

**QUIMIOSISTEMÁTICA, FITOQUÍMICA E POTENCIAL ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE MEDICINAL *Virola bicuhyba* Warb**

LUANA CARVALHO BATISTA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ
JUNHO 2019**

**QUIMIOSISTEMÁTICA, FITOQUÍMICA E POTENCIAL ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE MEDICINAL *Viola bicuhyba* Warb**

LUANA CARVALHO BATISTA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Ciências Naturais (Área de Concentração: Química Bioorgânica e Bioinorgânica).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Raquel Garcia Vega

CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ

JUNHO 2019

QUIMIOSISTEMÁTICA, FITOQUÍMICA E POTENCIAL ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE MEDICINAL *Virola bicuhyba* Warb

LUANA CARVALHO BATISTA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Ciências Naturais (Área de Concentração: Bioorgânica).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Raquel Garcia Vega

Aprovada em 18 de junho de 2019.

Banca examinadora:

Prof.^a. Dr.^a. Márcia Cristina Campos de Oliveira
(UFRRJ/ICE)

Prof.^a. Dr.^a. Adriana Lima de Sousa IFF
(IFF/*campus* Campos Guarus)

Prof.^o. Dr. Vinicius Fernandes Moreira
(IFF/*campus* Cabo Frio)

Prof.^a. Dr.^a. Maria Raquel Garcia Vega - Orientadora
(LCQUI/UENF)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da minha vida e por me permitir vivenciar todas as etapas que me trouxeram até aqui.

Aos meus pais, Isabel Cristina e Francisco, e aos meus irmãos por todo apoio e incentivo em minhas jornadas e paciência pelas inúmeras vezes em que eu mesma não tive.

A Diego, pelo companheirismo, incentivo e motivação. Por nunca me deixar desistir!

À professora Maria Raquel Garcia Vega, que me recebeu de braços abertos, por todo direcionamento, paciência, conhecimento, apoio e dedicação concedidos a mim neste período.

Gostaria de agradecer a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao professor Rodrigo Rodrigues de Oliveira pelo encorajamento, apoio, conselhos e alegrias divididas no dia a dia.

Aos meus amigos de laboratório: Queitilane, Amaro, Marcelo, Isabela, Fernanda e Carol, pelo convívio agradável, companheirismo, discussões trocadas, apoio, incentivo e colaboração. Vocês são os melhores!!! Obrigada pela amizade formada e motivação.

Aos técnicos e funcionários Marcelo Mathias, Márcio e ao professor Carlos pela ajuda nas análises realizadas.

Aos professores Francisco José Alves Lemos (UENF), Milton Masahiko Kanashiro (UENF) e Leonardo José de Moura Carvalho (FioCruz) pelo espaço cedido em seus laboratórios para que parte deste trabalho fosse realizado.

À UENF, FAPERJ e ao CNPq pelo financiamento dado à pesquisa.

RESUMO

BATISTA, Luana Carvalho; D.Sc.; **Quimiosistemática, fitoquímica e potencial atividades biológicas da espécie medicinal *Viola Bicuhyba* Warb.** Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Junho, 2019, Campos dos Goytacazes, RJ. Professor Orientador: D.Sc. Maria Raquel Garcia Vega.

Myristicaceae é uma das famílias mais antigas de angiospermas, pertencente à ordem das Magnoliflorae, possui 21 gêneros e cerca de 1140 espécies. No Brasil, a família é representada por 5 gêneros encontrados em todos os biomas, compreendendo 64 espécies. Sendo o gênero *Viola* o mais bem representado. A espécie *Viola bicuhyba*, endêmica e amplamente distribuída no bioma Mata Atlântica, é conhecida pelo uso na cicatrização de feridas por comunidades locais. O objetivo deste trabalho é o estudo do potencial farmacológico, investigação fitoquímica biomonitorada da espécie, bem como a análise do perfil quimiosistemático do gênero e da família. Os ensaios biológicos realizados foram: larvicida, antineoplásico e antimalárico. A atividade larvicida, realizada com larvas do 3º instar de *Aedes aegypti*, revelou que o extrato etanólico das folhas ($IC_{50}= 0,11 \text{ mgmL}^{-1}$) é mais ativo que o caule ($IC_{50}= 0,17 \text{ mgmL}^{-1}$). Na atividade antineoplásica, na linhagem U937, observou-se o mesmo resultado, o extrato das folhas ($IC_{50}= 15,23 \pm 1,10 \text{ } \mu\text{gmL}^{-1}$) foi mais ativo que o do caule ($IC_{50}= 42,29 \pm 1,11 \text{ } \mu\text{gmL}^{-1}$). Após fracionamento do extrato das folhas foi verificado que, as frações VBFD ($IC_{50}= 5,02 \pm 1,51 \text{ } \mu\text{gmL}^{-1}$) e VBFE ($IC_{50}= 4,89 \pm 1,54 \text{ } \mu\text{gmL}^{-1}$) apresentaram os melhores resultados. A atividade antimalárica para os extratos e frações confirmou que as frações VBFD e VBFE são as mais ativas, dentre as testadas. As substâncias quercetina, Oleiferina D, 3-hidroxi-1-(15-fenilpentadecanoil)-2,6-ciclohexadiona e 1-(3,4-dimetoxifenil)-2,3-dimetil-4-piperonilbutan-1-ona oriundas dessas frações foram isoladas utilizando técnicas cromatográficas. A determinação estrutural foi baseada nos dados de RMN ^1H e ^{13}C , incluindo os bidimensionais (HSQC e HMBC), espectrometria de massas e comparação com a literatura. O estudo quimiosistemático foi realizado com base no levantamento bibliográfico de metabólitos secundários identificados/isolados em Myristicaceae. As bases de dados *Scifinder*, *ScienceDirect* e *PubMed* identificaram 320 artigos que entre 1965 até 2019 enumeraram 1769 metabólitos distribuídos em 14 dos 21 gêneros. As classes neolignanais, terpenóides e flavonóides são as mais

abundantes na família, com destaque para os gêneros *Myristica* e *Virola* que detêm o maior número de ocorrências (NO). As análises do potencial de bioatividade realçam o potencial farmacêutico apresentado pela espécie e dados quimiossistemáticos corroboram com a atual classificação filogenética da família.

Palavras chaves: Myristicaceae, *Virola bicuhyba*, Quimiossistemática, Atividade biológica.

ABSTRACT

BATISTA, Luana Carvalho; DSc; **Chemosystematic, phytochemistry and biological potential of medicinal species *Virola bicuhyba* Warb.** Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, June, 2019, Campos dos Goytacazes, RJ. Advisor: Maria Raquel Garcia Vega.

Myristicaceae is one of the oldest families of angiosperms, subordinated to Magnoliiflorae order. This family has 21 genera and about 1140 species. In Brazil, Myristicaceae is represented by five genus found in all biomes, comprising 64 species with best representation of *Virola* genus. *Virola bicuhyba*, is endemic and widely distributed in Atlantic Forest biome, also known for its use in wound healing by local communities. The aim of this work was the biomonitoring and phytochemical study of *Virola bicuhyba*, as well as analysis of chemosystematic profile of the genus and family. Biological assays were performed in sequence and allowed the identification of main constituents of active fractions. Larvicidal activity, performed with 3rd instar larvae of *Aedes aegypti*, showed ethanolic extract of leaves ($IC_{50} = 0.11 \text{ mgmL}^{-1}$) is more active than stem extract ($IC_{50} = 0.17 \text{ mgmL}^{-1}$). Antineoplastic activity, in U937 strain also showed leaves extract ($IC_{50} = 15.23 \pm 1.10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) was more active than stem extract ($IC_{50} = 42.29 \pm 1.11 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). Leaves fractions VBFD ($IC_{50} = 5.02 \pm 1.51 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) and VBFE ($IC_{50} = 4.89 \pm 1.54 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) were still more active. Antimalarial activity of extracts and fractions confirmed VBFD and VBFE fractions are the most active, among fractions tested. Quercetin, oleiferin D, 3-hydroxy-1-(15-phenylpentadecanoyl)-2,6-cyclohexadione and 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2,3-dimethyl-4-piperonylbutan-1-one from fractions were isolated using chromatographic techniques from these fractions. Structural determination was made based on ^1H and ^{13}C NMR data including bidimensional (HSQC and HMBC), mass spectrometry and comparison with the literature. Chemosystematic study was carried out based on bibliographic survey of secondary metabolites identified/isolated in Myristicaceae. Survey in *Scifinder*, *ScienceDirect* and *PubMed* databases identified 320 articles between 1965-2019 and listed 1769 metabolites distributed in 14 of the 21 genus. Neolignan, terpenoid and flavonoid classes are the most abundant in the family, with emphasis on the genus *Myristica* and *Virola* with the highest number of occurrences (NO). In summary, analysis of biological assays and chemosystematic data corroborate

with current phylogenetic family classification and highlight pharmaceutical potential presented by the species. It is emphasized that this activity comes from isolated substances.

Key words: Myristicaceae, *Viola bicuhyba*, Chemosystematic, Biological activity.

LISTA DE ABREVIATURA

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
δ	Deslocamento químico em parte por milhão
ButOH	n-Butanol
Hex	Hexano
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
d	Dupleto
dd	Duplo duplete
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Alcool etílico (etanol)
IC ₅₀	Concentração a qual inibe 50% do crescimento das células
IG	Índice de proteção por glicosilação
IM	Índice de proteção por metilação
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IS	Índice de seletividade
<i>J</i>	Constante de acoplamento medida em Hertz
MeOH	Metanol
NO	Número de Ocorrência
O	Nível de oxidação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial da família Myristicaceae.	21
Figura 2. Exemplos de metabólitos isolados na família Myristicaceae. (1) Surinamensin (Neolignana), (2) 1-(2,4-diidroxifenil)-3-(3,4-metilenodioxifenil)-propano (1,3-diarilpropanos), (3) 7,4'-dimetoxiflavona (Flavonóide) e (4) (+)-Sesamin (Lignana).	22
Figura 3. Gráfico de distribuição de espécies de Myristicaceae presentes nos biomas brasileiros.	23
Figura 4. Mapa de distribuição da espécie <i>Virola bicuhyba</i> no Brasil.	29
Figura 5. Imagens da árvore, folha, fruto e folha de <i>Virola bicuhyba</i>	30
Figura 6. Constituintes químicos isolados de <i>Virola bicuhyba</i>	32
Figura 7. Esquema de biossíntese do metabolismo secundário.	35
Figura 8. Imagem de pupa (fase que ocorre a metamorfose do estágio larval para o adulto) de duas espécies de <i>Aedes</i>	39
Figura 9. Estrutura do flavonoide rutina.	45
Figura 10. Fluxograma de obtenção inicial dos extratos em etanol das folhas e do caule de <i>V. bicuhyba</i> (VBF e VBC).	48
Figura 11. Fluxograma das frações resultantes da partição à seco do extrato das folhas de <i>V. bicuhyba</i>	49
Figura 12. Fluxograma resumo das substâncias isoladas da fração VBFD de <i>V. bicuhyba</i>	52
Figura 13. Fluxograma das frações resultantes da partição líquido-líquido do extrato do caule de <i>V. bicuhyba</i>	53
Figura 14. Gráfico do número de publicações e do número de ocorrências de metabólitos secundários isolados e/identificados dos gêneros da família Myristicaceae.	54
Figura 15. Gráfico de correlação percentual do número de ocorrências de metabólitos secundários presentes em Myristicaceae.	55
Figura 16. Esqueletos clássicos de flavonoides encontrados nas espécies da família Myristicaceae.	57
Figura 17. Gráfico do número de ocorrência de flavonoides em Myristicaceae. .	57
Figura 18. Gráfico do número de ocorrência de tipos estruturais de neolignanas para Myristicaceae.	59
Figura 19. Esqueletos clássicos de lignanas.	59

Figura 20. Gráfico do percentual do número de ocorrência de metabólitos secundários presentes no gênero <i>Virola</i> (Myristicaceae).....	61
Figura 21. Gráfico do número de ocorrência dos tipos estruturais de neolignanais do gênero <i>Virola</i>	62
Figura 22. Estruturas de neolignanais presentes no gênero <i>Virola</i>	63
Figura 23. Estruturas de neolignanais com esqueleto semelhante a dihidrodieugenol encontradas no gênero <i>Virola</i>	66
Figura 24. Gráfico do número de ocorrência dos tipos estruturais de neolignanais de <i>Virola bicuhyba</i>	69
Figura 25. Imagem da distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, excetuando-se pele não melanoma. .	72
Figura 26. Gráfico da avaliação viabilidade celular da linhagem U937, através do ensaio MTT, dos extratos das folhas (VBF) e caule (VBC) de <i>V. bicuhyba</i> . O zero se refere ao controle negativo do ensaio (células e meio de cultura). Experimento representativo de três repetições em triplicata, com diferença significativa com *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 em relação ao controle negativo (zero).....	73
Figura 27. Gráfico da viabilidade celular, através do ensaio MTT, das frações do extrato das folhas de <i>V. bicuhyba</i>	74
Figura 28. Mapa de risco da malária no Brasil (2017).....	76
Figura 29. Gráfico da viabilidade celular das frações do extrato das folhas de <i>V. bicuhyba</i> frente a cepa <i>Plasmodium falciparum</i> . A: gráfico da fração VBFB, B: gráfico da fração VBFD, C: gráfico da fração VBFE e D: gráfico da fração VBFF.	77
Figura 30. Curva de calibração do ácido gálico em $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizada nas análises de fenóis totais.	80
Figura 31. Espectro MS/MS da substância V1 obtida do extrato etanólico das folhas de <i>V. bicuhyba</i>	81
Figura 32. Proposta de fragmentação do íon m/z 447 do espectro de massa da substância V1	81
Figura 33. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) em MeOD de V1	83
Figura 34. Ampliação na região de δ_{H} 7,36-5,36 do RMN ^1H (500 MHz) em MeOD de V1	83
Figura 35. Ampliação na região de δ_{H} 4,55-3,51 do RMN ^1H (500 MHz) em MeOD de V1	84

Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em MeOD de V1	84
Figura 37. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 de V2	87
Figura 38. Ampliação na região de δ_{H} 5,80-7,54 do RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 de V2	87
Figura 39. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 de V2	88
Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135 (125 MHz) em CDCl_3 de V2	88
Figura 41. Mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl_3 de V2	89
Figura 42. Mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl_3 de V2	89
Figura 43. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 de V3	92
Figura 44. Ampliação nas regiões de deslocamentos químicos do RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 de V3	92
Figura 45. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 de V3	93
Figura 46. Espectro de correlação heteronuclear de HSQC em CDCl_3 de V3	93
Figura 47. Espectro de correlação heteronuclear de HMBC em CDCl_3 de V3	94
Figura 48. Espectro de massas no tempo de retenção 29,37 min da substância V3 , com principais fragmentações do íon m/z 400 $[\text{M}-\text{H}]^-$	94
Figura 49. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 de V4	97
Figura 50. Ampliação da região de δ_{H} 6,50 - 7,50 do espectro de RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 de V4	97
Figura 51. Ampliação da região de δ_{H} 0,70 - 3,50 do espectro de RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 de V4	98
Figura 52. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 de V4	98
Figura 53. Ampliação na região de δ_{H} 38,29-56,05 do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 de V4	99
Figura 54. Espectro de correlação heteronuclear de HSQC em CDCl_3 de V4	99
Figura 55. Espectro de correlação heteronuclear de HMBC em CDCl_3 de V4 . .	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista das espécies do gênero <i>Virola</i> presentes no Brasil e distribuição geográfica.....	24
Tabela 2. Estudos biológicos descritos para as espécies do gênero <i>Virola</i> (Myristicaceae).....	26
Tabela 3. Classificação taxonômica de <i>Virola bicuhyba</i>	31
Tabela 4. Tabela dos principais estudos de atividades biológicas realizados para <i>Virola bicuhyba</i> (Schott) Warb.....	32
Tabela 5. Estudo cromatográfico da fração VBFD.....	49
Tabela 6. Estudo cromatográfico da fração VBFD2.....	50
Tabela 7. Estudo cromatográfico da fração VBFD2.18.....	51
Tabela 8. Estudo cromatográfico da fração VBFE-I.....	53
Tabela 9. Valores dos parâmetros de proteção e desproteção dos metabólitos bioproduzidos na família Myristicaceae.....	56
Tabela 10. Esqueletos carbônicos e designação numérica de neolignanas relatadas na literatura.....	58
Tabela 11. Neolignanas presentes nas espécies do gênero <i>Virola</i> no Brasil.	67
Tabela 12. Concentração Efetiva (EC ₅₀) dos extratos e frações de <i>V. bicuhyba</i> baseados nos ensaios larvicida, antineoplásica e antimalárica.....	70
Tabela 13. Porcentagem de mortalidade larval para <i>Aedes aegypti</i> após tratamento com extrato de <i>V. bicuhyba</i>	71
Tabela 14. Tabela do perfil fitoquímico das folhas e caule de <i>Virola bicuhyba</i>	79
Tabela 15. Dados da análise de UPLC-DAD-MS/MS da substância V1	80
Tabela 16. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) de V1 em MeOD, correlações observadas no espectro de HSQC e comparação com os valores de referência da literatura em MeOD. Os deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J), em Hz.	82
Tabela 17. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) de V2 em CDCl ₃ , correlações observadas no espectro de HSQC e comparação com os valores de referência da literatura em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J), em Hz.	86
Tabela 18. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) de V3 em CDCl ₃ , correlações observadas no espectro de HSQC e comparação com os valores de	

referência da literatura em CDCl_3 (50 MHz). Os deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J), em Hz. 91

Tabela 19. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) de **V4** em CDCl_3 , correlações observadas no espectro de HSQC e comparação com os valores de referência da literatura em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J), em Hz. 96

Sumário

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 FAMÍLIA MYRISTICACEAE	21
2.1 GÊNERO <i>Virola</i>	23
2.3 <i>Virola bicuhyba</i> (Schott ex Spreng.) Warb.	28
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 METODOLOGIA	37
4.1 METODOLOGIA PARA A QUIMIOSSISTEMÁTICA	37
4.2 ENSAIO BIOLÓGICO DE EXTRATOS E FRAÇÕES	38
4.2.1 Atividade Larvicida	38
4.2.1.1 Colônia de mosquitos	38
4.2.1.2 Ensaio de mortalidade de larvas	38
4.2.2 Atividade Antineoplásica	39
4.2.2.1 Manutenção das linhagens	39
4.2.2.2 Avaliação da viabilidade celular das amostras frente às células neoplásicas	40
4.2.3 Atividade Antimalárica	41
4.2.3.1 Cultivo contínuo do <i>Plasmodium falciparum</i>	41
4.2.3.2 Sincronização do cultivo	41
4.2.3.3 Preparo das placas para os ensaios de quimioterapia	42
4.2.3.4 Preparo das placas para teste imunoenzimático anti-HRP II	42
4.2.3.5 Teste imunoenzimático anti-HRP II	43
4.2.3.6 Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento do parasito (IC ₅₀)	43
4.3 ESTUDO FITOQUÍMICO	43
4.3.1 Materiais de Ensaio Fitoquímico	43
4.3.1.1 Reagentes, solventes e soluções	43

4.3.1.2	Instrumentação.....	44
4.3.1.2.1	<i>Cromatografia à gás</i>	44
4.3.1.2.2	<i>Ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	44
4.3.1.2.3	<i>Espectroscopia de Massas com Ionização por electrospray (ESI(-)-MS e ESI(-)-MS/MS)</i>	44
4.3.2	Material Botânico	44
4.3.2.1	Coleta do material botânico.....	44
4.3.3	Metodologia para triagem fitoquímica	45
4.3.3.1	Teste para esteroides e terpenoides (Liebermann-Burchard)	45
4.3.3.2	Teste para flavonoides (Shinoda).....	45
4.3.3.3	Teste para polissacarídeos	46
4.3.3.4	Teste para saponinas (Espuma)	46
4.3.3.5	Quantificação de fenóis totais	46
4.3.4	Metodologia de Estudo Fitoquímico	47
4.3.4.1	Obtenção do extrato bruto e frações das folhas e do caule de <i>V. bicuhyba</i> (VB).	47
4.3.4.2	Partição do extrato etanólico das folhas <i>V. bicuhyba</i>	48
4.3.4.3	Análise da fração VBFD (m= 13,8305 g).....	49
4.3.4.3.1	Análise da fração VBFD2 (m= 3,5027 g).....	50
4.3.4.3.2	Análise da fração VBFD2.4 (m= 0,0324 g).....	50
4.3.4.3.3	Análise da fração VBFD2.17 (m= 0,2006 g).....	51
4.3.4.3.4	Análise da fração VBFD2.18 (m= 0,4270 g).....	51
4.3.4.4	Análise da fração VBFE (m= 0,6066 g).....	52
4.3.4.4.1	Análise da fração VBFE-I (m= 0,2442 g).....	52
5	Resultados e Discussão	54
5.1	QUIMIOSSISTEMÁTICA DA FAMÍLIA MYRISTICACEAE	54
5.2	QUIMIOSSISTEMÁTICA DO GÊNERO <i>Virola</i>	60
5.3	QUIMIOSSISTEMÁTICA DA ESPÉCIE <i>Virola bicuhyba</i> Warb.	68

5.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA	69
5.4.1 Atividade Larvicida	70
5.4.2 Atividade Antiproliferativa	71
5.4.3 Atividade Antimalárica	75
5.5 TRIAGEM FITOQUÍMICA	79
5.6 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE <i>V. bicuhyba</i>	80
6 Considerações Finais	101
7 Referências Bibliográficas	103

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (World Health Organization – WHO) define uma planta medicinal (cultivada ou selvagem) quando utilizada para fins medicinais por comunidades e grupos étnicos (WHO, 2003). Segundo Dulloo e colaboradores (2014), milhares de plantas são utilizadas como medicamentos em remédios caseiros, rituais de cura, venenos e tônicos. A literatura revela que muitas plantas já eram utilizadas como fitoterápicos pelas civilizações antigas, os egípcios e romanos faziam uso das plantas tais como, *Digitalis purpúrea* L. e *Digitalis lanata* Ehr., pelas propriedades diuréticas e tóxicas. A cultura chinesa, por exemplo, utiliza o conhecimento popular das ervas há séculos, empregando mais de 5 mil espécies de plantas (FOGLIO et al., 2006).

As plantas medicinais podem ser classificadas de acordo com seu uso: as plantas empregadas diretamente na terapêutica, as que constituem matéria-prima para manipulação e, por último, as que são empregadas na indústria para obtenção de princípios ativos ou como precursoras em sínteses orgânicas (FOGLIO et al., 2006). Por ser uma fonte rica para obtenção de moléculas que podem ser exploradas terapeuticamente, as plantas medicinais são fontes inestimáveis para a farmacologia. Baseado em estudos etnobotânicos, é possível a exploração científica interdisciplinar na busca de agentes biologicamente ativos, a observação de usos de maneira tradicional por comunidades humanas, a obtenção de extratos brutos, frações e substâncias isoladas que, através de testes biológicos específicos permitem uma avaliação do uso terapêutico da espécie vegetal. Além disso, as plantas medicinais também auxiliam na condução dos estudos fitoquímicos visando a descoberta de novas moléculas e princípios ativos (MACIEL et al., 2002; FOGLIO et al., 2006; DULLOO et al., 2014).

A produção de metabólitos secundários presentes em uma planta pode também ser influenciado pelo ambiente circundante. Cada espécie de planta possui cerca de 500 a 800 metabólitos secundários, cuja produção pode sofrer alteração devido a variações temporais e espaciais como: sazonalidade, ritmo circadiano (diário), crescimento, temperatura, disponibilidade hídrica, incidência de radiação ultravioleta, quantidade de nutrientes disponíveis, altitude e estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; DULLOO et al., 2014).

O Brasil, devido a sua grande extensão territorial, é detentor de seis biomas característicos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal, possuindo a flora mais rica do mundo com cerca de 56.000 espécies de plantas superiores (quase 19% da flora mundial) (GIULIETTI et al., 2005; MMA, 2011). Embora detenha grande riqueza vegetal, atualmente na Farmacopeia Brasileira, publicada em 2010, estão registradas apenas 65 espécies e destas apenas 14 como espécies nativas, plantas medicinais brasileiras. Já o Sistema Único de Saúde (SUS) oferta à população, com recursos de União, Estados e Municípios, 12 medicamentos fitoterápicos. Eles constam na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename, 2018) e são indicados, por exemplo, para uso ginecológico, tratamento de queimaduras, auxiliares terapêuticos de gastrite e úlcera, além de medicamentos com indicação para artrite e osteoartrite.

A grande variedade de espécies vegetais, atributo da flora brasileira, despertou a atenção de pesquisadores do mundo inteiro. E com isso, novas linhas de pesquisa foram estabelecidas em universidades brasileiras, buscando principalmente bases mais sólidas para a validação científica do uso de plantas medicinais e na procura de novas moléculas bioativas (SANTOS e LIMA, 2009). Funari e Ferro (2005) relatam que a opção de conduzir pesquisas a partir da indicação de plantas utilizadas por comunidades encurta o percurso do desenvolvimento de um novo fármaco, já que os pesquisadores dispõem, antes mesmo de iniciarem os estudos científicos, uma indicação de qual atividade biológica esta droga poderia apresentar.

Nesse contexto, a espécie escolhida para este trabalho é a *Virola bicuhyba* que apresenta amplo uso popular, principalmente na cicatrização de feridas, como anti-inflamatória e anti-reumática, sendo considerada medicinal (SARTORELLI, YOUNG e KATO, 1998). É também importante ressaltar que essa espécie teve uma redução populacional bruta maior que 60% nas últimas três gerações do táxon (estimada em cerca de 30 anos), causada principalmente por extrativismo seletivo e conversão de habitat, que continuarão a causar declínio no futuro se nada for feito a fim de se reduzir ou cessar as ameaças descritas. Por esse motivo, a espécie *Virola bicuhyba* foi considerada Em Perigo (EN) de extinção.

O presente trabalho busca contribuir para avanços no conhecimento do potencial de atividade biológica de *Virola bicuhyba* através da triagem frente ao parasita *Plasmodium falciparum* (atividade antimalárica), no combate ao *Aedes aegypti* (atividade larvicida) e frente à linhagens cancerígenas (atividade antineoplásica); bem como o estudo quimiosistemático do gênero e da família Myristicaceae e a obtenção de dados químicos da espécie que fornecem ferramentas importantes para a compreensão e conhecimento mais aprofundado da espécie permitindo avaliar relações filogenéticas, tendências evolutivas, e confirmar a posição dentro do táxon.

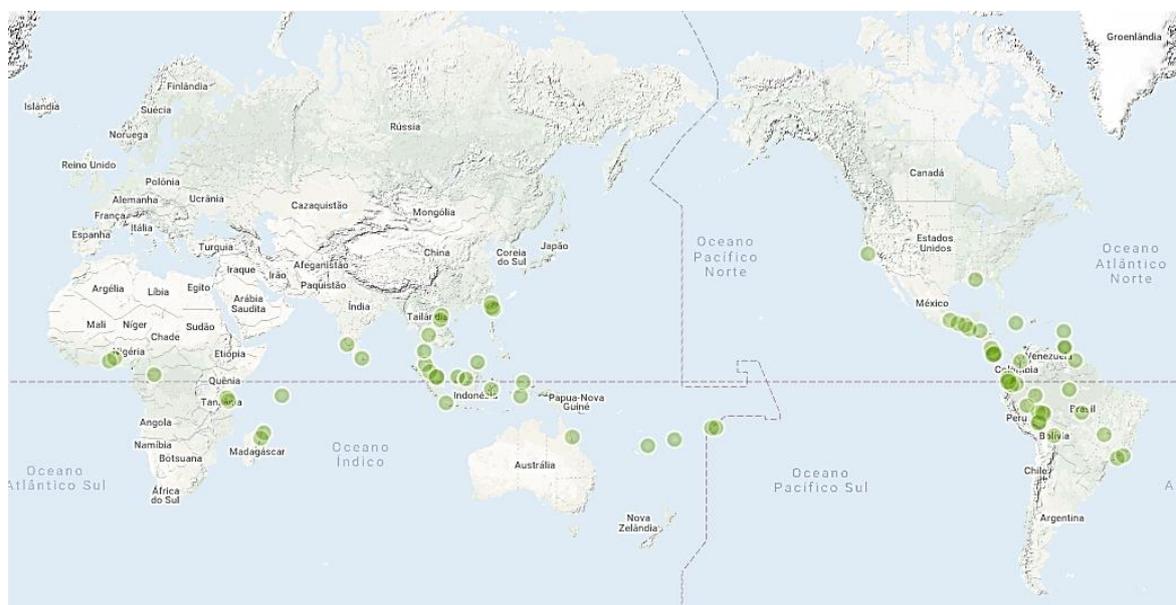
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FAMÍLIA MYRISTICACEAE

A família *Myristicaceae*, pertencente à super ordem das Magnonliflorae, é morfologicamente considerada uma das famílias de angiospermas mais primitivas. Constituída basicamente por árvores, arbustos e subarbustos frequentemente encontrados em florestas de planícies, esta família compreende 21 gêneros distribuídos pela Ásia (4 gêneros), África e Madagascar (9 gêneros) e na América (6 gêneros) somando cerca de 1140 espécies (KUROSHIMA et al., 2001; MORAIS et al., 2009; THE PLANT LIST, 2013).

As arvores da família geralmente apresentam uma seiva de cor vermelha quando cortada. As folhas são alternas, simples e inteira; com inflorescência racemosa e flores unissexuais (ROOSMALEN, BARDALES e GARCIA, 1996). A família está geograficamente distribuída de acordo com a **Figura 1, p. 21**.

Figura 1. Distribuição mundial da família Myristicaceae.

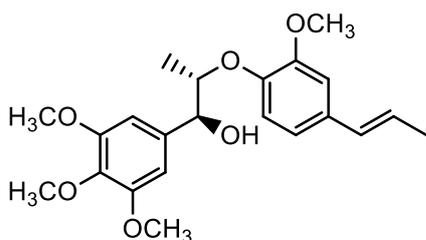


Fonte: <https://www.inaturalist.org/taxa/71575-Myristicaceae>. Acesso em: 06 Mar. 2019.

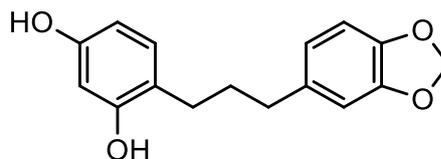
O estudo de espécies de *Myristicaceae* foi intensificado quanto à sua composição química após a descoberta do potencial narcótico alucinógeno de espécies presentes na Amazônia (GOTTLIEB, 1979). Os metabólitos

característicos encontrados nas espécies desta família são as neolignanas, flavonoides, 1,3-diarilpropanos e lignanas (VALDERRAMA, 2000). Exemplos de esqueletos básicos destes metabólitos estão ilustrados na **Figura 2, p. 22**.

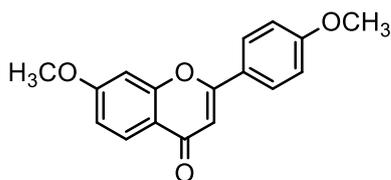
Figura 2. Exemplos de metabólitos isolados na família Myristicaceae. **(1)** Surinamensin (Neolignana), **(2)** 1-(2,4-diidroxifenil)-3-(3,4-metilenodioxifenil)-propano (1,3-diarilpropanos), **(3)** 7,4'-dimetoxiflavona (Flavonóide) e **(4)** (+)-Sesamin (Lignana).



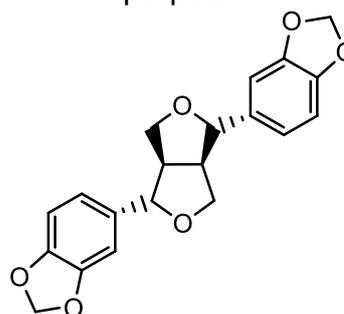
(1)
Surinamensin



(2)
1-(2,4-diidroxifenil)-3-(3,4-metilenodioxifenil)-propano



(3)
7,4'-dimetoxiflavona

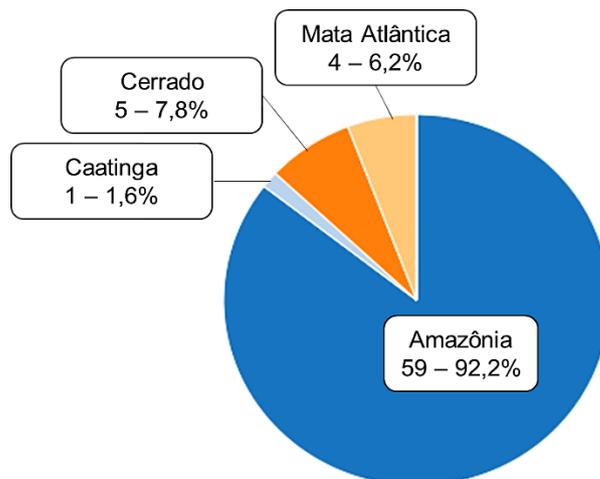


(4)
(+)-Sesamin

Fonte: Adaptado de BARATA et al., 2000; ALMEIDA et al., 1979; KATO; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1992.

No Brasil, a família é representada por 5 gêneros (*Virola*, *Iryanthera*, *Compsonera*, *Osteophloeum* e *Otoba*) e cerca de 64 espécies (sendo 14 endêmicas) espalhadas por todo o território (FLORA DO BRASIL, 2017). A distribuição por biomas brasileiros das espécies de Myristicaceae estão representadas na **Figura 3, p. 23**.

Figura 3. Gráfico de distribuição de espécies de Myristicaceae presentes nos biomas brasileiros.



Fonte: *Myristicaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB169>>. Acesso em: 06 Mar. 2019.

Estudos de atividade biológica da família Myristicaceae mostram um leque bem amplo de testes biológicos realizados. A literatura aponta as atividades antioxidante (SILVA et al., 2001; PATRO et al., 2005; FOUNDIKOU et al., 2018 e BENE et al., 2019, por exemplo), anticancerígena (LIU et al., 2018); larvicida (ADU et al., 2014), antifúngica (RODIANAWATI, HASTUTI e CAHYANTO, 2015), entre outras. Esse leque de atividades realizadas com as espécies da família Myristicaceae ressalta o potencial biológico existente na família.

Do ponto de vista econômico a família se destaca pelo número de espécies utilizadas como especiarias, principalmente a *Myristica fragans* (noz-moscada) de grande valor comercial e originária da Malásia. Na América do Sul é vendido comercialmente a espécie *Otoba novogranatensis* (noz-moscada de otoba). A madeira também é utilizada para fins comerciais, destacando-se as madeiras dos gêneros *Scyphocephalum*, *Brochoneura* e *Iryanthera* pelo seu alto teor de sílica (QUINTANILHA e LOBÃO, 2017).

2.1 GÊNERO *Virola*

O gênero *Virola* compreende 48 espécies distribuídas na Ásia, África, Madagascar e na América. Na América, este gênero é o mais disperso, indo

desde a Guatemala ao Rio Grande do Sul, incluindo a costa ocidental da Colômbia e Equador ao Atlântico (VALDERRAMA, 2000).

No Brasil são descritas 35 espécies deste gênero (11 endêmicas), sendo geralmente encontradas nas florestas tropicais. Na bacia amazônica, por exemplo, 26 espécies já foram relatadas (QUINTANILHA e LOBÃO, 2017; RODRIGUES, 1989; SARTORELLI, YOUNG e KATO, 1998; FLORA DO BRASIL, 2017). As espécies existentes no Brasil estão listadas na **Tabela 1, p. 24**.

Tabela 1. Lista das espécies do gênero *Virola* presentes no Brasil e distribuição geográfica.

Espécie	Domínio Fitogeográfico	Distribuição Geográfica	Endemismo
<i>Virola albidiflora</i> Ducke	Amazônia	AM, AC, MT	NE
* <i>Virola bicuhyba</i> (Schott ex Spreng.) Warb. sin. <i>Virola oleífera</i> (Schott) A.C.Sm	Mata Atlântica	BA, MG, ES, SP, RJ, PR, SC, RS	E
<i>Virola caducifolia</i> W.A.Rodrigues	Amazônia	PA, AM	NE
<i>Virola calophylla</i> Warb.	Amazônia	RR, AP, PA, AM, AC, RO, MT	NE
<i>Virola calophylloidea</i> Markgr.	Amazônia	PA, AM, AC	NE
<i>Virola carinata</i> (Benth.) Warb.	Amazônia	AC, AM, AP, RO, RR, MT	NE
<i>Virola coelhoi</i> W.A.Rodrigues	Amazônia	AM	NE
<i>Virola crebrinervia</i> Ducke	Amazônia	AP, PA, AM, RO	E
<i>Virola decorticans</i> Ducke	Amazônia	AM, AC	NE
<i>Virola duckei</i> A.C.Sm.	Amazônia	AM, AC	NE
<i>Virola elongata</i> (Benth.) Warb. sin. <i>Virola cuspidata</i> (Benth.) Warb.	Amazônia	RR, AP, PA, AM, AC, RO, MT	NE
<i>Virola flexuosa</i> A.C.Sm.	Amazônia	AM, AC, PA, RO	NE
<i>Virola gardneri</i> (A.DC.) Warb.	Mata Atlântica	PE, BA, AL, MG, ES, SP, RJ	E
<i>Virola guggenheimii</i> W.A.Rodrigues	Amazônia	AP, PA, AM	E
<i>Virola lorentensis</i> A.C.Sm.	Amazônia	AM, AC	NE
<i>Virola malmei</i> A.C.Sm.	Amazônia, Cerrado	PA, AC, MT	E
<i>Virola marleneae</i> W.A.Rodrigues	Amazônia	AM	NE
<i>Virola michelii</i> Heckel sin. <i>Virola melinonii</i> Benist	Amazônia	AP, PA, AM, RO, RR, MA, MT	NE
<i>Virola minutiflora</i> Ducke	Amazônia	AC, AM, RO, MT	E
<i>Virola mollissima</i> (A.DC.) Warb. sin. <i>Virola divergens</i> Ducke	Amazônia	PA, AM, AC, RO, RR, MT	NE
<i>Virola multicostata</i> Ducke	Amazônia	PA, AM, RO, MT	E
<i>Virola multinervia</i> Ducke	Amazônia	PA, AM, AC, RO	NE
<i>Virola obovata</i> Ducke	Amazônia	AM	NE
<i>Virola officinalis</i> Warb.	Mata Atlântica	BA, MG, ES	E
<i>Virola parvifolia</i> Ducke	Amazônia	AM	NE
<i>Virola pavonis</i> (A.DC.) A.C.Sm.	Amazônia	AC, AM, RO, MT	NE
<i>Virola peruviana</i> (A.DC.) Warb.	Amazônia	AM, AC	NE
<i>Virola polyneura</i> W.A.Rodrigues	Amazônia	AM	NE
<i>Virola rugulosa</i> Warb.	Amazônia	AM	NE
<i>Virola sebifera</i> Aubl. Sin.	Amazônia, Cerrado,	RR, AP, PA, AM, TO,	NE

Heterotípico <i>Virola theiodora</i> (Spruce ex Benth.) Warb.	Mata Atlântica	AC, RO, MA, BA, MT, GO, DF, MG, SP, RJ	
<i>Virola sessilis</i> (A.DC.) Warb.	Amazônia, Cerrado	RO, MT	E
<i>Virola subsessilis</i> (Benth.) Warb.	Cerrado	TO, MA, PE, BA, PI, GO	E
<i>Virola surinamensis</i> (Rol. Ex Rottb.) Warb.	Amazônia, Caatinga	RR, AP, PA, AM, TO, AC, RO, MA, PI, CE, MT	NE
<i>Virola urbaniana</i> Warb.	Cerrado	TO, MA, BA, MT, GO, DF	E
<i>Virola venosa</i> (Benth.) Warb.	Amazônia	AP, PA, AM, RO, MT	NE

*NE= Não Endêmica no Brasil; E= Endêmica no Brasil.

Fonte: FORZZA, R. C. Catálogo de plantas e fungos do Brasil, v. 2. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

Das espécies de *Virola* vigentes no Brasil, apenas 7 apresentam estudo biológico. Destes, os extratos das diferentes partes das espécies (folhas, casca do tronco, frutos, arilos, sementes, resinas, raízes e galhos) foram os mais analisados. Dentre as 7 espécies, duas foram coletadas fora do território brasileiro (*V. calophylla* e *V. elongata*). A **Tabela 2, p. 26** sumariza os estudos biológicos das espécies de *Virola* presentes no Brasil.

Tabela 2. Estudos biológicos descritos para as espécies do gênero *Virola* (Myristicaceae).

Espécies do Gênero	Parte utilizada / Solvente	Atividade Biológica	Referência
<i>V. bicuhyba</i>	Folhas	Extrato (MeOH)	Efeito analgésico Kuroshima et al., 2001
		Extrato (EtOH)	Atividade enzimática Rangel et al., 2008
	Resina	---	Inibição da aterosclerose Coutinho et al., 2017
		---	Antioxidante Corrêa et al., 2018
		---	Gastroprotetora Pereira et al., 2017
---	Inibidor de Nefropatia Bôa et al., 2015		
<i>V. calophylla</i>	Madeira	Extrato (CH ₂ Cl ₂)	Antialimentação de insetos Miles et al., 1987
<i>V. elongata</i>	Casca	Extrato (MeOH)	Atividade locomotora Macrae e Towers, 1985
		Extrato (EtOH)	Antiúlcera gástrica Almeida et al., 2019
		(Z)-3,5,4'-trimetoxiestilbeno	Antimitótica Chabert, Fougerousse e Brouillard, 2006
<i>V. michelli</i>	Folhas	(7,4'-dimetoxi-3'-hidroxiflavona)	Anti-inflamatória Carvalho et al., 2010
<i>V. sebifera</i>	Folhas	Extrato (CH ₂ Cl ₂)	Denny et al., 2007
		Extrato A (EtOH)	Denny et al., 2008
		Fração Orgânica (FO)	Denny et al., 2007
		3,5-dihidro-2-(1'-oxo-3'-hexadecenyl)-2-ciclohexen-1-one	Denny et al., 2007
	(4'Z)1-hexadec-4'-enoyl-2,6-dihydroxybenzene	Denny et al., 2008	
	Sesamin, eudesmin, lignana 1, lignana 2	Antifúngica Pagnocca et al., 1996	
Sementes	Neolignanas	Antioxidante Rezende et al., 2005	

Espécies do Gênero	Parte utilizada / Solvente	Atividade Biológica	Referência
<i>V. surinamenses</i>	Seiva da casca	---	Citotóxica Beloz, 1992
		---	Antiulcerogênica Hiruma-Lima et al., 2009
	Folhas	Extrato (Hex, AcOEt, MeOH)	Antileishmaniose Veiga et al., 2017
	Resina da casca	Extrato (EtOH)	Anti-ulcerogênica Hiruma-Lima et al., 2009
	Folhas e plântulas	Óleo essencial	Anti-malária Lopes et al., 1999
	Raízes	Methoxy-galbelgin e grandisin jruenolide C e Epi-jruenolide C $\alpha,2'$ -dihidroxi-4,4'-dimetoxidiidrochalcona 7-hidroxiflavona 7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona Biochanin A e 2'-hidroxi-7,4'-dimetóxiisoflavona violane e violanol C	Antifúngica Lopes, Kato e Yoshida, 1999
	Folhas	Surinamensina e Virolina Grandisin	Alelopática Anti-inflamatória Borges et al., 2007 Carvalho et al., 2010
	Sementes	Óleo	Antimicrobiana Cordeiro et al., 2018
	Galhos	Veraguensin, Grandisin, Biochanin A, 2'-hidroxibiochanin A, 2'-hidroxiformonetin, $\alpha,2'$ -dihidroxi-4,4'-dimetoxidiidrochalcona, 7-hidroxiflavona, tri-O-metilfloroglucinol	Antitripanossoma Lopes et al., 1998
<i>V. venosa</i>	Folhas	Extrato (Hex, AcOEt, MeOH)	Antioxidante Inibição enzimática Fernandes et al., 2019
	Casca do tronco	Extrato (Hex, AcOEt, MeOH)	Antioxidante Inibição enzimática Fernandes et al., 2019

Das espécies descritas para o Brasil, apenas 10 apresentam algum tipo de estudo químico e/ou biológico. O que retrata a necessidade de estudos mais aprofundado para o gênero.

Das espécies mencionadas na **Tabela 1, p. 24** as mais estudadas do ponto de vista químico são *V. carinata*, *V. elongata* e *V. sebifera*. E em termos de atividade biológica, se destacam como as mais analisadas *V. sebifera* e *V. surinamenses*.

As principais classes de metabólicos secundários relatados para o gênero são: flavonoides, policetídeos, lignanas, neolignanas, ácidos graxos, taninos, terpenos e alcaloides (BARATA et al., 2000; BLUMENTHAL et al., 1997; LOPES, YOSHIDA e GOTTLIEB, 1983; MARTINEZ, ALDANA e CUCA, 1999; REZENDE e KATO, 2002; DENNY et al., 2007; FUNASAKI et al., 2016).

Dentre as espécies deste gênero, a que mais se destaca comercialmente é a *Virola sebifera* (ucuúba-vermelha, gordura-de-virola, ucuúba-do-cerrado), muito utilizada na indústria de cosméticos devido às propriedades como emoliente, hidratante e antisséptico (FUNASAKI et al., 2016). Além dessas propriedades, algumas espécies apresentaram atividade antimalárica (LOPES et al., 1999); antiproliferativa frente às linhagens NCI-460, MCF-7, NCI-ADR, UACC-62, OVCAR03 e PC03 (DENNY et al., 2007); anti-leshimania (BARATA et al., 2000; MORAIS et al., 2009); antifúngica (LOPES, KATO e YOSHIDA, 1999) e antioxidante (MORAIS et al., 2009).

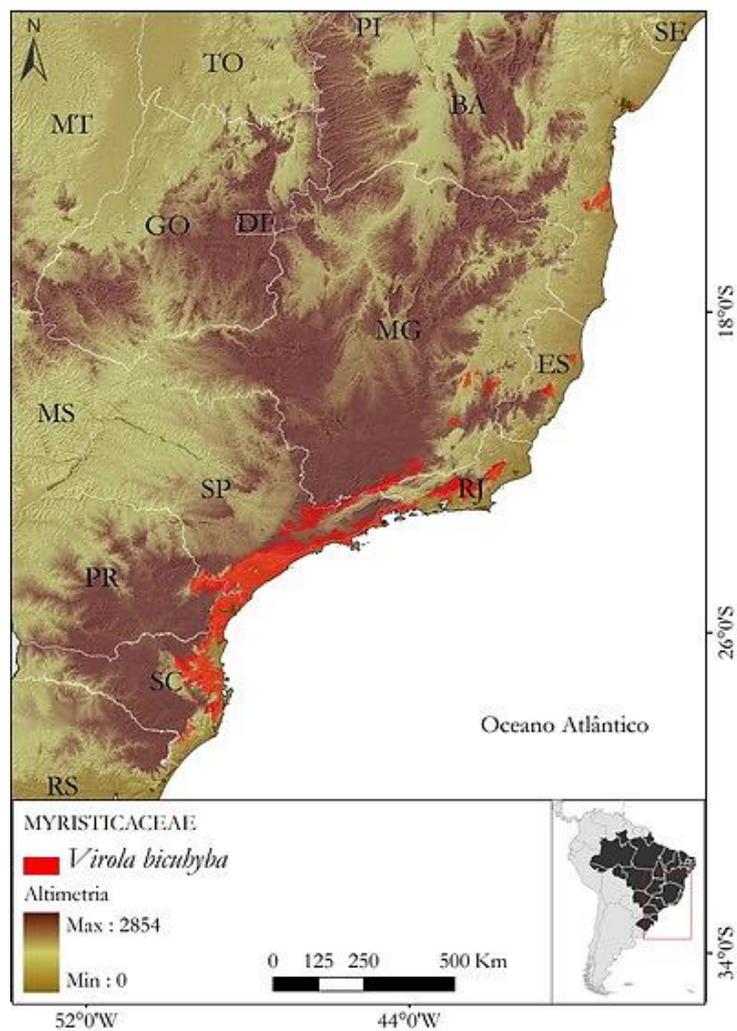
2.3 *Virola bicuhyba* (Schott ex Spreng.) Warb.

A espécie escolhida para fazer parte deste trabalho é a *Virola bicuhyba* (Schott ex Spreng.) Warb. sinônimo de *Virola oleífera* (Schott) A. C. Smith, é conhecida popularmente como bocuva, bicuíba-vermelha, bocuva-vermelha, ucuúba, paricá, Biguaçu, urucuíba e vicuíva. A espécie é endêmica do Brasil, com ampla distribuição no Domínio Fitogeográfico Mata Atlântica, nos estados das regiões Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (**Figura 4, p. 29**) (Rodrigues, 2009).

As espécies de *Virola* se apresentam como árvores de grande porte (20-30 m de altura), com folhas simples de 12-24 cm de comprimento e tronco de 50-90

cm de diâmetro. Sua florescência ocorre entre os meses de janeiro a maio e, frutifica nos meses de julho a início de novembro (LORENZI, 2000) (Figura 5, p. 30).

Figura 4. Mapa de distribuição da espécie *Virola bicuhyba* no Brasil.



Fonte: Site Jardim Botânico do RIO (<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Virola%20bicuhyba>), acessado em 18 de maio de 2019.

Figura 5. Imagens da árvore, folha, fruto e folha de *Virola bicuhyba*.



Fonte: LORENZI, 2000; GIEHL, 2010.

No entanto, a espécie *Virola bicuhyba* apresenta um histórico de controvérsias quanto a sua nomenclatura. Inicialmente esta espécie foi denominada como *Myristica bicuhyba* por Schott em 1827. Após uma revisão da família realizada Warburg (1897) passou a se chamar *Virola bicuhyba*. E, em 1937, após tratamento taxonômico de espécies de Myristicaceae americanas feita por Smith, a espécie passou a ser sinônimo de *Virola oleífera* (Schott) A.C. Smith. Por fim, a espécie deve seu nome legítimo reestabelecido, em 1998, por Rodrigues como *Virola bicuhyba* (Schott ex Spreng.) Warb. Atualmente a classificação taxonômica da espécie escolhida para esse estudo pode ser observada na **Tabela 3, p. 31**.

Tabela 3. Classificação taxonômica de *Virola bicuhyba*.

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Magnoliales
Família	Myristicaceae
Gênero	<i>Virola</i>
Espécie	<i>Virola bicuhyba</i>
Nomenclatura Binominal	<i>Virola bicuhyba</i> (Schott) Warb.

Virola bicuhyba apresenta ainda importância socioeconômica para o Brasil, devido ao seu uso na construção civil, carpintaria e marcenaria. Destaca-se também na ornamentação de parques e jardins e na composição de reflorestamentos de áreas degradadas de preservação permanente. Além de fornecer alimentos para uma grande variedade de pássaros, esta espécie é estrategicamente utilizada para agricultura familiar no Brasil (CNCFlora, 2019; LORENZI, 2000).

Na literatura, *Virola bicuhyba* se destaca como uma planta utilizada por comunidades locais circundantes à localização de coleta da espécie na cicatrização de feridas, como anti-inflamatório e anti-reumática (SARTORELLI, YOUNG e KATO, 1998).

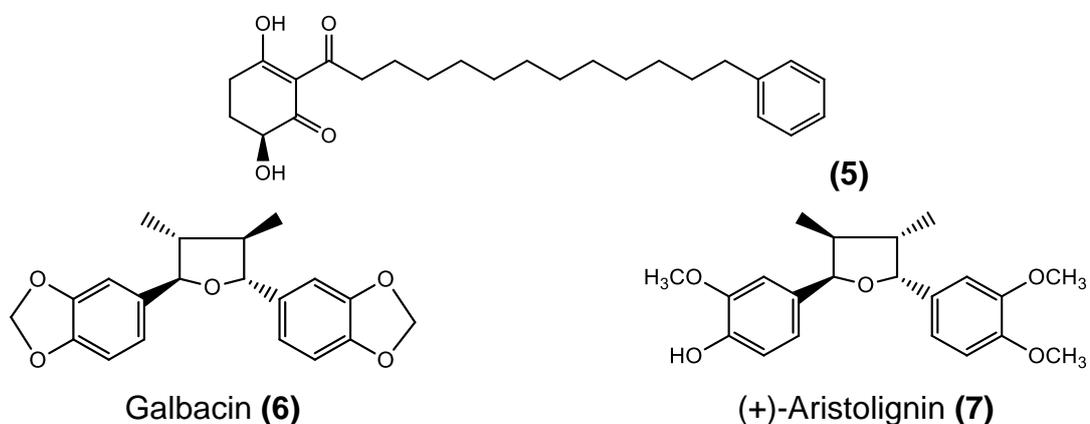
Apesar das propriedades anti-inflamatórias e de cicatrização relatadas como uso popular da espécie, pouco foi o interesse despertado na comunidade científica a fim de aprofundar os estudos em termos de atividade biológica. As propriedades farmacológicas atribuídas na literatura para *Virola bicuhyba* estão resumidas na **Tabela 4, p. 32**.

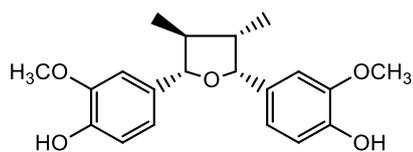
Tabela 4. Tabela dos principais estudos de atividades biológicas realizados para *Virola bicuhyba* (Schott) Warb.

Parte Utilizada	Atividade	Resultado da Atividade	Referência
Arilos (lignanais/CH₂Cl₂)	Antifúngica	Ativos numa concentração mínima de 25 µg	SARTORELLI, YOUNG e KATO, 1998
Folhas (extrato/MeOH)	Analgésico	Inibição de 39,8±3,9%	KUROSHIMA <i>et al.</i> , 2001
Resina	Antioxidante		PEREIRA <i>et al.</i> , 2017; BÔA <i>et al.</i> , 2015
	Antiulcerogênica		PEREIRA <i>et al.</i> , 2017
	Nefropatia induzida por contraste		BÔA <i>et al.</i> , 2015

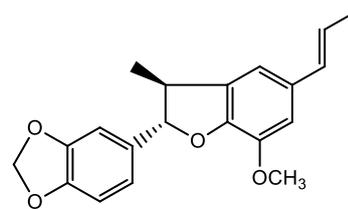
Na literatura encontramos trabalhos que descrevem o isolamento dos constituintes químicos das folhas e arilos de espécie coletada na Reserva Florestal Ubatuba (SP), Ilhota (SC) e Vale do Ribeira (SP), onde é possível verificar a presença de três flavonoides (**21-23**), quinze neolignanas (**6-20**) e um policetídeos (**5**) fazendo um total de 19 substâncias identificadas para esta espécie e além da determinação qualitativa de presença de flavonoides (FERNANDES, BARATA e FERRI, 1993, AZEVEDO *et al.*, 1997; SARTORELLI, YOUNG e KATO, 1998; KUROSHIMA *et al.*, 2001, PEREIRA *et al.*, 2017). Os metabólitos isolados e identificados na espécie são apresentados na **Figura 6, p. 32**.

Figura 6. Constituintes químicos isolados de *Virola bicuhyba*.

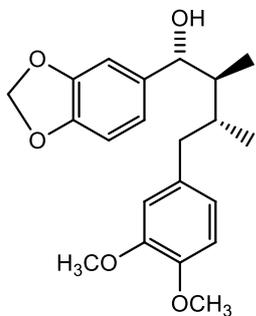




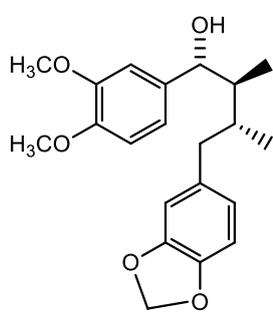
Verrucosin (8)



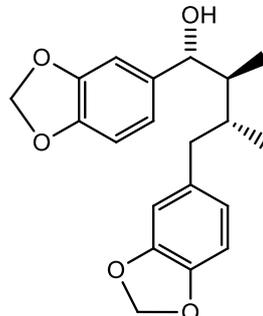
(9)



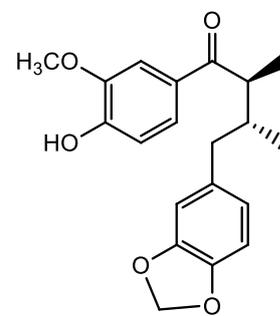
Oleiferin A (10)



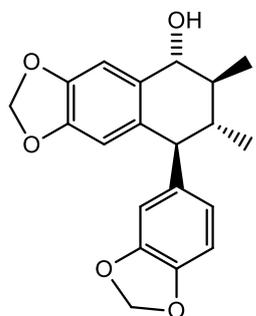
Oleiferin B (11)



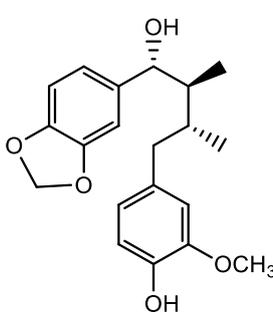
Oleiferin C (12)



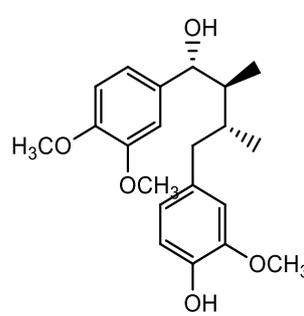
Oleiferin D (13)



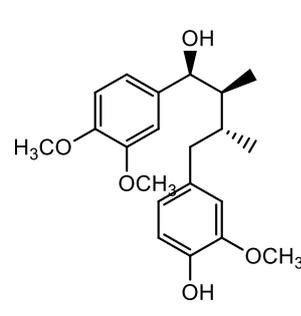
Oleiferin E (14)



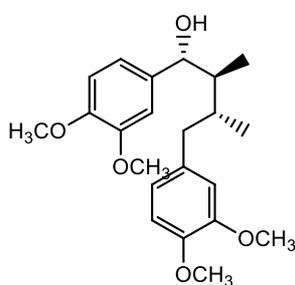
Oleiferin F (15)



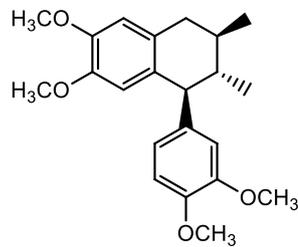
Oleiferin G (16)



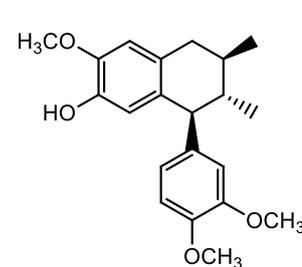
Oleiferin H (17)



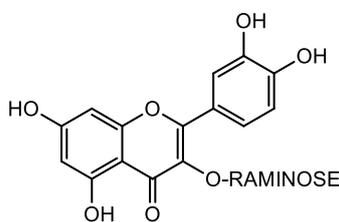
(18)



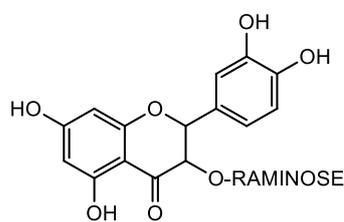
Galbulin (19)



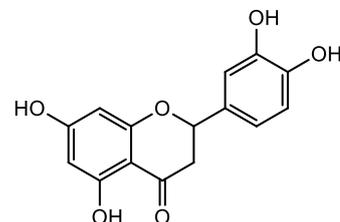
(20)



(21)



(22)



(23)

2.4 QUIMIOSSISTEMÁTICA

O interesse em classificar o que nos cerca está imbuído no ser humano desde os tempos remotos. A Quimiotaxonomia, entendida como o estudo da significância de ocorrência de determinados compostos químicos em seres vivos, se tornou uma ferramenta comum e muito importante nos estudos sistemáticos do Reino Vegetal (KAPLAN et al., 2010). Dessa forma, em se tratando do Reino Vegetal, não apenas dados morfológicos têm sido levados em consideração, mas também os dados químicos representados principalmente pelos metabólitos secundários utilizados em estudos que visam o estabelecimento de relações filogenéticas. Essa junção de áreas (dados morfológicos e dados químicos) é o alvo da quimiosistemática (GOTTLIEB e BORIN, 2012).

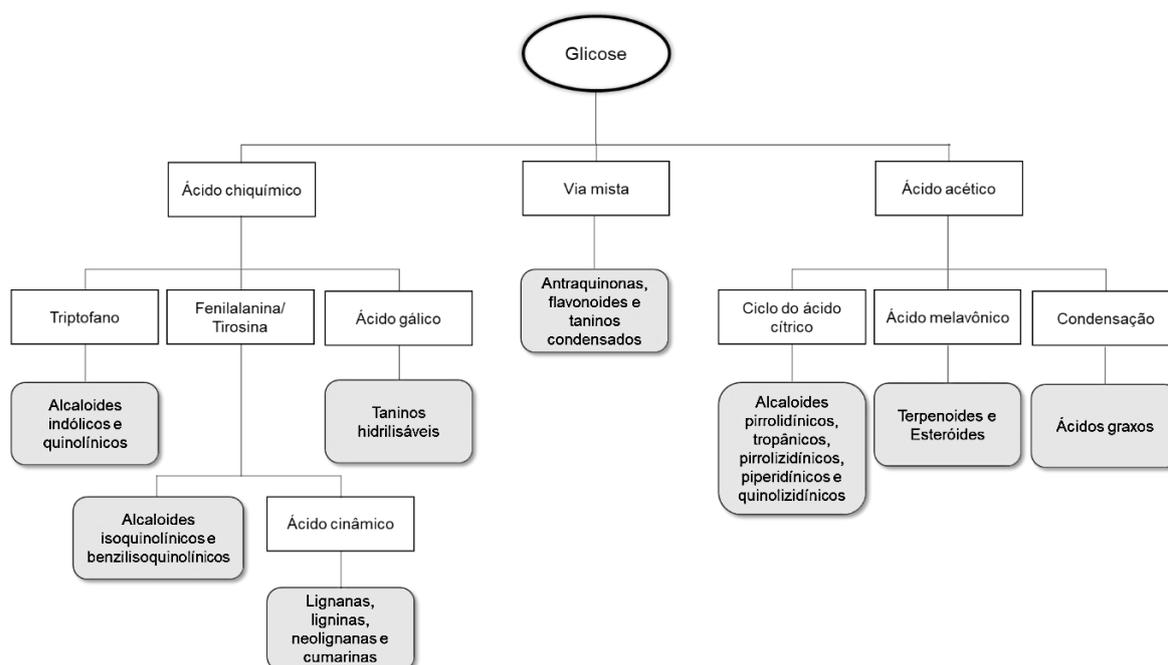
O metabolismo vegetal pode ser dividido em dois grandes grupos baseados nos produtos químicos produzidos: metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário corresponde a produção e modificação de moléculas vitais e com funções bem definidas para praticamente todos os organismos vivos, são elas: os carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (DEWICK, 2002). As moléculas provenientes desse metabolismo são chamadas de metabólitos primários e estão intimamente ligados à manutenção da vida do organismo produtor (SANTOS, 1999).

Já o metabolismo secundário ocorre numa proporção mais limitada, apenas em organismos específicos. As moléculas originadas desse metabolismo possuem funções específicas, tais como defesa contra predadores, como atrativo para a mesma ou outras espécies, agentes corantes para avisar ou atrair outras espécies, entre outros. Essas moléculas caracterizam-se como elementos de diferenciação e especialização, garantindo vantagens para a sobrevivência e perpetuação da espécie no ecossistema (DEWICK, 2002; SANTOS, 1999). Exemplos de metabólitos secundários são os taninos, saponinas, alcaloides, flavonoides, óleos voláteis, entre outros. Um esquema resumido da biossíntese responsável pela produção dos metabólitos secundários é mostrado na **Figura 7, p. 35**.

A via metabólica do ácido chiquímico tem origem na condensação de dois metabólitos da glicose resultando no ácido chiquímico. Este, por sua vez, originará aminoácidos aromáticos que são os precursores dos alcaloides,

fenilpropanóides e taninos. Já a via do acetato, tem início no ciclo do ácido cítrico na matriz mitocondrial gerando a espécie reativa e intermediária acetil-tio-coenzima A (acetil-SCoA) que é o precursor de vários grupos de substâncias. Dentre as substâncias geradas pelo acetil-SCoA, tem-se os alcaloides, terpenóides, esteróis, ácidos graxos e triglicerídeos. A terceira via metabólica, a via mista ou via do melavonato, forma os metabólitos da classe dos flavonoides, antraquinonas e taninos condensados.

Figura 7. Esquema de biossíntese do metabolismo secundário.



Fonte: Adaptado de SOUSA, 2016.

As famílias pertencentes a super ordem Magnolideia possuem baixo índice de herbacidade (IH), o que as caracteriza como organismos ainda primitivos, cuja principal via metabólica é a via do ciquimato, resultando como principais metabólitos secundários lignanas, neolignanas e alcaloides benzilisoquinolínicos (GOTTLIEB, KAPLAN e BORIN, 1996).

Portanto, a elaboração de uma proposta quimiossistemática para a família Myristicaceae e em especial o gênero *Virola*, é uma importante colaboração para o estudo da linguagem química (termo proposto por Otto Gottlieb) apresentada por esta família.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Compreender as relações dentro do gênero *Virola* da família Myristicaceae através de dados quimiosistemáticos e avaliar o perfil fitoquímico biomonitorado da espécie *Virola bicuhyba* através da atividade larvicida, antineoplásica e antimalárica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análise quimiosistemática e de ocorrência de metabólitos especiais nas espécies do gênero *Virola* da família Myristicaceae;
- Avaliar, *in vitro*, a atividade larvicida dos extratos brutos da espécie frente às larvas do terceiro estágio de *Aedes aegypti*;
- Avaliar, *in vitro*, a atividade antineoplásica dos extratos e frações e/ou substâncias puras de *Virola bicuhyba* frente à linhagem U937.
- Avaliar, *in vitro*, a atividade antimalárica dos extratos e frações de *V. bicuhyba* obtidos frente à cepa *Plasmodium falciparum* (resistente à cloroquina).
- Estudo fitoquímico guiado por bioensaios visando isolar e identificar os metabólitos especiais presentes nas frações.
- Caracterizar as moléculas presentes nas frações dos extratos brutos por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (¹H e ¹³C NMR) e, cromatografia à gás acoplada com espectrometria de massa (CG-MS).

4 METODOLOGIA

4.1 METODOLOGIA PARA A QUIMIOSSISTEMÁTICA

Para esta etapa da análise quimiossistemática da família Myristicaceae foi realizado o levantamento dos dados químicos registrados na literatura no *Chemical Abstract Service* mediante o acesso das obras disponibilizadas no indexador *Scifinder*, *ScienceDirect* e *PubMed*.

O levantamento abrangeu o período de 1965 até março de 2019 através das palavras-chave: nome da família (Myristicaceae), o nome de cada um dos seus gêneros, e o nome de cada espécie do gênero *Virola*. Completando-se as informações, quando necessárias, com consultas às referências originais. Com os dados obtidos foi possível organizar o registro dos metabólitos secundários em tabelas por meio de sua ocorrência.

O Número de Ocorrência (NO) é um parâmetro químico que fornece o grau de relevância de uma determinada categoria metabólica para um táxon escolhido. Ou seja, NO representa o número de substâncias de uma determinada classe química produzidas por um táxon (GOTTLIEB, KAPLAN e BORIN, 1996).

Nesse sentido, os valores do NO não apresentam uma padronização, portanto, a normalização desses dados foi realizada através da divisão do número de ocorrências pelo número de espécies da família (NO/sp) - Equação 1. Obtendo-se o NO para uma espécie hipotética da família e que representa suas características médias.

$$\frac{NO}{sp} \quad \text{(Equação 1)}$$

A segunda etapa foi o cálculo dos Índices Químicos Particulares, visando a representação individual das categorias biogenéticas das substâncias químicas registradas determinando-se o nível de oxidação (O) – Equação 2.

$$O = \frac{x-h}{n} \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde:

x: número de ligações C-heteroátomo;

h: número de ligações C-H;

n: número de átomos de C do esqueleto molecular.

Após os cálculos dos parâmetros individuais, foi obtido o parâmetro de avanço evolutivo de oxidação (AEo) – Equação 3 - do gênero *Virola* a partir das moléculas das rotas biossintéticas da via do Acetato e da via do Chiquimato.

$$\text{AEo} = \frac{\Sigma O}{\text{Número de substâncias}} \quad (\text{Equação 3})$$

4.2 ENSAIO BIOLÓGICO DE EXTRATOS E FRAÇÕES

Os estudos investigativos da atividade antineoplásica *in vitro* foram efetuados no Laboratório de Biologia do Reconhecer – LBR-CBB/UENF, sob supervisão do Prof. Milton Kanashiro. A avaliação antimalárica *in vitro* foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Malária (CPD-Mal) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), sob supervisão do Prof. Leonardo José de Moura Carvalho. E os estudos da atividade larvicida foram efetuados no Laboratório de Biotecnologia – LBT-CBB/UENF, sob supervisão do prof. Francisco José Alves Lemos.

4.2.1 Atividade Larvicida

4.2.1.1 Colônia de mosquitos

Os testes foram realizados com larvas do terceiro instar obtidas do insetário do LBT. As larvas foram criadas em bandejas com água e a alimentação baseada em ração canina triturada sendo efetuada diariamente.

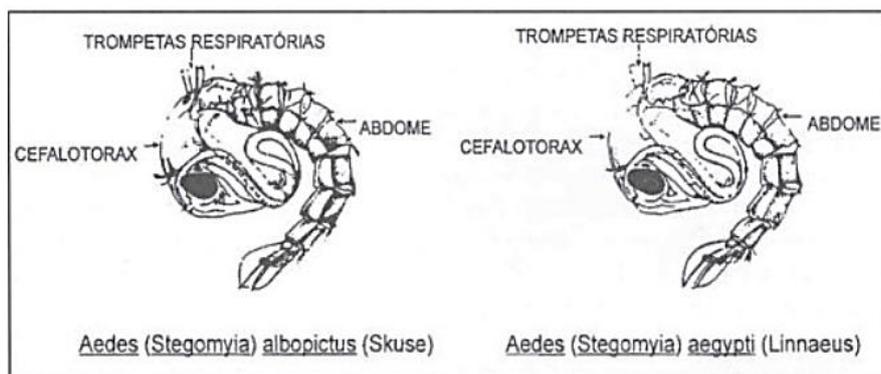
4.2.1.2 Ensaio de mortalidade de larvas

A metodologia empregada para o ensaio larvicida foi semelhante a utilizada por WHO (2005). Uma solução-mãe (1%) foi obtida por pesagem de 250 mg do extrato das folhas de *Virola bicuhyba* em 25 mL de solvente (MeOH). A solução-mãe foi diluída (dez vezes) em água destilada (25 mL). As concentrações de teste foram obtidas adicionando 0,1-20 mL da diluição apropriada a 100 mL de água destilada.

Grupos de 20 larvas do terceiro instar de *A. aegypti* foram mantidos por 24 horas na presença dos extratos. O experimento foi feito em triplicata. Após 24 horas as larvas mortas foram contadas e as médias de mortalidade calculada.

As larvas que tiveram pupados (**Figura 8, p. 39**) durante o período de teste negarão o teste. Se mais de 10% das larvas de controle fizerem a pupação durante o experimento, o teste deve ser descartado e repetido.

Figura 8. Imagem de pupa (fase que ocorre a metamorfose do estágio larval para o adulto) de duas espécies de *Aedes*.



Fonte: <http://www.pbh.gov.br/smsa/montapagina.php?pagina=bhdengue/biologia.htm>. Acessado dia: 02/01/2018.

Se a mortalidade do controle estiver entre 5% e 20%, as mortalidades dos grupos tratados foram corrigidas de acordo com a fórmula de Abbott (Equação 4).

$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{X-Y}{X} 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Onde:

X: Percentagem de sobrevivência no controle não tratado

Y: Percentagem de sobrevivência na amostra tratada.

4.2.2 Atividade Antineoplásica

4.2.2.1 Manutenção das linhagens

As linhagens celulares neoplásicas foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC). As células foram mantidas em garrafas de cultura de 25 cm² com meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient F-12 Ham* (DMEM/F-12) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 20 µg mL⁻¹ de gentamicina (Gibco).

4.2.2.2 Avaliação da viabilidade celular das amostras frente às células neoplásicas

A viabilidade dos extratos e frações correspondentes frente às células neoplásicas foi avaliada através de ensaio colorimétrico por redução de bromídeo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-(2,5-difeniltetrazólio) - MTT (Koh et al., 1987 e Mosmann, 1983).

Nesse ensaio células foram plaqueadas em volume de 100 μL por poço em placas de 96 poços numa concentração de 1×10^6 células mL^{-1} . O controle negativo corresponde às células mantidas com meio de cultura DMEM/F-12 suplementado a 10% SFB e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina. O controle positivo equivale ao fármaco doxorrubicina.

As amostras selecionadas para a realização desse ensaio foram obtidas a partir do preparo de uma solução *stock* dos extratos/frações na concentração de 200 mg mL^{-1} empregando-se dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) para solubilizar. As alíquotas foram preparadas em diluição seriada em meio de cultura DMEM/F-12 suplementado a 10% SFB e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina variando de 12,5-400 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Após 48 horas de incubação com as amostras, adicionou-se 20 μL da solução de MTT (Sigma, 5 mg mL^{-1} em PBS) para cada 100 μL de cultivo. As placas foram mantidas na estufa a 37 °C com 5% de CO_2 e umidade controlada por quatro horas. Após esse período 150 μL foram retirados do sobrenadante de cada poço adicionando-se 100 μL de uma solução de 0,0014 % de HCl fumegante com isopropanol (Merck), homogeneizando bem até a completa dissolução dos cristais púrpuros. Para separar o precipitado, as placas foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm e 100 μL do sobrenadante foi transferido para outra placa de cultura de 96 poços e lida em espectrofotômetro (Epoch™, BioTek® Instruments, Inc.) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas em três ensaios independentes.

Para o cálculo do IC_{50} , os dados foram plotados no Microsoft Excel® (Microsoft® Office 365) e analisados mediante o programa GraphPad versão 8.0.

Para este experimento foi utilizado o teste estatístico *Two-way ANOVA*. As diferenças significativas foram consideradas como $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$.

4.2.3 Atividade Antimalárica

4.2.3.1 Cultivo contínuo do *Plasmodium falciparum*

Foi utilizada a cepa W2 de *P. falciparum* (resistente à cloroquina), disponibilizada pelo Laboratório de Pesquisa em Malária (CPD-Mal) do IOC/Fiocruz. A metodologia utilizada no cultivo foi a de Trager & Jansen (1976) e o cultivo utilizou hemácias humanas provenientes de bolsas de sangue do tipo A+ cedidas pelo Instituto de Biologia do Exército (IBEx). O meio de cultivo utilizado foi RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 21 mM de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), 25 mM de hepes (Sigma-Aldrich), 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina (Nova Farma), 11 mM de glicose (Sigma-Aldrich) e 10% de soro humano desativado. As culturas foram mantidas em frascos próprios para cultura, com um hematócrito $\approx 6\%$ incubada a 37° C em atmosfera reduzida de oxigênio (aproximadamente 5% de CO₂, 90 - 92% de N₂ e 3 - 5% de O₂). A manutenção da cultura foi feita com a troca do meio a cada 24 horas e o acompanhamento realizado através de esfregaços sanguíneos corados com kit de panótipo rápido (Laborclin) ou pela técnica de coloração com Giemsa (Laborclin) e a parasitemia obtida através de observação ao microscópio óptico Nikon Eclipse 80i com objetiva de imersão (1.000x) Quando detectadas altas parasitemias diluições com hemácias não parasitadas foram realizadas.

4.2.3.2 Sincronização do cultivo

Para os testes *in vitro* a sincronização do cultivo é necessária para a obtenção de formas jovens (anéis), através de sincronização com sorbitol conforme descrito na literatura (Lambros e Vanderberg, 1979). Inicialmente foi feito um esfregaço sanguíneo para observação do estágio de amadurecimento do parasito e contagem da parasitemia. No momento em que a cultura apresentou predomínio de anéis a mesma foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos e retirou-se o sobrenadante. Foi acrescentado 10 mL de D-sorbitol (5% em glicose

0,5%), e incubado a 37 °C por 10 minutos. Logo após foi levado a nova centrifugação por 5 min, retirou-se o sobrenadante e lavou-se com meio. Posteriormente foi feito novo esfregaço para contagem da parasitemia. O hematócrito e a parasitemia, pré-determinados para o teste, foram ajustados com a adição de hemácias e meio RPMI completo em quantidades adequadas.

4.2.3.3 Preparo das placas para os ensaios de quimioterapia

Culturas de parasitos sincronizadas com predomínio de anéis de *P. falciparum* foram distribuídas em microplacas de 96 poços (Corning) adicionando-se 180 µL por poço de meio de cultura RPMI contendo: 0,05% de parasitemia e 1,5% de hematócrito para o teste de ELISA anti-HRP2. Anteriormente à adição da suspensão dos parasitos, 20 µL dos compostos a serem testados foram adicionados a placa teste, em triplicata, e em diferentes concentrações seriadas (100 µg mL⁻¹ - 1,5 µg mL⁻¹). Os poços controles (seis por teste) continham hemácias infectadas sem adição dos compostos-testes (controle positivo). O antimalárico padrão, cloroquina (Sigma-Aldrich), foi testado em paralelo em todos os experimentos realizados, em diluições seriadas de 1000 - 1 nM. As placas-testes foram incubadas por 24 h a 37 °C, e o conteúdo de seis poços (controle positivo) foi retirado e congelado à -20°C para ser utilizado posteriormente como *background*. A placa foi novamente incubada por 48 h nas condições ideais para o crescimento do parasito. Após 72 h totais de incubação, as placas foram congeladas e descongeladas duas vezes a -70 °C para que houvesse a lise das hemácias.

4.2.3.4 Preparo das placas para teste imunoenzimático anti-HRP2

Para a sensibilização das placas no teste anti-HRP2, 100 µL do anticorpo primário (MPFM-55A ICLLAB®, EUA) a 1,0 µg mL⁻¹ foram adicionados a cada poço da placa de ensaio (Maxysorp, Nunc, Denmark). Após incubação por 12-16 h a 4°C, o conteúdo dos poços foi descartado e 200 µL por poço de uma solução de bloqueio (PBS-BSA 2%) adicionada, sendo a placa mantida à temperatura ambiente por 2 h. Após esse tempo, o conteúdo dos poços foi novamente descartado e a placa lavada três vezes com PBS-Tween 20 a 0,05% (PBS-T).

4.2.3.5 Teste imunoenzimático anti-HRP II

No ensaio imunoenzimático anti-HRP II (Noedl et al., 2002) a cada poço da placa pré-sensibilizada foram adicionados 100 µL das amostras da cultura de *P. falciparum* hemolisadas. Em seis poços da placa foram adicionados 100 µL dos controles congelados nas primeiras 24 h (*background*). A placa foi então incubada por 1 h à temperatura ambiente, em câmara úmida, em seguida foi lavada três vezes com PBS-T, adicionando-se a cada poço 100 µL do anticorpo secundário (MPFG55P ICLLAB®, EUA) diluído a 1:5.000. Após incubação à temperatura ambiente por 1 h, em câmara úmida, a placa foi lavada três vezes com PBS-T e 100 µL de uma solução de 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) acrescentados a cada poço. A placa foi incubada por 5 a 10 min à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, e a reação interrompida adicionando-se 50 µL poço⁻¹ de uma solução de ácido sulfúrico 1 M. A leitura das absorvâncias foi realizada à 450 nm em espectrofotômetro de microplacas Spectramax 190 (leitor de ELISA).

A partir do resultado obtido prosseguiu-se para o cálculo de concentração inibitória para 50% do crescimento dos parasitos (IC₅₀).

4.2.3.6 Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento do parasito (IC₅₀)

A inibição do crescimento de 50% dos parasitos foi determinada através de curvas dose-resposta, em função de regressão não linear. Foi utilizado o programa Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA), para determinar o valor de IC₅₀.

4.3 ESTUDO FITOQUÍMICO

4.3.1 Materiais de Ensaio Fitoquímico

4.3.1.1 Reagentes, solventes e soluções

Todos os solventes e reagentes utilizados neste trabalho possuem grau de pureza analítica (P.A.) LabSynth (São Paulo, Brasil).

Para a realização dos processos cromatográficos foi utilizada sílica gel SiliaFlash® G60: 60-200 µm (TediaBrasil) para cromatografia de camada delgada.

A solução reveladora (vanilina sulfúrica) foi preparada adicionando-se três gramas de vanilina em 135 mL de água destilada, 135 mL de etanol e 30 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado.

4.3.1.2 Instrumentação

4.3.1.2.1 Cromatografia à gás

O sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) é composto pelo cromatógrafo GCMS-QP5050A Shimadzu (Kyoto, Japão) existente no LCQUI-UENF.

4.3.1.2.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros foram obtidos no aparelho modelo DPX-500 da marca Bruker (Billerica, EUA) existente no LCQUI-UENF.

4.3.1.2.3 Espectroscopia de Massas com Ionização por *electrospray* (ESI(-)-MS e ESI(-)-MS/MS)

Os espectros de massas foram obtidos empregando-se espectrômetro de massas MicroTOF LC Bruker Daltonics. A técnica de ionização utilizada foi a de ionização por *electrospray*, em modo negativo (ESI(-)-MS) e ESI(-)-MS/MS), empregando se acetonitrila/água (5:95). As análises foram realizadas no LCQUI-UENF.

4.3.2 Material Botânico

4.3.2.1 Coleta do material botânico

A espécie *Viola bicuhyba* (Schott ex Spreng.) Warb. foi coletada em setembro/2013 e em outubro/2015 na Reserva Biológica União, localizada na BR-101 entre os municípios de Casimiro de Abreu, Macaé e Rio das Ostras.

A espécie foi classificada no Herbário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (HUENF) sob responsabilidade do professor Rafael Oliveira Lima e a exsicata foi depositada sob o código HUENF00009772.

4.3.3 Metodologia para triagem fitoquímica

4.3.3.1 Teste para esteroides e terpenoides (Liebermann-Burchard)

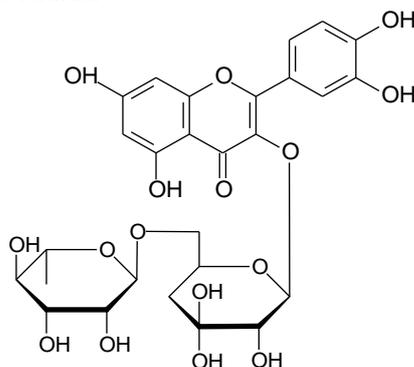
Dissolveram-se 10 miligramas das amostras estudadas em 1 mL de clorofórmio, contidos em 4 tubos de ensaio. Em seguida, filtrou-se cada solução clorofórmica e foi adicionado 2 mL de anidrido acético, agitou-se cada tubo suavemente e pelas paredes destes, adicionou-se cuidadosamente 1 mL de H₂SO₄ concentrado. Pouco depois, tornou-se a agitar suavemente e observou-se uma rápida mudança de cores, da cor azul para a cor verde (MATOS, 1997).

Para a presença de esteroides deve-se observar coloração azul seguida de verde permanente. E para a presença de triterpenoides observa-se uma coloração parda até vermelha (MATOS, 1997).

4.3.3.2 Teste para flavonoides (Shinoda)

Foram solubilizados 10 mg das amostras em volumes de metanol iguais a 3 mL, contidos em cada tubo. Em seguida, filtrou-se e foram adicionados 1 mL de ácido clorídrico concentrado. Logo após as soluções reagiram com 1 cm de fita de magnésio. O término da reação é indicado pelo fim da efervescência (MATOS, 1997). Preparou-se uma solução de controle positivo através do mesmo procedimento, porém utilizando como padrão o flavonoide rutina (**Figura 9**, p. 45).

Figura 9. Estrutura do flavonoide rutina.



O surgimento de uma coloração vermelha é indicativo da presença de flavonoides (flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídios) (MATOS, 1997).

4.3.3.3 Teste para polissacarídeos

Em 4 tubos de ensaio foram adicionadas duas gotas de solução a 1% (m/v) de bórax seguidas de duas gotas de fenolftaleína, resultando em solução cor de rosa. Adicionou-se 10 mg dos extratos sequencialmente sobre as soluções, esse procedimento pode ocasionar o desaparecimento da coloração rosa, que reaparece com o aquecimento e some novamente com o resfriamento. Se tal fenômeno for observado, a reação é positiva para a presença de polissacarídeos (MATOS, 1997).

4.3.3.4 Teste para saponinas (Espuma)

Para a identificação de saponinas, solubilizou-se as amostras (VBF e VBC) num volume entre em 1 a 2 mL de clorofórmio. Em seguida, separou-se a parte solúvel (utilizada na metodologia de teste de esteróides e triterpenoides) e a parte insolúvel neste solvente orgânico.

A parte insolúvel de cada amostra foi dissolvida em 5 a 10 mL de água destilada e filtrada para um tubo de ensaio. Agitou-se cada tubo contendo o filtrado fortemente por 2 a 3 minutos e observou-se se ocorria a formação de espuma.

A presença de espuma persistente e abundante confirma a presença de saponinas (heterósides saponínicos) (MATOS, 1997).

4.3.3.5 Quantificação de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes no extrato etanólico das folhas foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu com modificações propostas por Sousa e colaboradores (2007). Para começar, solubilizou-se 20 mg do extrato etanólico das folhas em 10 mL de MeOH em um balão volumétrico (10 mL). Em seguida,

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 2 minutos. Passado este tempo, 2 mL de solução de Na₂CO₃ a 15% m/v foram adicionados à mistura e agitada por 30 segundos. O volume foi completado para 10 mL com água destilada e, após 2 h de reação, a absorbância das amostras foi medida, no comprimento de onda 750 nm, utilizando-se cubetas de vidro. Para comparação foi realizado um teste em branco utilizando todos os reagentes sem adição de extrato.

O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10 a 350 µg mL⁻¹) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. A Equação da curva de calibração do ácido gálico foi $A = 0,07219015 + 0,098714 \cdot C$, onde C é a concentração do ácido gálico, A é a absorbância a 750 nm e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,999$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.3.4 Metodologia de Estudo Fitoquímico

Nesta fase do trabalho foram utilizadas principalmente as técnicas cromatográficas de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).

O grau de pureza das substâncias foi avaliado através de CCDA, cromatografia com fase gasosa e dados espectrais.

Na elucidação estrutural e na identificação das substâncias isoladas foram utilizados os seguintes métodos espectroscópicos: Espectrometria de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ¹H), de carbono-13 (RMN ¹³C), uni e bidimensionais de RMN ¹H e ¹³C (HSQC e HMBC).

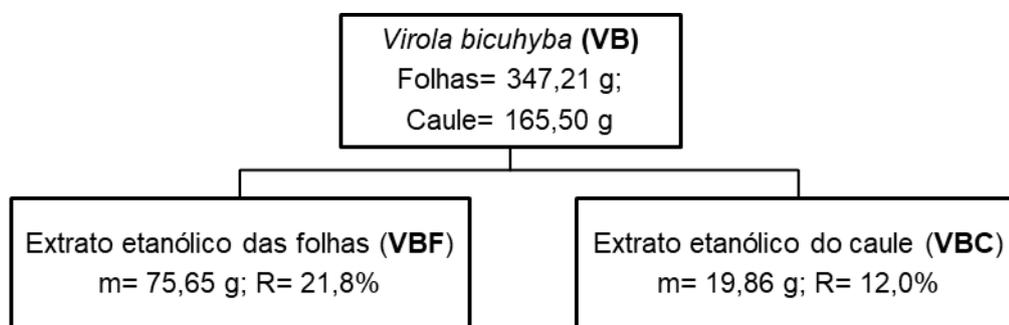
4.3.4.1 Obtenção do extrato bruto e frações das folhas e do caule de *V. bicuhyba* (VB).

Após a coleta, a secagem do material foi realizada em estufa com circulação de ar, 40°C. Estando o material seco, foi então submetido à trituração em moinho de facas (folhas: VBF = 347,21 g e caule: VBC = 165,50 g).

As folhas secas e moídas foram submetidas à extração a frio em

temperatura ambiente (25 °C) por percolação, tendo como solvente etanol. Ao passo que o caule moído foi submetido à extração a frio, também à temperatura ambiente, por maceração estática utilizando igualmente etanol como solvente. As soluções obtidas foram destiladas à pressão reduzida em evaporador rotativo obtendo-se, então, o extrato bruto. Para obter o extrato totalmente seco, ele foi submetido à liofilização a fim de que todo o resíduo de água fosse retirado. No fluxograma disposto na **Figura 10 (p. 48)** consta um resumo das etapas e das massas obtidas.

Figura 10. Fluxograma de obtenção inicial dos extratos em etanol das folhas e do caule de *V. bicuhyba* (VBF e VBC).

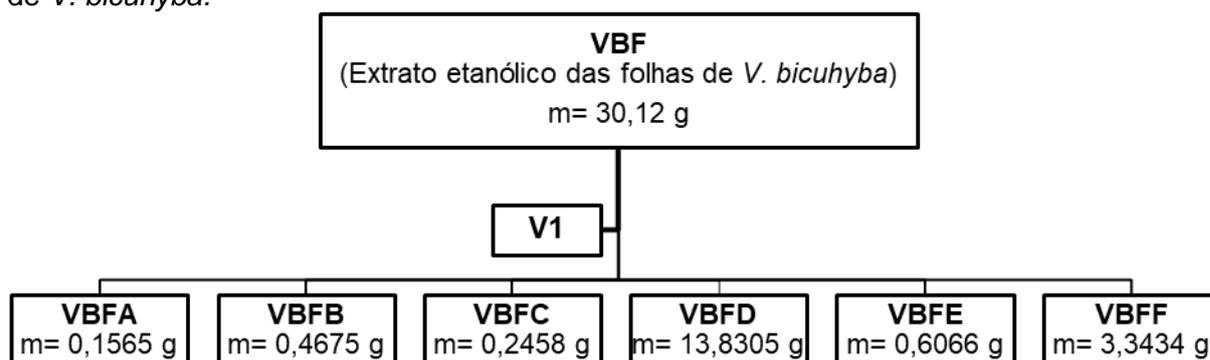


Fonte: Autor.

4.3.4.2 Partição do extrato etanólico das folhas *V. bicuhyba*

O extrato bruto etanólico das folhas foi submetido a uma cromatografia em coluna à pressão normal, tendo a fase estacionária empacotada sem solvente a fim de obter um fracionamento a seco. Cerca de 5,00 g da amostra (VBF) foi submetida à uma pastilha de sílica gel (SiliaFlash@ G60) em um funil de Büchner, com sistema de filtração à vácuo. Utilizou-se solventes em ordem crescente de polaridade HEX, AcOEt e MeOH. Após realizar uma análise qualitativa por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), as alíquotas foram reunidas por ordem de similaridade, dando origem as respectivas frações: VBFA, VBFB, VBFC, VBFD, VBFE e VBFF apresentadas na figura abaixo (**Figura 11, p. 49**).

Figura 11. Fluxograma das frações resultantes da partição à seco do extrato das folhas de *V. bicuhyba*.



Observado o perfil cromatográfico de cada uma das frações qualitativamente, através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e, sobretudo, em função dos resultados obtidos pelas atividades biológicas testadas para o extrato e frações. O trabalho se concentrou nas frações VBFD e VBFE. As frações não trabalhadas são justificadas por não apresentarem atividade significativa frente aos ensaios biológicos aqui descritos.

A descrição das análises cromatográficas realizadas para as frações VBFD e VBFE, escolhidas para o estudo fitoquímico, são relatados a seguir.

4.3.4.3 Análise da fração VBFD (m= 13,8305 g)

A fração VBFD foi submetida a uma cromatografia em coluna à pressão normal filtrante, empacotada com sílica gel em diclorometano como fase estacionária. A fase móvel foi constituída de solventes em ordem crescente de polaridade CH_2Cl_2 , AcOEt, MeOH e ACN, resultando nas frações VBFD1, VBFD2, VBFD3 e VBFD4 (**Tabela 5, p. 49**).

Tabela 5. Estudo cromatográfico da fração VBFD.

Frações reunidas	Códigos	Massa (g)	Observação
1-2	VBFD1	2,1919	Não trabalhada
3	VBFD2	3,5027	Trabalhada
4	VBFD3	5,0035	Não trabalhada
5-6	VBFD4	1,2658	Não trabalhada

4.3.4.3.1 Análise da fração VBFD2 (m= 3,5027 g)

A fração VBFD2 foi submetida à cromatografia em coluna a pressão normal em sílica gel empacotada com hexano. A fase móvel foi constituída por uma mistura de solventes em gradiente de polaridade crescente de HEX:CH₂Cl₂. Foram coletadas 123 frações reunidas após análise qualitativa por cromatografia em camada delgada analítica em 19 novas frações (**Tabela 6, p. 50**).

Tabela 6. Estudo cromatográfico da fração VBFD2.

Frações reunidas	Código	Massa (g)	Observação
11-14	VBFD2.1	0,0133	Não trabalhada
15-16	VBFD2.2	0,0126	Não trabalhada
17-26	VBFD2.3	0,3982	Não trabalhada
27-50	VBFD2.4	0,0324	V2
51-72	VBFD2.5	0,0837	Não trabalhada
73-77	VBFD2.6	0,0232	Não trabalhada
78-83	VBFD2.7	0,0207	Não trabalhada
84-93	VBFD2.8	0,0253	Não trabalhada
94-105	VBFD2.9	0,0278	Não trabalhada
106-107	VBFD2.10	0,0374	Não trabalhada
108-109	VBFD2.11	0,0220	Não trabalhada
110-111	VBFD2.12	0,0235	Não trabalhada
112	VBFD2.13	0,0143	Não trabalhada
113-114	VBFD2.14	0,0250	Não trabalhada
115-116	VBFD2.15	0,2129	Não trabalhada
117	VBFD2.16	0,0628	Não trabalhada
118-119	VBFD2.17	0,2006	Trabalhada
120-121	VBFD2.18	0,4270	Trabalhada
122-123	VBFD2.19	0,3281	Não trabalhada

4.3.4.3.2. Análise da fração VBFD2.4 (m= 0,0324 g)

A fração VBFD2.4 continha um sólido amorfo com pequenos cristais incrustados. Dessa forma, foi adicionado hexano à temperatura ambiente, resultando em duas frações. A primeira fração, ao evaporar o solvente, revelou-se um sólido com aparência de cristais em formato de agulhas unidos formando uma colmeia. A análise por cromatografia em camada delgada analítica, revelada com luz ultravioleta e vanilina sulfúrica confirmou uma única mancha na primeira

fração, sendo denominada **V2**. Já a segunda fração continha substâncias impuras.

4.3.4.3.3 Análise da fração VBFD2.17 (m= 0,2006 g)

A fração VBFD2.17 continha um sólido amorfo impuro, sendo ao mesmo adicionado hexano à temperatura ambiente. Esse procedimento resultou em 3 frações: a primeira resultou num sólido amorfo de cor bege, a segunda apresentava indícios de sólido com uma leve camada oleosa e a terceira consistiu num óleo de cor amarelo claro. A análise por cromatografia em camada delgada analítica, revelada com luz ultravioleta e com vanilina sulfúrica demonstrou que a fração VBFD2.17.1 apresentava uma única mancha, sendo denominada **V3**. Ao passo que as outras frações revelaram-se impuras.

4.3.4.3.4 Análise da fração VBFD2.18 (m= 0,4270 g)

A fração VBFD2.18 continha um sólido amorfo recoberto com uma camada oleosa verde. Então foi adicionado hexano à temperatura ambiente, resultando em três frações: duas oleosas (VBFD2.18.1:0,0574 g e VBFD2.18.2: 0,0731 g) e outra sólida (VBFD2.18.3: 0,1779 g), ambas solúveis em metanol.

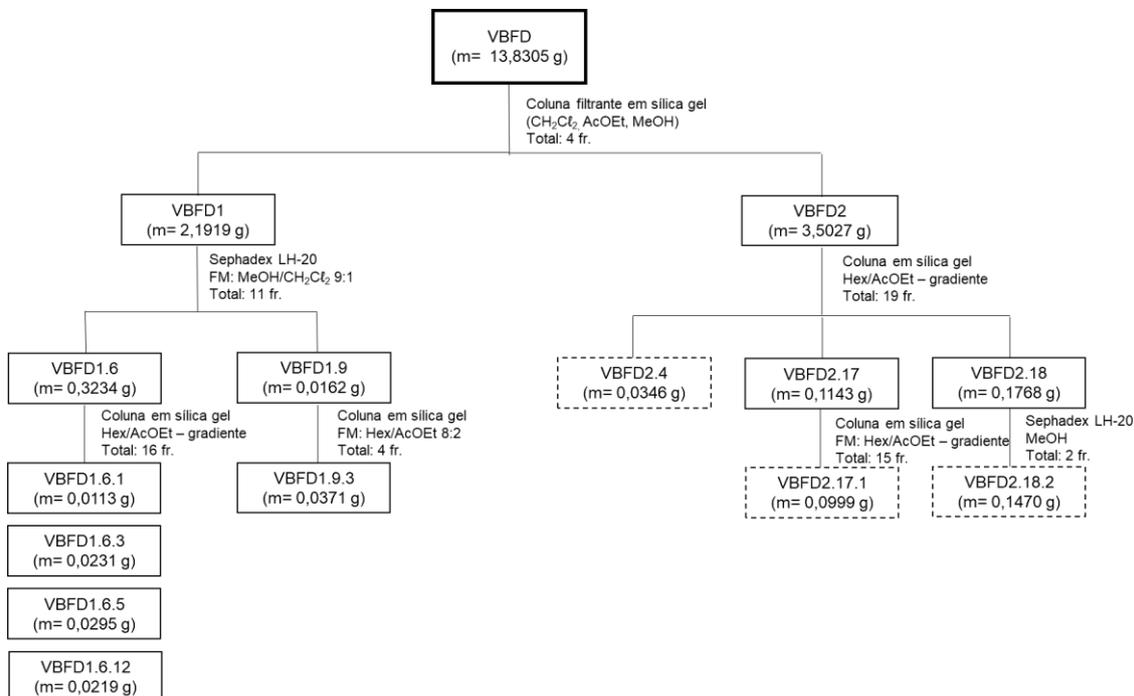
A fração sólida (VBFD2.18.3) foi submetida à cromatografia em coluna a pressão normal em Sephadex LH20. A fase móvel consistiu em MeOH 100%, resultando em 48 frações que após análise por cromatografia em camada delgada analítica resultou em duas novas frações (VBFD2.18.3.1 e VBFD2.18.3.2). Esse procedimento permitiu o isolamento da substância **V4**. O estudo cromatográfico da fração VBFD2.18 está descrito na **Tabela 7, p. 51**.

Tabela 7. Estudo cromatográfico da fração VBFD2.18.

Frações reunidas	Código	Massa (g)	Observação
1-39	VBFD2.18.3.1	0,0609	Não trabalhada
40-48	VBFD2.18.3.2	0,1470	V4

O resumo das análises cromatográficas da fração VBFD é mostrado na **Figura 12, p. 52**.

Figura 12. Fluxograma resumo das substâncias isoladas da fração VBFD de *V. bicuhyba*.



4.3.4.4 Análise da fração VBFE (m= 0,6066 g)

A fração VBFE foi submetida à uma partição líquido-líquido. Uma amostra (m= 0,4007 g) foi diluída em 10 mL de MeOH:H₂O (8:2) e em seguida encaminhada ao método extrativo por ultrassom por 2 min. Posteriormente, a solução foi lavada com diclorometano três vezes, resultando em duas frações: VBFE-I (m= 0,2442 g) e VBFE-S (m= 0,1101 g).

4.3.4.4.1 Análise da fração VBFE-I (m= 0,2442 g)

A fração VBFE-I foi submetida à cromatografia em coluna a pressão normal em sílica gel empacotada com hexano. A fase móvel consistiu em uma mistura de solventes em gradiente de polaridade crescente de Hex:AcOEt. Foram coletadas 125 frações reunidas após análise de cromatografia em camada delgada analítica em 17 novas frações (**Tabela 8, p. 53**).

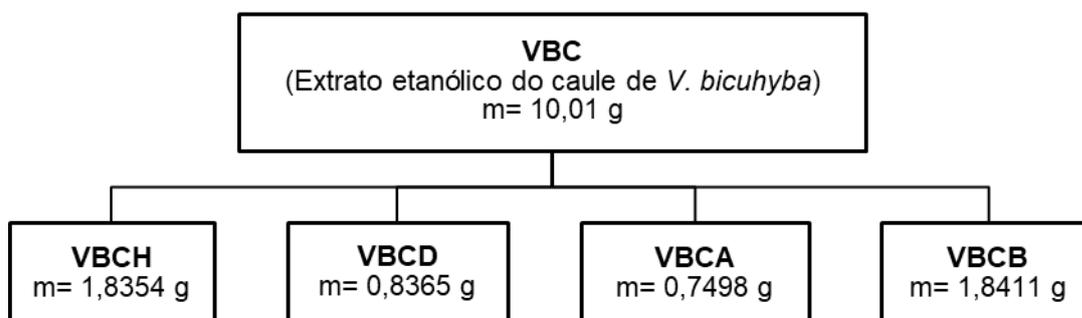
Tabela 8. Estudo cromatográfico da fração VBFE-I.

Frações reunidas	Código	Massa (g)	Observação
1-3	VBFE-I.1	0,0153	Não trabalhada
4-10	VBFE-I.2	0,0165	Não trabalhada
11-20	VBFE-I.3	0,0452	Não trabalhada
21-29	VBFE-I.4	0,0053	Não trabalhada
30-34	VBFE-I.5	0,0048	Não trabalhada
35-39	VBFE-I.6	0,0044	Não trabalhada
40-47	VBFE-I.7	0,0262	Não trabalhada
48-57	VBFE-I.8	0,0031	Não trabalhada
58-61	VBFE-I.9	0,0049	Não trabalhada
62-73	VBFE-I.10	0,0058	Não trabalhada
74-80	VBFE-I.11	0,0022	Não trabalhada
81-87	VBFE-I.12	0,0075	Não trabalhada
88-94	VBFE-I.13	0,0069	Não trabalhada
95-110	VBFE-I.14	0,0020	Não trabalhada
111-115	VBFE-I.15	0,0032	Não trabalhada
116-120	VBFE-I.16	0,0349	Não trabalhada
121-125	VBFE-I.17	0,0520	Não trabalhada

4.3.4.5 Partição do extrato etanólico do caule de *V. bicuhyba*

O extrato bruto do caule (m= 10,01 g) foi submetido à uma partição líquido-líquido, usando solventes imiscíveis em água, em ordem crescente de polaridade Hex, CH₂Cl₂, AcOEt e ButOH. Dando origem as frações VBCH, VBCHD, VBCHA e VBCHB (**Figura 13, p. 53**).

Figura 13. Fluxograma das frações resultantes da partição líquido-líquido do extrato do caule de *V. bicuhyba*.

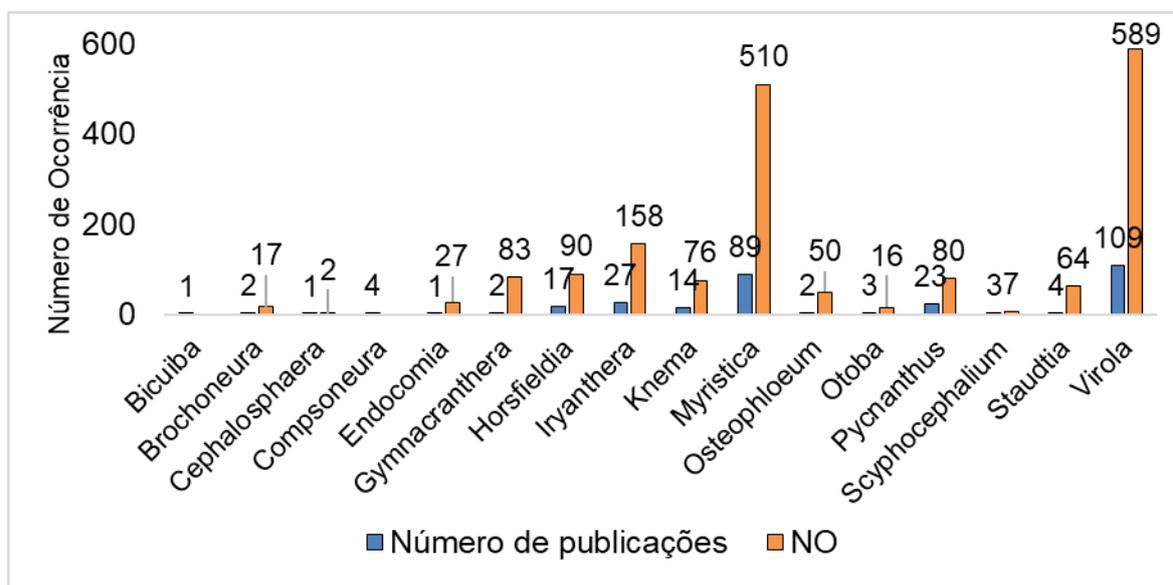


5 Resultados e Discussão

5.1 QUIMIOSSISTEMÁTICA DA FAMÍLIA MYRISTICACEAE

A ocorrência de metabólitos secundários foi observada para 14 dos 21 gêneros pertencentes à família Myristicaceae. A análise dos 320 trabalhos disponibilizados entre o período de 1965 até 2019 denota a ocorrência de 1769 substâncias distribuídas entre as classes esteroides, carotenoides, tocotrienóis, terpenóides, alcaloides, flavonoides, lignóides, cromonas e fenilpropanóides. Destaque é dado para os gêneros *Horsfieldia* (NO=90), *Iryanthera* (NO=158), *Myristica* (NO=510) e *Virola* (NO=589) que detém o maior número de ocorrências. A consolidação dos dados obtidos estão exibidos na **Figura 14, p. 54**.

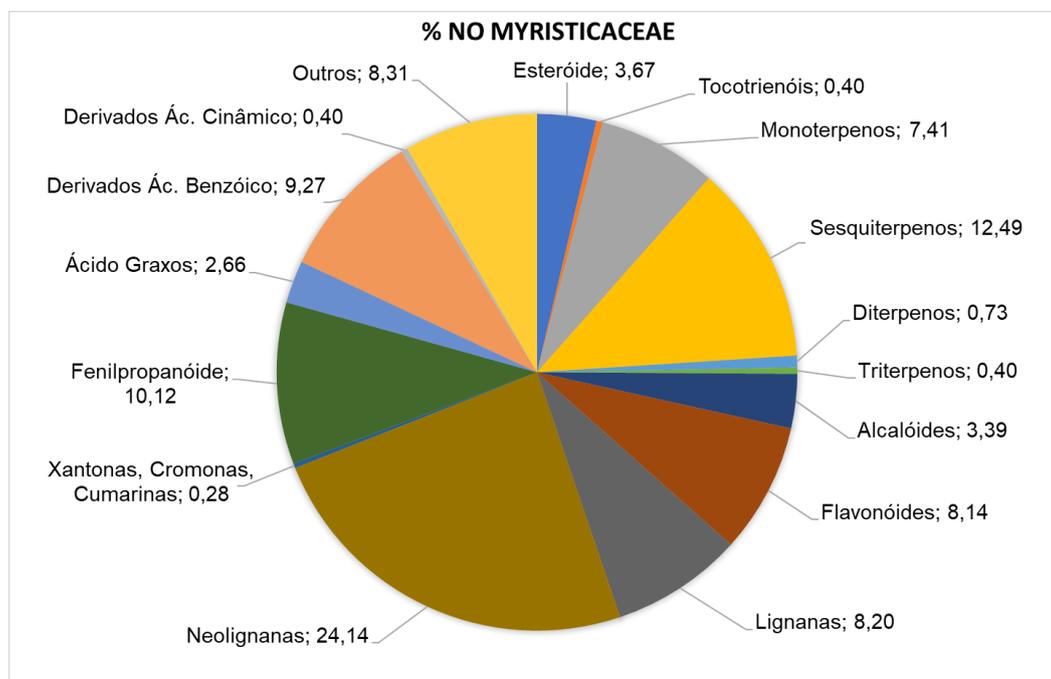
Figura 14. Gráfico do número de publicações e do número de ocorrências de metabólitos secundários isolados e/identificados dos gêneros da família Myristicaceae.



Os gêneros *Coelocaryon*, *Doyleanthus*, *Haematodendron*, *Mauloutchia* e *Paramyristica* se destacam pela ausência de estudos fitoquímicos e biológicos de suas espécies. Quanto à distribuição dos metabólitos secundários, observa-se que a família Myristicaceae possui uma abundante presença de lignanas, com destaque para as neolignanas, flavonoides e terpenóides, que perfazem um total de 61,51% do total de metabólitos relatados (1769 metabólitos). A correlação

percentual de ocorrência de metabólitos para a família está representada na **Figura 15, p. 55.**

Figura 15. Gráfico de correlação percentual do número de ocorrências de metabólitos secundários presentes em Myristicaceae.



No que tange às vias metabólicas, a família Myristicaceae apresenta metabólitos predominantemente oriundos da via do ácido chiquímico (NO=983), seguido pelos metabólitos da via do ácido acético (NO=491), e da via mista (NO=291). Esses dados baseiam-se na descrição e identificação dos metabólitos descritos para a família encontrados na literatura. E, vem ratificar o pensamento proposto por Gottlieb e Borin (2012) de que famílias com maior número de metabólitos oriundos da via do ácido chiquímico foram classificadas em posições mais basais de acordo com as primeiras classificações filogenéticas.

Sendo assim, os dados coletados vão de encontro com a atual posição basal da família Myristicaceae (angiospermas) na cadeia evolutiva.

Nesse sentido, cabe ressaltar que a análise dos parâmetros de proteção e desproteção fenólica dos metabólitos secundários bioproduzidos em Myristicaceae são importantes do ponto de vista da evolução metabólica. Ou seja, da adaptação e modificação das rotas metabólicas para produção de moléculas mais adaptadas ao meio.

Uma das formas discutidas e aceitas está na capacidade dos vegetais produzirem moléculas fenólicas protegidas por grupos glicosilados ou metoxilados, o que indica um avanço em termo de evolução metabólica para produção dessas moléculas. No entanto, os metabólicos bioproduzidos pelas espécies da família Myristicaceae não apresentaram proteção por O-glicosilação, apenas por O-metilação para os metabólitos da via do chiquimato e da via mista (**Tabela 9, p. 56**). Outro ponto a ser observado é que o avanço evolutivo de desproteção (AE_D) das rotas metabólicas do chiquimato e da via mista apresentam valores maiores que 50%. Quando observados os mesmos parâmetros para outras famílias de angiospermas, nota-se que, novamente, a família Myristicaceae não sofreu modificações relevantes em seus índices químicos particulares. O que vem ratificar a posição desta família na cadeia evolutiva.

Tabela 9. Valores dos parâmetros de proteção e desproteção dos metabólitos bioproduzidos na família Myristicaceae.

Via metabólica	IG	IM	AE_D	ΣO	AE_O
Acetato	0,0000	0,0000	0,4247(42%)	-173,2279	-0,9313
Chiquimato	0,0000	0,3356	0,5663(56%)	-25,0606	-0,4914
Mista	0,0000	0,1117	0,8883(88%)	-6,0910	-0,1646

Identificação dos índices: IG: proteção por glicosilação; IM: proteção por metilação; AE_D : avanço evolutivo de desproteção; ΣO : nível de oxidação; AE_O : avanço evolutivo de oxidação.

No que se refere aos metabólitos oriundos da via mista, destaca-se a classe dos flavonoides encontrado em maior ocorrência. Dos 21 gêneros, apenas 7 apresentaram relato de flavonoides. Das 144 ocorrências analisadas para flavonoides, destacam-se os tipos isoflavonóides (NO=47), diidrochalconas (NO=28), flavonas (NO=16) e flavanas (NO=17), cuja estrutura básica é apresentada na **Figura 16, p. 57**. Não foram observados relatos de flavonoides do tipo antocianidinas para nenhum gênero em questão. O número de ocorrência para flavonoides em Myristicaceae está representado na **Figura 17, p. 57**.

Figura 16. Esqueletos clássicos de flavonoides encontrados nas espécies da família Myristicaceae.

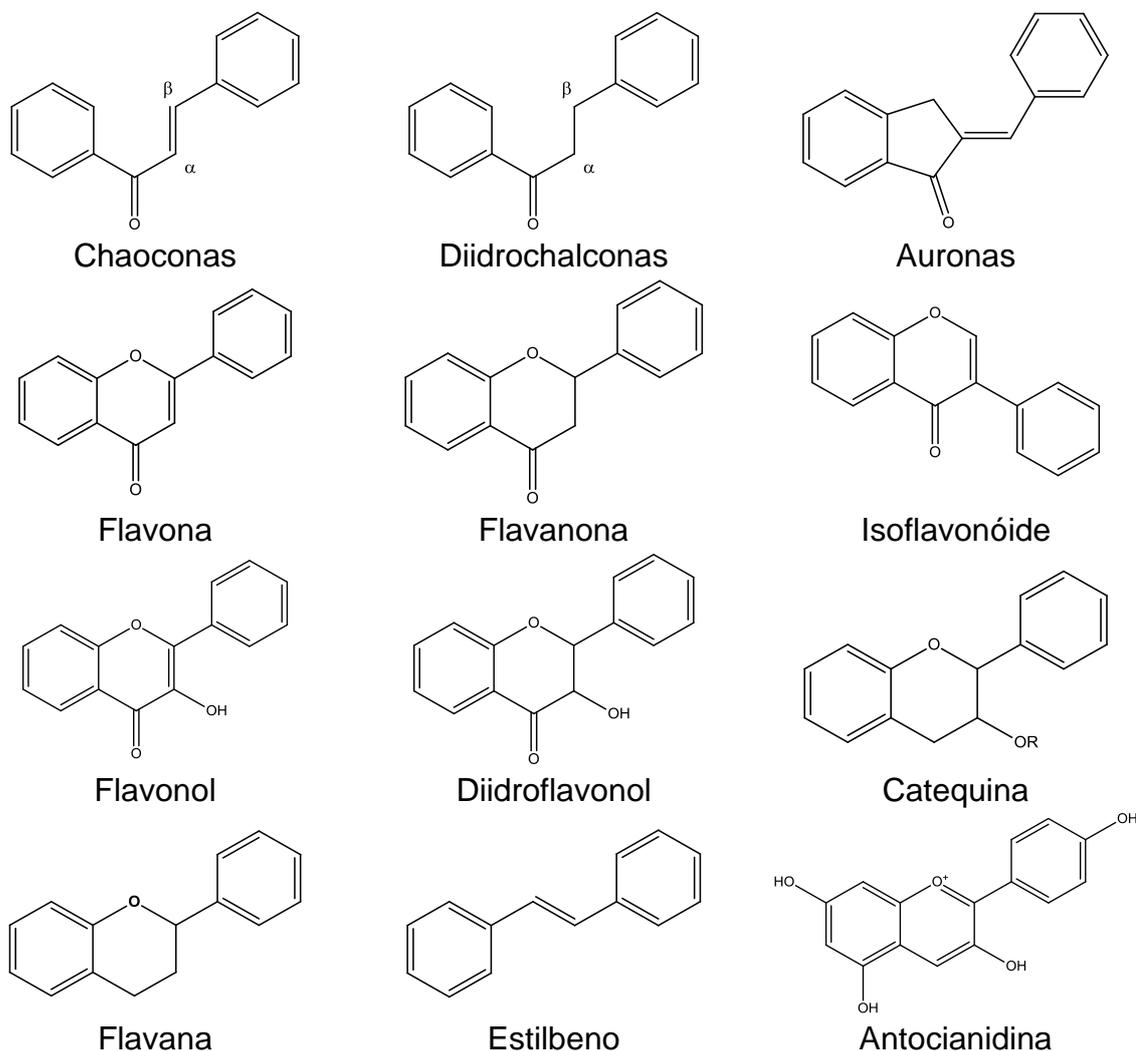
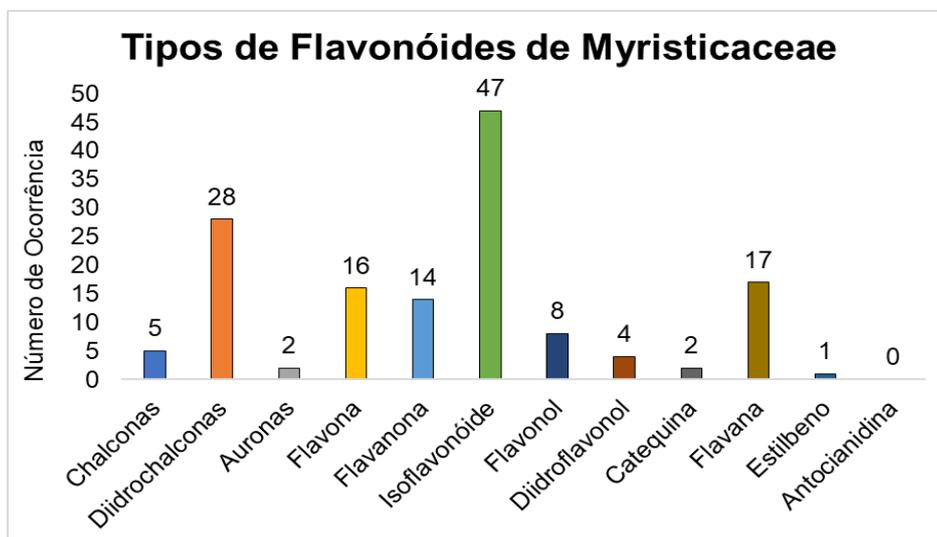
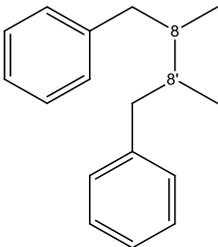
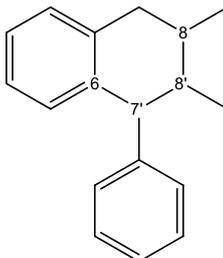
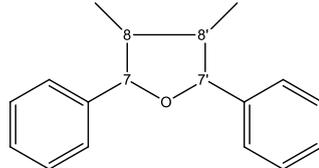
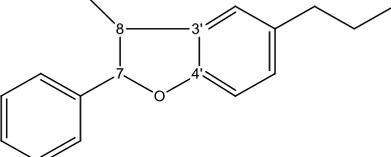
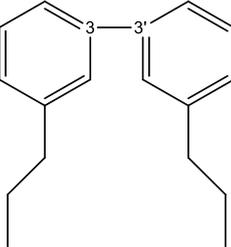
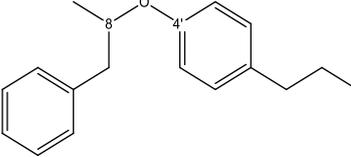
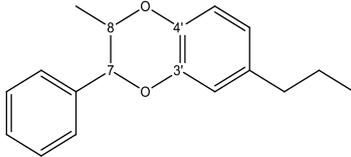
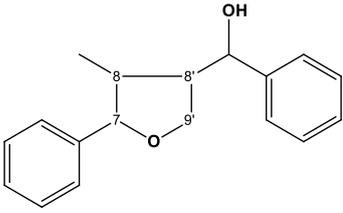
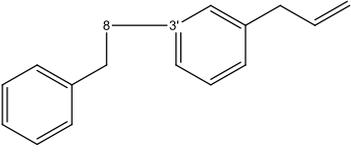


Figura 17. Gráfico do número de ocorrência de flavonoides em Myristicaceae.



Em relação à via do chiquimato, esta consiste na produção das classes metabólitas das lignanas, neolignanas, alcaloides indólicos e cumarinas. Quanto à classe neolignanas, sabe-se que o esqueleto básico pode ser representado de acordo com as posições das ligações entre as unidades C₆-C₃. Os tipos estruturais encontrados dentro da família Myristicaceae são de 9 subtipos: diarilbutano, ariltetralina, tetraidrofurano, benzofurano, di-hidrodieugenol, ariloxiarilpropano, benzodioxano, arilbenzilmetiltetraidrofurano e β-ariloxiarilpropano. Os tipos estruturais de neolignanas são mostrados na **Tabela 10, p. 58** (Barbosa Filho, 1999).

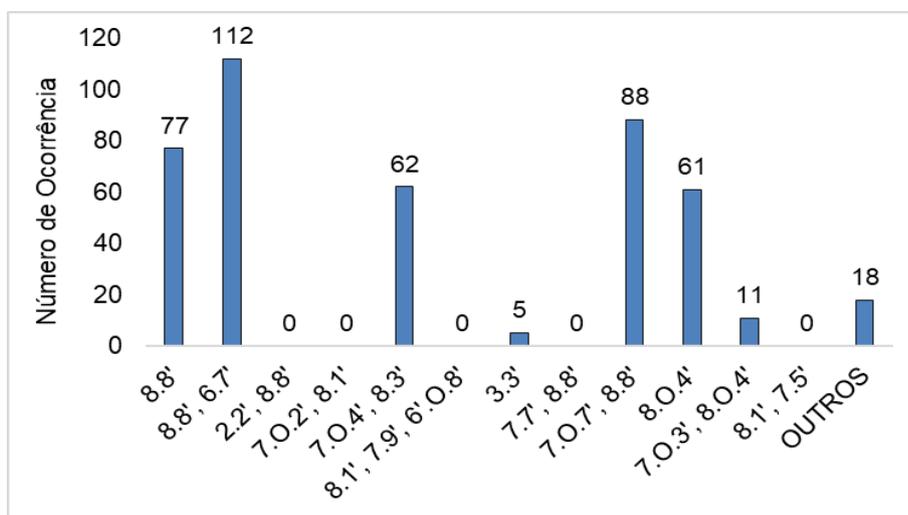
Tabela 10. Esqueletos carbônicos e designação numérica de neolignanas relatadas na literatura.

<p>Diarilbutano</p>  <p>8.8'</p>	<p>Ariltetralina</p>  <p>8.8',6.7'</p>	<p>Tetraidrofurano</p>  <p>7.O.7',8.8'</p>
<p>Benzofurano</p>  <p>7.O.4',8.3'</p>	<p>Di-hidrodieugenol</p>  <p>3.3'</p>	<p>Ariloxiarilpropano</p>  <p>8.O.4'</p>
<p>Benzodioxano</p>  <p>7.O.3',8.O.4'</p>	<p>Arilbenzilmetiltetraidrofurano</p>  <p>8.8',7.O.9'</p>	<p>β-ariloxiarilpropano</p>  <p>8.3'</p>

Fonte: BARBOSA FILHO, 1999.

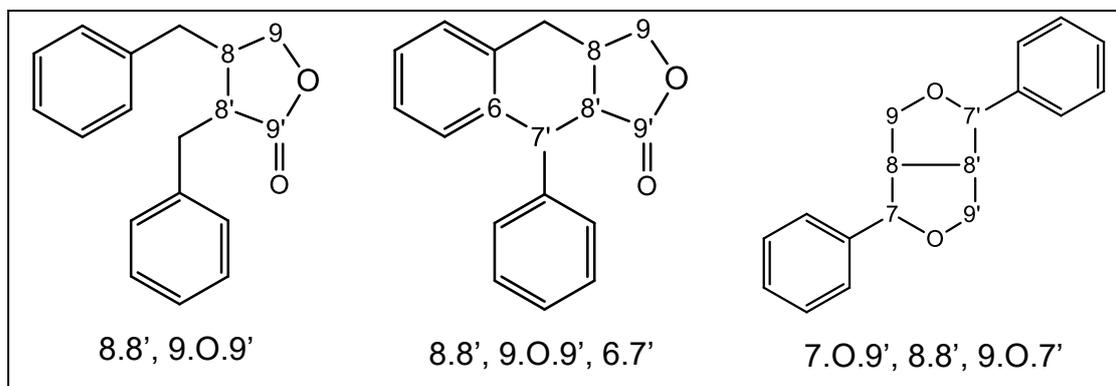
Em apenas 8 dos 21 gêneros que compõe a família foram encontradas neolignananas, são eles: *Iryanthera*, *Knema*, *Myristica*, *Otoba*, *Pycnanthus*, *Scyphocephalium*, *Staudtia* e *Virola*. Das 434 ocorrências listadas a maior abrangência ocorreu para os tipos 8.8',6.7' (NO=112), 7.O.7',8.8' (NO=88) e 8.8' (NO=77). O número de ocorrência para os tipos estruturais de neolignananas para os gêneros citados são mostrados na **Figura 18, p. 59**.

Figura 18. Gráfico do número de ocorrência de tipos estruturais de neolignananas para Myristicaceae.



As lignanas presentes na família ocorrem apenas nos tipos 8.8',9.O.9'; 8.8',9.O.9',6.7' e 7.O.9',8.8',9.O.7' segundo a classificação de esqueletos básicos proposta por Barbosa Filho (1999) e mostrado na **Figura 19, p. 59**.

Figura 19. Esqueletos clássicos de lignanas.



Fonte: Barbosa Filho, 1999.

Os dados do levantamento do perfil quimiosistemático para a família Myristicaceae revela que ela não foi o principal alvo de estudos científicos dentre as angiospermas, principalmente no tange à estudos fitoquímicos. Como uma das representantes de angiospermas mais antigas, esta família se destaca pelo pouco número de gêneros estudados, e dentre os que foram estudados, o reduzido número de ocorrência de diversidade estrutural dos metabólitos descritos confirma que esta família, na cadeia evolutiva, não apresentou um avanço significativo em termos de metabolismo.

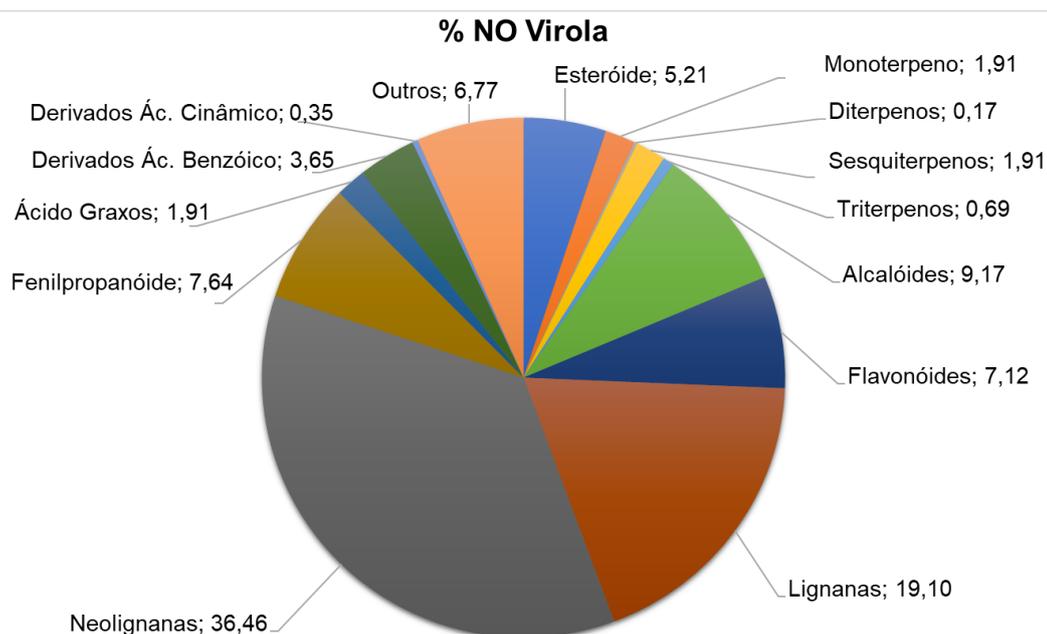
No que tange aos gêneros, *Myristica* (NO= 510) e *Virola* (NO= 589) são os que mais se destacam em números de ocorrências. Apesar do gênero *Myristica* ter se tornado conhecido devido à espécie *M. fragans*, mundialmente conhecida e utilizada como especiaria na culinária (noz-mosada), o gênero *Virola* também se evidencia devido ao número de relatos encontrados na literatura, principalmente para a espécie *V. surinamensis* e *V. sebifera*, cujo uso na confecção de velas e sabonetes se deu devido as suas resinas ricas em ácidos graxos.

5.2 QUIMIOSSISTEMÁTICA DO GÊNERO *Virola*

Uma análise mais profunda do gênero *Virola* presente no Brasil, resultou na quantificação das principais classes de metabólitos secundários. Este gênero é o mais amplamente distribuído e com o maior número de espécies dentre os gêneros de Myristicaceae existentes no Brasil.

A ocorrência de metabólitos secundários foi descrita para 16 das 35 espécies relatadas para o gênero. Das 109 publicações entre os anos de 1969 e 2018, 576 substâncias foram isoladas e/ou identificadas. Destaque é dado para as espécies *V. surinamensis* (NO=154), *V. cuspidata* (NO=98) e *V. sebifera* (NO=77), que tiveram a maior quantidade de metabólitos relatados. A **Figura 20, p. 61** representa o percentual das principais classes metabólicas verificadas na literatura para as espécies de *Virola brasileiras*.

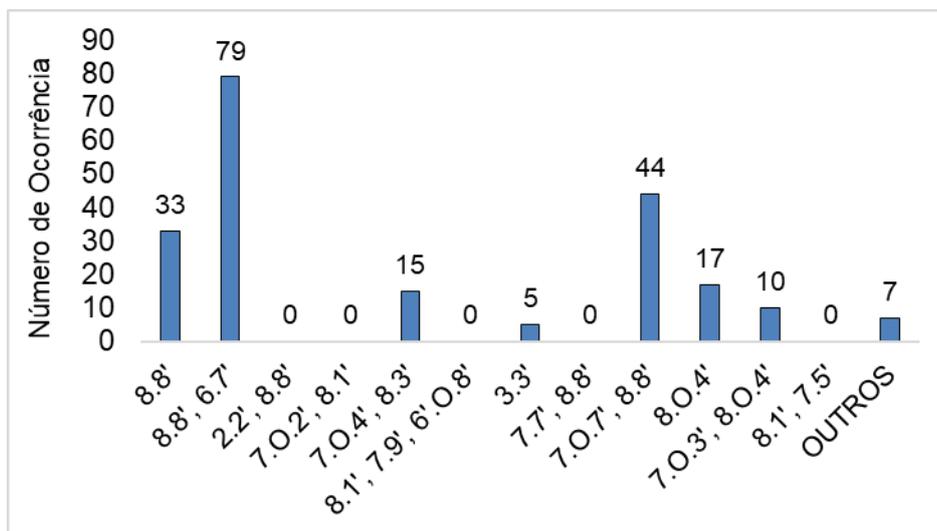
Figura 20. Gráfico do percentual do número de ocorrência de metabólitos secundários presentes no gênero *Viola* (Myristicaceae).



A análise do gráfico acima evidencia que dentre as classes de metabólitos isolados, as lignanas e neolignanas, correspondem à maior porcentagem de constituintes identificados no gênero somando 56%, aproximadamente. Esses dados corroboram também com o relato de Moraes (2008) de que neolignanas e lignanas se destacam como constituintes majoritários na família Myristicaceae na qual este gênero está inserido.

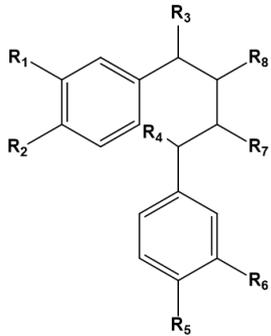
O gênero *Viola* apresentou 211 ocorrências de neolignanas descritas e isoladas das folhas, cascas, galhos, frutos e madeira das espécies. As neolignanas presentes nas espécies estão listadas na **Tabela 11, p. 67**. O número de ocorrência analisado de acordo com a **Figura 21, p. 62** sumariza 33 para o tipo diarilbutano, 79 ariltetralina, 44 tetraidrofurano, 15 benzofurano, 5 di-hidrodieugenol, 17 ariloxiarilpropano, 10 benzodioxano, 2 arilbenzilmethyltetraidrofurano, 4 β -ariloxiarilpropano e 2 outras neolignanas com esqueletos semelhantes a di-hidrodieugenol.

Figura 21. Gráfico do número de ocorrência dos tipos estruturais de neolignanas do gênero *Virola*.



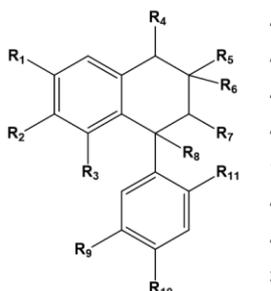
As neolignanas do subtipo ariltetralinas são os metabólitos secundários encontrados em maior quantidade nas espécies de *Virola* (Rezende et al., 2005). A **Figura 22, p. 63** e a **Figura 23, p. 66** retratam as estruturas de neolignanas descritas na literatura para o gênero *Virola*.

Figura 22. Estruturas de neolignanas presentes no gênero *Virola*.



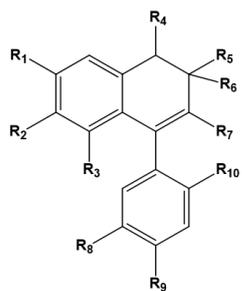
Diarilbutano

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
25	H ₃ CO	H ₃ CO	H	OH	H ₃ CO	H ₃ CO	CH ₃	CH ₃
10		-OCH ₂ O-	OH	H	H ₃ CO	H ₃ CO	"CH ₃	◀CH ₃
11	H ₃ CO	H ₃ CO	"OH	H		-OCH ₂ O-	"CH ₃	◀CH ₃
12		-OCH ₂ O-	"OH	H		-OCH ₂ O-	"CH ₃	◀CH ₃
13	H ₃ CO	H ₃ CO	O	H		-OCH ₂ O-	"CH ₃	◀CH ₃
26	H ₃ CO	OH	H	CH ₂		-OCH ₂ O-	CH ₃	CH ₃
27	H ₃ CO	OH	H	H	OH	H ₃ CO	CH ₃	CH ₃
28	H ₃ CO	OH	H	H		-OCH ₂ O-	CH ₃	CH ₃
29		-OCH ₂ O-	O	O		-OCH ₂ O-	CH ₃	CH ₃
30	H ₃ CO	H ₃ CO	O	H		-OCH ₂ O-	◀CH ₃	"CH ₃
18	H ₃ CO	H ₃ CO	"OH	H	H ₃ CO	H ₃ CO	"CH ₃	◀CH ₃
15		-OCH ₂ O-	"OH	H	OH	H ₃ CO	"CH ₃	◀CH ₃
16	H ₃ CO	H ₃ CO	"OH	H	OH	H ₃ CO	"CH ₃	◀CH ₃
17	H ₃ CO	H ₃ CO	◀OH	H	OH	H ₃ CO	"CH ₃	◀CH ₃
31		-OCH ₂ O-	H	OH	H ₃ CO	H ₃ CO	CH ₃	CH ₃
32		-OCH ₂ O-	H	H	H ₃ CO	H ₃ CO	CH ₃	CH ₃
33	H ₃ CO	H ₃ CO	H	H		-OCH ₂ O-	CH ₂ OH	CH ₃
34	H ₃ CO	H ₃ CO	O	O		-OCH ₂ O-	CH ₃	CH ₃
35		-OCH ₂ O-	H	O	H ₃ CO	H ₃ CO	CH ₃	CH ₃
36	H ₃ CO	H ₃ CO	H	O	H ₃ CO	H ₃ CO	CH ₃	CH ₃
37		-OCH ₂ O-	H	H		-OCH ₂ O-	CH ₂ OH	CH ₂ OH

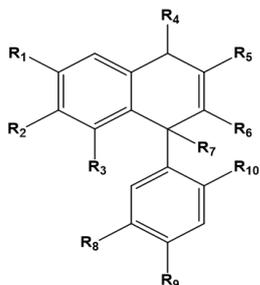


Ariltetralina

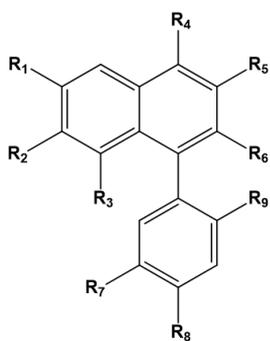
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11
19	H ₃ CO	H ₃ CO	H	H		◀CH ₃	"CH ₃	H	H ₃ CO	H ₃ CO	H
38	H		-OCH ₂ O-	O		CH ₃	CH ₃	OH		-OCH ₂ O-	H
39	H ₃ CO	H ₃ CO	H	O		CH ₃	CH ₃	OH		-OCH ₂ O-	H
40	H ₃ CO	H ₃ CO	H	O		CH ₃	CH ₃	H		-OCH ₂ O-	H
41	H ₃ CO	H ₃ CO	H	O	CH ₃	OH	CH ₃	OH		-OCH ₂ O-	H
42		-OCH ₂ O-	H	O	CH ₃	OH	CH ₃	OH	H ₃ CO	H ₃ CO	H
43	H ₃ CO	OH	H	H		CH ₃	CH ₃	H	H ₃ CO	OH	H
44		-OCH ₂ O-	H	H		CH ₃	CH ₃	H	H ₃ CO	OH	H
45		-OCH ₂ O-	H	H		CH ₃	CH ₃	H	H ₃ CO	H ₃ CO	H
14	H		-OCH ₂ O-	OH		◀CH ₃	"CH ₃	H		-OCH ₂ O-	H
46	H ₃ CO		-OCH ₂ O-	H		CH ₃	CH ₃	OH		-OCH ₂ O-	H
47	H		-OCH ₂ O-	H		CH ₃	CH ₃	OH		-OCH ₂ O-	H
20	H ₃ CO	OH	H	H		◀CH ₃	"CH ₃	H	H ₃ CO	H ₃ CO	H
48	H ₃ CO	H ₃ CO	H	H		CH ₃	CH ₃	H		-OCH ₂ O-	H
49	H ₃ CO	H ₃ CO	H	O		CH ₃	CH ₃	H		-OCH ₂ O-	OH
50	H ₃ CO	H ₃ CO	H	O	CH ₃	OH	CH ₃	H		-OCH ₂ O-	OH
51	H		-OCH ₂ O-	O		CH ₃	CH ₃	H		-OCH ₂ O-	H
52	H		-OCH ₂ O-	H		CH ₃	CH ₃	H		-OCH ₂ O-	H
53	H		-OCH ₂ O-	O		CH ₃	CH ₃	H		-OCH ₂ O-	OH
54	H		-OCH ₂ O-	O		CH ₃	CH ₃	H		-OCH ₂ O-	OAc
55	H ₃ CO	OH	H	H		CH ₃	CH ₃	H		-OCH ₂ O-	H



	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
56	H ₃ CO	H ₃ CO	H	O	CH ₃	OH	CH ₃	-OCH ₂ O-		H
57	H ₃ CO	H ₃ CO	H	H	CH ₃		CH ₃	-OCH ₂ O-		H
58	H ₃ CO	-OCH ₂ O-		H	CH ₃		CH ₃	-OCH ₂ O-		H
59		-OCH ₂ O-	H	H	CH ₃		CH ₃	H ₃ CO	H ₃ CO	H
60		-OCH ₂ O-	H	H	CH ₃		CH ₃	-OCH ₂ O-		H

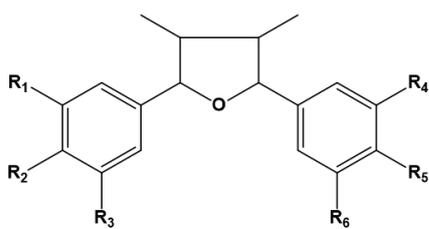


	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
61	H ₃ CO	H ₃ CO	H	O	CH ₃	CH ₃	OH	-OCH ₂ O-		H



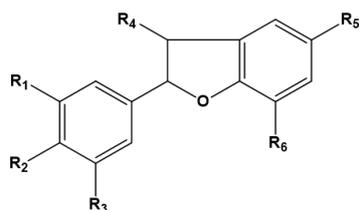
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
62	H ₃ CO	H ₃ CO	H	H	CH ₃	COH		-OCH ₂ O-	H
63	H ₃ CO	H ₃ CO	H	H	CH ₃	COOH		-OCH ₂ O-	H
64	H ₃ CO	H ₃ CO	H	H	CH ₃	CH ₃		-OCH ₂ O-	H
65	H ₃ CO	OH	H	H	CH ₃	CH ₃		-OCH ₂ O-	H

Aritetralina

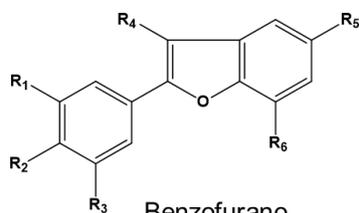


Tetraidrofurano

	R1	R2	R3	R4	R5	R6
6		-OCH ₂ O-		H	H	-OCH ₂ O-
7	H ₃ CO	OH		H	H ₃ CO	H ₃ CO
66	H ₃ CO	H ₃ CO		H	H ₃ CO	H ₃ CO
67	H ₃ CO	H ₃ CO	H ₃ CO	H ₃ CO	H ₃ CO	H ₃ CO
68		-OCH ₂ O-		H	H ₃ CO	OH
8	H ₃ CO	OH		H	H ₃ CO	OH

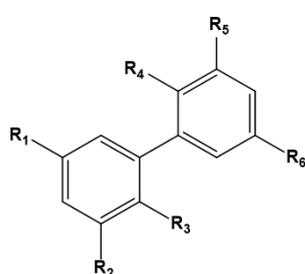


	R1	R2	R3	R4	R5	R6
69	H	OH	H ₃ CO	CH ₃	CH ₂ CH=CH ₂	H ₃ CO
70	H	H ₃ CO	H ₃ CO	CH ₂ OH	CH ₂ CH=CH ₂	H ₃ CO
9	-OCH ₂ O-		H	CH ₃	CH=CHCH ₃	H ₃ CO
71	H ₃ CO	H ₃ CO	H	CH ₃	CH ₂ CH=CH ₂	H ₃ CO



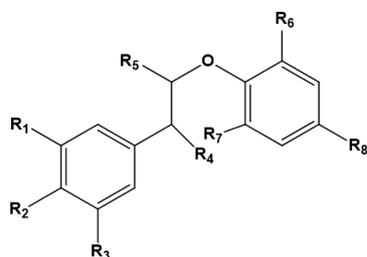
	R1	R2	R3	R4	R5	R6
72	H	OH	H ₃ CO	CH ₃	CH ₂ CH=CH ₂	H ₃ CO
73	H ₃ CO	H ₃ CO	H	CH ₃	CH ₂ CH=CH ₂	H ₃ CO

Benzofurano



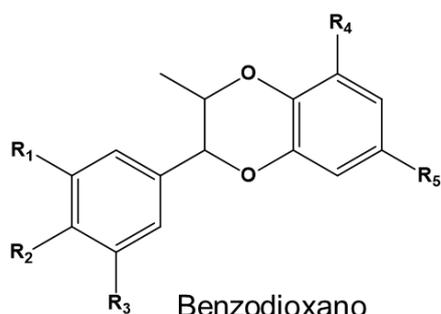
	R1	R2	R3	R4	R5	R6
74	CH ₂ CH=CH ₂	H ₃ CO	OH	OH	H ₃ CO	CH ₂ CH=CH ₂
75	CH ₂ CH ₂ CH ₃	H ₃ CO	OH	H ₃ CO	H ₃ CO	CH ₂ CH=CH ₂

Di-hidrodieugenol



	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
1	H ₃ CO	H ₃ CO	H ₃ CO	OH	CH ₃	H ₃ CO	H	CH=CHCH ₃
76	H ₃ CO	H ₃ CO	H	OH	CH ₃	H ₃ CO	H	CH=CHCH ₃
77	H ₃ CO	H ₃ CO	H ₃ CO	H	CH ₃	H ₃ CO	H ₃ CO	CH=CHCH ₃
78	H	H ₃ CO	H ₃ CO	OH	CH ₂ OH	H ₃ CO	H	CH ₂ CH=CH ₂
79	-OCH ₂ O-		H ₃ CO	H	CH ₃	H ₃ CO	H ₃ CO	CH ₂ CH=CH ₂
80	H ₃ CO	OH	H ₃ CO	H	CH ₃	H ₃ CO	H ₃ CO	CH=CHCH ₃
81	H ₃ CO	OH	H ₃ CO	OH	CH ₃	H ₃ CO	H ₃ CO	CH=CHCH ₃
82	H ₃ CO	OH	H ₃ CO	O	CH ₃	H ₃ CO	H ₃ CO	CH=CHCH ₃
83	H ₃ CO	H ₃ CO	H	OH	CH ₃	H ₃ CO	H	CH ₂ CH=CH ₂

Ariloxiarilpropano



	R1	R2	R3	R4	R5
84	H ₃ CO	H ₃ CO	H ₃ CO	H ₃ CO	CH ₂ CH=CH ₂
85	H ₃ CO	OH	H ₃ CO	H ₃ CO	CH=CHCH ₃
86	H ₃ CO	H ₃ CO	H ₃ CO	H ₃ CO	CH ₂ CH=CH ₂
87	H ₃ CO	H ₃ CO	H	H ₃ CO	CH ₂ CH=CH ₂
88	H ₃ CO	OH	H ₃ CO	H ₃ CO	CH ₂ CH=CH ₂

Benzodioxano

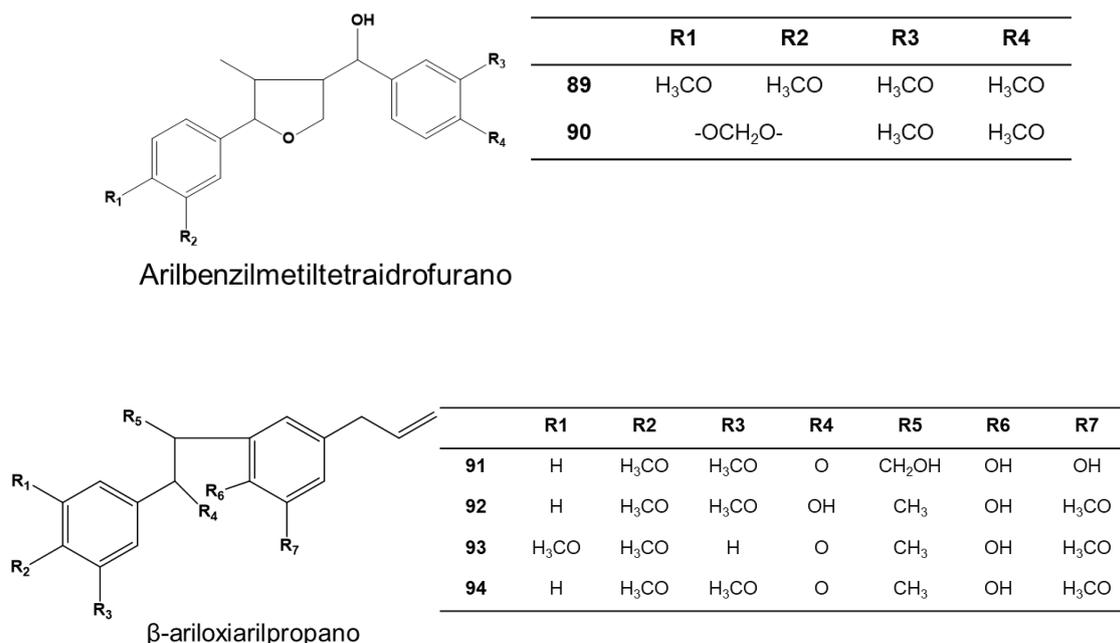
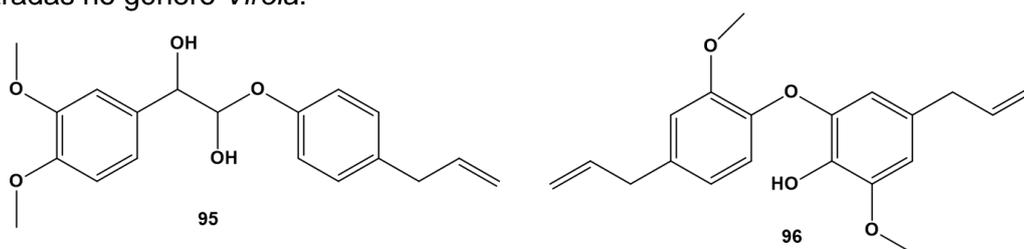


Figura 23. Estruturas de neolignan com esqueleto semelhante a di-hidrodieugenol encontradas no gênero *Virola*.



As neolignanas que foram isoladas nas espécies do gênero *Virola* estão distribuídas de acordo com a **Tabela 11, p. 67**. As espécies *V. albidiflora* Ducke, *V. caducifolia* W.A.Rodrigues, *V. coelhoi* W.A.Rodrigues, *V. crebrinervia* Ducke, *Virola decorticans* Ducke, *V. duckei* A.C.Sm, *V. gardneri* (A.DC.) Warb, *V. guggenheimii* W.A. Rodrigues, *V. lorensis* A.C.Sm., *V. malmei* A.C.Sm., *V. michelii* Heckel, *V. minutiflora* Ducke, *V. multcostata* Ducke, *V. multinervia* Ducke, *V. obovata* Ducke, *V. officinalis* Warb., *V. parvifolia* Ducke, *V. peruviana* (A.DC.) Warb, *V. polyneura* W.A.Rodrigues, *V. rugulosa* Warb., *V. sessilis* (A.DC.) Warb. e *V. subsessilis* (Benth.) Warb não apresentaram estudos que relatam a identificação e/ou isolamentos de substâncias presentes nessas espécies.

Tabela 11. Neolignanas presentes nas espécies do gênero *Virola* no Brasil.

Espécie	Substâncias de acordo com a numeração das Figuras 22 e 23	Referência
<i>Virola bicuhyba</i> (Schott ex Spreng.) Warb.	6-8, 10-16, 18-19, 20, 66	FERNANDES, BARATA e FERRI, 1993; KUROSHIMA et al., 2001; SARTORELLI, YOUNG e KATO, 1998
<i>Virola calophylla</i> Warb.	26, 57, 64, 65	MARTINEZ, YOSHIDA e GOTTLIEB, 1990
<i>Virola calophylloidea</i> Markgr.	46, 58	MARTINEZ et al., 1985
<i>Virola carinata</i> (Benth.) Warb.	1, 43-45, 69, 70-75, 78-79, 80-82, 91-92, 94, 96	CAVALCANTE, YOSHIDA e GOTTLIEB, 1985; GOTTLIEB, MAIA e RIBEIRO, 1976; KAWANISHI, UHARA e HASHIMOTO, 1982; KAWANISHI, UHARA e HASHIMOTO, 1982b; KAWANISHI, UHARA e HASHIMOTO, 1983
<i>Virola elongata</i> (Benth.) Warb.	19, 25, 30, 31-36, 38-41,45,48-51, 57,59, 60, 77, 84, 89-90	KATO et al., 1986; KATO, YOSHIDA e GOTTLIEB, 1990; MACRAE e TOWERS, 1985; MARTINEZ et al., 1985
<i>Virola flexuosa</i> A.C.Sm.	37	BAQUERO et al., 2015
<i>Virola mollissima</i> (A.DC.) Warb.	38, 67	MORAIS et al., 2009
<i>Virola pavonis</i> (A.DC.) A.C.Sm.	7-9, 69, 71-74, 77, 80, 85, 83, 92,94	BARATA et al., 2000; FERRI e BARATA, 1992; MARQUES, YOSHIDA e GOTTLIEB, 1992; MORAIS et al., 2009
<i>Virola sebifera</i> Aubl.	25, 19, 62, 63, 38, 39, 40, 41, 42, 56, 61, 29, 34, 51, 53-54	LOPES, YOSHIDA e GOTTLIEB, 1982; LOPES, YOSHIDA e GOTTLIEB, 1984; LOPES, YOSHIDA e GOTTLIEB, 1984b; REZENDE e KATO, 2002.
<i>Virola surinamensis</i> (Rol. Ex Rottb.) Warb.	1, 6,19, 66-68, 76	BARATA et al., 1978; BARATA et al., 2000; BLUMENTHAL, SILVA e YOSHIDA, 1997; BORGES et al., 2007; VEIGA et al., 2017; ZACCHINO et al., 1998.

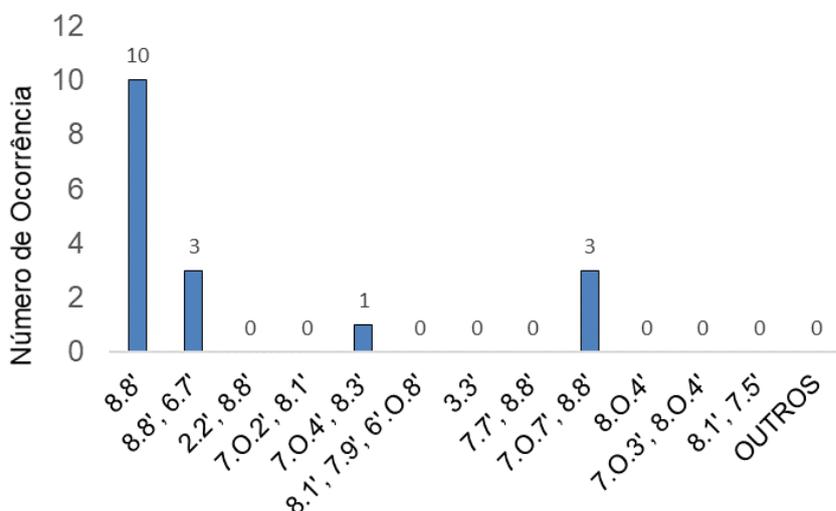
Os dados compilados para a variabilidade estrutural das moléculas presentes nas espécies e os estudos biológicos descritos na literatura para *Virola spp.* revelam que a atividade apresentada se deve principalmente aos extratos/frações com caráter mais polar. Quando observado as moléculas presentes nesses extratos/frações conclui-se que a maior parte são neolignanas. Dessas moléculas, as que apresentam um maior número de grupo metoxila (OCH_3) como substituinte são as que apresentaram uma atividade biológica mais expressiva. Embora estudos de correlação entre atividade biológica e estruturas químicas serem escassos ou inexistentes.

5.3 QUIMIOSSISTEMÁTICA DA ESPÉCIE *Virola bicuhyba* Warb.

Quando analisado a espécie de estudo desta pesquisa, *V. bicuhyba*, o número de ocorrências de classes de metabólitos secundários são 22. Esse quantitativo de número de ocorrências é um dado muito pequeno e que revela o pouco estudo realizado para a espécie, tanto em termos de atividade biológica como em estudos fitoquímicos. A literatura apresenta 6 estudos biológicos para essa espécie, sendo 2 com extratos das folhas e 4 com a resina da árvore. Esses estudos comprovam o uso popular da espécie como anti-inflamatória e protetora gástrica (SARTORELLI, YOUNG e KATO, 1998).

Quanto ao perfil molecular, a espécie apresenta 19 substâncias identificadas, destas 17 são neolignanas distribuídas de acordo com a **Figura 24, p. 69**.

Figura 24. Gráfico do número de ocorrência dos tipos estruturais de neolignanas de *Virola bicuhyba*.



Com o intuito de contribuir para melhor conhecimento do potencial de atividades biológicas da espécie *V. bicuhyba* foram realizados os estudos descritos a seguir para esta espécie.

5.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os extratos das folhas e do caule de *Virola bicuhyba* foram avaliados em três ensaios biológicos numa triagem para avaliar o potencial fitoterápico da espécie escolhida para o presente trabalho. A atividade larvicida, antineoplásica e antimalárica para os extratos e frações estão sumarizados na **Tabela 12, p. 70**. Ressalta-se que os resultados obtidos foram mais expressivos para as folhas, limitando-se os testes ao extrato etanólico do caule e não as frações obtidas de acordo com a **Figura 12, p. 52**.

Tabela 12. Concentração Efetiva (EC_{50}) dos extratos e frações de *V. bicuhyba* baseados nos ensaios larvicida, antineoplásica e antimalárica.

Extratos/Frações	Códigos	Atividade Larvicida	Atividade Antineoplásica	Atividade Antimalárica
		EC_{50} (μgmL^{-1})	EC_{50} (μgmL^{-1})	EC_{50} (μM)
(Extrato bruto das folhas)	VBF	110,00	15,23	-----
(Fração A de VBF)	VBFA	----	----	-----
(Fração B de VBF)	VBFB	----	53,00	8,76
(Fração C de VBF)	VBFC	----	----	----
(Fração D de VBF)	VBFD	----	5,02	6,04
(Fração E de VBF)	VBFE	----	4,89	12,17
(Fração F de VBF)	VBFF	----	364,70	26,19
(Extrato bruto do caule)	VBC	170,00	42,29	86,33

5.4.1 Atividade Larvicida

A dengue é uma das doenças virais que mais acometem os países tropicais e subtropicais. Essa doença é transmitida pelo mosquito vetor *Aedes aegypti*, que é responsável pelas frequentes epidemias (principalmente nas estações quentes) e circulação dos quatro sorotipos do vírus existente (FURTADO et al., 2005). O tratamento mais utilizado para o combate do vetor se baseia no uso de inseticidas, no entanto, o uso dessas substâncias tem apresentado algumas desvantagens, tais como: o fato de não serem seletivas, podendo afetar outros insetos benéficos; aumentar a resistência dos insetos vetores além de, ocasionar contaminação ambiental (MOREIRA et al., 2016).

Tendo em vista que o Brasil, devido a sua grande extensão territorial e diversidade vegetal possui a flora mais rica do mundo com cerca de 56.000 espécies de plantas (quase 19% da flora mundial). Estudos a partir de extratos vegetais surgem como alternativa aos efeitos colaterais e tóxicos apresentados pelos tratamentos correntes (GIULIETTI et al., 2005; MMA, 2011).

Como relatado na **Tabela 12, p. 70** a atividade larvicida foi efetuada apenas para os extratos brutos das folhas e caule. Os extratos foram testados em diferentes concentrações ($0,05 - 8 \text{ mgmL}^{-1}$) até chegar em uma faixa que apresentou mortalidade das larvas do 3º estágio de *Aedes aegypti*. As concentrações escolhidas para o ensaio foram $0,001 \text{ mgmL}^{-1}$, $0,05 \text{ mgmL}^{-1}$, $0,1$

mgmL⁻¹ e 0,2 mgmL⁻¹. Sendo a análise feita em triplicada para cada concentração mais o controle contendo apenas as larvas e os solventes utilizados na diluição das amostras. Os resultados observados na avaliação da atividade larvicida frente as larvas do 3^o estágio de *A. aegypti* revelou que o extrato das folhas de *V. bicuhyba* apresenta um maior efeito citotóxico para as larvas do que o extrato do caule (**Tabela 13, p. 71**).

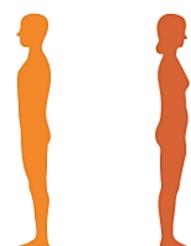
Tabela 13. Porcentagem de mortalidade larval para *Aedes aegypti* após tratamento com extrato de *V. bicuhyba*.

Concentração (mgmL⁻¹)	0,05	0,1	0,2
Controle	0 %	0 %	0 %
Extrato das folhas (VBF) EC ₅₀ = 0,11 mgmL ⁻¹	5 %	10 %	90 %
Extrato do caule (VBC) EC ₅₀ = 0,17 mgmL ⁻¹	2 %	8 %	60 %

5.4.2 Atividade Antiproliferativa

Outro ensaio efetuado para *V. bicuhyba* foi a avaliação da atividade citotóxica frente a células neoplásicas. O câncer é uma das doenças que mais tem atingido a população mundial. Segundo a OMS, a estimativa para o biênio 2018-2019, no Brasil, é que ocorra 600 mil casos novos a cada ano (OMS, 2017). A **Figura 25 (p. 72)** descreve o número estimado de casos, e a sua porcentagem, dos principais tipos de cânceres que acometeram homens e mulheres no ano de 2018. Observa-se que o sexo masculino tem sido alvo principalmente de câncer de próstata, seguido pelo câncer da traquéia, brônquio e pulmão. Já no sexo feminino, o maior número de casos é para o câncer de mama, seguido pelo cólon e reto (**Figura 25, p. 72**).

Figura 25. Imagem da distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, excetuando-se pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Homens Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

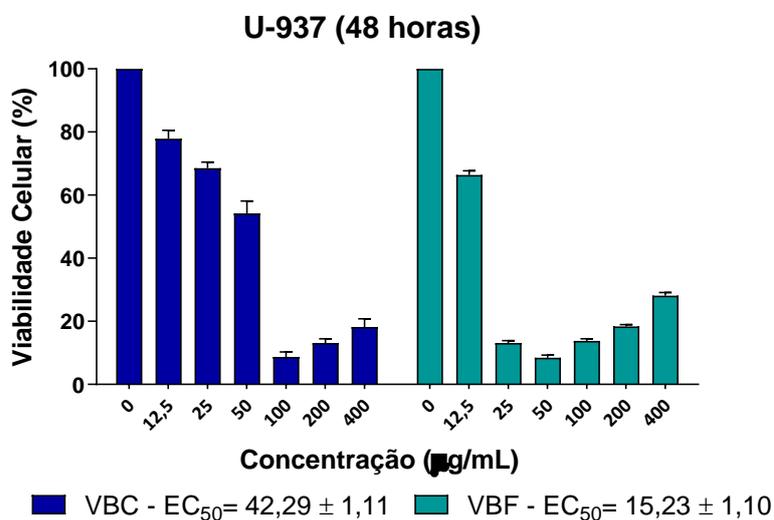
*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-incidencia-de-cancer-no-brasil-2018.pdf>.

O câncer surge a partir de uma mutação genética que promove o crescimento desordenado de células que podem invadir tecidos e órgãos ocasionando a formação de tumores que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2018). Dentre os diversos tipos de cânceres, os mais incidentes no mundo foram o de pulmão, mama, intestino e próstata (OMS, 2018).

A atividade antineoplásica consistiu na avaliação, em triplicada, através do ensaio colorimétrico utilizando MTT dos extratos brutos das folhas e caule (VBF e VBC) e das frações do extrato bruto das folhas (VBFB, VBFD, VBFE e VBFF). A citotoxicidade frente à célula neoplásica U937 foi realizada por um período de incubação de 48 horas. A **Figura 26, p. 73** mostra o gráfico com resultados obtidos para cada extrato e os valores de EC_{50} .

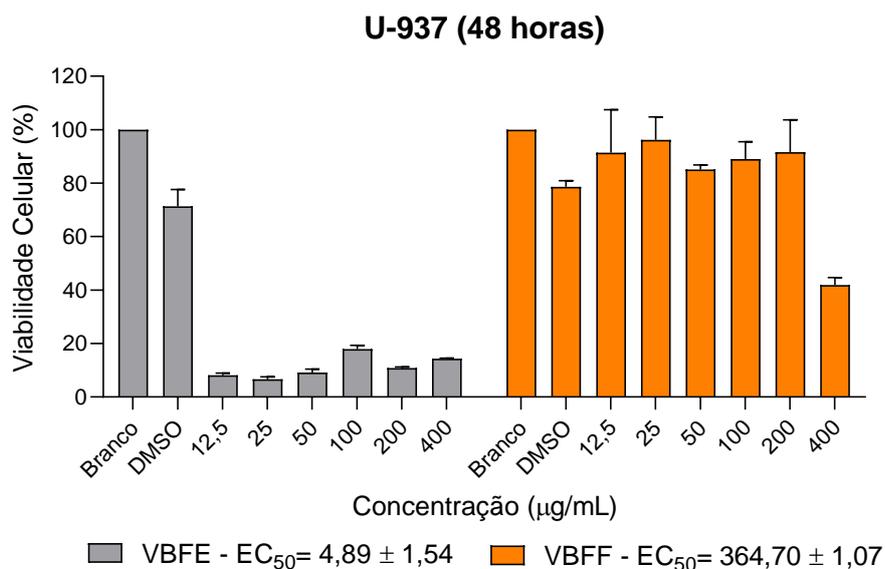
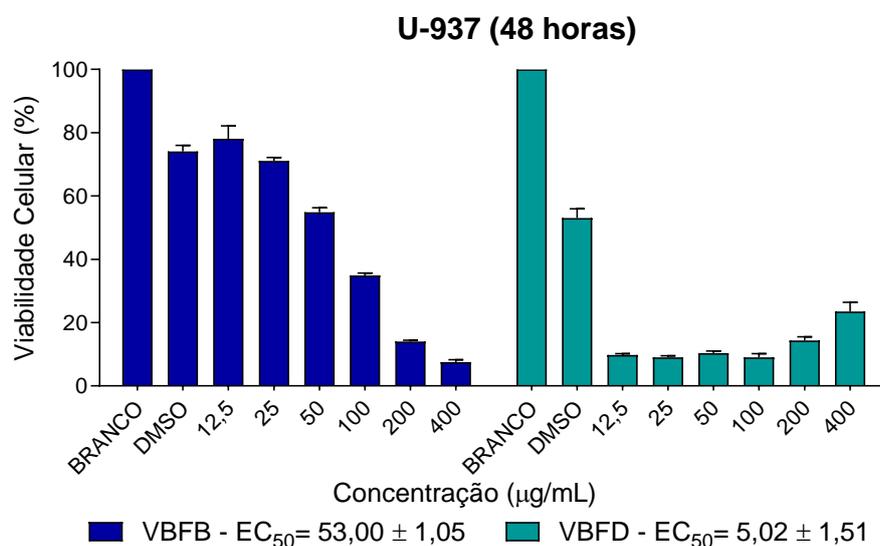
Figura 26. Gráfico da avaliação viabilidade celular da linhagem U937, através do ensaio MTT, dos extratos das folhas (VBF) e caule (VBC) de *V. bicuhyba*. O zero se refere ao controle negativo do ensaio (células e meio de cultura). Experimento representativo de três repetições em triplicata, com diferença significativa com * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ em relação ao controle negativo (zero).



Os valores apresentados pelos extratos denotam que a espécie em questão possui uma seletividade promissora para atuar frente às células cancerígenas. Visto que o MTT avalia a função celular à nível mitocondrial, mediante apoptose, e sendo o extrato bruto das folhas mais citotóxico que o extrato bruto do caule, o estudo foi continuado apenas com o extrato e frações das folhas.

As frações de VBF escolhidas para a avaliação da atividade foram as que apresentaram maior massa e facilidade de solubilização para realização do teste. A **Figura 27, p. 74** a seguir mostra os resultados obtidos para as frações do extrato das folhas e seus respectivos valores de EC_{50} .

Figura 27. Gráfico da viabilidade celular, através do ensaio MTT, das frações do extrato das folhas de *V. bicuhyba*.



De quatro frações escolhidas e analisadas (VBFB, VBFD, VBFE e VBFF), apenas as frações VBFD e VBFE apresentaram um efeito citotóxico pronunciado frente à linhagem celular U937. Exibindo os menores valores de EC_{50} encontrados para três experimentos isolados em triplicata. Nesse contexto, o fracionamento fitoquímico se deteve nessas duas frações a fim de isolar as substâncias responsáveis pelo efeito apresentado.

A fração VBFF não foi capaz de interferir na viabilidade das células U937 nas menores concentrações. Apenas na maior concentração ($400 \mu\text{g/mL}^{-1}$) ela

exibe um potencial de reduzir a viabilidade, no entanto, esta concentração não é viável para estudos mais aprofundados.

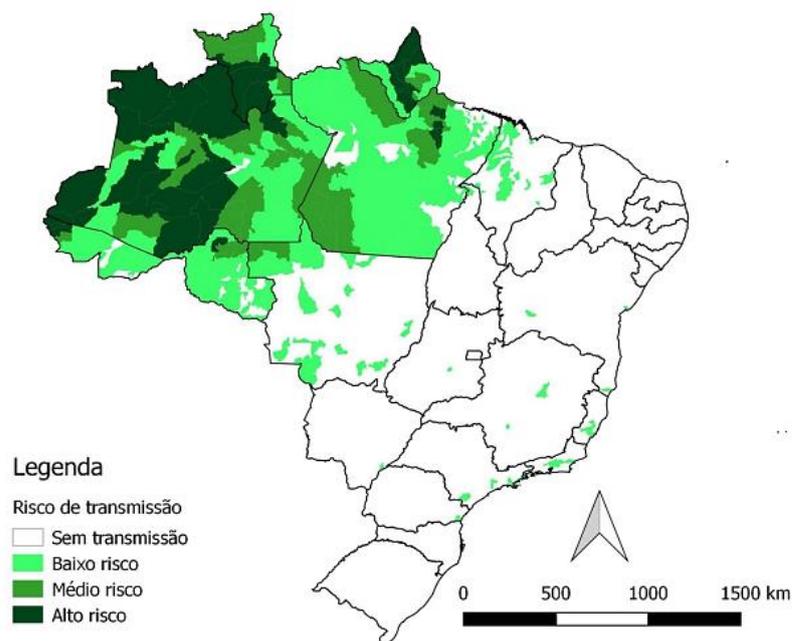
O DMSO (dimetilsulfóxido), veículo utilizado para a dissolução das frações, não expos efeito citotóxico sobre as células mantidas no cultivo na maior concentração testada. Portanto, o emprego deste como solvente nas frações não foi fator interferente nos resultados, pois os dados obtidos mostram leitura próximas entre DMSO e controle celular.

5.4.3 Atividade Antimalárica

A avaliação do potencial farmacológico apresentado pelas frações do extrato das folhas de *V. bicuhyba*, para a atividade antimalárica das frações foram avaliadas frente ao *Plasmodium falciparum*.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2017 foi estimado que cerca de 210 milhões de casos de pessoas infectadas com malária ocorreram no mundo. Destacando-se o aumento na transmissão no Brasil, Nicarágua e Venezuela (OMS, 2018). No Brasil a região com maior incidência de malária é a região amazônica (**Figura 28, p. 76**). Faz-se necessário, diante desse contexto, a busca por novas moléculas capazes de inibir ou matar o protozoário responsável por essa doença parasitária.

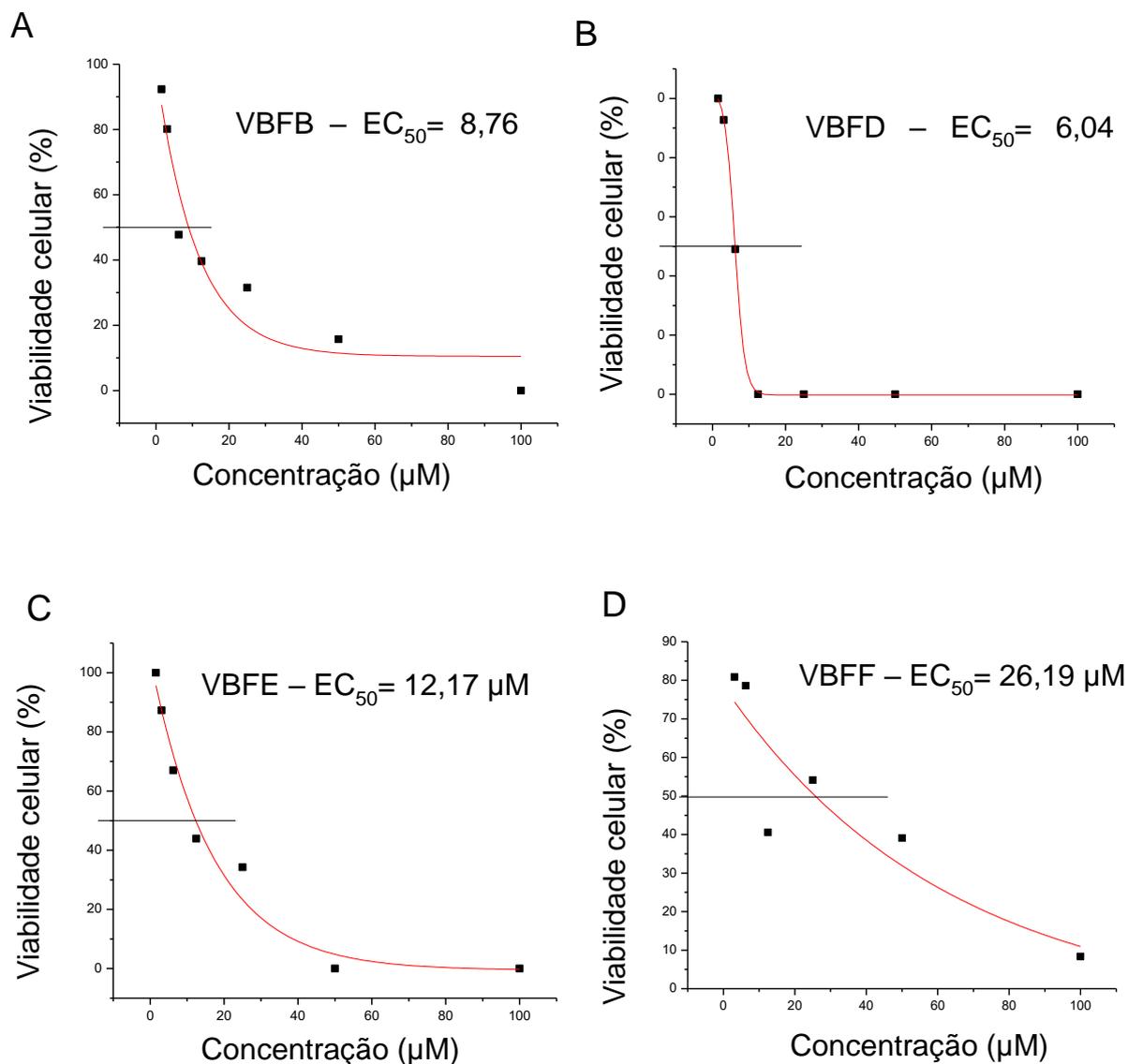
Figura 28. Mapa de risco da malária no Brasil (2017).



Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS. Dados preliminares, sujeitos à alteração. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/16/Mapa-de-risco-mal-ria-2017.pdf>. Acesso em: 05/03/19.

Os resultados obtidos da avaliação inicial das frações do extrato bruto das folhas de *V. bicuhyba* frente ao *Plasmodium falciparum* estão descritos na **Figura 29, p. 77**. De acordo os gráficos a fração VBFD se destaca com maior porcentagem de viabilidade celular, somando o potencial da fração ao resultado mostrado na atividade citotóxica frente à linhagem celular U937. O fracionamento fitoquímico desta fração nos permitiu identificar quais moléculas, e suas respectivas classes química, são potencialmente ativas.

Figura 29. Gráfico da viabilidade celular das frações do extrato das folhas de *V. bicuhyba* frente a cepa *Plasmodium falciparum*. **A:** gráfico da fração VBFB, **B:** gráfico da fração VBFD, **C:** gráfico da fração VBFE e **D:** gráfico da fração VBFF.



Todos os estudos realizados em relação aos dados dos ensaios biológicos aqui descritos, são inéditos, visto que as atividades investigadas não foram relatadas anteriormente para a espécie estudada. A atividade larvicida exibida para os extratos em concentrações muito baixas $0,2 \text{ mgmL}^{-1}$ com atividades de 90 e 60% de mortalidade das larvas é um importante indicativo da presença de moléculas altamente ativas e que fornece uma importante ferramenta na busca

para o desenvolvimento de moléculas efetivas com atividade larvicida para o controle da população de *Aedes aegypti*.

Os resultados de EC_{50} ($0,11 \text{ mgmL}^{-1}$ e $EC_{50}= 0,17 \text{ mgmL}^{-1}$) para os extratos demonstram que a espécie é potencialmente ativa, e que estudos aprofundados devem ser efetuados a fim de analisar o mecanismo de ação e a(s) substância(s) responsável pela atividade. Comparado com os dados da literatura, os extratos de *V. bicuhyba* apresentou valores muito menores dos que os relatados para óleos essenciais ($15,91 - 104,98 \text{ mgmL}^{-1}$) (FURTADO et al., 2005) e extratos ($0,85 - 8,57 \text{ mgmL}^{-1}$) de algumas espécies de outras famílias de angiospermas, tais como Fabaceae, Moraceae, Lamiaceae, Anacardiaceae, e outras (ADEBAJO, FAMUYIWA e ALIYU, 2014)

Em relação à atividade antiproliferativa para células malignas realizada com a cepa U937, foi demonstrado novamente que o extrato das folhas foi mais ativo que o do caule. Este resultado pode ter duas leituras, no mínimo: primeiro, as folhas tem moléculas com maior potencial bioatividade, e por outro lado, o extrato do caule, que também revelou boa atividade no ensaio larvicida é menos tóxico, visto que o ensaio se baseia em viabilidade celular. Na intenção de investigar as substâncias responsáveis pelo resultado observado para as folhas, as frações foram analisadas em novos ensaios. Dessas, as frações VBFD e VBFE foram as mais ativas.

Os resultados apresentados pelas frações são muitos promissores quando comparados com os resultados observados na literatura para extratos de diferentes partes de outras espécies da mesma família avaliadas frente à outras linhagens celulares, como *V. sebifera* ($50,37 - 140 \text{ } \mu\text{gmL}^{-1}$) e *Knema globularia* ($17,58 \text{ } \mu\text{gmL}^{-1}$) (SRIPHANA, YENJAI e KOATTHADA, 2016). Ou até de moléculas isoladas de espécies como *V. sebifera* ($3,86 - 56,52 \text{ } \mu\text{gmL}^{-1}$) (DENNY et al., 2008), *Knema glauca* ($5,60 - 16,24 \text{ } \mu\text{gmL}^{-1}$) e *Knema furfuracea* ($0,37 - 17,75 \text{ } \mu\text{gmL}^{-1}$) (RANGKAEW et al., 2009).

Considerando-se os resultados até aqui obtidos, as frações VBFD e VBFE, que apresentaram melhores resultados foram investigadas quanto a atividade antimalárica. Os resultados com valores abaixo dos que são relatados na literatura para frações e produtos naturais (RANGKAEW et al., 2009), evidenciam o potencial biológico das frações que pode ser efeito sinérgico das moléculas ali presentes.

Com o intuito de elucidar quais substâncias estão presentes nas frações ativas, o estudo fitoquímico foi direcionado para as frações VBFD e VBFE.

5.5 TRIAGEM FITOQUÍMICA

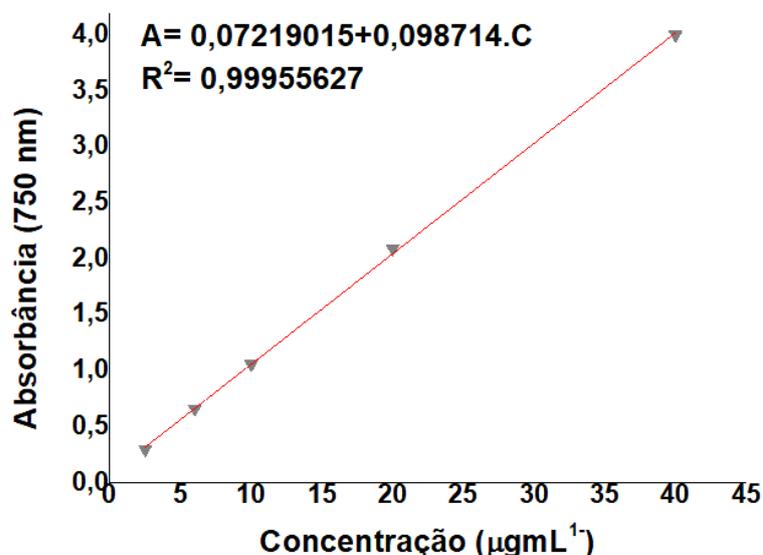
A triagem fitoquímica qualitativa para a espécie *Virola bicuhyba* forneceu um prospecto positivo para atividade antioxidante, presença de flavonoides, esteroides e taninos para as folhas e para o caule. Os resultados obtidos para os testes estão sumarizados na **Tabela 14, p. 79**. A análise destes dados demonstra que não há diferença no perfil de classes de substâncias presentes para ambas as partes coletadas de *V. bicuhyba*. No entanto, os resultados obtidos nos ensaios biológicos forneceram informações preliminares de que o extrato bruto e frações das folhas possuem maior atividade do que o extrato do caule. Portanto, o fracionamento fitoquímico se concentrou nas frações das folhas.

Tabela 14. Tabela do perfil fitoquímico das folhas e caule de *Virola bicuhyba*.

Testes	Folhas	Caule
Saponinas	-	-
Antioxidante	+	+
Flavonoides	+	+
Polissacarídeos	-	-
Terpenoides	-	-
Esteroides	+	+
Taninos	+	+

A quantificação de fenóis totais em equivalente de ácido gálico (**Figura 30, p. 80**) foi realizada apenas para o extrato bruto das folhas, visto que as folhas foi o objeto de estudo deste projeto. O teste de fenóis realizado apenas para o extrato das folhas apresentou um equivalente de 0,656 mg EAG/g extrato.

Figura 30. Curva de calibração do ácido gálico em $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizada nas análises de fenóis totais.



5.6 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *V. bicuhyba*

5.4.1 Determinação Estrutural de V1

A análise por cromatografia líquida utilizando o sistema acetonitrila:água (5:95) acoplada ao espectro de massas em modo negativo da amostra **V1**, revelou a presença do íon majoritário de razão massa/carga igual a 447 Da. O espectro de fragmentação do íon m/z 447 permitiu a identificação, comparado a literatura (**Tabela 15, p. 80**), que a substância em questão é o flavonoide glicosilado quercetina. A fragmentação do íon m/z 447 apresentou 3 espécies aniônicas (m/z 300, 271 e 255) (**Figura 31, p. 81**). Sendo o sinal de m/z 300 referente a parte estrutural flavonoidica resultante da perda de 147 daltons característico do açúcar raminose (**Figura 32, p. 81**).

Tabela 15. Dados da análise de UPLC-DAD-MS/MS da substância **V1**.

Tempo de retenção (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] (m/z)	MS/MS (m/z)	Nome	Referência
24.9	260,340	447.1004	300, 271, 255	Quercetina (Quercetina 3-O-raminosídeo)	MassBank; Lee et al, 2017

Figura 31. Espectro MS/MS da substância **V1** obtida do extrato etanólico das folhas de *V. bicuhyba*.

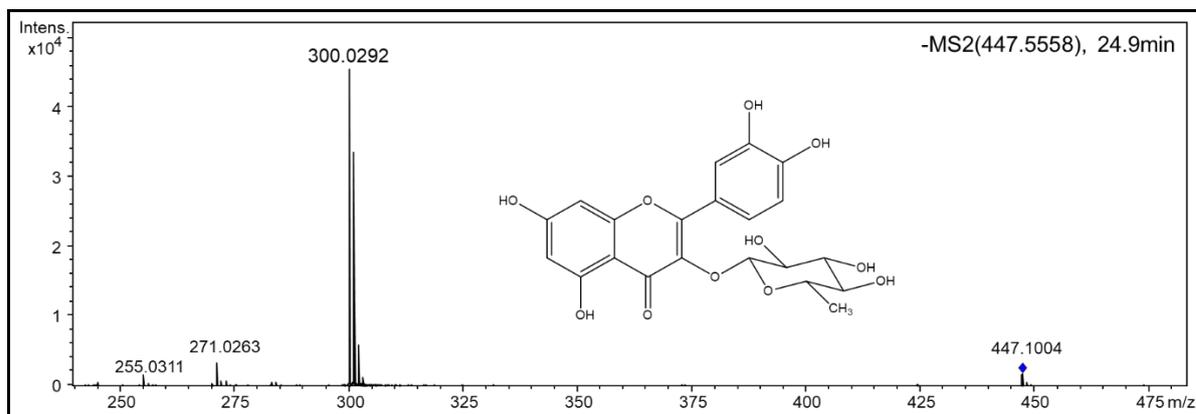
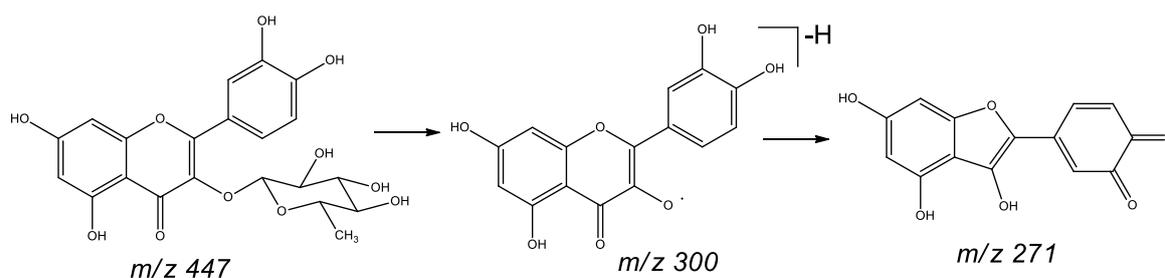


Figura 32. Proposta de fragmentação do íon m/z 447 do espectro de massa da substância **V1**.



Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (**Figura 33 e 36, p. 83 e 84**) revelou uma riqueza de sinais entre δ_{H} 0,95-7,33 ppm e δ_{C} 16,27-179,11 ppm. No espectro de RMN ^{13}C foram observados 26 sinais, sendo 21 com descolamentos químicos que apontaram para a estrutura flavonoidica e uma unidade de açúcar. O espectro ^{13}C (**Figura 36, p. 84**) indicou onze sinais metínicos (CH) em δ_{C} 98,46 (C6), δ_{C} 93,38 (C8), δ_{C} 115,03 (C2'), δ_{C} 115,58 (C5'), δ_{C} 121,55 (C6'), δ_{C} 101,14 (Ram-C1), δ_{C} 70,65 (Ram-C2), δ_{C} 70,72 (Ram-C3), δ_{C} 72,61 (Ram-C4), δ_{C} 70,50 (Ram-C5) e δ_{C} 16,27 (Ram-C5-CH₃). Dez sinais para átomos de carbono desidrogenados (C) em δ_{C} 177,86 (C4), δ_{C} 157,95 (C9), δ_{C} 104,51 (C10), δ_{C} 161,76 (C5), δ_{C} 164,46 (C7), δ_{C} 134,83 (C3), δ_{C} 157,95 (C2), δ_{C} 121,50 (C1'), δ_{C} 145,01 (C3') e δ_{C} 148,41 (C4'). O espectro não indicou a presença de átomos de carbonos para grupos metilênicos (CH₂) e metílicos (CH₃).

Os dados em conjunto da análise de RMN ^1H (**Figuras 33-35, p. 83 e 84**), ^{13}C (**Figura 36, p. 84**) e HSQC confirmaram as atribuições dos átomos de

hidrogênio e carbono da substância **V1**. Os dados foram comparados com os valores da literatura (WANG et al., 2008) e permitiram atribuir a essa substância a estrutura do flavonoide glicosilado quercetina 3-O-raminose já identificado anteriormente na espécie (KUROSHIMA et al., 2001) (**Tabela 16, p. 82**).

Tabela 16. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) de **V1** em MeOD, correlações observadas no espectro de HSQC e comparação com os valores de referência da literatura em MeOD. Os deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J), em Hz.

Nº C	HSQC	Literatura: WANG et al., 2008 MeOD (100 MHz)
	δ_c	δ_c
C		
4	177,86	177,9
9	157,95	157,5
10	104,51	104,2
5	161,76	161,4
7	164,46	154,3
3	134,83	134,4
2	157,95	156,6
1'	121,50	120,9
3'	145,01	145,3
4'	148,41	148,6
CH		
6	98,46	98,8
8	93,38	93,8
2'	115,03	115,6
5'	115,58	115,8
6'	121,55	121,3
Ram-C1	102,14	101,9
Ram-C2	70,65	70,5
Ram-C3	70,72	70,7
Ram-C4	72,61	71,3
Ram-C5	70,50	70,2
Ram-C5-CH ₃	16,27	17,6

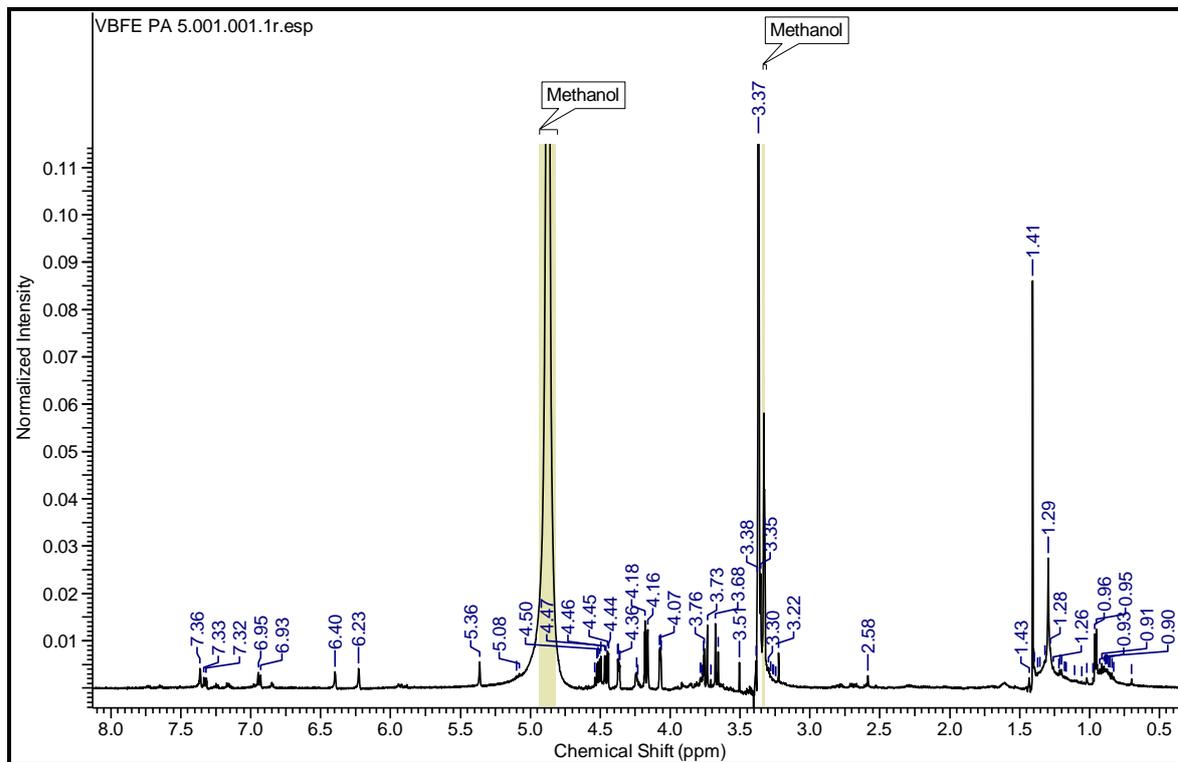
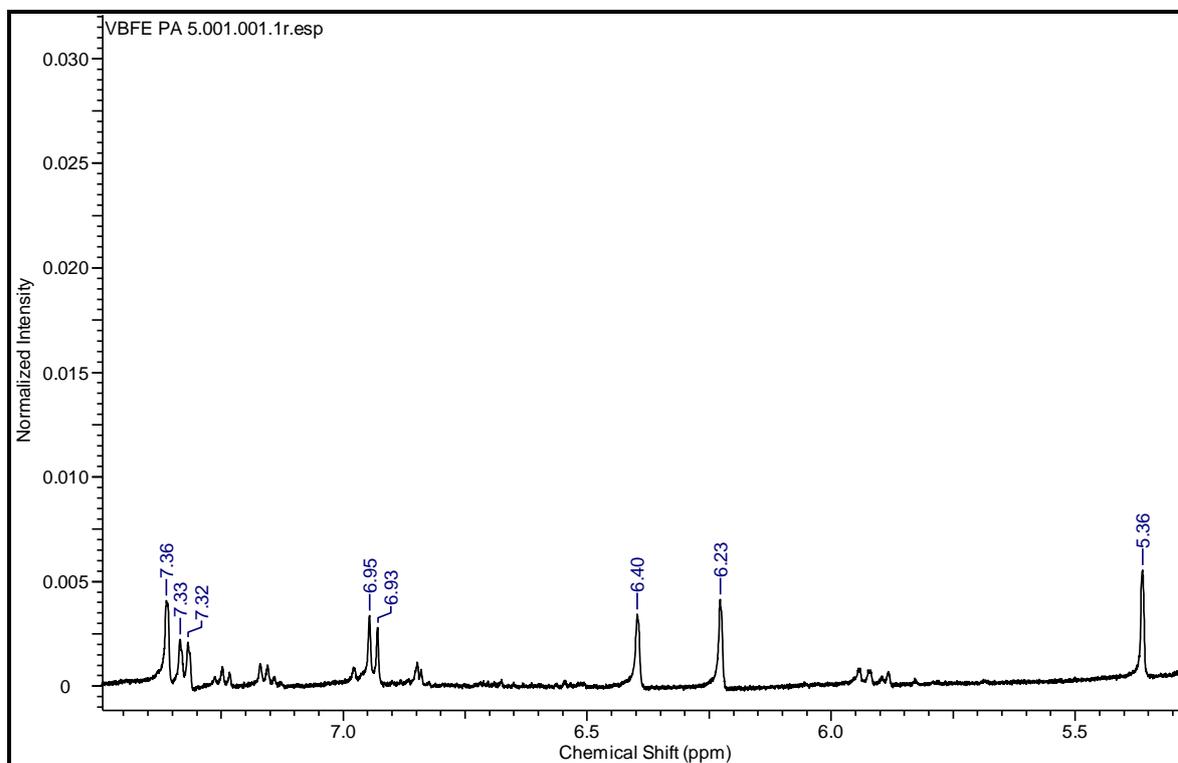
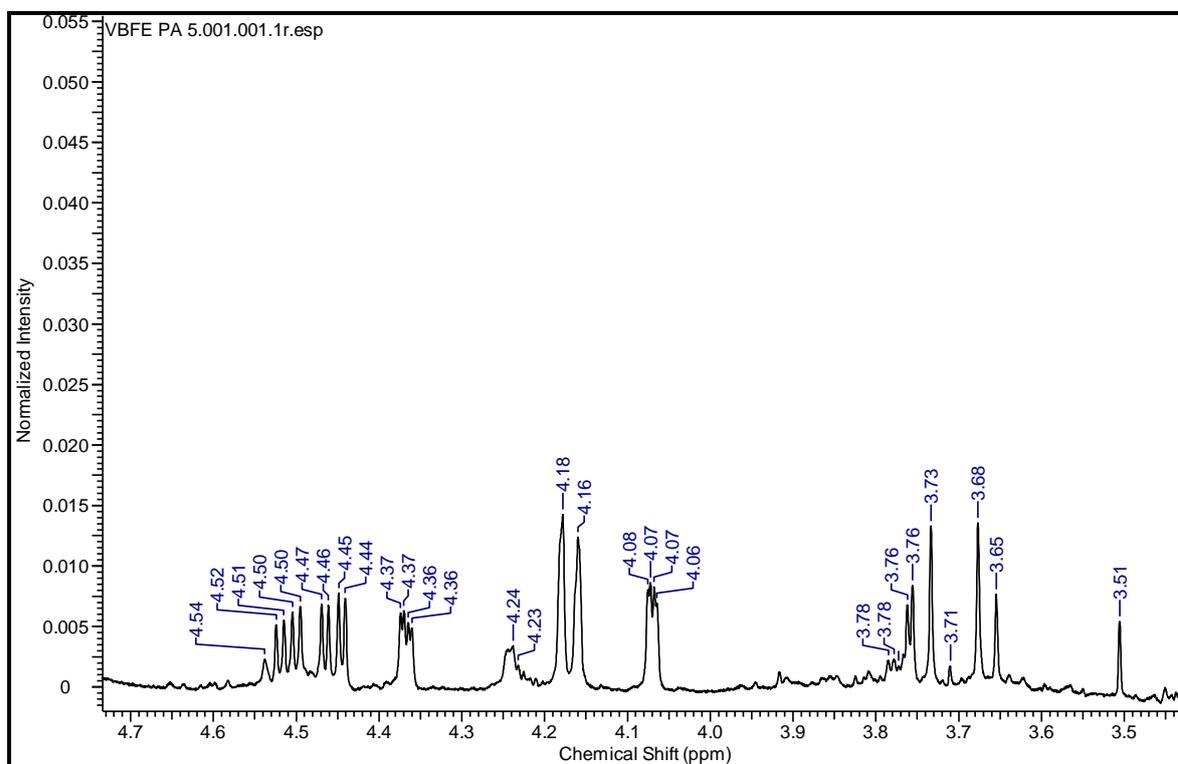
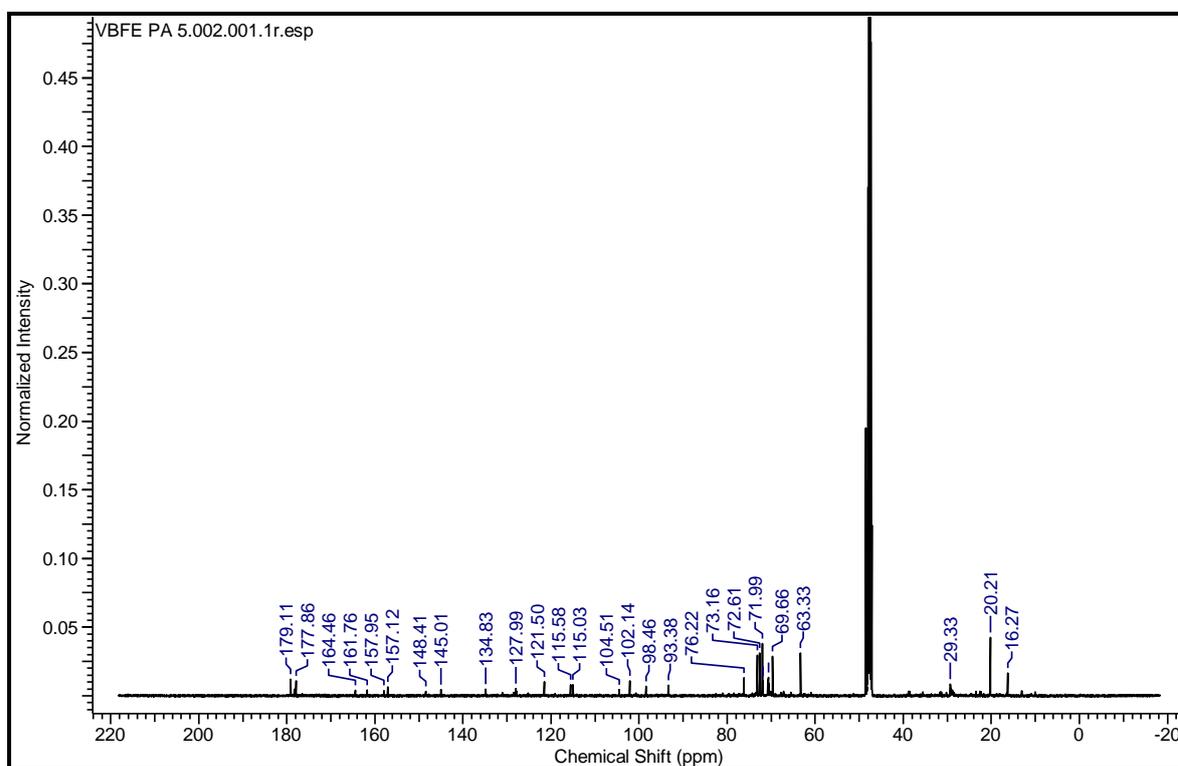
Figura 33. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) em MeOD de V1.**Figura 34.** Ampliação na região de δ_{H} 7,36-5,36 do RMN ^1H (500 MHz) em MeOD de V1.

Figura 35. Ampliação na região de δ_H 4,55-3,51 do RMN 1H (500 MHz) em MeOD de V1.**Figura 36.** Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em MeOD de V1

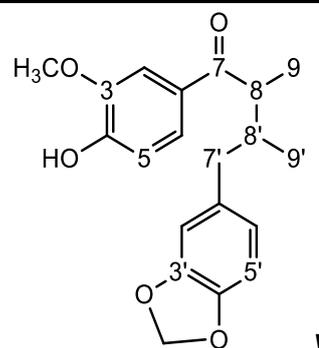
5.4.2 Determinação Estrutural de V2

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (**Figura 37 e 39, p. 87 e 88**) revelaram sinais entre δ_{H} 0,84-7,54 ppm e δ_{C} 14,22-202,99 ppm.

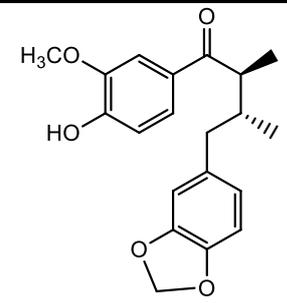
No espectro de RMN ^{13}C foram observados 20 sinais com deslocamentos químicos que permitiram a identificação dos átomos de carbono que compõe a substância **V2**. O espectro DEPT 135 (**Figura 40, p. 88**) indicou a presença de 13 átomos de carbonos, sendo dois sinais para grupos metílicos (CH_3) em δ_{C} 17,65 ($\text{CH}_3\text{-C9}$) e δ_{C} 14,22 ($\text{CH}_3\text{-C9}'$), dois sinais metilênicos (CH_2) em δ_{C} 39,00 ($\text{CH}_2\text{-C7}'$) e δ_{C} 100,72 (CH_2 do grupo OCH_2O), oito sinais metínicos (CH) em δ_{C} 110,19 (CH-C2), δ_{C} 150,28 (CH-C4), δ_{C} 113,76 (CH-C5), δ_{C} 123,33 (CH-C6), δ_{C} 44,94 (CH-C8), δ_{C} 38,29 ($\text{CH-C8}'$), δ_{C} 109,47 ($\text{CH-C2}'$), δ_{C} 107,96 ($\text{CH-C5}'$) e δ_{C} 121,99 ($\text{CH-C6}'$) e sete sinais para átomos de carbono desidrogenados (C) em δ_{C} 147,43 (C3), δ_{C} 150,28 (C4), δ_{C} 145,60 ($\text{C3}'$), δ_{C} 146,80 ($\text{C4}'$), δ_{C} 130,12 (C1) e δ_{C} 202,99 (C7). O sinal em δ_{C} 56,03 sugere a presença de um grupo metoxila (OCH_3).

Os dados em conjunto da análise de RMN ^1H (**Figura 37, p. 87**), ^{13}C (**Figura 39, p. 88**), DEPT 135 (**Figura 40, p. 88**), HSQC e HMBC (**Figura 41 e 42, p. 89**) confirmaram as atribuições dos átomos de hidrogênio e carbono da substância **V2**. Os dados foram comparados com os valores apresentados na literatura (FERNANDES, BARATA e FERRI, 1993) e permitiram atribuir a essa substância a estrutura de diarilbutano da neolignana Oleiferina D já identificado anteriormente para a espécie (**Tabela 17, p. 86**).

Tabela 17. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) de **V2** em CDCl_3 , correlações observadas no espectro de HSQC e comparação com os valores de referência da literatura em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J), em Hz.



V2



OLEIFERIN D

Nº C	HSQC		HMBC			Literatura
	δ_c	δ_H	J^2	J^3	J^4	δ_c <small>CDCl_3 (75,5 MHz)</small>
C						
7	202,99		3,39	7,54; 1,23; 7,50	2,81; 6,94	199,9
1	130,12					129,8
3	147,43					146,3
4	150,28		7,54	6,94; 7,50		149,7
3'	145,60		6,57		6,52	147,2
4'	146,80					145,4
1'	134,64					134,1
CH						
2	110,19	7,54 (s)				109,8
5	113,76	6,94 (d, J=8,2)				113,3
6	123,33	7,50 (d, J=8,4)				122,7
8	44,94	3,39 (m)				44,2
2'	109,47	6,57 (s)				109,1
5'	107,96	6,68 (d, J=7,9)				107,6
6'	121,99	6,52 (d, J=7,9)		2,81	2,18/2,14	121,6
8'	38,29	2,18/2,14 dd				37,9
CH₂						
7'	39,00	2,81 (d, J=9,9)				38,9
CH₃						
9	17,65	0,84 (d, J=6,0)				17,5
9'	14,22	1,23 (d, J=6,9)				14,2
OCH ₃	56,03	3,95 (s)				55,4
OCH ₂ O	100,72	5,90 (s)				100,0

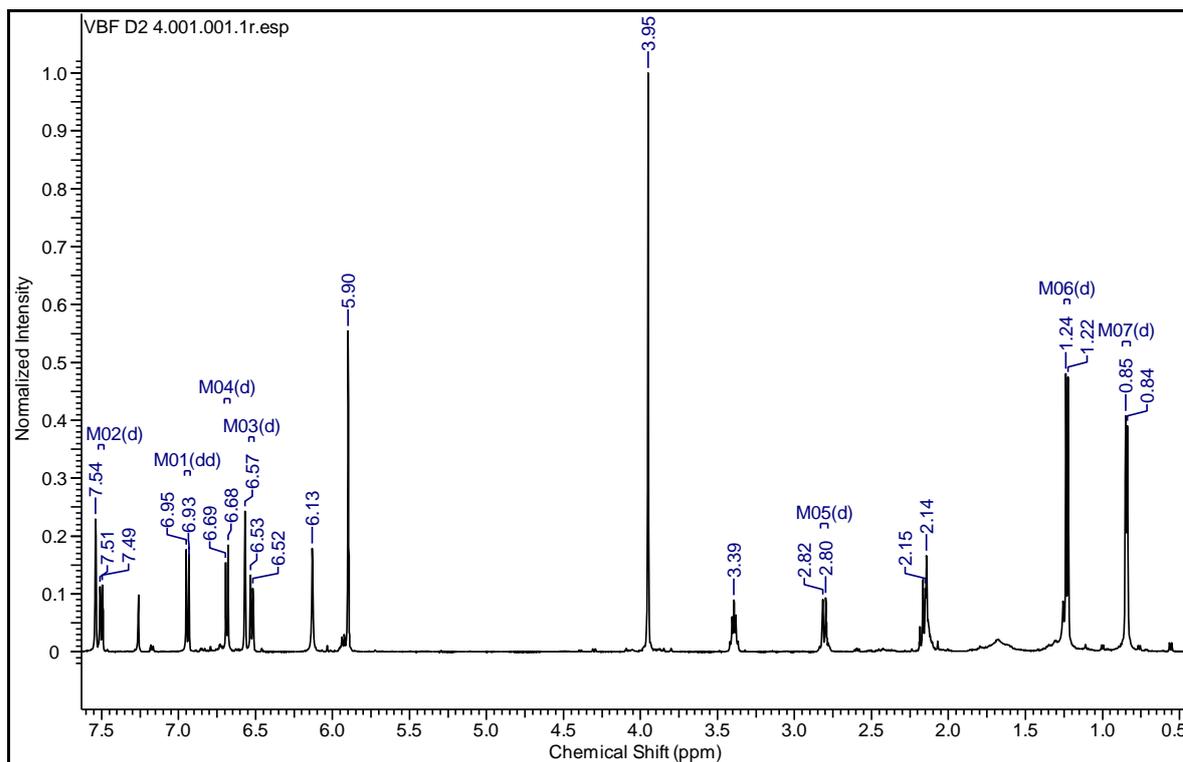
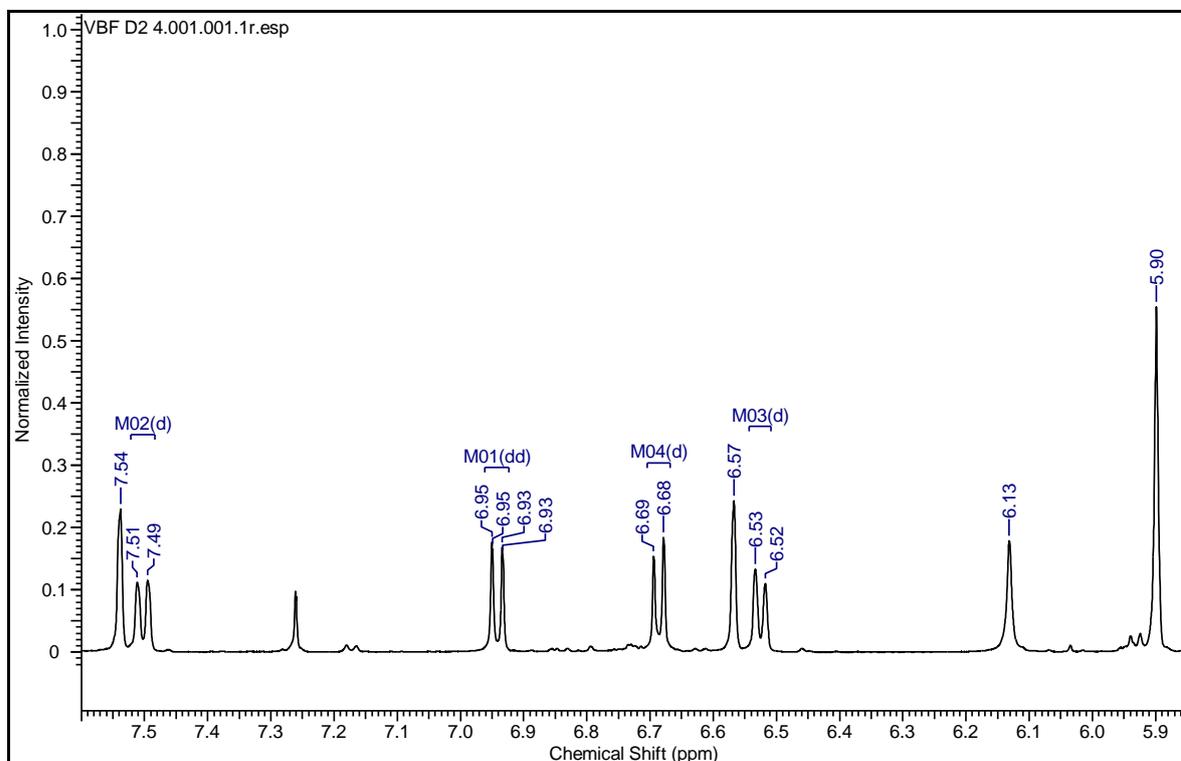
Figura 37. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 de **V2**.**Figura 38.** Ampliação na região de δ_{H} 5,80-7,54 do RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 de **V2**.

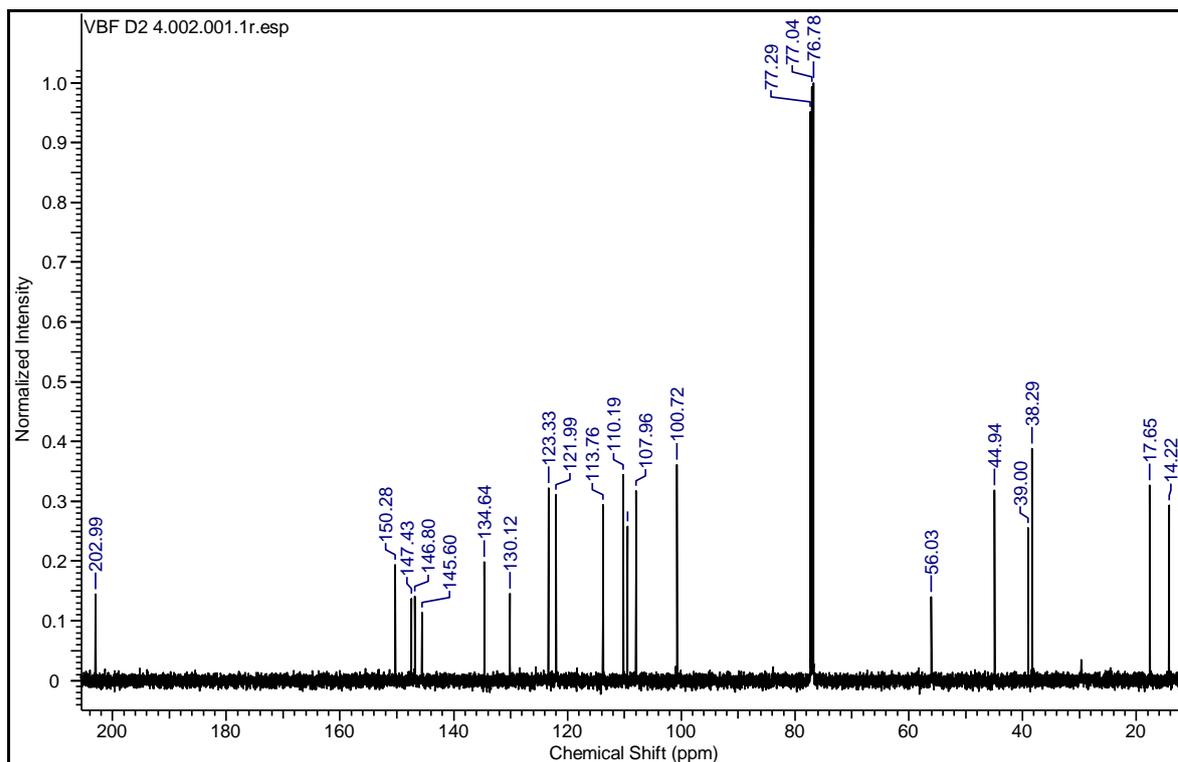
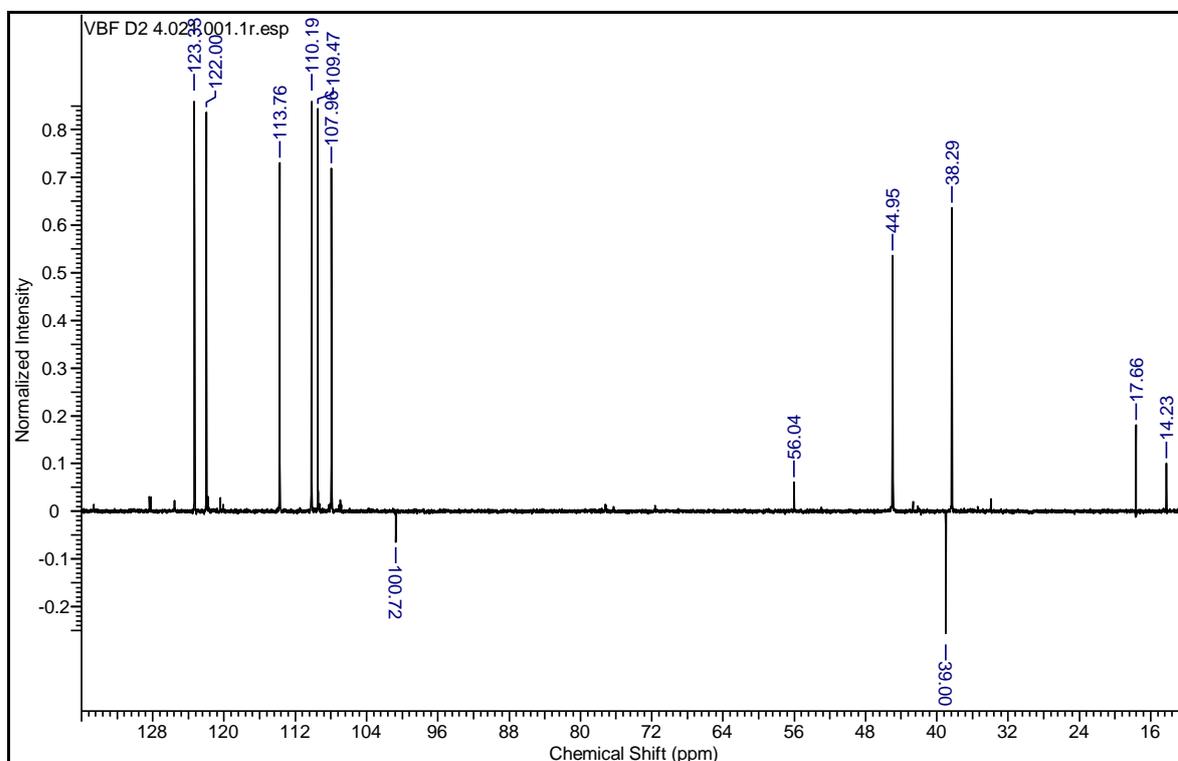
Figura 39. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 de **V2**.**Figura 40.** Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135 (125 MHz) em CDCl_3 de **V2**.

Figura 41. Mapa de correlação heteronuclear HSQC em CDCl_3 de **V2**.

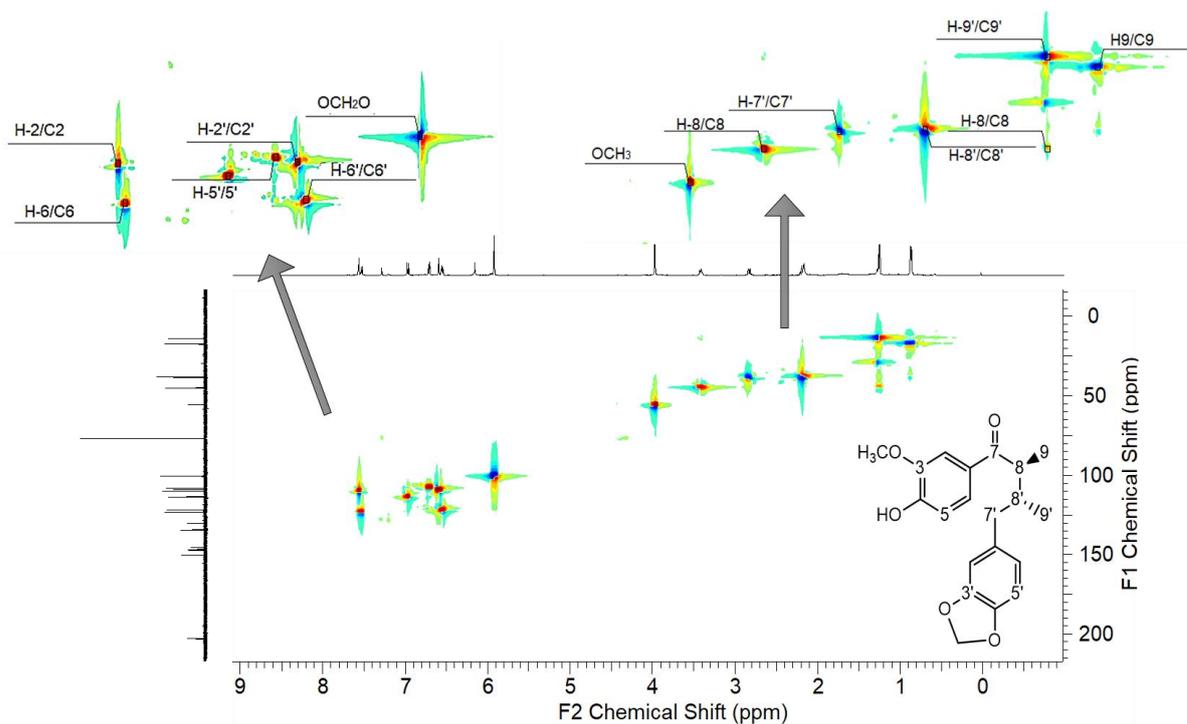
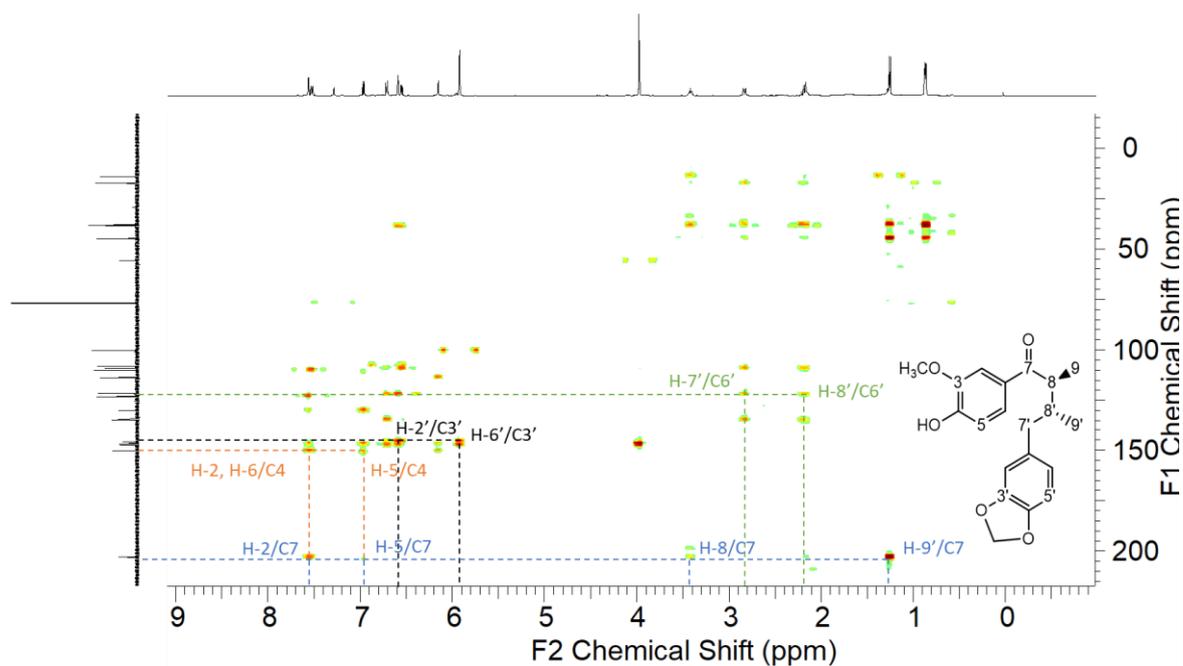


Figura 42. Mapa de correlação heteronuclear HMBC em CDCl_3 de **V2**.



5.4.3 Determinação Estrutural de V3

A amostra **V3** foi obtida na forma de cristais brancos em formato de agulha (0,07410 g) após recristalização em hexano a temperatura ambiente. Quando subordinado à CCDA, utilizando como sistema de solvente hexano:acetato de etila (8:2) foi observada uma única mancha quando revelado com vanilina sulfúrica. O teste do ponto de fusão mostrou que o ponto de fusão da substância **V3** é 61 °C, bem próximo do relatado na literatura (AZEVEDO et al., 1997).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (**Figura 43 e 45, p. 92 e 93**) revelaram sinais entre δ_{H} 0,68-7,28 ppm e δ_{C} 24,53-206,12 ppm, com perfil que apontam para a estrutura da classe de compostos fenólicos.

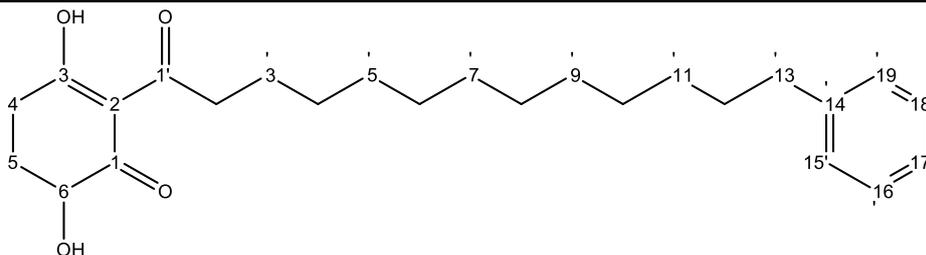
No espectro de RMN ^{13}C foram observados 21 sinais com deslocamentos químicos que permitiram a atribuição dos átomos de carbono para a substância **V3**. O espectro de ^{13}C (**Figura 45, p. 93**) indicou dezesseis sinais metilênicos (CH_2) em δ_{C} 24,56 ($\text{C}3'$), δ_{C} 27,17 ($\text{C}5$), δ_{C} 29,35-29,64 ($\text{C}4'$ - $\text{C}13'$), δ_{C} 31,31 ($\text{C}4$), δ_{C} 31,53 ($\text{C}14'$), δ_{C} 36,00 ($\text{C}15'$) e δ_{C} 40,27 ($\text{C}2'$). Seis sinais metínicos (CH) em δ_{C} 71,63 ($\text{C}3$), δ_{C} 125,54 ($\text{C}19'$), δ_{C} 128,21 ($\text{C}17'$ e $\text{C}21'$) e δ_{C} 128,40 ($\text{C}18'$ e $\text{C}20'$). Cinco sinais para átomos de carbono desidrogenados (C) em δ_{C} 110,31 ($\text{C}1$), δ_{C} 149,46 ($\text{C}16'$), δ_{C} 195,59 ($\text{C}6$), δ_{C} 197,92 ($\text{C}2$) e δ_{C} 206,12 ($\text{C}1'$). O espectro não indicou a presença de átomos de carbonos para grupos metílicos (CH_3).

Análise das correlações observadas no espectro bidimensional de HSQC e HMBC (**Figuras 46 e 47, p. 93 e 94**), em conjunto da análise de RMN ^1H e ^{13}C confirmaram as atribuições dos átomos de hidrogênio e carbono da substância **V3**.

A análise do cromatograma apresentado pelo CG-EM para a substância com tempo de retenção 29,37 min exibiu um sinal intenso com m/z 400 Da, sendo este coerente com íon molecular do arilalquiloídico 3,6-dihydroxi-2(13-feniltridecanoil)-2-ciclohexen-1-ona. Outros sinais observados a partir da fragmentação de V3 foram observados, destacando-se os de maior intensidade: m/z 183 e m/z 91 daltons (**Figura 48, p. 94**). Esses dados estão de acordo com os valores para os íons moleculares observados para a substância 3,6-dihydroxi-2(13-feniltridecanoil)-2-ciclohexen-1-ona (AZEVEDO et al., 1997.)

Os dados foram comparados com os valores apresentados na literatura (AZEVEDO et al., 1997) e permitiram atribuir a essa substância a estrutura do arilalquílico 3,6-dihidroxi-2-(13-feniltridecanoil)-2-ciclohexen-1-ona já identificado para esta espécie vegetal (**Tabela 18, p. 91**).

Tabela 18. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) de **V3** em CDCl_3 , correlações observadas no espectro de HSQC e comparação com os valores de referência da literatura em CDCl_3 (50 MHz). Os deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J), em Hz.



V3

Nº C	HSQC		HMBC			Literatura CDCl_3 (75,5 MHz)
	δ_c	δ_H	J^2	J^3	J^4	δ_c
C						
1'	206,12			1,61		205,7
1	197,92					197,2
3	195,59					195,0
14'	142,96		2,59; 7,15			142,2
2	110,31					110,0
CH						
6	71,63	4,08 (dd, J= 7,6)				71,3
17'	125,54		7,15	7,15		125,5
15', 19'	128,21	7,15-7,28 (m)				128,1
16', 18'	128,40					128,2
CH₂						
2'	40,27					39,9
3'	24,56	1,61 (m)				24,4
5	27,17	2,38 (m)	2,77; 4,08			27,1
4'-11'	29,35- 29,64	1,26/1,30 (m)				29,1-29,5
4	31,31	2,77 (m)				31,0
12'	31,53	1,61 (m)				31,3
13'	36,00	2,59 (t, J=7,6)				35,9

Figura 43. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 de **V3**.

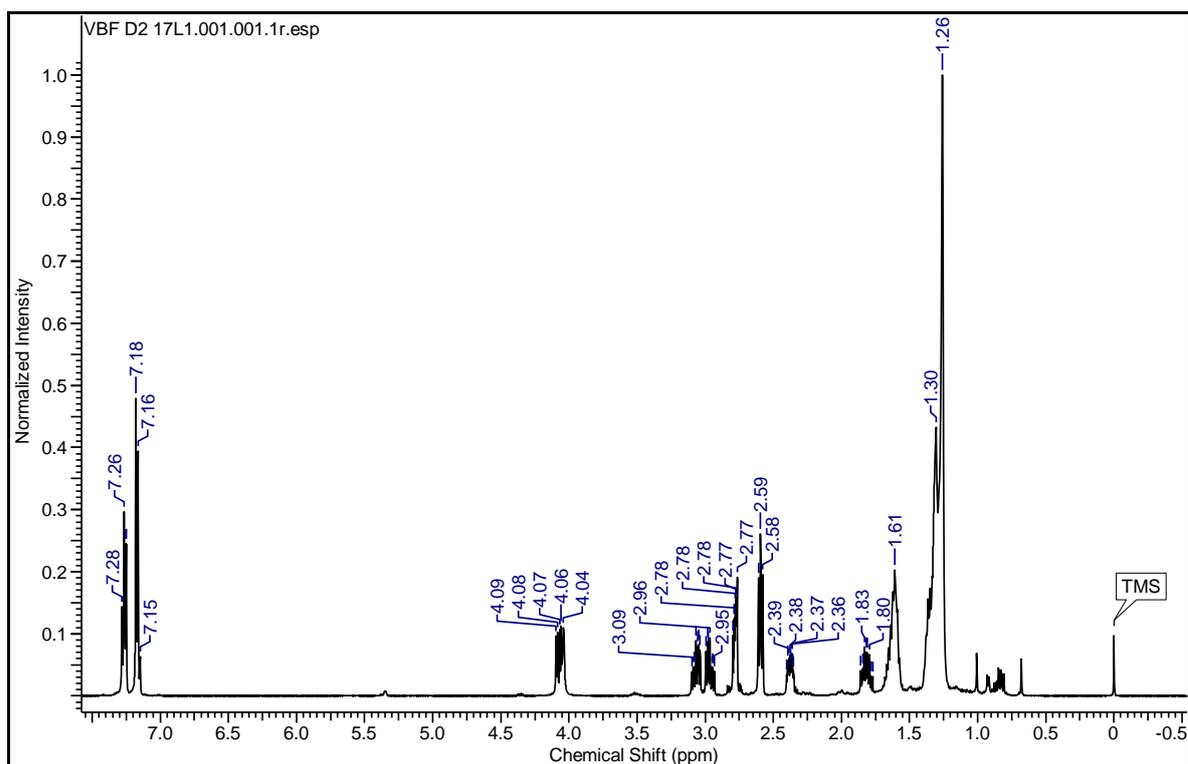


Figura 44. Ampliação nas regiões de deslocamentos químicos do RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 de **V3**.

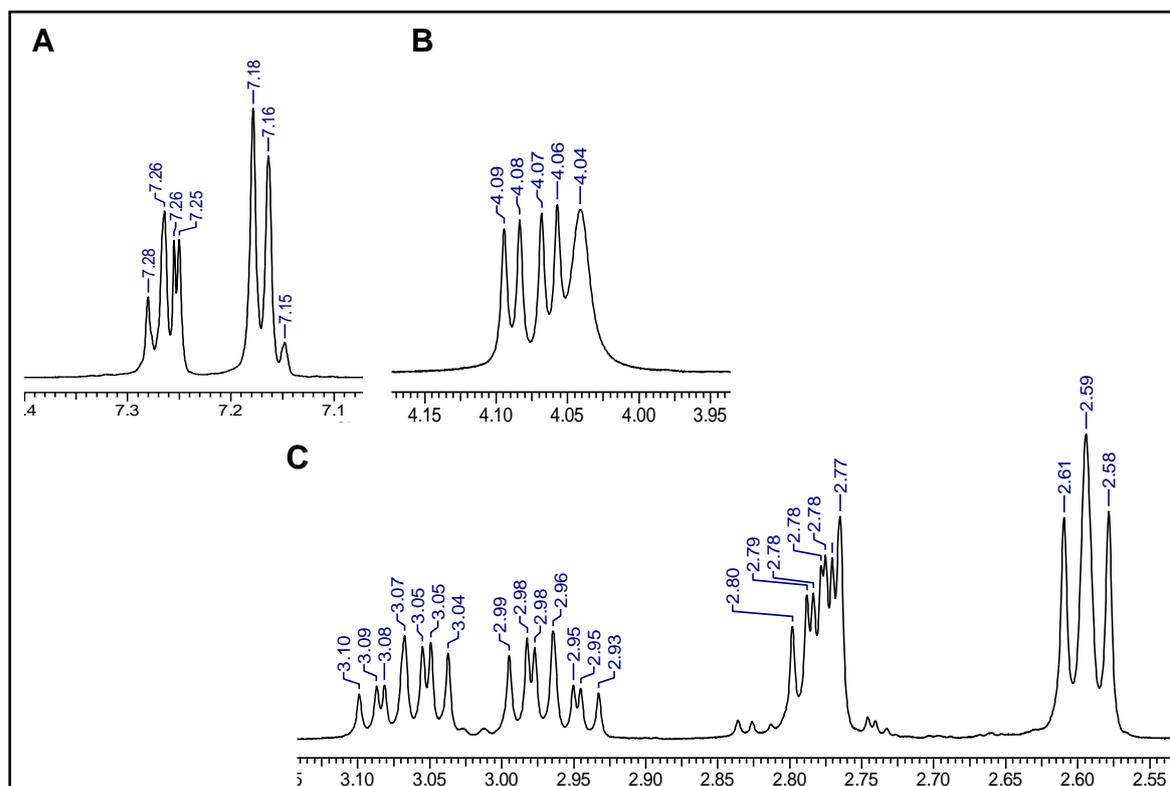


Figura 45. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 de **V3**.

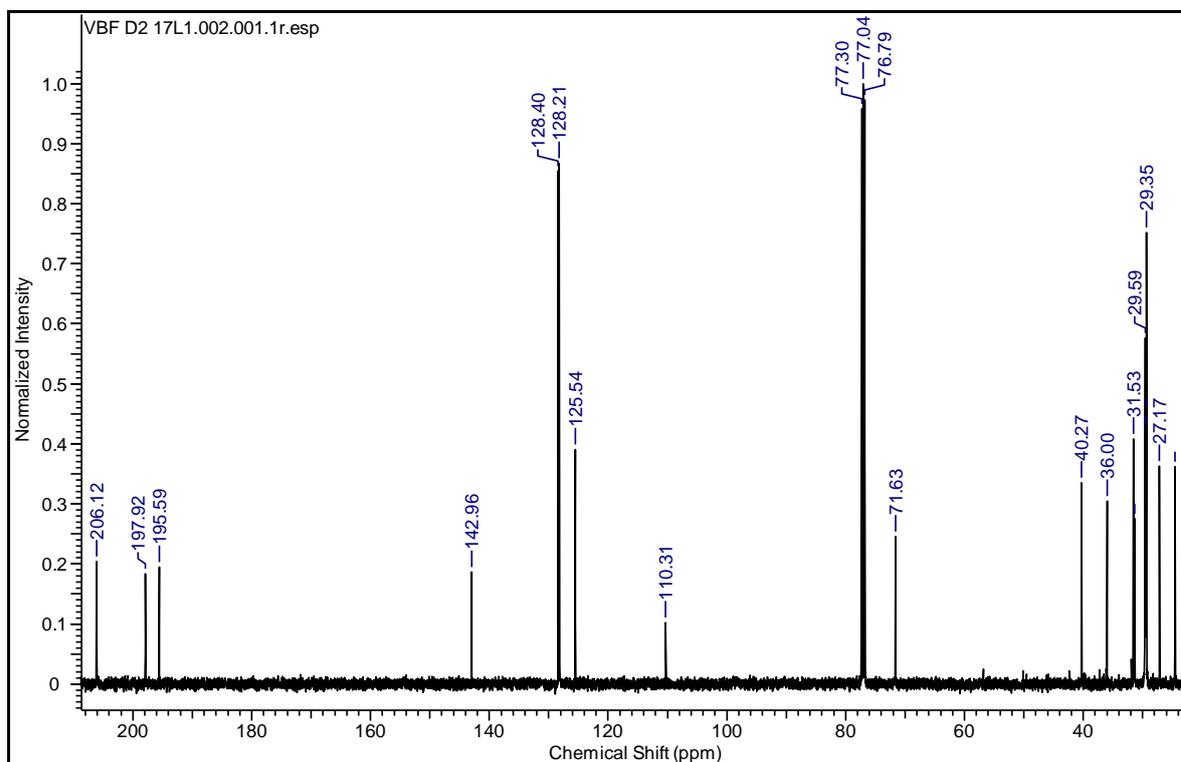


Figura 46. Espectro de correlação heteronuclear de HSQC em CDCl_3 de **V3**.

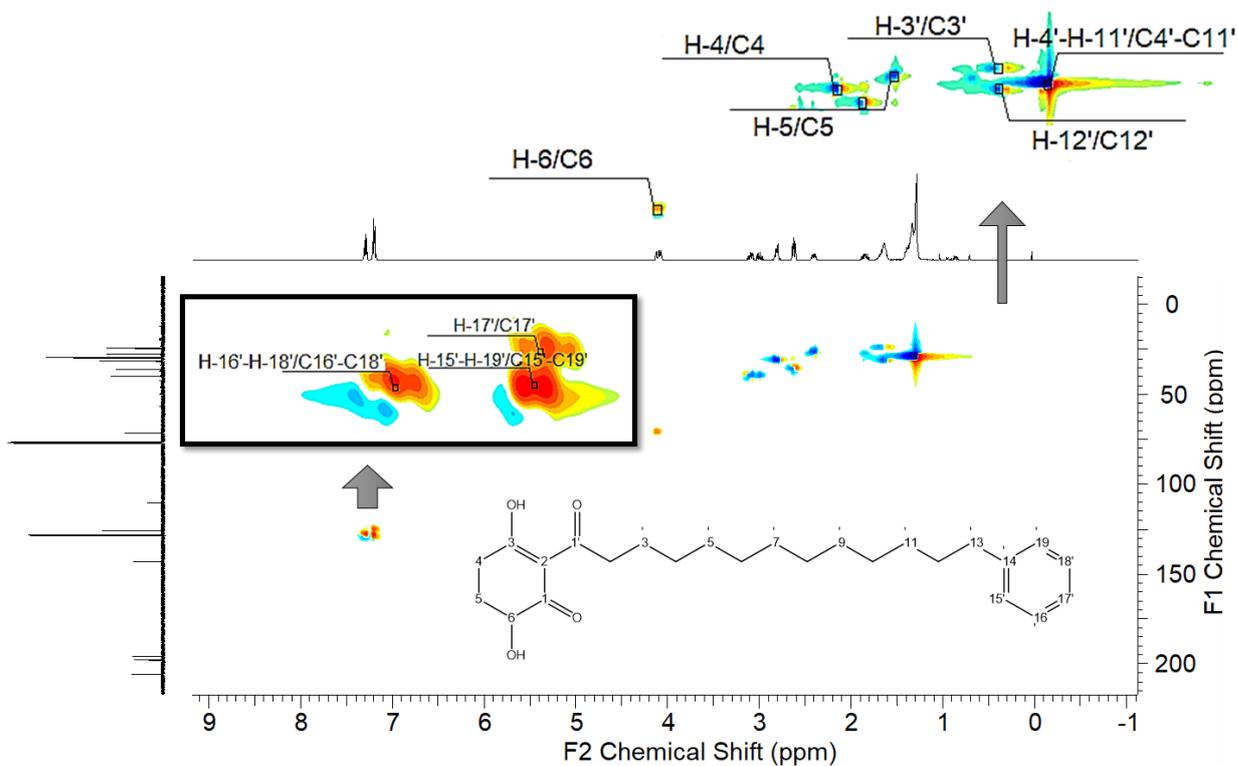


Figura 47. Espectro de correlação heteronuclear de HMBC em CDCl_3 de **V3**.

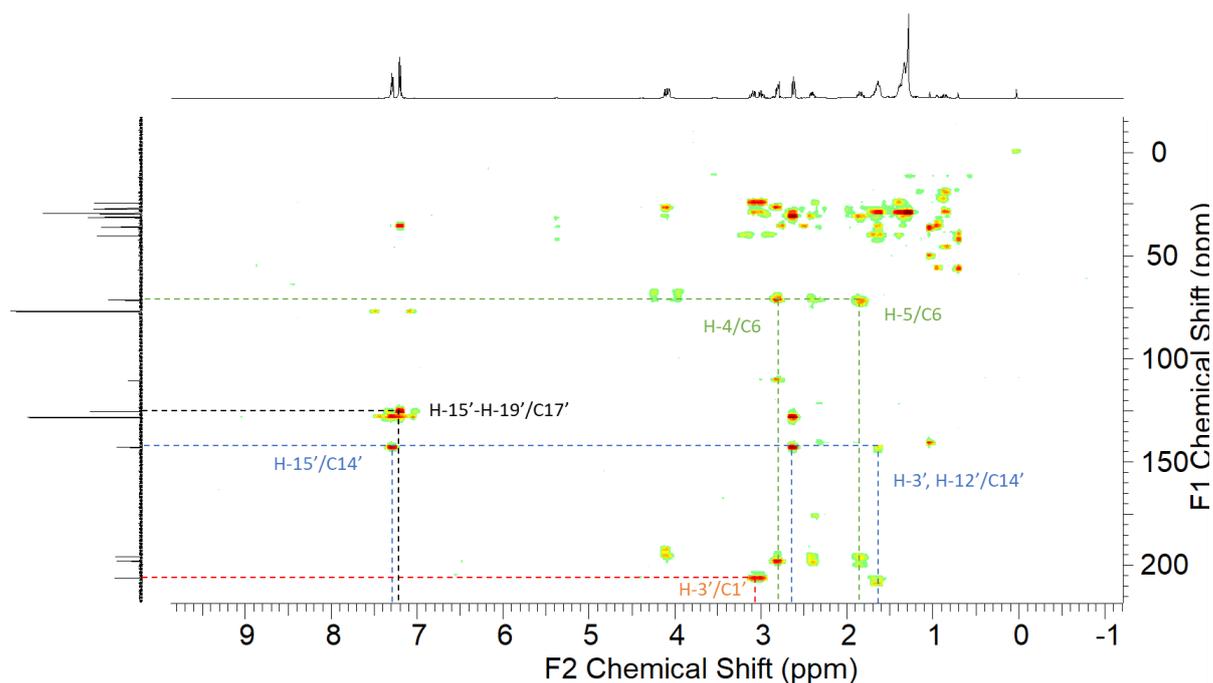
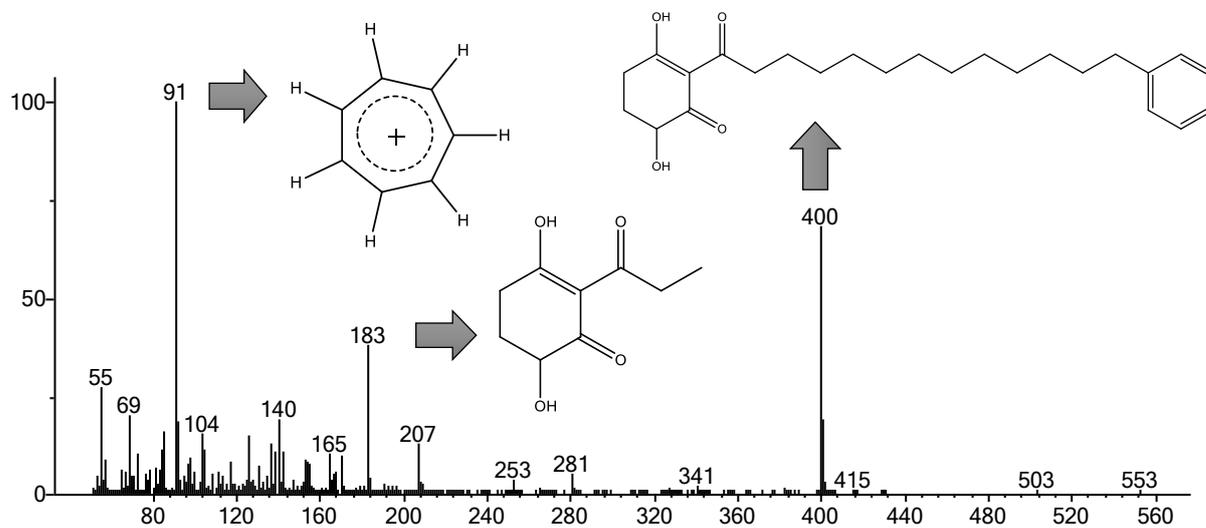


Figura 48. Espectro de massas no tempo de retenção 29,37 min da substância **V3**, com principais fragmentações do íon m/z 400 $[\text{M}-\text{H}]^-$.



5.4.4 Determinação Estrutural de V4

A amostra nomeada como **V4**, obtida da coluna à pressão normal com metanol apresentou-se com um sólido amorfo bege. As análises dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C permitiu a verificação de que essa amostra se apresenta semelhante a amostra **V2**, diferindo apenas pela presença de um grupo metoxila a mais.

Nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (**Figuras 49 e 52, p. 97 e 98**) pode-se observar uma riqueza de sinais entre δ_{H} 0,84-7,54 ppm e δ_{C} 14,23-203,01 ppm.

No espectro de RMN ^{13}C (**Figura 52, p. 98**) foram observados 20 sinais com deslocamentos químicos que permitiram a identificação dos átomos de carbono que compõem a substância **V4**. O espectro ^{13}C (**Figura 52, p. 98**) indicou dois sinais para grupos metílicos (CH_3) em δ_{C} 17,66 ($\text{CH}_3\text{-C9}$) e δ_{C} 14,23 ($\text{CH}_3\text{-C9}'$), dois sinais metilênicos (CH_2) em δ_{C} 39,00 ($\text{CH}_2\text{-C7}'$) e δ_{C} 100,72 (CH_2 do grupo OCH_2O), oito sinais metínicos (CH) em δ_{C} 110,20 (CH-C2), δ_{C} 150,30 (CH-C4), δ_{C} 113,78 (CH-C5), δ_{C} 123,34 (CH-C6), δ_{C} 44,95 (CH-C8), δ_{C} 38,29 ($\text{CH-C8}'$), δ_{C} 109,47 ($\text{CH-C2}'$), δ_{C} 107,96 ($\text{CH-C5}'$) e δ_{C} 121,99 ($\text{CH-C6}'$) e sete sinais para átomos de carbono desidrogenados (C) em δ_{C} 147,43 (C3), δ_{C} 150,30 (C4), δ_{C} 145,60 (C3'), δ_{C} 146,82 (C4'), δ_{C} 130,10 (C1), δ_{C} 134,64 (C1') e δ_{C} 203,01 (C7). O sinal duplo em δ_{C} 55,05 e 55,03 sugere a presença de dois grupos metoxilas (OCH_3), para estes últimos é observada no espectro HSQC correlação com o sinal em 3.95.

O deslocamento δ_{C} para as metoxilas e para os átomos de C-8 e C-8', diferem do relatado na literatura (MARTINEZ et al., 1985), o que pode indicar a existência de estereoisômeros diferentes para a molécula V4. A determinação da configuração absoluta para esta molécula só será possível com a obtenção de análises de Dicroísmo circular e α_{D} .

Os dados em conjunto da análise de RMN ^1H , ^{13}C e HSQC (**Figuras 49, 52, 54 e 55, p. 97, 98, 99 e 100**) confirmaram as atribuições dos átomos de hidrogênio e carbono da substância **V4**. Os dados foram comparados com os valores apresentados na literatura (MARTINEZ et al., 1985) e permitiram atribuir a essa substância a estrutura de diarilbutano da neolignana 1-(3,4-dimetoxifenil)-2,3-dimetil-4-piperonilbutan-1-ona descrito pela primeira vez em *Virola bicuhyba* e já identificado em *V. elongata* (**Tabela 19, p. 96**).

Tabela 19. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) de **V4** em CDCl_3 , correlações observadas no espectro de HSQC e comparação com os valores de referência da literatura em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J), em Hz.

Nº C	HSQC		HMBC			Literatura CDCl_3 (100 MHz)
	δ_{C}	δ_{H}	J^2	J^3	J^4	δ_{C}
C						
7	203,01		3,40	7,54; 7,50	1,23	202,4
1	130,10		7,54	6,94		129,7
3	147,43					148,9
4	150,30			7,54; 7,50		152,9
1'	134,64		2,14	2,81		134,5
3'	145,60					145,6
4'	146,82		6,69	6,57; 5,90		147,4
CH						
2	110,20	7,54 (d, $J=1,8$)				110,5
5	113,78	6,94 (d $J=8,2$)				113,3
6	123,34	7,50 (dd $J=8,4$)				122,4
8	44,95	3,40 (m)				42,8
2'	109,47	6,57 (s)		6,53		108,0
5'	107,96	6,69 (d $J=7,9$)				109,4
6'	121,99	6,53 (dd $J=7,9$)	6,69	2,14; 6,57	2,81	121,9
8'	38,29	2,81 (d, $J=9,8$)				41,2
CH₂						
7'	39,00	2,14 (m)				34,4
CH₃						
9	17,66	0,84 (d, $J=6,4$)				14,8
9'	14,23	1,23 (d, $J=6,9$)				11,2
OCH ₃	56,05 / 56,03	3,95 (s)				55,7/55,8
OCH ₂ O	100,72	5,90 s				100,5

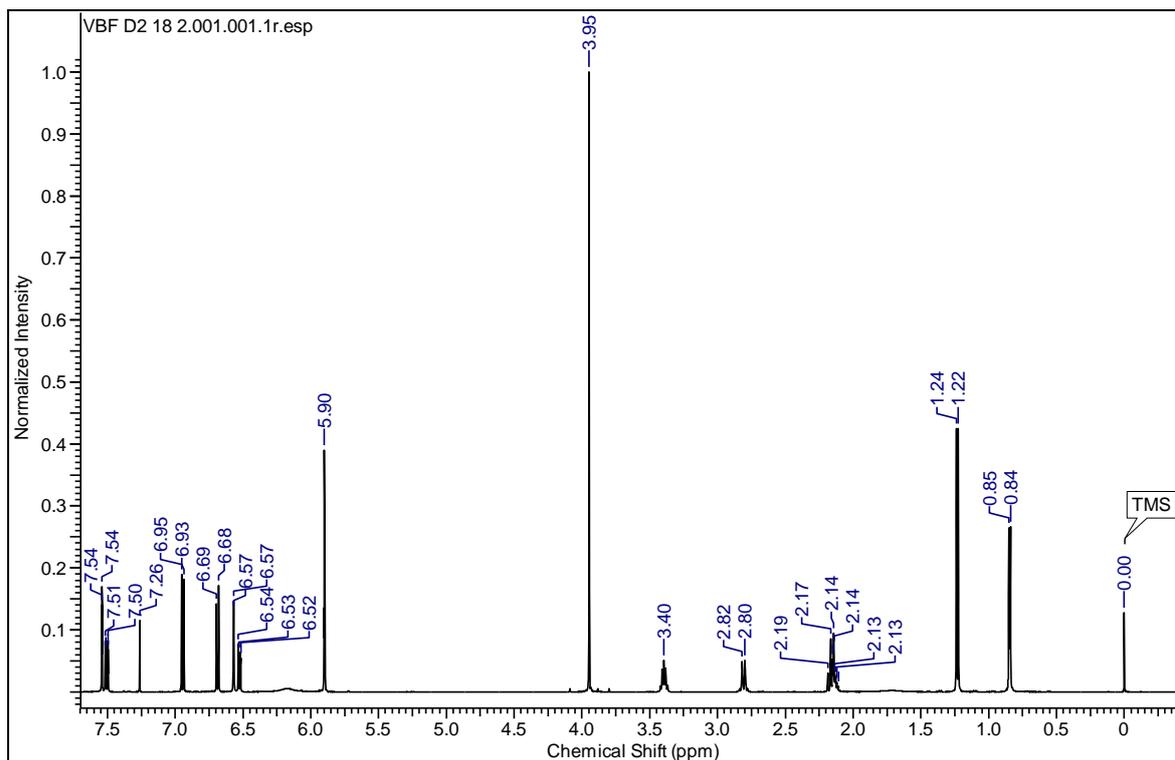
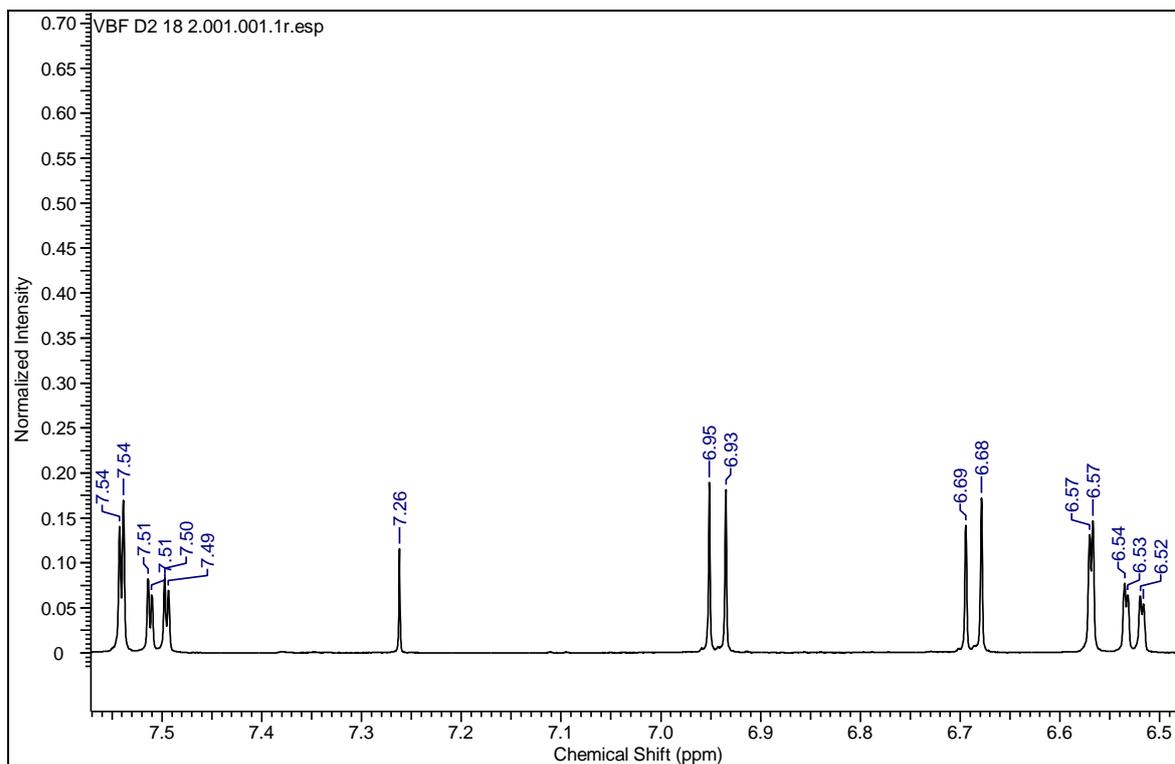
Figura 49. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 de **V4**.**Figura 50.** Ampliação da região de δ_{H} 6,50 - 7,50 do espectro de RMN ^1H (500 MHz) em CDCl_3 de **V4**.

Figura 51. Ampliação da região de δ_H 0,70 - 3,50 do espectro de RMN 1H (500 MHz) em $CDCl_3$ de **V4**

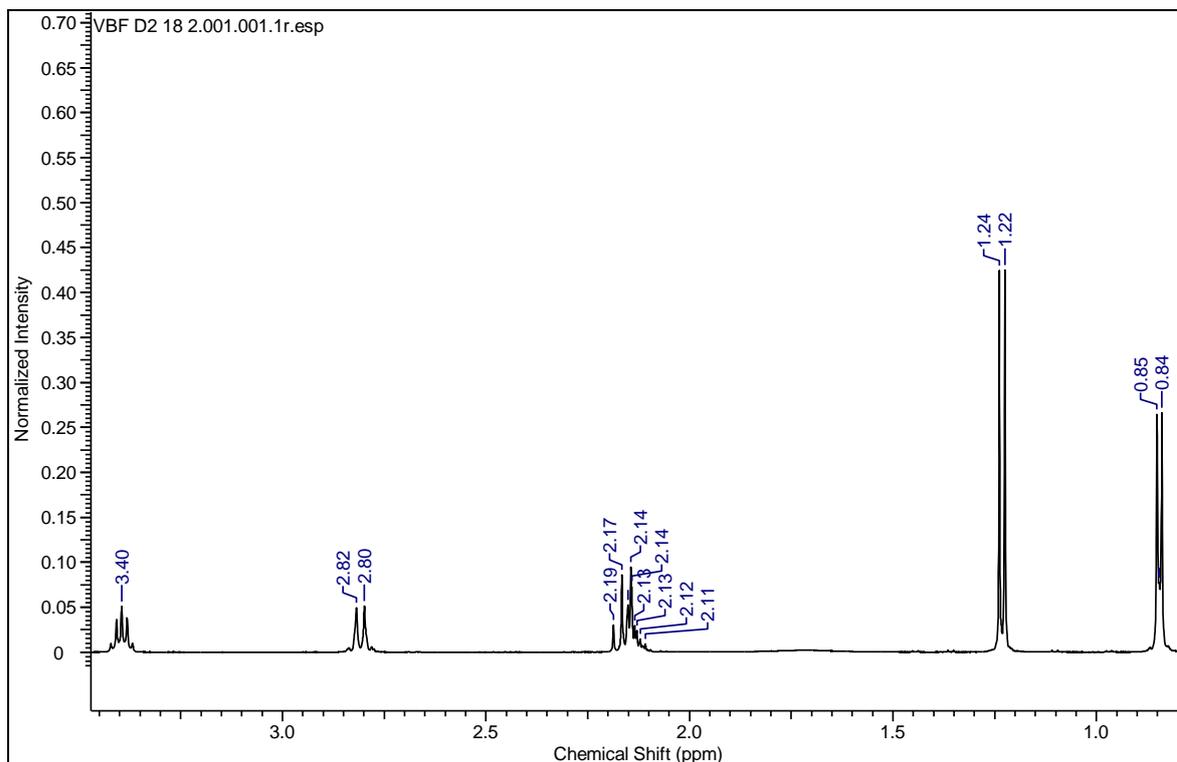


Figura 52. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em $CDCl_3$ de **V4**.

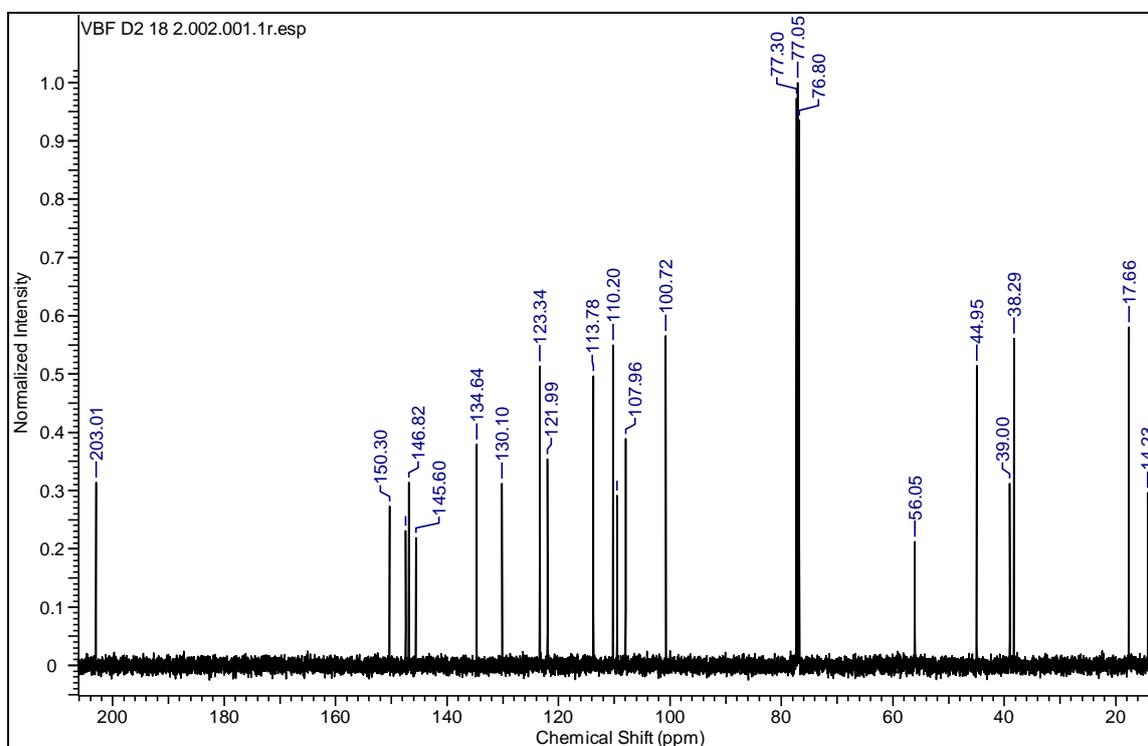


Figura 53. Ampliação na região de δ_H 38,29-56,05 do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) em $CDCl_3$ de **V4**.

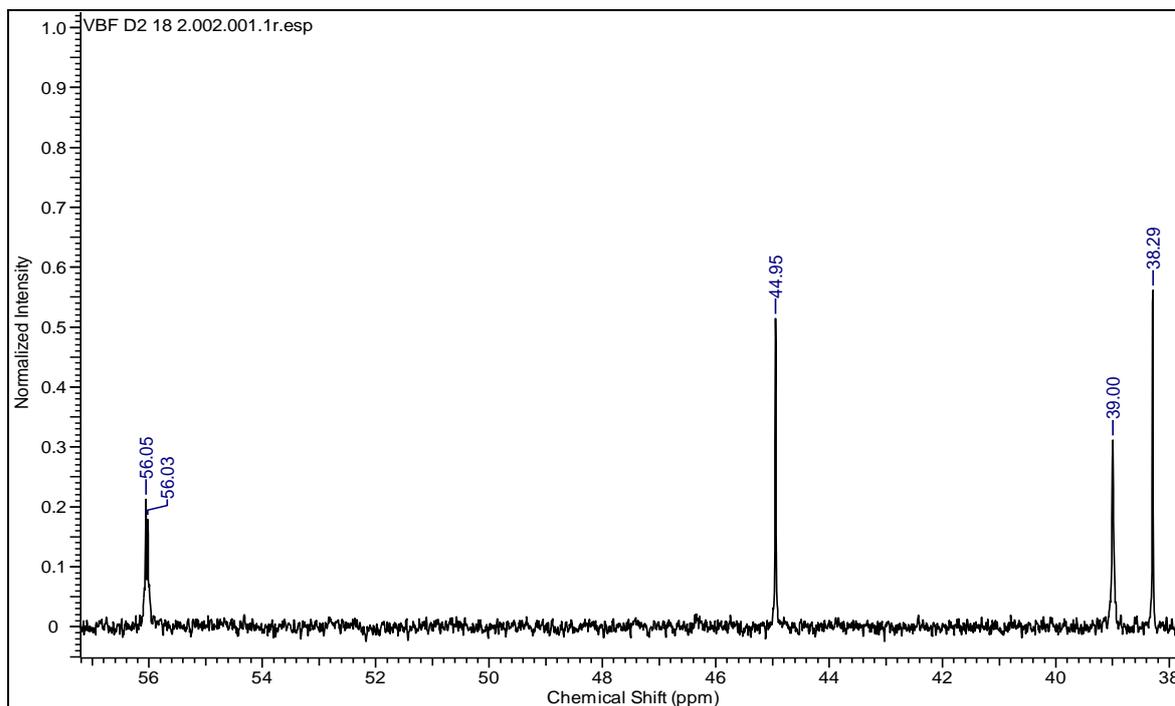


Figura 54. Espectro de correlação heteronuclear de HSQC em $CDCl_3$ de **V4**.

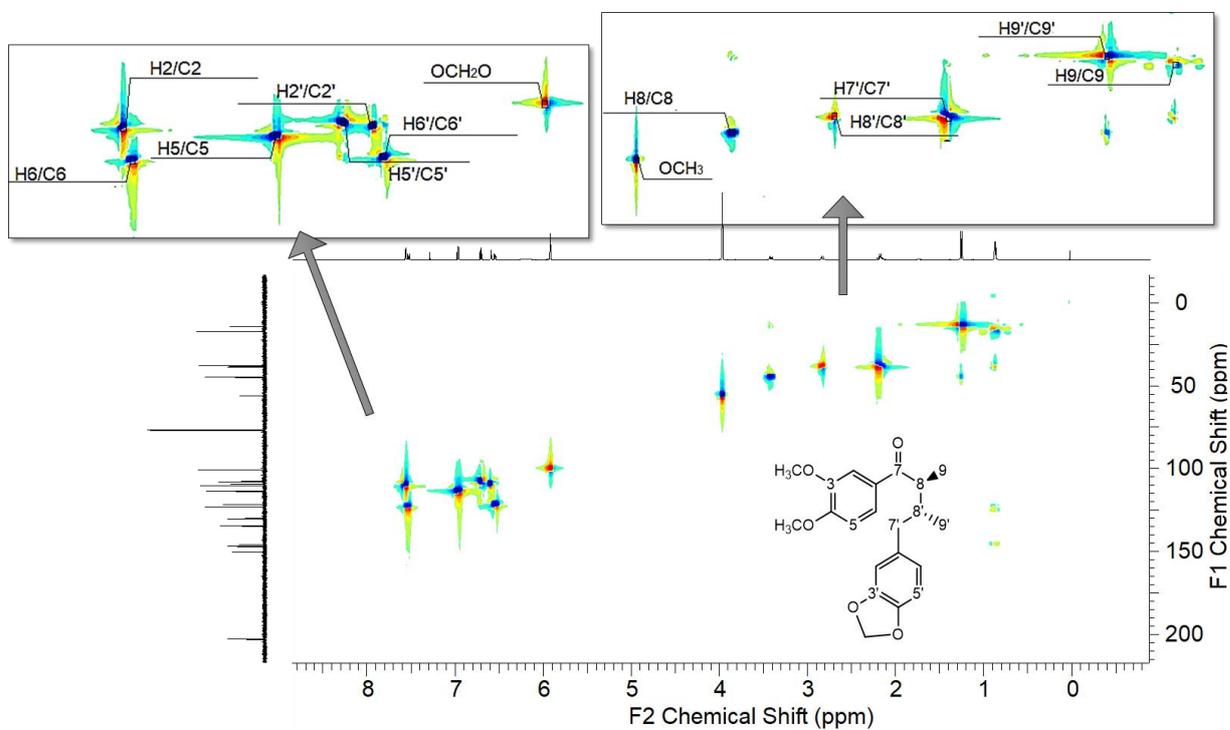
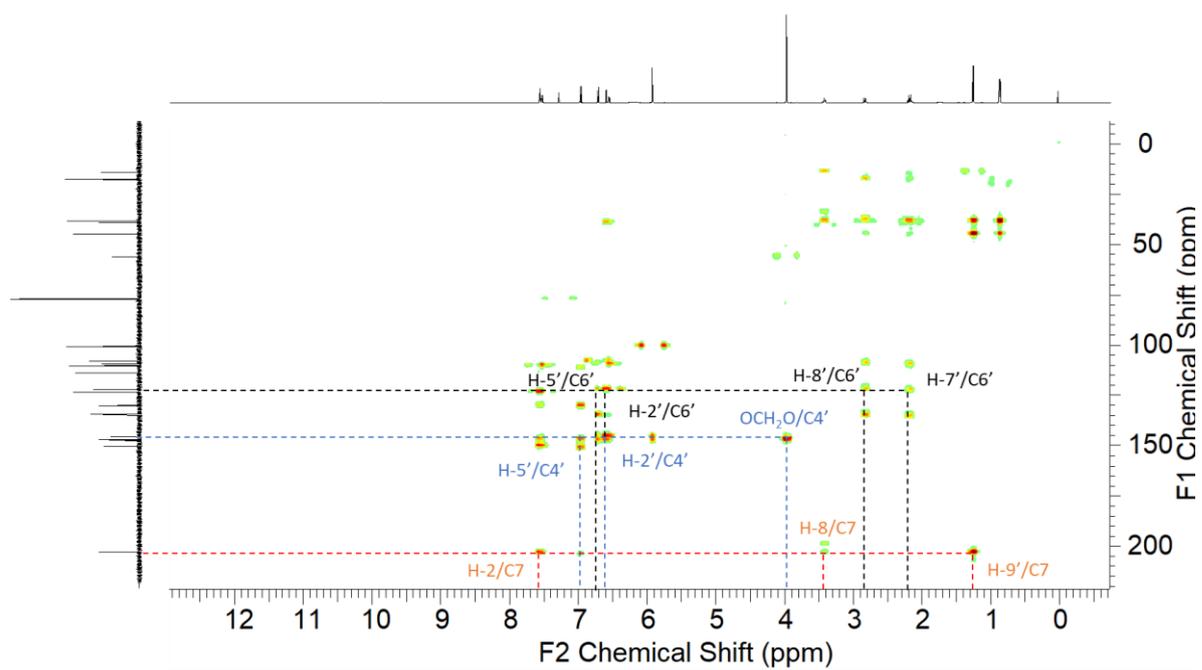


Figura 55. Espectro de correlação heteronuclear de HMBC em CDCl_3 de **V4**.

6 Considerações Finais

O levantamento dos dados químicos para a família Myristicaceae demonstram que a família possui 16 tipos de classes de metabólitos secundários. A presença em mais de 50% de metabólitos oriundos da via do chiquimato e destes, a pouca oxidação das moléculas observadas ratificam a atual classificação da família como representante antiga e basal dentro da classificação filogenética.

A análise quimiosistemática foi relevante para evidenciar as relações químicas entre os gêneros e dentro do gênero *Virola*, mediante as informações obtidas na literatura, mesmo que não tenham sido encontrados relatos para todos os gêneros e espécies da família.

Além disso, observou-se que a abordagem através do estudo biomonitorado dos extratos foi significativo para direcionar e facilitar a busca pelas substâncias potencialmente ativas. Destas, as substâncias **V1**(quercetina), **V2** (Oleiferin D), **V3** (3-hidroxi-1-(15-fenilpentadecanoil)-2,6-ciclohexadiona) e **V4** (1-(3,4-dimetoxifenil)-2,3-dimetil-4-piperonilbutan-1-ona) foram isoladas e identificadas, contribuindo para a fitoquímica da espécie, visto que a substância **V4** é inédita na espécie, não tendo sido isolada anteriormente de *Virola bicuhyba*.

Os ensaios biológicos avaliados, destacam-se particularmente, pelos valores baixos relatados para o EC₅₀ das atividades aqui descritas, que apontam o potencial biológico imbuído na espécie escolhida para este estudo. Reforçando, dessa forma, a relevância da pesquisa dos produtos naturais como um caminho promissor e eficaz para a descoberta de novas moléculas capazes de atuar em diferentes patologias.

Ademais, se faz importante denotar a necessidade de estudos químicos mais aprofundados da família Myristicaceae, tendo em vista que 14 gêneros apresentam ausência de estudos, como meio de conservação da biodiversidade e aprofundamento no conhecimento das moléculas bioproduzidas, a fim de ampliar a compreensão de sua história evolutiva. No caso da espécie em estudo ainda mais relevante considerando a que se encontra na lista de espécies em perigo (EN) de extinção.

Justifica-se que ensaios adicionais se fazem necessários para avaliar a eficiência das substâncias isoladas nas atividades larvicida, neoplásica e antimalárica, bem como os possíveis mecanismos de ação.

7 Referências Bibliográficas

ADU, F.; SAM, G. H.; AGYARE, C.; APENTENG, J. A.; BOAMAH, V. E.; NTINAGYEIMINTAH, D. Influence of methanol fruit and leaf extracts of *Myristica fragrans* (Myristicaceae) on the activity of some antibiotics. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 19, p. 1982-1986, 2014.

ALMEIDA, G. V. B.; ARUNACHALAM, K.; BALOGUN, S. O.; PAVAN, E.; ASCÊNCIO, S. D.; SOARES, I. M.; ZANATTA, A. C.; VILEGAS, W.; MACHO, A.; MARTINS, D. T. O. Chemical characterization and evaluation of gastric antiulcer properties of the hydroethanolic extract of the stem bark of *Virola elongata* (Benth.) Warb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, p. 113-124, 2019.

ALMEIDA, M. E. L.; BRAZ FILHO, R.; BÜLOW, M. V. V.; CORRÊA, J. J. L.; GOTTLIEB, O. R.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. S. Diarylpropanoids from *Iryanthera polyneura*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 1015-1016, 1979.

AZEVEDO, N. R.; SANTOS, S. C.; MIRANDA, E. G.; FERRI, P. H. A 2-acylcyclohexane-1,3-dione from *Virola oleífera*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1375-1377, 1997.

BAQUERO, E.; QUIÑONES, W.; FRANZBLAU, S.; TORRES, F.; ARCHBOLD, R.; ECHEVERRI, F. Furan type lignans with antimycobacterial activity. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14, n. 3, p. 171-178, 2015.

BARATA, L. E. S.; BAKER, P. M.; GOTTLIEB, O. R.; RÙVEDA, E. A. Neolignans of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 783-786, 1978.

BARATA, L. E. S.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H.; PHILLIPSON, J. D.; PAINE, A.; CROFT, S. L. Anti-leishmanial activity of neolignanas from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 55, p. 589-595, 2000.

BARBOSA FILHO, J. M. Linanas, neo-lignanas e seus análogos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1999. p. 471-488.

BELOZ, A. Brine shrimp bioassay screening of two medicinal plants used by the Warao: *Solanum straminifolium* and *Virola surinamensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, p. 225-227, 1992.

BENE, K.; SINAN, K. I.; ZENGIN, G.; DIUZHEVA, A.; JEKÖ, J.; CZIÁKY, Z.; AUMEERUDDY, M. Z.; XIAO, J.; MAHOMOODALLY, M. F.; A multidirectional investigation of stem bark extract of four African plants: HPLC-MS/MS profiling and biological potentials. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 168, p. 217-224, 2019.

BLUMENTHAL, E. E. A.; SILVA, M. S.; YOSHIDA, M. Lignoids, flavonoids and polyketides of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 745-749, 1997.

BÔA, I. S. F.; PORTO, M. L.; PEREIRA, A. C. H.; RAMOS, J. P. L.; SCHERER, R.; OLIVEIRA, J. P.; NOGUEIRA, B. V.; MEYRELLES, S. S.; VASQUEZ, E. C.; ENDRINGER, D. C.; PEREIRA, T. M. C. Resin from *Virola oleífera* protects against radiocontrast-induced nephropathy in mice. **PloS ONE**, v. 10, n. 12, p. 0-15, 2015.

BORGES, F. C.; SANTOS, L. S.; CORRÊA, M. J. C.; OLIVEIRA, M. N.; SOUZA FILHO, A. P. S. Potencial alelopático de duas neolignanas isoladas de folhas de *Virola surinamensis* (Myristicaceae). **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 51-59, 2007.

CARVALHO, A. A. V.; GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; KATO, M. J.; VALADARES, M. C.; CUNHA, L. C.; COSTA, E. A. Antinociceptive and antiinflammatory activities of grandisin extracted from *Virola surinamensis*. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 1, p. 113-118, 2010.

CAVALCANTE, S. H.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Neolignans from *Virola carinata* fruit. **Phytochemistry**, v. 24, n. 5, p. 1051-1055, 1985.

CHABERT, P.; FOUGEROUSSE, A.; BROUILARD, R. Anti-mitotic properties of resveratrol analog (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene. **BioFactors**, v. 27, p. 37-46, 2006.

CORDEIRO, R. M.; SILVA, A. P. S.; PINTO, R. H. H.; COSTA, W. A.; SILVA, S. H. M.; PINHEIRO, W. B. S.; ARRUDA, M. S. P.; CARVALHO JUNIOR, R. N. Supercritical CO₂ extraction of ucuúba (*Virola surinamensis*) seed oil: global yield, kinetic data, fatty acid profile, and antimicrobial activities. **Chemical Engineering Communications**, p. 0-13, 2018. DOI: 10.1080/00986445.2018.1474741.

CORRÊA, A. S.; CONTRERAS, L. A.; KEIJOK, W. J.; BARCELOS, D. H. F.; PEREIRA, A. C. H.; KITAGAWA, R. R.; SCHERER, R.; GOMES, D. C. O.; SILVA, A. R.; ENDRINGER, D. C.; OLIVEIRA, J. P.; GUIMARÃES, M. C. C. *Virola oleífera*-capped gold nanoparticles showing radical-scavenging activity and low cytotoxicity. **Materials Science & Engineering C**, v. 91, p. 853-858, 2018.

COSTA, E. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LIMA, E. O.; SUCUPIRA, G. C.; BERTOLIN, A. O.; LOLIS, S. F.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Antimicrobial activity of some medicinal plants of Cerrado, Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 5, p. 705-707, 2008.

COUTINHO, P. N.; PEREIRA, B. P.; PEREIRA, A. C. H.; PORTO, M. L.; ASSIS, A. L. E. M.; DESTEFANI, A. C.; MEYRELLES, S. S.; VASQUEZ, E. C.; NOGUEIRA, B. V.; ANDRADE, T. U.; ENDRINGER, D. C.; FRONZA, M.; PEREIRA, T. M. C. Chronic administration of antioxidant resin from *Virola oleífera* attenuates atherogenesis in LDLR^{-/-} mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 206, p. 65-72, 2017.

CUONG, T. D.; HUNG, T. M.; NA, M.; HA, D. T.; KIM, J. C.; LEE, D.; RYOO, S.; LEE, J. H.; CHOI, J. S.; MIN, B. S. Inhibitory effect on NO production of phenolic compounds from *Myristica fragrans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 6884-6887, 2011.

DANELUTTE, A. P.; CAVALHEIRO, A. J.; KATO, M. J. Lignoids in seedling of *Virola sebifera*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 382-386, 2000.

DENNY, C.; ZACHARIAS, M. E.; KOHN, L. K.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 598-603, 2007.

DENNY, C.; ZACHARIAS, M. E.; RUIZ, A. L. T. G.; AMARAL, M. C. E.; BITTRICH, V.; KOHN, L. K.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Antiproliferative properties of polyketides isolated from *Virola sebifera* leaves. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 127-130, 2008.

DEWICK, P. M. **Meddicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2ª Edição. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd. 2002. 507 p.

DULLOO, M. E.; HUNTER, D.; LEAMAN, D. Plant diversity in addressing food, nutrition and medicinal needs. In: GURIB-FAKIM, A. (Ed.). *Novel Plant Bioresources: applications in food, medicine and cosmetics*. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 2014. p. 3-21.

FERNANDES, A. M. A. P.; BARATA, L. E. S.; FERRI, P. H. Absolute configuration of the lignan oleiferins from *Virola oleífera*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 2, p. 533-534, 1994.

FERNANDES, A. M. A. P.; BARATA, L. E. S.; FERRI, P. H. Lignans and a neolignan from *Virola oleífera* leaves. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1567-1572, 1993.

FERNANDES, A. M. A. P.; PRADO, A. L.; BARATA, L. E. S.; PAULO, M. Q.; AZEVEDO, N. R.; FERRI, P. H. A method to separate lignoids from *Virola* leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 18-21, 1997.

FERNANDES, J. B.; RIBEIRO, M. N. S.; GOTTLIEB, O. R.; GOTTLIEB, H. E. Eusiderins and 1,3-diarylpropanes from *Virola* species. **Phytochemistry**, v. 19, p. 1523-1525, 1980.

FERNANDES, K. R. P.; BITTERCOURT, P. S.; SOUZA, A. D. L.; SOUZA, A. Q. L.; SILVA, F. M. A.; LIMA, E. S.; ACHO, L. D. R.; NUNOMURA, R. C. S.; TEIXEIRA, A. F.; KOOLEN, H. H. F. Phenolic compounds from *Virola venosa* (Myristicaceae) and evaluation of their antioxidante and enzyme inhibition potential. **Acta Amazonica**, v. 49, n. 1, p. 48-53, 2019.

FERRI, P. H.; BARATA, L. E. S. Neolignans and a phenylpropanoid from *Virola pavonis* leaves. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1375-1377, 1992.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUZA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinário. **MultiCiência: revista interdisciplinária dos centros e núcleos da Unicamp**, v. 7, 8 p. 2006.

FOUNDIKOU, H.; MBIANTCHA, M. KEZETAS, J. B.; TCHOUANKEU, J. C.; SHAHEEN, F.; CHOUDHARY, M. I.; LEBIBI, J.; TCHOUYA, G. R. F. Two new alkylresorcinol derivatives from the leaves of *Scyphocephalum ochocoa*. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 73, n. 6, p. 0-8, 2018.

FUNARI, C. S. e FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P. de; WANDERLEY, M. G. L.; BERG, C. V. D.; Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-61, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Revista Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONZALEZ, M. J.; PINTO, M. M. M.; KIJJOA, A.; KENGTHONG, S.; MONDANONDRA, I.; SILVA, A. M. S.; EATON, G.; HERZ, W. 5,7-Dihydroxychromones and 8-hydroxytetrahydrochromones from *Horsfieldia irya*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 995-998, 2002.

GOTTLIEB, O. R. Chemical studies on medicinal Myristicaceae from Amazonia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 1, p. 309-323, 1979.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Químico-biologia quantitativa: um novo paradigma. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2105-2114, 2012.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. Biodiversidade: um enfoque químico-biológico. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 1996. 268 p.

GOTTLIEB, O. R.; LOUREIRO, A. A.; CARNEIRO, M. S.; ROCHA, A. I. Distribution of diarylpropanoids in amazonian *Virola* species. **Phytochemistry**, v. 12, p. 1830, 1973.

GOTTLIEB, O. R.; MAIA, J. G. S.; RIBEIRO, M. N. S. Neolignans from *Virola carinata*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 773-774, 1976.

HIRUMA-LIMA, C. A.; BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; MAGRI, L. P.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 406-409, 2009.

KATO, M. J.; PAULINO Fo, H. F.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Neolignans from fruits of *Virola elongata*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 1, p. 279-280, 1986.

KATO, M. J.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Flavones and lignans in flowers, fruits and seedlings of *Virola venosa*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 1, p. 283-287, 1992.

KATO, M. J.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Lignoids and arylalkanones from fruits of *Virola elongata*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1799-1810, 1990.

KAWANISHI, K.; UHARA, Y.; HASHIMOTO, Y. Neolignans of *Virola carinata* bark. **Phytochemistry**, v. 21, n. 11, p. 2725-2728, 1982.

KAWANISHI, K.; UHARA, Y.; HASHIMOTO, Y. The neolignans (-)-carinatone and carinatin from *Viola carinata*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 4, p. 929-931, 1982.

KAWANISHI, K.; UHARA, Y.; HASHIMOTO, Y. The neolignans, carinatidin, dihydrocarinatidin, carinatidiol and dehydrodieugenol B from *Viola carinata*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 10, p. 2277-2280, 1983.

KUROSHIMA, K. N.; CAMPOS, F.; SOUZA, M. M.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. D.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacological investigations of *Viola oleifera* leaves. **Journal of Biosciences**, v. 56, n. 9-10, p. 703-706, 2001.

LIU, B.; DU, S.; KUANG, F.; LIU, Y.; TIAN, X.; CHEN, Y.; ZHAN, R. Two new lignans from *Horsfieldia kingii*. **Natural Product Research**, p. 7, 2018.

LOK, C. M.; GROENEWEGEN, A.; STROINK, J. B. A.; WARD, J. P. Kombic acid, a hydroquinone polyisoprenoic carboxylic acid from *Pycnanthus kombo* seed fat. **Phytochemistry**, v. 22, n. 9, p. 1973-1976, 1983.

LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. 1,11-Diarylundecan-1-one and 4-aryltetralone neolignans from *Viola sebifera*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 751-755, 1982.

LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Aryltetralone and arylindanone neolignans from *Viola sebifera*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 9, p. 2021-2024, 1984.

LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Dibenzylbutyrolactone lignans from *Viola sebifera*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 6, p. 1516-1518, 1983.

LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Further lignoids from *Viola sebifera*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2647-2652, 1984.

LOPES, N. P.; BLUMENTHAL, E. E. A.; CAVALHEIRO, A. J.; KATO, M. J.; YOSHIDA, M. Lignans, γ -lactones and propiophenones of *Viola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1089-1092, 1996.

LOPES, N. P.; CHICARO, P.; KATO, M. J.; ALBURQUEQUE, S.; YOSHIDA, M. Flavonoids and lignans from *Viola surinamensis* twigs and their *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Medica**, v. 64, n. 7, p. 667-668, 1998.

LOPES, N. P.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; MAIA, J. G. S.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. A butanolide from seedling and micropropagated leaves of *Viola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 6, p. 1469-1470, 1994.

LOPES, N. P.; KATO, M. J.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; YOSHIDA, M.; PLANCHART, A. R.; KATZIN, A. M. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Viola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiãpi Amazon indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 313-319, 1999.

LOPES, N. P.; KATO, M. J.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; YOSHIDA, M. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Viola surinamensis* leaves. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 689-693, 1997.

LOPES, N. P.; KATO, M. J.; YOSHIDA, M. Antifungal constituents from roots of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 29-33, 1999.

LOPES, N. P.; SANTOS, P. A.; KATO, M. J.; YOSHIDA, M. New butenolides in plantlets of *Virola surinamensis* (Myristicaceae). **Chemical Pharmacology Bulletin**, v. 52, n. 10, p. 1255-1257, 2004.

LOPES, N. P.; SIQUEIRA, D. H.; KATO, M. J.; YOSHIDA, M. Butanolides as a common feature of *Iryanthera lancifolia* and *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1405-1410, 1998.

LOPES, N. P.; YOSHIDA, M.; KATO, M. J. Biosynthesis of tetrahydrofuran lignans in *Virola surinamensis*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 1, p. 53-57, 2004.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Revista Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. Non-alkaloidal constituents of *Virola elongata* bark. **Phytochemistry**, v. 24, n. 3, p. 561-566, 1985.

MARQUES, M. O. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Neolignans from fruits of *Virola pavonis*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4380-4381, 1992.

MARTINEZ V., J. C.; CUCA S., L. E. Chemical studies of Myristicaceae species of the Colombian Amazon. **American Chemistry Society**, p. 116-123, 1995.

MARTINEZ V., J. C.; ALDANA J., M. I.; CUCA S., L. E. Dibenzylbutane lignans from *Virola sebifera* leaves. **Phytochemistry**, v. 50, p. 883-886, 1999.

MARTÍNEZ V., J. C.; CUCA S., L. E. Dihidrochalconas em corteza de *Iryanthera laevis*. **Revista Colombiana de Química**, v. 18, n. 1-2, p. 37-46, 1989.

MARTINEZ V., J. C.; CUCA S., L. E.; SANTANA M., A. J.; POMBO-VILLAR, E.; GOLDING, B. T. Neolignans from *Virola elongata*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1612-1614, 1985.

MARTINEZ V., J. C.; CUCA S., L. E.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Neolignans from *Virola calophylloidea*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1867-1868, 1985.

MARTINEZ V., J. C.; TORRES CH., R. Lignans from *Virola aff. Pavonis* leaves. **Phytochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1179-1182, 1997.

MARTINEZ V., J. C.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Arylnaphthalene neolignans from *Virola calophylla*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 9, p. 2655-2657, 1990.

MILES, D. H.; LY, A. M.; RANDLE, S. A.; HEDIN, P. A.; BURKS, M. L. Alkaloidal insect antifeedants from *Virola calophylla* Ward. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 794-797, 1987.

MING, D. S.; LÓPEZ, A.; HILLHOUSE, B. J.; FRENCH, C. J.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Bioactive constituents from *Iryanthera megistophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1412-1416, 2002.

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Quarto relatório nacional para a convenção sobre biodiversidade biológica**. Brasília, 2011.

MORAIS, A. A.; FO, R. B.; GOTTLIEB, O. R. Structural confirmation of spiroelliptin from *Iryanthera elliptica* by synthesis. **Phytochemistry**, v. 24, n. 12, p. 3023-3028, 1985.

MORAIS, S. K. R.; TEIXEIRA, A. F.; TORRES, Z. E. DOS S.; NUNOMURA, S. M.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H.; LINDOSO, J. A. L.; YOSHIDA, M. Biological activities of lignoids from amazon Myristicaceae species: *Virola michelii*, *V. mollissima*, *V. pavonis* and *Iryanthera juruensis*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 6, p. 1110-1118, 2009.

Myristicaceae in Flora do Brasil 2020 em Construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB169>. Acesso em: 02 Jun. 2019.

Myristicaceae in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB169>>. Acesso em: 06 Mar. 2019.

ONOCHA, P. A.; ALI, M. S. Pycnanolide A and B: new lignan lactones from the leaves of *Pycnanthus angolensis* (Myristicaceae). **Research Journal of Phytochemistry**, v. 5, n. 3, p. 136-145, 2011.

PAGNOCCA, F. C.; RIBEIRO, S. B.; TORKOMIAN, V. L. V.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, A. G. Toxicity of lignans to symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 22, n. 7, p. 1325-1330, 1996.

PATRO, B. S.; BAURI, A. K.; MISHRA, S.; CHATTOPADHYAY, S. Antioxidant activity of *Myristica malabarica* extracts and their constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6912-6918, 2005.

PEREIRA, A. C. H.; LENZ, D.; NOGUEIRA, B. V.; SCHERER, R.; ANDRADE, T. U.; COSTA, H. B.; ROMÃO, W.; PEREIRA, T. M. C.; ENDRINGER, D. C. Gastroprotective activity of the resin from *Virola oleífera*. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 472-480, 2017.

QUINTANILHA, L. G.; LOBÃO, A. Q. Flora do Rio de Janeiro: Myristicaceae. **Rodriguésia**, v. 68, n. 1, p. 85-89, 2017.

RANGEL, L. P.; ABREU, L. F.; ANDRADE, A. R.; LEITÃO, S. G.; LEITÃO, G. G.; FERREIRA-PEREIRA, A. Effect of diferente extracts from the Brazilian Atlantic Forest on the Pdr5p ATPase activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 30-36, 2008.

RANGKAEW, N.; SUTTISRI, R.; MORIYASU, M.; KAWANISHI, K. A new acyclic diterpene acid and bioactive compounds from *Knema glauca*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 5, p. 685-692, 2009.

RANGKAEW, N.; SUTTISRI, R.; MORIYASU, M.; KAWANISHI, K. A new aryl-naphthalene lignan from *Knema furfuracea*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 377-379, 2009.

REZENDE, K. R.; DAVINO, S. C.; BARROS, S. B. M.; KATO, M. J. Antioxidant activity of aryltetralone lignans and derivatives from *Viola sebifera* (Aubl.). **Natural Product Research**, v. 19, n. 7, p. 661-666, 2005.

REZENDE, K. R.; KATO, M. J. Dibenzylbutane and aryltetralone lignans from seeds of *Viola sebifera*. **Phytochemistry**, v. 61, n. , p. 427-432, 2002.

RODIANAWATI, I.; HASTUTI, P.; CAHYANTO, M. N. Nutmeg's (*Myristica fragrans* Houtt) oleoresin: effect of heating to chemical compositions and antifungal properties. **Procedia Food Science**, v. 3, p. 244-254, 2015.

RODRIGUES, W. A. Two new neotropical species of *Compsonura* (Myristicaceae). **Brittonia**, v. 41, n. 2, p. 160-163, 1989.

RODRIGUES, W. Myristicaceae *In*: Stehmann, J. R. et al. Plantas da Floresta Atlântica, 2009.

ROOSMALEN, M. G. M. V.; BARDALES, M. P. D.; GARCIA, O. M. C. G. Frutos da floresta Amazônica. Parte I: Myristicaceae. **Acta Amazonica**, v. 26, n. 4, p. 209-264, 1996.

SANTOS, M. R. A. e LIMA, M. R. **Levantamento dos recursos vegetais utilizados como fitoterápicos no município de Cujubim, Rondônia, Brasil**. Porto Velho, RO: Embrapa, 2009, 17p.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Org(s). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed. Universidades, 1999. P. 323-354.

SARTORELLI, P.; YOUNG, C. M.; KATO, M. J. Antifungal lignans from the arils of *Viola oleifera*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 6, p. 1003-1006, 1998.

SILVA, D. H. S.; PEREIRA, F. C.; ZANONI, M. V. B.; YOSHIDA, M. Lipophilic antioxidants from *Iryanthera juruensis* fruits. **Phytochemistry**, v. 57, p. 437-442, 2001.

SRIPHANA, U.; YENJAI, C.; KOATTHADA, M. Cytotoxicity of chemical constituents from the roots of *Knema globularia*. **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 129-133, 2016.

THE PLANT LIST (2013). Version 1.1. Publicado na internet: <http://www.theplantlist.org/> (Acessado: 19/06/2018).

VALDERRAMA, J. C. M. Distribution of flavonoids in the Myristicaceae. **Phytochemistry**, v. 55, p. 505-511, 2000.

VEIGA, A.; ALBUQUERQUE, K.; CORRÊA, M. E.; BRIGIDO, H.; SILVA, J. S.; CAMPOS, M.; SILVEIRA, F.; SANTOS, L.; DOLABELA, M. *Leishmania amazonenses* and *Leishmania chagasi*: in vitro leishmanicide activity of *Virola surinamensis* (rol.) Warb. **Experimental Parasitology**, v. 175, p. 68-73, 2017.

WANG, X. W.; MAO, Y.; WANG, N.; YAO, X. S. A new phloroglucinol diglycoside derivative from *Hypericum japonicum* Thunb. **Molecules**, v. 13, p. 2796-2803, 2008.

WHO (2003). WHO Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants, World Health Organization, Geneva, www.who.int/medicines/publications/traditional/gacp2004/en/. Acesso em 17 Março de 2016.

ZACCHINO, S.; RODRÍGUEZ, G.; SANTECCHIA, C.; PEZZENATI, G.; GIANNINI, F.; ENRIZ, R. In vitro studies on mode of action of antifungal 8.O.4'-neolignans occurring in certain species of *Virola* and related genera of Myristicaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 35-41, 1998.