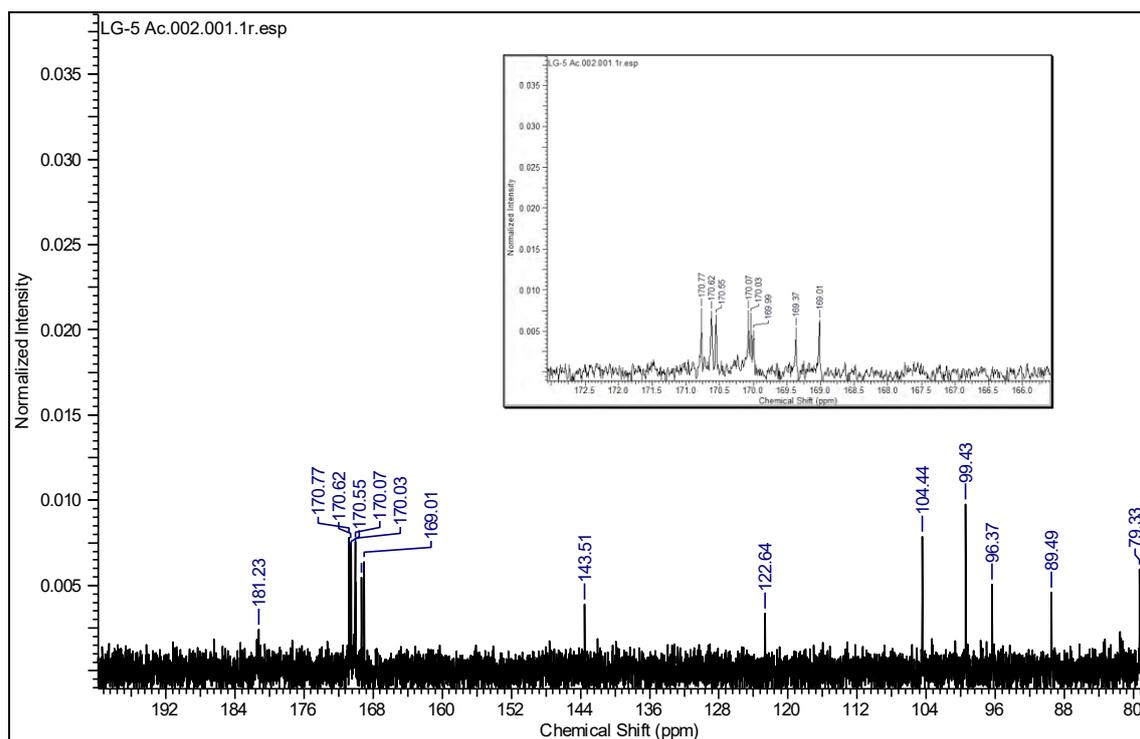


Figura 136. Ampliação das regiões entre (80 – 192 ppm) do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância **LG-5Ac**

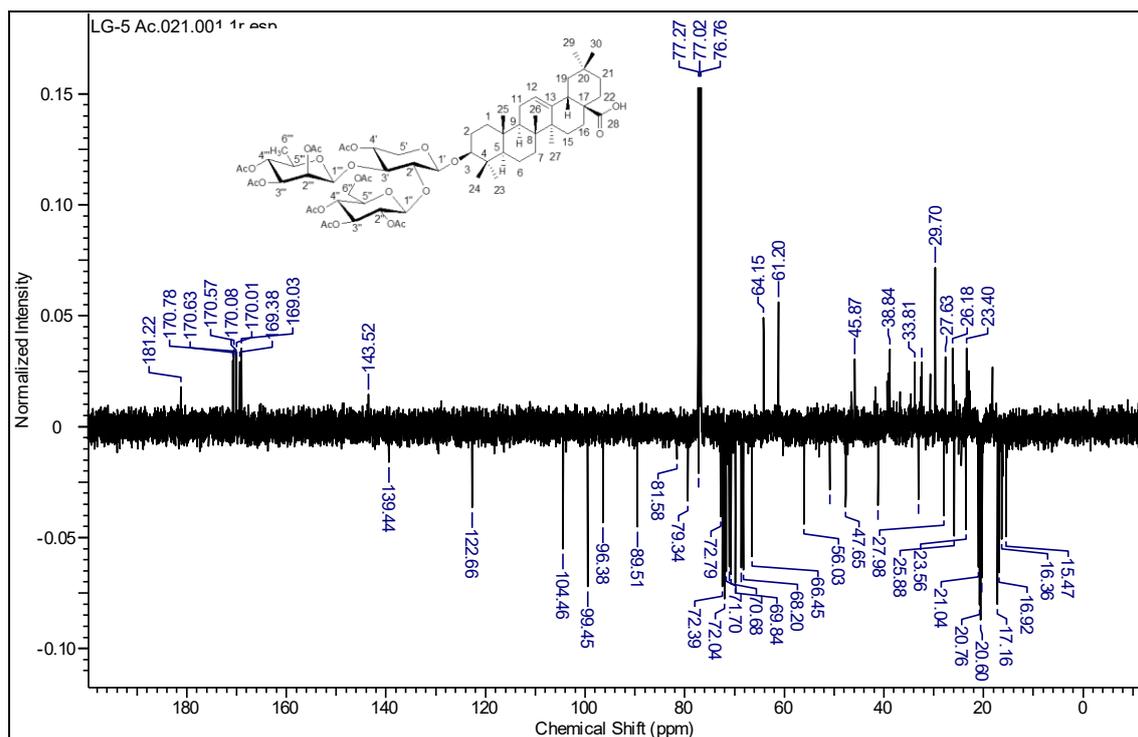


Figura 137. Espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl₃) da substância **LG-5Ac**

A fórmula molecular proposta através dos dados de RMN foi confirmada através do espectro de massa (ESI EM/EM) obtido utilizando através dos modos negativo e positivo que revelaram picos a $[\text{M} - \text{H} + 2 \text{CH}_3\text{CN}]^-$ a $m/z = 1313,5262$ (calculado para $\text{C}_{63}\text{H}_{92}\text{O}_{24}$ $m/z = 134,5979$) e $[\text{M} + \text{Na}]$ a $m/z = 1255,5715$ (calculado para $\text{C}_{63}\text{H}_{92}\text{O}_{24}$ $m/z = 1255,5979$), respectivamente (Figura 138 e 139 p. 153).

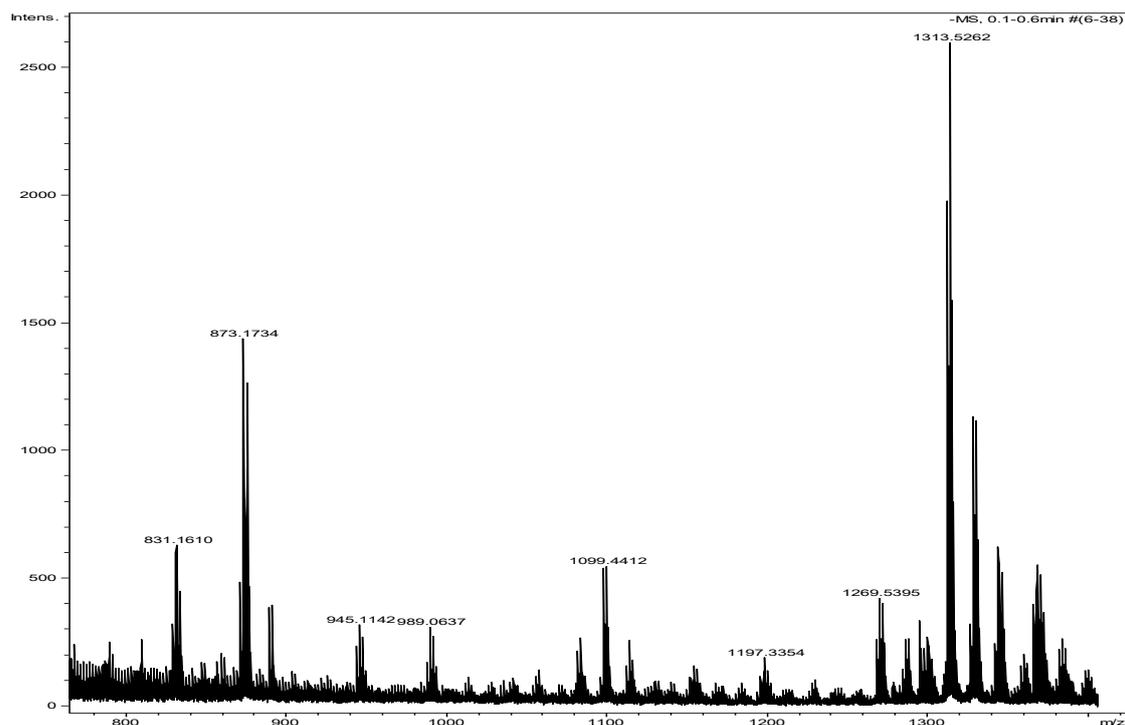


Figura 138. Espectro de massa da substância **LG-5Ac** ES/EM (modo negativo).

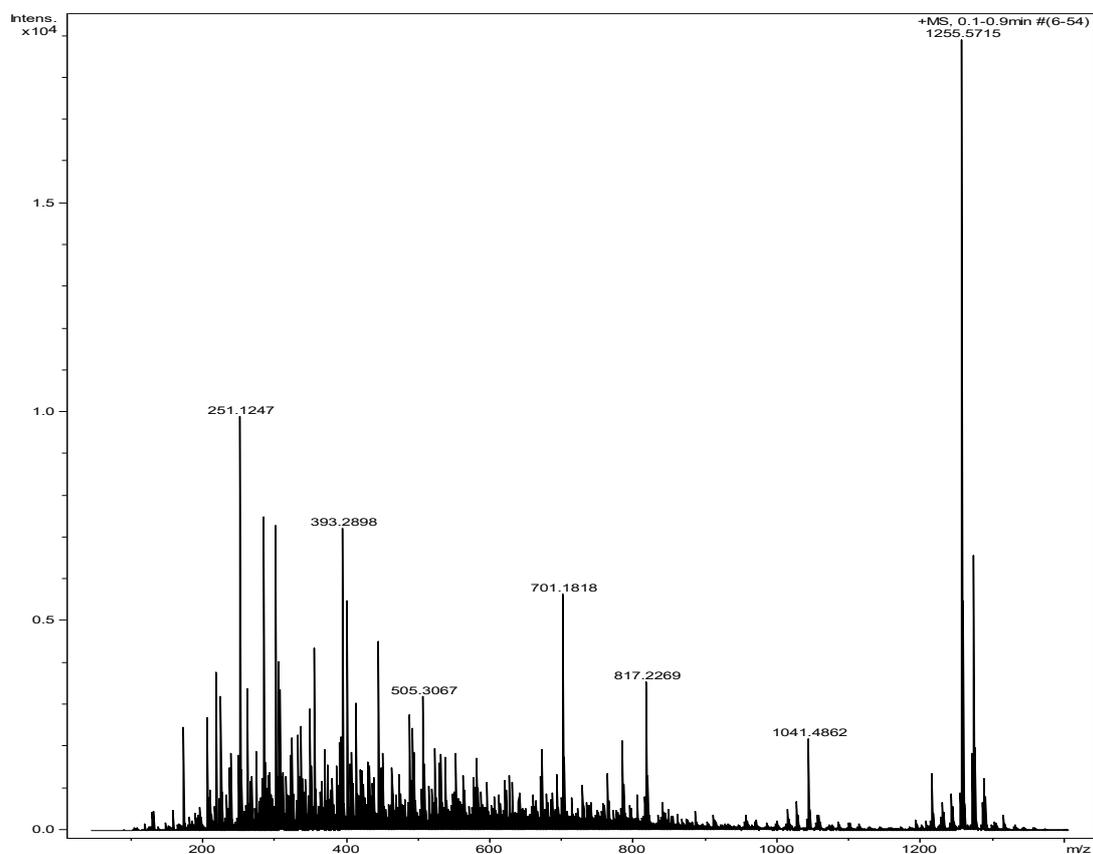


Figura 139. Espectro de massa da substância **LG-5Ac** ES/EM (modo positivo).

No espectro de massas modo positivo verificou-se também um fragmento significativo a $m/z = 817,2309$ [(M + Na) correspondente à quebra da ligação glicosídica entre a aglicona (triterpeno) e a glicona (resíduo de açúcar) (Figura 140 e 141). O espectro de massa/massa do pico a m/z 817,2256 feito no modo positivo mostrou um fragmento iônico a m/z 545, 1308 atribuído a perda de um resíduo de 2,3,4 acetil ramnose e a m/z 757,1847 e m/z 697,1689 relativo a perda consecutiva de dois grupos acetatos (m/z 817,2256 – 2 AcOH) consecutivos. Além desses, também foram observados fragmentos a m/z 765,6539 e m/z 19,0455 que também confirmam a existência de três resíduos de açúcar na molécula. A proposta de fragmentação para LG-5Ac encontra-se resumida na Figura 142, p.156.

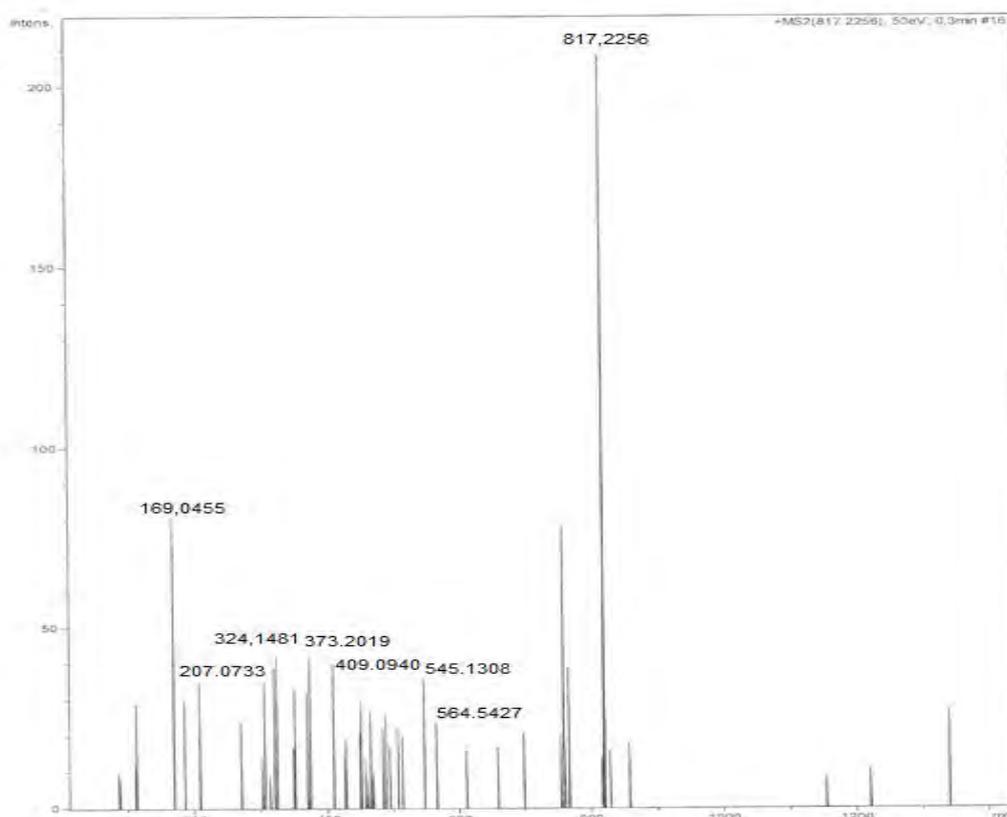


Figura 140. Espectro de massa/massa modo positivo do pico a m/z 817,2256 da substância **LG-5Ac**

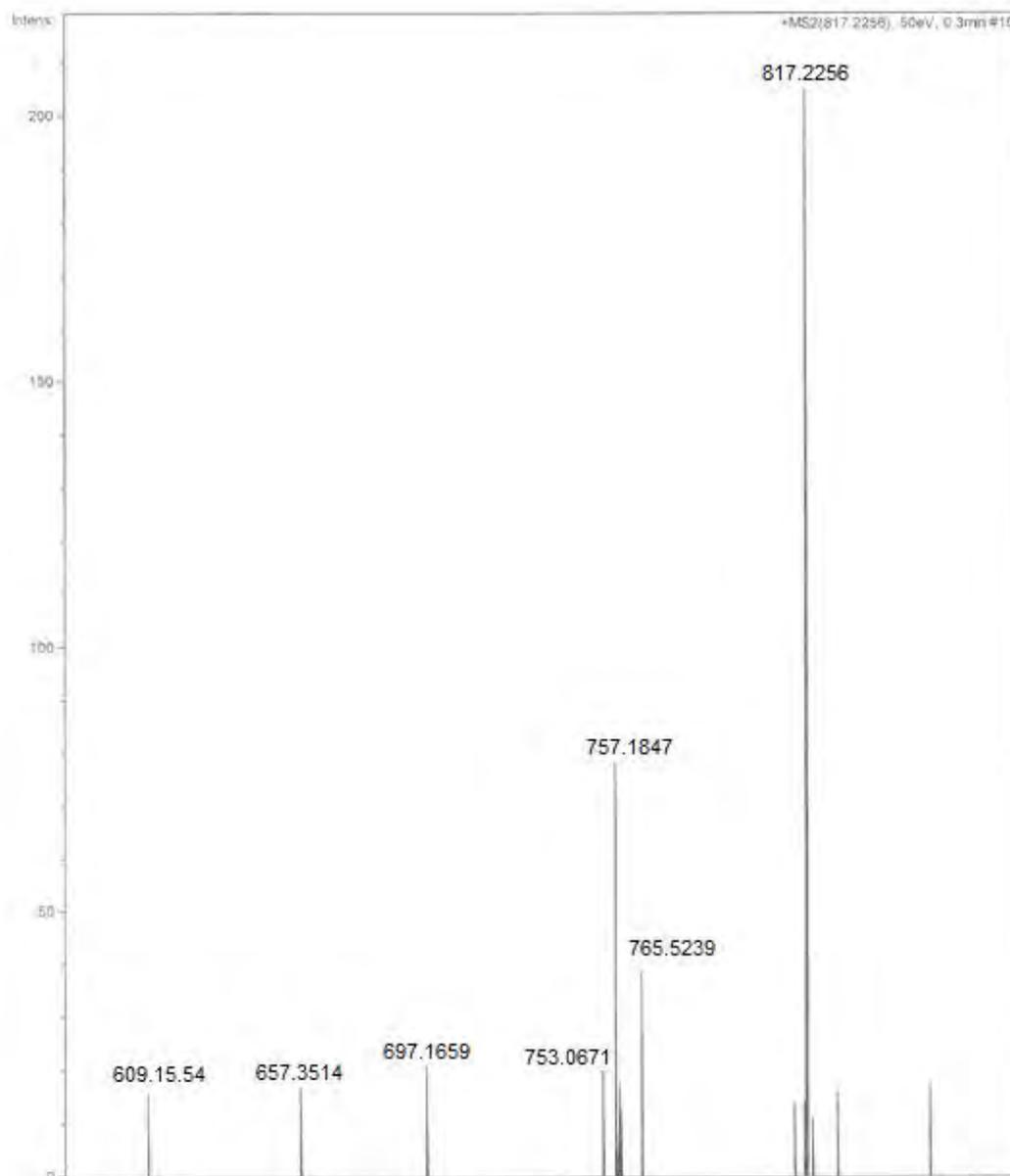


Figura 141. Espectro de massa/massa modo positivo do pico a m/z 817,2256 da substância **LG-5Ac**

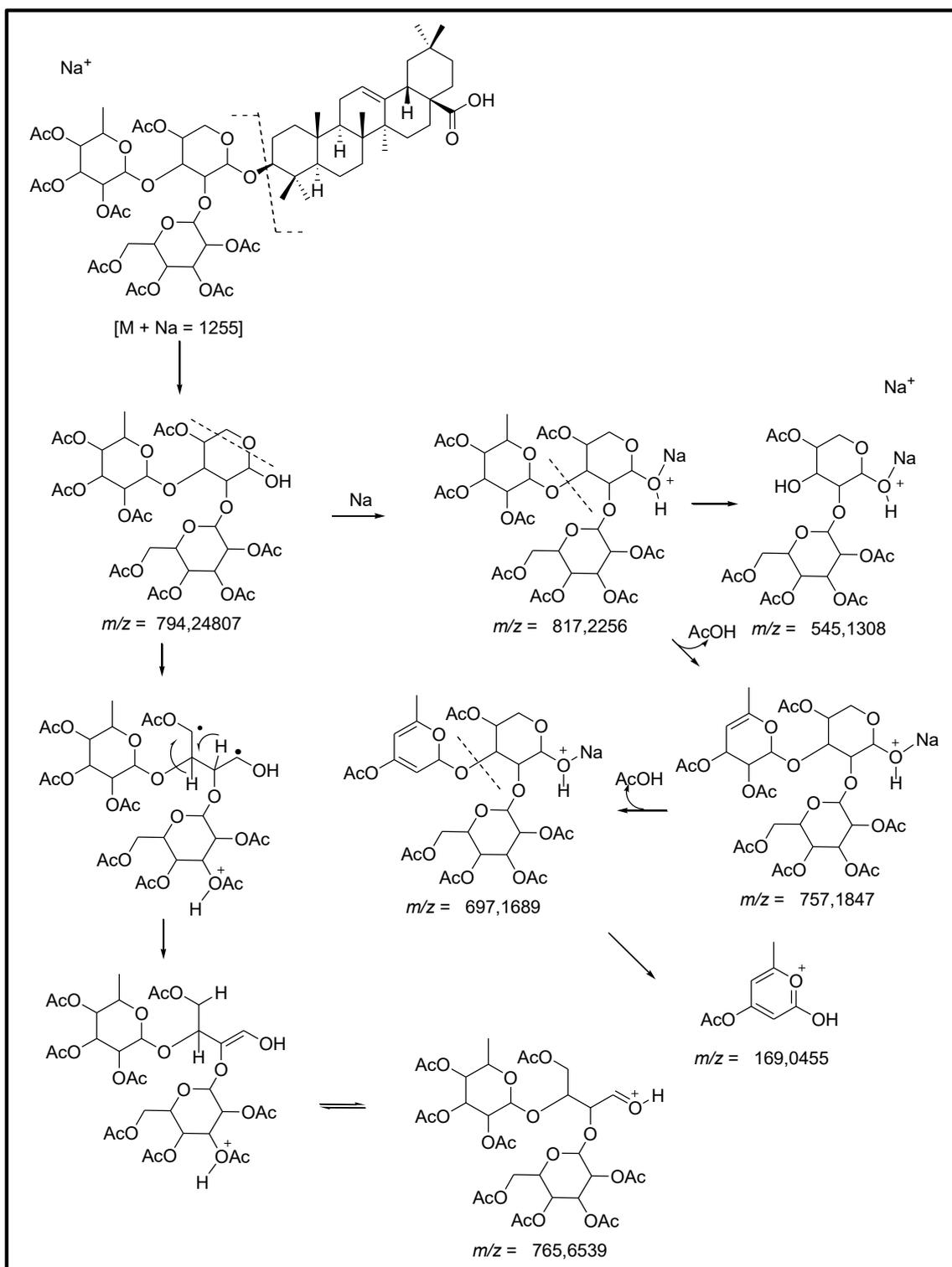


Figura 142. Proposição mecanística de fragmentação da substância **LG-5Ac**

Na análise dos resíduos de açúcares por RMN, considerou-se, inicialmente os sinais que aparecem na região entre δ_C 90 - 110 ppm nos espectros de RMN- ^{13}C (Figura 135, p. 151) e δ_H 3,5 – 6,0 ppm no de RMN- 1H .

O espectro de RMN- 1H (1D e 2D $^1H \times ^1H$ -COSY) de LG-5Ac (Figuras 143 e 144) mostrou sinais correspondentes seis átomos de hidrogênios a δ_H 4,34 (1H, *d*, $J = 7,3$ Hz, carbono anomérico CH-1'), 4,32 (1H, *m*, H-2'), 5,09 (1H, *m*, H-3'), 3,92 (1H, *m*, H-4'), 3,48 e 3,95 (2H, *m*, 2H-5') correspondentes a um resíduo de xilose; δ_H 4,74 (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz, carbono anomérico CH-1''), 4,89 (1H, *dd*, $J = 7,9$ e $9,6$ Hz, H-2''), 5,22 (1H, *t*, $J = 9,5$ Hz, H-3''), 5,06 (1H, *t*, $J = 10,1$ Hz, H-4''), 3,50 (1H, *m*, H-5''), 4,13 e 4,27 (2H, *m*, H-6''), correspondentes a um resíduo de glicose e a δ_H 5,31 (1H, *sl*, carbono anomérico CH-1'''), 5,04 - 5,13 (1H-2'''), 5,35 (1H, *dd* $J = 3,5$ e 10 Hz, H-3'''), 5,03 (1H, *t*, $J = 10$ Hz, H-4'''), 4,27 (1H, *m*, H-5'''), 1,19 (3H, *d*, $J = 6,3$ Hz, H-6'''), correspondentes a um resíduo de ramosse.

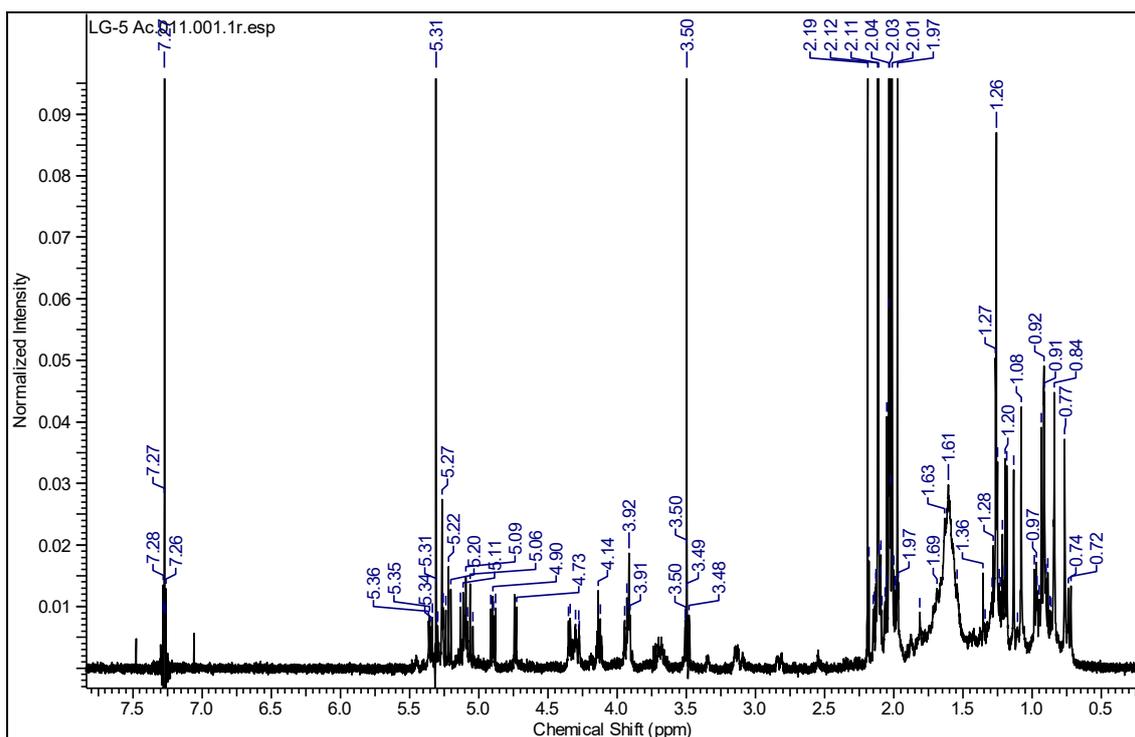


Figura 143. Espectro de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) da substância LG-5Ac

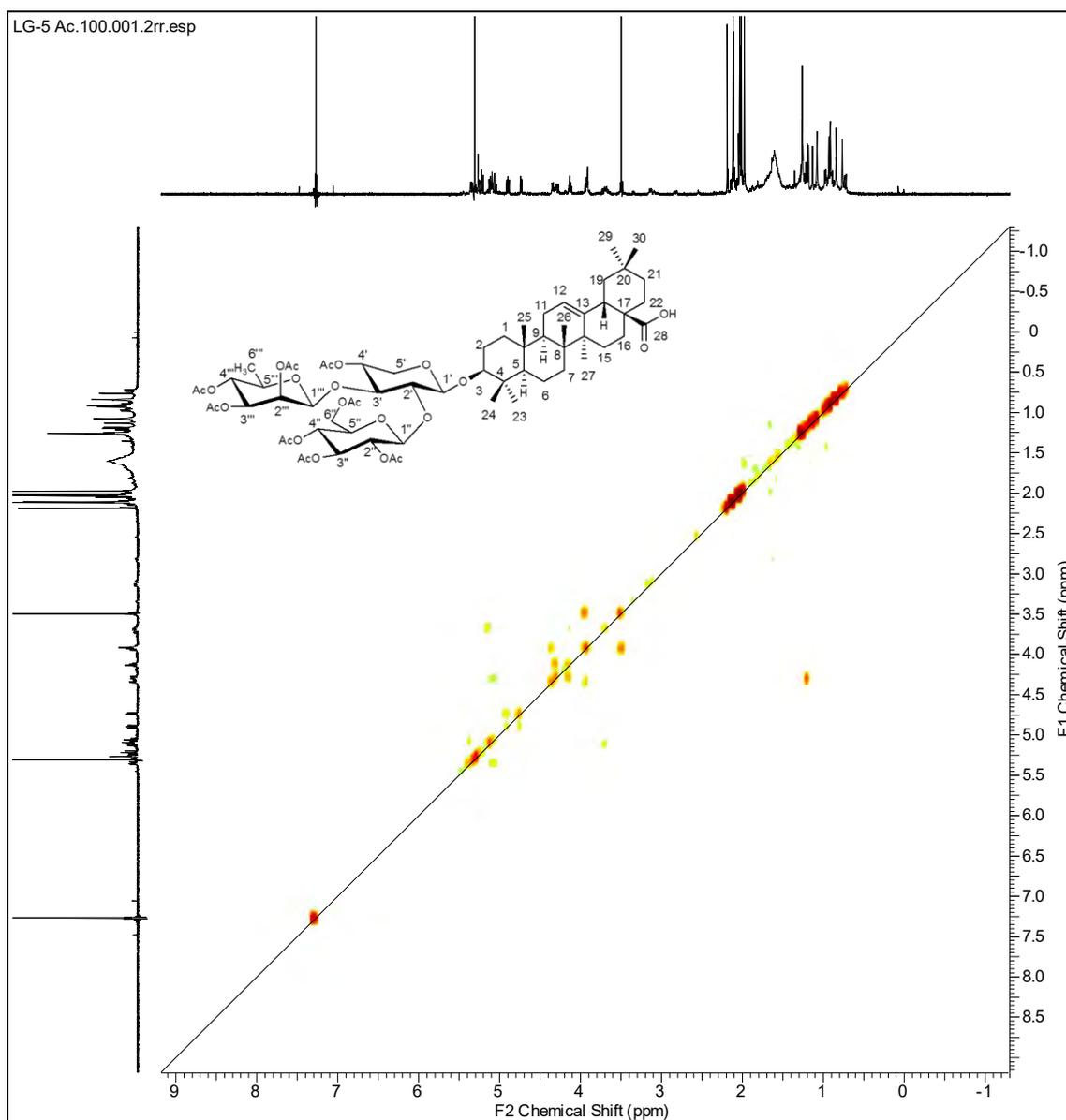


Figura 144. Mapa de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) da substância **LG-5Ac**

Através da análise do espectro de RMN- ^{13}C (HMQC) permitiu verificar que os sinais de RMN- ^1H dos resíduos de açúcar estão correlacionados no espectro de ^{13}C com os sinais a δ_{C} 104,44 (C-1'), 79,33 (C-2'), 68,59 (C-3'), 72,38 (C-4') e 64,13 (C-5') do resíduo de xilose respectivamente; δ_{C} 99,43 (C-1''), 71,69 (C-2''), 72,77 (C-3''), 68,19 (C-4''), 72,03 (C-5'') e 61,18 (C-6'') do resíduo de glicose respectivamente e; δ_{C} 96,37 (C-1'''), 70,67 (C-2'''), 68,83 (C-3'''), 71,03 (C-4'''), 66,43 (C-5''') e 17,15 (C-6''') do resíduo de rarnose respectivamente (Figura 145, p.159).

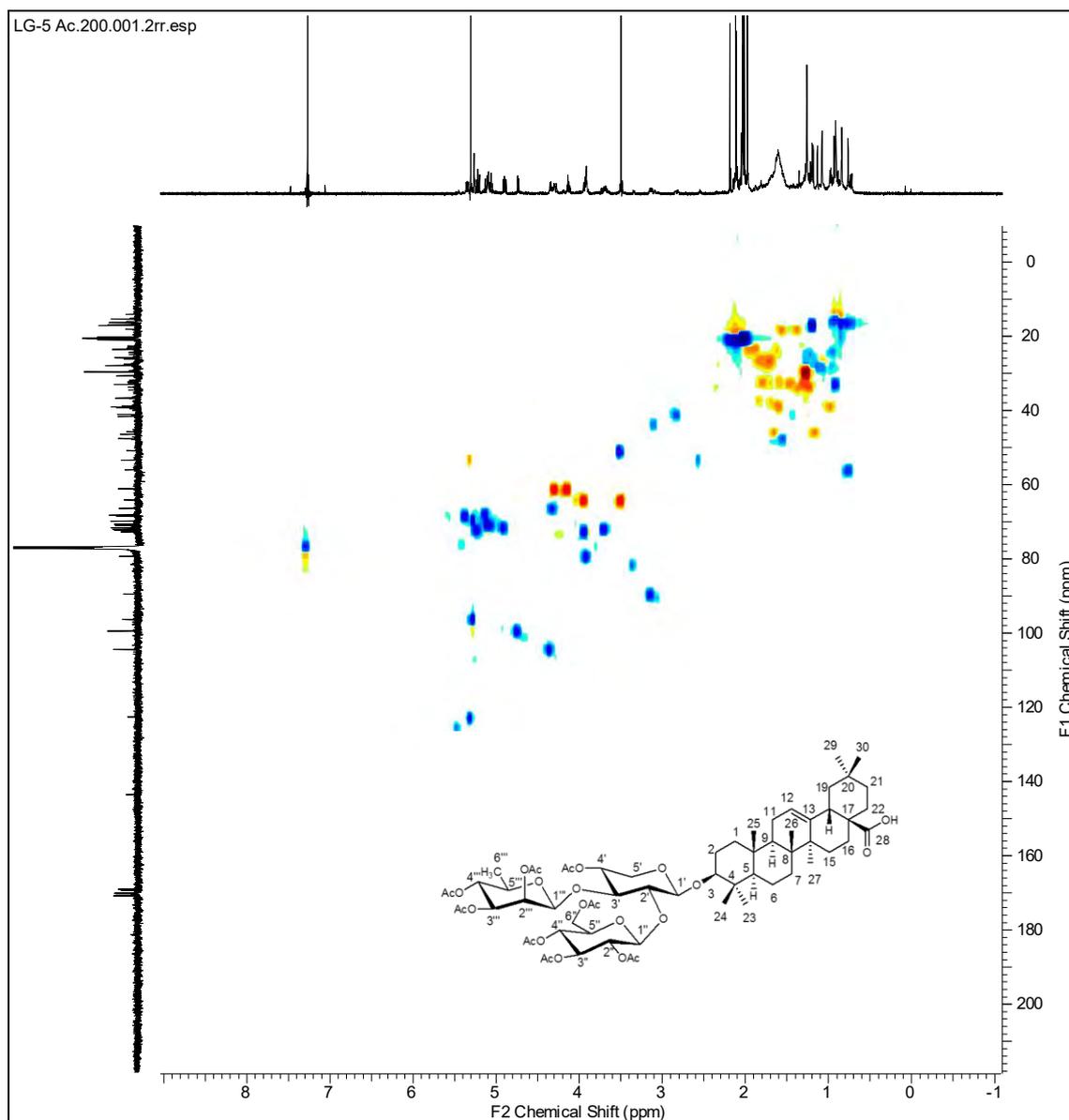


Figura 145. Espectro de HMQC da substância **LG-5Ac**

Os espectros em 1D de RMN- ^1H e ^{13}C , 2D homonuclear ($^1\text{Hx}^1\text{H}$ -COSY) e heteronuclear $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY- ^nJCH ($n=1$, HMQC; $n=2$ e 3 , HMBC) de LG-5Ac também mostraram sinais de deslocamentos químicos compatíveis com agliconas de saponinas triterpenoidais monodesmosídicas com esqueleto do ácido oleanóico (ácido 3β -hidroxi-12-en-28-óico), caracterizado por uma ligação dupla trissubstituída entre C-12 e C-13 representada pelos sinais a δ_{C} 122,64/ δ_{H} 5,26 e δ_{C} 143,51 (Mahato & Kundu, 1994). Os espectros também revelaram sinais a δ_{C} 26,17 e 89,49 característicos dos carbonos C-2 e C-3 de 3-O-glicosídeos. O sinal em δ_{C} 181,23 foi atribuído ao carbono carbonílico C-28 não glicosilado.

A presença de um resíduo de xilose ligado ao carbono C-3 da aglicona foi confirmado através de correlação heteronuclear a longa distância ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$) entre C-3 (δ_C 89,49) e o hidrogênio anomérico da xilose H-1' (δ_H 4,34) e os hidrogênios das metilas a CH₃-23 e CH₃-24. Além dessas, também foram observadas correlações entre C-3 (δ_C 89,49) e C-5 (δ_C 56,00) e os hidrogênios das metilas (CH₃-23, CH₃-24 e CH₃-25) (Figura 146).

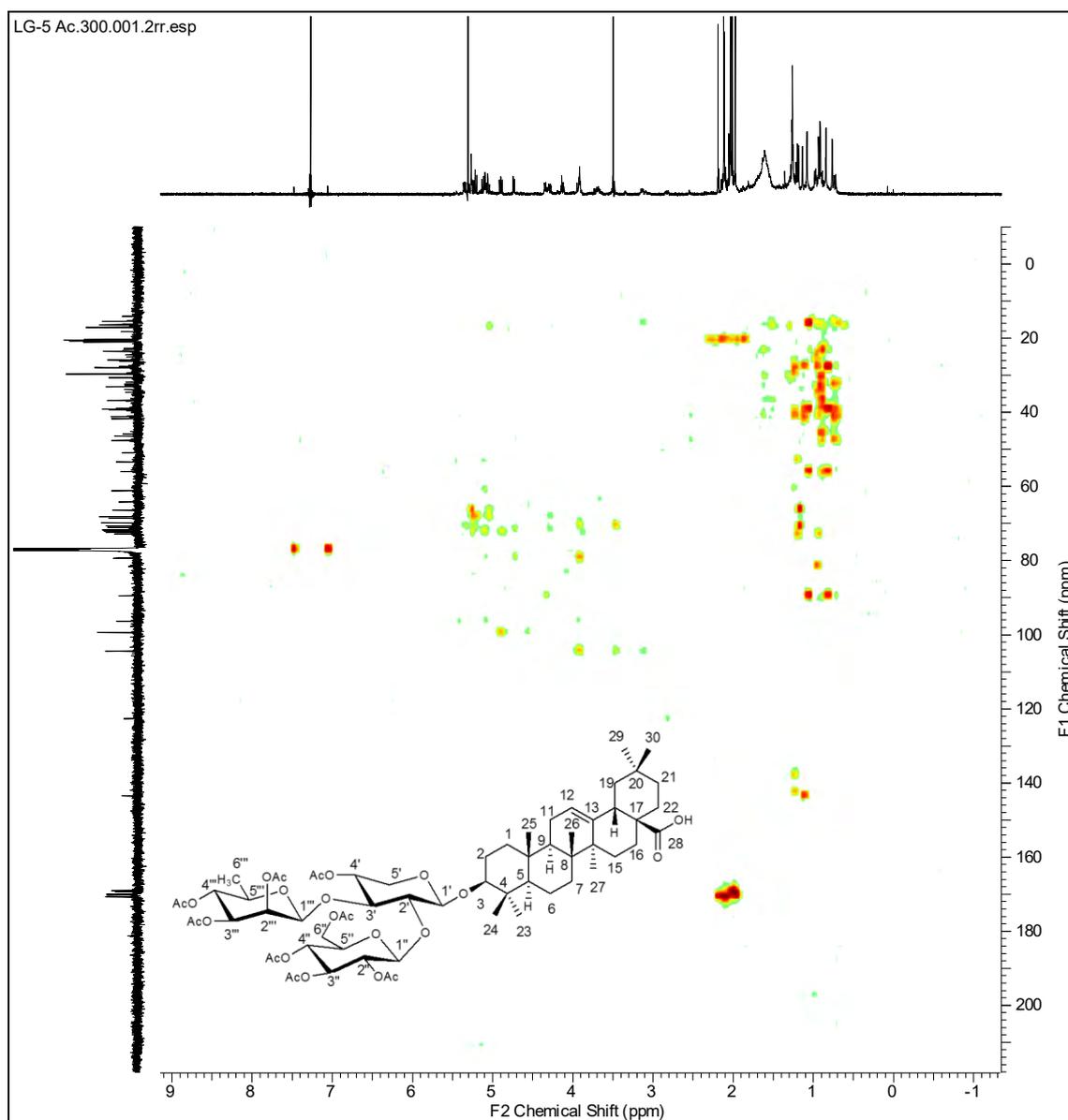


Figura 146. Espectro de HMBC da substância LG-5Ac

A análise completa dos espectros de HMBC em conjunto com dados espectrais de RMN adicionais e comparação com deslocamentos químicos de ^{13}C descritos na literatura para o ácido oleanóico (ácido 3 β -hidroxi-12-en-28-óico) (Mahato & Kundu, 1994), permitiram a caracterização e a atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da aglicona de LG-5Ac conforme resumido nas Tabelas 16 e 17 p.162 e 163.

As constantes de acoplamento $J = 11\text{ Hz}$ e $J = 4,25\text{ Hz}$ observadas nos sinais de H-3 (δ_{H} 3,14) no espectro de RMN- ^1H permitiu definir a estereoquímica deste átomo de carbono conforme indicado na Figura 147. Desse modo, com base nas evidências acima mencionadas, a estrutura química da saponina acetilada LG-5AC foi caracterizada como sendo ácido 3-O- β -D-xilofuranosil-(1'→3)- β -D-glicopiranosil(1''→2')- α -ramnopiranosil(1'''→3')-hidroxiolean-12-en-28-oico. Vale ressaltar que este é o primeiro relato de isolamento de saponina no gênero *Lonchocarpus*.

O resumo dos deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C observados para a substância LG-5Ac encontram-se nas Tabelas 16 e 17 p.162 e 163.

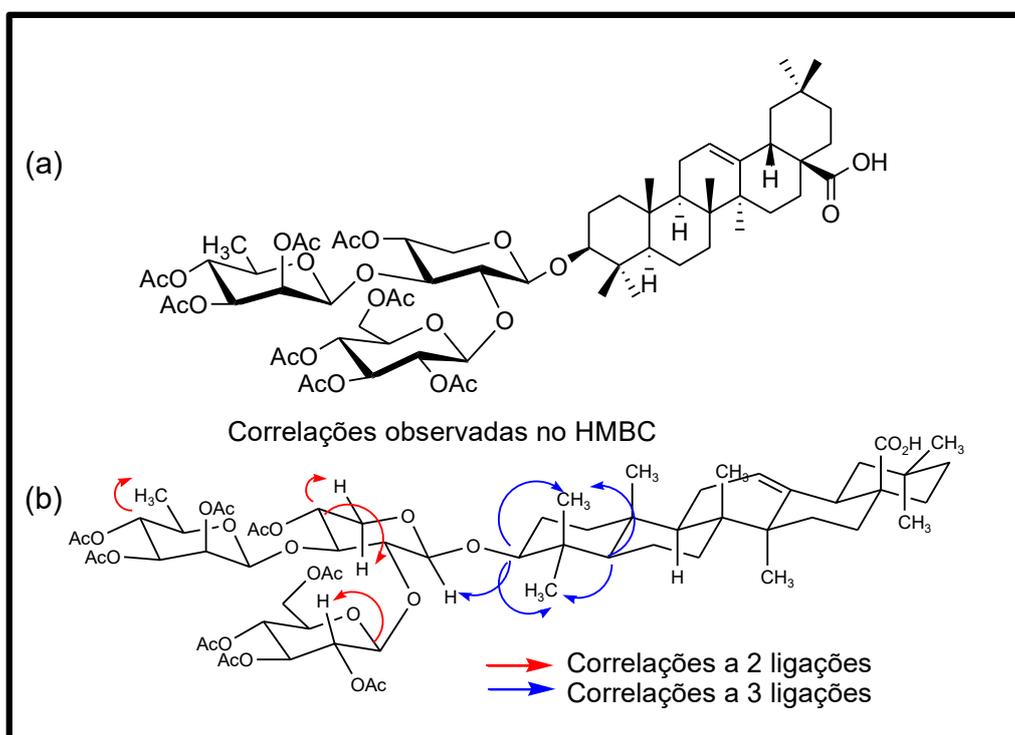


Figura 147. (a) estrutura da saponina ácido 3-O- β -D-xilofuranosil-(1'→3)- β -D-glicopiranosil (1''→2')- α -ramnopiranosil(1'''→3')-hidroxiolean-12-en-28-oico) (LG – 5Ac); (b) correlações a longa distância verificadas no espectro de HMBC

Tabela 16. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância LG-5Ac, utilizando CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).

C	δ_{C}	HMQC		HMBC	
		δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
Xilose em C-3					
1'	104,44	4,34 (1H, <i>d</i> , $J = 7,3$ Hz)	H - 2'	H - 3; 2H - 5'	
2'	79,33	4,32 (1H, <i>m</i>)	H - 3'	H - 4'; H - 1''	
3'	68,59	5,09 (1H, <i>m</i>)		H - 1'''	
4'	72,38	3,92 (1H, <i>m</i>)	2H - 5'	-	
5'	64,13	3,48 ax (1H, <i>m</i>) 3,95 eq (1H, <i>m</i>)	-	-	
Glicose em C-2'					
1''	99,43	4,74 (1H, <i>d</i> , $J = 7,6$ Hz)	H - 2''	-	
2''	71,69	4,89 (1H, <i>dd</i> , $J = 7,9$ e 9,6 Hz)	H - 1''; H - 3''	-	
3''	72,77	5,22 (1H, <i>t</i> , $J = 9,5$)	H - 2''	-	
4''	68,19	5,06 (1H, <i>t</i> , $J = 10,1$)	-	-	
5''	72,03	3,50 (1H, <i>m</i>)	-	-	
6''	61,18	4,13 (1H, <i>m</i>) 4,27 (1H, <i>m</i>)		-	
Ramnose em C-3'					
1'''	96,37	5,31 (1H, <i>sl</i>)	-	-	
2'''	70,67	5,04 - 5,13	-	-	
3'''	68,83	5,35 (1H, <i>dd</i> $J = 3,5$ e 10 Hz)	H - 2'''	H - 1'''	
4'''	71,03	5,03 ((1H, <i>t</i> , $J = 10$ Hz)		3H - 6'''	
5'''	66,43	4,27 (1H, <i>m</i>)	3H - 6'''	H - 1'''	
6'''	17,15	1,19 (3H, <i>d</i> , $J = 6,3$ Hz)		H - 4'''	
Grupos acetila					
	δ_{C}	δ_{H}			
CH ₃	21,02 - 20,31	2,18 - 1,97			-
C=O	170,77 - 169,01	-			

Tabela 17. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) obtidos para a aglicona da substância LG-5Ac utilizando CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm)

	HSQC		HMBC		
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
LG- 5Ac					*Literatura CDCl_3
Carbono não hidrogenado					
4	39,13	-			38,7
8	39,29	-			39,3
10	36,75	-			37,0
13	143,51	-			143,4
14	41,68	-			41,6
17	45,86	-			46,6
20	30,67	-			30,6
28	181,23	-			181,0
CH					
3	89,49	3,14 (<i>dd</i> , $J = 4,25$ e 11 Hz)		H-1', 3H-23; 3H-24	78,7
5	56,00	0,72 (<i>m</i>)			55,2
9	47,63	1,54 (<i>m</i>)			47,6
12	122,64	5,26 (<i>tl</i> , $J = 3,9$ Hz)			122,1
18	41,13	2,8 (<i>dd</i> , $J = 3,5$ e $11,0$ Hz)			41,3
CH ₂					
1	39,29	1,54 (<i>m</i>); 0,94 (6,7 Hz)			38,5
2	26,17	1,69 (<i>m</i>)			27,4
6	18,19	1,54 (<i>m</i>); 1,33 (<i>m</i>)			18,3
7	32,65	1,26 (<i>m</i>)			32,6
11	23,37	1,81 (<i>m</i>)			23,1
15	27,62	1,73 (<i>m</i>)			27,7
16	23,37	1,87 (<i>m</i>)			23,4
19	45,86	1,61 (<i>m</i>)			45,8
21	33,80	1,63 (<i>m</i>)			33,8
22	32,42	1,71 (<i>m</i>)			32,3
CH ₃					
23	27,97	1,08 (<i>s</i>)			28,1
24	16,35	0,84 (<i>s</i>)			15,6
25	15,45	0,89 (<i>s</i>)			15,3
26	16,91	0,74 (<i>s</i>)			16,8
27	25,87	1,13 (<i>s</i>)			26,0
29	33,05	0,87 (<i>s</i>)			33,1
30	23,55	0,90 (<i>s</i>)			23,6

*Mahato & Kundu, 1994

4. 4. 2. 11. Determinação estrutural da substância PM-1

A substância PM-1 isolada do extrato em MeOH/H₂O de *C. spruceanum* apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marron escuro, solúvel em MeOH.

O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) da substância PM-1 (Figura 148) apresentou bandas de absorção de deformação axial do grupo hidroxila de forma intensa e larga na região de 3500- 3000 cm⁻¹. Os estiramentos C=C aparecem em torno de 1689 – 1604 cm⁻¹ (Silverstein & Webster, 2000).

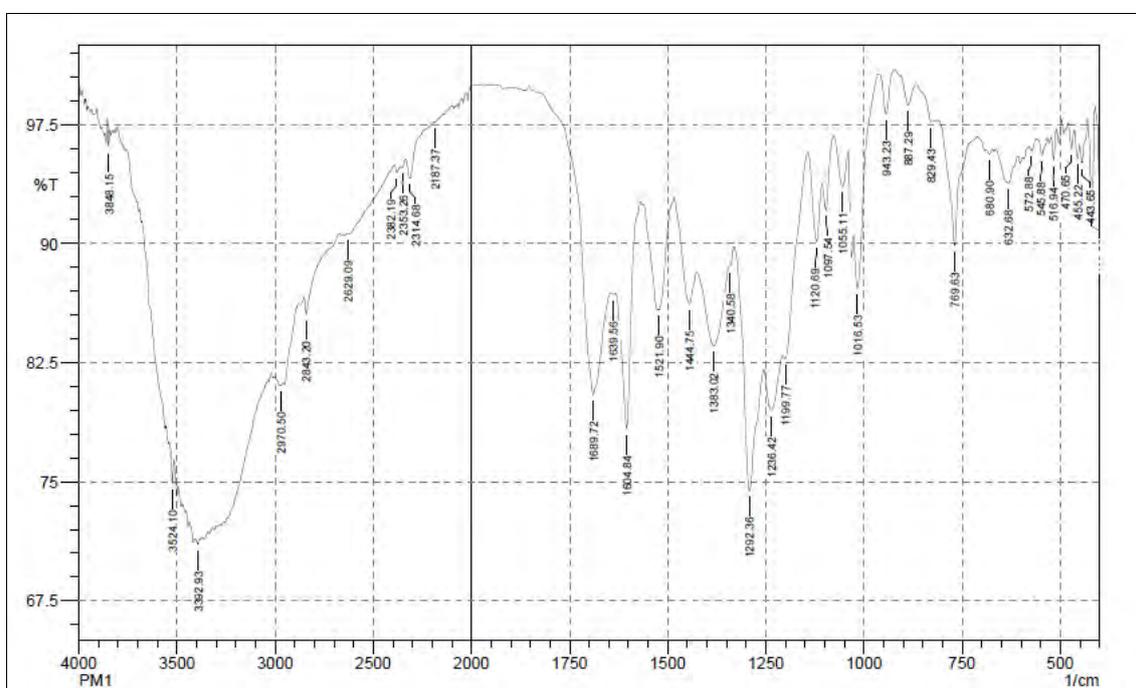


Figura 148. Espectro na região de infravermelho da substância **PM-1**

O espectro de massas ESI-EM/EM (modo negativo) da substância apresentou pico do íon molecular em m/z 153,0215 [$M - H$]⁻, compatível com a fórmula molecular C₇H₆O₄. O espectro de massas (Figura 149, p.165) da substância mostra um fragmento iônico a m/z = 109 relativo à perda de (CO₂H) e a m/z = 137 relativo à perda de hidroxila (OH). Uma proposta para o mecanismo de fragmentação esta descrita na Figura 150, p.165.

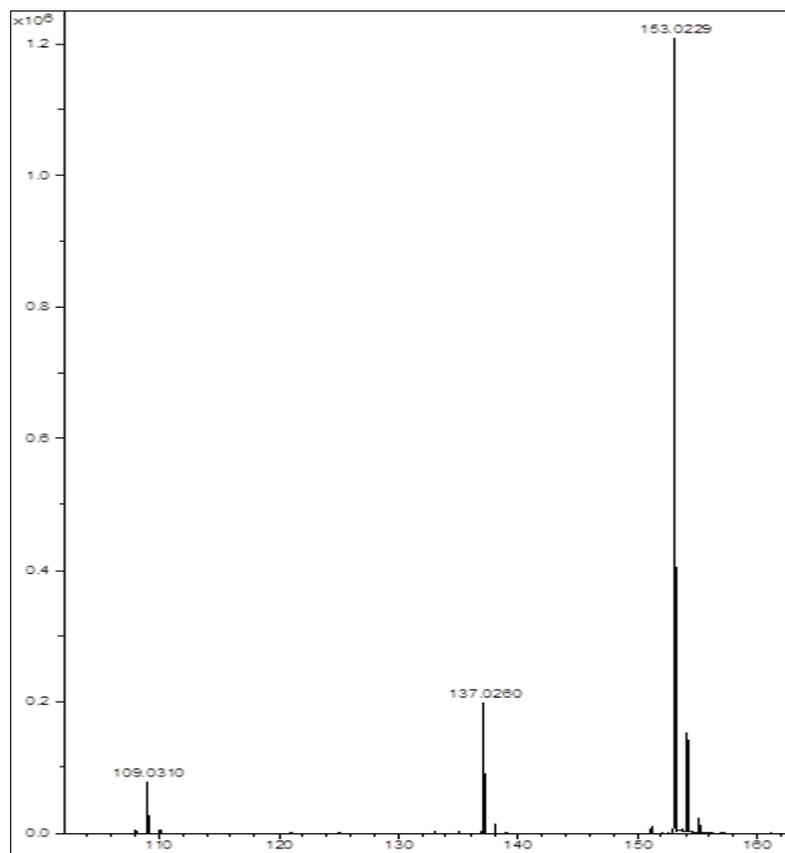


Figura 149. Espectro de massas da substância **PM-1** (ESI – modo negativo)

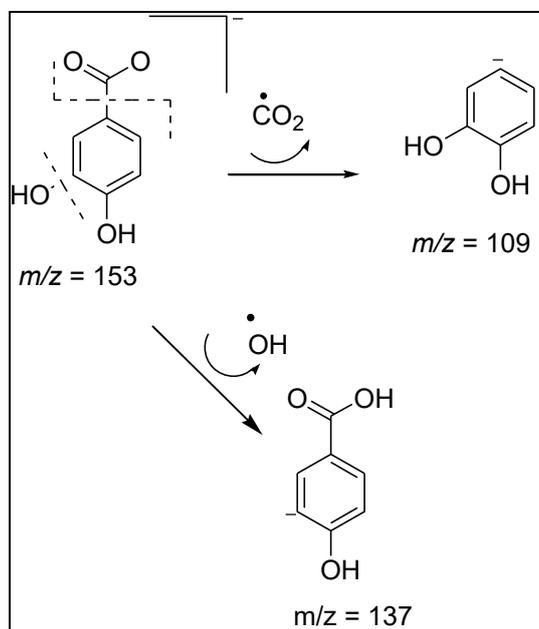


Figura 150. Proposta mecânica de fragmentação para a substância **PM-1**

O espectro de RMN de ^1H da substância PM-01 (Figura 151) apresentou sinais característicos de anel aromático na região entre (δ_{H} 7,43- 7,41). Verificou-se os sinais dos hidrogênios metínicos H-2 (δ_{H} 7,41 *d*, $J=2$ Hz); H-5 (δ_{H} 6,79, *d*, $J= 8,25$ Hz) e H-6 (δ_{H} 7,43, *dd*, $J=1,95$ e 7,75 Hz).

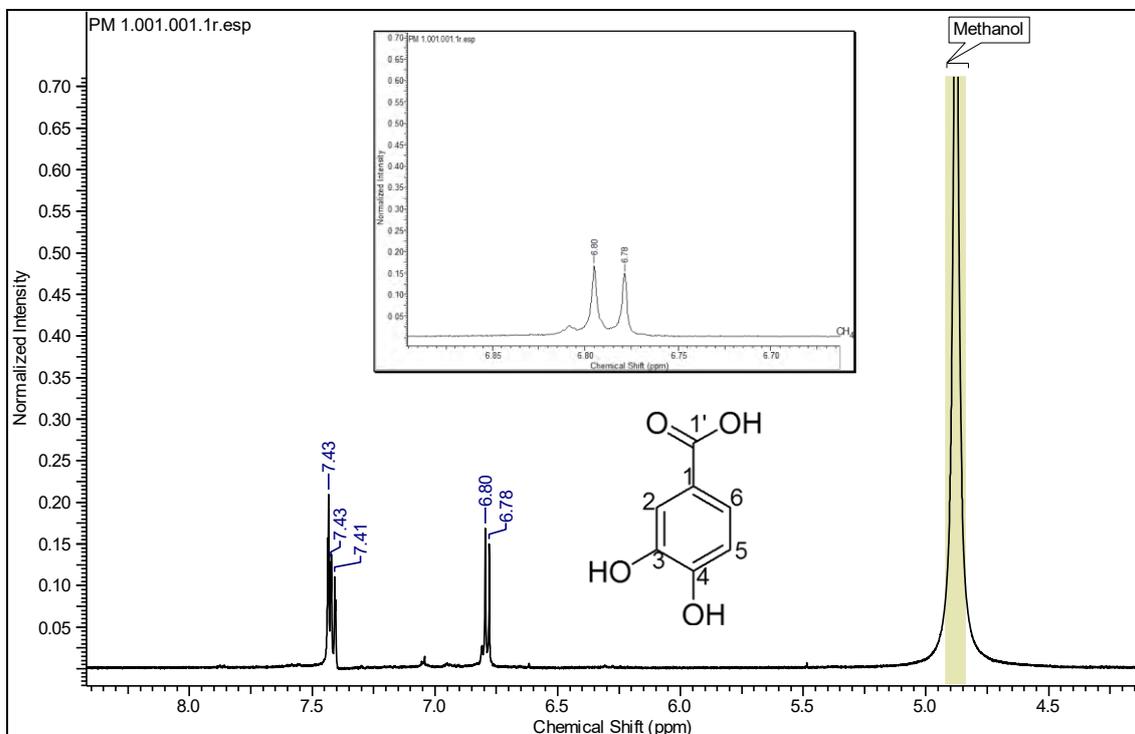


Figura 151. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância **PM-1**

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 152) apresentou sete sinais entre as regiões (δ_{C} 171,06 – 115,84) observou-se que o sinal em frequência mais alta a δ_{C} 171, 06 foi atribuído a carbonila (C-1').

Através do espectro de RMN ^{13}C - APT (Figura 153, p.167) foi possível confirmar a estrutura observando-se quatro sinais relativos aos carbonos quaternários a C-1' (δ_{C} 171,06); C-1 (δ_{C} 123,92); C-3 (δ_{C} 146,12); C-4 (δ_{C} 151,36) e três sinais relativos aos carbonos metínicos C-2 (δ_{C} 117,88); C-6 (δ_{C} 124,18) e C-5 (δ_{C} 115,83) da molécula.

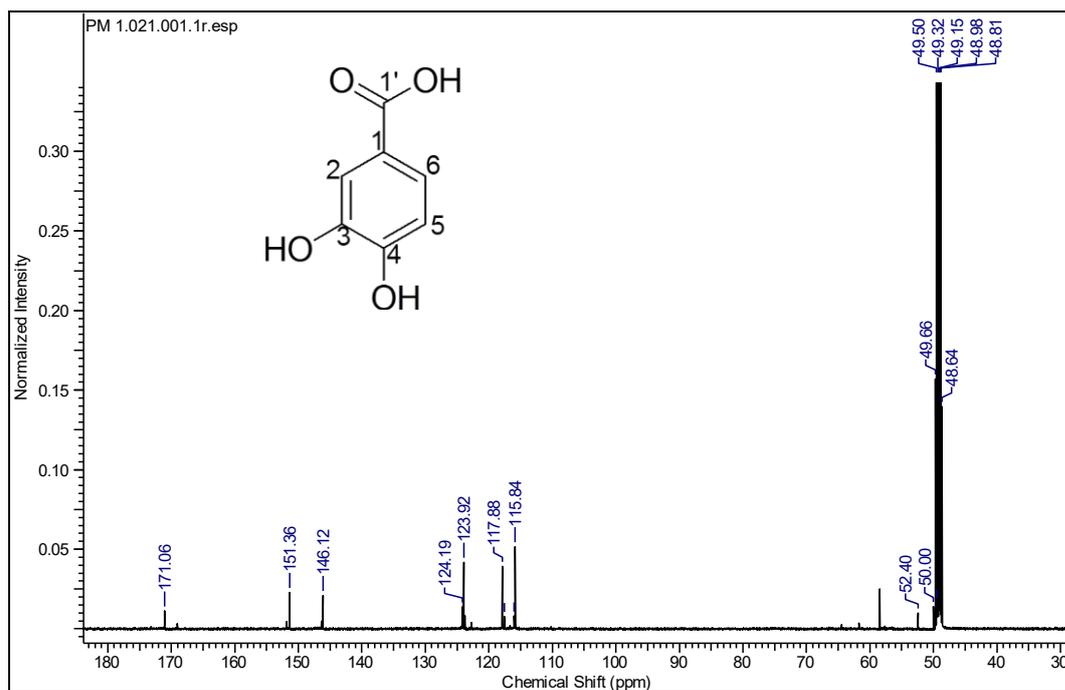


Figura 152. Espectro de RMN ^{13}C (125MHz, MeOD) da substância PM-1

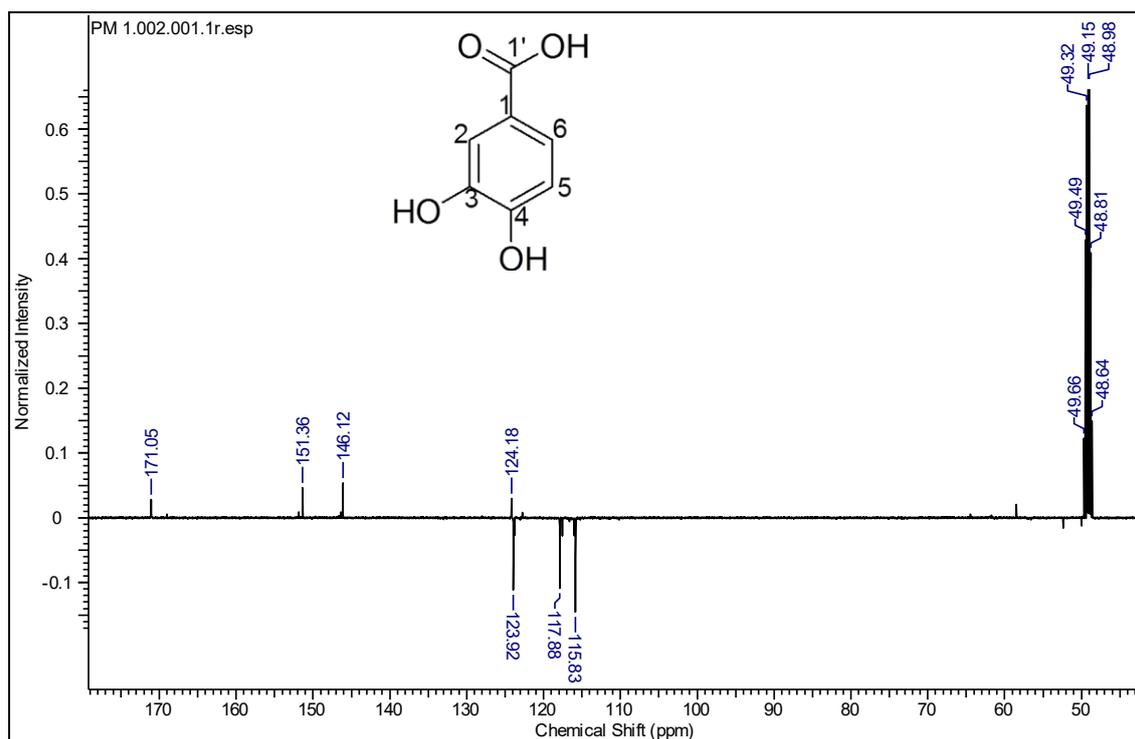


Figura 153. Espectro de RMN de ^{13}C - APT (125MHz, MeOD) da substância PM-1

No mapa de correlação heteronuclear a uma ligação HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) (Figura 154, p.168) observou-se as correlações entre os carbonos metínicos C-2 (δ_{C} 117,88) e H-2 (δ_{H} 7,41); C-5 (δ_{C} 115,84) e H-5 (δ_{H} 6,79); C-6, (δ_{C} 124,18)

e H-6 (δ_H 7,43), auxiliando na elucidação e confirmação da estrutura da molécula.

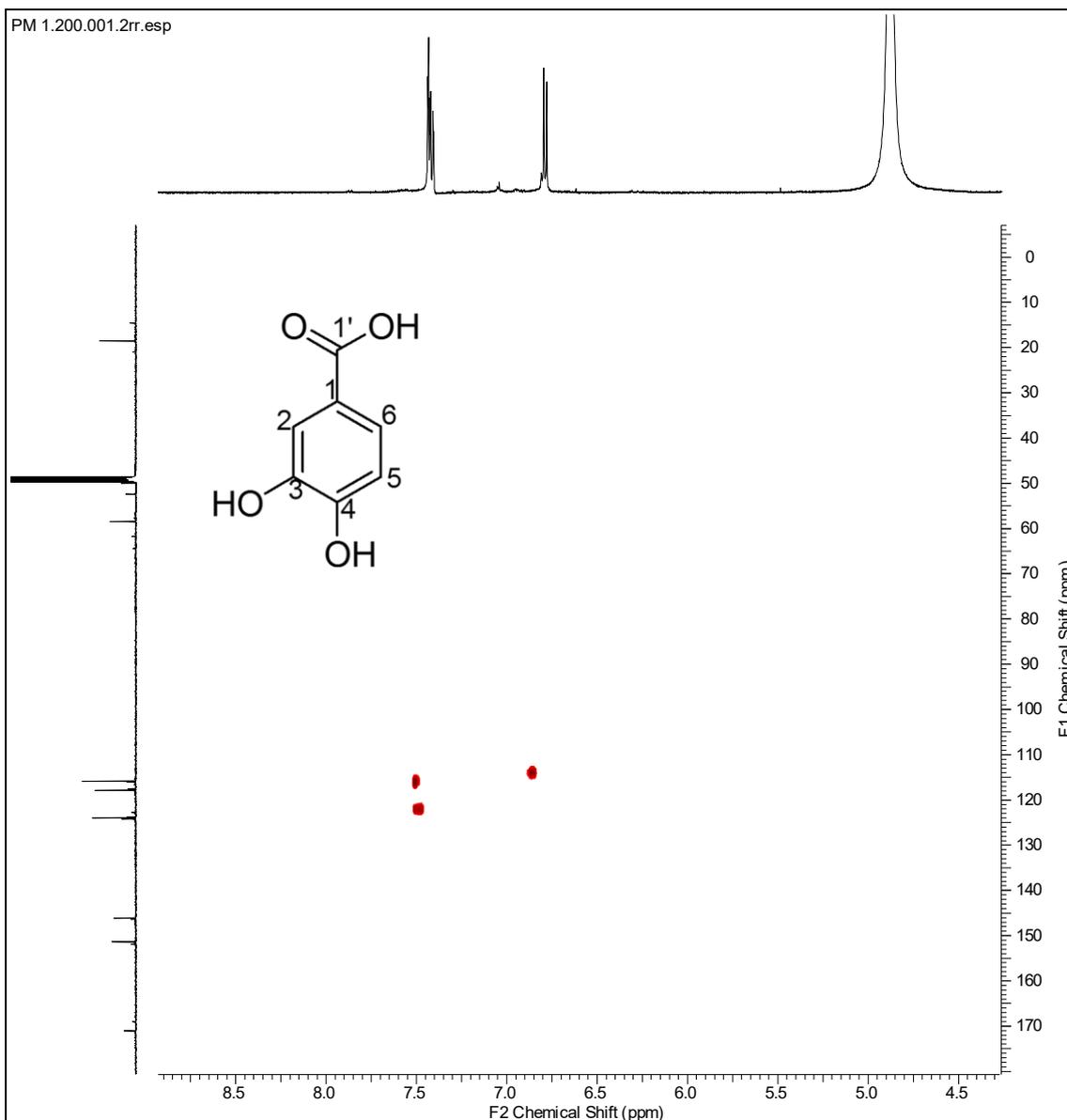


Figura 154. Espectro de HMQC da substância **PM-1**

Por meio do mapa de correlação a longa distância HMBC ($^nJ_{CH}$ $n=2$ e $n=3$) (Figura 155, p.169) foi possível correlacionar os sinais a duas ligações referentes a C-3 (δ_C 146,12) e H-2 (δ_H 7,41); C-6 (δ_C 124,18) e H-5 (δ_H 6,79); C-4 (δ_C 151,36) e H-5 (δ_H 6,81). Observaram-se também correlações a três ligações entre C-2 (δ_C 117,88) e H-6 (δ_H 7,43); C-6 (δ_C 124,18) e H-2 (δ_H 7,41); C-4 (δ_C 151,36) e H-6 (δ_H 7,43); C-3 (δ_C 146,12) e H-5 (δ_H 6,79), além das

correlações entre a carbonila C-1' (δ_C 171,06) com H-2 (δ_H 7,41) e o H-6 (δ_H 7,43) respectivamente.

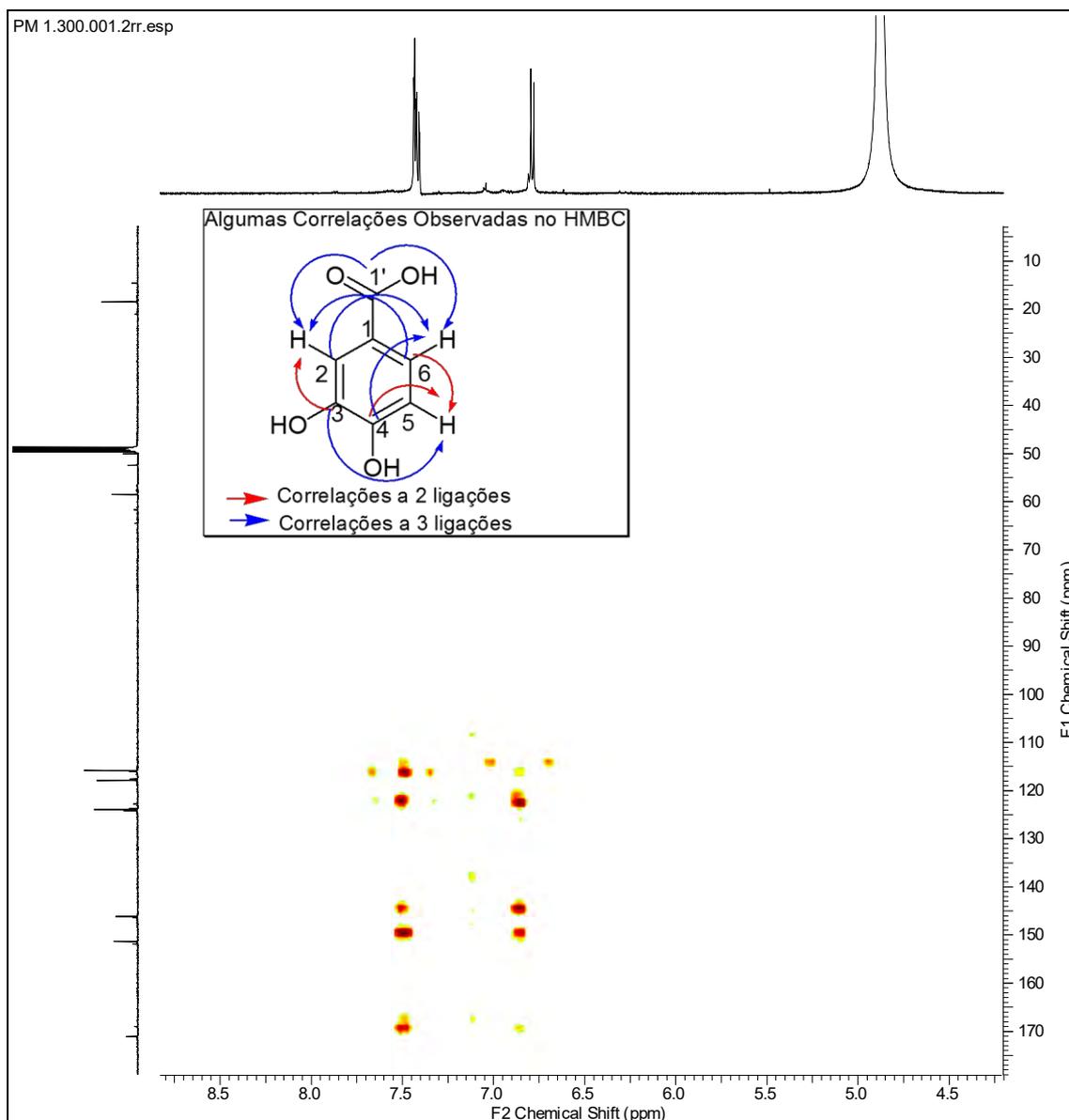


Figura 155. Espectro de HMBC da substância **PM1**

O conjunto de dados obtidos para a substância PM-1 quando comparados com aqueles descritos na literatura permitiram atribuir a estrutura do ácido protocatecuico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico (Figura 156). Os deslocamentos químicos atribuídos para a substância PM-1 estão resumidos na Tabela 18.

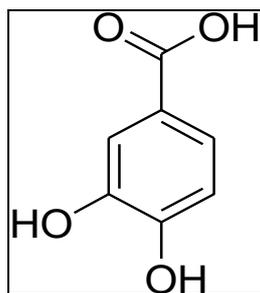


Figura 156. Estrutura da substância PM-1 (ácido protocatecuico)

Tabela 18. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da substância PM-1, utilizando MeOD como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).

C	PM-1				*Literatura DMSO-d ₆	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
1	123,92	-	-	-	-	-
1'	171,06	-	-	H2, H6	167,0	-
2	117,88	7,41 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2 Hz)	-	H6	117,1	7,32 <i>d</i> , <i>J</i> =1,5 Hz
3	146,12	-	H2	H5	145,0	-
4	151,36	-	H5	H6	150,0	-
5	115,84	6,79 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,25 Hz)	-	-	114,4	6,76 <i>d</i> , <i>J</i> =8,5 Hz
6	124,18	7,41 (<i>dd</i> , <i>J</i> =1,95 e 7,75 Hz)	H5	H2	122,4	7,27 (<i>dd</i> , <i>J</i> =8,5 e 1 Hz)

*(Moura et al., 2011)

4. 4. 2. 12. Determinação estrutural da substância PM-04

A substância PM-04 isolada do extrato em MeOH/H₂O de *C. spruceanum* apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom escuro, solúvel em MeOH, que ao ser analisada por meio de CCDA revelou duas manchas com R_f próximos quando revelada com FeCl₃.

O espectro na região do infravermelho (Figura 157) apresentou banda de estiramento C=O (conjugado) em 1691 cm⁻¹, banda de estiramento C=C (aromático) em 1300 cm⁻¹ e bandas de absorção de deformação axial do grupo hidroxila na região de 3419 cm⁻¹ coerentes com ácido carboxílico aromático (Silverstein & Webster, 2000).

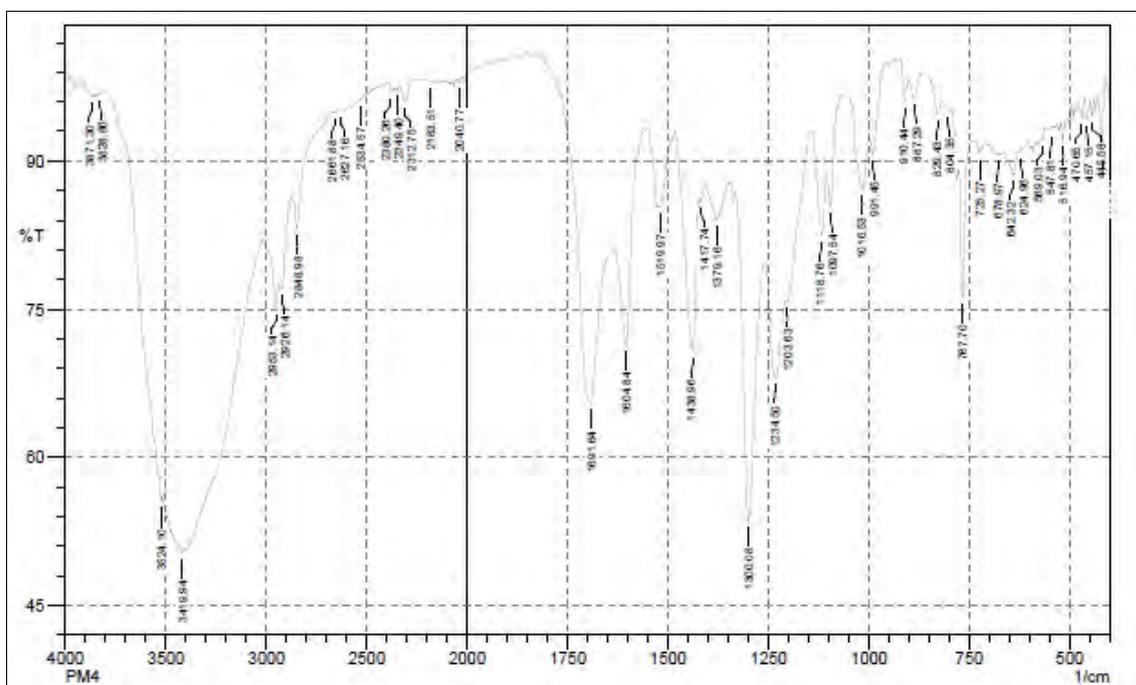


Figura 157. Espectro na região do infravermelho da amostra **PM-4**

O espectro de massas ESI-EM/EM (modo negativo) da amostra apresentou pico do íon molecular em m/z 167,0371[M – H]⁻, compatível com a fórmula molecular C₈H₈O₄. No espectro de massas (Figura 158, p. 172) da amostra verifica-se um fragmento iônico a m/z = 152, relativos à perda de (CH₃), m/z = 135 relativo à perda de (OCH₃) e fragmento iônico a m/z 124 relativa à perda de (OCH₃ e CO). Uma proposta para o mecanismo de fragmentação esta descrita na Figura 159, p. 172.

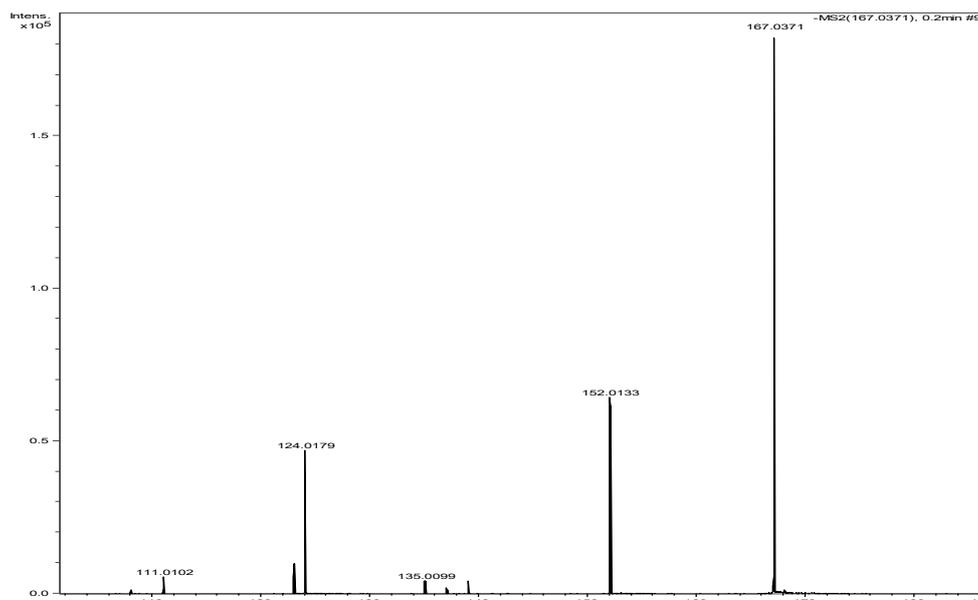


Figura 158. Espectro de massas da amostra **PM-4** (ESI – modo negativo)

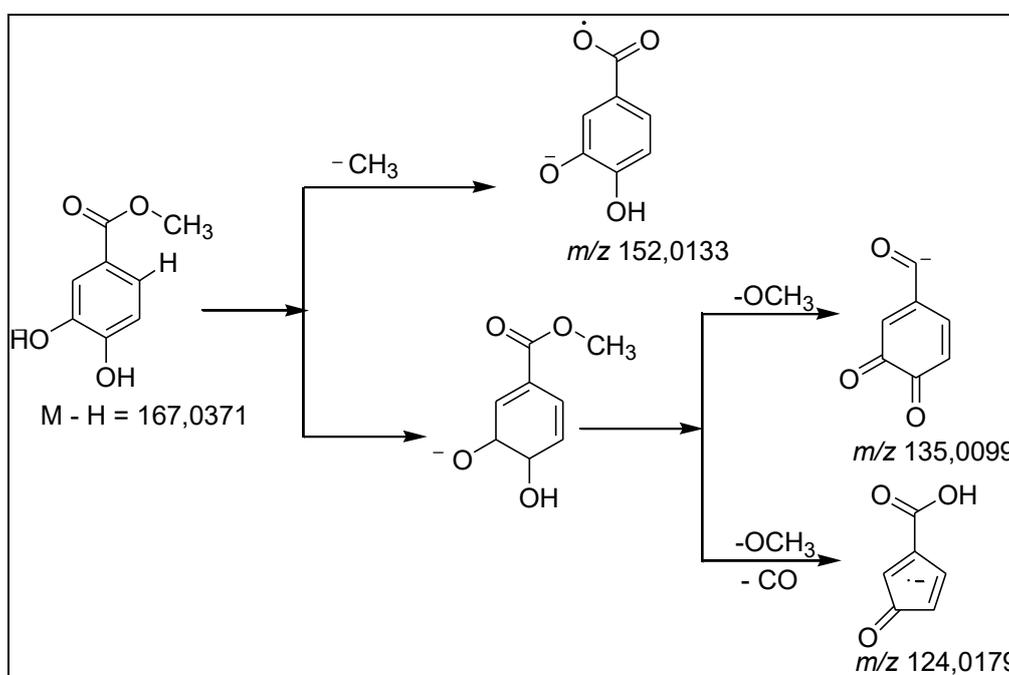


Figura 159. Proposta mecanística de fragmentação para a amostra **PM-4**

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) da amostra PM-04 (Figura 160, p. 173) apresentou sinais característicos de anel aromático nas regiões entre (δ_{H} 7,42 – 7,40). Verificou-se o sinais dos hidrogênios H-2 (δ_{H} 7,42), H-5 (δ_{H} 6,80) e H-6 (δ_{H} 7,40) além da presença de um singlete a δ_{H} 3,83 referente à OCH_3 .

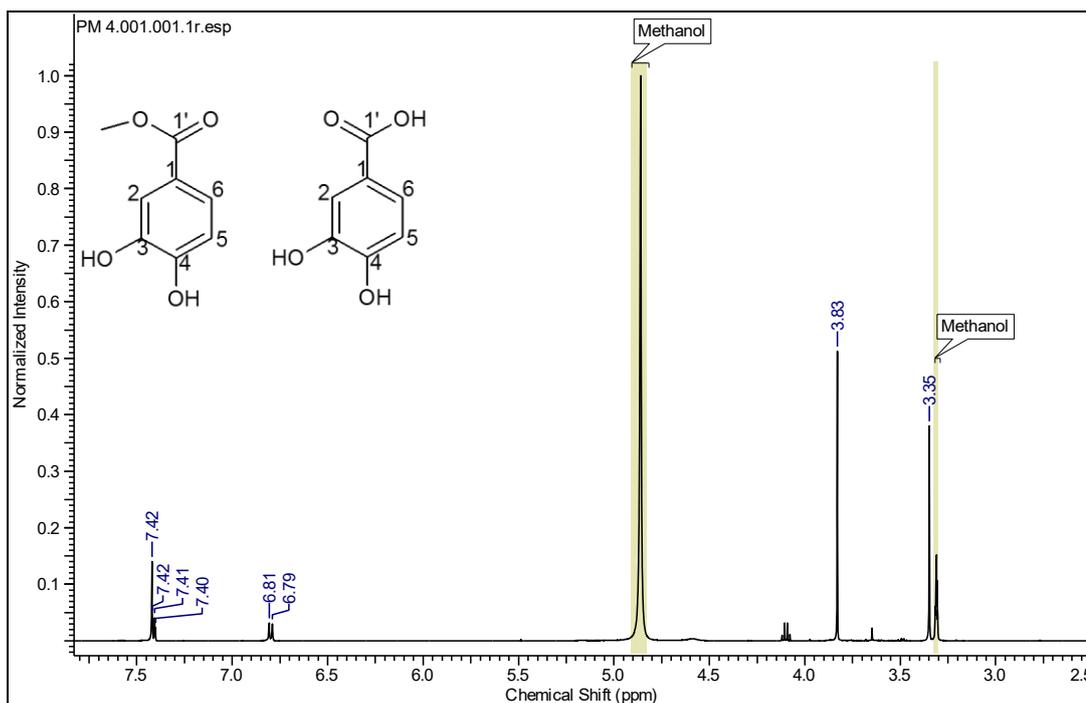


Figura 160. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da amostra **PM-4**

No espectro de RMN de ^{13}C observaram-se sinais nas regiões entre (δ_{C} 169,01 – 52,40), o sinal em frequência mais alta (δ_{C} 169,01) foi atribuído a carbonila C- 1' e o sinal a δ_{C} 52,40 atribuído ao grupo metoxila OCH_3 da molécula (Figura 161, p. 174).

No espectro de RMN ^{13}C - APT (Figura 162, p. 174) foi possível confirmar as estruturas observando-se a presença dos sinais C-1 (δ_{C} 122,73); C-3 (δ_{C} 146,34); C-4 (δ_{C} 151,86); relativos aos carbonos quaternários da molécula, além dos sinais dos carbonos C-2 (δ_{C} 117,56), C-5 (δ_{C} 116,00), e C-6 (δ_{C} 123,76) relativos aos carbonos metínicos.

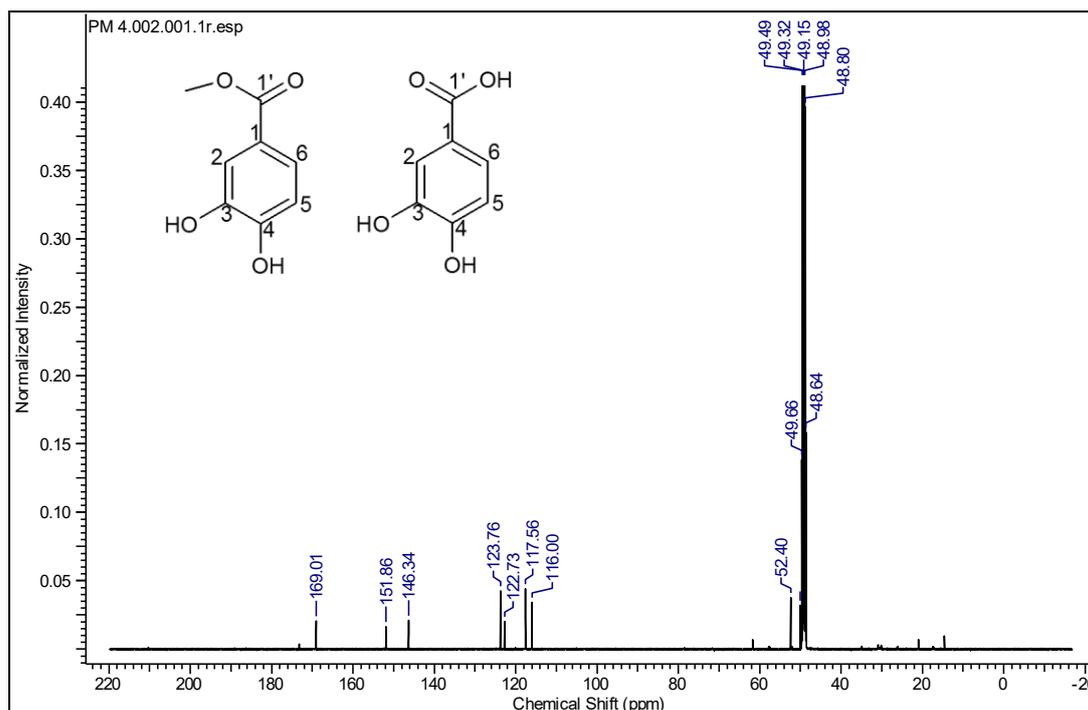


Figura 161. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD) da amostra **PM-4**

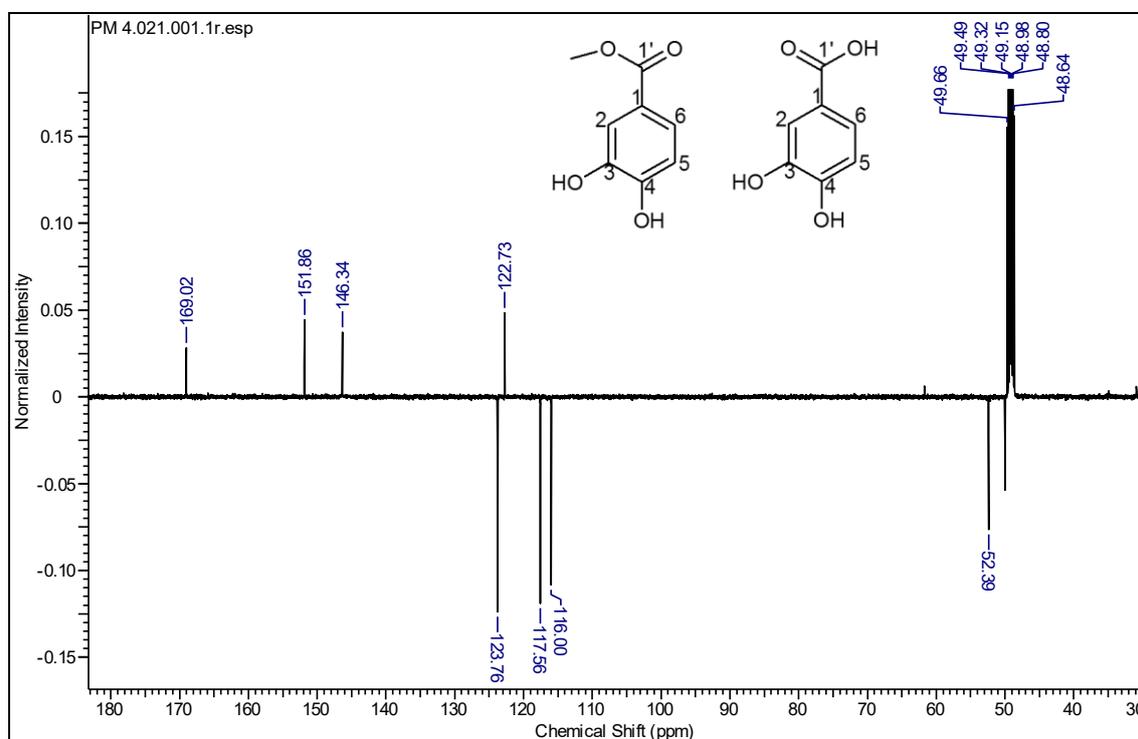


Figura 162. Espectro de RMN ^{13}C - APT (125 MHz, MeOD) da amostra **PM-4**

No mapa de correlação heteronuclear a uma ligação HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) (Figura 163, p. 175) observou-se as correlações entre os carbonos metínicos

C2 (δ_C 117,56) e H2 (δ_H 7,42); C5 (δ_C 116,00) e H5 (δ_H 6,80) e C6 (δ_C 123,75) e H6 (δ_H 7,42). Verificaram-se também os sinais da metoxila a (δ_C 52,39 e δ_H 3,83).

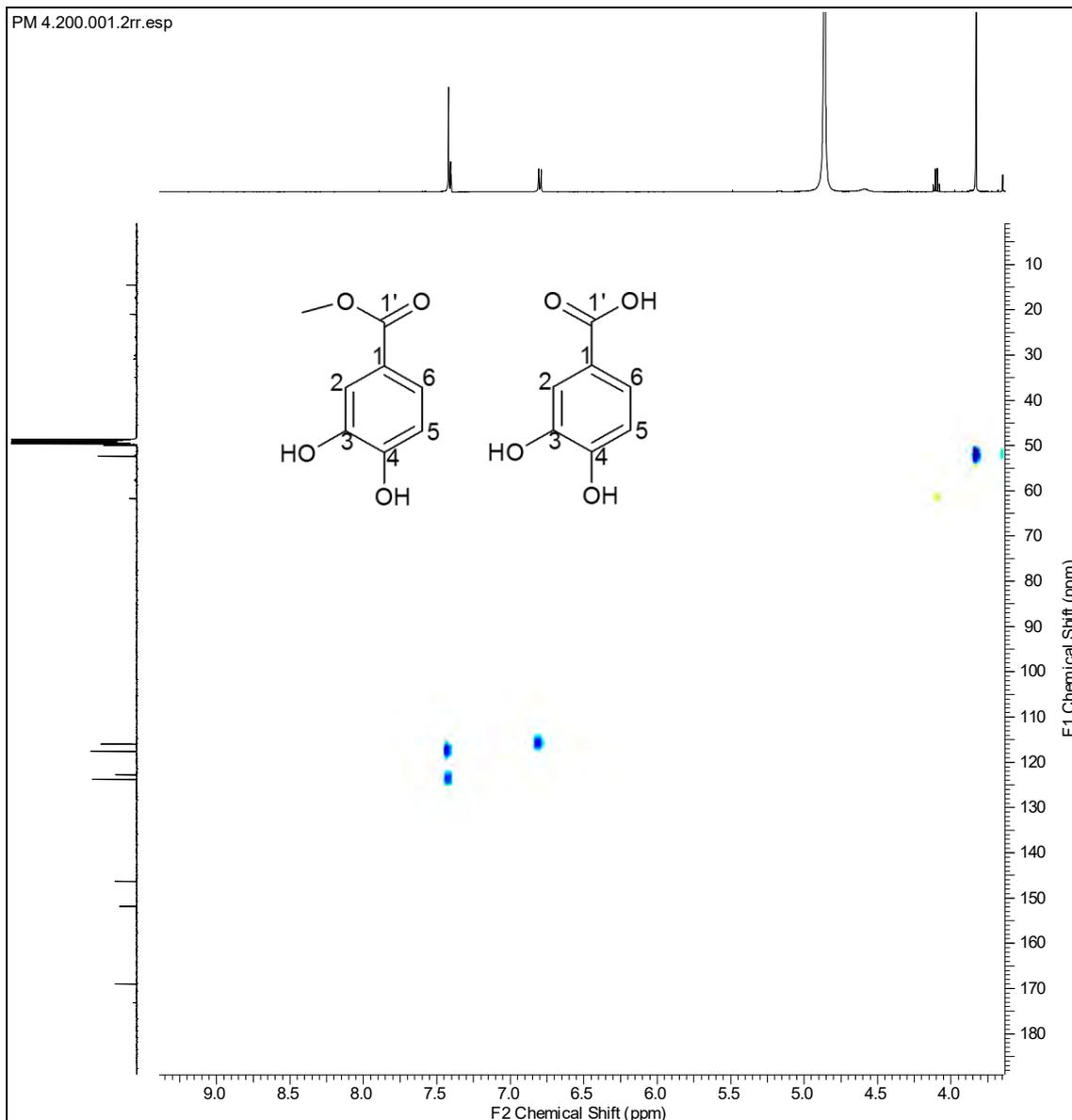


Figura 163. Espectro de HMQC da amostra **PM4**

Por meio do mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC ($^nJ_{CHn} = 2$ e $n=3$) (Figura 164, p. 176) foi possível correlacionar os sinais a duas ligações entre C3 (δ_C 146,34) e H2 (δ_H 7,42); C6 (δ_C 123,75) e H5 (δ_H 6,80); C4 (δ_C 151,86) e H5 (δ_H 6,80), verificou-se os sinais a três ligações entre C2 (δ_C 117,56) H6 (δ_H 7,40); C6 (δ_C 123,75) e H2 (δ_H 7,42); C4 (δ_C 151,86) e H6 (δ_H

7,40); C3 (δ_C 146,34) e H5 (δ_H 6,80) além das correlações entre o carbono C1' (δ_C 169,01) com H2 (δ_H 7,42) e H6 (δ_H 7,40) respectivamente.

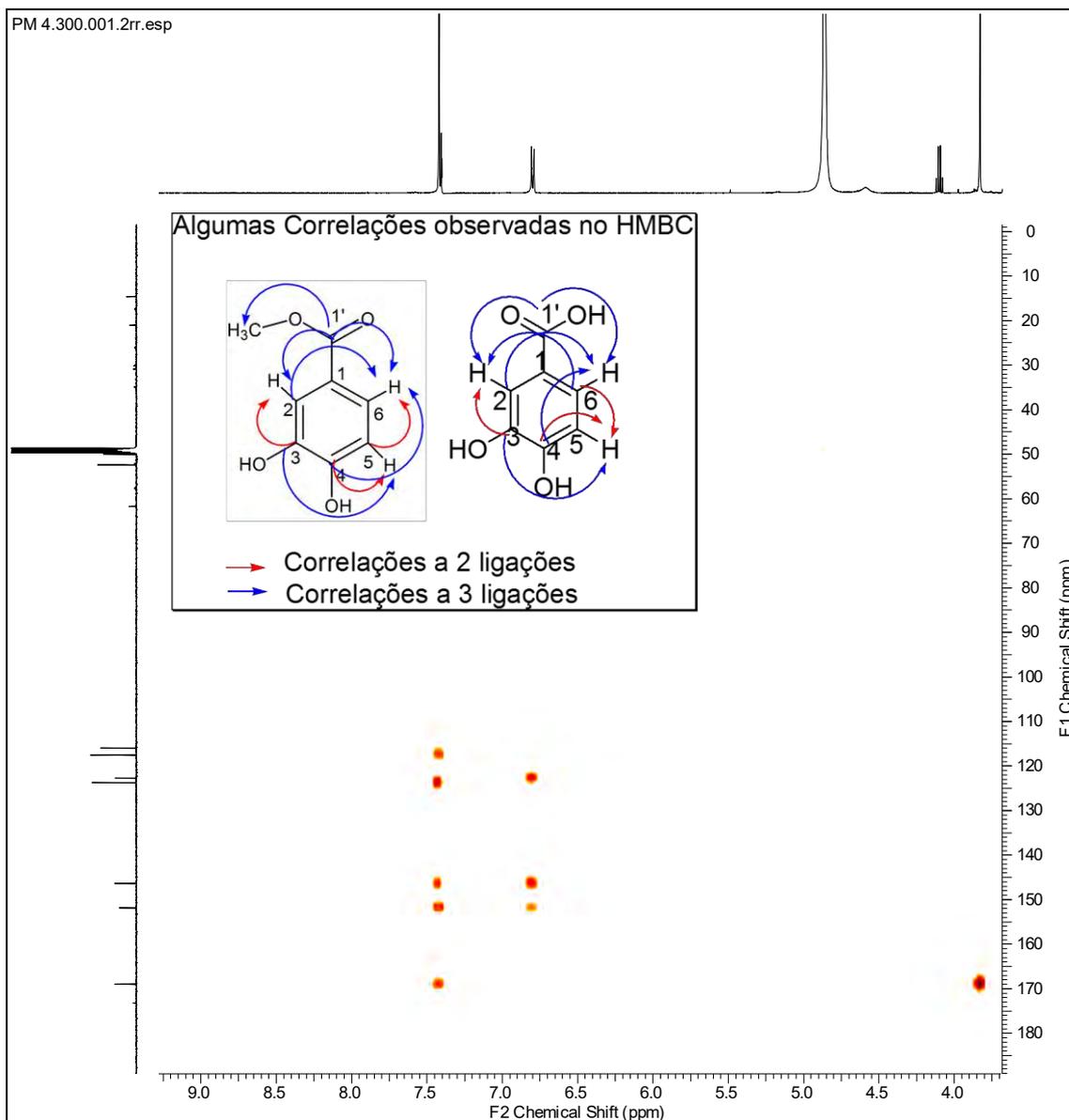


Figura 164. Espectro de HMBC da amostra **PM4**

O conjunto de dados espectrais obtidos para a amostra PM-4 quando comparados com os dados espectrais da substância PM-1, mostraram semelhanças, o que nos foi permitido concluir que a substância PM-4 trata-se da mistura dos ácidos protocatecuico e o protocatecuato de metila (metil-3,4-diidroxibenzoato) (Figura 165). Os deslocamentos químicos atribuídos para a mistura PM-4 estão resumidos na Tabela 19, p. 177.

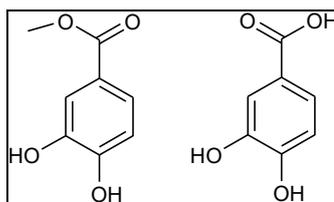


Figura 165. Estruturas das substâncias **PM-4** ácido protocatecuico e o éster metílico do ácido protocatecuico, (protocatecuato de metila).

Tabela 19. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz respectivamente) da mistura PM4, utilizando MeOD como solvente e TMS como referência interna. Deslocamentos químicos (δ , ppm).

C	PM-4				*Literatura DMSO- d_6	
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H
1	122,73	-	-	-	-	-
1'	169,01	-	-	H2, H6, OCH ₃	167,0	-
2	117,56	7,42 (<i>d</i> , $J=1,4$ Hz)	-	H6	117,1	7,32 <i>d</i> , $J=1,5$ Hz
3	146,34	-	H2	H5	145,0	-
4	151,86	-	H5	H6	150,0	-
5	116,00	6,80 (<i>d</i> , $J= 8,7$ Hz)	H6	-	114,4	6,76 <i>d</i> , $J=8,5$ Hz
6	123,75	7,40 (<i>d</i> , $J= 2,1$ Hz)	H5	H2	122,4	7,27 <i>dd</i> , $J=8,5$ e 1 Hz
OCH ₃	52,39	3,83 (<i>s</i>)	-	-	-	-

*(Moura et al., 2011)

4. 5. Referências Bibliográficas

ABREU, V.G.C., TAKAHASHI, J.A., DUARTE, L.P., PILÓ-VELOSO, D., JUNIOR, P.A.S., ALVES, R.O., ROMANHA, A.J., ALCÂNTARA, A.F.C. (2011) Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems, and flowers of *Lychnophora pinaster*. *Revista Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21 (4), 615-621.

BARBOSA, F. B. C. (2001). A biotecnologia e a conservação da biodiversidade amazônica, sua inserção na política ambiental. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, 18(2): 69-94.

BERGAMINI, G. (2008). Dexametasona: interação com ácidos carboxílicos aromáticos no estado sólido. (dissertação). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.58.

HIROTA, H. et al. The high resolution mass spectra of shionane and friedelane derivatives. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, v. 48, n. 6, p. 1884-1888, 1975.

JOSSANG, A., POUSSET, J.- L., BERNARD, B. (1994). Combreglutinin, a hydrolyzable tannin from *combretum glutinosum*. *Journal of Natural Products* Vol. 57, No. 6, pp. 732-737

LAWSON, M. A.; KAOUADJI, M.; ALLAIS, D. P.; CHAMPAVIER, Y.; CHULIA. A. J.(2006) Substituted tubaic acids, new oxidative rotenoid metabolites from *Lonchocarpus nicou*. *Tetrahedron letters*. 47, 451-454.

LIMA, A. F.; MILEO, P. G. M.; ANDRADE-NETO, M.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. P.; (2009). ¹H and ¹³C assignments of new methoxylated furanoflavonoids from *Lonchocarpus araripensis*. *Magnetic Resonance in Chemistry*., 47, 16.

LOPES, W. A., FASCIO, M. (2004). Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Química Nova*, Vol. 27, Nº. 4, 670-673.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M.G.A.; MAGALHÃES, E.G.; SANNOMIYA, M.; SORIANO, M. D. P. C.; PEREZ, M. A. F. (2007). Flavonoids of *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo and biological activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*.79:3.

MAHATO, S.B., KUNDU, A.P. (1994). ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features, *Phytochemistry*, 37 (6), 1517-1575.

MOUCO, G., BERNARDINO, M.J., CORNÉLIO, M. L. (2003). Controle de Qualidade de Ervas Medicinais. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. Vol 31.

MOREIRA, J., KLEIN-JÚNIOR, L. C., CECHINEL FILHO, V., BUZZI, F. DE C. (2013). Anti-hyperalgesic activity of corilagin, a tannin isolated from *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae), *Journal of Ethnopharmacology* 146, 318–323

MOURA, A. C. S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. dos. (2011). Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* LINN. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicular. *Química Nova*, vol. 34, n.7, p. 1136-1140.

SEO, S., UOMORI, A., YOSHIMURA, Y., TAKEDA, K., SETO, H., EBIZUCA, Y., NOGUHI, H., SANKAVA, V. (1988). Biosynthesis of sitosterol, cycloartenol, an 24-methylenecycloartenol in tissue cultures of higher and of ergosterolin yeast from [1,2- ¹³CH₂] and [2- ¹³CH₃] acetate and [5- ¹³CH₂]. *Journal Chemistry Societ. Perkin. Trans.I*, 2407- 2412p.

SHIOJIMA, K., ARAI, Y., MASUDA, K., TAKASE, Y., AGETA, T., AGETA H. (1992). Mass Spectra of pentacyclic triterpenoids. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 40 (7), 1683-1690.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. X. (2000) Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6ª. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (2001). Farmacognosia: da planta ao medicamento 3ed. Editora da UFSC

SPRENGER, R. F., THOMASI, S. S., FERREIRA, A. G., CASS, Q. B., BATISTA, J. M. JR. (2016) Solution-state conformations of natural products from chiroptical spectroscopy: the case of isocorilagin. Electronic Supplementary Material (ESI) for Organic & Biomolecular Chemistry, *The Royal Society of Chemistry*.

WILLIAMS, D.H. & FLEMING, I. Spectroscopic Methods in Organic Chemistry. McGraw-Hill, 5th ed. 1995, p. 329.

http://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_709-50-2_1HNMR.ht
(acesso em 22/01/ 2017)

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl_beta-D-glucoside
(acesso em 22/01/ 2017)

ZANON, R. B., Pereira, D. F., Boschett, T. K., Santos, dos M., Athayde, M. L. (2008). Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18(2): 226-229.



CAPÍTULO 5

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5. Atividade Antioxidante

5. 1. Introdução

Um dos grandes responsáveis, nos últimos anos, por doenças como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e diabetes mellitus tipo I, são os radicais livres e outros oxidantes. A produção de radicais livres ocorre naturalmente durante ações catalíticas de enzimas, no metabolismo celular ou pela exposição a fatores exógenos, como a radiação gama e ultravioleta, o cigarro, as dietas, entre outros (Barreiros et al., 2006; Souza et al., 2007).

Um desafio para a pesquisa industrial nos últimos anos é a descoberta de antioxidantes naturais que sejam utilizados na fabricação de produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos. De maneira que esses antioxidantes sejam de origem vegetal, como por exemplo, os compostos fenólicos, ácido ascórbico e carotenoides que atuem na prevenção do desencadeamento das reações oxidativas. Nesses produtos há um grande interesse pelo estudo da oxidação lipídica, em virtude da deterioração que este tipo de dano oxidativo pode causar (Laguerre et al., 2007).

Visando a substituição dos antioxidantes sintéticos, que são prejudiciais ao organismo animal, quando ministrados em altas doses, no século passado, a partir dos anos 80, iniciaram-se as pesquisas com antioxidantes naturais (Duran, 1993).

Novos compostos com atividades antioxidantes oriundos de fontes vegetais têm sido identificados e purificados com o intuito de agir sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, na prevenção da degradação oxidativa de alimentos e conseqüente diminuição do consumo de antioxidantes sintéticos (Shahidi et al., 2007).

As frutas e os vegetais contêm substâncias antioxidantes distintas, a presença de compostos fenólicos como os flavonoides, ácidos fenólicos, antiocianinas, além dos já conhecidos; vitaminas C, E e carotenoides, conferem a esses alimentos efeitos benéficos para saúde (Ajaikumar et al, 2005, Silva et al, 2004). Estudos reportam que o uso desses alimentos leva a uma significativa redução do câncer, e evidências epidemiológicas demonstram correlação inversa entre doenças cardiovasculares e consumo de alimentos

fonte de substâncias fenólicas, o que possivelmente se deve ao fato de suas propriedades antioxidantes (Karakaya, 2004), (Ninfali et al, 2005).

5. 2. Atividade Seqüestradora de Radical Livre DPPH

Testes preliminares qualitativos para a identificação de substâncias fenólicas em geral foram realizados com os extratos em MeOH e MeOH/H₂O do caule de *L. guilleminianus* e resultados positivos foram obtidos. Afim de se verificar quantitativamente os resultados, o método indireto da avaliação da atividade antioxidante utilizando a redução de radical livre DPPH (2,2'-difetil-1-picrihidrazil), foi utilizado. O método consiste em um ensaio qualitativo e quantitativo do grau da atividade antioxidante e na habilidade das substâncias de agirem como sequestradoras de radicais livres.

- Princípio

O DPPH é um radical livre estável, de coloração púrpura em etanol, e devido ao seu elétron ímpar, a solução etanólica exibe uma forte banda de absorção na faixa de 515-518nm. O DPPH reage com doadores de hidrogênio, (Figura 166, p. 183) na presença de substâncias antioxidantes, ele recebe H • sendo então reduzido, e passa a ter coloração amarela.

Estudos recentes demonstram que a interação de um potencial antioxidante com DPPH depende da conformação estrutural da molécula analisada, (Mensor et al, 2001).

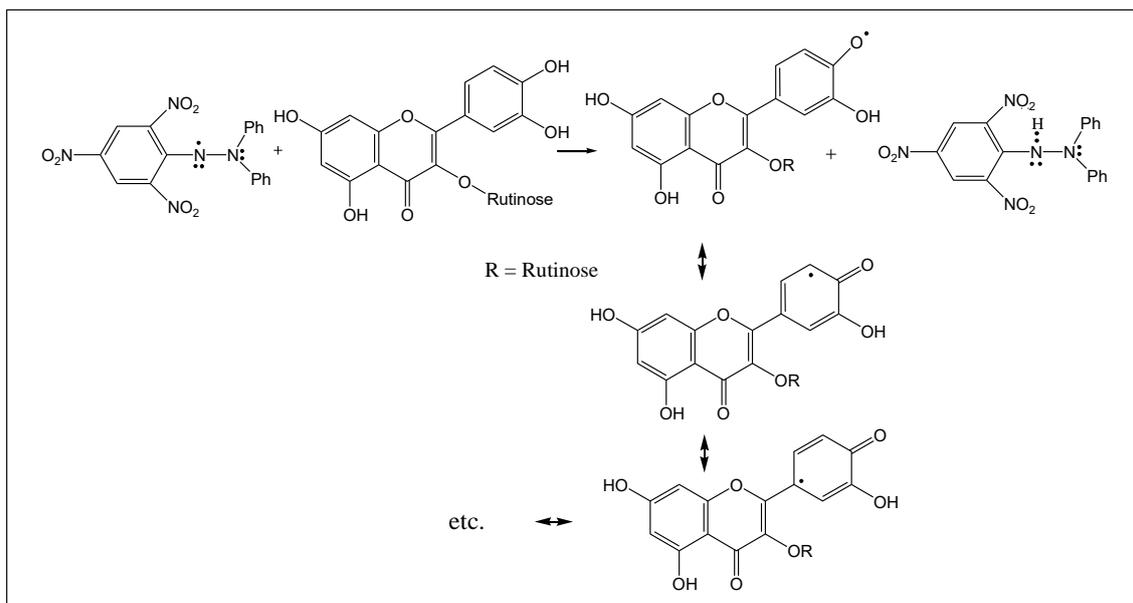


Figura 166. Possível interação entre o DPPH e o flavonoide Rutina

5. 2. 1. Materiais e Reagentes Utilizados

- DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil);
- Etanol;
- Balão volumétrico (10; 25; 50; 100 mL);
- Pipetas volumétricas (0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 5 mL);
- Espectrofotômetro;
- Tubos de ensaio;
- Rutina.

5. 2. 2. Procedimento Experimental

Construção da Curva de calibração do DPPH

Primeiramente foram preparados 50 mL de solução estoque de DPPH em MeOH na concentração de 40 μ g/mL. A solução foi mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram feitas diluições de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, e 1 μ g/mL. A curva de calibração (Gráfico 5) foi construída a partir dos valores de absorvância a 515 nm de todas as soluções (1 a 40 μ g/mL), medidas em cubetas de vidro com percurso ótico de 1cm e tendo como “branco” o metanol . As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata e em intervalos de 1min entre cada leitura. A equação da curva de calibração do DPPH foi: $C = 0,022A - 0,0238$, onde C corresponde à concentração de DPPH no meio, A é a

absorbância medida no comprimento de onda de 516 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,9909$.

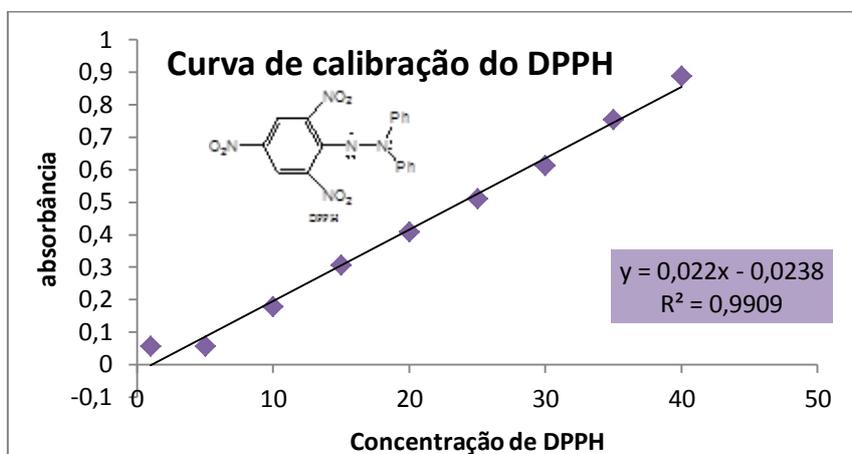


Gráfico 5. Curva de calibração do DPPH

Leitura das Medidas das Absorbâncias nas amostras

No ensaio uma solução estoque dos extratos brutos de *Calycophyllum spruceanum* e *Lonchocarpus guilleminianus* (500 µg/mL) em metanol foram diluídas nas concentrações de (10, 30, 50, 70, 90 e 100 µg/mL). As medidas das absorbâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH na concentração de 40 µg/mL) foram feitas a 515 nm (Figura 167, p. 185). Após 30 minutos, foi feita a leitura em um espectrofotômetro. As análises foram realizadas em triplicata.

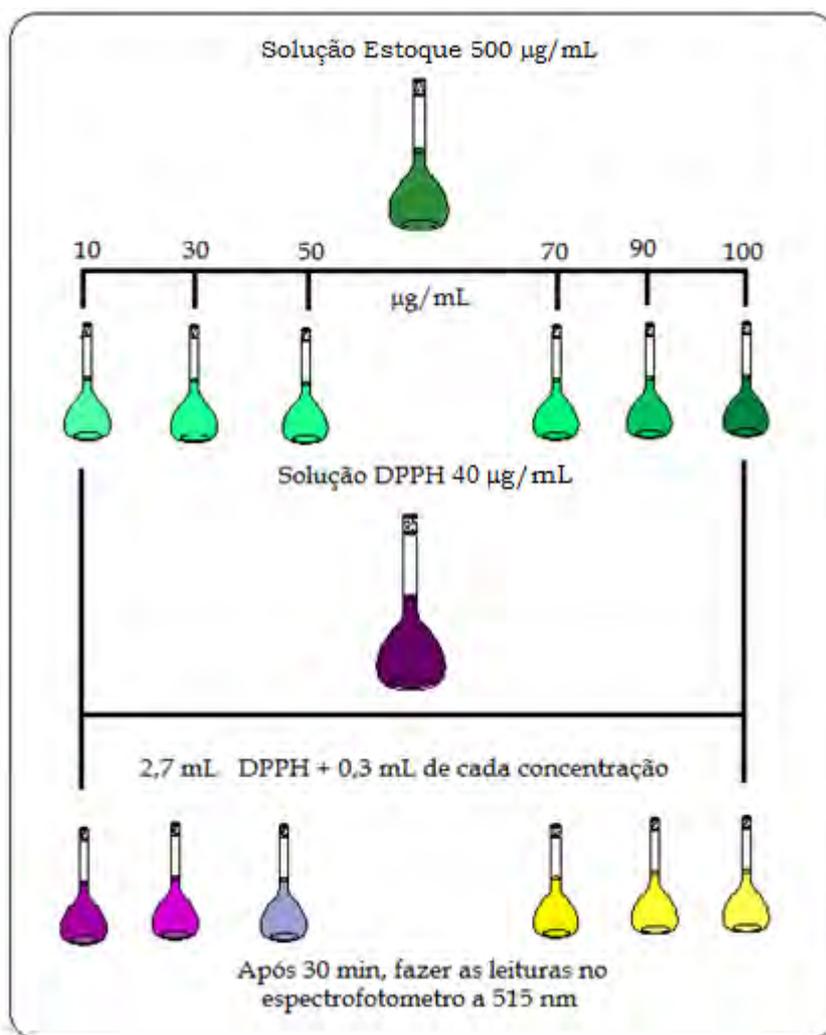


Figura 167. Procedimento Experimental realizado na atividade sequestradora de radicais livres DPPH.

O percentual de Atividade Antioxidante (AA%) das amostras foi calculado a partir do valor das absorbâncias verificadas.

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100]}{Abs_{controle}} \right\}$$

O controle positivo foi feito utilizando o flavonoide rutina através do mesmo procedimento utilizado para os extratos brutos.

A leitura do branco foi feita com 0,3 mL de solução das concentrações dos extratos brutos adicionado de 2,7 mL de MeOH.

5. 2. 3. Resultados e Discussão:

Foram testados na avaliação da atividade antioxidante (DPPH) os extratos em MeOH, MeOH/H₂O e AcOEt de *L. guilleminianus* e extratos em MeOH, MeOH/H₂O de *C. spruceanum*.

Quanto maior o consumo de DPPH pela amostra maior é sua atividade antioxidante (AA) (Alves, 2007). Sendo assim, quanto maior a concentração da amostra e menor a absorbância, maior o consumo de DPPH. Todas as amostras apresentaram capacidade de consumo de DPPH, visto que as absorbâncias após reação de DPPH com as diferentes concentrações testadas foram significativamente menores comparados com as absorbâncias obtidas para o controle negativo (DPPH + solvente), o que pode demonstrar preliminarmente a atividade antioxidante para os extratos testados.

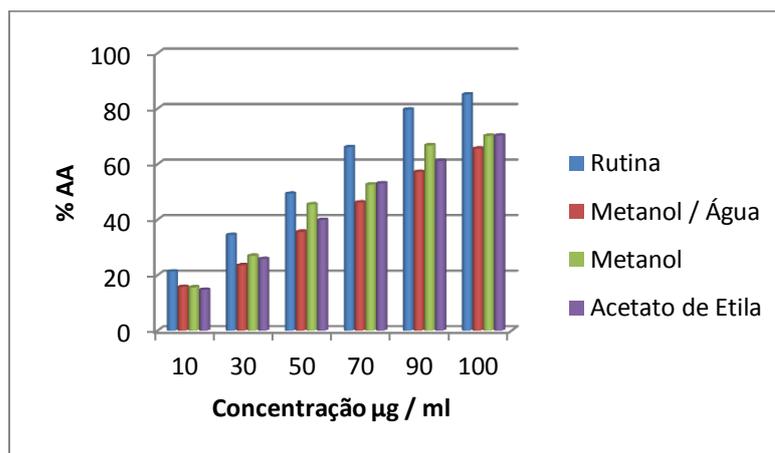
A menor (AA) foi evidenciada para o extrato em AcOEt, na concentração de 10 µg/mL, porém foi observado significativo percentual para esta mesma amostra nas outras concentrações. Quanto aos extratos de *C. spruceanum* o extrato em MeOH foi o que apresentou maior atividade antioxidante quando comparados os seus valores de %AA com o padrão rutina. As porcentagens de atividade antioxidante estão descritas nas Tabelas 20 e 21 e Gráfico 6 e 7.

Tabela 20. Porcentagem de Atividade Antioxidante dos extratos brutos de *L. guilleminianus*

Amostras	Concentrações (µg/mL)					
	10	30	50	70	90	100
Rutina	21,3	34,48	49,34	66,14	79,66	85,14
MeOH/H₂O	15,74	23,56	35,63	46,18	57,21	65,60
MeOH	15,6	26,98	45,52	52,66	66,79	70,22
AcOEt	14,71	25,81	39,89	53,07	61,19	70,31

Tabela 21. Porcentagem de Atividade Antioxidante dos extratos brutos de *C. spruceanum*

Amostras	Concentrações (µg/mL)					
	10	30	50	70	90	100
Rutina	21,3	34,48	49,34	66,14	79,66	85,14
MeOH/H ₂ O	13,05	21,48	29,19	35,15	41,52	48,67
MeOH	14,49	23,33	36,59	46,04	52,41	58,89



Gráficos 6. Gráfico da porcentagem de Atividade Antioxidante versus concentração dos extratos brutos em *L. guilleminianus*.

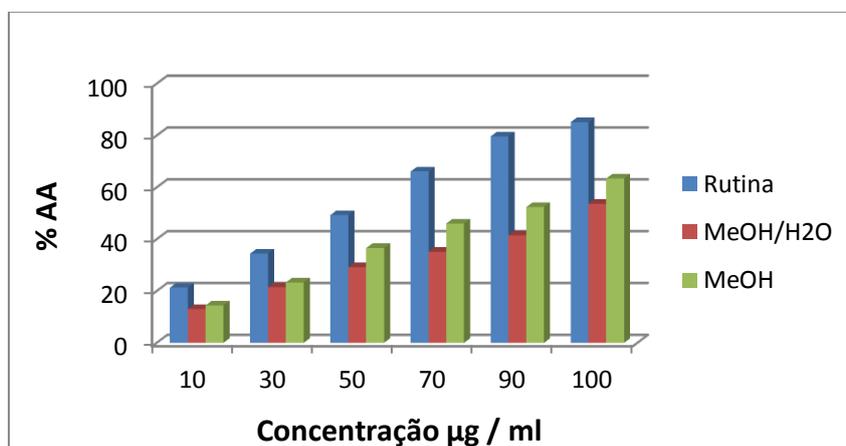


Gráfico 7. Gráfico da porcentagem de Atividade Antioxidante versus concentração dos extratos brutos em *C. spruceanum*.

A quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (EC_{50}) foi determinada usando a metodologia descrita por Rufino et al. (2007).

De acordo com os resultados expostos na Tabela 22 conclui-se que a EC_{50} , foi mais efetiva no extrato em AcOEt, seguida do extrato em MeOH/H₂O e MeOH de *L. guilleminianus*. Comparados com o padrão Rutina, cuja EC_{50} = 17,91, todos os extratos apresentaram valores de EC_{50} inferiores, conferindo assim um bom resultado, pois a Rutina é uma substância pura e nos extratos testados temos uma mistura complexa de substâncias.

Uma vez que, quanto menor for o valor da EC_{50} , maior será a atividade antioxidante, conclui-se então que o extrato em AcOEt possui a maior capacidade sequestradora do radical DPPH.

A espécie *C. spruceanum* quando avaliada quanto sua atividade antioxidante obteve valores significativos de EC_{50} , evidenciando o extrato em MeOH, como o mais ativo.

Tabela 22. Valores de EC_{50} para os extratos em AcOEt, MeOH e MeOH/H₂O de *L. guilleminianus* e MeOH e MeOH/H₂O de *C. spruceanum*

Valores de EC_{50} (mg/L)	Extratos		
	AcOEt	MeOH	MeOH/H ₂ O
<i>L. guilleminianus</i>	13,14	15,72	14,34
<i>C. spruceanum</i>	-	19,41	24,80

*Padrão: Rutina EC_{50} = 17,91

5. 3. Método do Radical ABTS

Diferente do DPPH que é um radical livre estável a temperatura ambiente o radical ABTS^{•+} é produzido a partir de um precursor, o ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico.

O radical ABTS^{•+} pode ser gerado por reações enzimáticas ou químicas. Enzimaticamente o radical ABTS^{•+} é gerado do ABTS pela sua reação com o radical ferromioglobina e H₂O₂ (água oxigenada) na presença de peroxidase

(Campos e Lissi, 1997). Novos métodos de geração do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foram desenvolvidos, como a partir da oxidação do sal por persulfato de potássio, cuja reação ocorre na ausência de luz, por um período 12 a 16 horas. A energia de ativação requerida é baixa e a reação começa imediatamente, mas não alcança um máximo de absorbância até o transcurso de 6 horas.

O ABTS reage estequiometricamente a uma relação 1: 0,5 com o persulfato de potássio. (Henriquez et al, 2002). Esse método baseia-se na geração do $\text{ABTS}^{\bullet+}$, que apresenta cor verde escuro, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio que possui absorção máxima em 645, 734 e 815 nm. Com a adição de um antioxidante, ocorre a redução do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional (Figura 168). Com a perda de cor, a porcentagem de inibição do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ é determinada em função do Trolox (ácido-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante. O método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais.

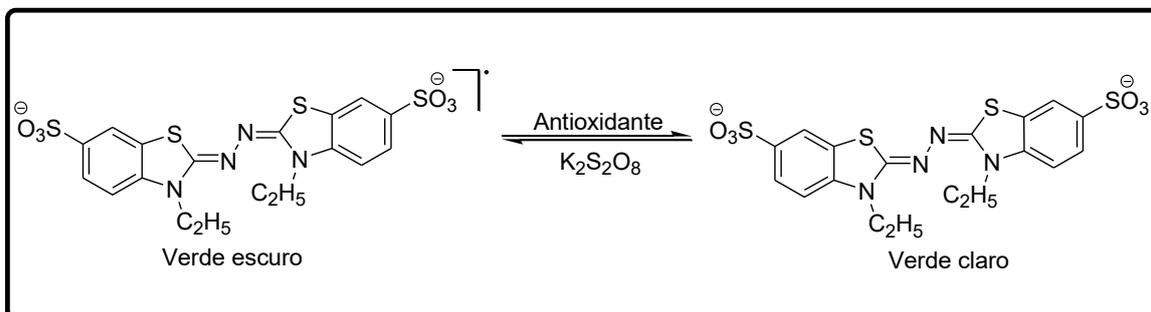


Figura 168. Estabilização do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. Adaptada de Souza et al, 2007.

O radical formado pode ser solubilizado em meios orgânicos e aquosos nos quais a atividade antioxidante pode ser determinada, dependendo da natureza dos compostos antioxidantes (Arnao, 2000).

Este método apresenta vantagem em relação ao método do radical livre DPPH, pois pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis (Lima, 2008; Kuskoski et al., 2006). Além disso, o radical apresenta excelente estabilidade, sendo um dos testes mais rápidos de atividade antioxidante e que oferece resultados reprodutíveis (Kuskoski et al, 2006).

5. 3.1. Materiais e Reagentes Utilizados

- Metanol;
- Água destilada;
- Frasco de vidro;
- Acetona;
- ABTS;
- Persulfato de Potássio;
- Trolox;
- Álcool etílico;
- Frasco de vidro âmbar
- Espectrofotômetro;
- Micropipeta automática;
- Pipeta volumétrica (1,0; 2,0; 5,0 mL);
- Balão Volumétrico (1000; 50; 10 mL).

5. 3. 2. Procedimento Experimental

Preparo de Soluções:

Solução de MeOH a 50% - Em balão volumétrico de 1 L, adicionou-se 500 mL de álcool metílico; completou-se o volume para 1.000 mL com água destilada, homogeneizou-se e transferiu para um frasco de vidro, devidamente etiquetado. Armazenou-se em temperatura ambiente por tempo indeterminado.

Solução de acetona a 70% -Em balão volumétrico de 1 L, adicionou-se 700 mL de acetona; completou-se o volume para 1.000 mL com água destilada, homogeneizou-se e transferiu para um frasco de vidro, devidamente etiquetado. Armazenou-se em temperatura ambiente por tempo indeterminado.

Solução estoque de ABTS 7mM– Dissolveu-se 192 mg de ABTS em água destilada e completou-se volume para 50 mL em um balão volumétrico com água destilada, homogeneizou-se e transferiu para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado. Armazenou-se sob refrigeração por até um mês.

Solução de persulfato de potássio 140 mM - Dissolveu-se 378,4 mg de persulfato de potássio em água destilada e completou-se o volume para 10 mL em um balão volumétrico com água destilada, homogeneizou-se e transferiu para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado. Armazenou-se em temperatura ambiente por até um mês.

O radical ABTS^{•+} foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio. Manteve-se a mistura no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida, diluiu-se 1 mL desta mistura em álcool etílico até obter uma absorbância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm.

Solução padrão de trolox 2mM - Dissolveu-se 25 mg de trolox em álcool etílico e completou-se o volume para 50 mL em um balão volumétrico com álcool etílico, homogeneizou-se e transferiu para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado.

Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 30 µL de cada solução de trolox (100 µM, 500 µM, 1.000 µM, 1.500 µM e 2.000 µM) para tubos de ensaio, misturou-se com 3,0 mL da solução do radical ABTS e homogeneizou-se em agitador de tubos. Realizou-se a leitura (734 nm) após 6 minutos da mistura e utilizou-se álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro. Plotou-se as concentrações de trolox no eixo X e as respectivas absorbâncias no eixo Y e calculou-se a equação da reta. A partir da equação da reta, calcula-se a absorbância referente a 1.000 µM de trolox (Nemadis et al., 2004).

5.3.3. Resultados e Discussão

A determinação da atividade antioxidante total (ATT) foi realizada com base na metodologia de Rufino et al. (2007) e expressos como capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox (valores TEAC).

Os extratos testados neste experimento foram os extratos em MeOH, MeOH/H₂O de *L. guilleminianus*.

O cálculo da atividade antioxidante total (ATT) foi realizado substituindo na equação da reta a absorbância equivalente a 1000 µM do padrão Trolox. O

valor obtido para o termo x corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1000 µM de trolox.

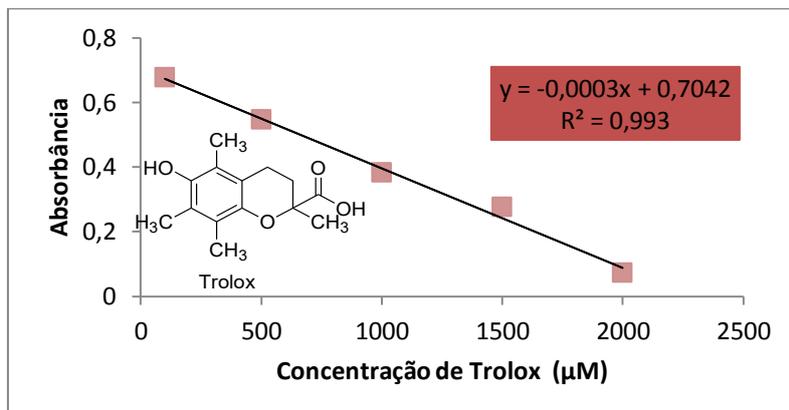


Gráfico 8. Curva de calibração do Trolox

- Equação da reta do Trolox (Gráfico 8): calcular a absorbância referente a 1000 µM de trolox.

$$y = 0,0003x + 0,7042$$

$$y = 0,4042$$

- Substituir na equação da reta a absorbância referente a 1000 µM de trolox para obter o valor correspondente a diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1000 µM de trolox.(Gráfico 9 e 10).

Extrato MeOH/H₂O

$$y = - 0,0002x + 0,7077$$

$$0,4042 - 0,7077 = - 0,0002x$$

$$x = 1517,5 \text{ mg/L}$$

Extrato MeOH

$$y = - 0,0001x + 0,7127$$

$$0,4042 - 0,7127 = - 0,0001x$$

$$x = 3085 \text{ mg/L}$$

A partir do resultado encontrado (x), dividir por 1.000 para ter o valor em g. O resultado final é calculado pela divisão de 1.000 (µM) pelo valor de X(g) e multiplicado por 1(g) para encontraro valor final que é expresso em µM trolox / g de extrato.

- Dividir o valor de x por 1000 para ter o resultado em g:

$$Xg = 1517,5/1000 = 1,5175 \text{ g/mL}$$

$$X_g = 3085/1000 = 3,085 \text{ g/mL}$$

- Atividade antioxidante total

MeOH/H₂O

$$\text{AAT} = 1000 / 1,5175 \times 1 = 658,97 \text{ } \mu\text{M de trolox/ g de extrato}$$

MeOH

$$\text{AAT} = 1000 / 3,085 \times 1 = 324,14 \text{ } \mu\text{M de trolox/ g de extrato}$$

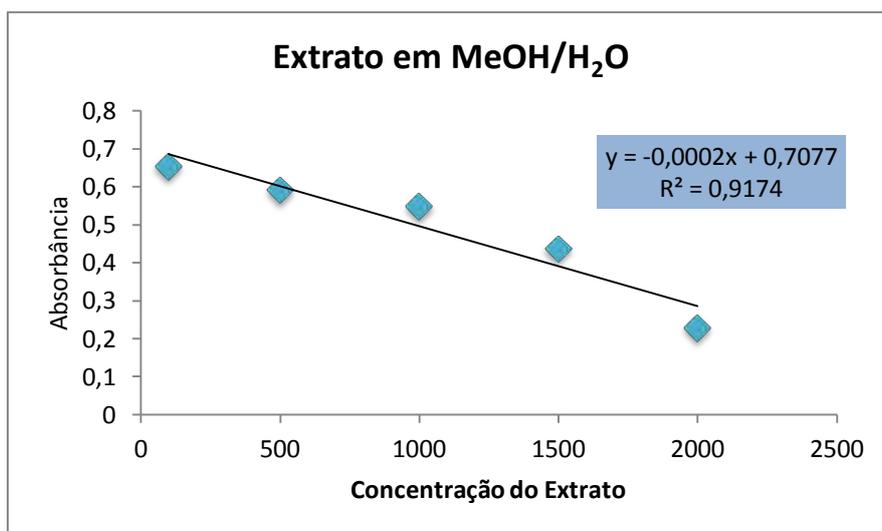


Gráfico 9. Equação da reta para o extrato em MeOH/H₂O de *L. guilleminianus*

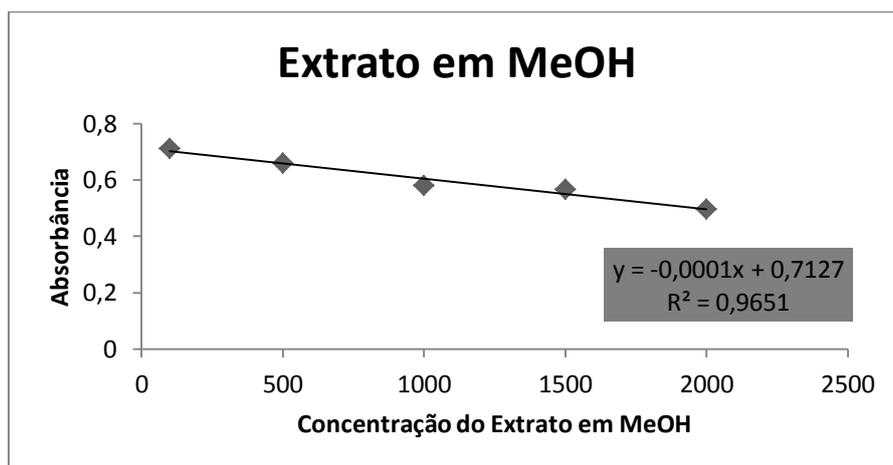


Gráfico 10. Equação da reta para o extrato em MeOH de *L. guilleminianus*

A partir da análise dos resultados da atividade antioxidante pelo método do ABTS, constata-se que o extrato em MeOH/H₂O de *L. guilleminianus* apresentou uma maior porcentagem de inibição do ABTS em função do trolox.

5. 4. Avaliação do Teor de Fenólicos Totais

O método de Folin-Ciocalteu foi utilizado com a finalidade de se relacionar a atividade antioxidante com o teor de fenólicos totais. De acordo com Souza et al. (2007), as substâncias fenólicas (Figura 169) distribuem-se nas seguintes categorias: fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados do ácido benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas.

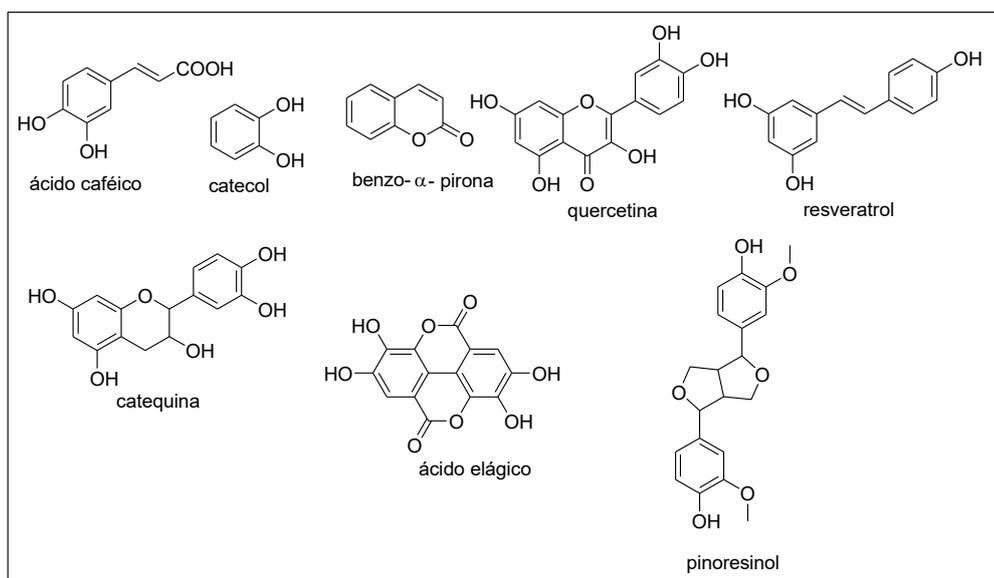


Figura 169. Exemplo de substâncias fenólicas

Tais substâncias possuem a capacidade de inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*.

Como forma de quantificação do ácido úrico na urina, iniciou-se os métodos de doseamento de polifenóis baseados em reação de oxi-redução. Para tal utilizou-se o reagente fosfotungstíco (Folin e Macallum, 1912) que foi modificado posteriormente e denominado reagente de Folin-Denis (Folin & Dennis, 1912).

Outro método de quantificação de fenóis é o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu inicialmente denominado fenol modificado que difere do reagente de Folin-Dennis pela presença de sulfato de lítio, que é adicionado

para evitar a formação de precipitados (Folin; Ciocalteu, 1927; Scalbert, 1992).

Os métodos de oxido-redução envolvem o doseamento de polifenóis (quantificados por espectrofotometria), por meio de formação de um complexo com coloração azul, derivado da redução do reagente pelas hidroxilas fenólicas, essa coloração ocorre em meio alcalino e é pouco estável em excesso de base fraca, pois quando uma base forte é acrescentada ao meio, observa-se uma perda rápida de coloração (Folin; Dennis, 1912; Scalbert, 1992).

O método utilizado neste trabalho para se determinar o teor de fenóis, fazendo-se uso do reagente de Folin Ciocalteu, é um dos mais utilizados pelos pesquisadores. O referido reagente consiste em uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstístico, onde o molibdênio e o tungstênio se encontram em um estado de oxidação +6. (Figura 170). Na presença de agentes redutores, ocorre a formação de molibdênio e tungstênio azul, cujo estado de oxidação se encontra entre +5 e +6. Esta mudança na coloração permite que seja determinada a concentração de substâncias redutoras, neste caso, os compostos de natureza fenólica (Chaves et al., 2010).

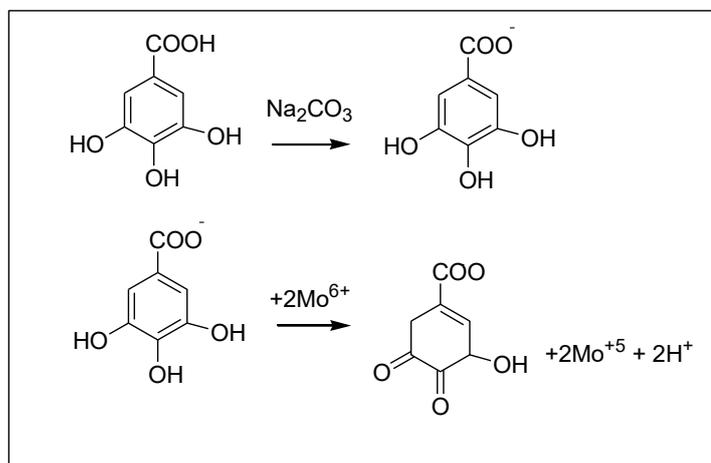


Figura 170. Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.

5. 4. 1. Reagentes e Materiais Utilizados

- Balão volumétrico (100; 50; 10 mL);;
- Pipeta volumétrica (0,5; 1,0; 2,0 mL);
- Micropipeta automática;
- Água destilada;
- Reagente de Folin Ciocalteu;
- Carbonato de Sódio;
- Espectrofotômetro;
- Metanol.

5. 4. 2. Procedimento Experimental

Para a análise de fenóis totais, uma solução de 100 mg do extrato bruto dissolvido em 100 mL de MeOH foi preparada. Uma alíquota de 7,5 mL desta solução foi transferida para balão de 50 mL e uma alíquota de 100 µL desta última solução foi agitada com 500 µL do reagente de Folin Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min. A adicionou-se 2mL de Na₂CO₃ a 15% e agitou-se a mistura por 30 segundos . A solução teve seu volume acertado para 10 mL com água destilada. Após 2 horas as absorvâncias das amostras foram medidas a 750 nm utilizando como “branco” o MeOH e todos os reagentes, menos o extrato.

O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10 a 350 µg/mL) e expressos como mg de EAG por grama de extrato.

Após a reação do ácido gálico com (RFC) foram feitas leituras das absorvâncias cujos valores permitiram traçar o gráfico das absorvâncias *versus* concentrações de ácido gálico. (Gráfico 11). A quantidade de fenóis totais do extrato bruto foi calculada através de equação obtida por regressão linear dos valores experimentais da solução padrão de ácido gálicos sendo no eixo das abscissas, colocadas as concentrações da amostra e no eixo das ordenadas as absorvâncias medidas. Os dados de no mínimo três experimentos independentes serão tratados estatisticamente, sendo que o valor médio obtido foi utilizado.

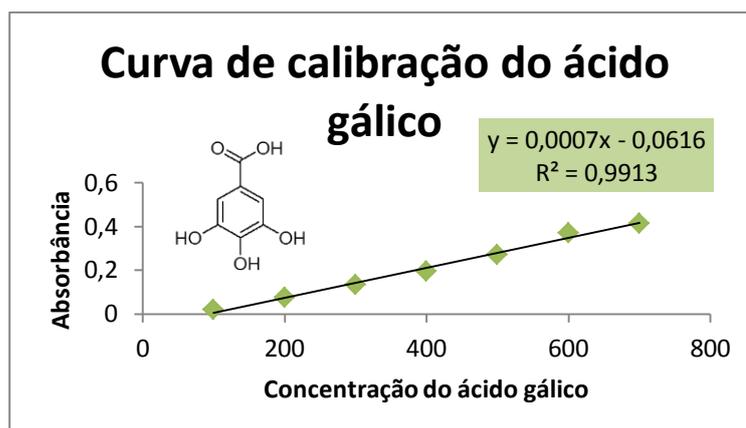


Gráfico 11. Curva de calibração do ácido gálico

5. 4. 3. Resultados e Discussão

Para os extratos em MeOH, MeOH/H₂O e AcOEt do caule de *L. guilleminianus* e extratos em MeOH, MeOH/H₂O de *C. spruceanum* os resultados obtidos na determinação do teor de fenóis totais (FT), utilizando o método Folin-Ciocalteu estão apresentados na Tabela 23. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de material vegetal seco, e observou-se que o extrato em MeOH foi o que apresentou um maior teor de fenólicos totais nas duas espécies.

Tabela 23. Teor de fenóis totais dos extratos brutos de *L. guilleminianus* e *C. spruceanum*

	Teor de Fenólicos Totais (mg de EAG/g de extrato)		
	Extratos		
	AcOEt	MeOH	MeOH/H ₂ O
<i>L. guilleminianus</i>	143,71	163,71	150,86
<i>C. spruceanum</i>	-	102,29	93,71

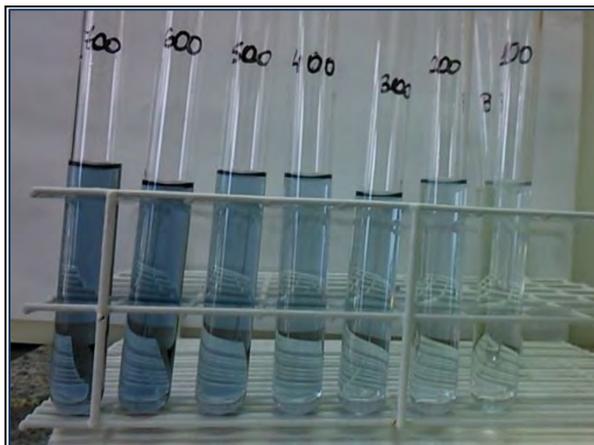


Figura 171. Reação do reagente Folin-Ciocalteu com o ácido gálico e o extrato em MeOH de *L. guilleminianus* em diferentes concentrações.

5. 5. Avaliação do Teor de Flavonoides Totais

Com o intuito de correlacionar a atividade antioxidante com o teor de flavonoides, pode-se utilizar a metodologia que usa rutina como padrão, em solução de cloreto de alumínio (AlCl_3).

O cloreto de alumínio, depois da década de 60 passou a ser largamente empregado como um reagente de deslocamento batocrômico em espectrometria no UV- visível para a determinação estrutural de flavonoides e foi utilizado pela primeira vez para identificar antocianidinas (Mabry et al., 1970), nos últimos anos o cloreto de alumínio tem sido utilizado largamente para a determinação do teor de flavonoides totais em plantas (Vennat et al., 1992).

A formação de um complexo estável com o cátion alumínio e os flavonoides, em metanol, (Figura 172, p. 199) é observada ao realizar uma análise espectrofotométrica com tais substâncias, pois há um desvio batocrômico e uma intensificação da absorção, o que torna possível a determinação do teor de flavonoides evitando a interferência de outras substâncias fenólicas, substâncias essas que formam complexos com o cloreto de alumínio, porém absorvem em comprimento de ondas inferiores (Mabry et al., 1970).

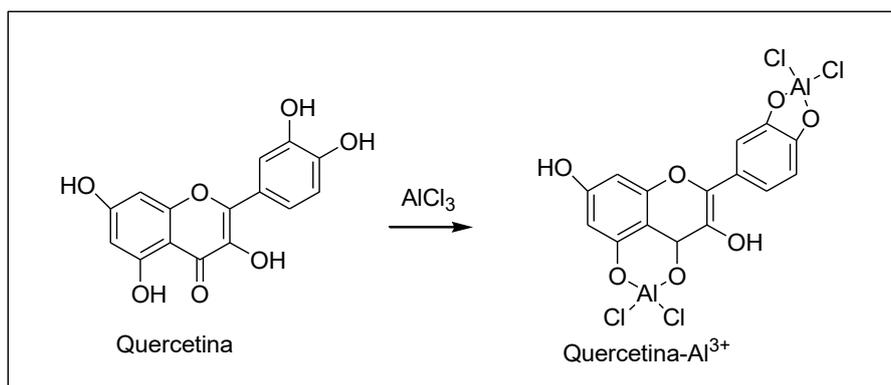


Figura 172. Formação do complexo Flavonoide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio

O comprimento de onda selecionado para o método, 425 nm, corresponde a banda de absorção do complexo quercetina-alumínio, o que faz com que o método não seja considerado exato para a determinação de flavonoides, pois o valor médio é medido e o valor real é mais próximo quanto maior a proporção de flavonóis e menor a proporção de flavonas e isoflavonas existentes na planta (Marcucci et al., 1998).

5. 5. 1. Reagentes e Materias Utilizados:

- Cloreto de alumínio;
- Rutina;
- Água destilada;
- Metanol;
- Balão Volumétrico (25; 50; 100 mL);
- Espectrofotômetro;
- Pipeta volumétrica (0,5, 1,0, 2,0, 5,0 mL).

5. 5. 2. Procedimento Experimental

A quantificação foi feita de acordo com a metodologia proposta por Rio (1996) modificado, utilizou-se rutina como padrão, em solução de cloreto de alumínio. Foi preparada uma solução contendo 10 mg do extrato bruto em balão volumétrico de 100 mL. Uma alíquota de 15 mL foi colocada em balão

volumétrico de 50 mL onde adicionou-se 1 mL de solução de cloreto de alumínio (5 g de cloreto de alumínio em 100 mL de MeOH). Após repouso de 30 minutos, fez-se leitura a 425 nm em espectrofotômetro UV/visível Beckman DU 70 para se obter a concentração de flavonóides (mg/mL).

5. 5. 3. Resultados e Discussão

A análise foi feita em triplicata. Os dados de absorvância das amostras foram comparados com uma curva padrão (Gráfico 12), construída a partir de soluções com concentrações crescentes de rutina. A solução padrão de rutina foi preparada com MeOH 70% numa concentração de 100 mg/mL. Alíquotas de 3,5 (7,5 mg/mL) a 7,5 mL (15mg/mL), com intervalos de 0,5 mL foram utilizadas para a confecção da curva-padrão, acrescidas de 1 mL de cloreto de alumínio e completadas para 50 mL com MeOH 70%.

Os teores de flavonoides totais dos extratos testados foram calculados a partir da equação obtida por regressão linear dos valores experimentais da solução padrão de rutina, sendo que no eixo das abscissas foram colocadas as concentrações das amostras e no eixo das ordenadas as absorvâncias medidas em 425 nm. Os dados de no mínimo três experimentos independentes foram tratados estatisticamente onde a média obtida foi utilizada.

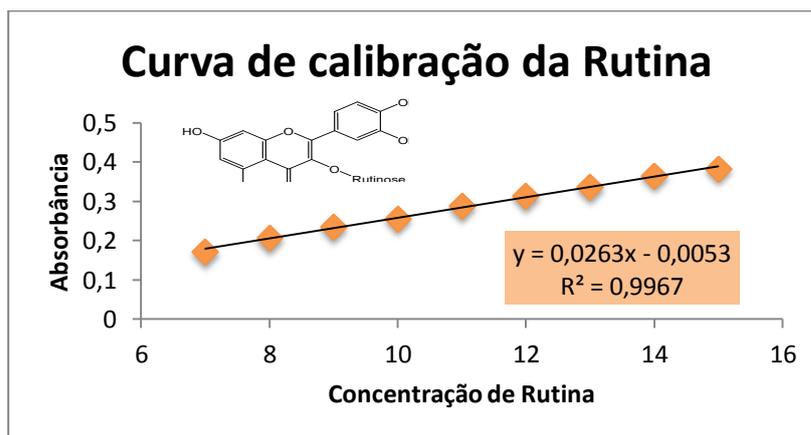


Gráfico 12. Curva de calibração da Rutina

Os extratos testados na avaliação do teor de flavonoides totais foram os extratos em MeOH, MeOH/H₂O e AcOEt de *L. guilleminianus* e extratos em MeOH, MeOH/H₂O de *C. spruceanum*.

Com a equação da reta obtida na curva de calibração da rutina e o valor médio das absorbâncias encontradas, determinou-se o teor de flavonoides, expressos em $\mu\text{g/ml}$. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 24.

Tabela 24. Teor de flavonoides totais dos extratos brutos de *L. guilleminianus* e *C. spruceanum*

	Teor de Flavonoides Totais $\mu\text{g/ml}$		
	Extratos		
	AcOEt	MeOH	MeOH/H ₂ O
<i>L. guilleminianus</i>	2,06	1,43	1,87
<i>C. spruceanum</i>	-	2,22	1,34

Os resultados do teor de Flavonoides totais calculado mostraram-se análogos aos do EC_{50} , com maior concentração de flavonoides totais para o extrato em AcOEt de *L. guilleminianus*.

Observou-se uma correlação entre os teores de flavonoides totais e a EC_{50} , no entanto no teor de fenólicos totais e no teste que utiliza o ABTS não se observa este comportamento, essa análise sugere que existe algum constituinte no extrato em AcOEt que contribui particularmente para ação sequestradora de radicais livres (DPPH) e no teor de flavonoides totais.

Os constituintes químicos isolados da espécie *L. guilleminianus* são de natureza fenólica e em sua maioria isolados do extrato em MeOH/H₂O (extrato mais trabalhado fitoquimicamente) e MeOH.

As substâncias: ácido elágico, ácido gálico, 2,3-(S) hexaidroxidifenoil-D-glicose e a β -1-O-galoil-3,6-(R)-hexahidroxidifenoil-D-glicose (corilagina) e a saponina ácido 3-O- β -D-xilofuranosil-(1'→3)- β -D-glicopiranosil (1''→2')- α -ramnopiranosil(1'''→3')-hidroxiolean-12-en-28-oico foram isoladas do extrato em MeOH/H₂O, do extrato em MeOH foram identificados a (corilagina) e açúcares e do extrato em AcOEt : o ácido gálico. Esses extratos apresentaram

valores satisfatórios em todos os resultados para a avaliação de sua atividade antioxidante.

Os valores da EC₅₀ calculados para os extratos, bem como os valores de fenólicos e flavonoides totais evidenciam a atividade antioxidante da *C. spruceanum*.

Do extrato em MeOH/H₂O de *C. spruceanum* foram isolados o ácido protocatecuico e o protocatecuato de metila, caracterizando assim a natureza fenólica do extrato.

5. 6. Referências Bibliográficas

ALVES, C.Q. (2007). Flavonoides antioxidantes e derivados de ácido gálico isolados de *Cenostigma gardenerianum* TUL. (Leguminosae). Dissertação do programa de pós graduação em química da UFBA.

AJAIKUMAR, K. B. et al. (2005). The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. *Journal Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 96, n. 1/2, p. 171-76.

ARNAO, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology* ;11(11):419-21.

CAMPOS, A. M, LISSI, E. A. (1997) Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. *International Journal of Chemical Kinetics*. 219 – 224

CHAVES, M.H; CITÓ, A.M.G.L; LOPES, J.A.D; COSTA, D.A; OLIVEIRA, C.A.A; COSTA, A.F; et al. (2010). Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. *Braz Pharmacognosy Journal*, 20(1):106-12.

DURAN, R. M.; PADILLA, R. B. (1993). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites, Sevilla*, v. 44, n. 2, p. 101-6.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, Boston, v.73, p.627-650.

FOLIN, O.; DENIS, W. (1912). On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *The Journal of Biological Chemistry*, v.12, p.239-243.

FOLIN, O.; MACALLUM, A. B.; (1912). On the blue color reaction of phosphotungstic acid with uric acid and other substances: preliminary paper *The Journal of Biological Chemistry*, 265.

HARBORNE J.B. (1984). Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis, *Chapman and Hall*, London.

HENRIQUEZ C, ALIAGA C, LISSI E. (2002) Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. *International Journal Chemical Kinetics*; 34(12):659-65.

KARAKAYA, S. (2004). Bioavailability of Phenolic Compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*., Boca Raton, v. 44, n. 6, p. 453-64.

KUSKOSKI EM, ASUERO AG, MORALES MT, FETT R. (2006). Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*; 36(4):1283-7.

LAGUERRE, M., LECOMTE, J., VILLENEUVE, P., Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges (2007). *Review Progress in Lipid Research*, v.46, p.244-282.

LIMA A. (2008). Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (caryocar brasiliense, camb.). Tese. [Doutorado em Bromatologia] - Universidade de São Paulo.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M.B. (1970). The Systematic identification of flavonoids. *Springer- Verlag*, Berlin- Heidelberg – New York.

MARCUCCI, M.C., RODRIGUEZ, J., FERRERES, F., BANKOVA ,V., GROTO R., POPOV, S. (1998). Chemical composition of Brazilian propolis from São Paulo State. *Z Naturforsch* 53c:117-119.

MENSOR, L.L., MENEZES, S.F., LEITÃO, G.G., REIS, S.A., DOS SANTOS, C.T., COUBE, S.C., LEITÃO, G.S. (2001). Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytherapy Research*, (15) 127.

NINFALI, P. et al. (2005). Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *British Journal of Nutrition*, Wallingford, v. 93, n. 2, p. 257-66.

PÉREZ-JIMÉNEZ J, SAURA-CALIXTO F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*; 39:791-800.

RUFINO, M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. *Comunicado Técnico*, 2007.

RIO, R.G.W. (1996). Métodos de controle químico de amostras de própolis. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SCALBERT, A. (1992). Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In: HEMINGWAY, R. W.; LAKS, P. E. Plant Polyphenols. New York: *Plenum Press*.

SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C. M. (2007). Antioxidant Phytochemicals in Hazelnut Kernel (*Corylus avellana* L.) and Hazelnut Byproducts. *J. Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 55, n. 4, p. 1212-20

SILVA, B. M. et al. (2004). Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Washington, v. 52, n. 15, p. 4705-12.

SOUZA, C. M. de M. e SILVA, H. R.; Jr-VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C. C.; da COSTA, L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. S. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, H. C. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30 (2), 351-355.

VENNAT, B., GROSS, D., POURRAT, A. E POURRAT, H. (1992). Hamamelis virginiana: identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extrats. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 67: 11-14.



CAPÍTULO 6
ENSAIOS BIOLÓGICOS

6. Ensaios Biológicos

6. 1. Atividade Citotóxica

Letalidade Frente às larvas do microcrustáceo *artemia salina* leach.

6. 1. 1. Introdução

A avaliação biológica de compostos orgânicos geralmente é pouco viável em laboratórios tradicionais de química. A existência de programas de colaboração com biólogos ou farmacólogos auxilia muito neste aspecto.

Surge então a necessidade da realização de ensaios com procedimentos simples e rápido. Na atividade citotóxica avaliada frente às larvas de *Artemia salina* leach, analisa-se a letalidade de organismos simples e monitorara-se sua resposta biológica. No bioensaio existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida, ele é considerado essencial como um teste preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (Colegate, 1993).

Um dos animais que tem sido utilizado nestes bioensaios é uma espécie de crustáceo marinho, *Artemia salina* Leach (larva de camarão de água salgada) utilizado como alimento para peixes. O primeiro trabalho relativo ao uso da *Artemia salina* em bioensaios foi publicado em 1956 (Michael, 1956) e, a partir daí inúmeros artigos tem sido reportados na literatura. A técnica tem a vantagem de apresentar baixo custo, rapidez e não exigir técnicas assépticas (Meyer *et al.*, 1982). O bioensaio é caracterizado por ser uma forma simples de determinar a DL₅₀ (µg/mL) para substâncias puras, extratos brutos e frações (McLaughlin *et al.*, 1995).

Em altas doses as substancias ativas apresentam uma toxicidade, de modo que a letalidade *in vivo* de organismos que possuem uma maior simplicidade na escala zoológica, pode indicar a atividade de substâncias presentes em extratos vegetais.

A literatura relata alguns trabalhos relacionando a toxicidade sobre as larvas de *A. salina* com atividades, tais como: antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasiticida e tripanossomocidas (Siqueira *et al.*, 1998) e também com células cancerosas do tipo P-388 (Meyer *et al.*, 1982).

Segundo McLaughlin, valores de DL₅₀ ≤ 1000 µg/mL são considerados ativos para extratos brutos e < 30 µg/mL, muito ativos para substâncias puras.

Os dados obtidos no bioensaio são facilmente tratados estatisticamente (Cavalcante et al., 2000).

6. 1. 2. Materiais e Reagentes Utilizados

- Larvas de *Artemia salina*;
- Água do mar (coletada na praia de Costa Azul, Rio das Ostras);
- Dicromato de Potássio $K_2Cr_2O_7$ (50,0 mg);
- Dimetilsulfóxido DMSO;
- Água destilada;
- Pipeta automática (100 μ L);
- Pipeta Pasteur;
- Recipiente (10X5X3 cm);
- Balão volumétrico (5,00 mL);
- Tubos de ensaio;
- Luminária.

6. 1. 3. Procedimento Experimental

Na análise foram utilizados 50 mg de cada extrato diluído em um volume de 5 mL no seguinte sistema de solventes: $[H_2O:DMSO (3:2)]$, formando soluções estoque de 10 mg/mL. Em tubos de ensaio foram adicionadas alíquotas de: 50, 100, 200, 300 e 500 μ L as quais foram diluídas com água do mar artificial até atingir um volume final de 5mL. As concentrações finais foram de: 100, 200, 400, 600 e 1000 μ g/mL.

Em cada tubo de ensaio foram adicionadas aproximadamente 15 larvas de *A. salina*. Após 24 horas sob iluminação artificial foi realizada a contagem dos indivíduos vivos e mortos (Figura 173, p. 209). A quantificação dos resultados foi realizada através do programa Finey Probit que permite calcular a (DL_{50}) , isto é, a dose letal para 50% da população de microcrustáceo presente nos tubos nas concentrações acima definidas. Como controle positivo foi utilizado uma solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), nas mesmas concentrações das amostras e como controle negativo foi utilizado a mistura de solventes $H_2O:DMSO (3:2)$ a uma concentração de 100 μ g/mL.



Figura 173. Esquema do experimento realizado para a avaliação da atividade citotóxica

A avaliação da atividade citotóxica, segundo metodologia proposta por McLaughlin, dos extratos de *L. guillemianus* e *C. spruceanum* apresentaram os resultados mostrados na Tabela 25.

6. 1. 4. Resultados e Discussão

Segundo McLaughlin, valores de $DL_{50} \leq 10^3 \mu\text{g/mL}$ são considerados ativos para extratos brutos. Os resultados obtidos na Tabela 25 apontam os extratos de *L. guillemianus* em MeOH/H₂O e MeOH respectivamente como os que apresentaram melhor atividade e os extratos de *C. spruceanum* em MeOH e MeOH/H₂O como mais ativos, respectivamente.

Tabela 25. Valores de DL_{50} dos extratos de *L. guillemianus* e *C. spruceanum*

Espécies	DL_{50}		
	MeOH	MeOH/H ₂ O	AcOEt
<i>L. guillemianus</i>	497.770	111.074	≥ 1000
<i>C. spruceanum</i>	480.109	939.242	-

Estudos indicam que espécies do gênero *Lonchocarpus* apresentam atividade citotóxica contra as larvas de *A. salina*.

Extratos e substâncias isoladas da espécie *L. montanus* apresentaram alta toxicidade no ensaio de letalidade com *A. salina*, os extratos foram: éter de petróleo, CH₂Cl₂ e MeOH as substâncias foram: pongamol, laceolatina B, derriobtusona A e (E)-7-O-metoxipongamol (Magalhães et al., 2007).

Os extratos em éter de petróleo, CH₂Cl₂ e MeOH das cascas das raízes de *L. filipes* mostraram-se fortemente ativos no ensaio de toxicidade sobre *A. salina*, podendo essa atividade ser correlacionada com atividade antitumoral e/ou inseticida (Santos et al., 2009).

6. 2. Atividade Antimicrobiana

6. 2. 1. Introdução

Existem vários estudos sobre a atividade antimicrobiana em extratos vegetais, e uma busca crescente pela descoberta de substâncias antimicrobianas potentes capazes de combater as novas espécies de bactérias que exibem efeitos colaterais e resistência clínica aos antibióticos convencionais. A evolução dessas bactérias é um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Os “Antibióticos Naturais” possuem o potencial de ultrapassarem a resistência antimicrobiana (Ravishankar et al., 2012; Carlos et al., 2010; Park et al., 2009; Caili et al., 2006).

Por apresentarem uma diversidade de constituintes, as plantas medicinais estão entre os produtos naturais de maior interesse científico, pois elas possuem a capacidade de se tornarem fármacos eficazes e por proporcionarem grandes chances de obterem-se moléculas protótipos (Nascimento et al., 2000; Pessini et al., 2003; Duarte et al., 2004; Michelin et al., 2005; Lima et al., 2006).

O consumo excessivo de antibióticos e a subsequente redução do número destes válidos disponíveis é atualmente um grande problema da saúde pública mundial e o maior obstáculo para o sucesso terapêutico (SILVA et al., 2010). Os antimicrobianos vegetais representam uma alternativa eficaz e econômica no combate a microrganismos patogênicos mutantes resistentes (Vargas et al., 2004).

As principais bactérias de interesse em estudos da atividade antimicrobiana são: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, que são responsáveis por diferentes processos patogênicos tanto em pacientes imunocompetentes quanto em paciente imunocomprometidos (Antunes et al., 2006; Catão, 2007; Catão et al., 2010).

✓ O Gênero *Staphylococcus*

Um dos principais agentes responsáveis por infecções hospitalares é a espécie *S. aureus* sendo responsável por 45% das toxinfecções em todo o mundo (Neto et al., 2002). Apesar de estar presente na microbiota normal do corpo humano, o microrganismo é responsável pela causa de infecções superficiais (abscessos cutâneos, infecções de feridas), e até mesmo infecções sistêmicas como bacteremia, endocardite, pneumonia entre outras. (Azulay & Azulay, 1997; Teixeira et al., 2005).

De fácil disseminação é um microrganismo que esta presente não só em ambientes hospitalares como também em locais de circulação humana como barras para as mãos nos ônibus, equipamentos atléticos compartilhados em academias, toalhas compartilhadas após o banho, dentre outros. (Cardoso, 1986; Torres et al., 2007).

A partir da década de 60, o uso constante de penicilinas, como a oxacilina, no tratamento de infecções estafilocócicas, favoreceu o surgimento de cepas resistentes a esses antimicrobianos, essas cepas de *S. aureus* resistentes a oxacilina (ORSA), também apresentavam resistência aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos em detrimento disto essa bactéria é um dos principais agentes causadores de infecção hospitalar desde a década de 70 até os dias atuais (Finan et al., 2001; Sousa et al., 2011).

As doenças provocadas pelo *S. aureus* podem ser decorrentes da invasão direta dos tecidos, de bacteremia primária ou, exclusivamente, ser devidas às toxinas que ele produz. Essas infecções podem se localizar em um ou em múltiplos sítios, e, de acordo com a localização e outras características, recebem diferentes designações, como foliculite (infecção do folículo piloso); sico (bicho-do-pé); carbúnculo; antraz; furúnculos localizados na região cervical posterior; hordéolo (terçol); hidradenite (inflamação das glândulas sudoríparas); e impetigo. Além das piogênicas, o *S. aureus* pode causar outras infecções mesmo durante

um processo infeccioso ou não. Esses diferentes mecanismos e patologias fazem com que o *S. aureus* possua várias características que, por vezes, não são encontradas em todas as cepas desse Gram-positivo, surgindo, entretanto, à medida que nele são identificadas novas e diferentes propriedades patogênicas (Dos Santos et al., 2007).

✓ O gênero *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis é um dos principais agentes responsáveis pelas infecções nosocomiais, como por exemplo, a bacteremia e as infecções associadas a dispositivos médicos, estando comumente associado à resistência à antibioterapia convencional. A bactéria *S. epidermidis* é considerada a espécie mais importante de *Staphylococcus* coagulase-negativos. Uma vez que esta espécie se encontra amplamente distribuída pela superfície do corpo humano (O'Gara and Humphreys, 2001).

A patogenicidade das infecções causadas por *S. epidermidis* está associada à capacidade desta espécie em colonizar as superfícies dos dispositivos médicos, produzindo biofilme (Mack et al., 2004).

6. 2. 2. Materiais e Reagentes Utilizados

- Placas de Petri;
- Alça de Platina;
- Capela de Fluxo laminar;
- Densitômetro, Densimat, Biomérieux D.O. 550nm;
- Estufa bacteriológica;
- Paquímetro;
- Swab;
- Tubos de ensaio;
- Cloreto de Sódio, 90%, Vetec;
- Ágar Muller-Hinton, Acumedia, Índia;
- Gentamicina, Sigma-Aldrich, (EUA).

6. 2. 3. Procedimento Experimental

Segundo Macrae e colaboradores (1998) existe uma correlação entre atividade citotóxica frente a *A. salina* e a atividade antimicrobiana.

As amostras testadas no ensaio biológico foram os extratos brutos *L. guilleminianus*: Extrato (4) em MeOH/H₂O e *C. spruceanum*: Extrato (5) em MeOH/H₂O.

Uma partição líquido-líquido, foi realizada com o extrato em MeOH/H₂O das duas espécies de plantas. Frações obtidas desta partição foram testadas e codificadas como (LGH) fração em H₂O, (LGB) fração em BuOH de *L. guilleminianu* (PMH) fração em H₂O, (PMB) fração em BuOH de *C. spruceanum* (Figura 174), e a substância 2,3-(S)-hexaidroxidifenoil-d-glicose isolada do extrato em MeOH/H₂O de *L. guilleminianus* (LG-12) também foi testada. O isolamento da substância esta descrito nas páginas 47 e 48 do capítulo 4.

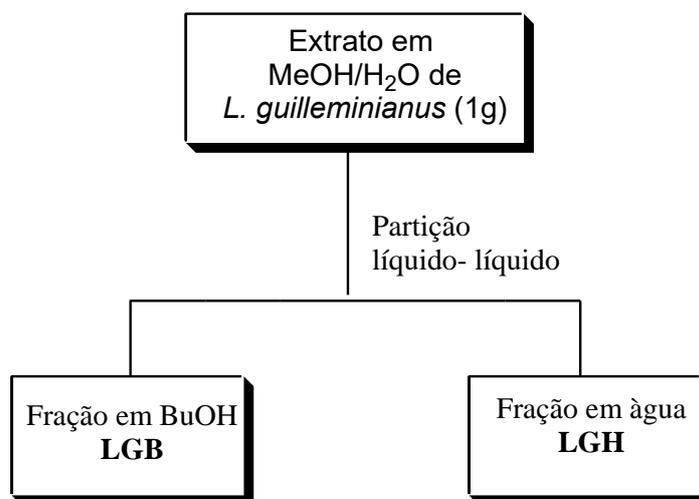


Figura 174. Fluxogramas da partição realizada com os extratos em MeOH/H₂O de *L. guilleminianus* e *C. spruceanum*

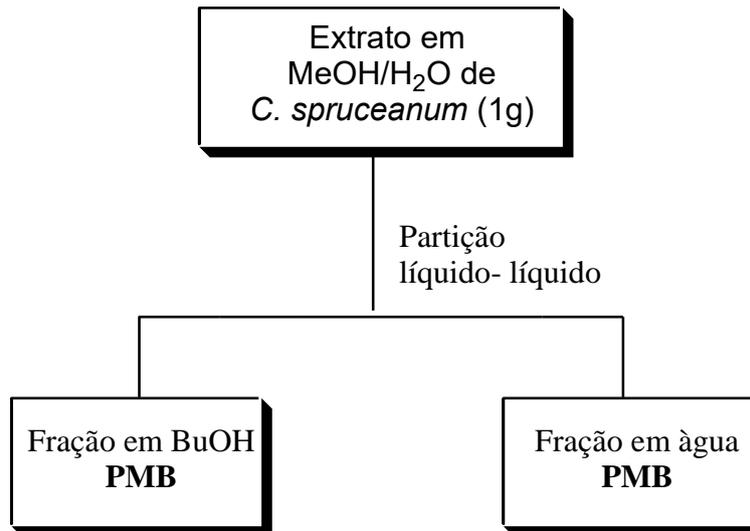


Figura 174. Continuação

Todas as amostras foram solubilizadas em DMSO estéril na concentração de 15000 ppm. (estoque em temperatura ambiente), em seguida foram realizadas diluições em água estéril, concentração final de 5000 ppm.

As amostras microbianas são patrimônio biológico do Laboratório de Sanidade Animal integrantes da bacterioteca e micoteca do Prof. Olney Vieira da Motta.

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram a bactéria *S. epidermidis* ATCC 12228, três cepas de *S. aureus*: cepa-padrão ATCC 25923, ATCC 33591 que é uma cepa de *S. aureus* resistente a metilina (MRSA, Multiple-resistant *Staphylococcus aureus*). A metilina é um antibiótico usado para tratar a *S. Aureus*. As MRSA são resistentes à metilina e normalmente a outros antibióticos frequentemente utilizados para tratar infecções provocadas pela *S. Aureus*. Uma cepa clínica LSA 88 que foi isolada pelo LSA/UENF de leite de vaca com mastite subclínicas, em rebanho da região Norte Fluminense, *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 e *Escherichia coli* ATCC 17759 também foram usadas. Conforme descrito na Tabela 26.

Tabela 26. Microrganismos utilizados no Ensaio Biológico

Microrganismo	Grupo	Cepa	Procedência
<i>S. aureus</i>	Gram-positiva	ATCC 25923	Fundação Oswaldo Cruz Fio- Cruz, RJ.
<i>S. aureus</i>	Gram-positiva	ATCC 33591	Fundação Oswaldo Cruz Fio- Cruz, RJ.
<i>S. aureus</i>	Gram-positiva	LSA 88	Cepa Clínica (isolada de mastite bovina)
<i>S. epidermidis</i>	Gram-positiva	ATCC 12228	Fundação Oswaldo Cruz Fio- Cruz, RJ.
<i>B. cepacia</i>	Gram-negativa	ATCC 25416	Fundação Oswaldo Cruz Fio- Cruz, RJ.
<i>E. coli</i>	Gram-negativa	ATCC 17759	Fundação Oswaldo Cruz Fio- Cruz, RJ.

A avaliação do potencial antibacteriano dos extratos e partições foi realizada através do método que tem apresentado resultados satisfatórios, de contagem de colônias de bactérias e de leveduras, que está sendo utilizada na rotina de laboratório. Foi utilizada a metodologia (modificada) da diluição em meio líquido (Lemos, 1997).

As cepas dos microrganismos foram cultivadas em ágar estoque (BHA-Brain Heart agar, Himedia, Índia), previamente reativadas em tubos de ensaio contendo caldo BHI (Himedia, Índia) e levadas à estufa de crescimento bacteriológico (Quimis) a 37°C por 24 horas. A concentração inicial de cada inóculo foi obtida através da transferência de colônias ativas para caldo BHI estéril até atingir uma turbidez equivalente a uma concentração de 0,5

MacFarland em fotômetro Densimat®, bioMérieux, França com o comprimento de onda 550 nm (Araújo et al., 2004).

Os extratos e substâncias puras foram solubilizados em DMSO P.A. As concentrações foram definidas realizando-se testes para verificação da inibição do extrato em relação aos microrganismos.

Para a realização do teste posteriormente, 10 µL da amostra diluída foi adicionada a 170 µL do meio Müller Highton (MH) líquido (Acumedia, Índia) em tubos do tipo *ependorfs* (2,0 mL), juntamente com um volume de 20 µL de suspensão da bactéria utilizada, padronizada pela turvação equivalente a 0,5 da escala de MacFarland (inóculo). Após a incubação, os tubos foram colocados em estufa de crescimento bacteriano a 37°C por 6 horas, uma alíquota de 50 µL do conteúdo de cada tubo foi semeada, com auxílio de swab, em placas de Petri contendo meio MH sólificado (Acumedia, Índia). Após o período de incubação das placas (em estufa de crescimento bacteriológico a 37°C por 24 horas), foi identificada a presença ou não de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias) obtidas em cada experimento, com subsequente comparação com o controle, (o procedimento experimental esta representado na Figura 175, p. 217).

Os controles foram preparados de maneira semelhante aos extratos e substâncias puras, sendo que são adicionados 170 µL de meio MH líquido e 20 µL de inóculo, 10 µL do antibiótico gentamicina na concentração de 200 µg/mL como controle positivo, e 170 µL de meio MH líquido e 20 µL de inóculo, como controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicatas (Lemos, 1997).

Observou-se que mudando a metodologia descrita utilizando uma menor quantidade do inóculo obtivemos melhores resultados frente às bactérias: *S. aureus*, então no procedimento modificado utilizou-se 180 µL do meio de cultura, 10 µL do inóculo e 10 µL do extrato e um tratamento controle com 190 uL de meio de cultura e 10 uL de inóculo.



Figura 175. Esquema do experimento realizado para a avaliação da atividade antibacteriana

Os antibiogramas foram realizados após a incubação das cepas com as amostras. Colônias puras de cada cepa (que apresentou resultados positivos nos testes realizados anteriormente) foram cultivadas em placas de agar Muller Hinton, para a difusão dos discos contendo os antibióticos a serem testados. O halo formado em torno de cada disco foi medido e o experimento foi realizado em triplicata. Os discos continham os seguintes fármacos:

amoxicilina (AMO, 10 µg), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC, 30 µg), clindamicina (CLIN- 2 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), penicilina G (PEN, 10 U), vancomicina (VAN, 30 µg), cefalexina (CEF, 30 µg), tetraciclina (TET, 30 µg), oxacilina (OXA, 1 µg) (Laborclin, PR, Brazil).

6. 2. 4. Resultados e Discussão

É importante ressaltar que pelo melhor do nosso conhecimento, esse é o primeiro relato de atividade antibacteriana com o extrato bruto e frações de *C. spruceanum* e extrato bruto, frações e substância isolada de *L. guilleminianus*.

A análise foi feita de acordo com os seguintes parâmetros: a ausência de crescimento no ágar correspondeu ao não crescimento de nenhuma unidade formadora de colônia (UFC), a presença de crescimento aparente com a formação entre 30 e 300 UFC, correspondente a concentração mínima inibitória (CMI), e a presença de um número superior a 300 UFC, com aspecto de confluência de colônia, foi considerado como ausência de atividade.

O extrato MeOH/H₂O (8:2) de *L. guilleminianus* (extrato 4), a fração aquosa (LGH), butanólica (LGB) e a substância isolada 2,3-(S)-hexaidroxidifenoil-D-glicose (LG-12) quando submetidos ao teste em meio líquido e difusão em ágar promoveram a inibição do crescimento das cepas de *S. epidermidis* ATCC 12228 apresentando uma inibição aparente.

Controles negativos apresentaram crescimento confluyente, enquanto os tratamentos apresentaram contagens de UFC inferiores a 300 e acima de 30.

Valores significativos ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, valores comparativos das médias do número de colônias entre os tratamentos estão descritos na Tabela 27.

Tabela 27. Média do número de colônias da cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 tratadas com o extrato 4, as frações LGB, LGH e a substância 2,3-(S)-hexaidroxidifenoil-D-glicose (LG-12)

<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	
Tratamentos	Número médio de colônias
LG-12 (substância isolada)	47.55 B
LGB (fração em BuOH)	62.78 B
LGH (fração aquosa)	76.11 B
Ext.4 (extrato bruto em MeOH/H ₂ O)	150.66 A

Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si no teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Da mesma forma observou-se que, a substância isolada do extrato MeOH/H₂O de *L. guilleminianus* a 2,3-(S)-hexaidroxidifenoil-D-glicose (LG-12) também promoveu a inibição no crescimento das cepas de *S. aureus* ATCC 33591. Valores comparativos das médias dos números de colônias entre as duas cepas ATCC 33591 e ATCC 12228 quando tratadas com a substância LG-12 estão descritos na Tabela 28.

Tabela 28. Média do número de colônias das cepas *S. aureus* ATCC 33591 e *S. epidermidis* ATCC 12228 tratadas com a substância 2,3-(S)-hexaidroxidifenoil-D-glicose (LG-12).

Substância LG-12	
<i>S. aureus</i> ATCC 33591	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228
Número médio de colônias LG-12	
58,77 A	47,55 A

Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na linha (tratamento) não diferem estatisticamente entre si no teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Nas Figuras 176 a 179, p. 220 e 221 estão apresentadas a atividade do controle negativo, o controle positivo e as atividades dos tratamentos **LG-12**, **LGH**, **LGB** e o **extrato 4** contra a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228. No controle negativo o crescimento bacteriano observado foi confluyente, no controle positivo (antibiótico gentamicina) o crescimento bacteriano foi totalmente inibido (não houve UFC na placa de Petri) e nos tratamentos observou-se inibição significativa no crescimento das bactérias, crescimento bacteriano aparente.

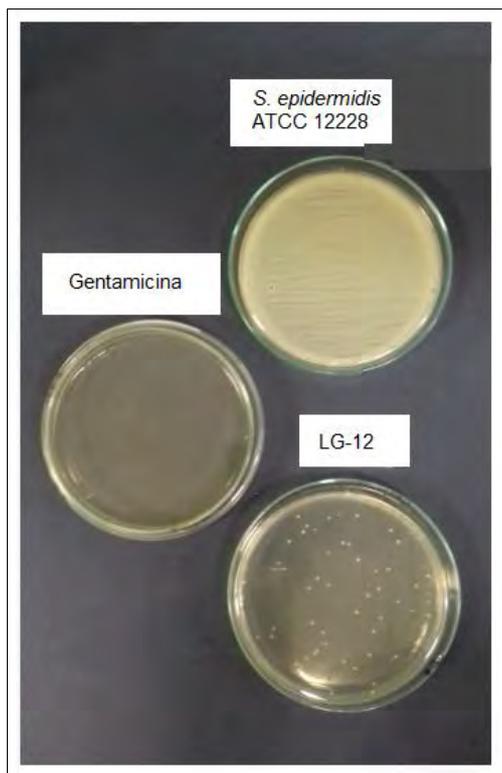


Figura 176. Experimento realizado com a substância **LG-12** frente à bactéria *S.epidermidis* ATCC 12228

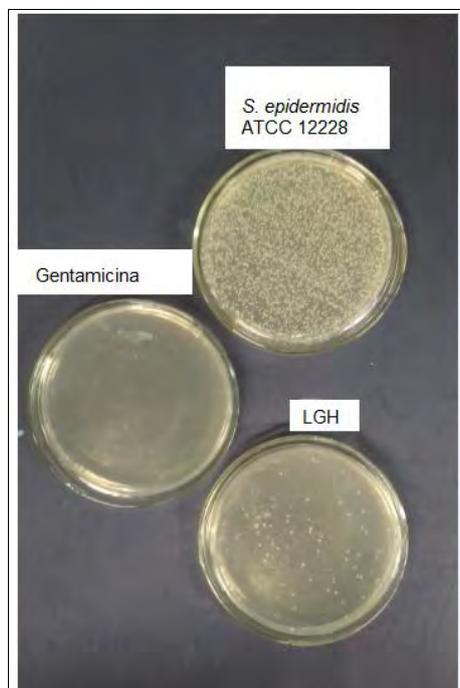


Figura 177. Experimento realizado com a fração **LGH** frente à bactéria *S.epidermidis* ATCC 12228

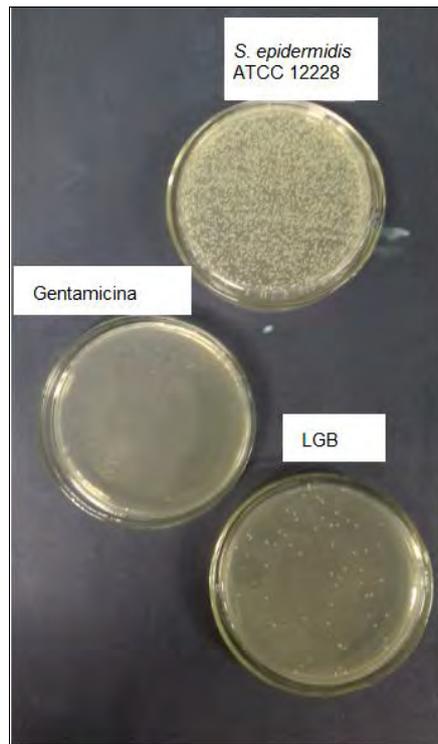


Figura 178. Experimento realizado com a fração **LGB** frente à bactéria *S.epidermidis* ATCC 12228

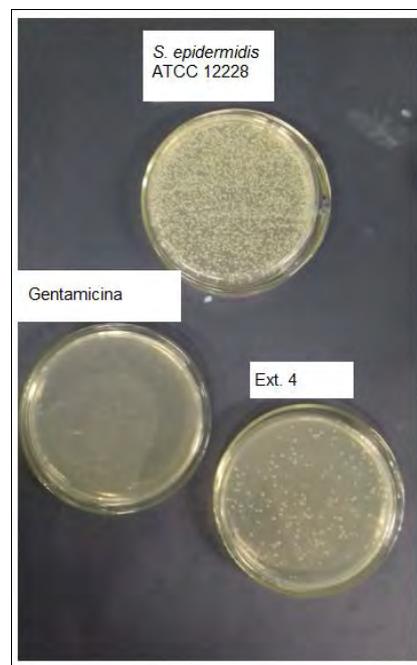


Figura 179. Experimento realizado com o **extrato 4** frente à bactéria *S.epidermidis* ATCC 12228

No experimento realizado com *S. aureus* ATCC 33591 tratada com a substância LG-12 (Figura 180), observou-se o crescimento menor de UFCs que no controle negativo, sugerindo uma significativa atividade antibacteriana

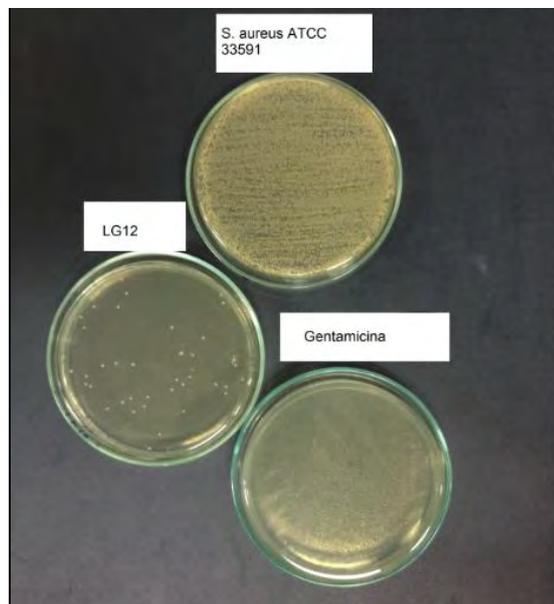


Figura 180. Experimento realizado com a substância **LG-12** frente à bactéria *S. aureus* ATCC 33591

Quando o extrato 4 (extrato em MeO/ H₂O de *L. guillemerianus*), as frações LGH e LGB foram testadas contra as cepas das bactérias *S. aureus* ATCC 25923 (Figuras 181, 182 e 183, p. 223 e 224) e *S. aureus* ATCC 33591 (Figuras 184, 185 e 186, p. 224 e 225) observou-se que apesar de inibir algumas colônias de bactérias, essa inibição se manifestou em número superior a 300 UFC, com aspecto de confluência de colônia.



Figura 181. Experimento realizado com a fração em água **LGH** de *L. guilleminianus* frente à bactéria *S. aureus* ATCC 25923



Figura 182. Experimento realizado com a fração em BuOH **LGB** de *L. guilleminianus* frente à bactéria *S. aureus* ATCC 25923

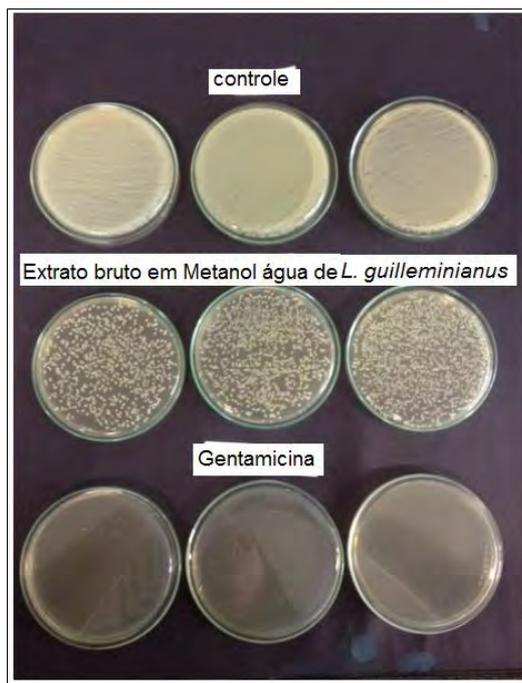


Figura 183. Experimento realizado com o **extrato 4** de *L. guilleminianus* frente à bactéria *S. aureus* ATCC 25923

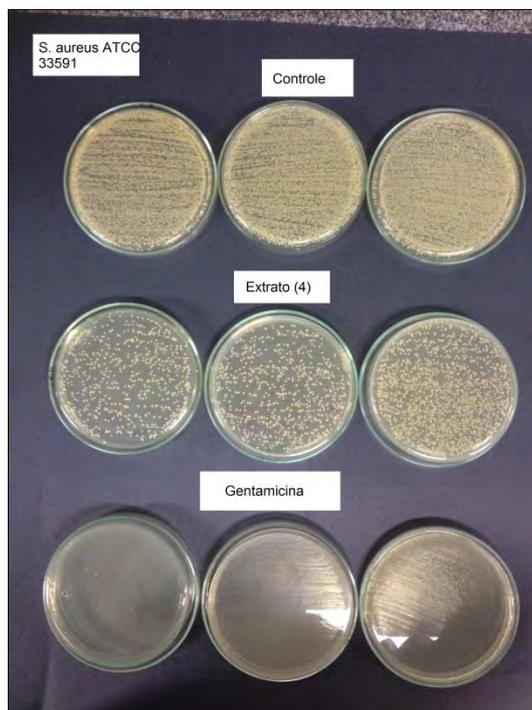


Figura 184. Experimento realizado com o **extrato 4** de *L. guilleminianus* frente à bactéria *S. aureus* ATCC 33591

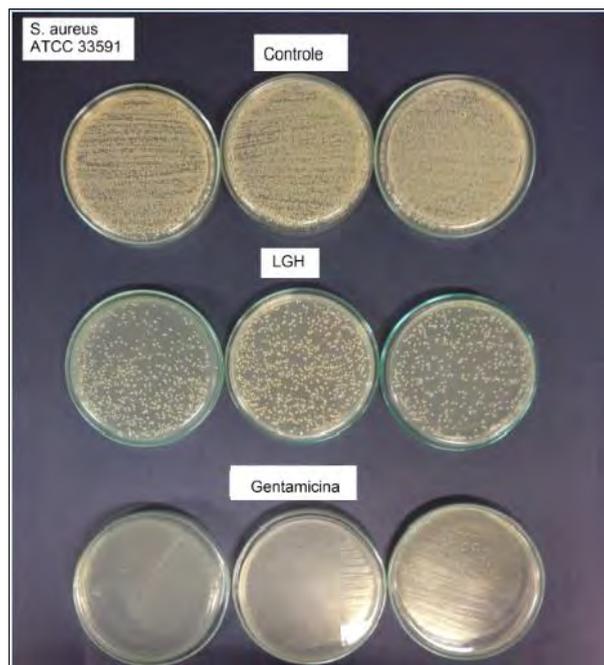


Figura 185. Experimento realizado com a fração em H₂O **LGH** de *L. guilleminianus* frente à bactéria *S. aureus* ATCC 33591

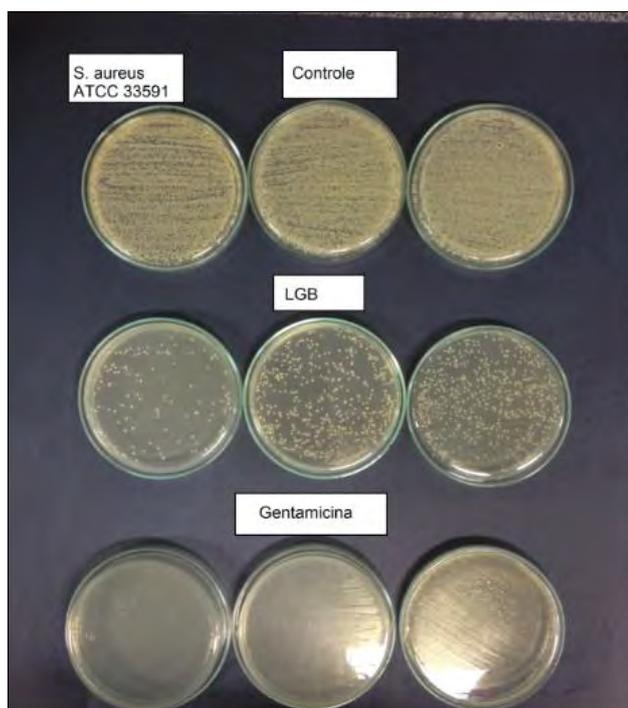


Figura 186. Experimento realizado com a fração em H₂O **LGB** de *L. guilleminianus* frente à bactéria *S. aureus* ATCC 33591

No Extrato **5** (extrato em MeOH/ H₂O) e nas frações **PMH** (fração em H₂O) e **PMB** (fração em BuOH) oriundas da espécie *C. spruceanum* o crescimento bacteriano foi semelhante ao do controle negativo, onde não ocorreu inibição no crescimento das cepas analisadas. Assim como não houve uma ação antibacteriana quando as amostras foram analisadas frente às cepas testadas. O resumo dos resultados obtidos pode ser observado na Tabela 29 e Figura 187.

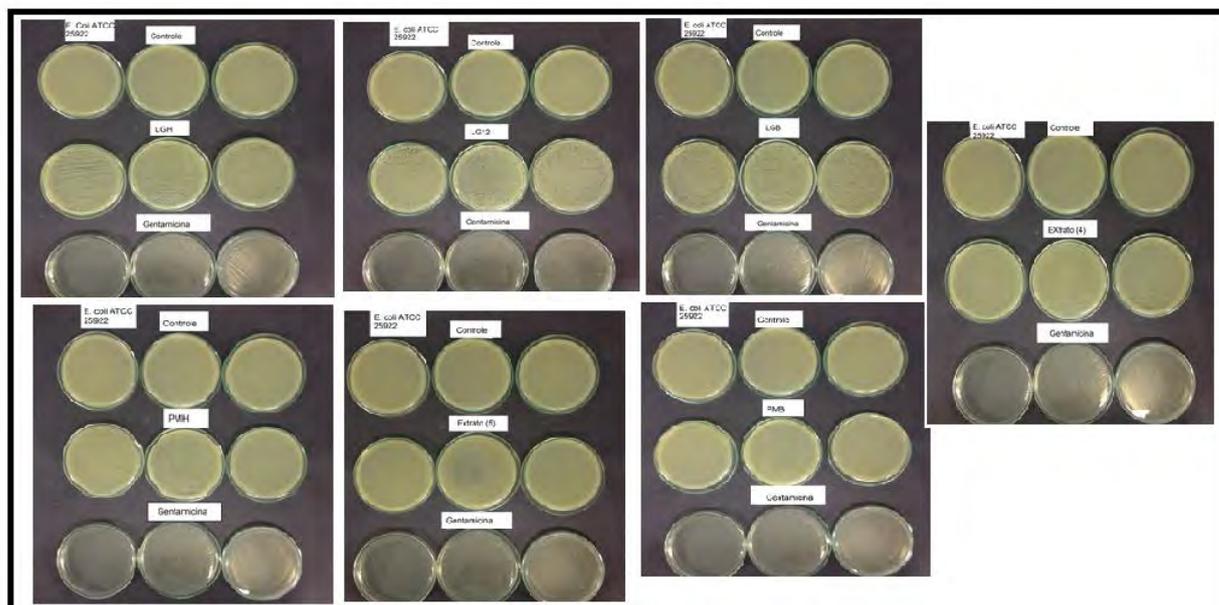


Figura 187. Experimentos realizados com as frações em H₂O e BuOH (LGH), (LGB), (PMH), (PMB) de *L. guilleminianus* e *C. spruceanum*, os extratos 4 e 5 e a substância (LG-12) frente à bactéria *E. coli*.

Tabela 29. Resumo dos resultados obtidos da Avaliação da Atividade Antibacteriana das diferentes frações testadas contra diferentes espécies bacterianas.

Microrganismos	Amostras						
	LGH	LGB	PMH	PMB	LG-12	Ext.4	Ext.5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 33591	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. aureus</i> LSA 88	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	+	+	-	-	+	+	-
<i>B. cepacia</i> ATCC 25416	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 17759	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: - UFC > 300, + UFC < 300

Posteriormente aos testes, foram realizados antibiogramas para comprovação da atividade.

Os antibiogramas foram realizados com a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 e as frações e substância isolada que apresentaram atividade e a cepa *S. aureus* ATCC 33591 e a substância LG-12, juntamente com os discos de antibióticos.

O antibiograma realizado com a LG-12 e a cepa *S. aureus* ATCC 33591 mostrou um diâmetro no halo de inibição significativamente maior que o do respectivo controle, entre sete dos dez antibióticos testados, sugerindo-se que houve sinergismo. Apenas os antibióticos, vancomicina (VAN), cefalexina (CEF) e clindamicina (CLIN) não alteraram a atividade do fármaco (Tabela 30, p. 229), vale ressaltar que com o antibiótico oxacilina (OXA), a cepa mostrou-se

resistente no controle (halo de inibição igual a zero) e no tratamento (LG-12) houve halo de inibição.

Comparando os resultados entre os antibióticos nas colunas da Tabela 30 a amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), gentamicina (GEN) e vancomicina (VAN) foram os que obtiveram um melhor efeito, uma melhor interação com o tratamento frente à cepa de *S. aureus* ATCC 33591.

Os resultados dos antibiogramas da cepa *S. aureus* ATCC 33591 tratadas com a substância (LG-12) são mostrados na Tabela 30 e Figura 188.

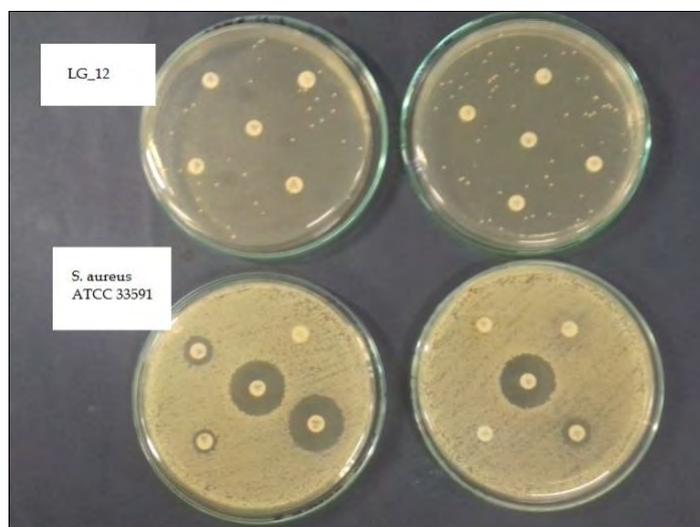


Figura 188. Antibiograma realizado com a **LG-12** frente à cepa de *S. aureus* ATCC 33591.

Tabela 30. Antibiograma da cepa *S. aureus* ATCC 33591, tratado com a substância 2,3-(S)-hexaidroxidifenoil-D-glicose (LG-12) e dez antibióticos, avaliada por método da difusão em ágar (diâmetro do halo medido em mm).

<i>S. aureus</i> ATCC 33591		
Antibióticos	Controle	Tratamento (LG-12)
AMO	9,09 Bb	22,32 Aa
AMC	20,77Ba	29,68 Aa
AMP	12,89 Bab	22,62 Aa
CLIN	0,00 Ac	6,79 Ab
GENT	21,92 Ba	27,49 Aa
PEN	0,00 Bc	16,96 Aab
VAN	21,12 Aa	28,61 Aa
CEF	7,50 Ab	17,56 Aa
TET	0,00 Bc	17,86 Aab
OXA	0,00 Bc	15,79 Aab

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna (tratamento) e letras maiúsculas na linha (antibiótico) não diferem estatisticamente entre si no teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O resultado dos antibiogramas realizados com a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 tratados com o extrato 4, as frações (LGH), (LGB) e a substância (LG-12) podem ser observados na Tabela 31, p. 233 Figuras 189 a 192, p. 230 a 232. Os resultados demonstram a interação que ocorre entre os antibióticos e os tratamentos, conforme o tamanho do diâmetro formado no halo de inibição.

O diâmetro dos halos dos tratamentos (LGH) e o extrato 4, não apresentaram alteração significativa quando comparados com o controle, o que sugere que não houve interação entre os antibióticos testados e os tratamentos os resultados não se diferem estatisticamente.

Em contrapartida análises observadas no tratamento LGB demonstraram interação com os antibióticos amoxicilina (AMO) e clindamicina (CLI) e no tratamento LG-12 com os antibióticos amoxicilina (AMO), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), ampicilina (AMP), gentamicina (GEN), penicilina (PEN), vancomicina (VAN) e clindamicina (CLIN), com o aumento da zona de inibição, sugerindo um efeito sinérgico para a substância isolada LG-12 e a fração butanólica LGB com os respectivos antibióticos.

Comparando os resultados entre os antibióticos (coluna da Tabela 31), a cefalexina (CEF) e a clindamicina (CLIN) evidenciaram maior atividade do que os outros antibióticos testados contra a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228.

Observou-se também uma considerável interação da tetraciclina (TET) com as frações LGB, LGH e a substância LG-12. Ao analisarmos a linha da tabela, nos três casos descritos acima houve uma mudança no halo de inibição dos controles (halo de inibição igual à zero), para os tratamentos (halo de inibição diferente de zero).

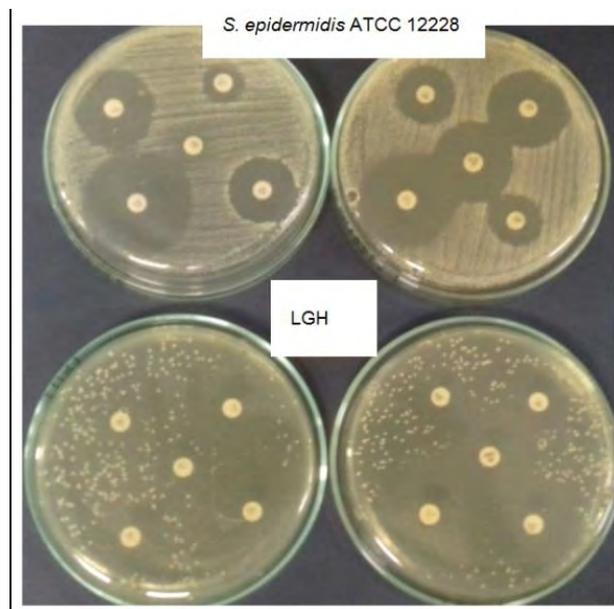


Figura 189. Antibiograma realizado com a fração **LGH** frente à cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228

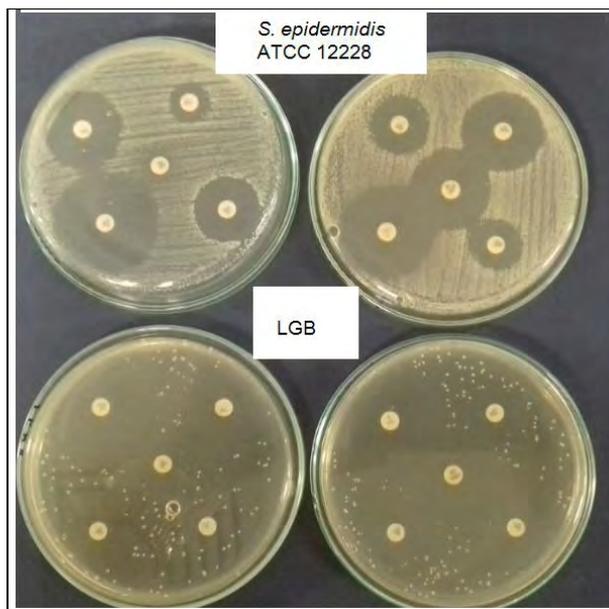


Figura 190. Antibiograma realizado com a fração **LGB** frente à cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228

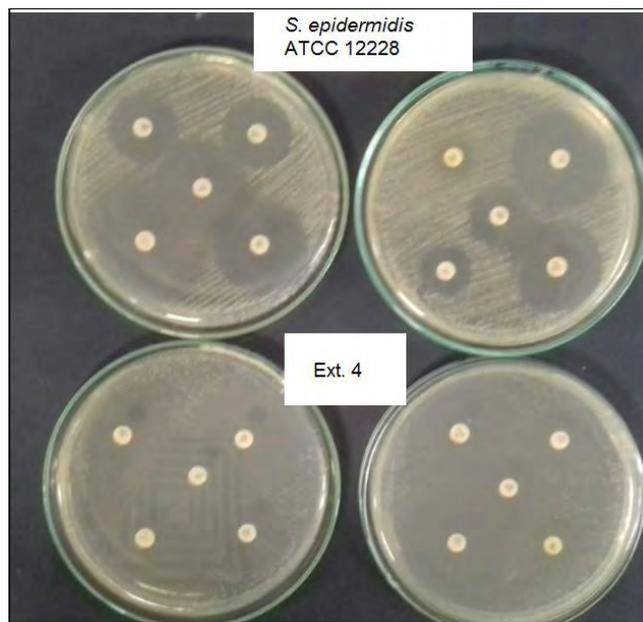


Figura 191. Antibiograma realizado com o **extrato 4** frente à cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228

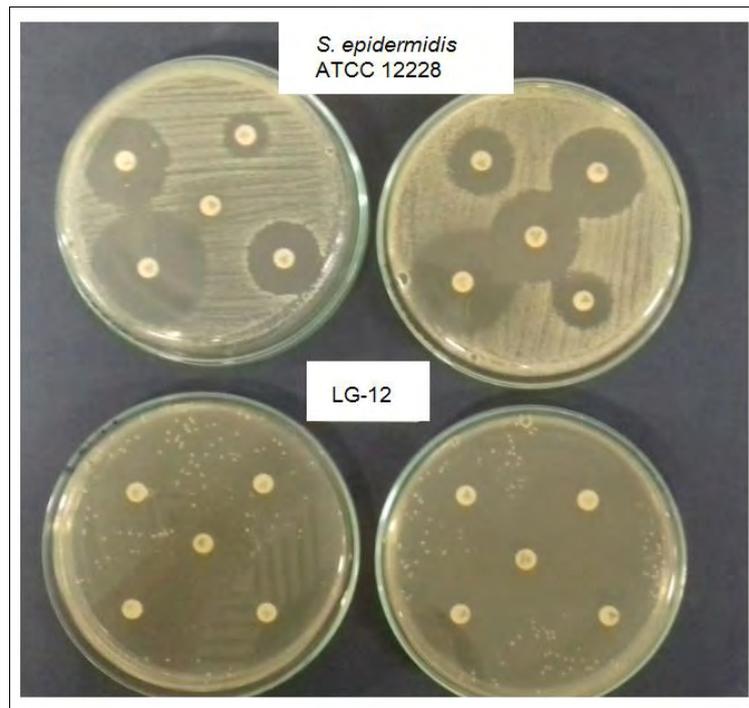


Figura 192. Antibiograma realizado com a **LG-12** frente à cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228

Tabela 31. Antibiograma da cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, tratado com a fração aquosa (LGH) a fração butanólica (LGB), a substância (LG-12) e o extrato em MeOH/H₂O (Ext.4) e dez antibióticos, avaliada por método da difusão em ágar (diâmetro do halo medido em mm).

<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228								
Antibióticos	Cont.	Trat.(LGH)	Cont.	Trat. (LGB)	Cont.	Trat. (LG-12)	Cont.	Trat.(Ext.4)
AMO	18,25 Ade	18,66 Abc	18,25 Bde	22,66 A abc	18,25 Bde	25,40 Aab	18,25 Ade	20,32 Acde
AMC	31,85 Aab	32,31 Aab	31,85 Aab	32,64 Aab	31,85 Bab	36,96 Aab	31,85 Aab	28,48 Aabc
AMP	20,67 Ade	20,01 Aabc	20,67 Ade	23,34 Aabc	20,67 Bde	26,94 Aab	20,67 Ade	16,19 Ade
CLIN	32,03 Aab	34,53 Aab	32,03 Bab	40,53 Aa	32,03 Aab	39,10 Aa	32,03 Aab	34,41Aa
GEN	29,93 Aabc	30,35 Aab	29,93 Aabc	33,7 Aab	29,93 Babc	36,93 Aab	29,93 Aabc	31,16 Aab
PEN	15,90 Ae	13,83 Ac	15,90 Ae	18,50 Abc	15,90 Be	20,50 Ab	15,90 Ae	12,93 Be
VAN	23,40 Acd	23,55 Aabc	23,40 Acd	25,01 Aabc	23,40 Bcd	27,93 Aab	23,40 Acd	22,83 Abcd
CEF	36,38 Aa	35,54 Aa	36,38 Aa	37,02 Aab	36,38 Aa	36,63 Aab	36,38 Aa	36,87 Aa
TET	0,00 Af	3,74 Ad	0,00 Af	12,04 Ac	0,00 Af	9,72 Ac	0,00 Af	0,00 Af
OXA	28,55 Abc	25,41 Aabc	28,55 Abc	29,56 Aab	28,55 Abc	28,88 Aab	28,55 Abc	28,88 Aabc

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna (antibióticos) e letras maiúsculas na linha (tratamentos) não diferem estatisticamente entre si no teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As Tabelas 32a e 32b mostram que a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, permaneceu menos sensível ao tratamento (LG-12) e aos antibióticos.

A cepa *S. aureus* ATCC 33591 mostrou sensibilidade quando tratadas com o tratamento (LG-12) e os seguintes antibióticos: amoxicilina (AMC), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), ampicilina (AMP), penicilina (PEN) e vancomicina (VAN).

Sugerindo então que a cepa *S. aureus* ATCC 33591 obteve uma melhor resposta ao tratamento utilizando-se os antibióticos e a substância isolada LG-12.

Tabela 32a. Comparação da inibição entra as cepas *S. aureus* (ATCC 33591) e *S. epidermidis* (ATCC 12228), tratadas com a substância LG-12 e submetidos a cinco antibióticos, avaliados por método da difusão em ágar (diâmetro do halo medido em mm).

Antibióticos	AMO		AMC		AMP		CLIN		GEN	
	Cont.	Trat.								
ATCC 33591	9,09Bb	22,32Ab	20,77Bb	29,68Aa	12,89Ba	22,62Ab	0,00Bb	6,79Bb	21,92Bb	27,49Bb
ATCC 12228	18,25Aa	25,40Aa	31,85Aa	36,96Aa	20,67Aa	26,94Aa	32,03Aa	39,10Aa	29,93Aa	36,93Aa

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna (cepas) e letras maiúsculas na linha (tratamento) não diferem estatisticamente entre si no teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 32b. Comparação da inibição entra as cepas *S. aureus* (ATCC 33591) e *S. epidermidis* (ATCC 12228), tratadas com a substância LG-12 e submetidos a cinco antibióticos, avaliados por método da difusão em ágar (diâmetro do halo medido em mm).

Antibióticos	PEN		VAN		CEF		TET		OXA	
	Cont.	Trat.	Cont.	Trat.	Cont.	Trat.	Cont.	Trat.	Cont.	Trat.
ATCC 33591	0,00Bb	16,96Aa	21,12Bb	28,61Aa	7,50Bb	17,56Bb	0,00Aa	17,86Aa	0,00Bb	15,79Bb
ATCC 12228	15,90Aa	20,50Aa	23,40Aa	27,93Aa	36,38Aa	36,63Aa	0,00Aa	9,72Aa	28,55Aa	28,88Aa

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna (cepas) e letras maiúsculas na linha (tratamento) não diferem estatisticamente entre si no teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Quase todas as cepas de *S. aureus* são resistentes a penicilina, (Carlos et al., 2010) no presente estudo a cepa ATCC 33591 após o tratamento com LG-12 tornou o fármaco mais eficiente quando comparado com o controle.

De acordo com a literatura substâncias isoladas de espécies do gênero *Lonchocarpus* apresentaram atividade antimicrobiana frente a cepas da bactéria *S. aureus*, como por exemplo, os extratos em éter de petróleo, CH_2Cl_2 e MeOH e as substâncias isoladas da espécie *L. montanus*: pongamol, lanceolatina B, isolonchocarpina, derriobtusona A e medicarpina (Figura 193) foram ativas nos ensaios de bioautografia contra *S. aureus* (Magalhães et al., 2007).

Assim como a substância derriobtusona A isolada da espécie *L. obtusus* mostrou potencial atividade antibacteriana contra *S. aureus* e sua capacidade para inibir formação de biofilme (Vasconcelos et al., 2014).

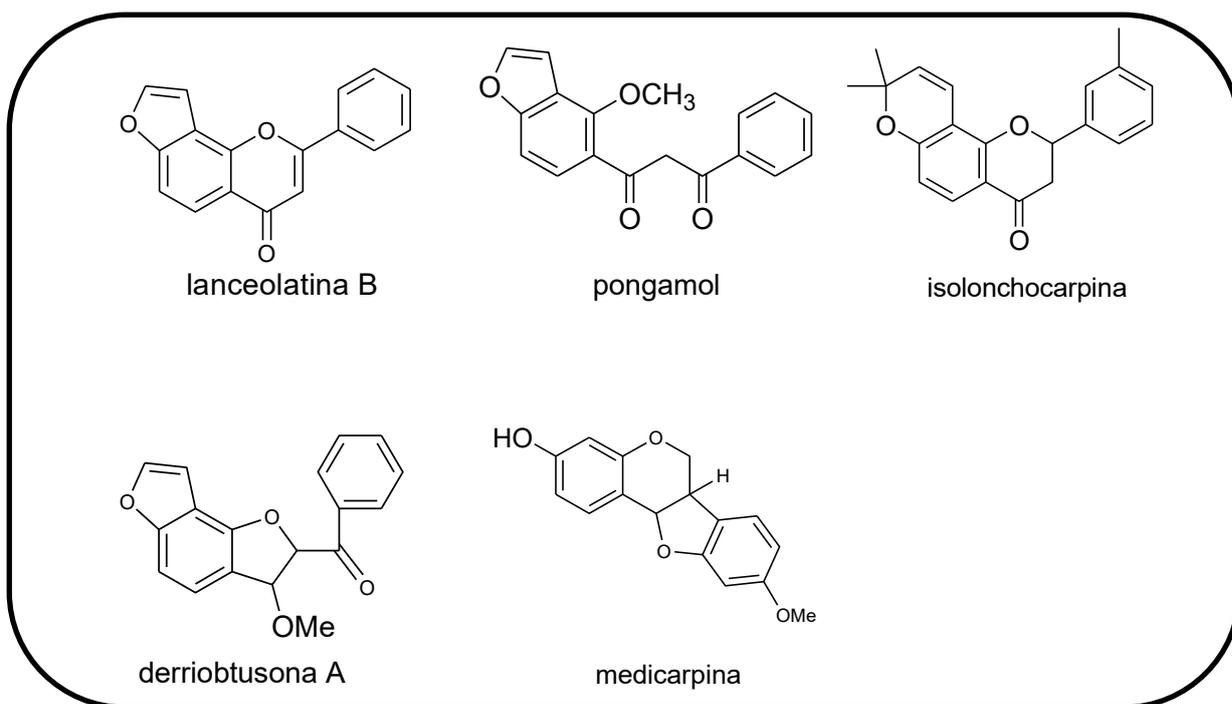


Figura 193. Substâncias isoladas do gênero *Lonchocarpus* com potencial atividade antibacteriana contra *S. aureus*

As substâncias isoladas de espécies de *Lonchocarpus* que demonstraram atividade antibacteriana frente à cepa *S. aureus*, foram da classe dos flavonoides, uma flavona, uma chalcona, uma flavanona, uma aurona e um pterocarpano.

O presente trabalho sugere para a substância (LG-12) 2,3-(S) hexaidrodifenoil-D- glicose (Figura 194) atividade antibacteriana frente a bactérias *S. aureus* ATCC 33591 e *S. epidermidis*.

A substância (LG-12) foi isolada do extrato em MeOH/H₂O de *L. guilleminianus* e é um tanino hidrolisável.

Os taninos hidrolisáveis são formados por ésteres de glicose (ou de outros açúcares) e de ácidos fenólicos: ácido gálico (taninos gálicos) ou ácidos hexaidroxidifênicos e seus derivados (taninos elágicos). É caracterizado por um poliol central (β -D-glicose) cujas funções hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico.

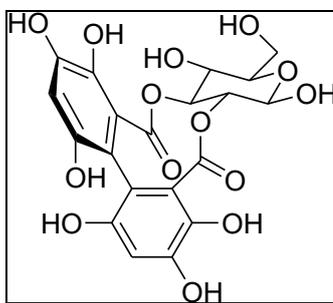


Figura 194. Estrutura do 2,3-(S) hexaidrodifenoil-D- glicose (LG-12)

Substâncias do metabolismo secundário vegetal ou metabolismo especial apresentam um amplo valor nas interações entre a planta e seu ecossistema exercendo, por exemplo, a função de fagoinibidores (substância que desestimula o uso de alimento por predador sem causar dano a este) contra herbívoros ou como agentes antimicrobianos (Sant'ana et al., 2002). Dentre os metabólitos secundários, os taninos são substâncias fenólicas de grande importância econômica e ecológica. Apresentam solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcaloides (Mello et al., 2001). Os taninos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glucoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante (Bruneton, 1991). A ligação entre taninos e proteínas ocorre, através de pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas, emprestando uma duradoura estabilidade a esses complexos.

As aplicações de drogas com taninos estão relacionadas, principalmente, a essa propriedade que os taninos possuem. Por via interna exercem efeito anti-diarréico e anti-séptico; por via externa impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas subjacentes (Bruneton et al., 1991). Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico, eles são hemostáticos e, como precipitam alcalóides, pode servir de antídoto em casos de intoxicações (Bruneton et al., 1991). Os taninos também auxiliam em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, auxiliando no processo curativo, podendo o mesmo ocorrer naturalmente (Mello et al., 2001).

Os taninos possuem propriedades antimicrobianas conhecidas e relatadas. Moléculas de taninos estão sendo testadas com a intenção de se descobrir uma droga eficiente no combate ao vírus HIV (Chung et al., 1998; Kilkuskie et al., 1992). Kilkuskie e colaboradores observaram que taninos hidrolisáveis caracterizados por um núcleo (glicose) esterificado com ácidos gálicos os “galotaninos” mostraram atividade inibitória somente em concentrações tóxicas, elagitaninos e taninos condensados que são polímeros da flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol, derivados do metabolismo de fenilpropanoides inibiram fracamente a replicação viral e os taninos complexos mostraram potente atividade contra a replicação do HIV. Avaliaram que a atividade anti-HIV exibida por taninos é devida à inibição da transcriptase reversa, dificultando assim a replicação viral. Além disso uma série de bactérias são sensíveis aos taninos, dentre elas *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* e, em concentrações mínimas (0,5 g/L), o fungo *Fomes annosus* teve seu crescimento inibido (Castro et al., 1999).

6. 3. Referências bibliográficas

ANTUNES, R. M. P., LIMA, E. O., PEREIRA, M. S. V., CÂMARA, C. A., ARRUDA, T. A., CATÃO, R. M. R., BARBOSA, T. P., NUNES, X. P., DIAS, C. S., SILVA, T. M. S. (2006) Atividade antimicrobiana “*in vitro*” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Revista Brasileira Farmacognosia*. 16(4): 517-24.

ARAÚJO, R., RODRIGUES, A.G., PINA-VAZ, C. (2004) A fast, practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an *Aspergillus* suspension. *Journal of Medical Microbiology*. 53:783-786.

AZULAY, R. D., AZULAY, D. R. (1997). *Piodermites, outras infecções bacterianas da pele e rickettsioses*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

BRUNETON, J. (1991). *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*, Ed. Acribia, SA: Espanha.

CAILI, F., HUAN, S., QUANHONG, L. (2006) A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. *Plant Foods for Human Nutrition*. 61: 73-80.

CARDOSO, C. L. (1986). *Estudo da Flora Bacteriana das Mãos de Grupos de Populações Intra e Extra Hospitalar, do Hospital Universitário da UFRJ*. [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ.

CARLOS, L.A., AMARAL, K.A.S., VIEIRA, I.J.C., MATHIAS, L., BRAZ-FILHO, R., SAMARÃO, S.S., VIEIRA-DA-MOTTA, O. (2010) *Rauvolfia grandiflora* (apocynaceae) extract interferes with 90 staphylococcal density, enterotoxin production and antimicrobial activity. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41:612-620.

CASTRO, H. G.; CASALI, V. W. D.; BARBOSA, L. C. A.; CECON, P. R. (1999) Rendimento de tanino em dois acessos de Carqueja (*Baccharis myriocephala* D.C.), em diferentes épocas de colheita em Viçosa-MG. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 1, 29.

CATÃO, R. M. R. Atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre bactérias e fungos leveduriformes (2007) [Tese]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba.

CATÃO, R. M. R., BARBOSA-FILHO, J. M., LIMA, E. O., PEREIRA, M. S. V., SILVA, M. A. R., ARRUDA, T. A., ANTUNES, R. M. P. (2010). Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 42(1): 9-14.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. F.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A.; (2000) Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia Salina leach* *Química Nova*, 23, 20.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). (2001) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin or soft tissue infections in a state prison-Mississippi. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 50(42):919-22.

CHUNG, K.; WEI, C.; JOHNSON, M. G. (1998). Are tannins a double-edged sword in biology and heal. *Trends in Food Science and Technology*. 9, 168.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J.; (1993). Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination; Colegate, S. M., Ed.; CRC Press; London,

DOS SANTOS, A. L; OLIVEIRA, S. D; DE FREITAS, C. C; LEAL, B. F. A; AFONSO, I. F.; RANGEL, C. R; CASTRO, H. C. (2007). Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e*

Medicina Laboratorial, 43: 6 pp. 413-423 Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial Rio de Janeiro, Brasil,

DUARTE, M. C. T., FIGUEIRA, G. M., PEREIRA, B., MAGALHÃES, P. M., DELARMELENA, C. (2004) Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 14:6-8.

FINAN, J. E., ROSATO, A. E., DICKINSON, T. M., KO, D., GORDON, L. A. (2001) Conversion of oxacillin resistant *Staphylococci* from heterotypic to homotypic resistance expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(1):24-30.

KILKUSKIE, R. E.; KASHIWADA, Y.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I.; BODNER, A.; CHENG, Y.; LEE, K. (1992). HIV and reverse transcriptase inhibition by tannins *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2, 1529

LEMOS, G.C.S (1997) Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de espécies vegetais frente a bactérias de mastite bovina. Dissertação (Mestrado em 1997) – Campos dos Goytacazes – RJ – UENF, 141p.

LIMA, M. R. F., XIMENES, C. P. A., LUNA, J. S., SANT'ANA, A. E. G. (2006). The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16:300-6.

MACK, BECKER, et al. (2004). Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *International Journal of Medical Microbiology* 294: 203-212.

MACRAE, W. D. HUDSON, J. B. TOWERS, G. H. N. (1998). Studies on the pharmacological activity of amazonian Euphorbiaceae. *Journal of ethnopharmacology*, 22: 143.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M.G.A.; MAGALHÃES, E.G.; SANNOMIYA, M.; SORIANO, M. D. P. C.; PEREZ, M. A. F. (2007). Flavonoids of *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo and biological activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*.79:3.

MCLAUGHLIN, J. L. COLMAN-SAZARBITORIA, T., ANDERSON J.E. (1995). Tres bioensayos Simples para Químicos de Productos Naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*, p.13-18.

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P. (2001). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*; orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed.

MELO, V. V., DUARTE, I. P., QUEIROZ, A. (2012). Guia Antimicrobianos – 1.ed. – Goiânia.

MEYER, B.N., FERRIGNI, N.R., PUTNAM, J.F., JACOBSEN, L.B., NICHOLS, D.E., MCLAUGHLIN, J.L. (1982). Brine Shrimp a Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, (45): 3.

MICHELIN, D. C., MORESCHI, P. E., LIMA, A. C., NASCIMENTO, G. G. F., PAGANELLI, M. O., CHAUD, M. V. (2005) Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 15: 316-20.

NASCIMENTO, G. F., LOCATELLI, J., FREITAS, P. C., SILVA, G. L. (2000) Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Revista Brasileira de Microbiologia*. 31: 48-53.

NETO, A. C., SILVA, C. G. M., STANFORD, T. L. M. (2002) Staphylococcus enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Food Science and Technology*. 22(3): 263-271.

O'GARA AND HUMPHREYS (2001). Staphylococcus epidermidis biofilms: importance and implications. *Journal of Medical Microbiology* 50: 582-587

PARK, S.C, KIM, J.Y., LEE, J.K., HWANG, I., CHEONG, H., NAH, J.W., HAHM, K.S., PARK, Y. (2009) Antifungal mechanism of a novel antifungal protein from pumpkin rinds against various fungal pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:9299-9304.

PESSINI, G. L., HOLETZ, F. B., SANCHES, N. R., CORTEZ, D. A. G., DIAS-FILHO, B., NAKAMURA, C. V. (2003) Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.13:21-4.

RAVISHANKAR, K., KIRANMAYI, G.V.N., APPA REDDY, G.V., SOWJANYA, V.V.L., SAINADH, V.B., DURGA, V.G.L., PRASAD, V.S., SWAMINAIDU, P.V., PRASAD, T. (2012) Preliminary phytochemical screening and in-vitro antibacterial activity of *Cucurbita maxima* seed extract. *International journal of research in pharmacy and chemistry*. 2:86-91.

SANT'ANA, A. E. G. ARAÚJO, E. L.; MOURA, A. N.; SAMPAIO, E. S. B.; GESTINARI, L. M. S.; CARNEIRO, J. M. T. (2002). *Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável da Flora do Brasil*; Eds.; Imprensa Universitária: UFRPE, Recife.

SANTOS, E. L.; COSTA, E. V.; MARQUES, F. A., VAZ, N. P.; MAIA, B. H. L. N.S. (2009). Toxicidade e Atividade Antioxidante de Flavonoides das Cascas das Raízes de *Lonchocarpus filipes*. 32 (9): 2255-2258.

SILVA, C. V, REIS., A. L. V., FERRER, S. R., GUERREIRO, H. M. N., BARROS, T. F., VELOZO, E. S. (2010). Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. *Brazilian Journal Pharmacognosy*. 20:355-60.

SIQUEIRA, M. J., BOMM, D. M., PEREIRA, G. F. N., GARCEZ, S. W., BOAVENTURA, D. A. M. (1998). Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii*-Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*. (5): 21.

SOUSA, L. U., MIELKE, T. P., HOMER, R., RODRIGUES, M. A., SANTOS, S. O., SALLA, A. (2011). Avaliação de metodologias para a detecção de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e análise do perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos em um hospital terciário. *Revista Saúde*. 37(1): 23-30.

TEIXEIRA, L. M., SANTOS, K. R. N., BUERIS, V., TRABULSI, L. R. (2005) *Staphylococcus aureus*. In: Trabulsi LR, Altherthum F (Org). Microbiologia. São Paulo: Atheneu.

TORRES, A. M., RITTER, A. M. V., VOLPE, A. T. V., TOGNIM, M. C. B. (2007) Contaminação por *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (ORSA) nos equipamentos atléticos das academias. In: Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar; Maringá, PR.

VARGAS, A.C., LOGUERCIO, A. P., WITT, N. M., COSTA, M. M., SILVA, M. S., VIANA, L. R. (2004) Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcóolico de própolis. *Ciência Rural*. 34 (1): 159-63.

VASCONCELOS, M. A.; ARRUDA, F. V. S.; ALENCAR, D. B.; SAKER-SAMPAIO, S.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SANTOS, H. S.; BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L.; CAVADA B. S.; HENRIQUES, M.; PEREIRA, M. O.; TEIXEIRA, E. H. (2014). Antibacterial and Antioxidant Activities of Derriobtusone A Isolated from *Lonchocarpus obtusus*. *BioMed Research International*, Article ID 248656.



CAPÍTULO 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. Considerações Finais

O estudo fitoquímico da madeira da espécie de *Lonchocarpus guilleminianus* e das cascas do tronco de *Calycophyllum spruceanum* resultou no isolamento e/ou identificação de 34 substâncias: ácido elágico (**LG-04**), ácido gálico (**LG-10**), 2,3- (R)- hexaidroxidifenoil-D-glicose (**LG-12**), β -1-O-galoil-3,6-(R)-hexahidroxidifenoil-D-glicose (**LG-20**), metil- β -D-glicopiranosídeo (**LG-14**), 1,2,3,4-Butanotetrol tetraacetato [**LG-14 Ac (a)**], Metil 2,3,4-tri-O-acetil- β -D-xilopyranosídeo tetraacetato [**LG-14 Ac (b)**], tetraacetil- β -l-ramnose [**LG-14 Ac (c)**], α -l-Manopiranosose,6-desoxi-tetraacetato [**LG-14 Ac (d)**], Lixopiranosose tetraacetato [**LG-14 Ac (e)**], L-Iditol, hexaacetato [**LG-14 Ac (f)**], Metil- β - D-glicopiranosídeo tetraacetato [**LG-14 Ac (g)**], D-Glicose, 2,3,4,5,6-pentaacetato [**LG-14 Ac (h)**], α -D-Glicopiranosose pentaacetato [**LG-14 Ac (i)**], D-Manitol hexaacetato [**LG-14 Ac (j)**], uma mistura de hidrocarbonetos: Hexadecano **LGA1(a)**, Heptadecano **LGA1(b)**, Pentadecano-2,6,10,14-tetrametil **LGA1(c)**, Octadecano **LGA1(d)**, Nonadecano **LGA1(e)**, Eicosano **LGA1(f)**, Heneicosano **LGA1(g)**, Docosano **LGA1(h)**, Tricosano **LGA1(i)**, Tetracosano **LGA1(j)**, Pentacosano **LGA1(k)**, Hexacosano **LGA1(l)**, Heptacosano **LGA1(m)**, Nonacosano **LGA1(n)**, friedelina **LGA2**, estigmasterol e γ -sitosterol **LGA3**, ácido 3-O- β -D-xilofuranosil-(1'→3)- β -D-glicopiranosil (1''→2')- α -ramnopiranosil(1'''→3')-hidroxiolean-12-en-28-oico **LG-5Ac**, ácido protocatecuico **PM1** e protocatecuato de metila **PM4**.

A revisão bibliográfica de *Lonchocarpus guilleminianus* mostrou que as substâncias: ácido elágico (**LG-04**), ácido gálico (**LG-10**), 2,3- (S)-hexaidroxidifenoil-D-glicose (**LG-12**), β -1-O-galoil-3,6-(R)-hexahidroxidifenoil-D-glicose (**LG-20**) e (**LG-5Ac**) ácido 3-O- β -D-xilofuranosil-(1'→3)- β -D-glicopiranosil (1''→2')- α -ramnopiranosil(1'''→3')-hidroxiolean-12-en-28-oico, pelo melhor do nosso conhecimento são inéditas no gênero e na espécie, assim o presente trabalho contribuiu para o conhecimento de sua composição química.

A revisão bibliográfica da espécie *Calycophyllum spruceanum* mostrou que as substâncias: ácido protocatecuico **PM1** e seu éster metílico protocatecuato de metila **PM4**, pelo melhor do nosso conhecimento são

inéditas no gênero e na espécie, assim o presente trabalho contribuiu para o conhecimento da composição química da espécie.

A avaliação do potencial antioxidante dos extratos de *L. guilleminianus* e *C. spruceanum* usando o método do radical DPPH e ABTS, assim como a avaliação dos teores de fenóis e flavonoides totais, confirmou a correlação existente entre a atividade e a presença de substâncias fenólicas nos extratos testados.

A avaliação da citotoxicidade com larvas de *Artemia salina* indicou os extratos em MeOH e MeOH/H₂O de *L. guilleminianus* e *C. spruceanum* como ativos de acordo com a metodologia proposta por McLaughlin.

A análise da atividade antibacteriana das frações, extrato e substância isolada 2,3- (S)- hexaidroxidifenoil-D-glicose (**LG-12**), de *L. guilleminianus*, sugere que as frações (LGH), (LGB), a substância (LG-12) e o extrato 4 possui uma atividade antibacteriana frente a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 e a substância isolada 2,3- (S)- hexaidroxidifenoil-D-glicose (**LG-12**) frente a cepa *S. aureus* ATCC 33591.

O ácido elágico (**LG-04**) ocorre especialmente em frutas como nozes, morango, framboesa, uvas e amoras, é uma lactona fenólica presente na forma de elagitaninos, como componente estrutural da membrana e parede celular vegetal (Vattem & Shetty, 2005). Diversas propriedades biológicas têm sido descritas para o ácido elágico: anticarcinogênica e antimutagênica (Aggarwal & Shishodia, 2006); antioxidante (Sudheer et al., 2007; Devipriya et al., 2007); antiinflamatória (Rogério et al., 2006; Yu et al., 2007; Papoutsi et al., 2008); antiulcerogênica, gastroprotetora (Lino et al., 2001 e 2002); antimicrobiana, (Vattem & Shetty, 2005); inibidora da síntese de tromboxano B₂ (Murakami e colaboradores, 1991); hepatoprotetora (Vattem & Shetty, 2005); antiaterosclerótico (Yu et al., 2007); e inibidora da DNA topoisomerase (Vattem & Shetty, 2005).

Entre vários polifenóis, o ácido gálico (**LG-10**) (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico), um composto trifenólico de baixo peso molecular que ocorre naturalmente, emergiu como um antioxidante forte. A partir da biodisponibilidade e da via biossintética do ácido gálico a literatura inclui vários estudos in vitro, in vivo e in silico, fornecendo o modo de atividade de eliminação de radicais, capacidade de inibir a peroxidação lipídica, manutenção

de sistemas de defesa e quelação de íon metálicos por esta molécula trifenólica.

Os derivados do ácido gálico também foram encontrados em diversos fitoterápicos com diversas atividades biológicas e farmacológicas como bloqueio de radicais, interferência com as vias de sinalização celular e apoptose de células cancerosas. As diversas aplicações deste polifenol simples é devida a combinação entre os seus antioxidantes e o potencial pró-oxidante (Badhani e colaboradores 2015).

Ellagitaninos como a substância isolada (**LG-20**) são uma classe biológica e estruturalmente diversa de substâncias. A estrutura consiste tipicamente em um grupo galoil e um grupo Hexahidroxidifeoil esterificado a uma glicose. Recentemente uma gama de atividades biológicas foi relatada para a corilagina, por exemplo, a potenciação de antibióticos β -lactâmicos contra MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), atividades antivirais e antimicrobianas, efeito anti-hipertensivo e inibição de uma quitina sintase (Yamada et al., 2008).

Dados experimentais demonstraram que a corilagina exibe atividade anti-hiperalgésica que pode ser devido à interação com o sistema glutamatérgico (Moreira et al., 2013).

Além dos taninos foi isolada do extrato em MeOH/H₂O de *L. guilleminianus* a saponina ácido 3-O- β -D-xilofuranosil-(1'→3)- β -D-glicopiranosil (1''→2')- α -ramnopiranosil(1'''→3')-hidroxiolean-12-en-28-oico, as saponinas em solução aquosa formam espuma persistente e abundante. Essas atividades provem do fato de apresentarem em sua estrutura uma parte lipofílica denominada aglicona ou sapogenina e uma parte hidrofílica constituída por um ou mais açúcares (Schenkel et al., 2001). O comportamento anfifílico das saponinas e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípídeos de membranas possibilitam ações biológicas variadas, como ação antifúngica e hipocolesterolmiante (Cunha & Roque, 2005).

Assim, após o estudo fitoquímico-biológico e antioxidante das espécies *L. guilleminianus* e *C. spruceanum* obteve-se resultados promissores que podem servir como um incentivo para estudos biológicos mais específicos, podendo levar a utilização dessas espécies de plantas, como fonte de novos fármacos para uso na terapêutica.

7. 1. Referências Bibliográficas

AGGARWAL, B.B. & SHISHODIA, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical. Pharmacology*. 71(10): 1397-1421.

BADHANI, B., SHARMA, N., KAKKAR, R.(2015). Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *The Royal Society of Chemistry*, 5, 27540–27557.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. Esteróis e triterpenos: ácidos biliares, precursores da vitamina D e fitosteróides, cardiotônicos, hormonas esteróides, matérias-primas de núcleo esteróide usadas em sínteses parciais e saponósidos. (2005). In: CUNHA, A. P. Farmacognosia e fitoquímica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian,. p. 432-482.

DEVIPRIYA, N.; SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A.R. & MENON, V.P. (2007) Effect of ellagic acid, a natural polyphenol, on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance: a drug dose dependent study. *Singapore Medical Journal*, 48(4): 311-318.

LINO, T.; NAKAHARA, K.; MIKI, W., *et al.* (2001). Less damaging effect of whisky in rat stomachs in comparison with pure ethanol. Role of ellagic acid, the nonalcoholic component. *Digestion*, 64(4): 214-221.

LINO, T.; TASHIMA, K.; UMEDA, M., *et al.* (2002). Effect of ellagic acid on gastric damage induced in ischemic rat stomachs following ammonia or reperfusion. *Life Sci.*, 70(10): 1139-1150.

MOREIRA, J., KLEIN-JÚNIOR, L. C., CECHINEL FILHO, V., BUZZI, F. DE C. (2013). Anti-hyperalgesic activity of corilagin, a tannin isolated from *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae), *Journal of Ethnopharmacology* 146, 318–323.

MURAKAMI, S.; ISOBE, Y.; KIJIMA, H., *et al.* (1991). Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase and acid secretion by ellagic acid. *Planta Medica.*, 57: 305-308.

PAPOUTSI, Z.; KASSI, E.; CHINOI, I., *et al.*(2008). Walnut extract (*Juglans regia* L.) and its component ellagic acid exhibit anti-inflammatory activity in human aorta endothelial cells and osteoblastic activity in the cell line KS483. *British Journal of Nutrition.*, 99(4): 715-722.

RATNOFF, O.D. & CRUM, J.D. (1964). Activation of Hageman factor by solutions of ellagic acid. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 63: 359-77.

ROGERIO, A.P.; FONTANARI, C.; MELO, M.C., *et al.* (2006). Anti-inflammatory, analgesic and anti-oedematous effects of *Lafoensia pacari* extract and ellagic acid. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(9): 1265-1273.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. (2001). *Farmacognosia: da planta ao medicamento* .3 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, cap.27, p.597-619.

SUDHEER, A.R.; MUTHUKUMARAN, S.; DEVIPRIYA, N. & MENON, V.P. (2007) Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage in vitro: with the comparison of N-acetylcysteine. *Toxicology*, 230(1): 11-21,

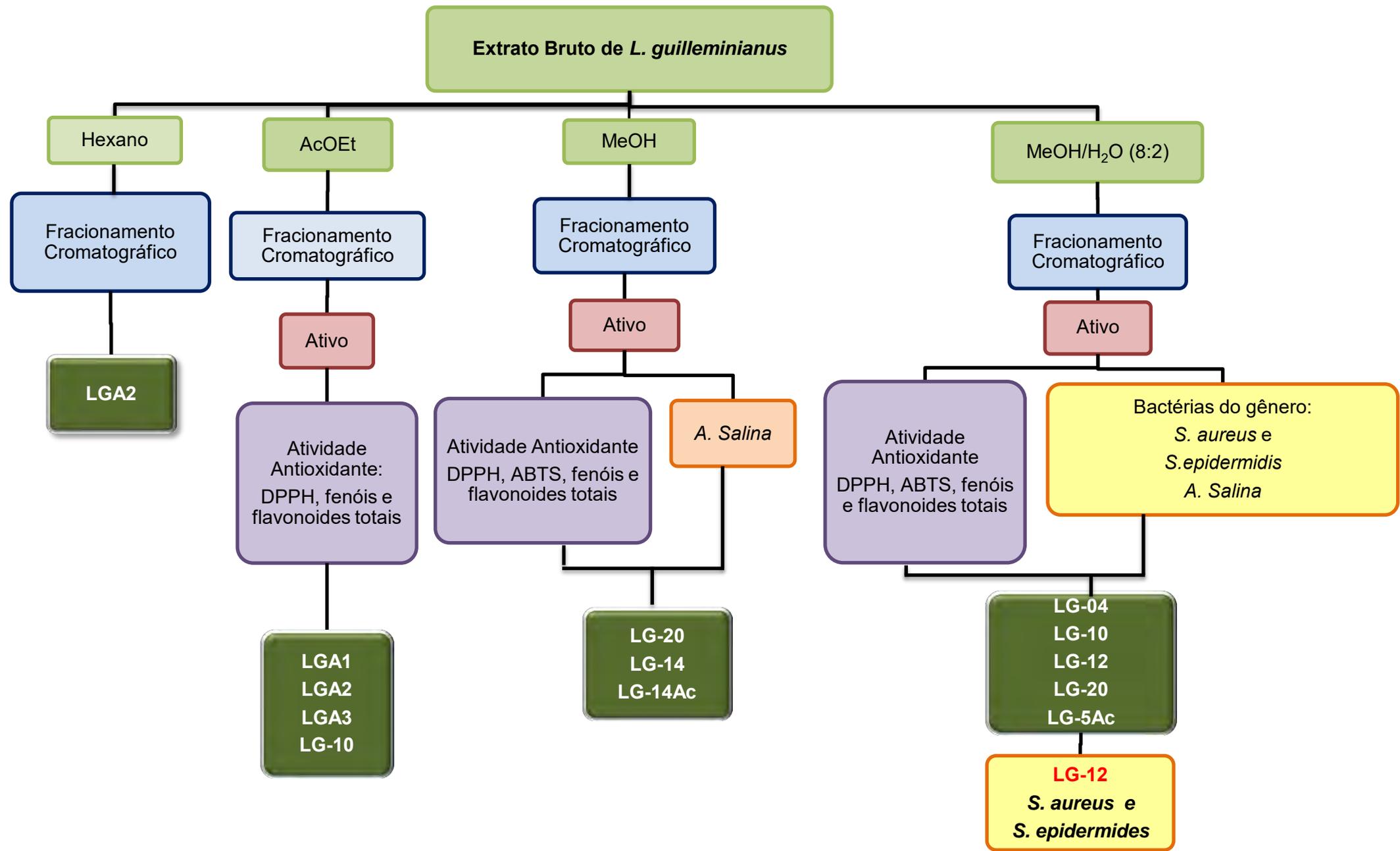
VATTEM, D.A. & SHETTY, K. (2005) Biological functionality of ellagic acid: a review. *Journal of Food Biochemistry*, 29(3): 234–266.

YAMADA, H.,* NAGAO, K., DOKEI, K., KASAI, Y., MICHIHATA, N.(2008). Total Synthesis of (-)-Corilagin, *American Chemical Society*, 130, 7566–7567.

YU, Y.M.; WANG, Z.H.; LIU, C.H. & CHEN, C.S. (2007). Ellagic acid inhibits IL-1 β -induced cell adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cells. *British Journal of Nutrition*, 97(4): 692-698.



Apêndice



Extrato Bruto de *L. guilleminianus*

Hexano

Fracionamento Cromatográfico

LGA2

AcOEt

Fracionamento Cromatográfico

Ativo

Atividade Antioxidante:
DPPH, fenóis e flavonoides totais

LGA1
LGA2
LGA3
LG-10

MeOH

Fracionamento Cromatográfico

Ativo

Atividade Antioxidante
DPPH, ABTS, fenóis e flavonoides totais

LG-20
LG-14
LG-14Ac

A. Salina

MeOH/H₂O (8:2)

Fracionamento Cromatográfico

Ativo

Atividade Antioxidante
DPPH, ABTS, fenóis e flavonoides totais

LG-04
LG-10
LG-12
LG-20
LG-5Ac

Bactérias do gênero:
S. aureus e
S. epidermidis
A. Salina

LG-12
S. aureus e
S. epidermides

