

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS**

**KÍSSILA GOMES BARRETO**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DE UM ESPÉCIME DE *Lecythis*  
*pisonis* CAMBESS. (LECYTHIDACEAE)**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ, 2021**

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	03
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
2.1. Considerações sobre a família Lecythydaceae.....	05
2.2. Considerações sobre o gênero <i>Lecythis</i> .....	09
2.3. Considerações sobre a espécie <i>Lecythis pisonis</i> .....	13
2.3.1. Descrição botânica da espécie <i>L. pisonis</i> .....	14
2.3.2. Usos populares da espécie <i>L. pisonis</i> .....	15
2.3.3. Aspectos fitoquímicos da espécie <i>L. pisonis</i> .....	15
2.3.4. Atividades biológicas da espécie <i>L. pisonis</i> .....	21
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos Específicos.....	24
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	25
4.1. Equipamentos.....	25
4.2. Reagentes.....	26
4.3. Material de consumo.....	26
4.4. Soluções reveladoras empregadas nos processos cromatográficos em camada delgada.....	27
4.4.1. Soluções de vanilina.....	27
4.4.2. Soluções de cloreto férrico.....	27
4.5. Material vegetal.....	27
4.6. Preparação dos extratos brutos.....	28
4.7. Fracionamento dos extratos brutos das folhas de <i>Lecythispisonis</i> ....	28
4.7.1. Fracionamento do extrato em MeOH das folhas.....	28
4.7.2. Fracionamento do extrato em MeOH:H <sub>2</sub> O das folhas.....	32
4.8. Fracionamento dos extratos brutos da madeira de <i>Lecythispisonis</i> ..	35
4.8.1. Fracionamento do extrato em MeOH damadeira.....	35
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1. Determinação dos constituintes químicos isolados e/ou identificados em <i>L. pisonis</i> .....	38
5.1.1. Substâncias identificadas no extrato em metanol das folhas de <i>L. pisonis</i> .....	38
5.1.2. Substâncias identificadas no extrato em MeOH:H <sub>2</sub> O das folhas de <i>L. pisonis</i> .....	43
5.1.3. Substâncias identificadas no extrato em MeOH da madeira de <i>L. pisonis</i> .....	43
5.1.3. Substâncias identificadas no extrato em MeOH:H <sub>2</sub> O da madeira de <i>L. pisonis</i> .....	101
6. ATIVIDADES BIOLÓGICAS E TESTES QUANTITATIVOS DOS EXTRATOS MEOH E MEOH:H <sub>2</sub> O DA MADEIRA DE <i>L. pisonis</i> .....	110
6.1. Atividade antioxidante.....	110
6.1.1. Avaliação da atividade antioxidante.....	112
6.1.1.1. Método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH).....	112
6.1.1.2. Avaliação da atividade antioxidante pelo método do 2,2-azino-bis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS <sup>+</sup> ).....	116
6.2. Determinação do teor de flavonoides totais.....	119
6.3. Determinação de proantocianidinas pelo método da vanilina.....	122

6.4. Avaliação da toxicidade frente a larvas de <i>Artemia salina</i> .....	125
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	128
8. REFERÊNCIAS.....	130

## 1. INTRODUÇÃO

Por muito tempo, o homem buscou na natureza fontes para atender suas necessidades básicas, como por exemplo, a procura por agentes terapêuticos para o tratamento de doenças (CRAGG; NEWMAN, 2013). Segundo Cragg e Newman (2013), a base da medicina popular é constituída, principalmente, pelo uso de plantas, seja por produção de chás, garrafadas, óleos essenciais e de extratos.

Todavia, não há informações precisas disponíveis para avaliar a magnitude do uso de plantas ou de princípios ativos derivados delas nos sistemas de saúde dos países (WHO, 2002; FARNSWORTH et al., 1985). Presume-se que, aproximadamente, 80% da população dos países desenvolvidos são completamente dependentes do uso de plantas para cuidados primários à saúde (HOSTETTMANN; MARSTON, 2002; WHO, 2002; FARNSWORTH et al., 1985). Sendo que, mais de 25% dos medicamentos comercializados, nestes países, são derivados, direta ou indiretamente, de plantas (HOSTETTMANN; MARSTON, 2002).

Desta forma, foi observado um avanço científico significativo nos estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, com o intuito de se obter novas substâncias com propriedades terapêuticas (QUELBANI et al., 2016; FAKCHICH; ELACHOURI, 2014; SOUZA et al., 2013; CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). A motivação pela busca de plantas medicinais e novos fitoterápicos está relacionada com a capacidade que as plantas possuem de biossintetizar os mais variados tipos de estruturas químicas, bem como as atividades biológicas que podem apresentar (VERPOORTE, 2000). Além das propriedades farmacológicas, os metabólitos secundários podem ser utilizados pelo homem como fragâncias, conservantes, corantes, inseticidas entre outras funções (VERPOORTE, 2000).

No Quadro 1, encontram-se listados alguns exemplos de princípios ativos de medicamentos oriundos de fontes naturais, evidenciando-se assim a relevância dos produtos naturais como fonte promissora para a obtenção de novos fármacos.

**Quadro 1.** Exemplos de medicamentos de origem natural.

Princípio ativo	Origem	Atividade biológica
Pilocarpina	<i>Pilocarpus microphyllus</i> - Rutaceae	Antiglaucoma
Pseudopterosina A	<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i> - Gorgoniidae	Anti-inflamatório
Solamargine	<i>Solanum nigrum</i> - Solanaceae	Anticâncer
Podofilotoxina	<i>Podophyllum peltatum</i> - Berberidaceae	Anticâncer e usado no tratamento de condilomas venéreos
Protodioscina	<i>Tribulus terrestris</i> - Zygophyllaceae	Regulador hormonal e aumento da espermatogênese
Homoharringtonina	<i>Cephalotaxus hainanensis</i> - Cephalotaxaceae	Anticâncer
Artemisina	<i>Artemisia annua</i> - Asteraceae	Antimalárica

Fonte: Adaptado de NEWMAN; CRAGG, 2016; CENDALES; SUÁREZ, 2016; BRAZ-FILHO, 1994.

A área da química dos produtos naturais responsável pela investigação, isolamento, purificação e caracterização estrutural das substâncias produzidas pelas plantas, fungos, animais e/ou organismos marinhos é chamada de fitoquímica (BRAZ-FILHO, 2010).

A composição química das plantas pode variar dependendo das condições ambientais do lugar em que se encontram, e com os diferentes órgãos vegetais (galho, folha, semente, raiz e etc) (GLOBBO-NETO; LOPES, 2007). Ademais, algumas substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas podem apresentar distribuição restrita a um dado gênero ou espécie (VERPOORTE, 2000). Ou seja, esses fatores geram uma diferenciação química entre as plantas.

Diante disso, o estudo fitoquímico de uma determinada espécie não pode se restringir a um único espécime, se quer a um único órgão.

Neste contexto, considerando a importância de se conhecer a composição química de produtos naturais e a busca por substâncias bioativas, este trabalho se propôs a estudar um espécime de *Lecythis pisonis* (Lecythidaceae), uma planta nativa da Mata Atlântica e Floresta Amazônica. O estudo fitoquímico das folhas (BARRETO et al., 2020) e cascas do caule (DUARTE et al., 2015) dessa espécie foi parcialmente realizado pelo nosso grupo de pesquisa Química de

Produtos Naturais – Laboratório de Ciências Químicas (LCQUI) – PPGCN/UENF, no qual foram obtidos resultados promissores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRETO, K. G.; MOREIRA, L. L. P. F.; GOMES, J. S. X.; MATOS, C. R. R.; MATHIAS, L. Perfil Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antioxidante e Citotóxica de um Espécime de *Lecythis pisonis* Cambess. (Lecythidaceae). *Rev Virtual Quim*, 12, p. 1-18, 2020.

BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. *Química Nova*, v. 17, n. 5, p. 405-445, 1994.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização. *Química Nova*, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CENDALES, D. R. M.; SUÁREZ, L. E. C. Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). *Revista Colombiana de Cancerología*, v. 20, n. 3, p. 124-134, 2016.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

DUARTE, R.; MATOS, C. R. R.; BRAZ-FILHO, R.; MATHIAS, L. Chemical Constituents of *Lecythis pisonis* (Lecythidaceae) – A New Saponin and complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Chemical Shift Assignments. *Natural Product Communications*, v. 10, n. 6, p. 871-874, 2015.

FAKCHICH, J.; ELACHOURI, M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *J. Ethnopharmacol*, v. 154, p. 76–87, 2014.

FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 63, n. 6, p. 965-981, 1985.

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

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives. *Phytochemistry Reviews*, v. 1, n. 3, p. 275-285, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, v. 79, p. 629-661, 2016.

QUELBANI, R.; BENSARI, S.; MOUAS, T. N.; KHELIFI, D. Ethnobotanical investigations on plants used in folk medicine in the regions of Constantine and Mila (North-East of Algeria). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 194, p. 196-218, 2016.

SOUZA, C. M. P.; BRANDÃO, D. O.; SILVA, M. S. P.; PALMEIRA, A. C.; SIMÕES, M. O. S.; MEDEIROS, A. C. D. Utilização de Plantas Medicinais com Atividade Antimicrobiana por Usuários do Serviço Público de Saúde em Campina Grande – Paraíba. *Rev. Bras. Pl. Med*, v. 15, n. 2, p. 188-193, 2013.

VERPOORTE, R. Plant secondary metabolism. *In*: VERPOORTE, R.; ALFERMANN, A. W. (Eds.). *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Springer Science+Business Media, 2000, p. 1-30.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005. *World Health Organization Geneva*, 2002.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O trabalho tem como objetivo geral dar continuidade ao estudo fitoquímico da espécie *Lecythis pisonis* (Lecythidaceae), com vista ao isolamento de metabólitos secundários dos extratos das folhas e madeira da espécie. Além de realizar a avaliação da atividade antioxidante e citotóxica dos extratos brutos polares da madeira.

### 2.2. Objetivos específicos

- a) Elaborar os extratos brutos, empregando os solventes: hexano, metanol e o sistema metanol/água (1:1).
- b) Realizar o fracionamento cromatográfico dos extratos brutos através de técnicas clássicas e modernas de cromatografia (cromatografia de adsorção em coluna, de partição, de exclusão em gel de Sephadex LH-20 e em coluna com sílica tipo *Flash*).
- c) Elucidar a estrutura dos constituintes químicos isolados através de métodos espectrométricos (IV, UV, CG-EM, EM, ESI-MS, LC-MS, e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ).
- d) Determinar o teor de fenóis, flavonoides e proantocinidinas dos extratos brutos da madeira pelos métodos de Folin-Ciocalteu, cloreto de alumínio e vanilina, respectivamente.
- e) Avaliar a atividade antioxidante dos extratos brutos da madeira pelos métodos do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH $^{\cdot}$ ) e 2-Ácido 2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS $^{2+}$ ).



f) Avaliar a atividade citotóxica dos extratos brutos da madeira frente às larvas de *Artemia salina* Leach.

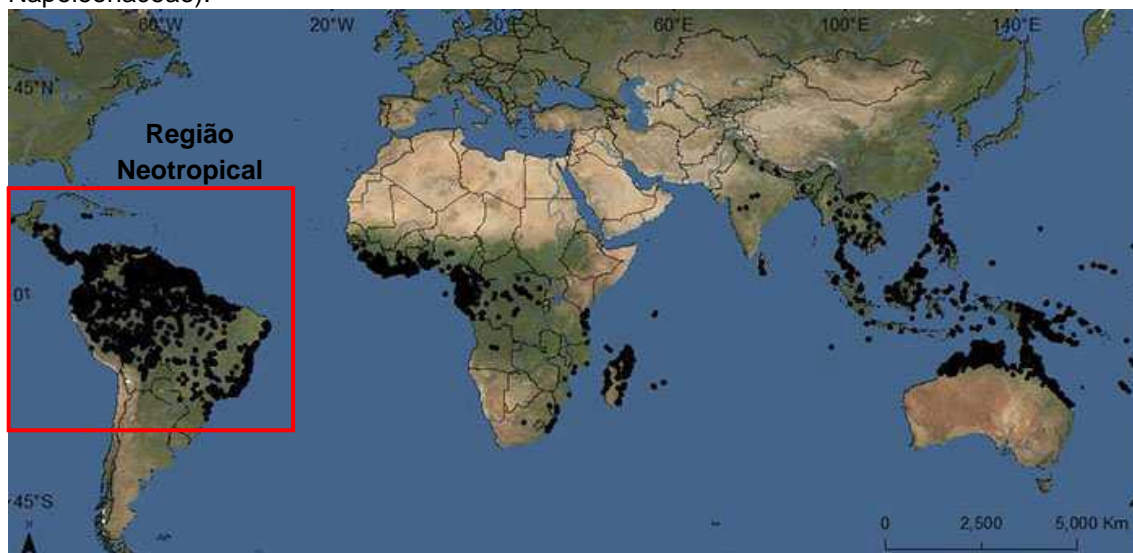
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA LECYTHIDACEAE

A família Lecythidaceae é representada por pequenas e grandes árvores. Suas espécies estão distribuídas pantropicamente, ou seja, estão presentes nas regiões tropicais dos continentes, como mostrado na Figura 1 (PRANCE; KARTAWINATA, 2013; MORI, 1988). Sendo que, a maior diversidade em espécies encontra-se na região neotropical (VARGAS; DICK, 2020; TER STEEGE et al., 2013; MORI, 1990, 1988).

Sua predominância encontra-se em regiões de terras baixas, ou seja, em florestas que não sofrem inundações, chamadas de terra firme. Desta forma, o local de dominância das espécies desta família é a Amazônia brasileira e internacional, podendo também ser encontradas no bioma Mata Atlântica (MORI, 2001, 1990, 1988).

**Figura 1.** Distribuição no mundo da família Lecythidaceae (incluindo Scytopetalaceae e Napoleonaceae).



Fonte: adaptada de MORI et al. 2017.

A família Lecythidaceae é conhecida internacionalmente como “Família da Castanha-do-Pará”, devido à comercialização mundial das sementes da

espécie *Bertholletia excelsa* Bonpl, que é chamada, popularmente, de castanha-do-pará (MORI et al., 2017; MORI et al., 2007; MORI, 1990).

A circunscrição da família ainda é controversa e há diferenças quanto ao número de subfamílias. Para o The Angiosperm Phylogeny Group (2003), Lecythidaceae é dividida em cinco subfamílias: Napoleonoideae, Scytopetaloidae, Foetidioideae, Barringtonioideae e Lecythidoideae. Em contraste, outros estudos atribuem o status de família a Scytopetalaceae e Napoleonaceae, reconhecendo apenas as outras três subfamílias para Lecythidaceae (HUANG; MORI; KELLY, 2015; MORI et al., 2007).

De acordo com a plataforma The Plant List (<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/>), a família Lecythidaceae, incluindo Napoleoneae e Scytopetalaceae, compreende cerca de 24 gêneros e 341 espécies. A subfamília Napoleonaceae é composta por 13 espécies distribuídas em 2 gêneros; a Scytopetalaceae possui 18 espécies em 6 gêneros; a Barringtonioideae compreende cerca de 79 espécies distribuídas em 5 gêneros; a Foetidioideae é constituída por 18 espécies em um único gênero; e a Lecythidoideae é composta por 213 espécies em 10 gêneros (HUANG; MORI; KELLY, 2015, 2011; MORI et al., 2007).

No Quadro 2 pode-se observar a divisão da família Lecythidaceae em subfamílias, bem como os gêneros pertencentes as mesmas e as regiões de ocorrência.

**Quadro 2.** Subfamílias, regiões e gêneros de Lecythidaceae (continua).

<b>Subfamília</b>	<b>Região</b>	<b>Gênero</b>
<b>Napoleoneae</b>	África tropical	<i>Crateranthus</i> <i>Napoleonea</i>
<b>Scytopetaloidae</b>	África tropical e Amazônia ( <i>Asteranthos</i> )	<i>Asteranthos</i> <i>Oubanguia</i> <i>Scytopetalum</i> <i>Brazzeia</i> <i>Pierrina</i> <i>Rhaptopetalum</i>
<b>Foetidioideae</b>	Madagascar, Ilhas Maurício e Leste da África tropical	<i>Foetidia</i>

**Quadro 2.** Subfamílias, regiões e gêneros de Lecythidaceae (conclusão).

<b>Subfamília</b>	<b>Região</b>	<b>Gênero</b>
<b>Lecythidoideae</b>	Neotropical	<i>Allantoma</i> <i>Bertholletia</i> <i>Cariniana</i> <i>Corythophora</i> <i>Couratari</i> <i>Couroupita</i> <i>Eschweilera</i> <i>Grias</i> <i>Gustavia</i> <i>Lecythis</i>
<b>Barringtonioideae</b>	África e Ásia tropical, Austrália e Ilhas do Pacífico	<i>Careya</i> <i>Barringtonia</i> <i>Petersianthus</i> <i>Chydenanthus</i> <i>Planchonia</i>
	<b>Total</b>	<b>24</b>

Fonte: adaptado de MORI et al., 2007; The Plant List, 2013 (<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Lecythidaceae/>)

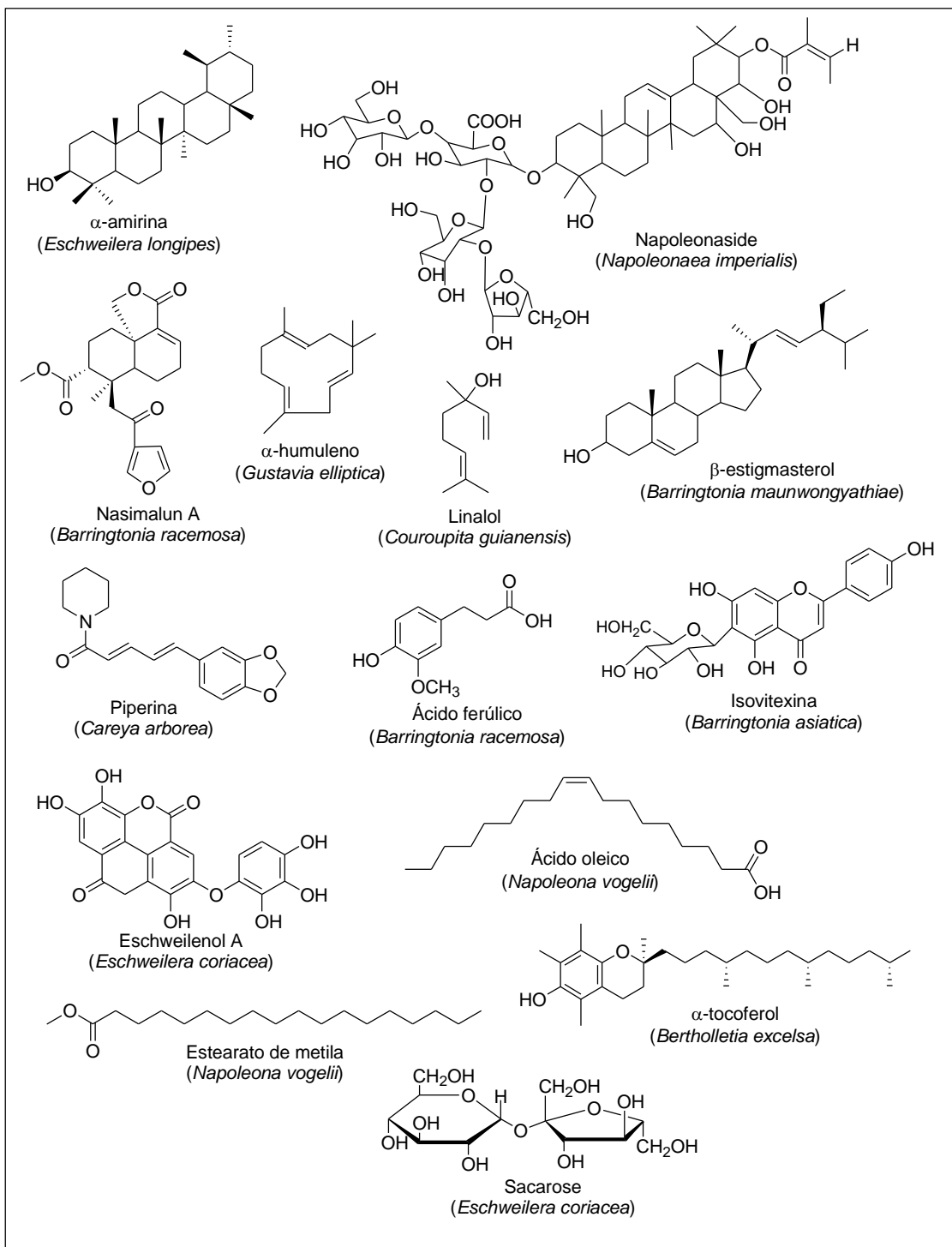
No Brasil são encontrados 10 gêneros, sendo 9 pertencentes a subfamília Lecythidoideae (com exceção do gênero *Grias*) e um a Scytopetaloideae (*Asteranthos*), ocorrendo 119 espécies, destas 54 são endêmicas (SMITH; MORI; PRANCE, 2015). Desta forma, o Brasil configura-se como o país que possui uma maior diversidade das espécies de Lecythidaceae (HUANG; MORI; KELLY, 2015; 2011; MORI, 1990, 1988).

Vale ressaltar, que apesar da grande diversidade no Brasil, os estudos voltados para a composição química destas plantas são limitados a apenas 40 espécies em 15 gêneros, sendo eles: *Allantoma*, *Barringtonia*, *Bertholletia*, *Careya*, *Cariniana*, *Chydenanthus*, *Couroupita*, *Eschweilera*, *Foetidia*, *Grias*, *Gustavia*, *Lecythis*, *Napoleonaea*, *Planchonia* e *Petersianthus*. No qual, os gêneros mais explorados são *Barringtonia* e *Couroupita*.

A quimiodiversidade da família Lecythidaceae é representada pela presença de metabólitos da classe dos terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, esteroides e tetraterpenos), saponinas, ácidos fenólicos, flavonoides, alcaloides, ácidos graxos e seus ésteres. Na Figura 2 são apresentadas algumas substâncias identificadas em espécies de Lecythidaceae (CARVALHO et al., 1998; OJINAKA; OKPALA, 2012; HASAN et

al., 2000; ALMEIDA et al., 2011; WONG; TIE, 1995; JUTIVIBOONSUK et al., 2007; AHMED et al., 2002; HUSSIN et al., 2009; IWASHINA; KOKUBUGATA, 2016; YANG et al., 1998; IKUMAWOYI; AGBAJE; AWODELE, 2017; FUNASAKI et al., 2013).

Figura 2. Alguns constituintes químicos presentes em espécies da família Lecythidaceae.



Algumas espécies dessa família são usadas na medicina popular para o tratamento da inflamação do útero e dos ovários (*Cariniana rubra*), câncer (*Bertholletia excelsa*), prurido (*Lecythis pisonis*), meningite (*Grias peruviana*), leucorreia (*Cariniana estrellensi* e *Cariniana legalis*) e tratar dores de cabeça (*Barringtonia asiatica*) (CABALLERO-SERRANO et al., 2019; OLIVEIRA; MACHADO; RODRIGUES, 2014; PRANCE; KARTAWINATA, 2013; PASA, 2011; FRANCO, BARROS, 2006; FENNER et al., 2006).

### 3.2. Considerações sobre o gênero *Lecythis*

Dentre os gêneros pertencentes à subfamília Lecythidoideae, *Lecythis* foi o primeiro a ser descrito. Ele é o terceiro maior gênero da subfamília Lecythidoideae, sendo constituído por 27 espécies, na qual 22 podem ser encontradas em território brasileiro (HUANG; MORI; KELLY, 2011).

As espécies do gênero *Lecythis* encontram-se distribuídas desde a Nicarágua ao Rio de Janeiro, sendo encontradas principalmente na Floresta Amazônica (Figura 3) (HUANG; MORI; KELLY, 2011; MORI, 2001, 1990, 1988).

**Figura 3.** Distribuição geográfica do gênero *Lecythis*.



Fonte: <[https://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make\\_map&kind=Lecythis](https://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make_map&kind=Lecythis)>

Levando-se em consideração as características florais e da fruta, *Lecythis* é considerado o gênero mais diversificado quando comparado com os outros

pertencentes à família Lecythidaceae (HUANG; MORI; KELLY, 2011; MORI, 2001, 1990, 1988). Sendo assim, a quimiotaxonomia, classificação de espécies vegetais pela sua composição química, pode auxiliar na identificação dessas espécies.

Espécies já estudadas no gênero revelaram a presença de metabólitos pertencentes à classe de aminoácidos, sesquiterpenos, esteroides, triterpenos, ácidos graxos de cadeia longa, estéres e aldeídos. No Quadro 4 apresenta-se as substâncias identificadas no gênero e na Figura 4 pode-se observar suas estruturas químicas.

**Quadro 4.** Substâncias identificadas em algumas espécies do gênero *Lecythis* (continua).

<b>Espécie</b>	<b>Substância</b>	<b>Referência</b>
<i>Lecythis lurida</i>	Sitosterol (1)	PEREIRA et al., 2015
	Estigmasterol (2)	
	$\beta$ -Amirina (3)	
	$\alpha$ -Amirina (4)	
	Lupeol (5)	
	Taraxerol (6)	
	Friedelina (7)	
	Friedelinol (8)	
<i>Lecythis minor</i>	1-Metil-4-(5-metil-1-metileno-4-hexenil) ciclohexeno (9)	LAFONT; CALLE; DURANGO, 2013
	Esqualeno (10)	
	3-Metil-2-butenil benzeno (11)	
	1-Etil-2-metilciclopropano (12)	
	Hexanal (13)	
	Nonanal (14)	
	(E)-2-Octenal (15)	
	(Z)-2-Decenal (16)	
	(E,E)-2,4-Decadienal (17)	
	9,17-Octadecadienal (18)	
	Ácido linoleico (19)	
	Ácidooleico (20)	
	Ácido palmítico (21)	
	Ácido estearico (22)	
	Palmitato de metila (23)	
	Cis-9-octadecenoato de metila (24)	

**Quadro 4.** Substâncias identificadas em algumas espécies do gênero *Lecythis* (conclusão).

Espécie	Substância	Referência
<i>Lecythis minor</i>	Linoleato de metila (25)	LAFONT; CALLE; DURANGO, 2013
<i>Lecythis ollaria</i>	Selenocistationina (26)	ARONOW; KERDEL- VEGAS, 1964
<i>Lecythis tuyrana</i>	Ácido linoleico (19)	ARBELÁEZ; PACHECO; ROJANO, 2018
	Ácidooleico (20)	
	Ácidomirístico (27)	
	Ácido palmítico (21)	
<i>Lecythis tuyrana</i>	Ácido margarico (28)	ARBELÁEZ; PACHECO; ROJANO, 2018
	Ácido estearico (22)	
	Ácido beenico (29)	
	Ácido palmitoleico (30)	
	Ácido araquidonico (31)	

**Figura 4.** Estruturas químicas das substâncias identificadas no gênero *Lecythis* (continua).

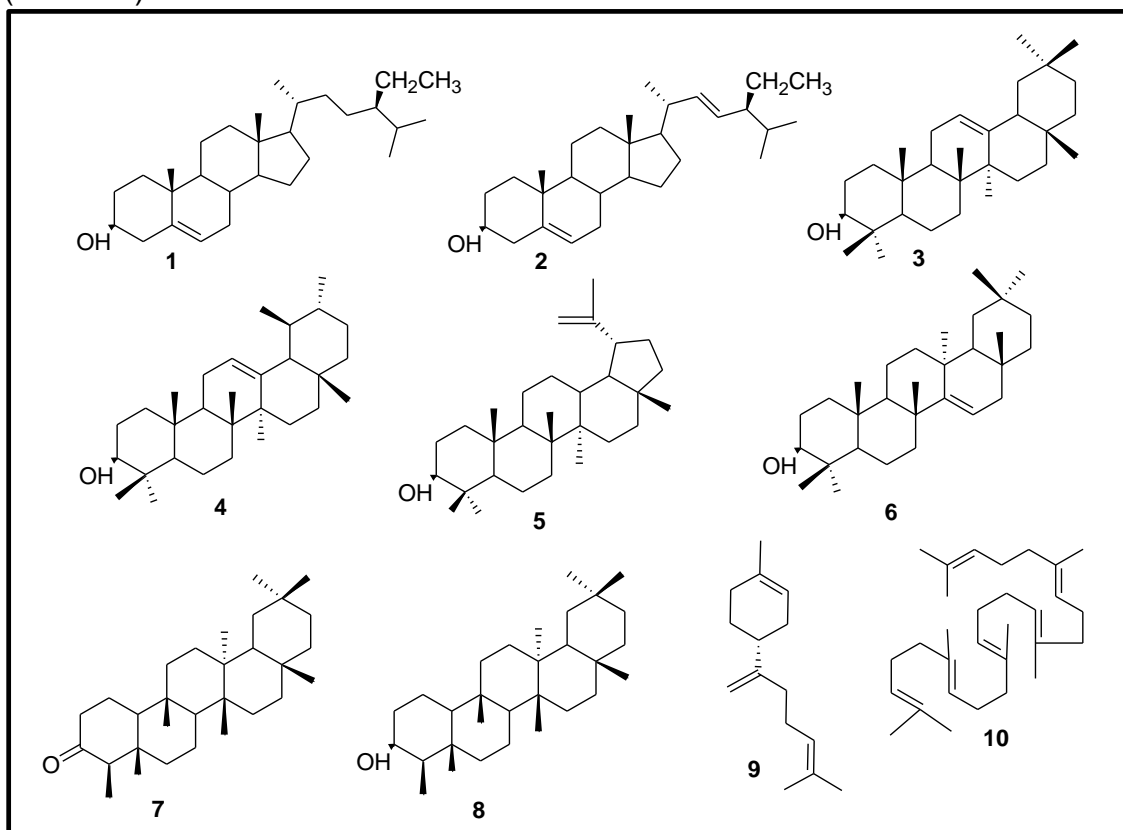
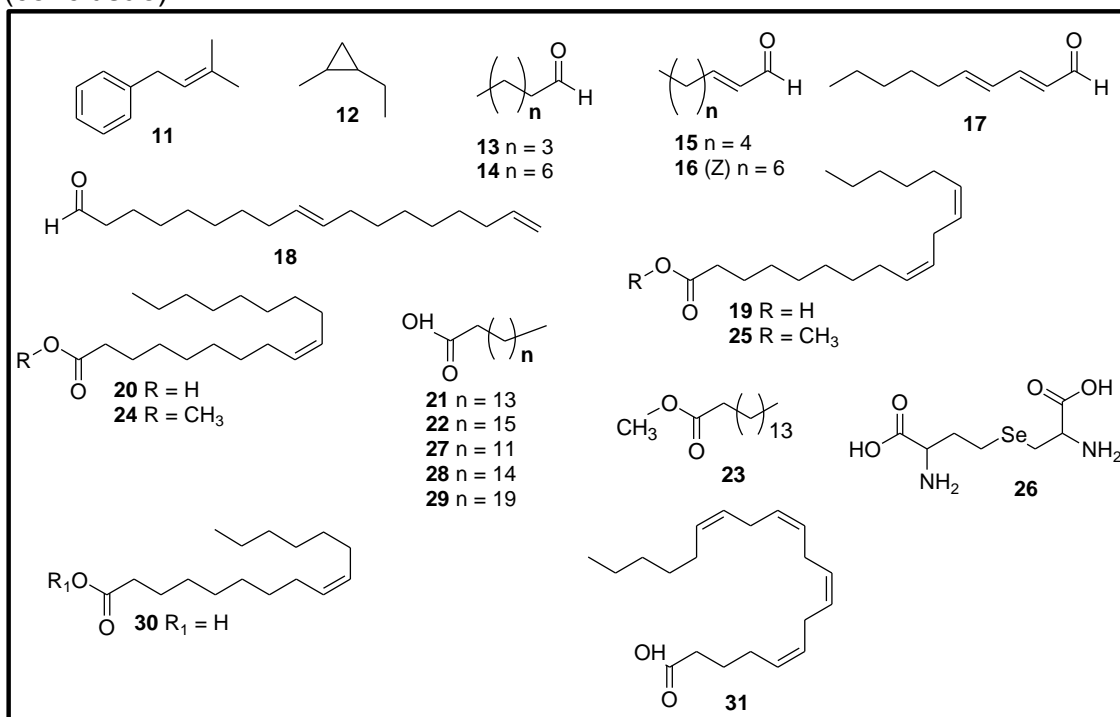




Figura 4. Estruturas químicas das substâncias identificados no gênero *Lecythis* (conclusão).



Estudos biológicos foram realizados com algumas espécies desse gênero. O extrato metanólico e as frações aquosa e em diclorometano dos galhos de *L. corrugata* apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (ROVIRA et al., 1999). Os extratos em metanol das espécies *L. idatimon* (madeira e cascas do caule) e *L. poiteau* (galhos) também mostraram capacidade de inibir o crescimento de bactérias (ROVIRA et al., 1999).

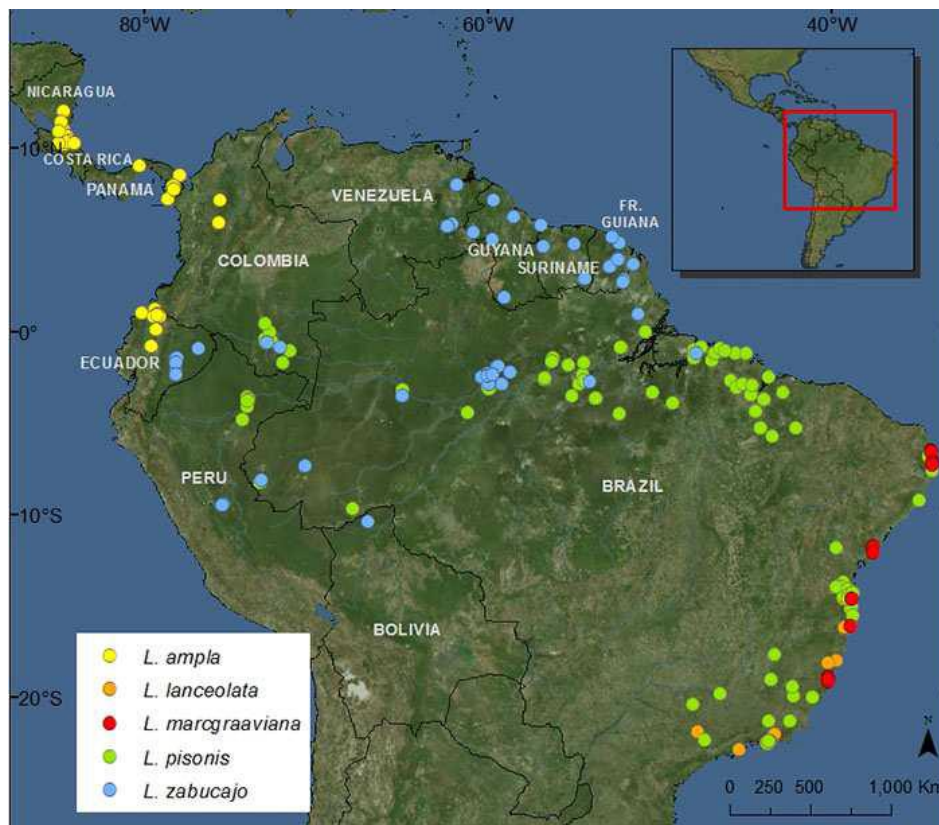
As folhas e cascas do caule da espécie *L. lurida* apresentaram atividade acaricida contra *Rhipicephalus microplus* (carrapato-de-boi) (PEREIRA et al., 2015). Em *L. ollaria* o efeito citotóxico das sementes foi atribuído ao aminoácido selenocistationina (26) (ARONOW; KERDEL-VEGAS, 1964). Em *L. turyrana*, o óleo das sementes demonstrou atividade antioxidante (ARBELÁEZ; PACHECO; ROJANO, 2018).

### 3.3. Considerações sobre a espécie *Lecythis pisonis* Cambess.

A espécie *Lecythis pisonis* foi descrita em 1829 por Jacques Cambessedes. Posteriormente, Miers descreveu a espécie *L. usitata* em 1874 (SOUZA et al., 2014). No entanto, durante uma revisão do gênero, Mori e Prance (1981) concluíram que essas duas espécies não eram distintas, pelo contrário, os autores as agruparam, tendo prevalecido o nome *L. pisonis* por ser o mais antigo. Sendo assim, *L. usitata* consta como sinonímia científica (SOUZA et al., 2014).

*L. pisonis* pode ser encontrada na Amazônia e florestas da Mata Atlântica (Figura 5). No Brasil, encontra-se distribuída, majoritariamente, na região Norte (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia), Nordeste (Bahia, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte) e Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) (MORI; PRANCE, 1981).

Figura 5. Distribuição geográfica da espécie *L. pisonis* (em verde).



Fonte: MORI et al., 2017.

O enquadramento taxonômico de *L. pisonis* pode ser observado no Quadro 5.

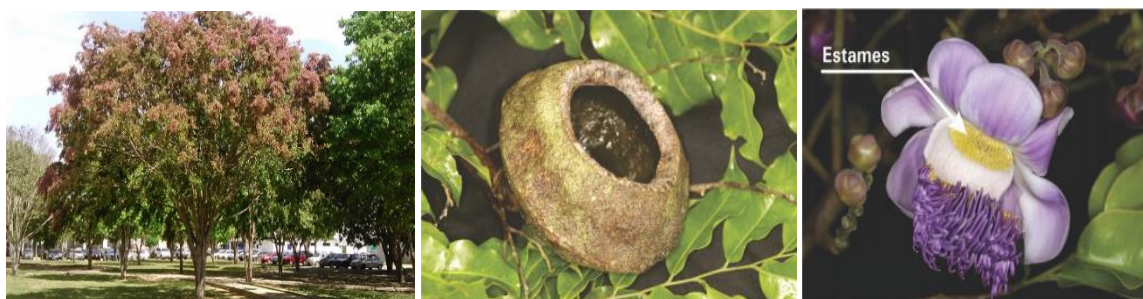
**Quadro 5.** Enquadramento taxonômico de *L. pisonis* Cambess.

Taxonomia	
<b>Classe</b>	Equisetopsida
<b>Subclasse</b>	Magnoliidae
<b>Ordem</b>	Ericales
<b>Família</b>	Lecythidaceae
<b>Gênero</b>	<i>Lecythis</i>
<b>Espécie</b>	<i>Lecythis pisonis</i> Cambessedes

Fonte: Adaptado de Tropicos.org (2018).

É uma árvore de grande porte de tronco retilíneo, estriado, com várias marcas semelhantes a arranhões, que pode alcançar de 20-30 m de altura, tendo seu tronco cerca de 50-90 cm de diâmetro (Figura 6a). As folhas são coriáceas, glabras e verdes (Figura 6b). Produz flores rosáceas, odoríferas, carnosas, com numerosos estames amarelos durante os meses de julho a janeiro (Figura 6c). Os frutos são grandes e lenhosos, semelhante a uma urna de barro (Figura 6b). Cada fruto pode possuir de 10-30 sementes. Quando maduros se abrem, expondo as castanhas (sementes), que são comestíveis e muito saborosas, sendo muito apreciadas pela fauna, especialmente por macacos e morcegos (MORI et al., 2017; SOUZA et al. 2014; MORI, 2001; MORI; PRANCE, 1981).

**Figura 6.** (a) um espécime de *L. pisonis*. (b) fruto e folhas. (c) flor.



(a)

(b)

(c)

Fonte: (a) própria autora. (b) e (c) Souza et al. (2014).

Devido a forma dos frutos, a espécie é conhecida popularmente como cumbuca-de-macaco, mas também recebeu o nome popular de sapucaia.

A planta apresenta características ornamentais que a recomendam para o paisagismo em geral. A madeira é muito utilizada para a construção de instrumentos musicais, artigos de esporte, carrocerias, embarcações, estacas, esculturas, implementos agrícolas, janelas, móveis, obras portuárias, pisos industriais, postes para distribuição de energia elétrica e etc. O fruto é utilizado como adorno e como recipiente na zona rural (SOUZA et al., 2014).

Na medicina popular, o óleo extraído das sementes é utilizado como um emoliente para redução da dor muscular, as folhas são usadas para o tratamento de prurido e o chá das cascas é indicado para tratar desinteria (MATOS; SERRA, 2020; AGRA et al., 2007; FRANCO; BARROS, 2006).

Os estudos fitoquímicos encontrados na literatura revelam que a química da espécie é bastante diversificada. Na literatura são listadas 96 substâncias identificadas na planta, pertencentes as seguintes classes metabólicas: terpenos, saponina, flavonoides, ácidos fenólicos e seus derivados, álcoois, hidrocarbonetos, ácidos graxos e ésteres (BARRETO et al., 2020; DEMOLINER et al., 2018a; DUARTE et al., 2015; FERREIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2012; ANDRADE; ZOGHBI; MAIA, 2000; ANDRADE et al., 1999).

Destaca-se, que até o momento só foi realizado um único estudo fitoquímico com os galhos de *L. pisonis*, no qual foram identificadas 9 substâncias pertencentes a classe dos terpenoides (FERREIRA et al., 2014). Ou seja, ainda é desconhecida as substâncias polares que fazem parte da composição química da madeira dessa planta.

Os estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa Química de Produtos Naturais (LCQUI – PPGCN/UENF), com as cascas do caule (DUARTE et al., 2015) e folhas (BARRETO et al., 2020) da espécie possibilitou o isolamento/identificação de uma saponina triterpênica, à época inédita na literatura, além de outras 25 substâncias conhecidas. Sendo assim, o PPGCN/UENF tem apresentado um importante papel para a contribuição do conhecimento químico da planta.

No Quadro 6 estão agrupadas as substâncias descritas na literatura para espécie. As estruturas químicas estão ilustradas na Figura 7.

**Quadro 6.** Substâncias identificadas na espécie *L. pisonis* (continua).

Substâncias	Parte da planta	Referência
<i>Monoterpeno</i>		
Linalol (32)	Flores	ANDRADE; ZOGHBI; MAIA, 2000
<i>Diterpeno</i>		
( <i>E</i> )-Fitol (33)	Folhas e galhos	FERREIRA et al., 2014 OLIVEIRA et al., 2012
<i>Esteróide</i>		
Sitosterol (1)	Planta inteira	ANDRADE; ZOGHBI; MAIA, 2000 OLIVEIRA et al., 2012
Estigmasterol (2)	Planta inteira	FERREIRA et al., 2014 DUARTE et al., 2015 DEMOLINER et al., 2018a BARRETO et al., 2020
Campesterol (34)	Sementes, galhos e cascas do caule	ANDRADE et al., 1999 FERREIRA et al., 2014 DUARTE et al., 2015 DEMOLINER et al., 2018a
Colesterol (35)	Cascas do caule	DUARTE et al., 2015
$\Delta^7$ -Estigmastenol (36)	Sementes	ANDRADE et al., 1999
<i>Triterpenos</i>		
$\beta$ -Amirina (3)	Planta inteira	ANDRADE et al., 1999 OLIVEIRA et al., 2012
$\alpha$ -Amirina (4)	Planta inteira	FERREIRA et al., 2014 DUARTE et al., 2015 BARRETO et al., 2020
Lupeol (5)	Planta inteira	DUARTE et al., 2015 FERREIRA et al., 2014
Friedelina (7)	Folhas e cascas do caule	DUARTE et al., 2015 BARRETO et al., 2020
Friedelanol (8)	Folhas e cascas do caule	OLIVEIRA et al., 2012 FERREIRA et al., 2014 DUARTE et al., 2015 BARRETO et al., 2020
Esqualeno (10)	Folhas	FERREIRA et al., 2014 BARRETO et al., 2020
Uvaol (37)	Folhas	OLIVEIRA et al., 2012
Eritrodiol (38)	Folhas	
Ácido ursólico (39)	Folhas e galhos	OLIVEIRA et al., 2012 SILVA et al., 2012 BRANDÃO et al., 2013 FERREIRA et al., 2014 BARRETO et al., 2020

**Quadro 6.** Substâncias identificadas na espécie *L. pisonis* (continua).

<b>Substâncias</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Referência</b>
Ácido oleanólico (40)	Folhas e galhos	OLIVEIRA et al., 2012 SILVA et al., 2012 BRANDÃO et al., 2013 FERREIRA et al., 2014
Germanicol (41)	Cascas do caule	DUARTE et al., 2015
<i>Saponinas</i>		
Ácido-3-O- $\beta$ -D-glicuronopiranosil-(1'→3)-arjúnico (42)	Cascas do caule	DUARTE et al., 2015
<i>Flavonoides</i>		
Quercetina-3-O-rutinosideo (43)	Folhas	FERREIRA et al., 2014
Kaempferol-3-O-rutinosideo (44)	Folhas	
Quercetina-3-O-glicosídeo (45)	Folhas	BARRETO et al., 2020
Kaempferol-3-O-glicosídeo (46)	Folhas	
Kaempferol (47)	Sementes	DEMOLINER et al., 2018b
Miricetina (48)	Sementes	
Catequina (49)	Sementes	
Epicatequina (50)	Sementes	
(+)-Epigallocatechin (51)	Sementes	
Aromadendrin (52)	Sementes	
Taxifolina (53)	Sementes	
<i>Ácidos fenólicos e derivados</i>		
Ácido ferúlico (54)	Sementes	DEMOLINER et al., 2018b
Ácido vanílico (55)	Sementes	
Vanilina (56)	Sementes	
Ácido gálico (57)	Folhas e sementes	DEMOLINER et al., 2018b BARRETO et al., 2020
Galato de metila (58)	Folhas	BARRETO et al., 2020
Ácido protocatecuico (59)	sementes	DEMOLINER et al., 2018b
Ácido elágico (60)	Folhas e sementes	DEMOLINER et al., 2018b BARRETO et al., 2020
<i>Tocoferois</i>		
$\alpha$ -Tocoferol (61)	Folhas e sementes	ANDRADE et al., 1999 DEMOLINER et al., 2018a BARRETO et al., 2020

**Quadro 6.** Substâncias identificadas na espécie *L. pisonis* (Continua).

<b>Substâncias</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Referência</b>
$\gamma$ -Tocoferol (62)	Sementes	ANDRADE et al., 1999
$\delta$ -Tocoferol (63)	Sementes	DEMOLINER et al., 2018a
<i>Alcaloide</i>		
Indole (64)	Flores	ANDRADE; ZOGHBI; MAIA, 2000
<i>Álcoois</i>		
Álcool 2-feniletílico (65)	Flores	ANDRADE; ZOGHBI; MAIA, 2000
Álcool 2-metoxi-2'-feniletílico (66)	Flores	ANDRADE; ZOGHBI; MAIA, 2000
<i>n</i> -Eicosan-1-ol (67)	Galhos	FERREIRA et al., 2014
<i>Aldeído</i>		
<i>p</i> -Anisaldeído (68)	Flores	ANDRADE; ZOGHBI; MAIA, 2000
Fenilacetaldéido (69)	Flores	ANDRADE; ZOGHBI; MAIA, 2000
Benzaldeído (70)	Flores	ANDRADE; ZOGHBI; MAIA, 2000
<i>Ésteres</i>		
Fenilacetato de 2-feniletíl (71)	Flores	ANDRADE; ZOGHBI; MAIA, 2000
2-Feniletilbutirato (72)	Flores	ANDRADE; ZOGHBI; MAIA, 2000
2-Methyl-6-propylphenol (73)	Flores	ANDRADE; ZOGHBI; MAIA, 2000
Palmitato de metila (23)	Folhas	BARRETO et al., 2020
Palmitato de etila (74)	Folhas	
9-Octadecenoato de etila (75)	Folhas	
Palmitato de butila (76)	Folhas	
Octadecanoato de metila (77)	Folhas	
Octadecanoato de etila (78)	Folhas	
Octadecanoato de butila (79)	Folhas	
<i>Ácidos graxos</i>		
Ácido linoleico (19)	Sementes	ANGELIS et al., 1980
Ácido oleico (20)	Sementes	VALLILO et al., 1998
Ácido palmítico (21)	Sementes	ANDRADE et al., 1999
Ácido esteárico (22)	Sementes	DENADAI et al., 2007 SILVA, 2014 DEMOLINER et al., 2018a TEIXEIRA et al., 2018b TEIXEIRA et al., 2018a SANTOS et al., 2019
Ácido mirístico (27)	Sementes	ANGELIS et al., 1980 ANDRADE et al., 1999 DENADAI et al., 2007 DEMOLINER et al., 2018a TEIXEIRA et al., 2018b TEIXEIRA et al., 2018a



**Quadro 6.** Substâncias identificadas na espécie *L. pisonis* (Continua).

Substâncias	Parte da planta	Referência
Ácido margarico (28)	Sementes	DEMOLINER et al., 2018a TEIXEIRA et al., 2018b TEIXEIRA et al., 2018a SANTOS et al., 2019
Ácido beênico (29)	Sementes	TEIXEIRA et al., 2018b TEIXEIRA et al., 2018a SANTOS et al., 2019
Ácido palmitoléico (30)	Sementes	ANGELIS et al., 1980 VALLILO et al., 1998 ANDRADE et al., 1999 DENADAI et al., 2007 DEMOLINER et al., 2018a TEIXEIRA et al., 2018b TEIXEIRA et al., 2018a SANTOS et al., 2019
Ácido araquidônico (31)	Sementes	TEIXEIRA et al., 2018a
Ácido linolênico (80)	Sementes	VALLILO et al., 1998 DENADAI et al., 2007 DEMOLINER et al., 2018a TEIXEIRA et al., 2018a SANTOS et al., 2019
Ácido caprílico (81)	Sementes	ANDRADE et al., 1999
Ácido cáprico (82)	Sementes	
Ácido láurico (83)	Sementes	DENADAI et al., 2007
Ácido araquídico (84)	Sementes	ANGELIS et al., 1980 ANDRADE et al., 1999 TEIXEIRA et al., 2018a
Ácido elaídico (85)	Sementes	TEIXEIRA et al., 2018a
Ácido cis-vacênico (86)	Sementes	
Ácido erúcico (87)	Sementes	SANTOS et al., 2019
Ácido cis-11-eicosenóico (88)	Sementes	DENADAI et al., 2007 DEMOLINER et al., 2018a TEIXEIRA et al., 2018b TEIXEIRA et al., 2018a SANTOS et al., 2019
Ácido lignocérico (89)	Sementes	TEIXEIRA et al., 2018b
<i>Hidrocarbonetos</i>		
<i>n</i> -Nonano (90)	Flores	ANDRADE; ZOGHBI; MAIA, 2000
<i>n</i> -Decano (91)	Flores	
<i>n</i> -Dodecano (92)	Flores	
<i>n</i> -Tridecano (93)	Flores	
<i>n</i> -Tetradecano (94)	Flores	
<i>n</i> -Pentadecano (95)	Flores	



**Quadro 6.** Substâncias identificadas na espécie *L. pisonis* (Conclusão).

<b>Substâncias</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Referência</b>
<i>n</i> -Docosano (96)	Folhas	SILVA et al. (2017)
<i>n</i> -Tricosano (97)	Folhas	
<i>n</i> -Tetracosano (98)	Folhas	
<i>n</i> -Pentacosano (99)	Folhas	
<i>n</i> -Hexacosano (100)	Folhas	
<i>n</i> -Heptacosano (101)	Folhas	
<i>n</i> -Octacosano (102)	Folhas	
<i>n</i> -Nonacosano (103)	Folhas	
<i>n</i> -Triacontano (104)	Folhas	
<i>n</i> -Hentriacontano (105)	Folhas	
<i>n</i> -Dotriacontano (106)	Folhas	
<i>n</i> -Tritriacontano (107)	Folhas	
<i>n</i> -Tetratriacontano (108)	Folhas	
<i>n</i> -Pentatriacontano (109)	Folhas	

Figura 7. Substâncias identificadas na espécie *L. pisonis* (continua).

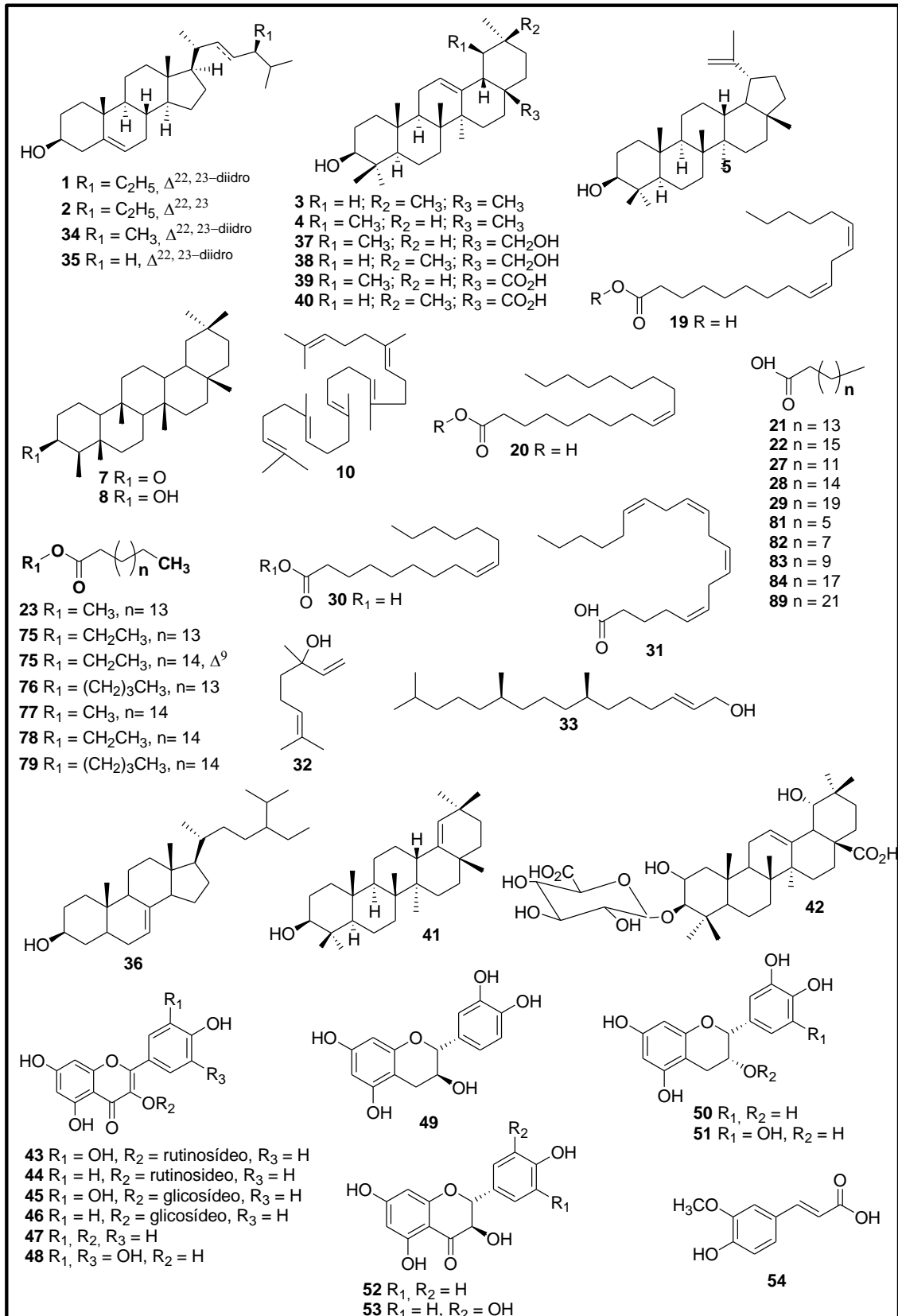
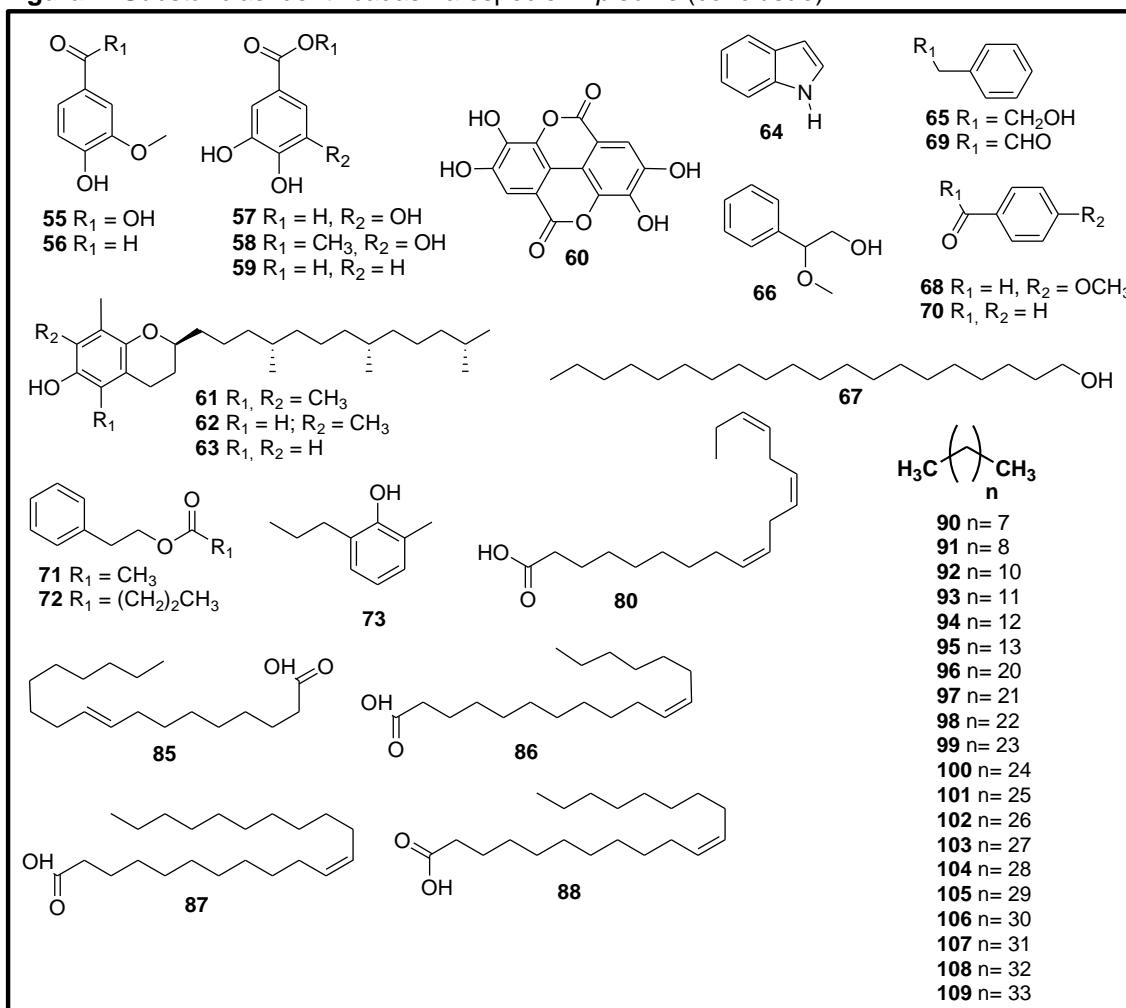


Figura 7. Substâncias identificadas na espécie *L. pisonis* (conclusão).



No que se refere a avaliação da atividade biológica dos extratos e substâncias isoladas da espécie, poucos estudos foram realizados, apesar do uso na medicina popular.

Barreto et al., (2020) verificou a atividade antioxidante e citotóxica dos extratos brutos em MeOH e MeOH/H<sub>2</sub>O das folhas. Os extratos apresentaram efeito antioxidante pelo método do DPPH\* ( $EC_{50} = 61,57 \pm 0,34$  e  $25,17 \pm 0,85$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) e ABTS\*<sup>+</sup> ( $296,51 \pm 3,89$  e  $300,15 \pm 2,97$   $\mu\text{mol TEAC/g}$  de extrato), respectivamente. Através do método DPPH, o extrato hidroalcoólico mostrou efeito comparável ao padrão quercetina ( $EC_{50} = 23,24 \pm 1,44$   $\mu\text{g} / \text{mL}$ ).

Em outro estudo, os extratos etanólico das folhas e galhos de *L. pisonis* exibiram atividade antioxidante pelo método do DPPH com valores de  $EC_{50} = 49,04 \pm 1,65$  e  $71,52 \pm 3,11$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Sendo que, no referido

trabalho o extrato etanólico das folhas também apresentou atividade semelhante a rutina ( $EC_{50} = 47,08 \pm 4,65 \mu\text{g/mL}$ ) (FERREIRA et al. 2014).

Em estudos *in vitro* as sementes apresentaram atividade antioxidante (DEMOLINER et al., 2018b; TEIXEIRA et al., 2018a). As sementes também apresentaram efeito neuroprotetivo (VIDAL MARTINS et al., 2015).

O extrato em etanol e a fração em éter etílico das folhas exibiram efeito antinociceptivo, que foi atribuído a mistura dos ácidos oleanólico e ursólico (BRANDÃO et al., 2013). O extrato etanólico das folhas de *L. pisonis* e a fração em éter etílico também inibiram significativamente o edema de pata induzido por carragenina, demonstrando um potencial efeito antiedematogênico (SILVA et al. 2012).

Silva e colaboradores (2012) também verificaram que o extrato etanólico das folhas, as frações em hexano, éter etílico, acetato de etila e a mistura de ácidos oleanólico e ursólico apresentaram atividade antipruriginosa. Segundo os autores, essa informação apóia o uso tradicional dessa planta contra coceira na pele.

O extrato em etanol das folhas, a fração em éter etílico e a mistura de ácido ursólico e oleanólico exibiram atividade citotóxica (OLIVEIRA et al., 2012). Os extratos em MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O apresentaram leve toxicidade frente as larvas de *Artemia salina* (BARRETO et al., 2020).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AHMED, M.; RAHMAN, M. W.; RAHMAN, M. T.; HOSSAIN, C. F. Analgesic principle from the bark of *Careya arborea*. *Pharmazie*, v. 57, n. 10, p. 698-701, 2002.

ALMEIDA, M. F. O.; MELO, A. C. R.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. P. Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). *Química Nova*, v. 34, n. 7, p. 1182-1187, 2011.

ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; STREICH, R.; MARX, F. Seed Composition of Amazonian Lecythidaceae Species: Part 3 in the Series "Studies of Edible Amazonian Plants". *J Food Compos Anal*, v. 12, n. 1, p. 37-51, 1999.

ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S. The Volatiles from Flowers of *Couroupita guianensis* Aubl., *Lecythis usitata* Miers. var. *paraensis* (Ducke) R. Kunth. and *Eschweilera coriacea* (A. P. DC.) Mori (Lecythidaceae). *J Essent Oil Res*, v. 12, n. 2, p. 163-166, 2000.

ANGELIS, D. F.; PICCOLO, A. L. G.; THOMAZINI, L. I.; FIQUEIREDO, I. B. *Lecythis pisonis* Camb: dados morfológicos e composição química da semente. *Eletica Quim J*, v. 5, n. 1, p. 51-57, 1980.

ARBELÁEZ, A. F. A.; PACHECO, A. C.; ROJANO, B. Composition, antioxidant activity, thermal and oxidative stability of *Lecythis turyrana* oil. *J Food Nutr Res*, v. 57, p. 87-97, 2018.

ARONOW, L.; KERDEL-VEGAS, F. Factor citotóxico en la *Lecythis ollaria* ("coco de mono"). *Dermatol Venez*, v. 4, p. 186-209, 1964.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Uma revisão sobre a ocorrência de sacarose no reino vegetal. *Farmácia & Química*, v. 33, n. 2/3, p. 6-22, 2000.

BARRETO, K. G.; MOREIRA, L. L. P. F.; GOMES, J. S. X.; MATOS, C. R. R.; MATHIAS, L. Perfil Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antioxidante e Citotóxica de um Espécime de *Lecythis pisonis* Cambess. (Lecythidaceae). *Rev Virtual Quim*, 12, p. 1-18, 2020.

BRANDÃO, M. S.; PEREIRA, S. S.; LIMA, D. F.; OLIVEIRA, J. P. C.; FERREIRA, E. L. F.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C. Antinociceptive effect of *Lecythis pisonis* Camb. (Lecythidaceae) in models of acute pain in mice. *J Ethnopharmacol*, v. 146, n. 1, p. 180-186, 2013.

CABALLERO-SERRANO, V.; MCLAREN, B.; CARRASCO, J. C.; ALDAY, J. G.; FIALLOS, L.; AMIGO, J.; ONAINDIA, M. Traditional ecological knowledge and medicinal plant diversity in Ecuadorian Amazon home gardens. *Glob Ecol Conserv*, v. 17, p. 1-23, 2019.

CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, L. F.; BEZERRA, F. B. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). *Química Nova*, v. 21, n. 6, p. 740-743, 1998.

DEMOLINER, F.; DE BRITTO POLICARPI, P.; RAMOS, J. C.; BASCUNÂN, V. L. A. F.; FERRARI, R. A.; JACHMANIÁN, I.; CASAS, A. F.; VASCONCELOS, L. F. L.; BLOCK, J. M. Sapucaia nut (*Lecythis pisonis* Cambess) and its by-products: A promising and underutilized source of bioactive compounds. Part I: Nutritional composition and lipid profile. *Food Res Int*, v. 108, p. 27-34, 2018a.

DEMOLINER, F.; POLICARPI, P. B.; VASCONCELOS, L. F. V.; VITALI, L.; MICKE, G. A.; BLOCK, J. M. Sapucaia nut (*Lecythis pisonis* Cambess) and its by-products: A promising and underutilized source of bioactive compounds. Part II: Phenolic compounds profile. *Food Res Int*, v. 112, p. 434-442, 2018b.

DENADAI, S. M. S.; HIANE, P. A.; MARANGONI, S.; BALDASSO, P. A.; MIGUEL, A. M. R. O.; MACEDO, M. L. R. *In vitro* digestibility of globulins from sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.) nuts by mammalian digestive proteinases. *Ciênc Tecnol Aliment*, v. 27, n. 3, p. 535-543, 2007.

DUARTE, R.; MATOS, C. R. R.; BRAZ-FILHO, R.; MATHIAS, L. Chemical Constituents of *Lecythis pisonis* (Lecythidaceae) – A New Saponin and complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Chemical Shift Assignments. *Natural Product Communications*, v. 10, n. 6, p. 871-874, 2015.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Rev Bras Ciênc Farm*, v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.

FERREIRA, E. L. F.; MASCARENHAS, T. S.; OLIVEIRA, J. P. C.; CHAVES, M. H.; ARAÚJO, B. Q.; CAVALHEIRO, A. J. Phytochemical investigation and antioxidant activity of extracts of *Lecythis pisonis* Camb. *J Med Plant Res*, v. 8, n. 8, p. 353-360, 2014.

FRANCO, E. A. P.; BARROS, R. F. M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. *Revista Brasileira de plantas medicinais*, v. 8, n.3, p.78-88, 2006.

FUNASAKI, M.; MENEZES, I. S.; BARROSO, H. S.; ZANOTTO, S. P.; CARIOCA, C. R. F. Tocopherol profile of Brazil nut oil from different geographic areas of the Amazon region. *Acta Amazonica*, v. 43, n. 4, p. 505-510, 2013.

HASAN, C. M.; KHAN, S.; JABBAR, A.; RASHID, M. A. Nasimaluns A and B: neo-clerodane diterpenoids from *Barringtonia racemosa*. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 3, p. 410-411, 2000.

HUANG, Y-Y.; MORI, S.; KELLY, L. M. A morphological cladistics analysis of Lecythidoideae with emphasis on *Bertholletia*, *Corythophora*, *Eschweilera*, and *Lecythis*. *Brittonia*, v. 63, n. 3, p. 396-417, 2011.

HUANG, Y-Y.; MORI, S.; KELLY, L. M. Toward a phylogenetic-based Generic Classification of Neotropical Lecythidaceae-I. Status of *Bertholletia*, *Corythophora*, *Eschweilera* and *Lecythis*. *Phytotaxa*, v. 203, p. 85-121, 2015.

HUSSIN, N. M.; MUSE, R.; AHMAD, S.; RAMLI, J.; MAHMOOD, M.; SULAIMAN, M. R.; SHUKOR, M. Y. A.; RAHMAN, M. F. A.; AZIZ, K. N. K. Antifungal activity of extracts and phenolic compounds from *Barringtonia racemosa* L. (Lecythidaceae). *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 12, p. 2835-2842, 2009.

IKUMAWOYI, V.; AGBAJE, E.; AWODELE, O. Antigenotoxic and antioxidante activity of metanol stem bark extract of *Napoleona vogelii* Hook & Planch (Lecythidaceae) in cyclophosphamide-induced genotoxicity. *Journal of Medical Sciences*, v. 5, n. 7, p. 866-874, 2017.

IWASHINA, T.; KOKUBUGATA, G. Flavonoid Properties in the Leaves of *Barringtonia asiatica* (Lecythidaceae). *Bulletin of the National Museum of Nature and Science*, v. 42, n. 1, p. 41-47, 2016.

JUTIVIBOONSUK, A.; ZHANG, H. J.; KONDRATYUK, T. P.; HERUNSALEE, A.; CHAUKUL, W.; PEZZUTO, J. M.; FONG, H. H. S.; BUNYAPRAPHATSARA, N. Isolation and characterization of cancer chemopreventive compounds from *Barringtonia maunwongyathiae*. *Pharmaceutical Biology*, v. 45, n. 3, p. 185-194, 2007.

LAFONT, J. J.; CALLE, E. A.; DURANGO, L. C. Composición Química del Aceite de Almendras producidas por el Árbol Olleto (*Lecythis minor* DC). *Inf Tecnol*, v. 24, p. 59-68, 2013.

MATOS, L. S.; SERRA, A. B. As florestas no meiode vida das famílias do Mosaico de unidades de conservação do Lago de Tucuruí, Pará. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 15, n. 1, p. 48 - 56, 2020.

MORI, S. A família da castanha-do-Pará: símbolo do Rio Negro. In: OLIVEIRA, Alexandre et al. *Florestas do Rio Negro*. São Paulo: Companhia de Letras: Unip, 2001.

MORI, S. A.; KIERNAN, E. A.; SMITH, N. P.; KELLEY, L. M.; HUANG, Y-Y.; PRANCE, G. T.; THIERS, B. Observations on the phytogeography of the Lecythidaceae clade (Brazil nut family). *Phytoneuron*, v. 30, p. 1-85, 2017.

MORI, S. Biologia da polinização em Lecythidaceae. *Acta bot. bras.* v. 1, n. 2, p. 121-124, 1988.

MORI, S. Diversificação e Conservação das Lecythidaceae neotropicais. *Acta bot. bras.* v. 4, n. 1, p. 45-68, 1990.

MORI, S.; PRANCE, G. The "sapucaia" group of *Lecythis* (Lecythidaceae). *Brittonia*, v. 33, n. 1, p. 70-80, 1981.

MORI, S.; TSOU, C. H.; WU, C. C.; CRONHOLM, B.; ANDERBERG, A. A. Evolution of Lecythidaceae with an emphasis on the circumscription of neotropical genera: information from combined *ndhF* and *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany*, v. 94, n. 3, p. 289-301, 2007.

OJINAKA, C. M.; OKPALA, D. C. A Molluscicidal triterpenoid saponin from the fruits of *Napoleonaea* P. Beauv (Lecythidaceae). *J Appl Sci Environ Manage*, v. 16, n. 6, p. 213-216, 2012.

OLIVEIRA, J. P. C.; FERREIRA, E. L. F.; CHAVES, M. H.; MILITÃO, G. C. G.; JÚNIOR, G. M. V.; COSTA, A. M.; PESSOA, C. O.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Chemical constituents of *Lecythis pisonis* and cytotoxic activity. *Rev Bras Farmacogn*, v. 22, n. 5, p. 1140-1144, 2012.

OLIVEIRA, L. A. R.; MACHADO, R. D.; RODRIGUES, A. J. L. Levantamento sobre o uso de plantas medicinais com a terapêutica anticâncer por pacientes da Unidade Oncológica de Anápolis. *Rev Bras Plantas Med*, v. 16, p. 32-40, 2014.

PASA, M. C. Saber local e medicina popular: a etnobotânica em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Bol Mus Para Emílio Goeldi Ciênc Hum*, v. 6, p. 179-196, 2011.

PEREIRA, S. G.; NASCIMENTO JÚNIOR, J. R. S.; LIMA, A. S.; COSTA JUNIOR, L. M.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S. Ação carrapaticida sobre *Rhipicephalus microplus* dos extratos, frações e compostos obtidos da espécie *Lecythis lurida* (Lecythidaceae). *Biotemas*, v. 28, p. 119-130, 2015.

PRANCE, G. T.; KARTAWINATA, E. K. Lecythidaceae. Flora Malesiana - Series 1, *Spermatophyta*, v. 21, p. 1-118, 2013.

ROVIRA, I.; BERKOV, A.; PARKINSON, A.; TAVAKILIAN, G.; MORI, S.; MEURER-GRIMES, B. Antimicrobial activity of neotropical wood and bark extracts. *Pharm Biol*, v. 37, p. 208-215, 1999.

SANTOS, O. V.; CARVALHO JR, R. N.; COSTA, C. E. F.; LANNES, S. C. S. Chemical, chromatographic-functional, thermogravimetric-differential and spectroscopic parameters of the sapucaia oil obtained by different extraction methods. *Ind Crop Prod*, v. 132, p. 487-496, 2019.

SILVA, L. L.; GOMES, B. S.; SOUSA-NETO, B. P.; OLIVEIRA, J. P.; FERREIRA, E. L.; CHAVES, M. H.; OLIVEIRA, F. A. Effects of *Lecythis pisonis* Camb. (Lecythidaceae) in a mouse model of pruritus. *J Ethnopharmacol*, v. 139, n. 1, p. 90-97, 2012.

SILVA, R. M. Constituintes químicos de sementes de Lecythidaceae ocorrentes em Pernambuco e seu potencial econômico. 2014. 152f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SILVA, R. M.; RIBEIRO, R. T. M.; SOUZA, R. J. C.; OLIVEIRA, A. F. M.; SILVA, S. I.; GALLÃO, M. I. Cuticular *n*-alkane in leaves of seven Neotropical species of the family Lecythidaceae: a contribution to chemotaxonomy. *Acta Bot Bras*, v. 31, n. 1, p. 137-140, 2017.

SMITH, N. P.; MORI, S.; PRANCE, G. T. Lecythidaceae A. Rich. *In*: Lista de Espécies da Flora do Brasil Page, 2015.

SOUZA, A. S.; MARGALHO, L.; PRANCE, G. T.; GURGEL, E. S. C.; GOMES, J. I.; CARVALHO, L. T.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V. Conhecendo espécies de



plantas da Amazônia: sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess. – Lecythidaceae).  
*Comunicado técnico 250*: Embrapa, 2014.

TEIXEIRA, G. L.; ÁVILA, S.; SILVEIRA, J. L. M.; RIBANI, M.; RIBANI, R. H. Chemical, thermal and rheological properties and stability of sapucaia (*Lecythis pisonis*) nut oils. *J Therm Anal Calorim*, v. 131, p. 2105-2121, 2018a.

TEIXEIRA, G. L.; GHAZANI, S. M.; CORAZZA, M. L.; MARANGONI, A. G.; RIBANI, R. H. Assessment of subcritical propane, supercritical CO<sub>2</sub> and Soxhlet extraction of oil from sapucaia (*Lecythis pisonis*) nuts. *J Supercrit Fluids*, v. 133, p. 122-132, 2018b.

TER STEEGE, H.; PITMAN, N. C. A.; SABATIER, D.; BARALOTO, C.; SALOMÃO, R. P.; GUEVARA, J. E.; PHILLIPS, O. L.; CASTILHO, C. V.; MAGNUSSON, W. E.; MOLINO, J-F.; MONTEAGUDO, A.; NÚÑEZ VARGAS, P.; MONTERO, J. C.; FELDPAUSCH, T. R.; CORONADO, E. N. H.; KILLEEN, T. J.; MOSTACEDO, B.; VASQUEZ, R.; ASSIS, R. L.; TERBORGH, J.; WITTMANN, F.; ANDRADE, A.; LAURANCE, W. F.; LAURANCE, S. G. W.; MARIMON, B. S.; MARIMON, B-H.; GUIMARÃES VIEIRA, I. C.; AMARAL, I. L.; BRIENEN, R.; CASTELLANOS, H.; CÁRDENAS LÓPEZ, D.; DUIVENVOORDEN, J. F.; MOGOLLÓN, H. F.; MATOS, F. D. A.; DÁVILA, N.; GARCÍA-VILLACORTA, R.; STEVENSON DIAZ, P. R.; COSTA, F.; EMILIO, T.; LEVIS, C.; SCHIETTI, J.; SOUZA, P.; ALONSO, A.; DALLMEIER, F.; MONTOYA, A. J. D.; FERNANDEZ PIEDADE, M. T.; ARAUJO-MURAKAMI, A.; ARROYO, L.; GRIBEL, R.; FINE, P. V. A.; PERES, C. A.; TOLEDO, M.; AYMARD, C. G. A.; BAKER, T. R.; CERÓN, C.; ENGEL, J.; HENKEL, T. W.; MAAS, P.; PETRONELLI, P.; STROPP, J.; ZARTMAN, C. E.; DALY, D.; NEILL, D.; SILVEIRA, M.; PAREDES, M. R.; CHAVE, J.; LIMA FILHO DA, JØRGENSEN, P. M.; FUENTES, A.; SCHÖNGART, J.; CORNEJO VALVERDE, F.; DI FIORE, A.; JIMENEZ, E. M.; PEÑUELA MORA, M. C.; PHILLIPS, J. F.; RIVAS, G.; VAN ANDEL, T. R.; VON HILDEBRAND, P.; HOFFMAN, B.; ZENT, E. L.; MALHI, Y.; PRIETO, A.; RUDAS, A.; RUSCHELL, A. R.; SILVA, N.; VOS, V.; ZENT, S.; OLIVEIRA, A. A.; SCHUTZ, A. C.; GONZALES, T.; TRINDADE NASCIMENTO, M.; RAMIREZ-ANGULO, H.; SIERRA, R.; TIRADO, M.; UMAÑA MEDINA, M. N.; VAN DER HEIJDEN, G.; VELA, C. I. A.; VILANOVA TORRE, E.; VRIESENDORP, C.; WANG, O.; YOUNG, K. R.; BAIDER, C.; BALSLEV, H.; FERREIRA, C.; MESONES, I.; TORRES-LEZAMA, A.; URREGO GIRALDO, L. E.; ZAGT, R.; ALEXIADES, M. N.; HERNANDEZ, L.; HUAMANTUPA-CHUQUIMACO, I.; MILLIKEN, W.; PALACIOS CUENCA, W.; PAULETTO, D.; VALDERRAMA SANDOVAL, E.; VALENZUELA GAMARRA, L.; DEXTER, K. G.; FEELEY, K.; LOPEZ-GONZALEZ, G.; SILMAN, M. R. Hyperdominance in the Amazonian Tree Flora. *Science*, v. 342, p. 1243092-1–1243092-9, 2013.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot J Linn Soc*, v. 141, p. 399–436, 2003.

VALLILO, M. I.; TAVARES, M.; PIMENTEL, S. A.; BADOLATO, E. S. G.; INOMATA, E. I. Caracterização química parcial das sementes de *Lecythis pisonis* Camb. (sapucaia). *Acta Amaz*, v. 28, n. 2, p. 131-140, 1998.

VARGAS, O. M.; DICK, C. W. Diversification History of Neotropical Lecythidaceae, an Ecologically Dominant Tree Family of Amazon Rain Forest. In: RULL, V.; CARNAVAL, A. C. (eds) *Neotropical Diversification: Patterns and Processes*. Springer, Cham., 2020. Cap. 29, p. 791-809.

VIDAL MARTINS, M.; MONTEZANO DE CARVALHO, I. M.; MAGALHÃES CAETANO, M. M.; LOPES TOLEDO, R. C.; AVELAR XAVIER, A.; DE QUEIROZ, J. H. Neuroprotective effect of Sapucaia nuts (*Lecythis pisonis*) on rats fed with high-fat diet. *Nutr Hosp*, v. 33, n. 6, p. 1424-1429, 2016.

WONG, K. C.; TIE, D. Y. Volatile constituents of *Couroupita guianensis* Aubl. flowers. *Journal of Essential Oil Research*, v. 7, n. 2, p. 225-227, 1995.

YANG, S-W.; ZHOU, B. N.; WISSE, J. H.; EVANS, R.; WERFF, H.; MILLER, J. S.; KINGSTON, D. G. I. Three new ellagic acid derivatives from the bark of *Eschweilera coriacea* from the Suriname Rainforest. *Journal of Natural Products*, v. 61, n. 7, p. 901-906, 1998.

#### 4. EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO E ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS

Diferentes classes de metabólitos secundários e atividades biológicas têm sido relatadas para a família Lecythidaceae. No entanto, até o momento, na literatura há poucas informações sobre os constituintes químicos polares presentes na espécie *L. pisonis*. Por isso há a necessidade da realização de mais estudos fitoquímicos com a planta, de forma a contribuir para o conhecimento da composição química da espécie.

##### 4.1. Parte experimental

Os solventes empregados no desenvolvimento desse trabalho foram de grau P.A. e procedência Merck, Synth e Vetec. Nas análises por RMN utilizaram-se solventes deuterados de procedência Cil (Cambridge Isotope Laboratories, Inc).

Nas análises comparativas através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizaram-se cromatofolhas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> e RP-18 F<sub>254</sub> (todas de procedência Merck).

A revelação das cromatoplasmas foram efetuadas através de irradiação com luz na região do ultravioleta em comprimento de onda 254 e 365nm e/ou com reveladores cromogênicos (vanilina sulfúrica, solução alcoólica de cloreto férrico 2% e orcinol sulfúrico).

##### Equipamentos:

- Balança analítica, Adventurer, modelo AR2140.
- Câmara escura com lâmpada de luz ultravioleta (254 e 365 nm), Cienlab.
- Capela de exaustão.
- Centrífuga, Daiki, modelo 80-2B.
- Espectrofotômetro, Shimadzu, modelo IRAffinity-1.
- Espectrofotômetro, Shimadzu, modelo UV-1800.

- Espectrômetro de massas de alta resolução, equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) Bruker Daltonics, modelo LCMS-IT-TOF, HPLC - Shimadzu.
- Espectrômetro de massas CG/MS - QP 5050 Shimadzu.
- Espectrômetro de massas CG/MS 5975C Inert XL EI/CI/MS Agilent Technologies, acoplado ao cromatógrafo a gás 7890A.
- Espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear, Bruker Avance com frequência de 500 MHz (RMN <sup>1</sup>H) e 125 MHz (RMN <sup>13</sup>C).
- Evaporador rotativo, Büchi, modelo 480.
- Liofilizador, Thermo Savant.
- Moinho de facas, modelo Wiley.
- Ultrassom

Reagentes:

- 4-dimetilamino-piridina (DMAP)
- Acetato de etila P.A., Synth e Vetec.
- Acetona P.A., Synth.
- Acetonitrila, grau HPLC, Merck.
- Ácido sulfúrico P.A., Merck.
- Água deuterada, CIL – Cambridge Isotope Laboratories, Inc.
- Alcól *n*-butílico P.A., Synth e Vetec.
- Anidrido acético P.A., Vetec.
- Carvão ativo.
- Celite, Vetec.
- Cloreto férrico hexaidratado, 99%, Vetec.
- Clorofórmio P.A., Synth.
- Diclorometano P.A., Synth.
- Dimetilsufóxido deuterado, CIL – Cambridge Isotope Laboratories, Inc.
- Dimetilsulfóxido P.A., Synth.
- Etanol P.A., Synth.

- Hexano P.A., Synth e Vetec.
- Metanol deuterado, CIL – Cambridge Isotope Laboratories, Inc.
- Metanol P.A., Synth e Vetec.
- Metanol, grau HPLC, Merck.
- Orcinol
- Piridina P.A.. Synth.
- Sulfato de cobre, Vetec.
- Sulfato de sódio anidro, Vetec.
- Vanilina, Synth.

Material de consumo:

- Cromatofolhas de sílica gel 60 GF254, Merck.
- Funil analítico sem ranhura.
- Funil de separação de 500 mL.
- Funil de vidro silanizado
- Kitassato de 500 mL
- Papel de filtro qualitativo de 3 micras.
- Pipetas de Pasteur, vidro.
- Proveta de 10 mL.
- Proveta de 100 mL.
- Resina DIAION HP-20.
- Resina XAD-2, Amberlite.
- Sephadex LH-20, Pharmacia.
- Sílica gel 60G (0,04-0,063 mm; 230-400 mesh ASTM), Vetec.

Soluções reveladoras empregadas nos processos cromatográficos em camada delgada analítica

- Solução de vanilina sulfúrica: dissolver 3 g de vanilina em 135 mL de água e 135 mL de etanol, posteriormente, adicionar lentamente 30 mL de ácido sulfúrico.
- Solução de cloreto férrico: solução etanólica a 2% (m/v).
- Solução de orcinol sulfúrico

#### 4.1.1. Coleta do material vegetal

Os materiais botânicos (folhas e madeira) foram coletados no *campus* da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). A excicata da espécie encontra-se no depositada no herbário da UENF (Centro de Biociências e Biotecnologia), com o código HUENF 5707.

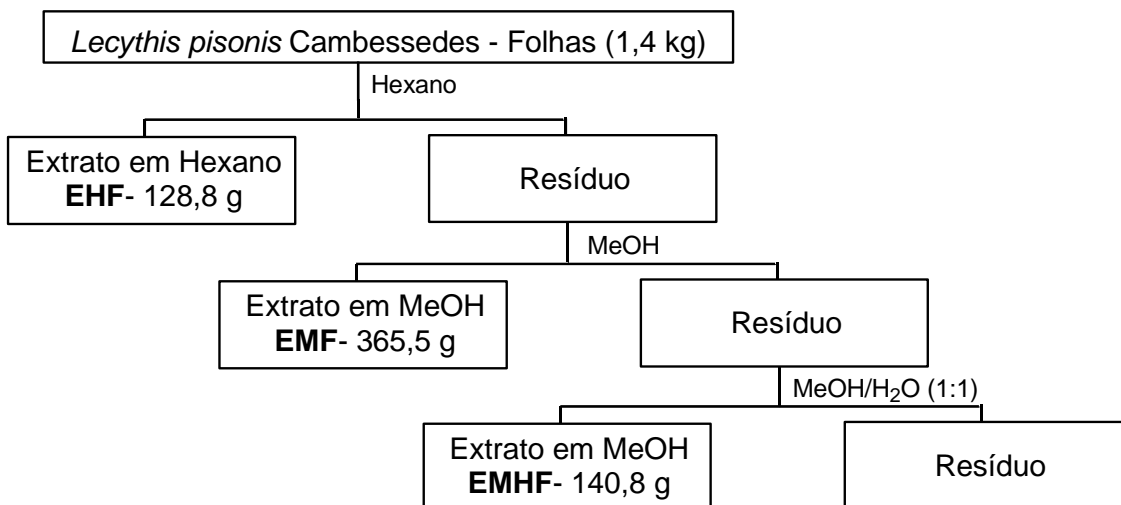
A princípio foi realizada uma triagem dos materiais coletados. Foram descartadas as folhas e madeira contaminadas por insetos ou fungos. Os materiais foram submetidos à secagem à temperatura ambiente.

#### 4.1.2. Preparação dos extratos brutos

##### 4.1.2.1. Folhas

As folhas após secas e moídas, em moinho de facas, foram pesadas obtendo-se uma massa de 1,4 kg. Posteriormente, o material foi submetido à extração a frio por maceração exaustiva em ordem crescente de polaridade empregando os seguintes solventes orgânicos: hexano (EHF), MeOH (EMF) e MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) (EMHF). Após filtração simples e evaporação dos solventes, em evaporador rotatório sob pressão reduzida, os extratos obtidos foram colocados em capela de exaustão até peso constante. Obteve-se 128,8 g de EHF (9,3%), 365,5 g de EMF (26,5%) e 140,8 g de EMHF (10,2%).

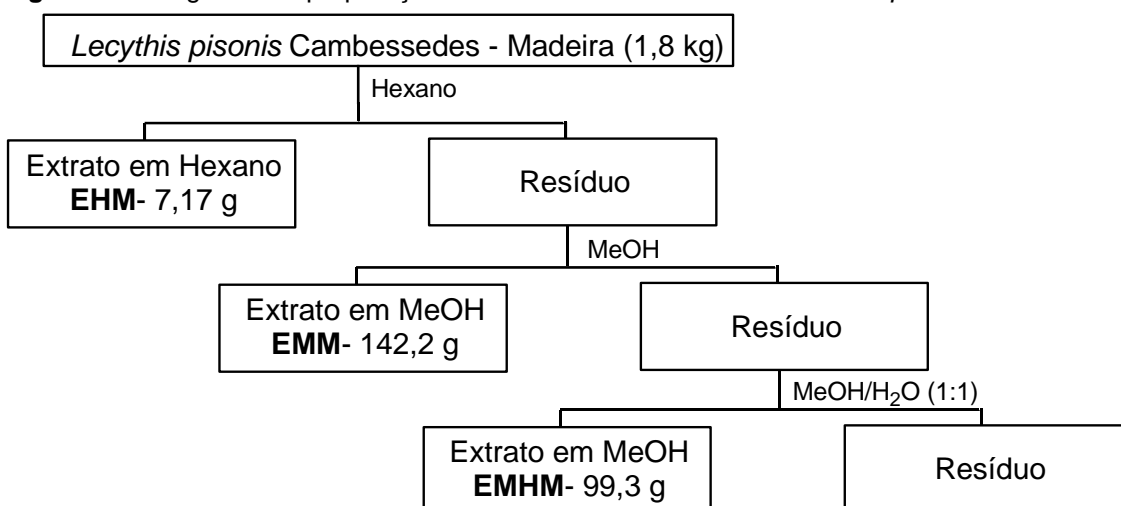
Figura 8. Fluxograma da preparação dos extratos brutos das folhas de *L. pisonis*.



#### 4.1.2.2. Madeira

A madeira (1,8 kg) foi moída, em moinho de facas, e submetida à extração a frio por maceração exaustiva em ordem crescente de polaridade com os solventes hexano (EHM), MeOH (EMM) e MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) (EMHM). Os extratos brutos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida fornecendo 7,2 g de EHM (0,40%), 142,2 g de EMM (8,0%) e 99,3 g de EMHM (5,1%).

Figura 9. Fluxograma da preparação dos extratos brutos da madeira de *L. pisonis*.

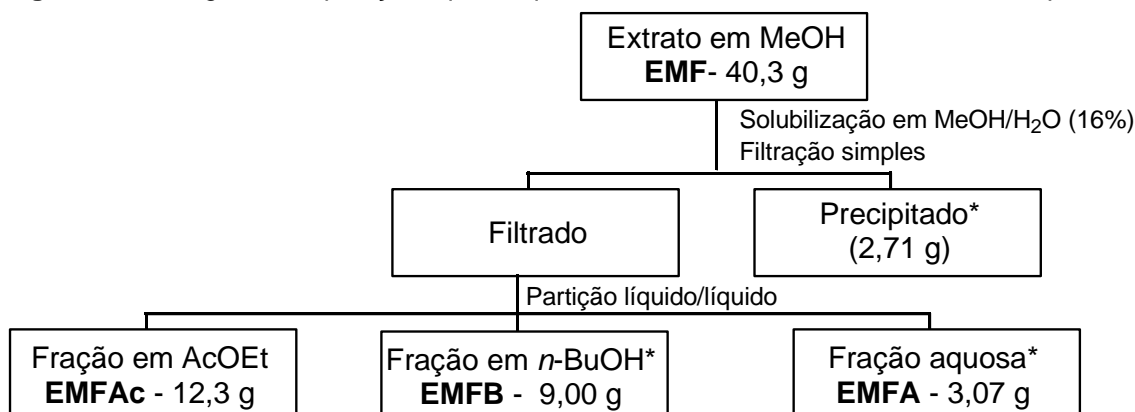


#### 4.1.3. Fracionamento dos extratos brutos e purificação das substâncias

#### 4.1.3.1. Fracionamento do extrato em MeOH das folhas (EMF)

Uma alíquota do extrato (40,3 g) foi solubilizada em uma solução MeOH:H<sub>2</sub>O 16 % v/v, devido à baixa solubilidade da mesma em água. Esse procedimento resultou em um precipitado que foi removido através de filtração simples em papel de filtro. O filtrado foi submetido à partição líquido/líquido com os solventes orgânicos: acetato de etila (AcOEt) e álcool *n*-butílico (*n*-BuOH). As fases em AcOEt e *n*-BuOH foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida. A fração aquosa foi liofilizada. Esse procedimento resultou nas frações em AcOEt (EMFAc – 12,3 g), em *n*-BuOH (EMFB – 9,0 g) e a aquosa (EMFA – 3,07 g).

Figura 10. Fluxograma da partição líquida/líquida do extrato em MeOH das folhas de *L. pisonis*.



\*fração não trabalhada

- Fracionamento da fração em AcOEt (EMFAc)

A fração EMFAc (4,03 g) foi submetida à cromatografia de adsorção em coluna empacotada com resina XAD-2, utilizando-se como eluentes: H<sub>2</sub>O acidificada (com HCl P.A., até pH=2), H<sub>2</sub>O, gradiente de polaridade decrescente da mistura H<sub>2</sub>O/MeOH (5-100% v/v), acetona, AcOEt e diclorometano (DCM). Cada solvente foi recolhido em frascos separados. As frações foram analisadas por meio de CCDA (em sílica gel), e reunidas com base na similaridade do perfil cromatográfico observado, resultando em 7 frações: X-M1 (320,5 mg), X-M2 (306,7 mg), X-M3 (114,5 mg), X-M4 (3,21 g), X-Act (67,2 mg), X-AcOEt (5,4 mg)



e X-DCM (5,1 mg). A fração extraída com água acidificada foi descartada devido a contaminação microbiana.

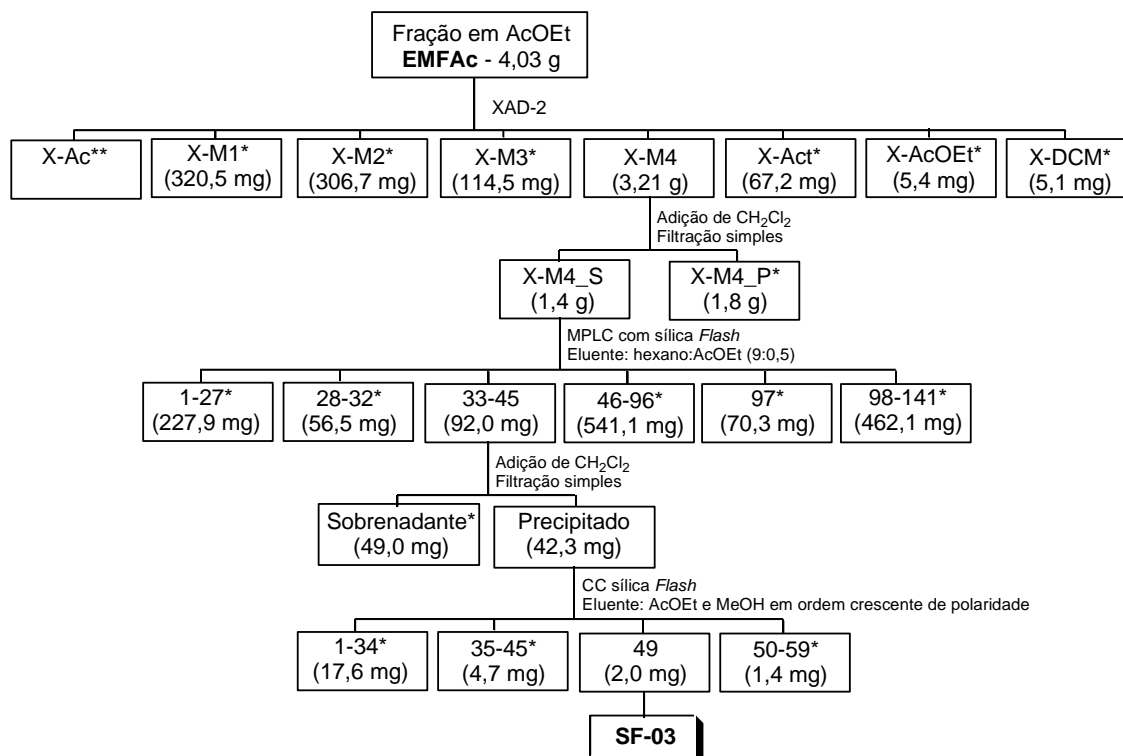
A fração X-M4 foi ressuspensa em diclorometano. Este procedimento resultou na solubilização de uma parte da amostra. A fração solúvel (X-M4\_S) foi separada do precipitado (X-M4\_P – 1,8 g) através de filtração simples em papel de filtro. A fração solúvel após evaporação do solvente resultou em uma massa de 1,4 g. Esta fração foi submetida à Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC). No procedimento, a amostra foi dissolvida em 5,0 mL da mistura de solventes orgânicos hexano:AcOEt (9:0,5), que também foi empregado na eluição da amostra.

Utilizou-se uma coluna de vidro Büchi (15 mm x 230 mm) empacotada com sílica gel tipo *Flash* (230 – 400 mesh). A amostra foi injetada na coluna utilizando-se um *loop* de 5 mL de capacidade. A eluição ocorreu com fluxo de 8 mL/min durante 1h:40min. Usou-se detector de UV com comprimento de onda ( $\lambda$ ) a 280 nm. Esse procedimento resultou em 141 frações de 10 mL que foram reunidas por semelhança de fator de retenção em CCDA (em sílica gel), constituindo 6 frações.

A tentativa de solubilização da fração 33-45 (92,0 mg) em diclorometano resultou na formação de um precipitado, que foi separado por meio de filtração simples em papel de filtro. O precipitado (42,3 mg) foi submetido a cromatografia em coluna (CC) utilizando sílica gel tipo *Flash* (230 – 400 mesh) eluída com AcOEt e MeOH em um gradiente crescente de polaridade. Esse procedimento resultou em 59 frações, que foram reunidas com base na análise por CCDA (em sílica gel). A sub-fração 49 (2,0 mg), quando analisada em CCDA [eluente: AcOEt/ácido fórmico/ácido acético/etil metil cetona/H<sub>2</sub>O (50:3:7:30:10)], apresentou uma mancha majoritária de coloração azulada ao ser revelada com vanilina sulfúrica. A sub-fração 49 foi codificada como **SF-03**.

A Figura 11 (p. 46) apresenta de forma resumida os procedimentos cromatográficos empregados no fracionamento da fração em AcOEt do extrato metanólico das folhas.

**Figura 11.** Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração em AcOEt do extrato metanólico das folhas.



\*fração não trabalhada

\*\*fração descartada por contaminação microbiana

#### 4.1.3.2. Fracionamento do extrato em hexano da madeira (EHM)

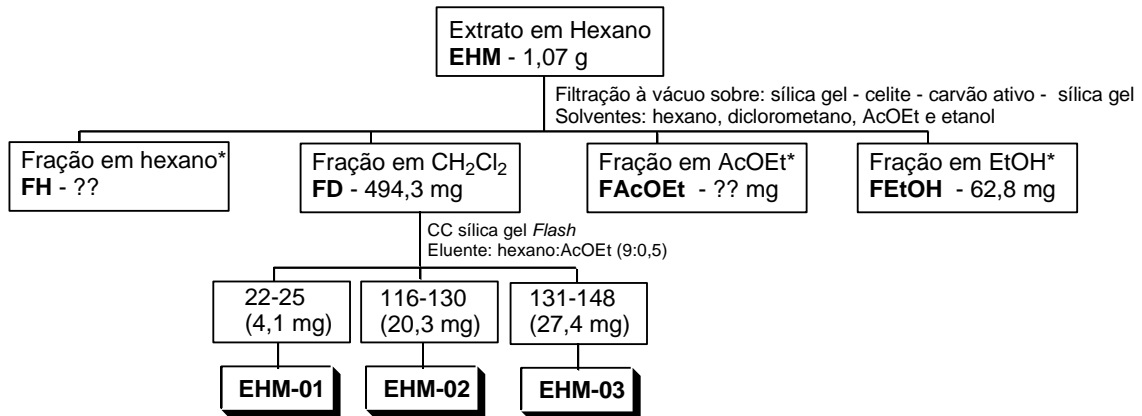
Uma alíquota de 1,07 g do extrato em hexano da madeira foi submetida a uma filtração à vácuo sobre uma mistura de sílica gel – celite – carvão ativo – sílica gel, utilizando como eluyente os solventes orgânicos hexano, diclorometano, AcOEt e etanol. As frações foram coletadas e os solventes removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Esse procedimento resultou em 4 frações: fração em hexano (FH - ??), em diclorometano (FD – 494,3 mg), em AcOEt (FAcOEt - ??) e em etanol (FEtOH – 62,8 mg).

A fração FH foi analisada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM) e apresentou grande quantidade de hidrocarbonetos. Por esta razão esta fração não foi trabalhada.

A fração FD, ao ser analisada por CG/EM revelou a presença de ácidos graxos, ésteres de cadeia longa, triterpenos e esteroides. Essa fração foi submetida a CC com sílica gel tipo *Flash* (230 – 400 *mesh*) utilizando como

eluente o sistema hexano:AcOEt (9:0,5), resultando em 167 frações, que foram analisadas através de CCDA (em sílica gel) e reunidas em 18 sub-frações. As sub-frações 22-25 (4,1 mg), 116-130 (20,3 mg) e 131-148 (27,4 mg) apresentaram grau de pureza adequado, e foram codificadas como **EHM-01**, **EHM-02** e **EHM-03**, respectivamente.

Figura 12. Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato em hexano da madeira.



\*fração não trabalhada

#### 4.1.3.3. Fracionamento do extrato em MeOH da madeira (EMM)

Durante a concentração do extrato metanólico utilizando o evaporador rotatório foi observado o aparecimento de um precipitado branco. Na tentativa de se obter uma maior quantidade do precipitado, foi adicionado MeOH ao resíduo da evaporação. A solução foi submetida à centrifugação por 20 min, com velocidade de 2000 rpm. Após o procedimento, a solução foi submetida à filtração simples em papel de filtro fornecendo a fração solúvel em MeOH [sobrenadante – F1 (135,6 g)] e a insolúvel [precipitado – F2 (6,533 g)].

- Fracionamento da fração insolúvel em MeOH (F2)

A uma alíquota de 1,0321 g da fração F2 foram adicionados 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada e deixada no ultrassom por 2h. Posteriormente, a solução foi deixada em repouso sob refrigeração por 24h. Em seguida, separou-se o

sobrenadante (F2A) do precipitado (F2B) por meio de filtração simples em papel de filtro.

Ao sobrenadante (F2A) foi adicionado acetona até a formação de um precipitado (F2A\_P – 100,5 mg), que foi separado do sobrenadante (F2A\_S) por meio de filtração simples em papel de filtro. Durante a concentração da fração F2A\_S foi observada a formação de um sólido amarelado, que foi separado do sobrenadante por meio de filtração simples em papel de filtro. Resultando, após evaporação do solvente, em 268,3 mg do sobrenadante (F2A\_S1) e 158,5 mg do precipitado (F2A\_S2).

A fração F2A\_S2 foi solubilizada em H<sub>2</sub>O, centrifugada e filtrada, fornecendo duas frações: fração insolúvel (30,5 mg) e solúvel em água (134,9 mg). Essas frações foram codificadas como **SM-04a** e **SM-04b**, respectivamente.

Ao adicionar MeOH à fração F2A\_S1 observou-se a formação de um precipitado que foi separado do sobrenadante por meio de filtração simples em papel de filtro. Após evaporação, esse procedimento resultou em 106,8 mg de fração solúvel em MeOH (sobrenadante) e 139,9 mg de insolúvel em MeOH (precipitado). Essas frações, ao serem analisadas em CCDA [em RP-18, eluídas com o sistema MeOH:H<sub>2</sub>O (6,5:3,5), revelação com FeCl<sub>3</sub>], apresentaram grau de pureza adequado. A fração solúvel foi codificada como **SM-05a** e a insolúvel como **SM-05b**.

O precipitado F2A\_P (100,5 mg) foi submetido a uma reação de acetilação.

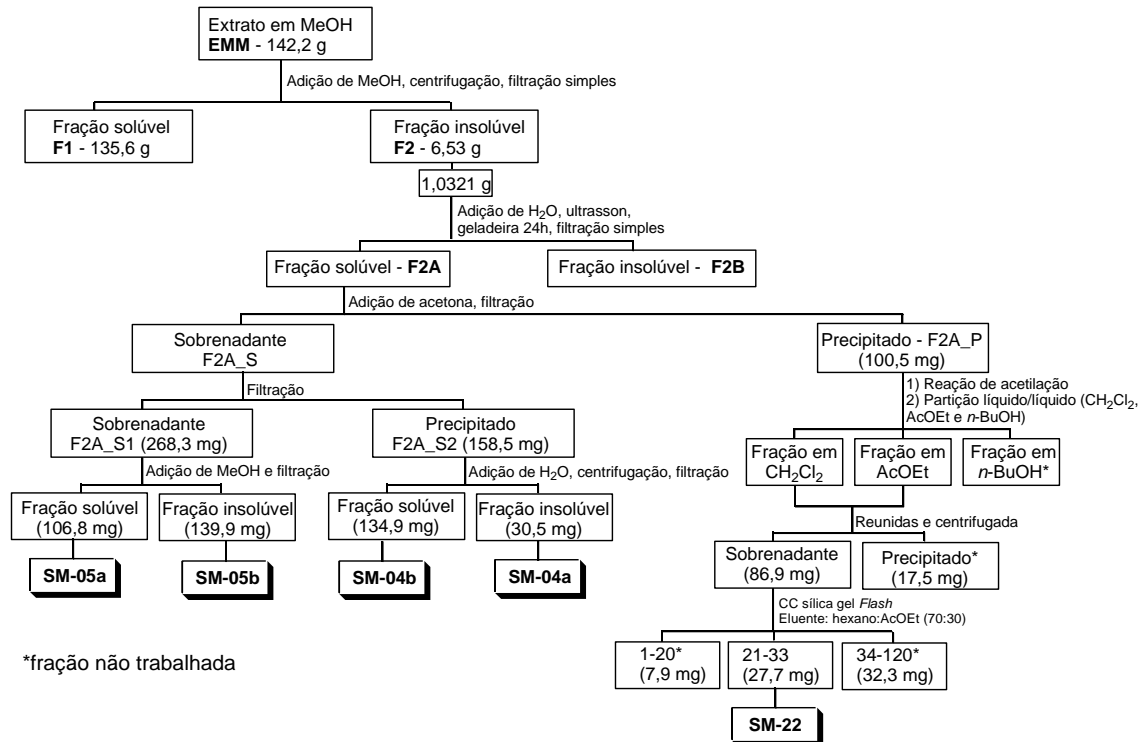
- **Reação de acetilação do precipitado F2A\_P**

Ao frasco contendo a amostra foram adicionados 10 mL de uma mistura de anidrido acético e piridina (9:1). Em seguida, foi adicionada uma pequena quantidade de 4-dimetilamino-piridina (DMAP) ao frasco e aqueceu-se levemente a mistura reacional (50 °C). Após o aquecimento, a mistura foi deixada em repouso por 48h. Decorrido o tempo, foi adicionada água destilada gelada a mistura, e posteriormente feita uma partição líquido/líquido, em funil de separação, com os solventes orgânicos diclorometano, AcOEt e *n*-BuOH. O processo de extração foi realizado três vezes com cada solvente. As fases orgânicas foram lavadas com solução aquosa de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>), até

remoção dos resíduos de piridina. E depois foram lavadas com água destilada. Em seguida, foi adicionada as fases orgânicas sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para retirar resquícios de água. Depois as frações foram filtradas em papel de filtro. As soluções resultantes tiveram seus volumes reduzidos em rota evaporador e o resíduo foi deixado na capela de exaustão até peso constante.

O procedimento de acetilação do precipitado F2A\_P resultou nas frações em diclorometano, AcOEt e *n*-BuOH. Após análise em CCDA (em sílica gel), as frações em diclorometano e em AcOEt foram reunidas. Após repouso, foi observada nessa fração a formação de um precipitado branco (17,5 mg), que foi separado do sobrenadante (86,9 mg) por meio de filtração simples. Esse sobrenadante foi submetido a CC com sílica gem tipo *Flash* utilizando como fase móvel o sistema hexano:AcOEt (70:30), resultando em 120 frações, que foram analisadas através de CCDA (em sílica gel) e reunidas em 4 sub-frações. A sub-fração 21-33 (27,7 mg) apresentou grau de pureza adequado, e foi codificada como **SM-22**.

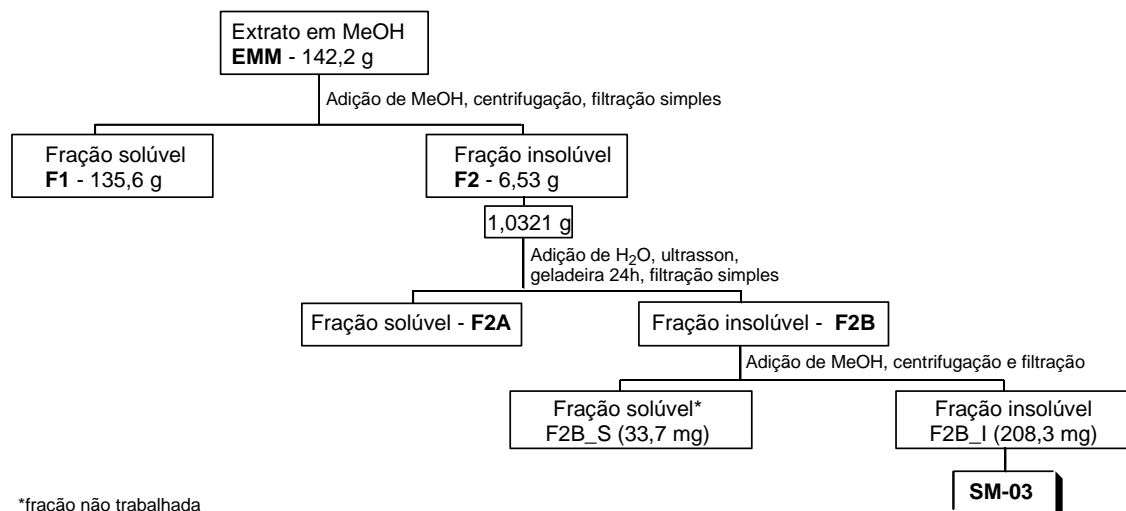
**Figura 13.** Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração solúvel em água (F2A) do extrato em MeOH da madeira.



À fração insolúvel em água (F2B), foi adicionado MeOH e submeteu a solução à centrifugação por 20 min. Esse procedimento forneceu uma fração solúvel em MeOH (F2B\_S - 33,7 mg) e outra insolúvel (F2B\_I - 208,3 mg), que foram separadas por filtração. A fração F2B\_I foi submetida à análise em CCDA [em RP-18, eluída com o sistema MeOH:H<sub>2</sub>O (6,5:3,5), revelação com FeCl<sub>3</sub>] e verificou que a amostra possui um grau de pureza adequado. A amostra foi codificada como **SM-03**.

O fracionamento da fração insolúvel (F2B) do extrato em MeOH da madeira pode ser visualizado na Figura 14.

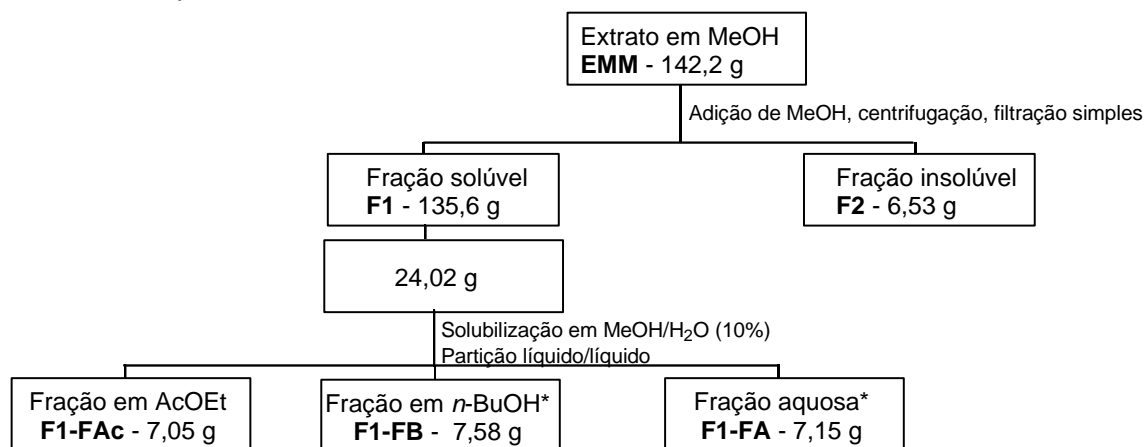
**Figura 14.** Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração insolúvel em água (F2B) do extrato em MeOH da madeira.



- Fracionamento da fração solúvel (F1) do extrato em MeOH da madeira

Uma alíquota da fração F1 (24,02 g) foi solubilizada em uma solução MeOH:H<sub>2</sub>O 10 % v/v, devido à baixa solubilidade da mesma em água. Em seguida, a amostra foi submetida à partição líquido/líquido com os solventes orgânicos AcOEt e *n*-BuOH. As soluções foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Esse procedimento resultou em 7,05 g da fração em AcOEt (F1-FAc), 7,58 g da fração em *n*-BuOH (F1-FB) e, após liofilização, 7,15 g da fração aquosa (F1-FA). O fracionamento da fração solúvel (F1) do extrato em MeOH da madeira pode ser visualizado na Figura 15.

**Figura 15.** Fluxograma da partição líquido/líquida da fração solúvel (F1) do extrato em MeOH da madeira de *L. pisonis*.



\*fração não trabalhada

- Fracionamento da fração em AcOEt (F1-FAc)

Durante a concentração da fração F1-FAc, em evaporador rotatório, foi observada a formação de um precipitado branco. Desta forma, após a evaporação do solvente, acrescentou-se MeOH e centrifugou a amostra por 20 min. Após centrifugação, a fração foi filtrada em papel de filtro fornecendo uma fração solúvel em MeOH (F1-FAc\_S) e outra insolúvel (F1-FAc\_I - 102,0 mg).

A fração F1-FAc\_S foi solubilizada em MeOH e, submetida a precipitação forçada por meio da adição de AcOEt. A solução foi filtrada em papel de filtro, fornecendo 5,38 g do sobrenadante (F1-FAc\_S1) e 684,5 mg do precipitado (F1-FAc\_S2).

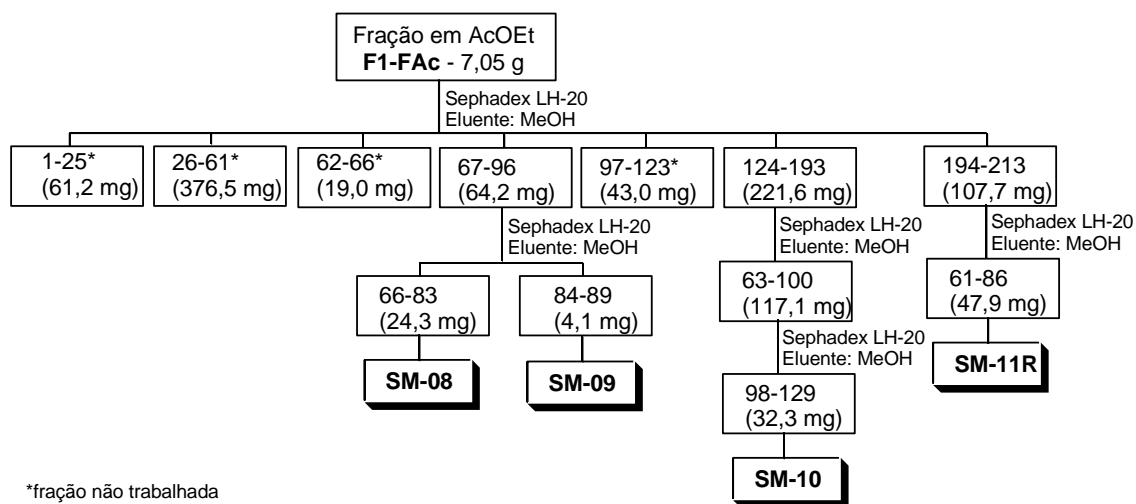
Uma alíquota de 1,01 g da fração F1-FAc\_S1 foi submetida a filtração em Sephadex LH-20, utilizando MeOH como eluente. Este procedimento resultou em 213 frações, que foram analisadas por meio de CCDA (em sílica gel) e reunidas em 7 sub-frações: 1-25 (61,2 mg), 26-61 (376,5 mg), 62-66 (19,0 mg), 67-96 (64,2 mg), 97-123 (43,0 mg), 124-193 (221,6 mg) e 194-213 (107,7 mg).

A sub-fração 67-96 (64,2 mg) foi submetida ao mesmo processo cromatográfico da fração anterior, produzindo um total de 139 frações. As frações foram analisadas por meio de CCDA (em sílica gel) e reunidas em 5 sub-frações. As sub-frações 66-83 (24,3 mg) e 84-89 (4,1 mg) foram analisadas em CCDA e apresentaram grau de pureza adequado, sendo codificadas como **SM-08** e **SM-09**, respectivamente.

A sub-fração 124-193 (215,5 mg) foi submetida a filtração em Sephadex LH-20 eluída com MeOH, resultando em 128 frações que foram reunidas 5 sub-frações após análise em CCDA (em sílica gel). A sub-fração 63-100 (117,1 mg) foi submetida ao mesmo procedimento cromatográfico que a fração anterior, resultando em 129 sub-frações que, após análise em CCDA (em sílica gel), foram reunidas em 3 sub-frações. A sub-fração 98-129 (32,3 mg) foi analisada em CCDA e apresentou grau de pureza adequado, sendo codificada como **SM-10**.

A sub-fração 194-213 (107,7 mg) foi codificada como **SM-11** e enviada para análise em LC-MS e IV. Ao observar os espectros de LC-MS da amostra, foi verificada a presença de 6 picos. Desta forma, a amostra foi submetida a outra filtração em Sephadex LH-20 utilizando MeOH como eluente, resultando em 124 frações que foram reunidas em 8 sub-frações. A sub-fração 61-86 (47,9 mg) foi analisada em CCDA (em sílica gel) e verificou-se que a amostra possui um grau de pureza adequado. A amostra foi codificada como **SM-11R**.

Figura 16. Fluxograma resumido do fracionamento dos extratos da madeira de *L. pisonis*.



\*fração não trabalhada

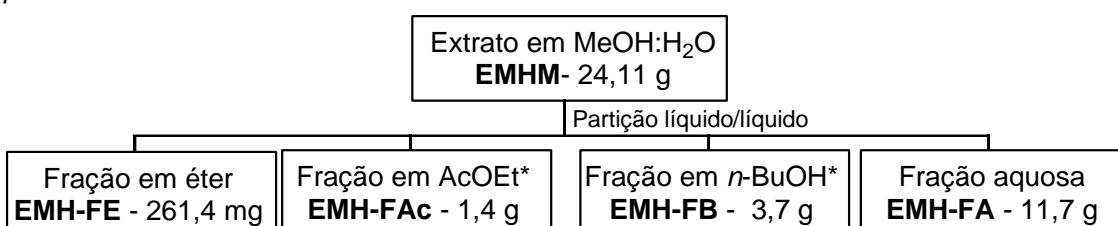
#### 4.1.3.4. Fracionamento do extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O da madeira (EMHM)

Uma alíquota do extrato (24,11 g) foi solubilizada em uma solução MeOH:H<sub>2</sub>O 11 % v/v, devido à baixa solubilidade da mesma em água. A solução



foi submetida à partição líquido/líquido com os solventes orgânicos: éter etílico, AcOEt e *n*-BuOH. As fases em éter etílico, AcOEt e *n*-BuOH foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida. A fração aquosa foi liofilizada. Esse procedimento resultou nas frações em éter etílico (EMH-FE – 261,4 mg), AcOEt (EMH-FAc – 1,4 g), em *n*-BuOH (EMH-FB – 3,7 g) e a aquosa (EMH-FA – 11,7 g).

**Figura 17.** Fluxograma da partição líquida/líquida do extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O da madeira de *L. pisonis*.



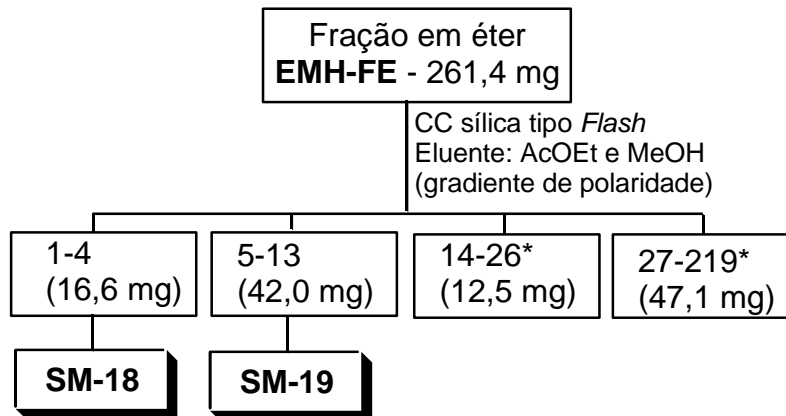
\*fração não trabalhada

- Fracionamento da fração em éter etílico (EMH-FE)

Ao adicionar MeOH à fração EMH-FE foi observada a formação de uma parte insolúvel. A amostra foi submetida à centrifugação e, posteriormente filtrada. Esse procedimento forneceu uma fração solúvel em MeOH (F3 - 185 mg) e outra insolúvel (F4 – 59,5 mg).

A fração solúvel (F3) foi submetida a CC com sílica tipo *Flash* usando como fase móvel AcOEt e MeOH em um gradiente crescente de polaridade. Esse procedimento resultou em 219 frações, que foram reunidas em 4 sub-frações, após análise por CCDA (em sílica gel). As sub-frações 1-4 (16,6 mg) e 5-13 (42,0 mg), quando analisada em CCDA, apresentaram grau de pureza satisfatório e foram codificadas como **SM-18** e **SM-19**, respectivamente.

**Figura 18.** Fluxograma do fracionamento da fração em éter etílico (EMH-FE) do extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O da madeira.



\*fração não trabalhada

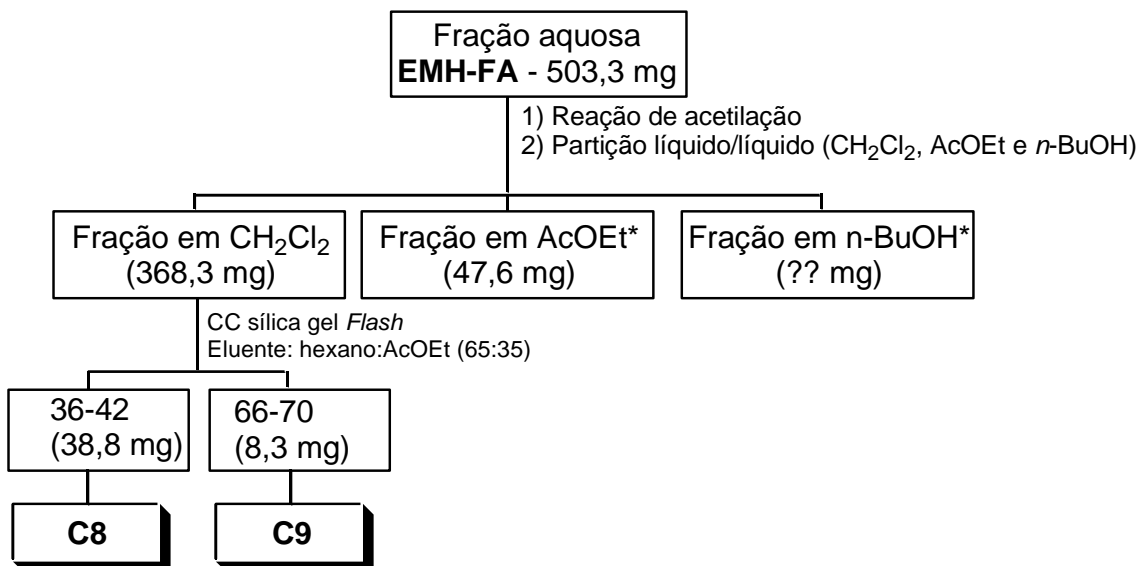
- Fracionamento da fração aquosa (EMH-FA)

Uma alíquota da fração aquosa (503,3 mg) foi submetida a reação de acetilação (metodologia descrita na p. 48), a fim de facilitar a solubilidade da amostra. O procedimento de acetilação da fração EMH-FA resultou nas frações em diclorometano (368,3 mg), AcOEt (47,6 mg) e *n*-BuOH (?? mg).

As frações em diclorometano e AcOEt foram analisadas por CG/EM e verificou que ambas apresentavam a mesma composição química (mistura de açúcares e inosítois acetilados). A fração em BuOH foi analisada em CCDA (sílica gel) e observou tratar de uma amostra muito complexa, por isso a fração não foi trabalhada.

A fração em diclorometano (368,3 mg) foi submetido a CC com sílica gem tipo *Flash* utilizando como fase móvel o sistema hexano:AcOEt (65:35), resultando em 194 frações, que foram analisadas através de CCDA (em sílica gel) e reunidas em 15 sub-frações. As sub-frações 36-42 (38,8 mg) e 66-70 (8,3 mg) apresentaram grau de pureza adequado, e foram codificadas como **C8** e **C9**.

**Figura 18.** Fluxograma do fracionamento da fração aquosa (EMH-FA) do extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O da madeira.



\*fração não trabalhada

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Constituintes químicos isolados e/ou identificados na espécie *L. pisonis*

O estudo fitoquímico das folhas e madeira de um espécime de *L. pisonis* foi realizado empregando-se técnicas cromatográficas clássicas e modernas (cromatografia de adsorção em coluna, de partição, de exclusão, de precipitação e cromatografia líquida de média pressão - MPLC). A elucidação estrutural das substâncias foi realizada aplicando-se técnicas espectrométricas como IV/Vis, CG/EM, LC-MS, ESI-MS e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Nesse trabalho foram isoladas e/ou identificadas X substâncias, sendo: x triterpenos, 1 ciclitol, x açúcares, x ácidos fenólicos e derivados, x taninos hidrolisáveis.

#### 5.1.1. Substâncias identificadas no extrato em metanol das folhas de *L. pisonis*

O fracionamento do extrato em MeOH das folhas resultou em duas frações codificadas como SF-02 e SF-03. **A fração SF\_02 ainda não foi elucidada, pois falta realizar a análise de massas de alta resolução da mesma e o equipamento estava inoperante.**

##### 5.1.1.1. Determinação estrutural da amostra SF-03

A fração SF-03 foi obtida a partir do fracionamento da fração em AcOEt (EMFAC) (item 4.1.3.1, p. 44). A amostra apresentou-se como um sólido branco e solúvel em MeOH. Ao ser analisada por meio de CCDA (em sílica gel) utilizando como eluente o sistema AcOEt/ácido fórmico/ácido acético/etil metil cetona/H<sub>2</sub>O (50:3:7:30:10) e revelação com vanilina sulfúrica, foi possível observar a presença de 1 mancha majoritária de coloração azul. Sendo assim, a fração foi submetida à análise em RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

A análise dos dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOD) obtidos para a fração SF-03, revelou a presença de três sinais característicos de

hidrogênios de carbonos carbinólicos ( $\delta_H$  3,0 a 4,0 ppm), um sinal de hidrogênio olefínico, sete sinais de grupos metílicos, entre outros (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). O espectro pode ser visualizado na Figura 20 (p. 61).

Observaram-se sete singletos (s) correspondentes a sinais de hidrogênios metílicos ( $\text{CH}_3$ ) em  $\delta_H$  1,01 (H-23),  $\delta_H$  0,82 (H-24),  $\delta_H$  0,79 (H-25),  $\delta_H$  1,00 (H-26),  $\delta_H$  1,17 (H-27), 1,01 (H-28) e  $\delta_H$  0,96 ppm (H-30). Também foi possível verificar a presença de um dubleto (d) em  $\delta_H$  2,92 ( $J = 9,6$  Hz, H3) e um multipletto (m) em  $\delta_H$  3,62 ppm (H-2) correspondentes a hidrogênio carbinólico em triterpenos. Verificou-se a presença de um tripleto (t) em  $\delta_H$  5,26 ppm ( $J = 3,7$  Hz, H12), característico de hidrogênio olefínico e um sinal em  $\delta_H$  2,85 ppm (m, H18), típico de hidrogênio alílico. A ausência de hidrogênio em C-20, permite sugerir uma estrutura triterpênica com esqueleto oleano.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, MeOD) da fração SF-03 exibiu sinais referentes a 28 átomos de carbono, cujos deslocamentos químicos variaram de  $\delta_C$  182,0 – 17,2 ppm. O grau de hidrogenação destes, foi determinada por meio da análise do espectro APT (Figura 21, p. 61), sendo 7 sinais de carbonos metílicos, 8 carbonos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), 7 carbonos metínicos (CH) e 8 carbonos quartenários (C).

Os sinais em  $\delta_C$  123,6 e 145,5 ppm são típicos de carbonos olefínicos e foram atribuídos ao C-12 e C-13, respectivamente, de estrutura triterpênica com esqueleto oleano. A presença do grupo carboxílico foi indicada pelo sinal  $\delta_C$  182,0 ppm, referente a carbonila em C-28. Foram observados três sinais referentes a carbonos carbinólicos,  $\delta_C$  69,6, 80,2 e 84,6 ppm, que foram atribuídos a C-2, C-19 e C-3, respectivamente.

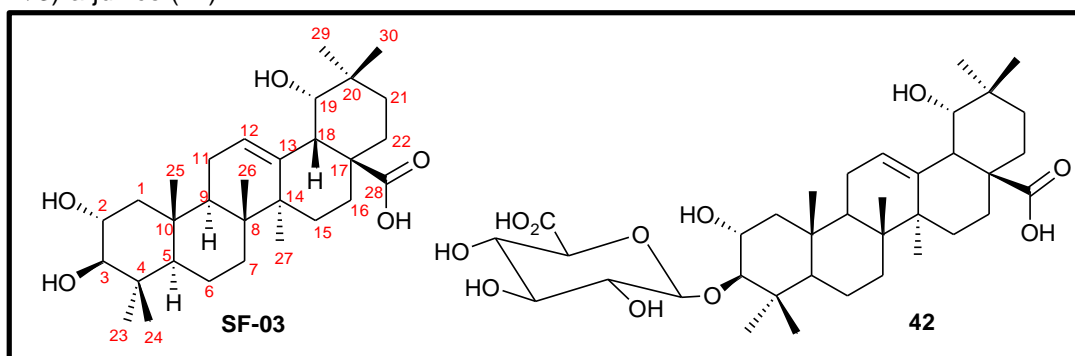
A partir da análise do espectro de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMQC) (Figura 22, p. 62) foi possível inferir a ligação entre os hidrogênios e carbonos carbinólicos. Observou-se correlação direta entre o C-2 ( $\delta_C$  69,6 ppm) e H-2 ( $\delta_H$  3,62 ppm), C-3 ( $\delta_C$  84,6 ppm) e H-3 ( $\delta_H$  2,92 ppm) e C-19 ( $\delta_C$  80,2 ppm) e H-19 ( $\delta_H$  3,33 ppm). Só foi possível atribuir o valor de H-19 por meio da análise do espectro de HMQC, uma vez que o sinal de H-19 está sobreposto com o sinal do solvente quando analisado o espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

A correlação dos carbonos e hidrogênios ligados a duas ou três ligações foi feita a partir da análise do espectro HMBC (Figura 23, p. 62). Foi possível observar correlação do sinal  $\delta_C$  69,6 ppm (C-2) com  $\delta_H$  2,92 (H-3) e  $\delta_H$  1,94 ppm (H-1),  $\delta_C$  84,6 (C-3) e 56,8 ppm (C-5) com  $\delta_H$  1,94 (H-1), 1,01 (H-23) e 0,82 ppm (H-24),  $\delta_C$  40,6 (C-4) e 29,4 ppm (C-23) com  $\delta_H$  2,92 ppm (H-3),  $\delta_C$  145,5 ppm (C-13) com  $\delta_H$  2,85 (H-18) e  $\delta_H$  1,17 ppm (H-17),  $\delta_C$  42,8 ppm (C-18) com  $\delta_H$  5,26 ppm (H-12) e  $\delta_C$  80,2 ppm (C-19) com  $\delta_H$  1,01 (H-29) e  $\delta_H$  0,96 ppm (H-30).

Desta forma, com base nas informações espectrais obtidas, aliada à comparação com dados espectrométricos descritos na literatura (Tabela 1) foi possível identificar o constituinte majoritário de SF-03 como o ácido arjúnico (Figura 24) (DUARTE et al., 2015; BRANDÃO et al., 2013).

O triterpeno ácido arjúnico corresponde a aglicona da saponina, inédita na época, isolada pelo nosso grupo de pesquisa (DUARTE et al., 2015). Sendo este, o primeiro relato dessa substância na espécie e no gênero *Lecythis*.

**Figura 24.** Estrutura do ácido arjúnico (SF-03) e da saponina ácido-3-O- $\beta$ -D-glicuronopiranosil-(1'→3)-arjúnico (42).



**Tabela 1.** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz) da fração SF-03.

C	Tipo	SF-03				Ácido arjúnico*	
		$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_c$	$\delta_H$
1	CH <sub>2</sub>	48,2	1,94 (m)	-	-	47,1	-
2	CH	69,6	3,62 (m)	H3; H1	-	67,2	3,4 (bl)
3	CH	84,6	2,92 (d, J = 9,6 Hz)	-	H1; H23; H24	82,3	2,74 (d, J = 8,0 Hz)
4	C	40,6	-	H3	-	38,9	-
5	CH	56,8	0,85 (m)	-	H1; H23; H24	54,9	-
6	CH <sub>2</sub>	19,7	1,5 (m)	-	-	18,1	-
7	CH <sub>2</sub>	31,8	-	-	-	32,4	-
8	C	40,6	-	-	-	45,4	-
9	CH	48,2	-	-	-	47,3	-
10	C	39,4	-	-	-	46,7	-
11	CH <sub>2</sub>	24,2	-	-	-	23,2	-
12	CH	123,6	5,26 (t, J = 3,7 Hz)	-	-	122,2	5,23 (m)
13	C	145,5	-	H18	H27	143,5	-
14	C	43,1	-	-	-	41,4	-
15	CH <sub>2</sub>	28,9	-	-	-	28,4	-
16	CH <sub>2</sub>	24,8	-	-	-	24,1	-
17	C	47,7	-	-	-	44,7	-
18	CH	42,8	2,85 (m)	-	H12	43,2	2,92 (bl)
19	CH	80,2	3,33 (d, J = 2,6 Hz)	-	H29; H30	80,1	3,11 (dd, J = 8,0 e 4,0 Hz)
20	C	35,0	-	-	-	37,8	-
21	CH <sub>2</sub>	28,9	-	-	-	27,9	-
22	CH <sub>2</sub>	33,9	0,92 (s)	-	-	34,9	-
23	CH <sub>3</sub>	29,4	1,01 (s)	-	H3	28,8	-
24	CH <sub>3</sub>	17,6	0,82 (s)	-	H3	17,0	-
25	CH <sub>3</sub>	17,2	0,79 (s)	-	-	16,2	-
26	CH <sub>3</sub>	17,9	1,00 (s)	-	-	16,9	-
27	CH <sub>3</sub>	26,6	1,17 (s)	-	-	28,1	-
28	C	182,0	-	-	-	179,2	-
29	CH <sub>3</sub>	29,4	1,01 (s)	-	-	24,5	-
30	CH <sub>3</sub>	24,1	0,96 (s)	-	-	24,1	-

**Legenda:** SF-03 = dados obtidos no presente trabalho (MeOD). **d** dubleto; **dd** dubleto duplo; **m** multipleteo; **s** singleteo; **t** tripleteo; **J** constante de acoplamento, unidade Hertz.

Fonte: \*BRANDÃO et al., 2013.

Figura 20. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para SF-03 (500 MHz, MeOD).

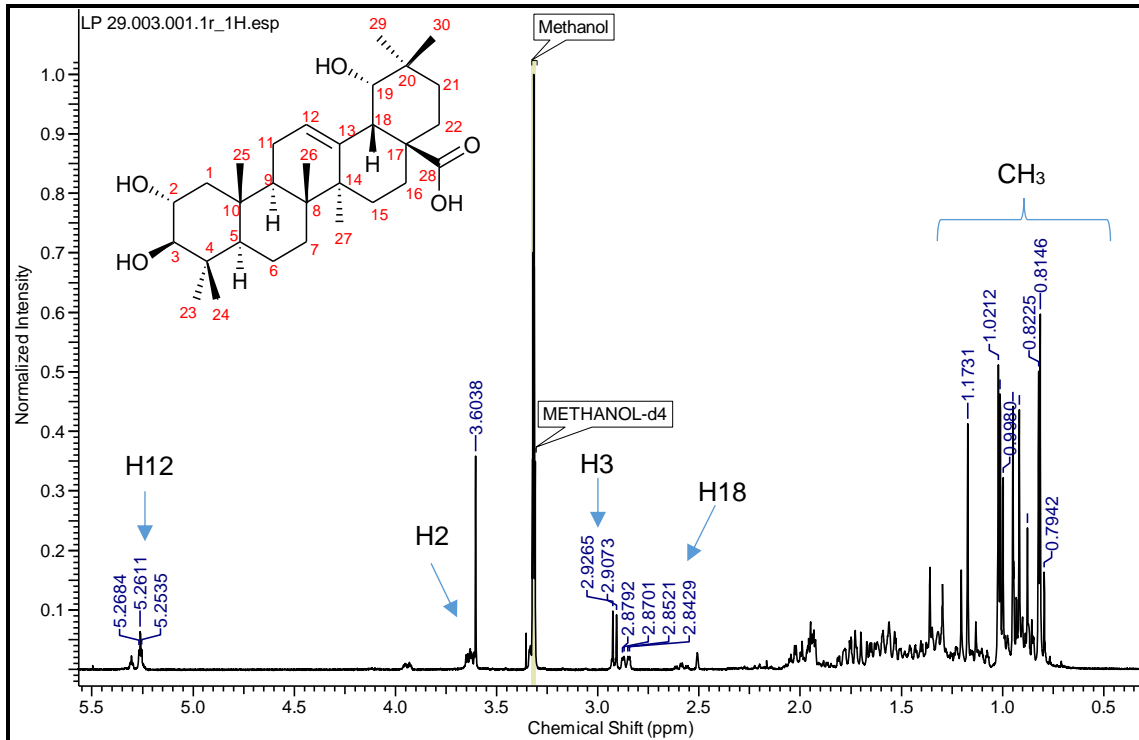


Figura 21. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para SF-03 (125 MHz, MeOD).

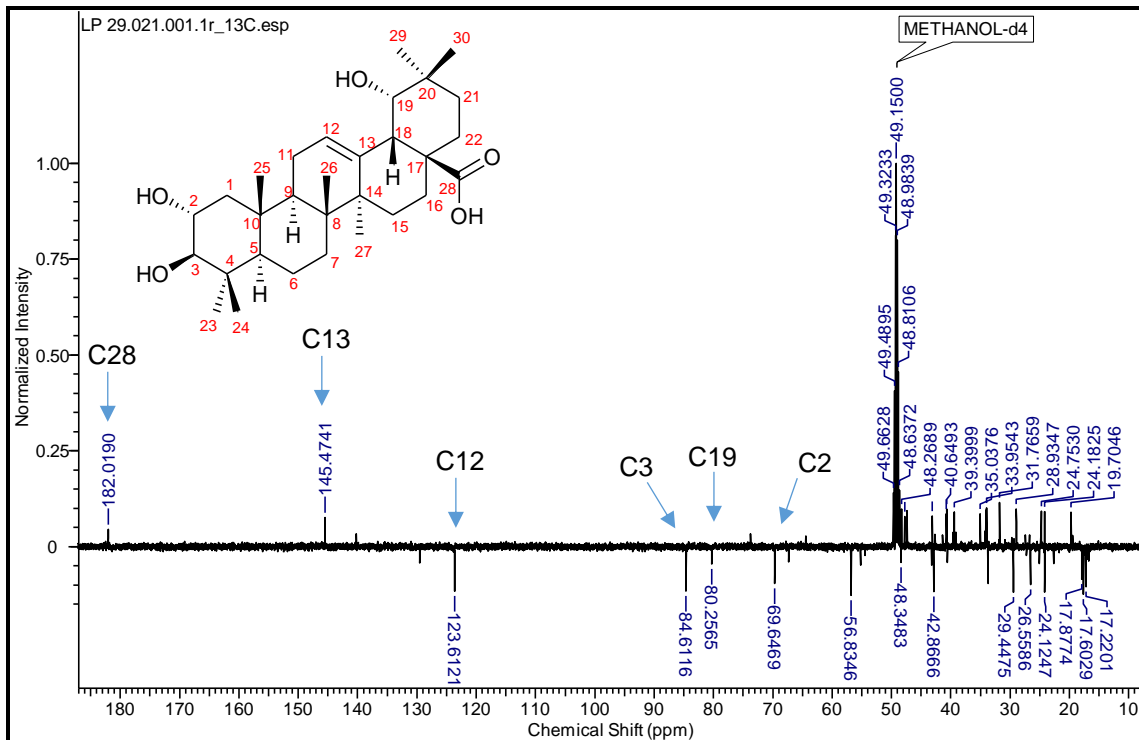




Figura 22. Espectro de HMQC obtido para SF-03 (MeOD).

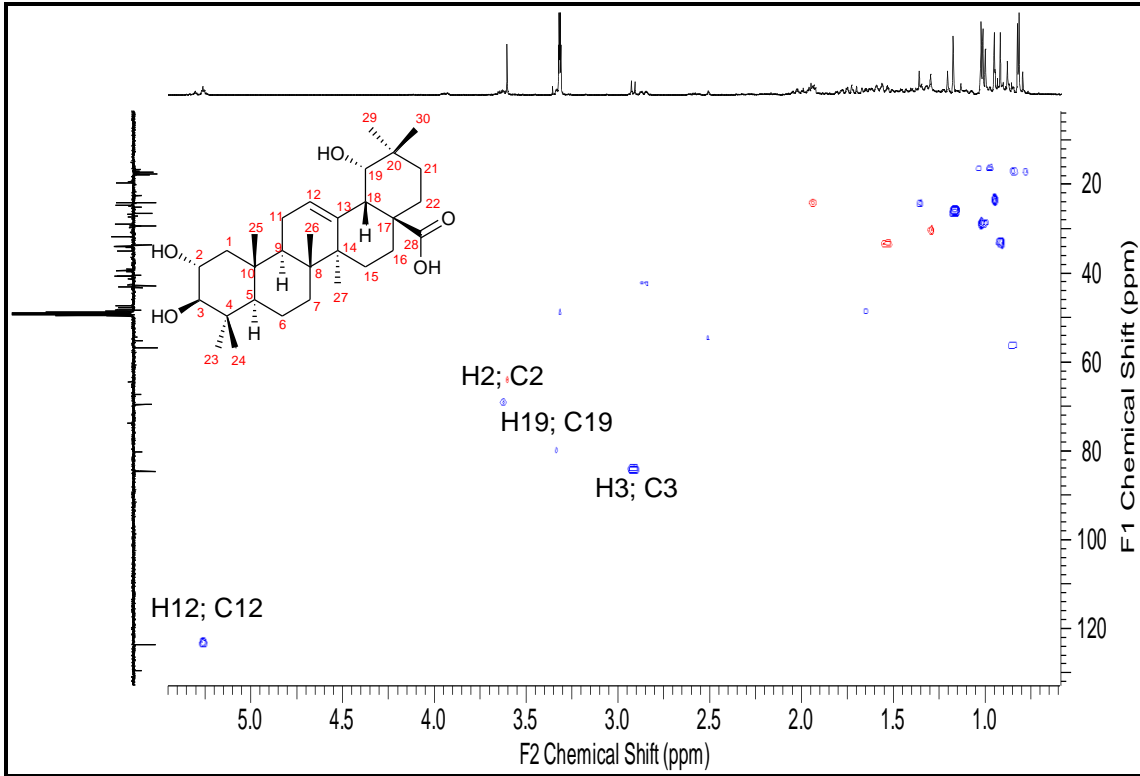
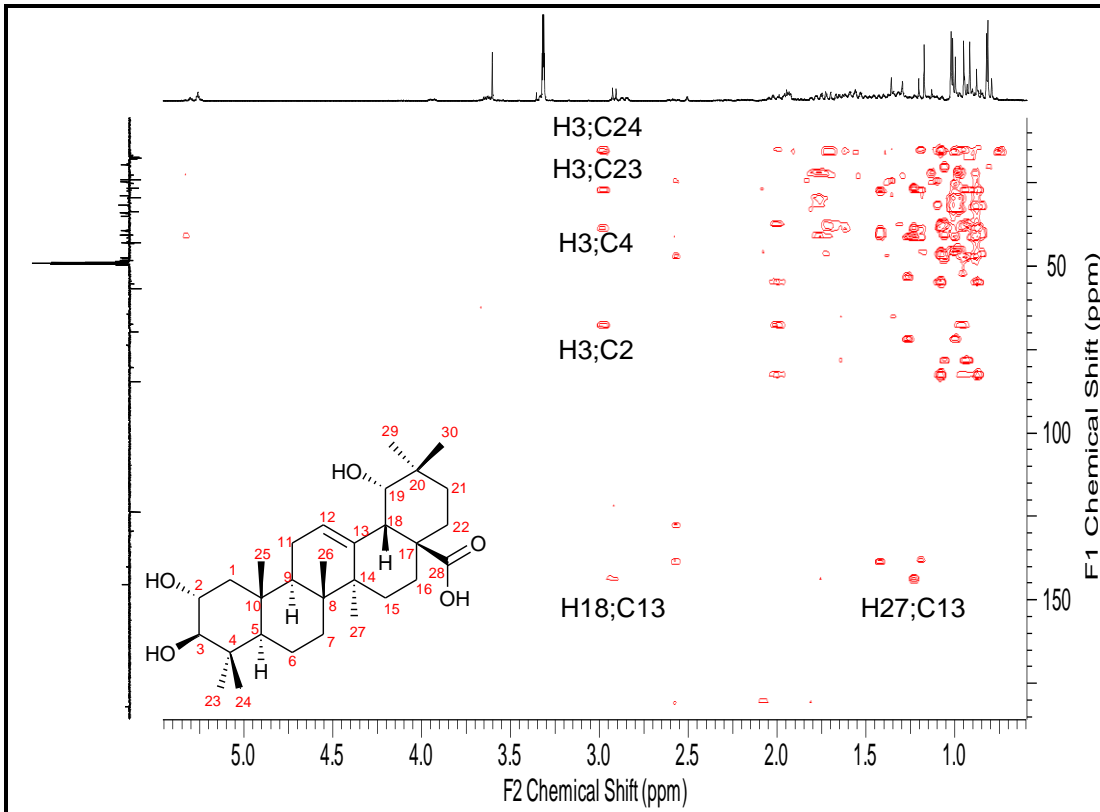


Figura 23. Espectro de HMBC obtido para SF-03 (MeOD).



### 5.1.2. Substâncias identificadas no extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O das folhas de *L. pisonis*

O fracionamento do extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O das folhas resultou em uma fração codificada como SF\_01. A fração SF\_01 ainda não foi elucidada, pois falta realizar a análise de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da mesma e o equipamento estava inoperante.

### 5.1.3. Substâncias identificadas no extrato em hexano (EHM) da madeira de *L. pisonis*

O fracionamento do extrato em hexano da madeira resultou em três frações codificadas como EHM-01, EHM-02 e EHM-03.

#### 5.1.3.1. Determinação estrutural da amostra EHM-01

A fração EHM-01 foi obtida a partir da CC com sílica gel tipo *Flash* da fração em diclorometano do extrato em hexano da madeira (item 4.1.3.2, p. 46). A amostra apresentou-se como um sólido branco amorfo, solúvel em diclorometano. A amostra ao ser analisada em CCDA (em sílica gel), utilizando como eluente hexano:AcOEt (9,5:0,5), apresentou uma mancha de coloração roxa, após revelação com vanilina sulfúrica sob aquecimento.

A análise da fração EHM-01 por meio de CG/EM, indicou que a amostra trata-se de uma mistura composta por cinco substâncias majoritárias. Na Figura 25 (p. 64), encontra-se o cromatograma da amostra EHM-01.

Por meio da comparação da razão massa/carga e do padrão de fragmentação de cada pico com o banco de dados da biblioteca NIST do equipamento do CG/EM, foi possível verificar que a amostra trata-se de uma mistura de triterpenos: ursan-9(11)-12-dien-3-ona (**EHM-01a**), friedoolean-14-en-3-ona (**EHM-01b**), β-amirona (**EHM-01c**), lupenona (**EHM-01d**) e friedelina (**EHM-01e**). Sendo o triterpeno friedelina a substância majoritária (Tabela 2 e Figura 26).

Figura 25. Cromatograma da fração EHM-01.

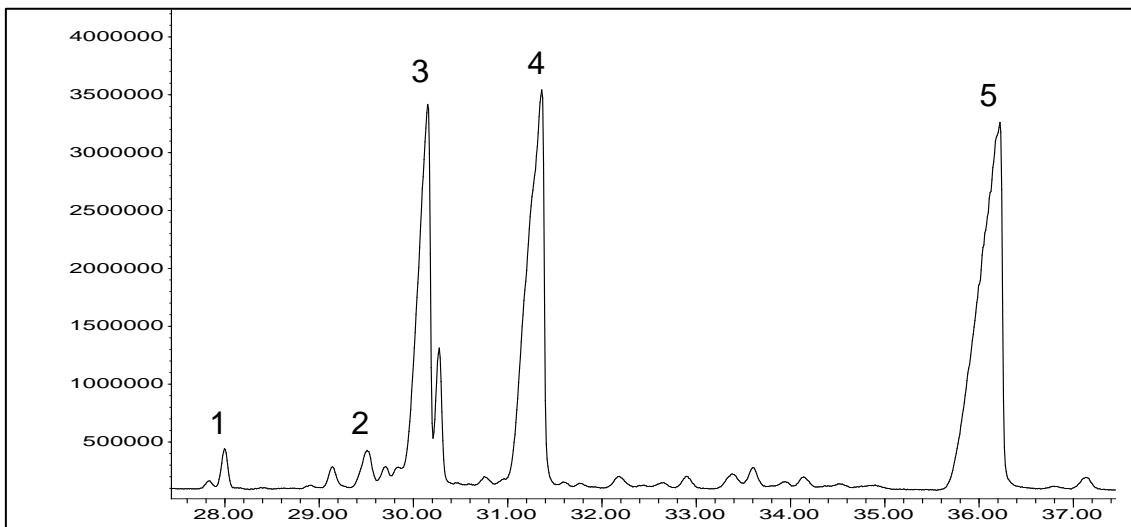
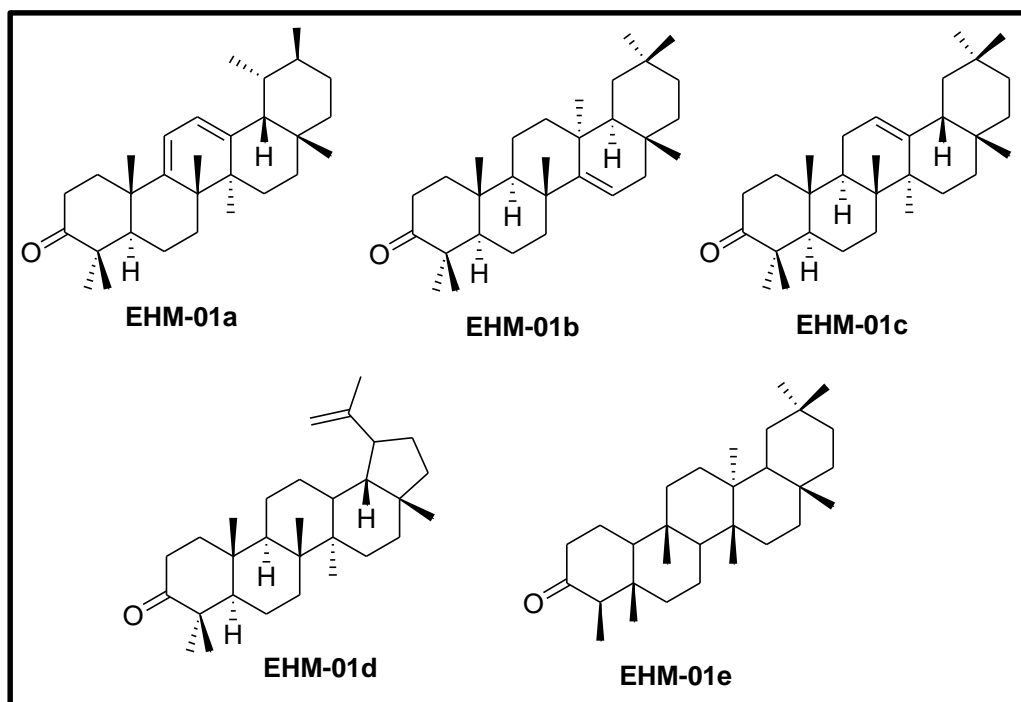


Tabela 2. Tempo de retenção ( $t_R$ ), relação massa/carga ( $m/z$ ) e porcentagem de área (%) das substâncias identificadas na fração EHM-01.

Pico	$t_R$ (min)	$m/z$	%	Substância	Código
1	28,00	422	1,12	Ursan-9(11)-12-dien-3-ona	EHM-01a
2	29,53	424	1,39	Friedoolean-14-en-3-ona	EHM-01b
3	30,10	424	17,56	$\beta$ -Amirona	EHM-01c
4	31,36	424	31,68	Lupenona	EHM-01d
5	36,19	426	41,76	Friedelina	EHM-01e

Figura 26. Substâncias identificadas na fração EHM-01.



Os espectros de massas de cada substância (EHM-01a-e) estão apresentados nas Figuras 27-31.

Figura 27. Espectro de massas da substância EHM-01a.

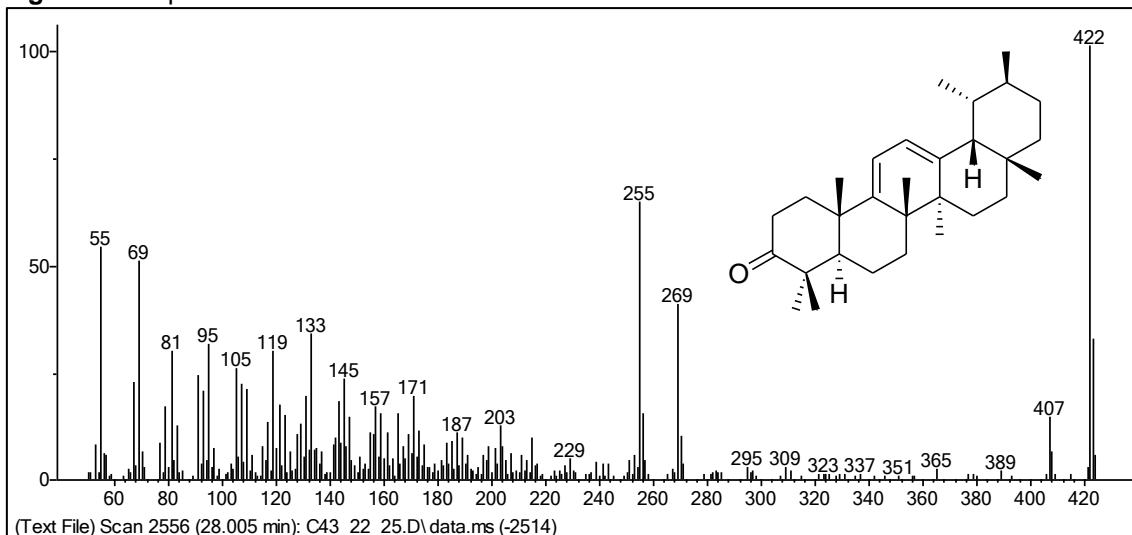


Figura 28. Espectro de massas da substância EHM-01b.

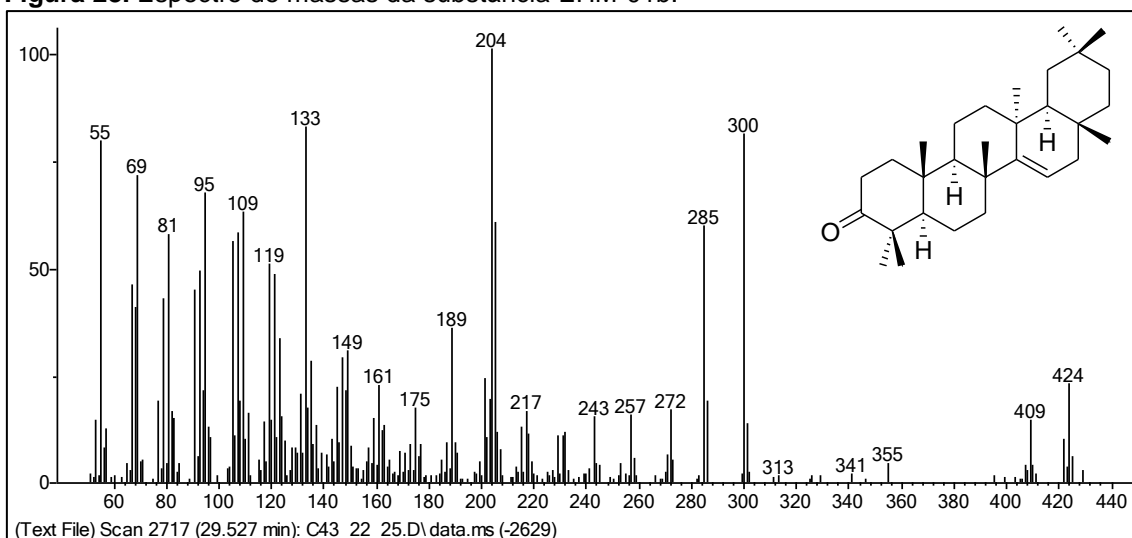


Figura 29. Espectro de massas da substância EHM-01c.

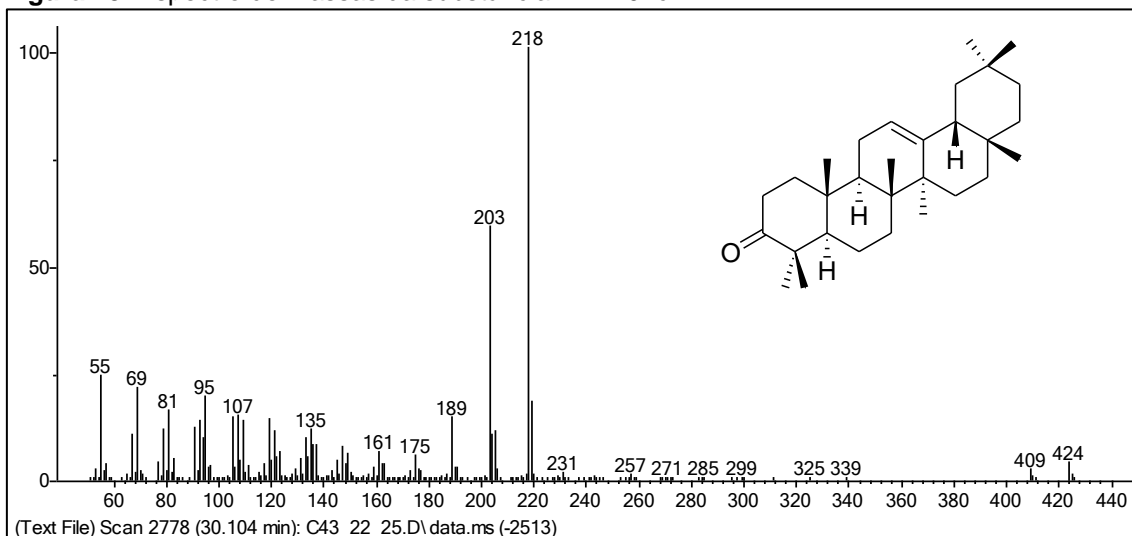


Figura 30. Espectro de massas da substância EHM-01d.

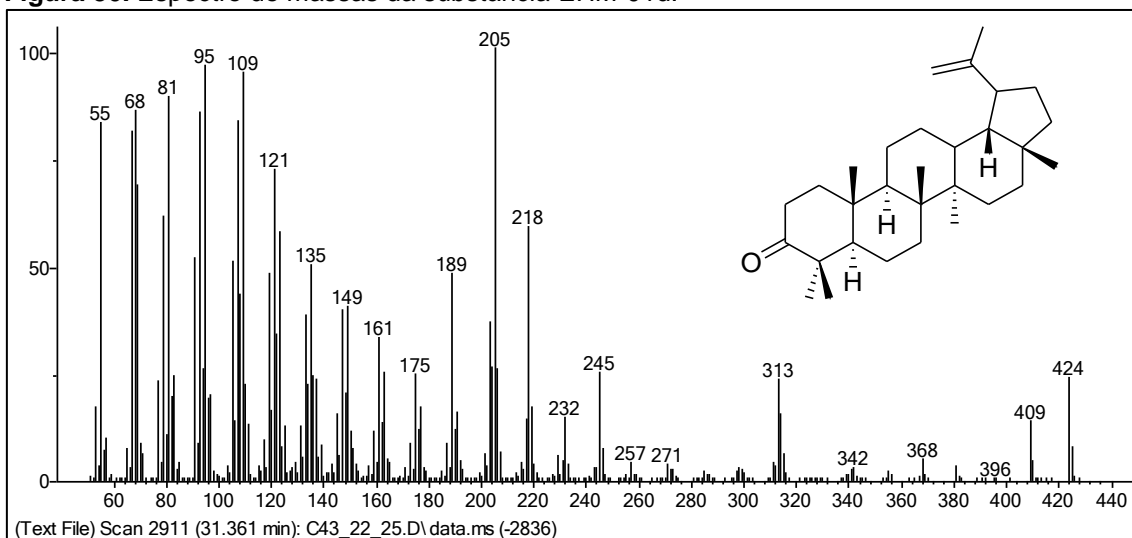
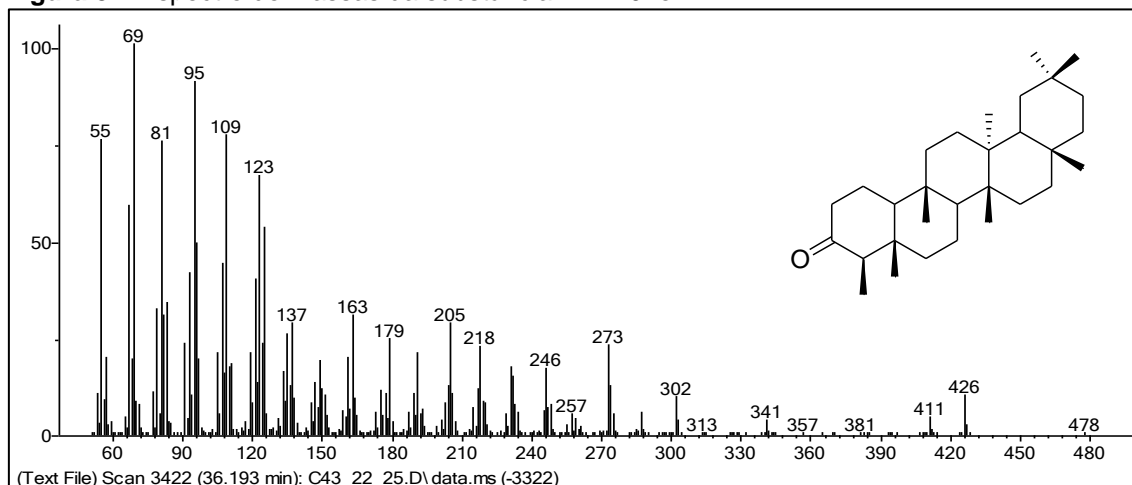


Figura 31. Espectro de massas da substância EHM-01e.



Com base na literatura, este é o primeiro relato da presença das substâncias ursan-9(11)-12-dien-3-ona (**EHM-01a**), friedoolean-14-en-3-ona (**EHM-01b**),  $\beta$ -amirona (**EHM-01c**) e lupenona (**EHM-01d**) na espécie *L. pisonis*.

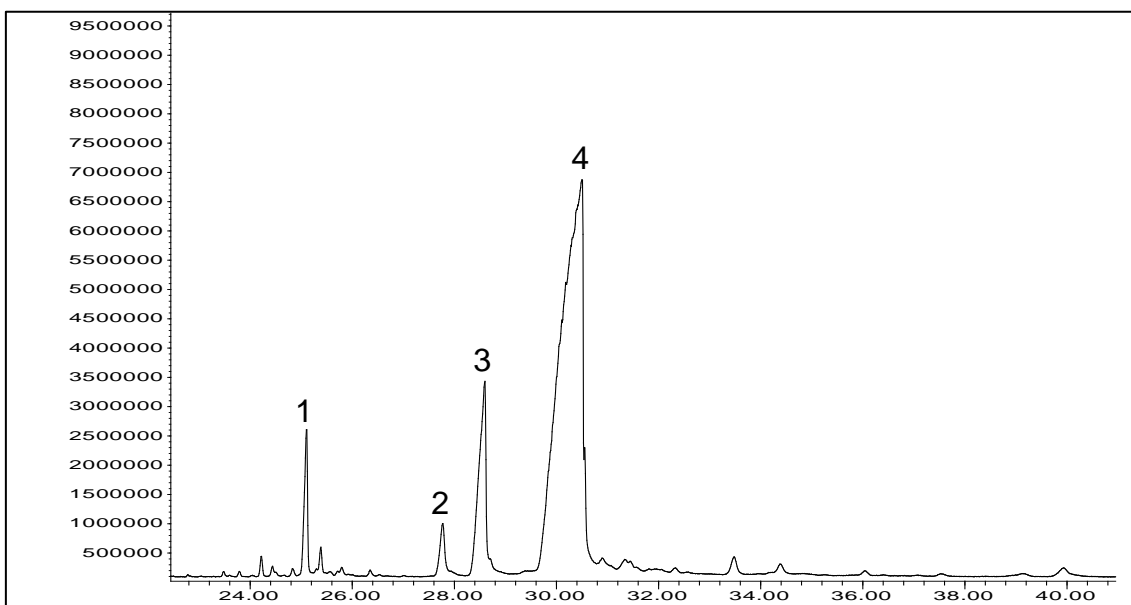
#### 5.1.3.2. Determinação estrutural da amostra EHM-02

A fração EHM-02 foi obtida a partir da CC com sílica gel tipo *Flash* da fração em diclorometano do extrato em hexano da madeira (item 4.1.3.2, p. 46). A amostra apresentou-se como um sólido branco amorfo, solúvel em diclorometano. A amostra ao ser analisada em CCDA (em sílica gel), utilizando como eluente hexano:AcOEt (9,5:0,5), apresentou duas manchas de coloração roxa, após revelação com vanilina sulfúrica sob aquecimento.

A análise da fração EHM-02 por meio de CG/EM, indicou que a amostra é composta pela mistura de quatro substâncias majoritárias. Na Figura 32 (p. 68), encontra-se o cromatograma da amostra EHM-02.

Por meio da comparação da razão massa/carga e do padrão de fragmentação de cada pico com o banco de dados da biblioteca NIST do equipamento do CG/EM, foi possível verificar que a amostra trata-se de uma mistura dos esteróides campesterol (**EHM-02b**), estigmasterol (**EHM-02c**) e  $\gamma$ -sitosterol (**EHM-02d**). Sendo  $\gamma$ -sitosterol a substância majoritária (Tabela 3 e Figura 33).

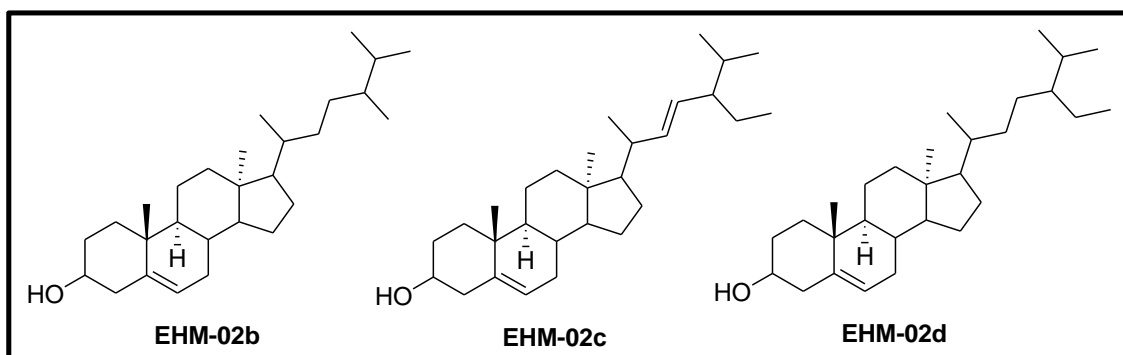
Figura 32. Cromatograma da fração EHM-02.



**Tabela 3.** Tempo de retenção ( $t_R$ ), relação massa/carga ( $m/z$ ) e porcentagem de área (%) das substâncias identificadas na fração EHM-02.

Pico	$t_R$ (min)	$m/z$	%	Substância	Código
1	25,11	394	4,06	Não identificada	EHM-02a
2	27,77	400	2,07	Campesterol	EHM-02b
3	28,60	412	11,76	Estigmasterol	EHM-02c
4	30,49	414	79,40	$\gamma$ -Sitosterol	EHM-02d

**Figura 33.** Substâncias identificadas na fração EHM-02.



Os espectros de massas de cada substância (EHM-02b-d) estão apresentados nas Figuras 34-36.

**Figura 34.** Espectro de massas da substância EHM-02b.

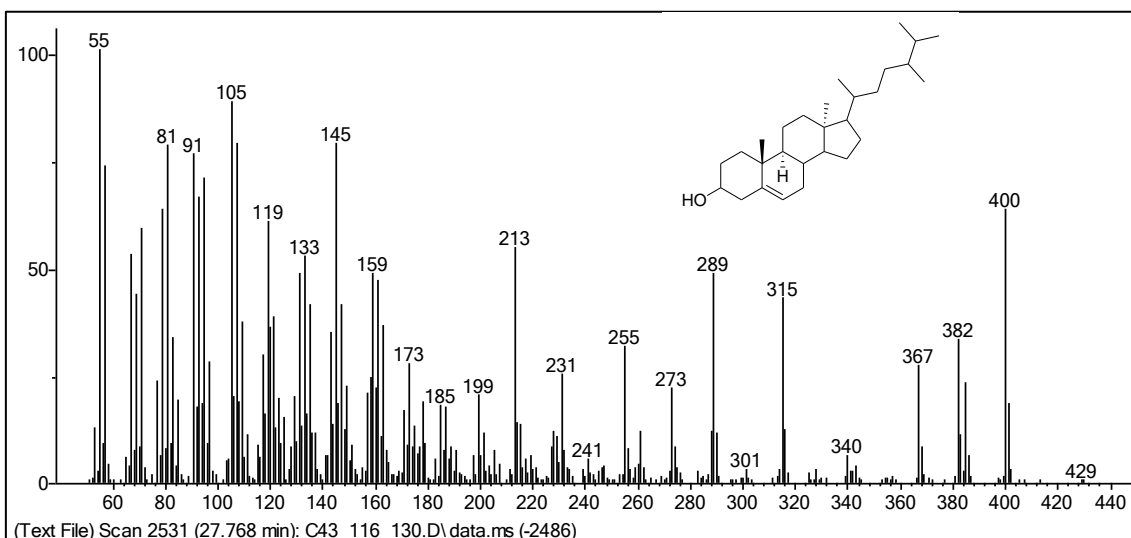
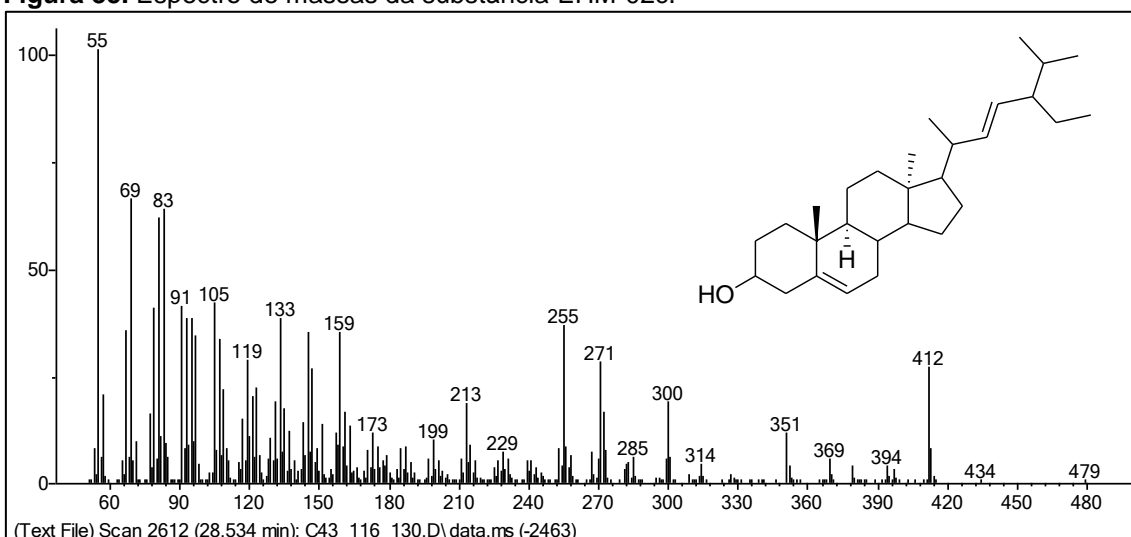


Figura 35. Espectro de massas da substância EHM-02c.



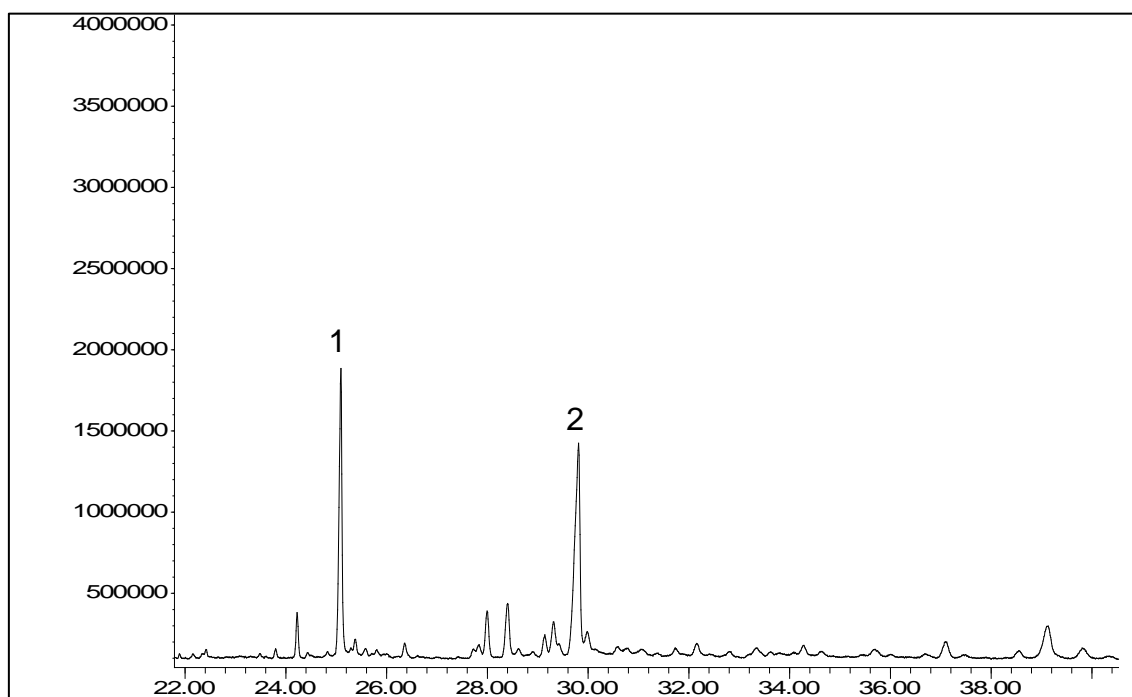
### 5.1.3.3. Determinação estrutural da amostra EHM-03

A fração EHM-03 foi obtida a partir da CC com sílica gel tipo *Flash* da fração em diclorometano do extrato em hexano da madeira (item 4.1.3.2, p. 46). A amostra apresentou-se como um sólido branco amorfo, solúvel em diclorometano. A amostra ao ser analisada em CCDA (em sílica gel), utilizando como eluente hexano:AcOEt (9,5:0,5), apresentou duas manchas de coloração roxa, após revelação com vanilina sulfúrica sob aquecimento.



A análise da fração EHM-03 por meio de CG/EM, indicou que a amostra é composta pela mistura de duas substâncias majoritárias. Na Figura 37, encontra-se o cromatograma da amostra EHM-03.

Figura 37. Cromatograma da fração EHM-03.

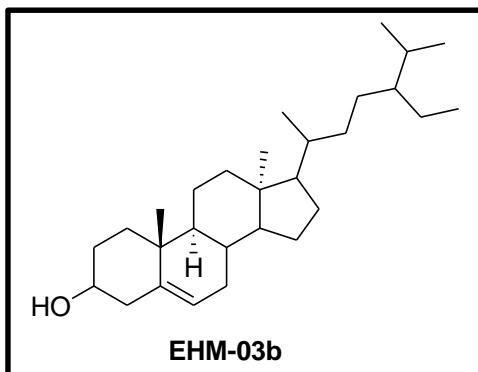


Por meio da comparação da razão massa/carga e do padrão de fragmentação de cada pico com o banco de dados da biblioteca NIST do equipamento do CG/EM, foi possível verificar que a amostra trata-se da mistura de duas substâncias majoritárias, sendo que apenas uma foi identificada,  $\gamma$ -sitosterol (**EHM-03b**) (Tabela 4 e Figura 38).

**Tabela 4.** Tempo de retenção ( $t_R$ ), relação massa/carga ( $m/z$ ) e porcentagem de área (%) das substâncias identificadas na fração EHM-03.

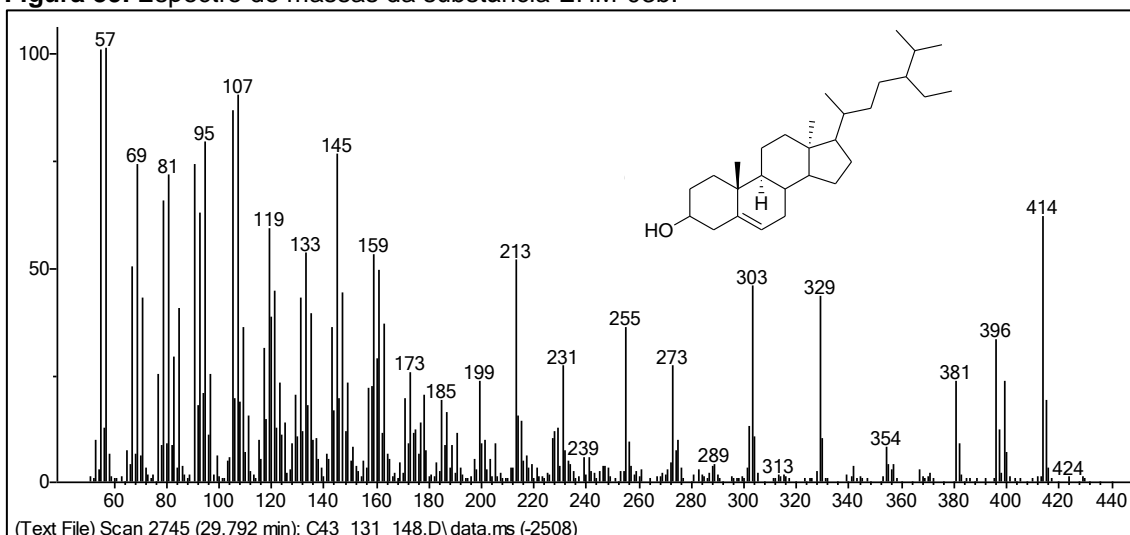
Pico	$t_R$ (min)	$m/z$	%	Substância	Código
1	25,09	394	30,04	Não identificada	EHM-03a
2	29,81	414	37,75	$\gamma$ -Sitosterol	EHM-03b

Figura 38. Substância identificada na fração EHM-03.



O espectro de massas da substância EHM-03b está apresentado na Figura 39.

Figura 39. Espectro de massas da substância EHM-03b.



#### 5.1.4. Substâncias identificadas no extrato em MeOH da madeira de *L. pisonis*

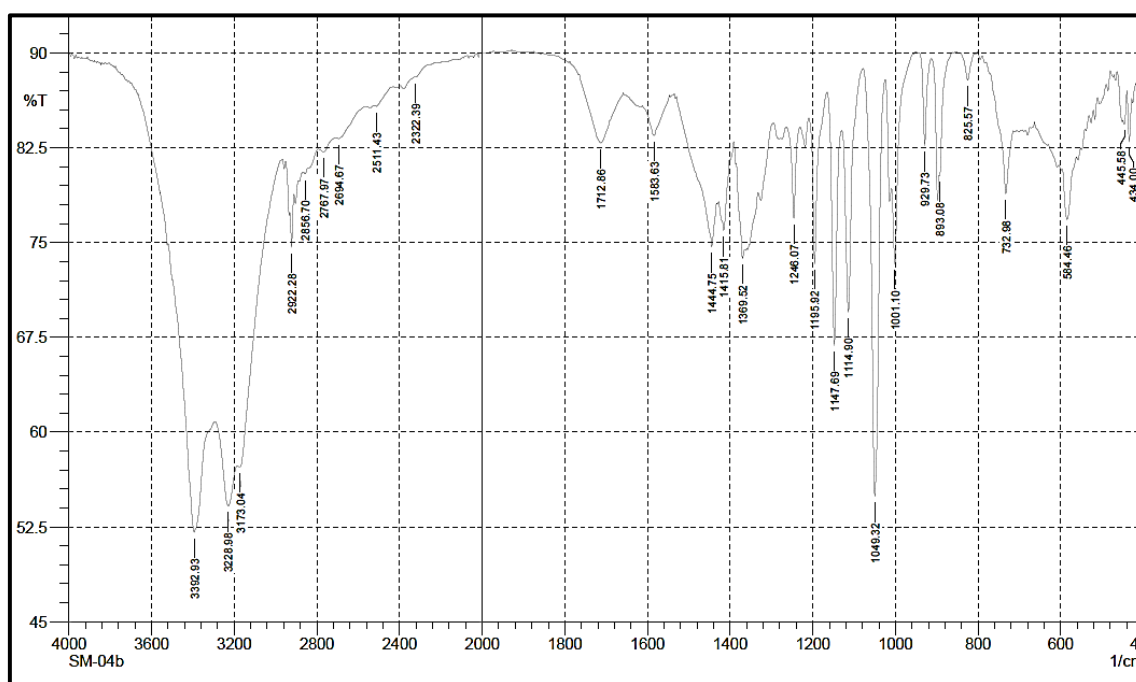
O fracionamento do extrato em MeOH da madeira resultou na obtenção de X frações codificadas como SM-03, SM-04a, SM-04b, SM-05a, SM-08, SM-10, SM-11 e SM-22. A fração SM-06 ainda não foi elucidada, pois falta realizar a análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da mesma e o equipamento está inoperante.

#### 5.1.4.1. Identificação estrutural da amostra SM-04b

A amostra SM-04b, obtida a partir da adição de H<sub>2</sub>O à fração F2A\_S2 (item 4.1.3.3, p. 47), apresentou-se como um pó amarelo solúvel em água.

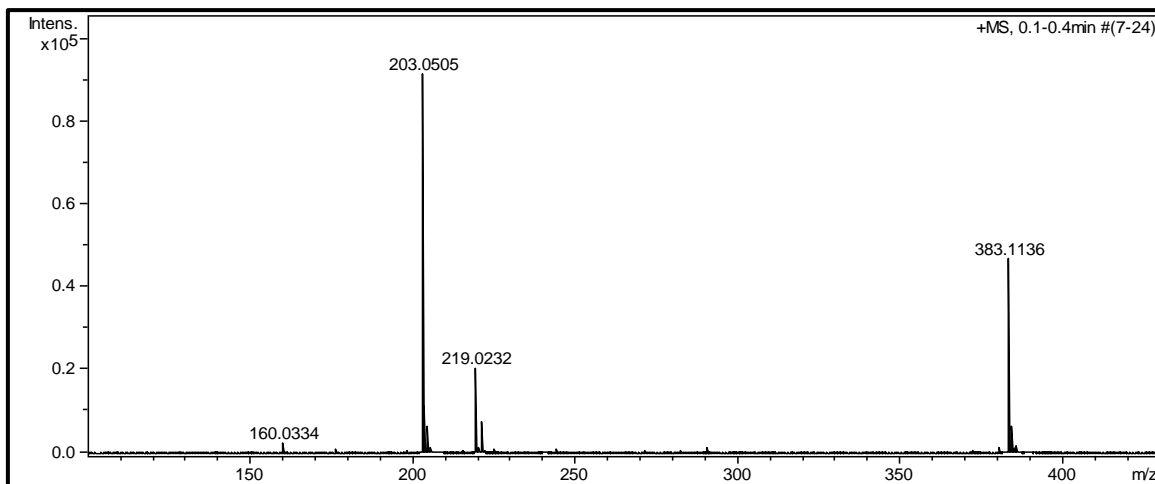
O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 40), obtido em KBr, apresentou intensas absorções em  $\nu_{OH}$  3392, 3228 e 3173 cm<sup>-1</sup>, indicando a presença de grupos hidroxilas, e em  $\nu_{C-O}$  1049 cm<sup>-1</sup> atribuído as ligações C-O.

Figura 40. Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra SM\_04b.



A amostra foi submetida a análise de espectrometria de massas com ionização electrospray (ESI-MS) no modo positivo. No espectro obtido foi possível observar o íon quasi-molecular  $[M+Na]^+ = 203,0505$ , compatíveis com a fórmula molecular de um ciclitol C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (calculado  $m/z$  203,0526) (Figura 41). Não foi observada fragmentação desse íon.

Figura 41. Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo positivo, da amostra SM\_04b.



A análise dos dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ), revelou a presença de quatro sinais característicos de hidrogênios de carbonos carbinólicos ( $\delta_{\text{H}}$  3,0 a 4,0 ppm) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). No entanto, não foi observado sinais na região de hidrogênios aromáticos ( $\delta_{\text{H}}$  6,0 a 8,0ppm) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). O espectro pode ser visualizado na Figura 42 (p. x).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu observar a presença de um duplo dubleto (*dd*) em  $\delta_{\text{H}}$  3,49 ppm, referente a 2-H, com  $J = 2,9$  e  $9,9$  Hz e três tripletos, em  $\delta_{\text{H}}$  4,02 ppm, (1H,  $J = 2,75$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  3,58 ppm (2H,  $J = 9,9$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  3,23 ppm (1H,  $J = 9,3$  Hz). A partir da análise, foi possível atribuir os sinais  $\delta_{\text{H}}$  3,49 ppm a H-1/H-3,  $\delta_{\text{H}}$  4,02 a H-2,  $\delta_{\text{H}}$  3,58 ppm a H-4/H-6 e  $\delta_{\text{H}}$  3,23 ppm a H-5 (Figura 43, p. x).

O valor da constante de acoplamento entre 8-14 Hz (usualmente observado entre 8-10 Hz) é característico de sistema  $\text{H}_{\text{axial}} - \text{H}_{\text{axial}}$ , enquanto que de 1-7 Hz (geralmente observado entre 2-3 Hz) corresponde a acoplamento de  $\text{H}_{\text{axial}} - \text{H}_{\text{equatorial}}$  (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). Desta forma, pode-se observar a presença de um único hidrogênio em posição equatorial, resultando em menor número de hidroxilas em posição axial (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Por meio da análise do espectro de correlação espectroscópica  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (COSY) do RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 44, p. x) foi possível identificar o acoplamento

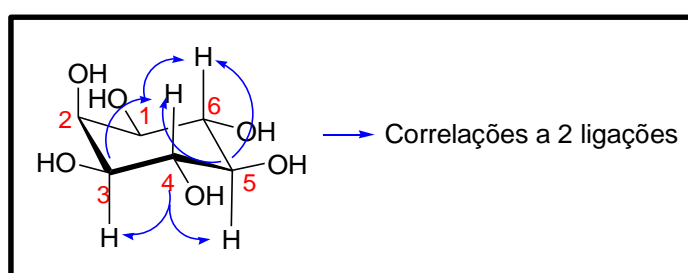
entre os hidrogênios. Estes dados possibilitaram confirmar as atribuições feitas a partir do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  monodimensional.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) apresentou sinais referentes a quatro átomos de carbono. A natureza destes foi deduzida a partir do espectro APT e indicou a presença de carbonos metínicos (CH). Os valores de deslocamento químico de carbono ( $\delta_{\text{C}}$ ) variaram de 74,4 – 71,1 ppm. Esses sinais são característicos de carbonos carbinólicos, o que está em acordo com o observado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . O espectro pode ser visualizado na Figura 45 (p. x).

A análise do espectro de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  a uma ligação (HMQC) (Figura 46, p. x) permitiu atribuir o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  72,1 ppm ao carbono C-2 com hidrogênio na posição equatorial H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  4,02 ppm),  $\delta_{\text{C}}$  74,3 ppm a C-5,  $\delta_{\text{C}}$  72,3 ppm a C-4/C-6 e  $\delta_{\text{C}}$  71,1 ppm a C-1/C-3.

A correlação dos carbonos e hidrogênios ligados a duas ou três ligações foi feita a partir da análise do espectro HMBC (Figura 47, p. x). Foi possível observar correlação do sinal  $\delta_{\text{C}}$  74,3 ppm (C-5) com  $\delta_{\text{H}}$  3,58 ppm (H-4/H-6),  $\delta_{\text{C}}$  72,3 ppm (C-4/C-6) com 3,49 (H-1/H-3) e 3,23 ppm (H-5),  $\delta_{\text{C}}$  72,1 ppm (C-2) com  $\delta_{\text{H}}$  4,02 ppm (H-2) e  $\delta_{\text{C}}$  71,1 ppm (C-1/C-3) com 3,58 ppm (H-4/H-6). A Figura 48 mostra algumas das correlações observadas no espectro de HMBC.

**Figura 48.** Algumas correlações observadas a 2 e 3 ligações no espectro de HMBC.



A ausência de sinal de hidrogênio ( $\delta_{\text{H}} > 4,30$  ppm) e carbono anomérico ( $\delta_{\text{C}}$  100,0 ppm) reafirma a hipótese de SM\_04b tratar-se de um ciclitol, descartando a possibilidade de ser um monossacarídeo. Desta forma, com base nas informações espectrais obtidas, aliada à comparação com dados

espectrométricos descritos na literatura (Tabela 5) foi possível identificar SM\_04b como o *mio*-inositol (Figura 49). A numeração dos ciclitolis segue a seguinte regra, “o único grupo hidroxila axial do *mio*-inositol ocupa a posição C2 na estrutura” (ALMEIDA *et al.*, 2003).

Este é o primeiro relato dessa classe de substância (ciclitol) na espécie e na família Lecythidaceae.

Figura 49. Estrutura da substância identificada na amostra SM\_04b.

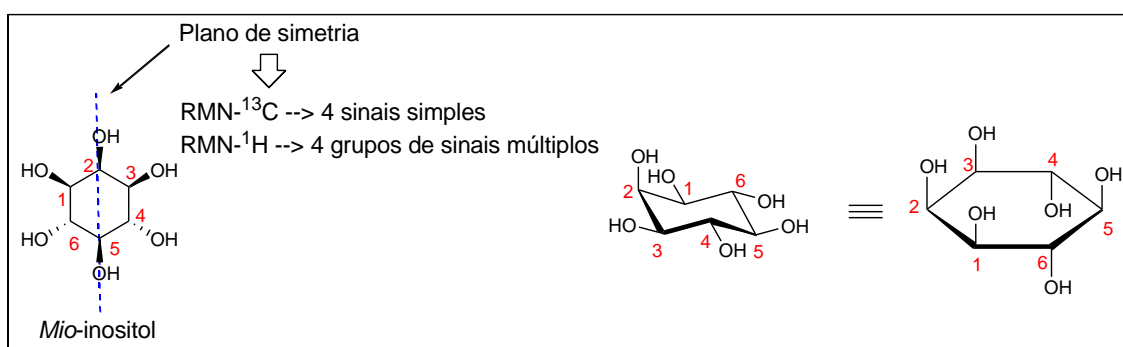


Tabela 5. Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz, respectivamente) da amostra SM\_04b em  $\text{D}_2\text{O}$ .

SM_04b					Mio-inositol*	
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	71,09	3,49 ( <i>dd</i> , $J = 2,9$ e $9,9$ Hz)	H6	-	73,20	3,54 ( <i>dd</i> )
2	72,13	4,02 ( <i>t</i> , $J = 2,75$ Hz)	-	-	72,98	4,07 ( <i>t</i> )
3	71,09	3,49 ( <i>dd</i> , $J = 2,9$ e $9,9$ Hz)	H4	-	73,20	3,54 ( <i>dd</i> )
4	72,35	3,58 ( <i>t</i> , $J = 9,9$ Hz)	H3; H5	-	71,93	3,64 ( <i>t</i> )
5	74,30	3,23 ( <i>t</i> , $J = 9,3$ Hz)	H4/H6	-	75,15	3,29 ( <i>t</i> )
6	72,35	3,58 ( <i>t</i> , $J = 9,9$ Hz)	H1; H5	-	71,93	3,64 ( <i>t</i> )

Legenda: SM\_04b = dados obtidos no presente trabalho ( $\text{D}_2\text{O}$ ). *dd* duplete duplo; *t* tripete;  $J$  constante de acoplamento, unidade Hertz.

Fonte: \*REBECCA; BOYCE; SOMASUNDRAM, 2012.

Figura 42. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para SM\_04b (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).



Figura 44. Espectro de COSY obtido para SM\_04b (D<sub>2</sub>O).

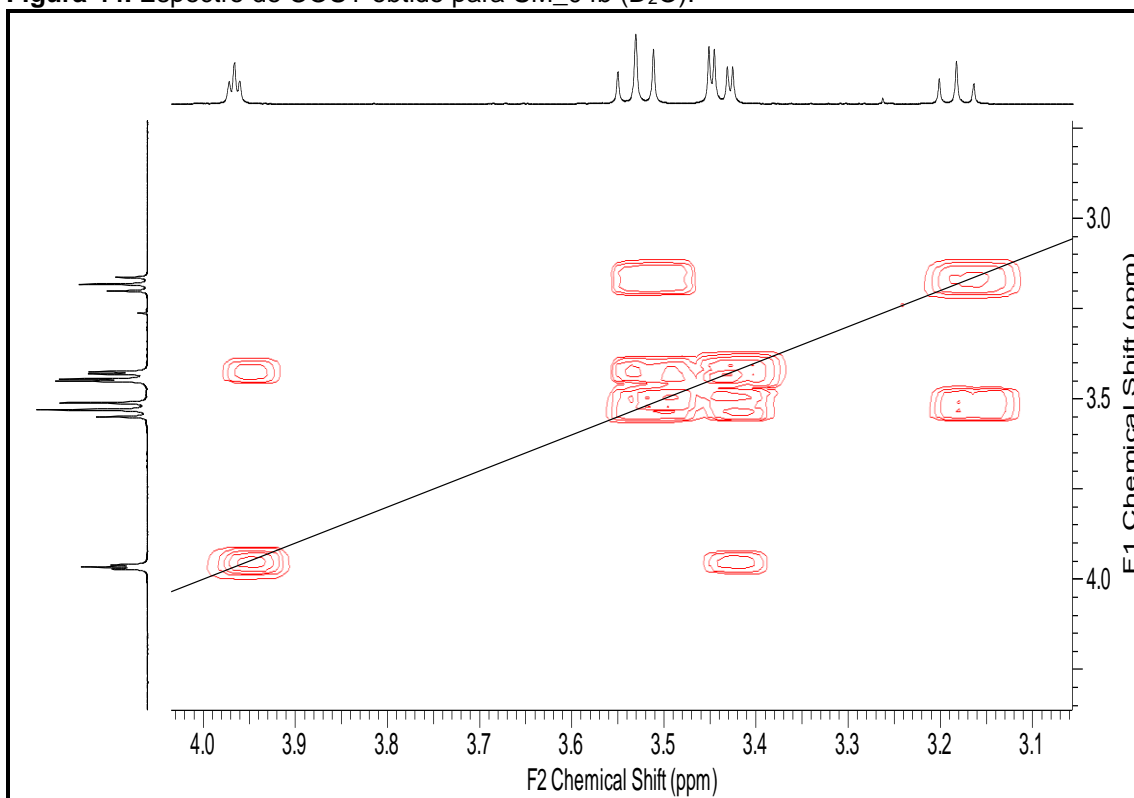


Figura 45. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C obtido para SM\_04b (125 MHz, D<sub>2</sub>O).

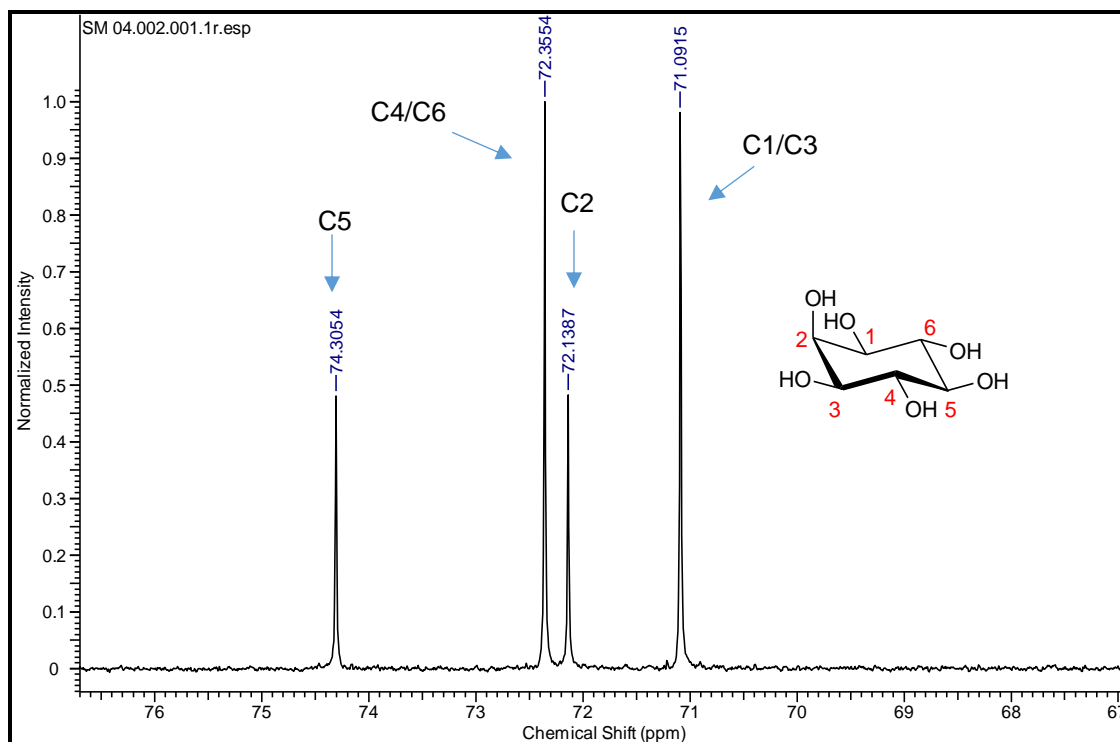




Figura 46. Espectro de HMQC obtido para SM\_04b (D<sub>2</sub>O).

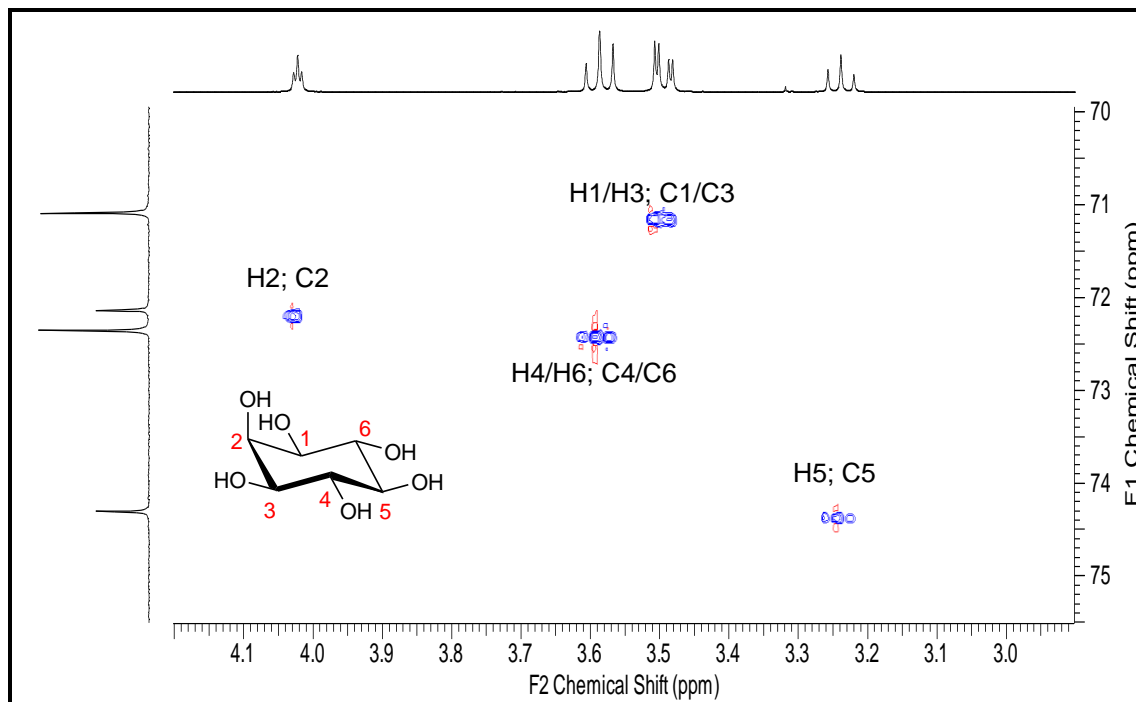
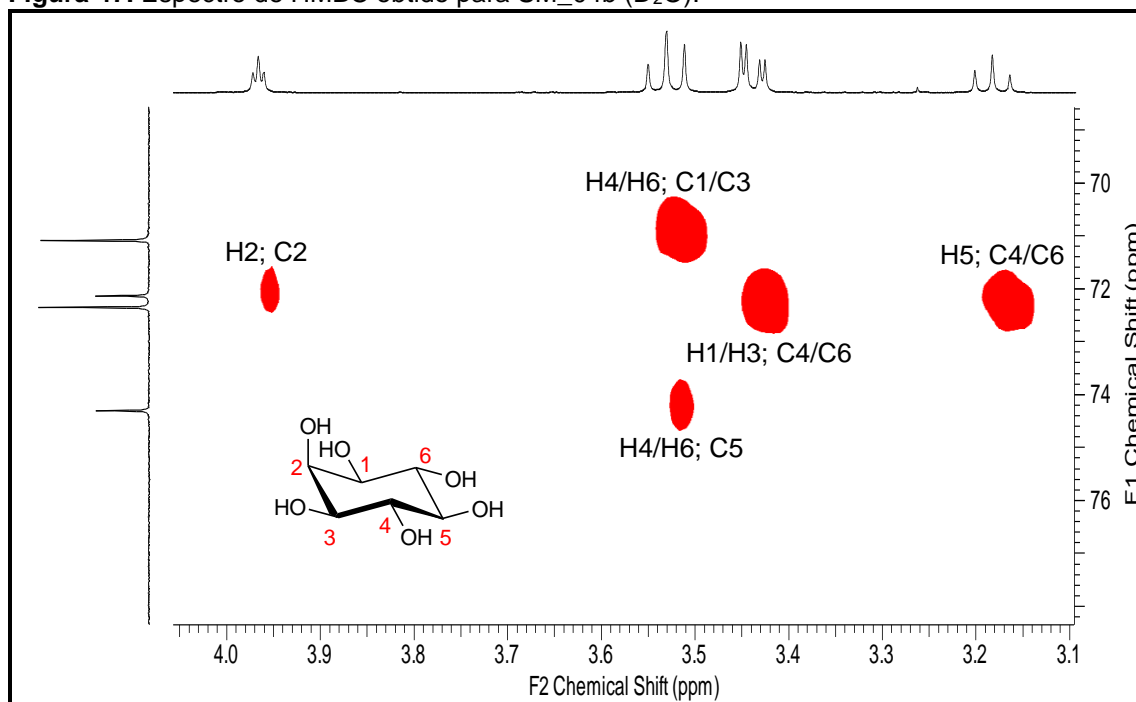


Figura 47. Espectro de HMBC obtido para SM\_04b (D<sub>2</sub>O).



#### 5.1.4.2. Identificação estrutural da amostra SM-03

A amostra SM-03, obtida a partir do fracionamento da fração insolúvel em MeOH do extrato (item 4.1.3.3, p. 47), apresentou-se como um pó amorfo amarelo solúvel em DMSO.

A análise em CCDA utilizando sílica de fase reversa RP-18 eluída com uma mistura de MeOH:H<sub>2</sub>O (6:4 v/v) evidenciou a presença de uma única mancha azul escura, quando revelada com solução etanólica de FeCl<sub>3</sub> (2%). Esta observação sugere a presença de uma substância fenólica.

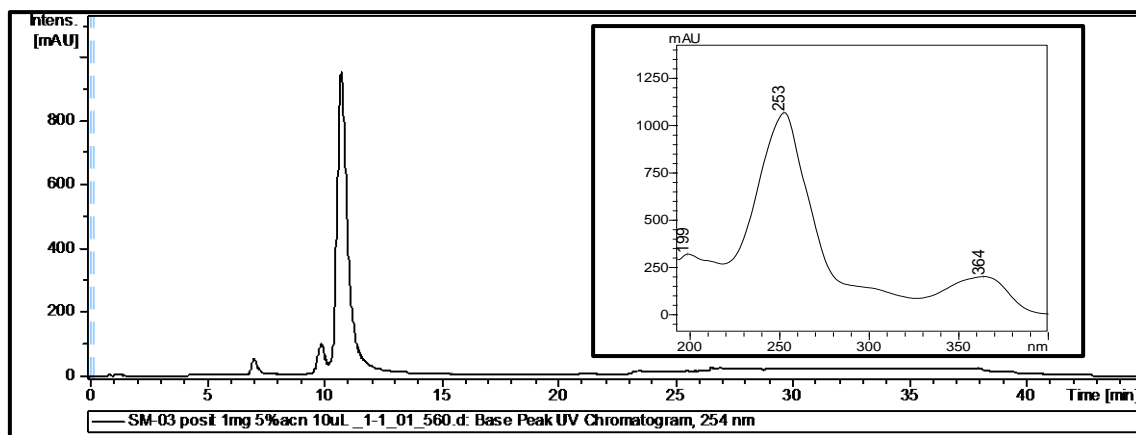
A amostra foi submetida a análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (LC-MS) utilizando como fase móvel água deionizada (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos acidificados com ácido fórmico (0,1%), com temperatura do forno a 40 °C e fluxo a 0,25 mL/min. Foi preparada uma solução da amostra na concentração de 1,0 mg/mL em acetonitrila:água deionizada (5%). O volume de injeção da amostra foi de 10 µL. A análise foi realizada com o gradiente em função da concentração do solvente B, com base na programada a seguir (Tabela 6).

**Tabela 6.** Programação aplicada na análise da amostra SM-03 por LC-MS.

<b>Tempo</b>	<b>Módulo</b>	<b>Ação</b>	<b>Concentração (%)</b>
0,01	<i>Controle</i>	<i>Iniciar</i>	
0,02	Bomba	Concentração B	5
1,00	Bomba	Concentração B	5
3,00	Bomba	Concentração B	13
15,00	Bomba	Concentração B	15
20,00	Bomba	Concentração B	100
30,00	Bomba	Concentração B	100
35,00	Bomba	Concentração B	5
40,00	Bomba	Concentração B	5
40,10	<i>Controle</i>	<i>Parar</i>	

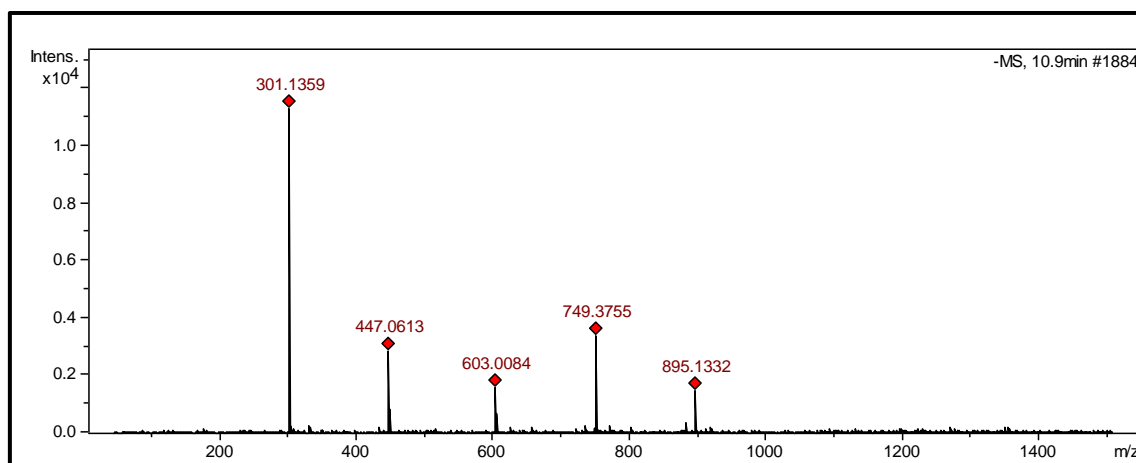
O cromatograma obtido com essa análise exibiu um sinal majoritário com tempo de retenção  $t_R = 10,9$  mim. O espectro na região do UV/Vis do pico majoritário apresentou absorções  $\lambda_{max}$  igual a 253 e 364 nm, que são características do ácido elágico (Figura 50).

**Figura 50.** Cromatograma (LC-MS) e espectro na região do UV/Vis do pico majoritário da amostra SM-03.



O espectro de massas de alta resolução, obtido no modo negativo, exibiu o íon quasi-molecular  $[M-H]^- = 301,1359$ , compatível com a fórmula molecular  $C_{14}H_5O_8^-$  (calculado  $m/z$  300,9990) (Figura 51).

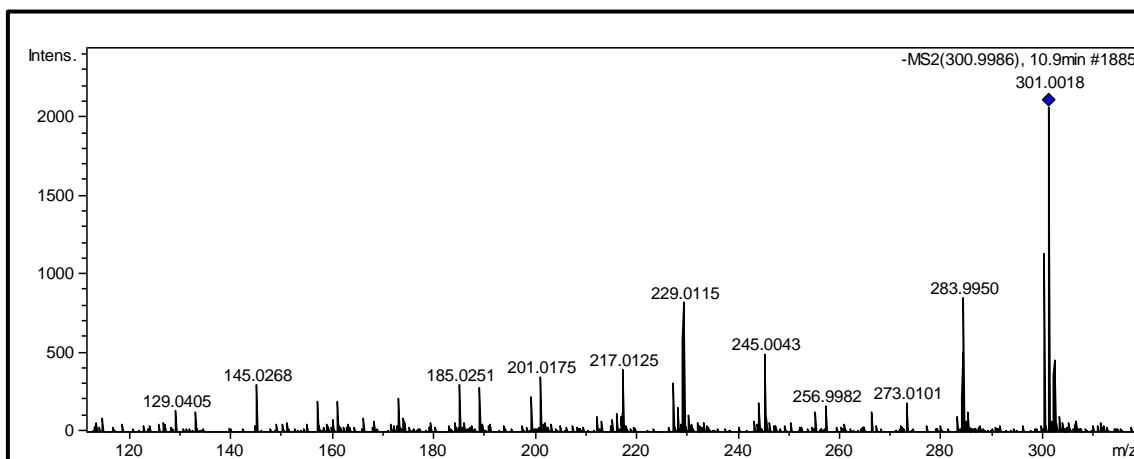
**Figura 51.** Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da amostra SM-03.



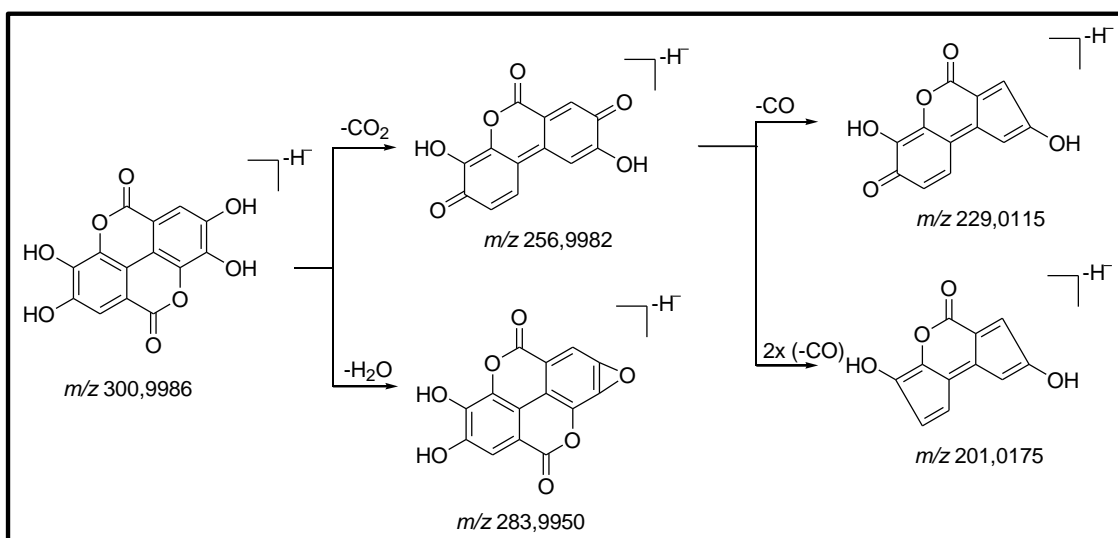
No espectro de segunda ordem ( $MS^2$ ) (Figura 52), o fragmento com  $m/z$  283,9950 ( $C_{14}H_4O_7^-$ ) e  $m/z$  256,9982 ( $C_{13}H_5O_6^-$ ) foram gerados pela perda de uma molécula de  $H_2O$  (18 Da) e de  $CO_2$  (44 Da) do íon precursor, respectivamente. O fragmento com  $m/z$  229,0115 ( $C_{12}H_5O_5^-$ ) e  $m/z$  201,0175 ( $C_{11}H_5O_4^-$ ) foram detectados como resultado da perda de  $CO$  (28 Da) da unidade do íon fragmento em  $m/z$  256,9982 ( $C_{13}H_6O_6^-$ ). Esses fragmentos são característicos de ácido elágico. A proposta de fragmentação da amostra SM-03

está esquematizada na Figura 53.

**Figura 52.** Espectro de massa/massa de alta resolução (ESI-MS<sup>2</sup>), modo negativo, do íon quasi-molecular [M-H]<sup>-</sup> = 301,1359 (amostra SM-03).



**Figura 53.** Proposta de fragmentação para a amostra SM\_03.



Fonte: YISIMAYILI *et al.*, 2019.

A Figura 54 (p. x) mostra o espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO) que exibiu apenas um sinal singlete intenso em  $\delta_H$  7,27 ppm (s, H-5 e H-5'), característico de hidrogênios aromáticos ( $\delta_H$  6,0 a 8,0 ppm) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

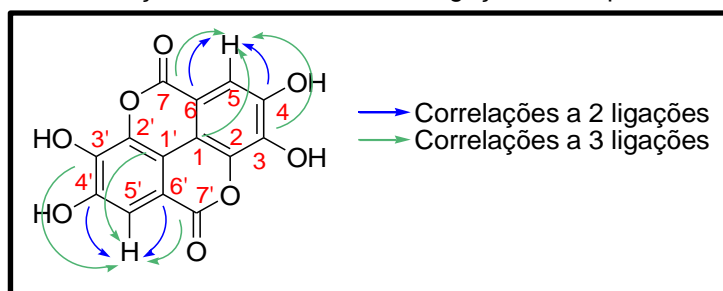
O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO), revelou a presença de sete sinais na região entre  $\delta_c$  102,4 - 160,3 ppm (Figura 55, p. X). Por meio da técnica APT (Figura 56) foi possível verificar que o sinal  $\delta_c$  107,7 ppm corresponde a um carbono metínico (C-5 e C-5') e que os outros sinais são carbonos quaternários:

$\delta_c$  160,3 (C-7 e C-7'),  $\delta_c$  149,3 (C-4 e C-4'),  $\delta_c$  146,7 (C-3 e C-3'),  $\delta_c$  136,1 (C-2 e C-2'),  $\delta_c$  113,6 (C-1 e C-1') e  $\delta_c$  102,4 ppm (C-6 e C-6').

A análise do mapa de correlação heteronuclear a uma ligação (HMQC), figura 57, confirmou a correlação direta entre o sinal  $\delta_H$  7,27 (H-5 e H-5') e  $\delta_c$  107,7 (C-5 e C-5').

O mapa de correlação heteronuclear a longa distância (HMBC), figura 58, mostrou as correlações entre o sinal de hidrogênio  $\delta_H$  7,27 (H-5 e H-5') com todos os sinais de carbono. Na Figura 59 são apresentadas algumas das correlações observadas à longa distância.

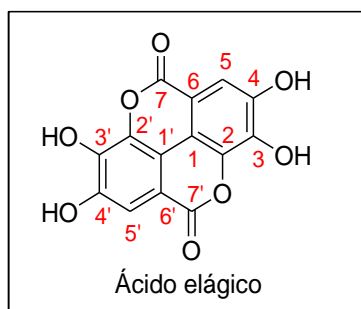
**Figura 59.** Algumas correlações observadas a 2 e 3 ligações no espectro de HMBC.



Mediante as informações obtidas com os espectros de LC-ESI-MS<sup>2</sup>, RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (1D e 2D) e comparação com os dados da literatura (Tabela 7), a amostra SM-03 foi identificada como ácido elágico.

A literatura reporta a presença do ácido elágico nas folhas e sementes de *L. pisonis*, no entanto, nos madeira este é o primeiro relato (FERREIRA, 2016; DEMOLINER *et al.*, 2018).

**Figura 60.** Estrutura da substância identificada na amostra SM\_03.



**Tabela 7.** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz, respectivamente) da amostra SM-03 em DMSO.

SM_03						Ácido elágico*	
C	$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$^4J_{CH}$	$\delta_c$	$\delta_H$
1	113,6	-	-	H5	-	112,57	-
1'	113,6	-	-	H5'	-	112,57	-
2	136,1	-	-	-	H5	136,33	-
2'	136,1	-	-	-	H5'	136,33	-
3	146,7	-	-	H5	-	140,88	-
3'	146,7	-	-	H5'	-	140,88	-
4	149,3	-	H5	-	-	148,35	-
4'	149,3	-	H5'	-	-	148,35	-
5	107,7	7,27 (s)	-	-	-	109,74	7,42 (s)
5'	107,7	7,27 (s)	-	-	-	109,74	7,42 (s)
6	102,4	-	H-5	-	-	106,56	-
6'	102,4	-	H5'	-	-	106,56	-
7	160,3	-	-	H5	-	159,34	-
7'	160,3	-	-	H5'	-	159,34	-

**Legenda:** SM\_03 = dados obtidos no presente trabalho (DMSO). s singletto.

Fonte: \*AZEVEDO, 2017.

**Figura 54.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para SM\_03 (500 MHz, DMSO).

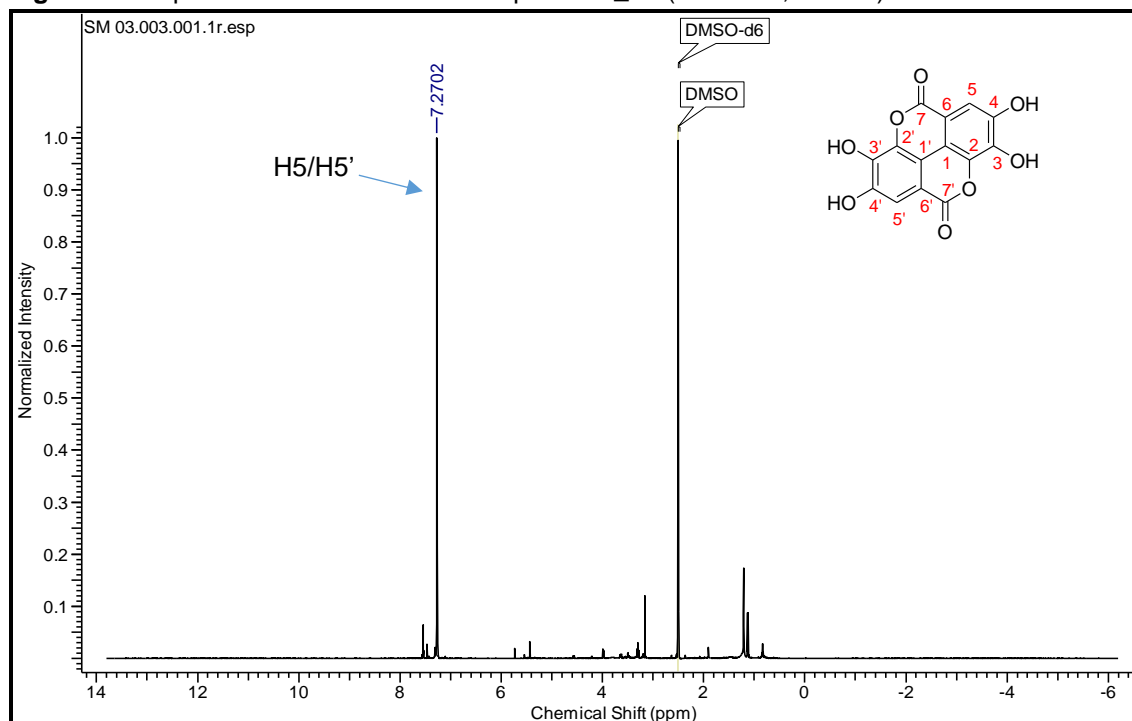


Figura 55. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para SM\_03 (125 MHz, DMSO).

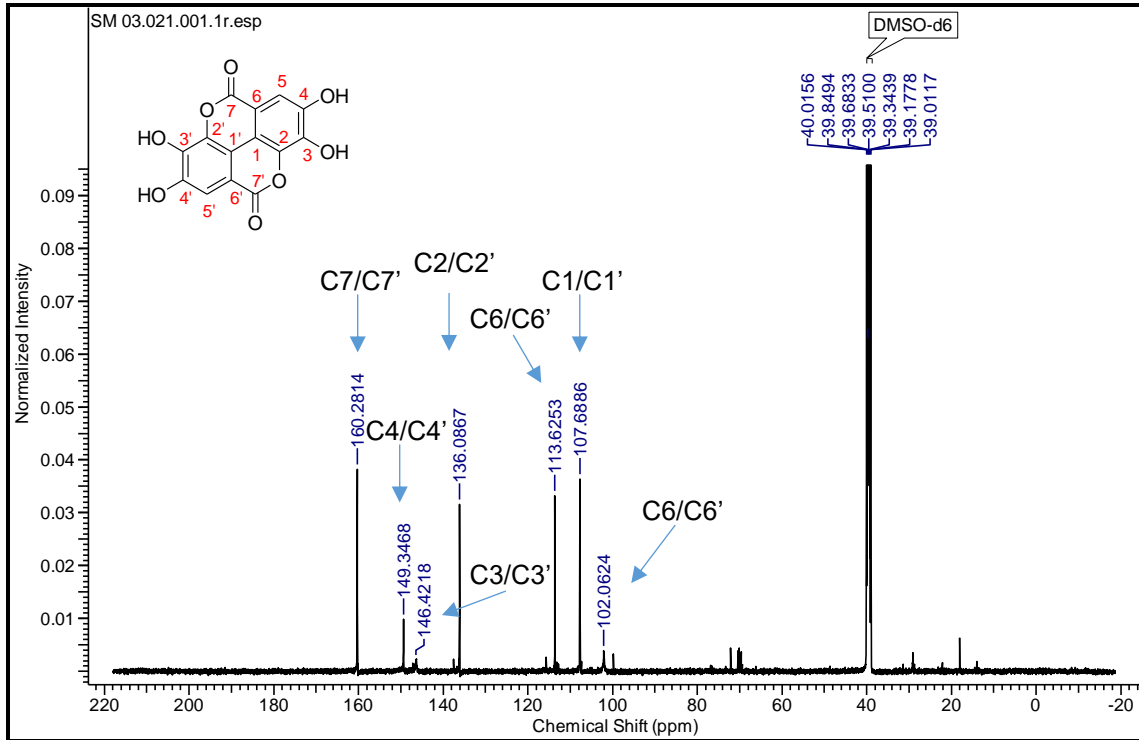


Figura 56. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT obtido para SM\_03 (125 MHz, DMSO).

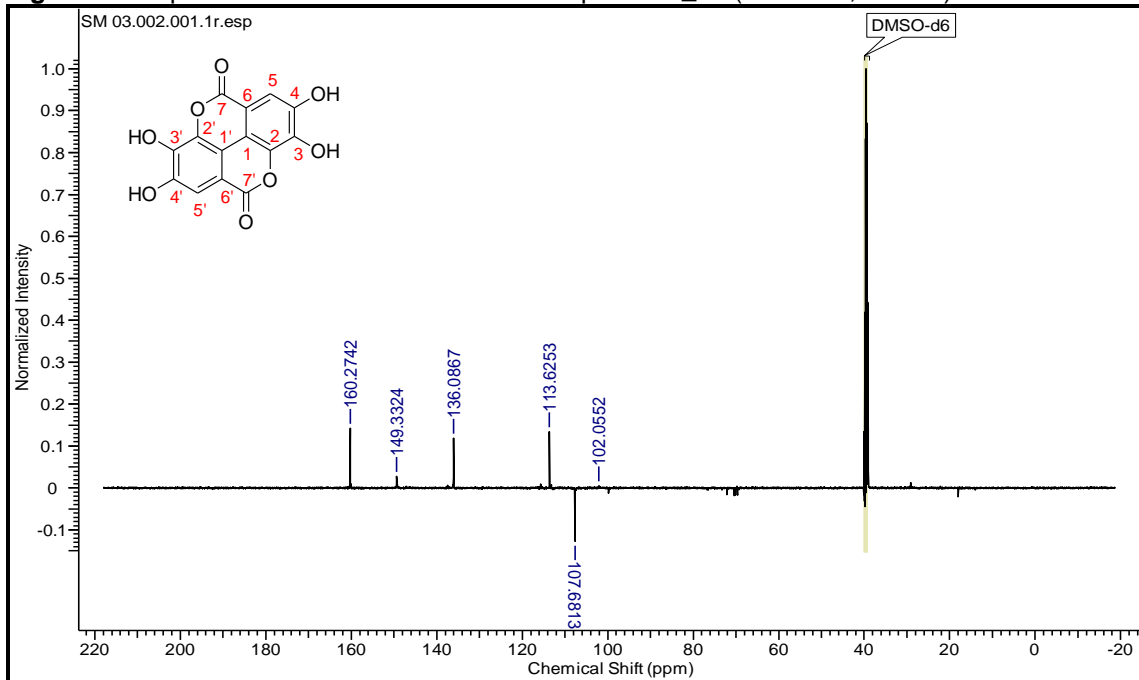


Figura 57. Espectro de HMQC obtido para SM\_03 (DMSO).

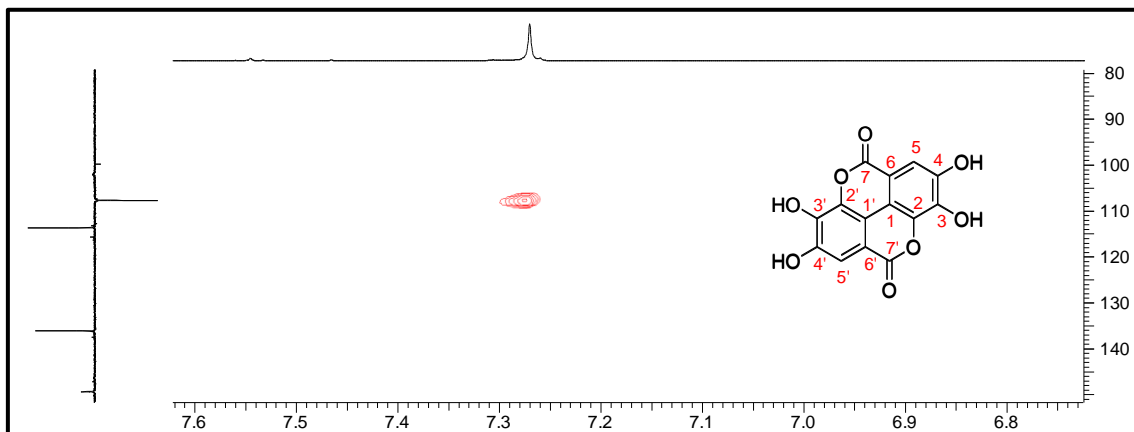
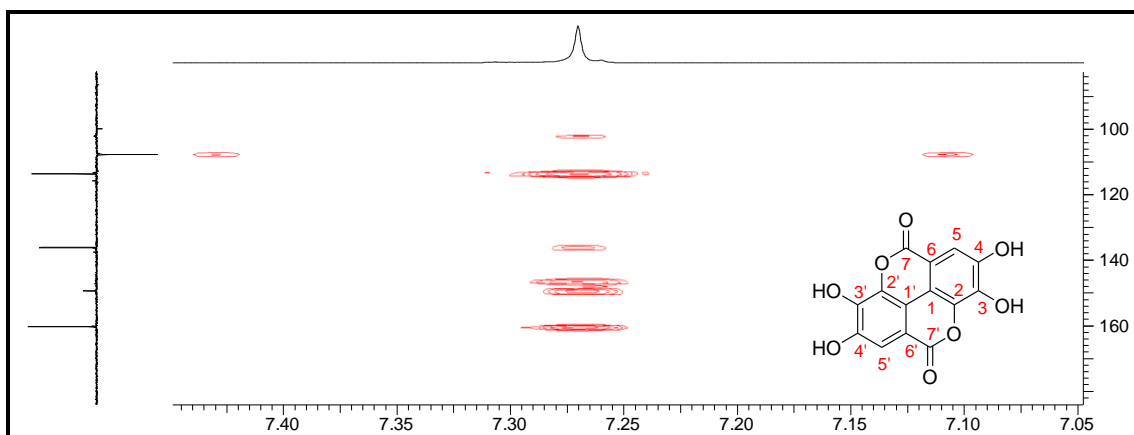


Figura 58. Espectro de HMBC obtido para SM\_03 (DMSO).



#### 5.1.4.3. Identificação estrutural da amostra SM-04a

A amostra SM-04a foi obtida a partir da adição de H<sub>2</sub>O à fração F2A\_S2 (item 4.1.3.3, p. 47). Esse procedimento levou a formação de um precipitado insolúvel em água, que foi separado por meio de centrifugação e filtração. A amostra se apresentou como um pó amorfo amarelo, solúvel em DMSO.

Por meio da análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (500 e 125 MHz, DMSO) foi verificado que a amostra SM\_04a trata-se de uma mistura de duas substâncias (SM\_04a<sup>1</sup> e SM\_04a<sup>2</sup>), visto que seus dados de RMN revelaram a presença de dois conjuntos de sinais com diferentes proporções (Figuras 61-62).

O primeiro conjunto de sinais dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C exibiu sinais e correlações similares ao apresentado pela amostra SM-03. Nesse

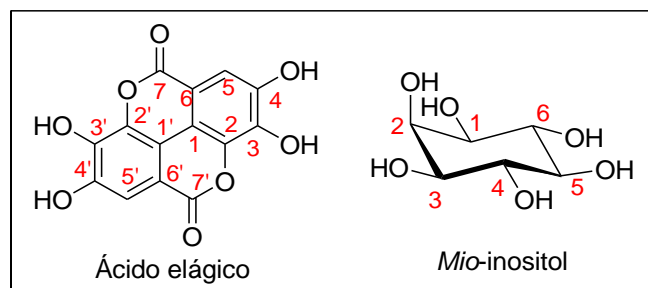


conjunto, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresentou um sinal singleto intenso em  $\delta_{\text{H}}$  7,28 ppm e o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostrou sete sinais na região entre  $\delta_{\text{C}}$  102,4 - 160,1 ppm. A partir das informações obtidas com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D) e comparação com os dados da literatura, a substância foi identificada como ácido elágico.

Considerando o segundo conjunto de dados, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 61, p. x) mostrou a presença de quatro sinais característicos de hidrogênios de carbonos carbinólicos:  $\delta_{\text{H}}$  3,70 (t,  $J = 2,6$  Hz, H-2);  $\delta_{\text{H}}$  3,35 (t,  $J = 9,3$  Hz, H-4 e H-6);  $\delta_{\text{H}}$  3,12 (dd,  $J = 2,6$  e  $9,65$  Hz, H-1 e H-3) e  $\delta_{\text{H}}$  2,91 ppm (t,  $J = 9,0$  Hz, H-5). Com base nos valores dos sinais e das constantes de acoplamento, pode-se observar que a substância apresenta sinais similares ao apresentado pela amostra SM-04b.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 62-63, p. x) apresentou quatro sinais de carbonos metínicos:  $\delta_{\text{C}}$  75,4 (C-5);  $\delta_{\text{C}}$  72,8 (C-2);  $\delta_{\text{C}}$  72,6 (C-4/C-6) e  $\delta_{\text{C}}$  72,0 ppm (C-1/C-3). Com base nas informações espectrais obtidas, aliada à comparação com dados espectrométricos descritos na literatura foi possível identificar a substância como o *mio*-inositol.

Figura 64. Estrutura das substâncias identificadas na amostra SM\_04a.



**Tabela 8.** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz, respectivamente) da amostra SM\_04a<sup>1</sup> em DMSO.

C	SM_04a <sup>1</sup>					Ácido elágico*	
	$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$^4J_{CH}$	$\delta_c$	$\delta_H$
1	113,47	-	-	H5	-	112,57	-
1'	113,47	-	-	H5'	-	112,57	-
2	136,02	-	-	-	H5	136,33	-
2'	136,02	-	-	-	H5'	136,33	-
3	145,70	-	-	H5	-	140,88	-
3'	145,70	-	-	H5'	-	140,88	-
4	149,14	-	H5	-	-	148,35	-
4'	149,14	-	H5'	-	-	148,35	-
5	107,74	7,28 (s)	-	-	-	109,74	7,42 (s)
5'	107,74	7,28 (s)	-	-	-	109,74	7,42 (s)
6	102,36	-	H-5	-	-	106,56	-
6'	102,36	-	H5'	-	-	106,56	-
7	160,08	-	-	H5	-	159,34	-
7'	160,08	-	-	H5'	-	159,34	-

**Legenda:** SM\_04a = dados obtidos no presente trabalho (DMSO).s singlete.

Fonte: \*AZEVEDO, 2017.

**Tabela 9.** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz, respectivamente) da amostra SM\_04a<sup>2</sup> em DMSO.

C	SM_04a <sup>2</sup>				Mio-inositol*	
	$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_c$	$\delta_H$
1	71,89	3,13 (dd, J = 2,6 e 9,6 Hz)	H6	-	73,20	3,54 (dd)
2	72,78	3,70 (t, J = 2,6 Hz)	-	-	72,98	4,07 (t)
3	71,89	3,13 (dd, J = 2,6 e 9,6 Hz)	H4	-	73,20	3,54 (dd)
4	72,67	3,35 (t, J = 9,3 Hz)	H3; H5	-	71,93	3,64 (t)
5	75,26	2,91 (t, J = 9,0 Hz)	H4/H6	-	75,15	3,29 (t)
6	72,67	3,35 (t, J = 9,3 Hz)	H1; H5	-	71,93	3,64 (t)

**Legenda:**SM\_04b = dados obtidos no presente trabalho (D<sub>2</sub>O). **dd**duplete duplo; **t**tripleto; **J** constante de acoplamento, unidade Hertz.

Fonte: \*REBECCA; BOYCE; SOMASUNDRAM, 2012.

Figura 61. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para SM\_04a (500 MHz, DMSO).

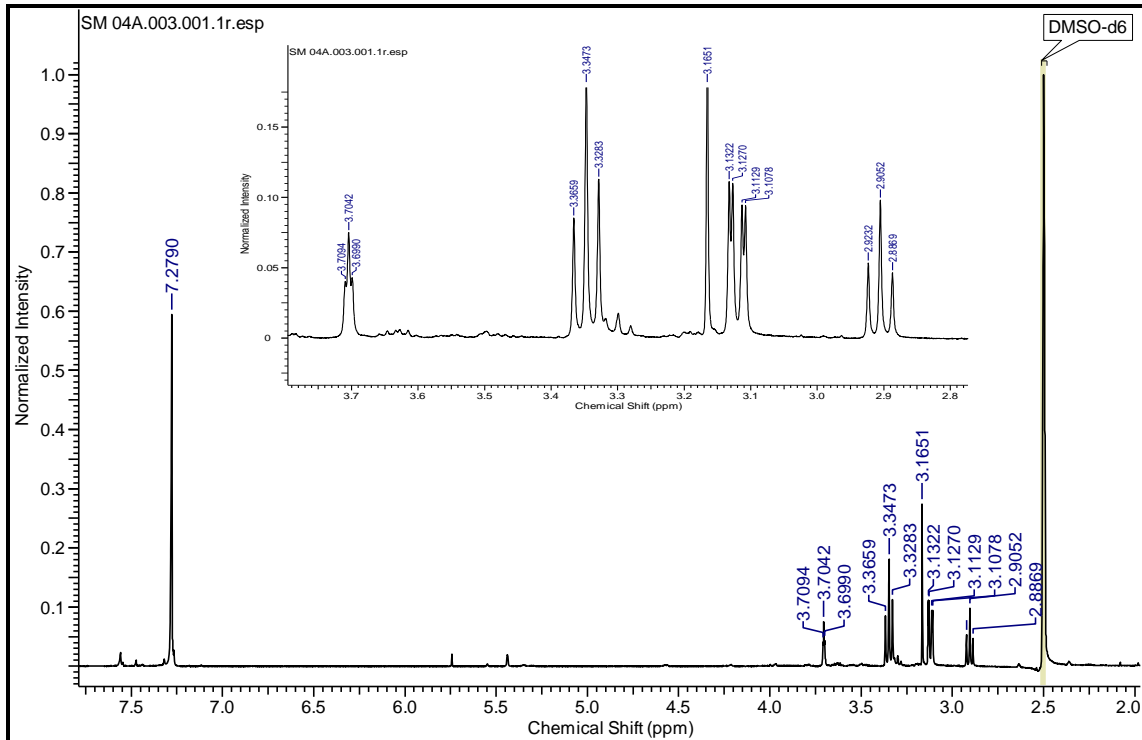


Figura 62. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para SM\_04a (125 MHz, DMSO).

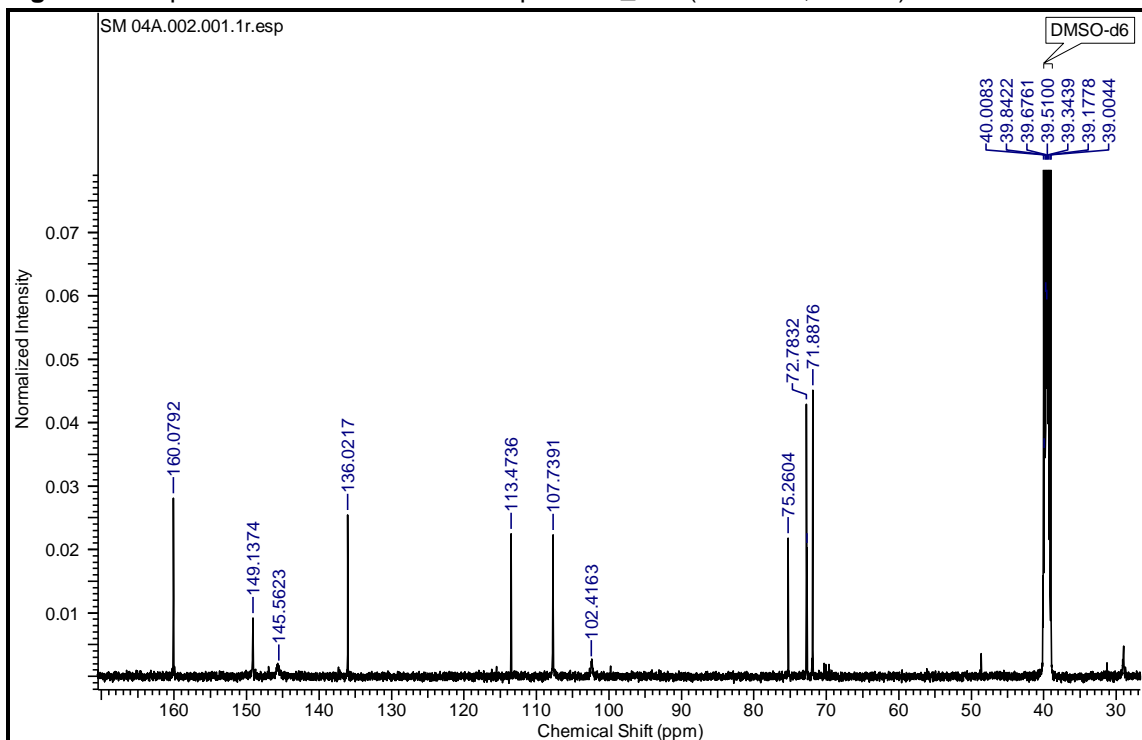
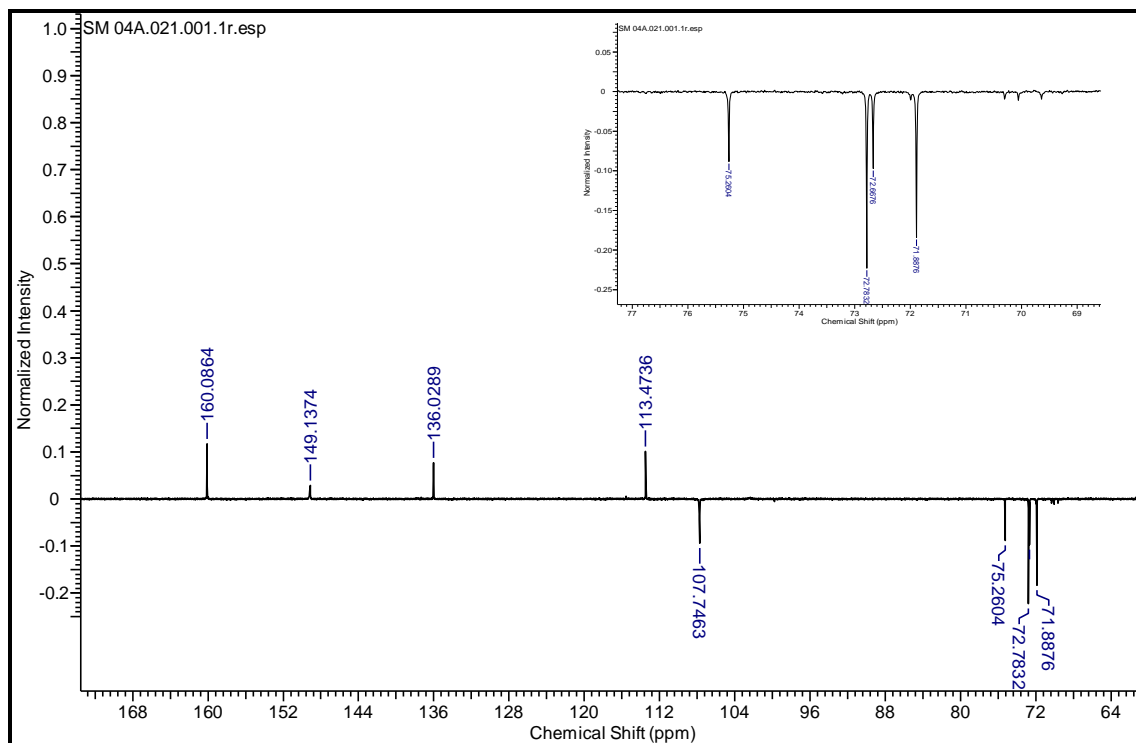


Figura 63. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT obtido para SM\_04a (125 MHz, DMSO).

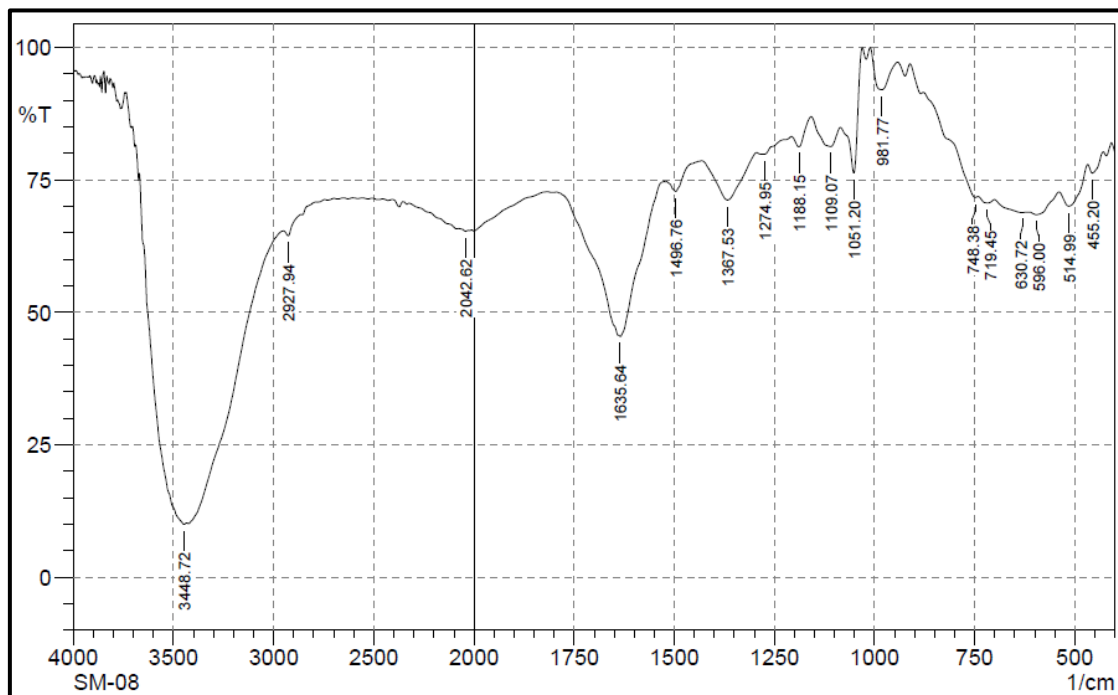


#### 5.1.4.4. Identificação estrutural da amostra SM-08

A amostra SM-08 foi obtida a partir do fracionamento cromatográfico da partição em AcOEt do extrato em MeOH (o procedimento metodológico pode ser observado na pág. 51). A análise em CCDA, utilizando-se como eluente AcOEt, revelou a presença de uma única mancha de coloração azul escuro quando revelada com solução de  $\text{FeCl}_3$  (2%), esta observação sugere tratar-se de uma substância fenólica. A amostra se apresentou como cristais de coloração amarela esolúveis em MeOH.

Na Figura 65, o espectro de absorção na região do infravermelho de SM-08, obtido em KBr, exibiu uma intensa absorção em  $\nu_{\text{OH}}$   $3448\text{ cm}^{-1}$  atribuído a presença de grupos hidroxilas, baixa intensidade em  $\nu_{\text{C=O}}$   $1635\text{ cm}^{-1}$  característico da deformação axial da ligação dupla C=O, além de sinais correspondentes a presença de ligação dupla C=C e de ligação C-H de anel aromático.

Figura 65. Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra SM-08.



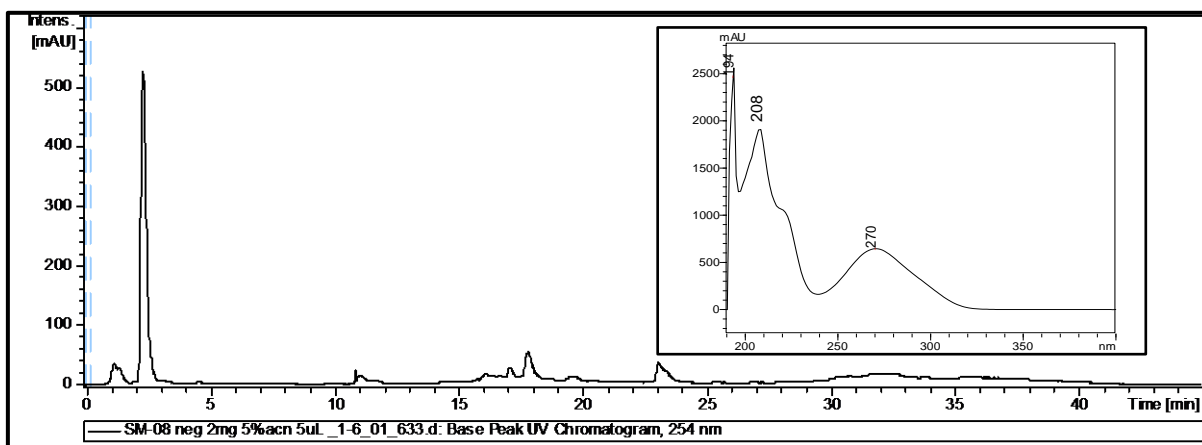
A amostra foi submetida à análise em LC-MS utilizando como fase móvel água deionizada (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos acidificadas com ácido fórmico (0,1%). A temperatura do forno empregada foi de 40 °C e fluxo a 0,25 mL/min. A solução de injeção foi preparada na concentração de 2,0 mg/mL em solução de acetonitrila:água deionizada (5%). O volume de injeção da amostra foi de 5 µL. A análise foi realizada com o gradiente em função da concentração do solvente B, com base na programada a seguir (Tabela 10).

**Tabela 10.** Programação aplicada na análise da amostra SM-08 por LC-MS.

Tempo	Módulo	Ação	Concentração (%)
0,01	Controle	Iniciar	
0,02	Bomba	Concentração B	5
1,00	Bomba	Concentração B	5
10,00	Bomba	Concentração B	5
15,00	Bomba	Concentração B	35
25,00	Bomba	Concentração B	45
30,00	Bomba	Concentração B	100
35,00	Bomba	Concentração B	100
40,00	Bomba	Concentração B	5
45,00	Bomba	Concentração B	5
45,10	Controle	Parar	

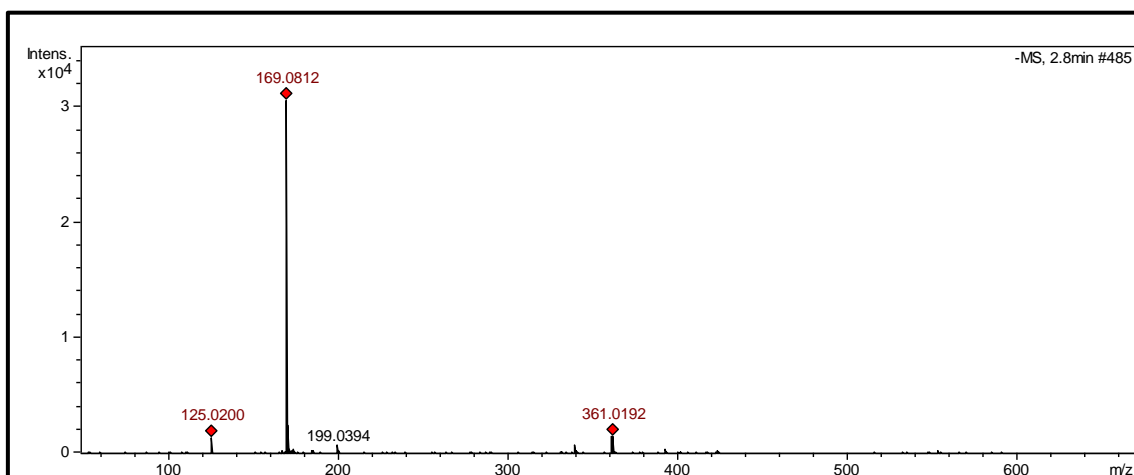
O cromatograma obtido com essa análise exibiu um sinal majoritário com tempo de retenção  $t_R = 2,8$  mim. O espectro na região do UV/Vis do pico majoritário apresentou absorções  $\lambda_{max}$  igual a 208 e 270 nm, que são características do ácido gálico (Figura 66).

**Figura 66.** Cromatograma (LC-MS) e espectro na região do UV/Vis do pico majoritário da amostra SM-08.



O espectro de massas de alta resolução, obtido no modo negativo, exibiu o íon quasi-molecular  $[M-H]^- = 169,0812$ , compatível com a fórmula molecular  $C_7H_5O_5^-$  (calculado  $m/z$  169,0142) (Figura 67).

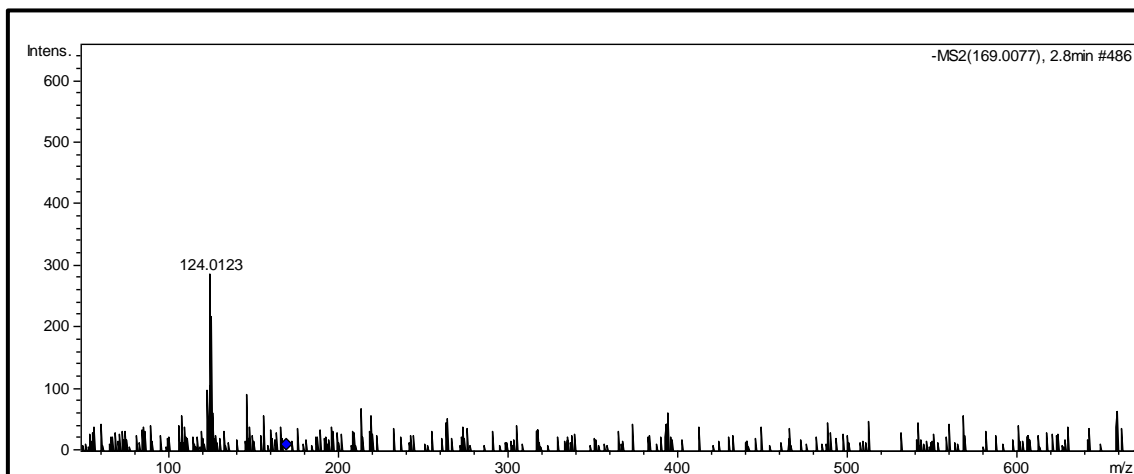
**Figura 67.** Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da amostra SM-08.



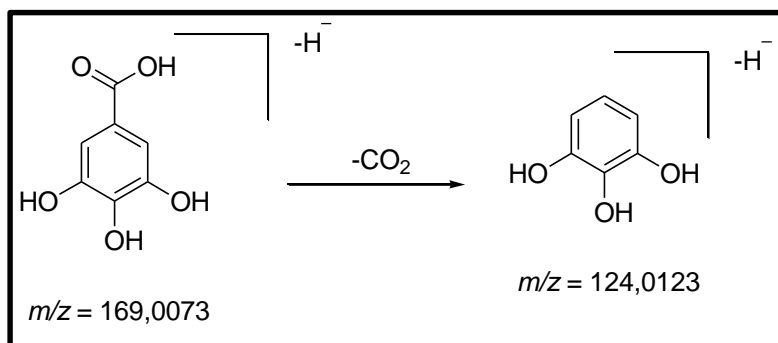
No espectro de segunda ordem ( $MS^2$ ) (Figura 68), o fragmento com  $m/z$  124,0123 ( $C_{14}H_4O_7^-$ ) foi gerado pela perda de uma molécula de  $CO_2$  (44 Da) e

do íon precursor, respectivamente. Esse fragmento é característico do ácido gálico. A proposta de fragmentação da amostra SM-08 está esquematizada na Figura 69.

**Figura 68.** Espectro de massa/massa de alta resolução (ESI-MS<sup>2</sup>), modo negativo, do íon quasi-molecular [M-H]<sup>-</sup> = 169,0073 (amostra SM-08).



**Figura 69.** Proposta de fragmentação para a amostra SM-08.



Fonte: YISIMAYILI *et al.*, 2019.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD), figura 70 (p. x), revelou a presença de um sinal em  $\delta_H$  7,03 ppm (2H, s, H-2 e H-6), característico de hidrogênios aromáticos ( $\delta_H$  6,0 a 8,0ppm) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

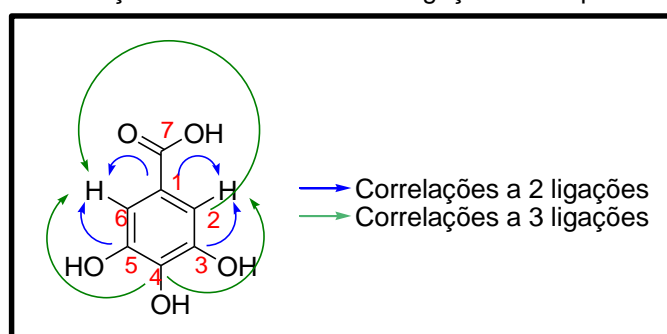
O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, MeOD), figura 71 (p. x), exibiu cinco sinais de carbono, sendo um de carbono metínico  $\delta_C$  110,5 ppm (C-2/C-6) e 4 de carbonos quartenários  $\delta_C$  170,9 (C-7);  $\delta_C$  146,5 (C-3/C-5);  $\delta_C$  139,5 (C-4) e  $\delta_C$  122,7 ppm (C-1).

A análise do mapa de correlação HMQC permitiu estabelecer a correlação

entre o sinal  $\delta_H$  7,03 (H-2/H-6) e o  $\delta_C$  110,5 (C-2/C-6) (Figura 72, p. x). Essas informações sugerem uma estrutura molecular aromática simétrica com quatro carbonos substituídos (MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011).

A partir do mapa de correlação HMBC (Figura 73, p. x) foi possível verificar a correlação a longa distância entre o sinal  $\delta_H$  7,03 (H-2/H-6) com todos os sinais de carbono da substância. Na Figura 74 são apresentadas algumas das correlações observadas à longa distância.

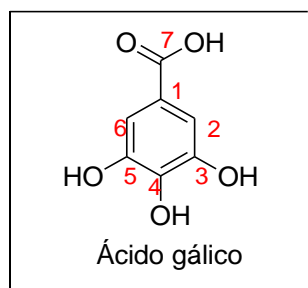
**Figura 74.** Algumas correlações observadas a 2 e 3 ligações no espectro de HMBC.



Com base nas informações obtidas com os espectros, que aliada à comparação com dados espectrométricos descritos na literatura, foi possível identificar a substância como o ácido gálico.

A literatura reporta a presença do ácido gálico nas folhas e sementes de *L. pisonis*, no entanto, nos madeira este é o primeiro relato (FERREIRA, 2016; BARRETO, 2017; DEMOLINER *et al.*, 2018).

**Figura 75.** Estrutura da substância identificada na amostra SM-08.





**Tabela 11.** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz, respectivamente) da amostra SM-08 em MeOD.

SM-08					Ácido gálico*	
C	$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_c$	$\delta_H$
1	122,66	-	H2/H6	-	120,7	-
2	110,46	7,03 (s)	-	H6	108,8	6,92 (s)
3	146,47	-	H2	-	145,4	-
4	139,53	-	-	H2/H6	138,0	-
5	146,47	-	H6	-	145,4	-
6	110,46	7,03 (s)	-	H2	108,8	6,92 (s)
7	170,93	-	-	H2/H6	167,6	-

**Legenda:** SM\_08 = dados obtidos no presente trabalho (MeOD). **s** singletto.

Fonte: \*MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011.

**Figura 70.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para SM\_08 (500 MHz, MeOD).

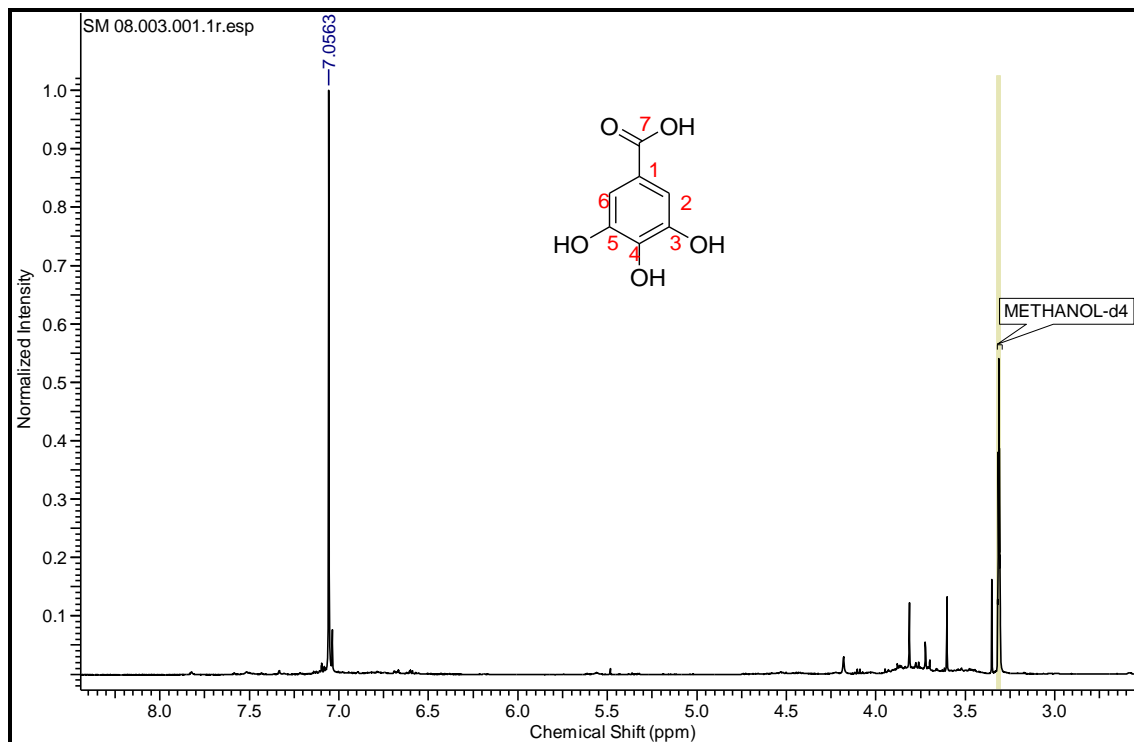


Figura 71. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para SM\_08 (125 MHz, MeOD).

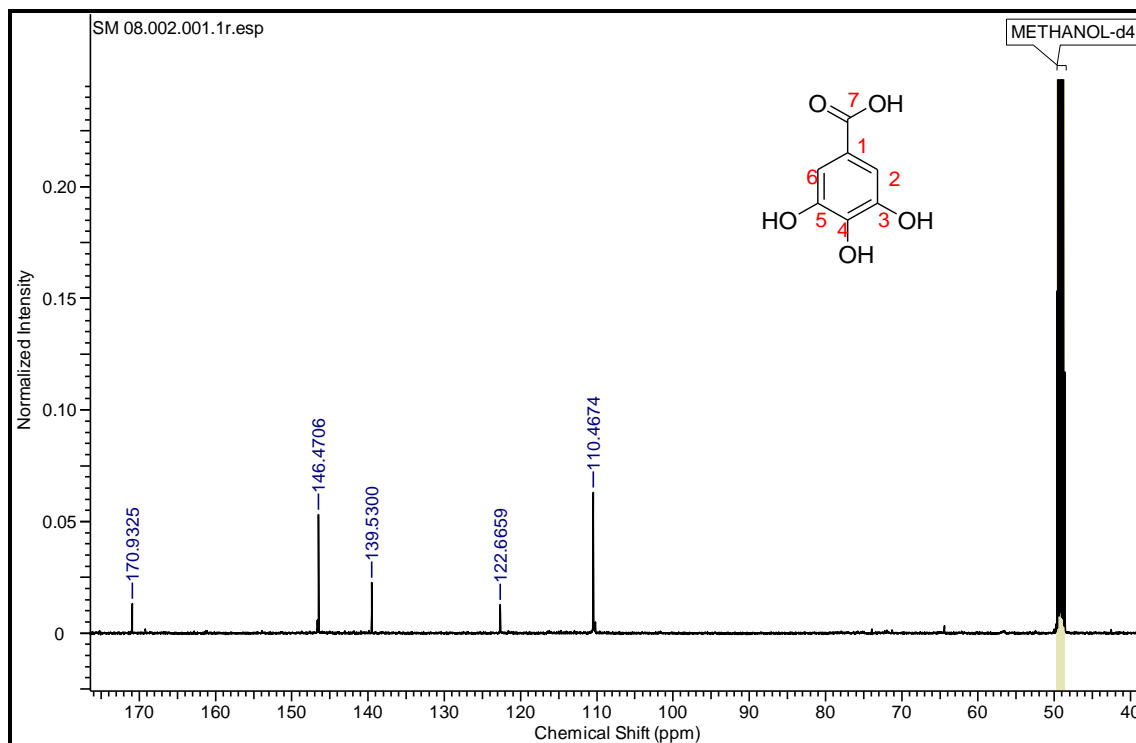


Figura 72. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT obtido para SM\_08 (125 MHz, MeOD).

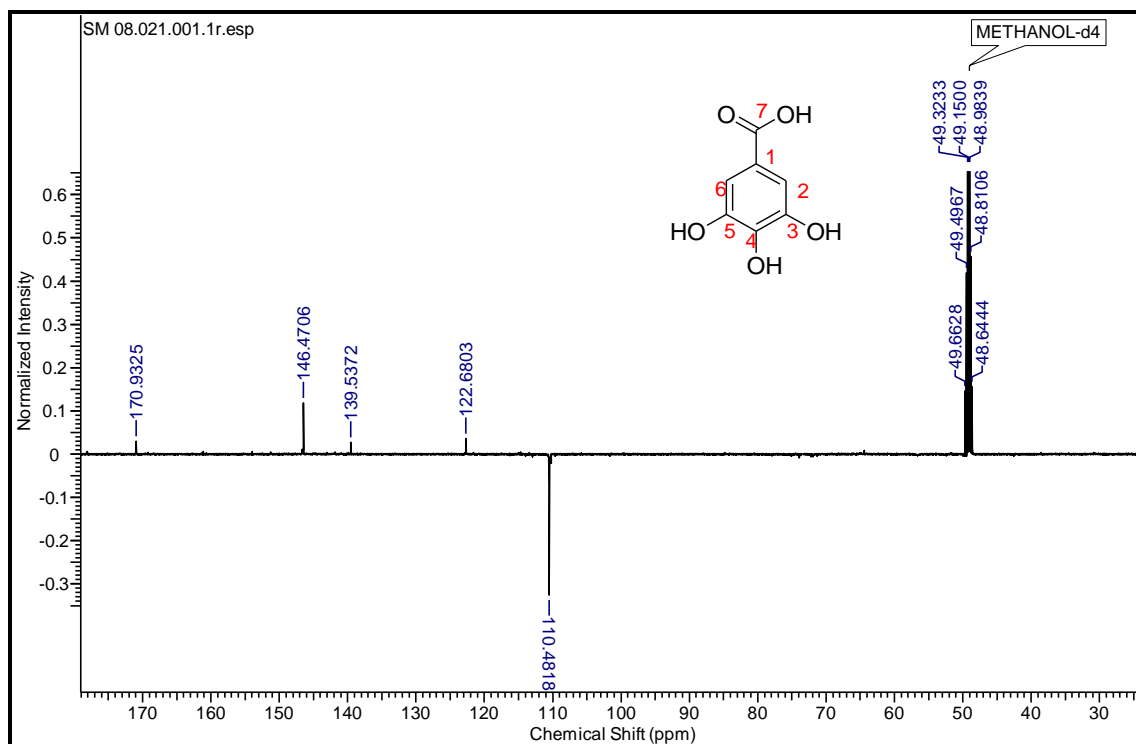


Figura 73. Espectro de HMQC obtido para SM\_08 (MeOD).

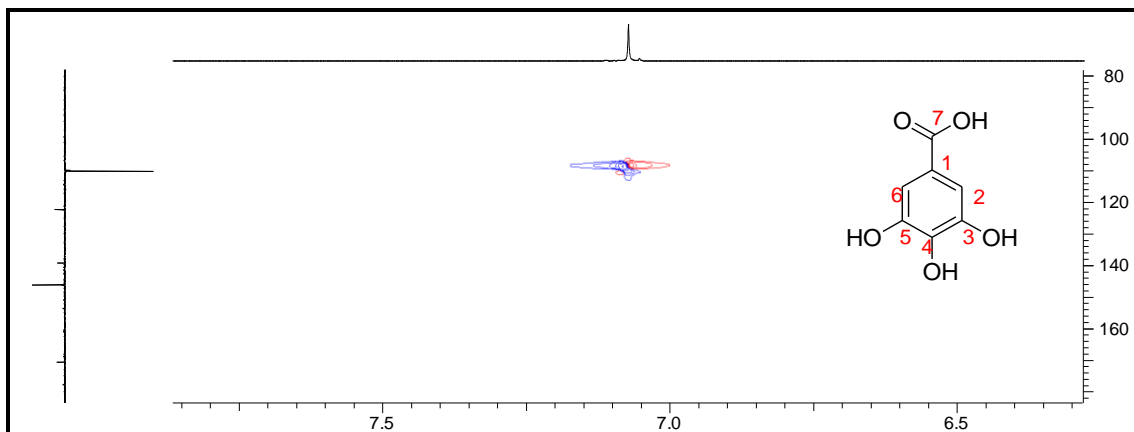
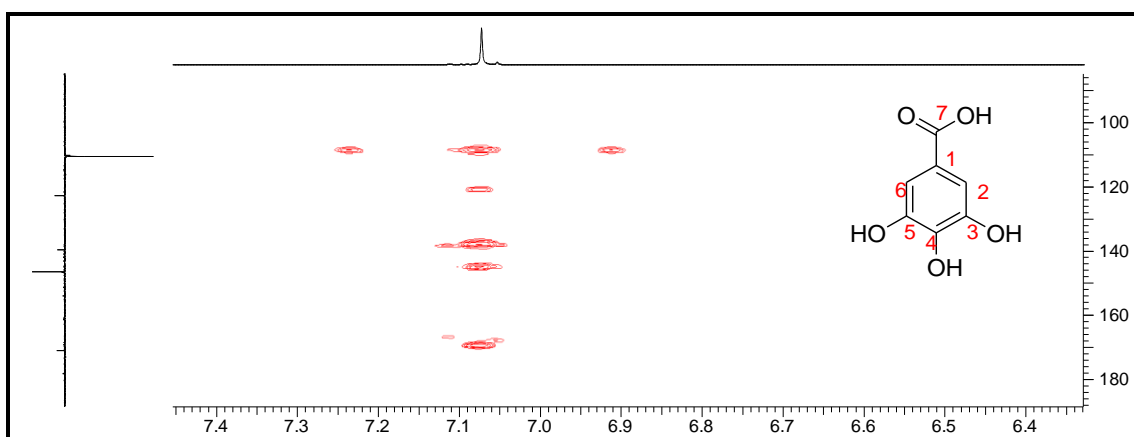


Figura 74. Espectro de HMBC obtido para SM\_08 (MeOD).



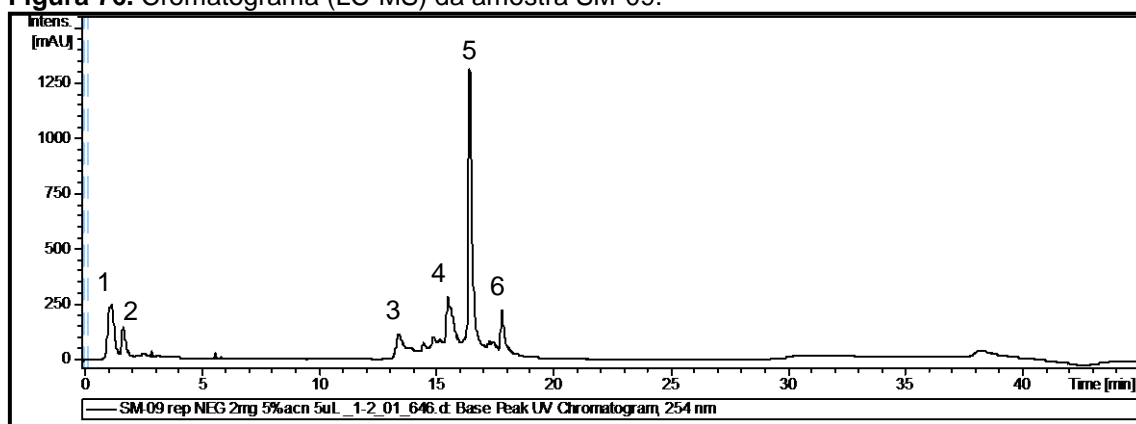
#### 5.1.4.5. Identificação estrutural da amostra SM-09

A amostra SM-09 foi obtida a partir do fracionamento cromatográfico da partição em AcOEt (F1-FAc) do extrato em MeOH (o procedimento metodológico pode ser observado na pág. 51). A análise em CCDA (em sílica ge), utilizando-se como eluente uma mistura dos solventes AcOEt:HCOOH:CH<sub>3</sub>COOH:CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O (100:1:2:10:3) revelou a presença de uma mancha majoritária de coloração azul escuro quando revelada com solução de FeCl<sub>3</sub> (2%), esta observação sugere tratar-se de uma substância fenólica. A amostra se apresentou oleosa de coloração amarela e pouco solúvel em MeOH.

A amostra foi submetida à análise em LC-MS utilizando as mesmas condições e método de análise utilizados para a amostra SM-08 (Tabela 10, p.90).

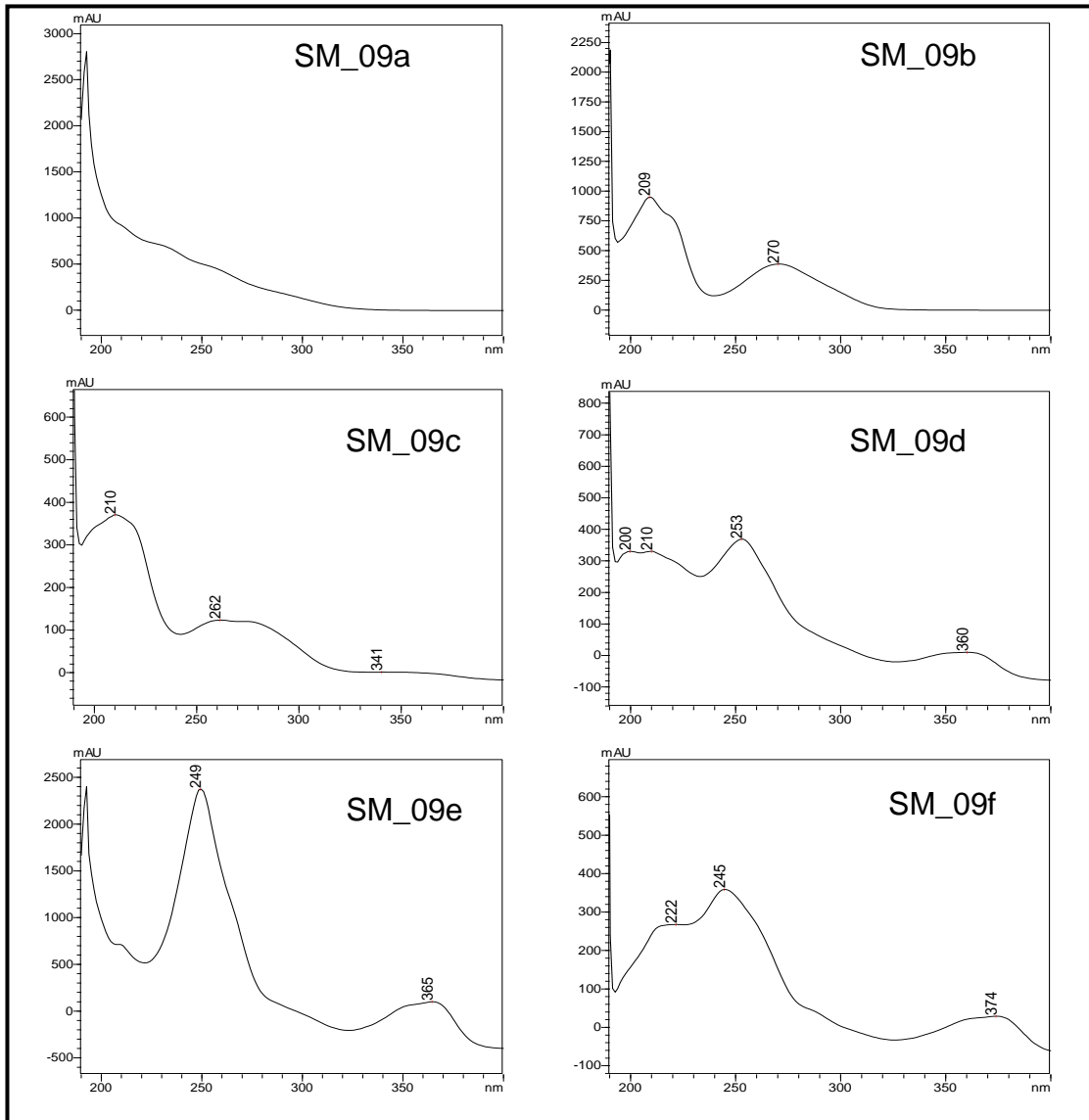
O cromatograma obtido com essa análise (Figura 76) exibiu a presença de seis sinais com tempo de retenção  $t_R$  a 1,7 (SM\_09a, pico n° 1); 2,3 (SM\_09b, pico n° 2), 14,5 (SM\_09c, pico n° 3), 15,7 (SM\_09d, pico n° 4), 16,9 (SM\_09e, pico n° 5) e 17,9 min (SM\_09f, pico n° 6).

Figura 76. Cromatograma (LC-MS) da amostra SM-09.



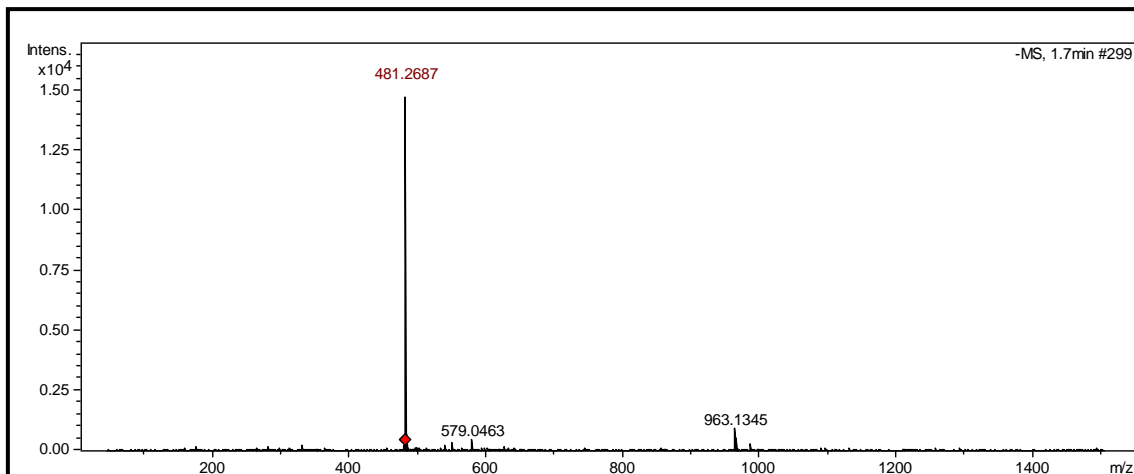
O espectro de absorção na região do UV/Vis do pico 1 (SM\_09a) se apresentou como uma inclinação, isto se deve a presença da unidade do ácido hexa-hidroxidifênico (HHDP) na molécula (HANHINEVA et al. (2008)). O pico 2 (SM\_09b) e o pico 3 (SM\_09c) apresentaram absorções  $\lambda_{max}$  em torno de 210 e 270 nm, que são características do ácido gálico. Os outros picos 4-6 (SM\_09d-f) exibiram absorções de UV/Vis em torno de 240-380 nm. Os espectros de UV/Vis podem ser visualizados na Figura 77.

Figura 77. Espectro de absorção na região UV/Vis (254 nm) das substâncias SM\_09a-f.

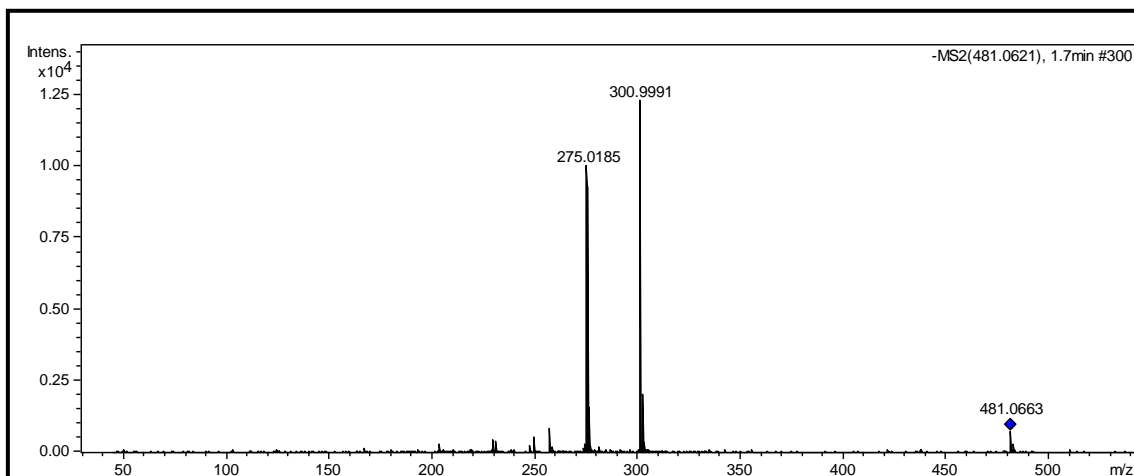


O pico 1 (SM\_09a) apresentou tempo de retenção precoce, o que também sugere a presença de grupos HHDP na estrutura da substância, uma vez que esses grupos tendem a diminuir o tempo de retenção dos elagitaninos (MOILANEM; SINKKONEN; SALMINEN, 2013). O espectro de massas exibiu íon quasi-molecular  $[M-H]^- = 481,2687$ , compatível com a fórmula molecular de  $C_{20}H_{17}O_{14}^-$  (calculado  $m/z$  481,0624), com fragmentos em  $m/z$  301 (perda de uma unidade de glicose -180 Da) e  $m/z$  275. Com base nas informações obtidas, sugere-se que a substância SM-09a trata-se do HHDP-glicose. Os espectros podem ser visualizados nas Figuras 78-79.

**Figura 78.** Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da substância SM-09a.

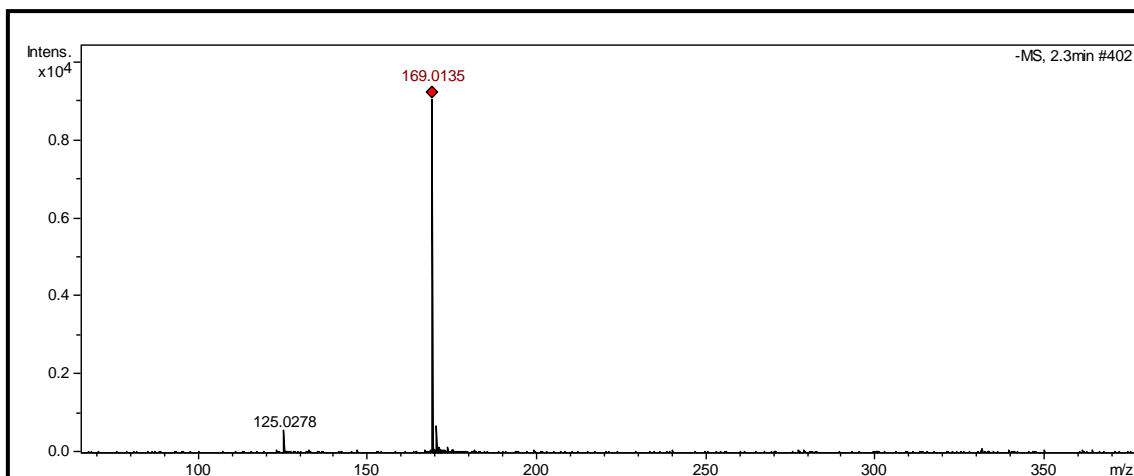


**Figura 79.** Espectro de massa/massa de alta resolução (ESI-MS<sup>2</sup>), modo negativo, do íon quasi-molecular [M-H]<sup>-</sup> = 481,0621 (substância SM-09a).



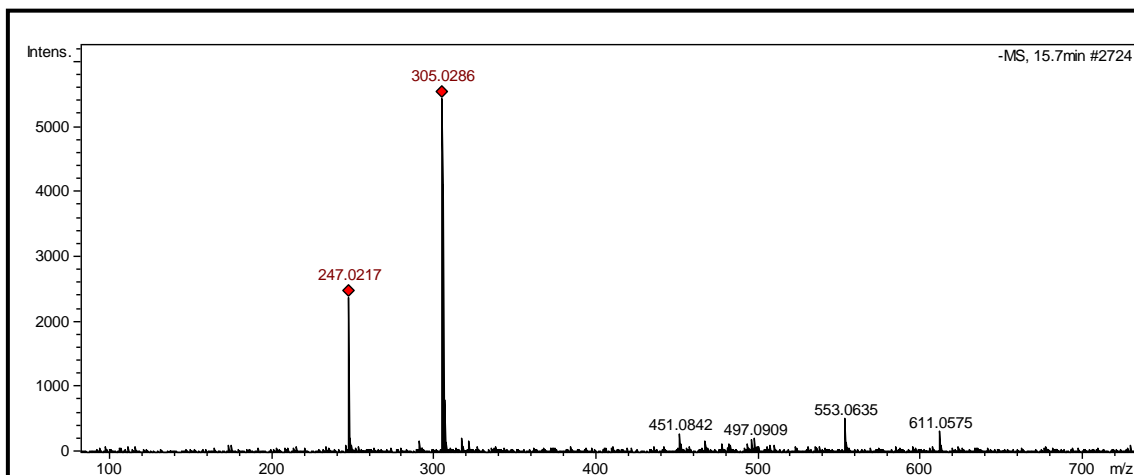
O pico 2 (SM\_09b) apresentou íon quasi-molecular [M-H]<sup>-</sup> = 169,0135, compatível com a fórmula molecular de C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub><sup>-</sup> (calculado *m/z* 169,0142), característico do ácido gálico, anteriormente identificado (item 5.1.4.4, p. 89). O espectro de massas de alta resolução pode ser observado na Figura 80.

**Figura 80.** Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da substância SM-09b.



O espectro de massas de alta resolução do pico 4 (SM-09d) exibiu o íon quasi-molecular  $[M-H]^- = 305,0286$ , compatível com a fórmula molecular  $C_{14}H_9O_8^-$  (calculado  $m/z$  305,0303) (Figura 81).

**Figura 81.** Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da substância SM-09d.

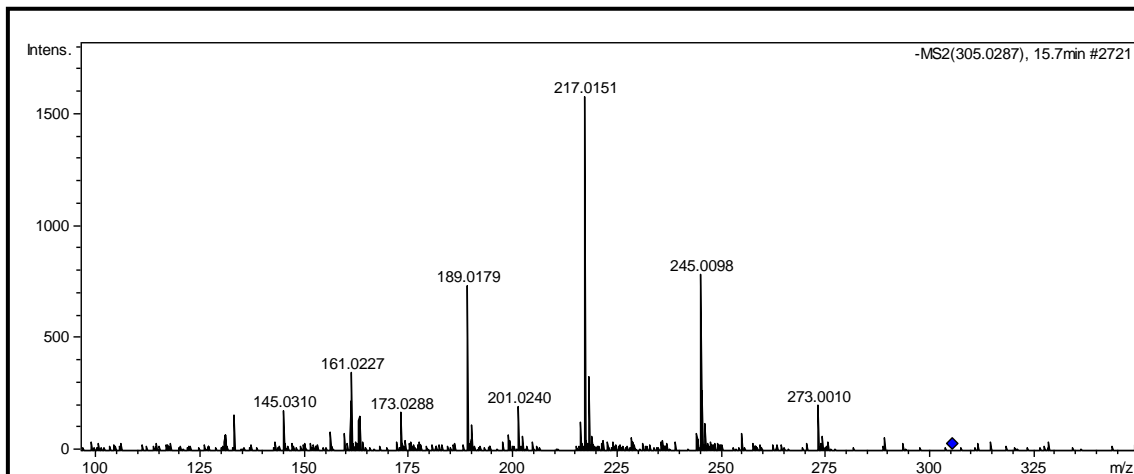


O espectro de segunda ordem ( $MS^2$ ) exibiu fragmentos com  $m/z$  273 ( $C_{13}H_5O_7^-$ ), 245 ( $C_{12}H_5O_6^-$ ) e 217 ( $C_{14}H_4O_8^-$ ), que foram gerados pela perda de uma molécula de  $CH_3OH$  (32 Da), de  $C_2H_4O_2$  (60 Da) e da perda de  $CO$  (28 Da), respectivamente. O espectro pode ser visualizado na Figura 82.

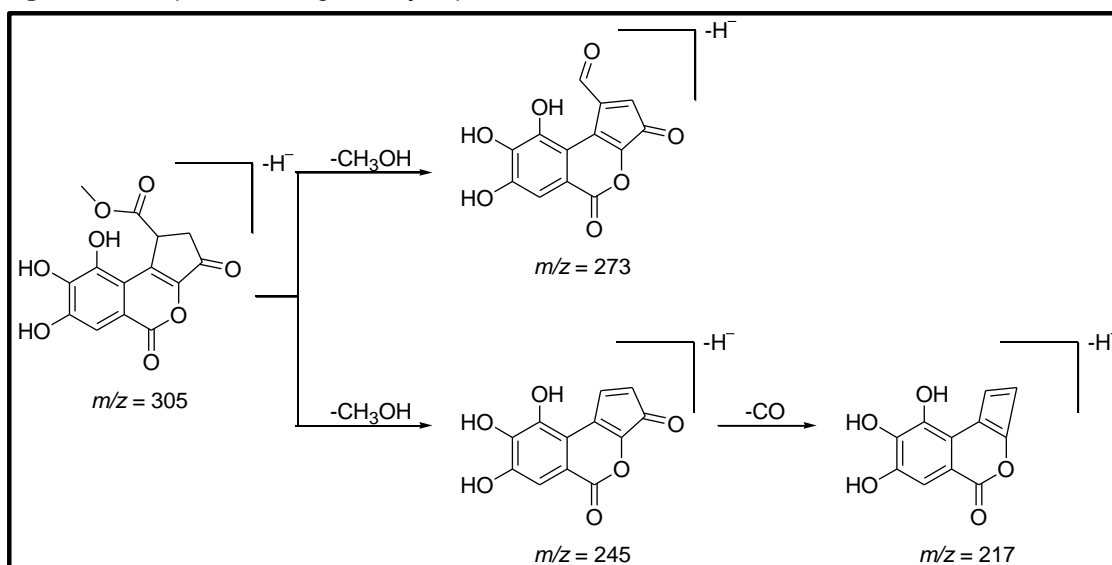
Com base no padrão de fragmentação, sugere-se que a substância SM-09d corresponde a isocumarina brevifolincarboxilato de metila (ZHU; DONG;

GUO, 2015). A proposta de fragmentação da substância SM-09d está esquematizada na Figura 83.

**Figura 82.** Espectro de massa/massa de alta resolução (ESI-MS<sup>2</sup>), modo negativo, do íon quasi-molecular [M-H]<sup>-</sup> = 305,0287 (substância SM-09d).



**Figura 83.** Proposta de fragmentação para a substância SM-09d.

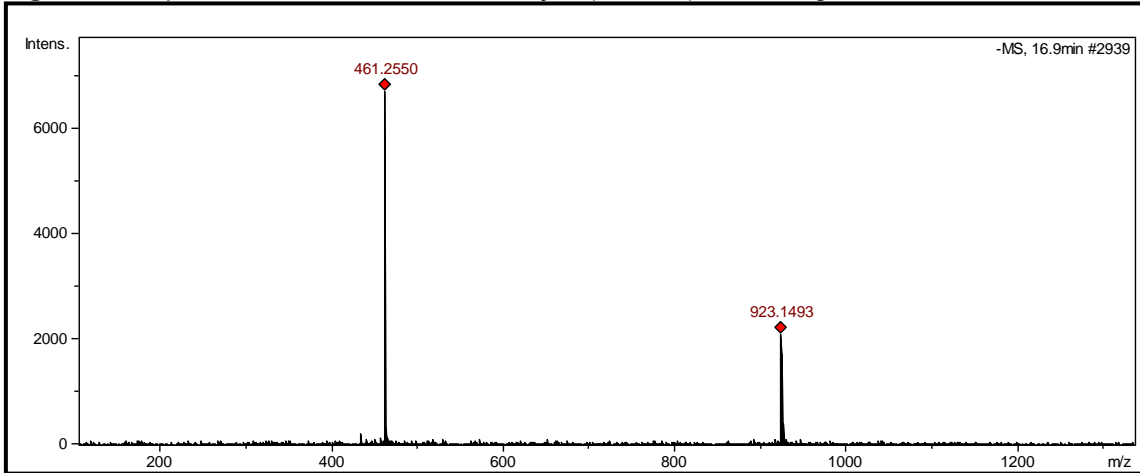


Fonte: elaborada pela autora.

O espectro de massas de alta resolução do pico 5 (SM-09e) exibiu o íon quasi-molecular [M-H]<sup>-</sup> = 461,0706. O [M-H]<sup>-</sup> é compatível com a fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>O<sub>12</sub><sup>-</sup> (calculado *m/z* 461,0798) (Figura 84).



**Figura 84.** Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da amostra SM-09e.



No espectro de segunda ordem (Figura 85) foram observados fragmentos com  $m/z$  315 ( $C_{15}H_7O_8^-$ ), que corresponde a perda de uma unidade de ramosa, 146 Da e 300 ( $C_{14}H_4O_8^-$ ), perda de uma metila. O padrão de fragmentação do íon  $m/z$  461 sugere que a substância SM\_09e corresponde ao ácido metililágico ramosídico (SILVA et al., 2019). A proposta de fragmentação da substância pode ser observada na Figura 86.

**Figura 85.** Espectro de massa/massa de alta resolução (ESI-MS<sup>2</sup>), modo negativo, do íon quasi-molecular  $[M-H]^- = 461,0706$  (amostra SM-09e).

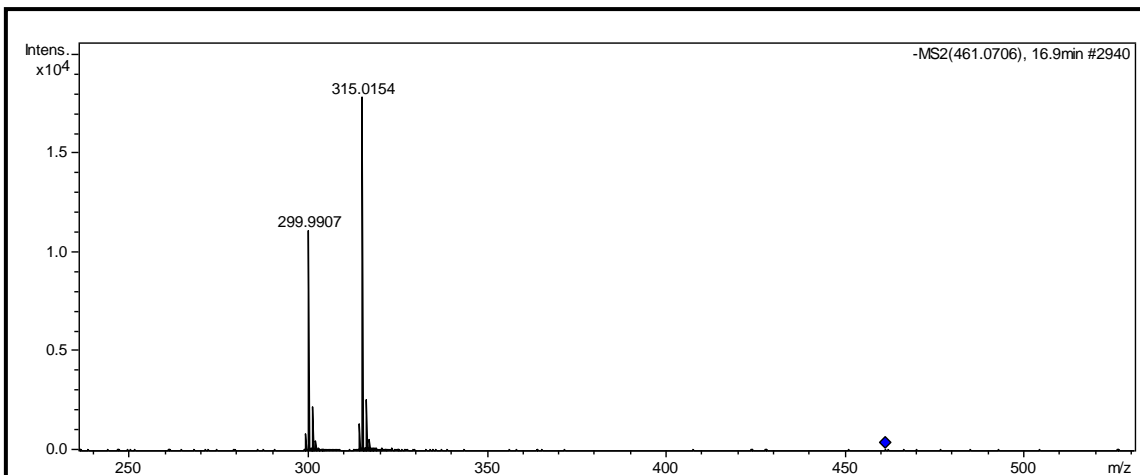
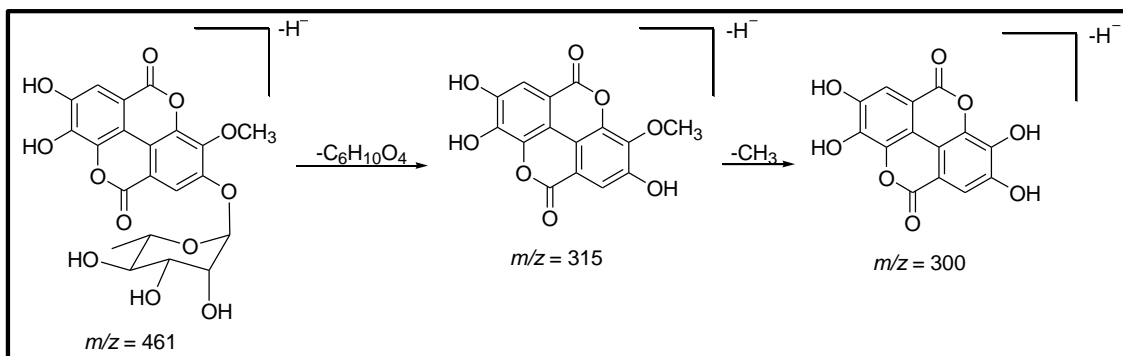


Figura 86. Proposta de fragmentação para a amostra SM\_09e.



Fonte: elaboração própria.

Na Tabela 12 estão listadas as informações sobre o tempo de retenção ( $t_R$ ), absorções de UV e dados do  $[M-H]^-$  e fragmentações ( $MS^2$ ) das substâncias presentes na amostra SM-09.

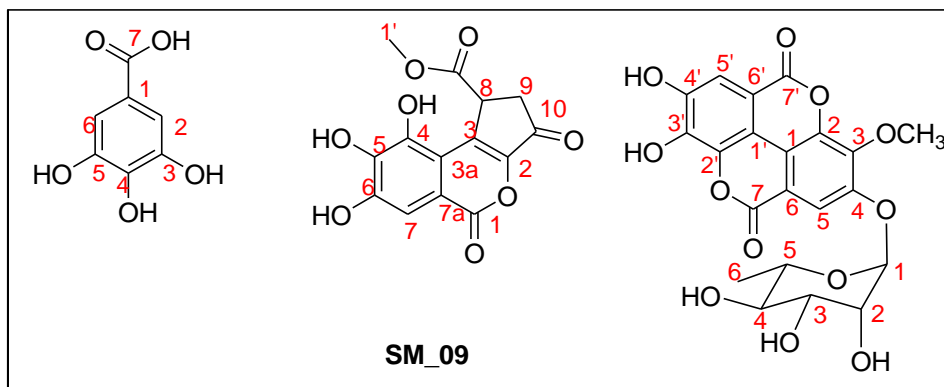
Tabela 12. Dados de LC-MS das substâncias detectadas na amostra SM-09.

	$T_R$ (min)	UV (nm)	$[M-H]$ $m/z$	$MS^2$ $m/z$	Substância
SM_09a	1,7	inclinação	481	301, 275	HHDP-glicose
SM_09b	2,3	209, 270	169	-	Ácido gálico
SM_09c	14,5	262, 341	-	-	Não identificado
SM_09d	15,7	253, 360	305	273, 245, 217	Brevifolincarboxilato de metila
SM_09e	16,9	249, 365	461	315, 300	Ácido metilgálico ramnosídeo
SM_09f	17,9	245,374	483	451, 395, 300	Não identificado

Fonte: elaboração própria.

Pelo melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro relato da presença do brevifolincarboxilato de metila, ácido metilgálico ramnosídeo e do elagitanino HHDP-glicose em *L. pisonis*. Cumarina e isocumarinas foram identificadas na madeira de *Gustavia hexapetala* e nas cascas do caule de *Couroupita guianensis*, respectivamente (PETTIT *et al.*, 2004; SARKAR *et al.*, 2013). O ácido metilgálico ramnosídeo foi identificado anteriormente em resíduos de biomassa de *Bertholletia excelsa* usando análises de HPLC-DAD-MS/MS (SILVA *et al.*, 2019).

Figura 87. Estrutura das substâncias identificadas na amostra SM-09.

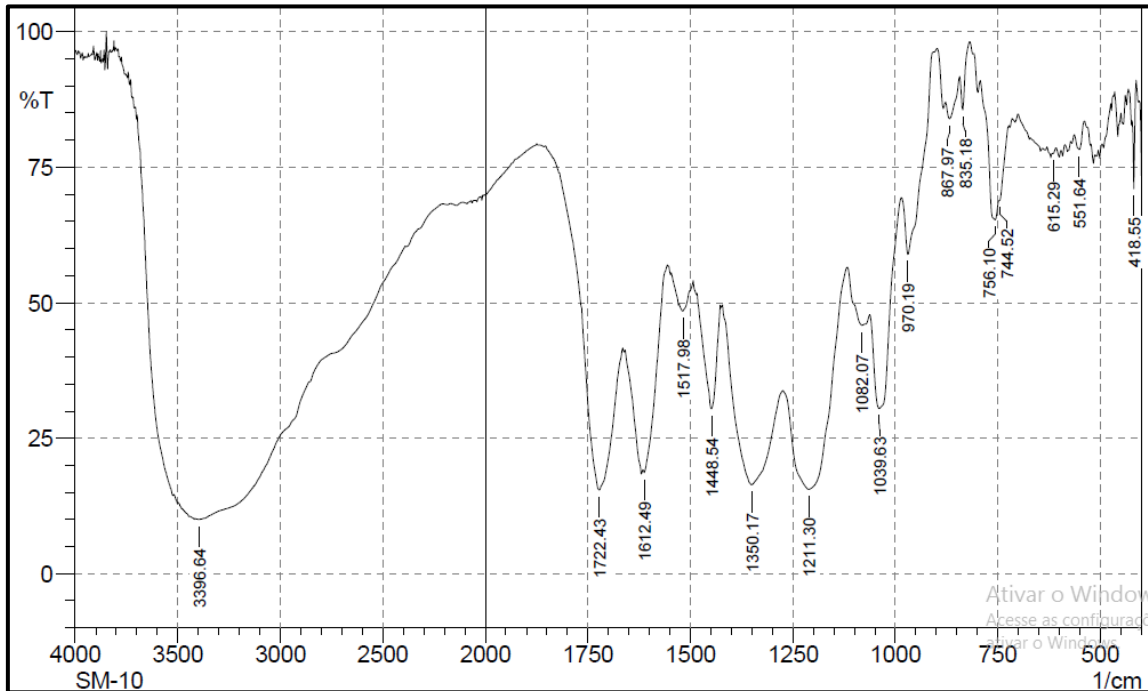


#### 5.1.4.6. Identificação estrutural da amostra SM-10

A amostra SM-10 foi obtida a partir do fracionamento cromatográfico da partição em AcOEt do extrato em MeOH (o procedimento metodológico pode ser observado na pág. 51). A análise em CCDA, utilizando-se como eluente uma mistura de AcOEt:HCOOH:CH<sub>3</sub>COOH:CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O (100:1:2:10:3), revelou a presença de uma mancha majoritária de coloração azul escuro quando revelada com solução de FeCl<sub>3</sub> (2%). Esta observação sugere tratar-se de uma substância fenólica. A amostra apresentou-se com um aspecto oleoso de coloração amarela e solúvel em MeOH.

Na Figura 88, o espectro de absorção na região do infravermelho de SM-10, obtido em KBr, exibiu bandas intensas em  $\nu_{OH}$  3396 cm<sup>-1</sup> e  $\nu_{C=O}$  1722 cm<sup>-1</sup>, referentes a presença de grupos hidroxilas e ligação dupla C=O.

Figura 88. Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra SM-10.

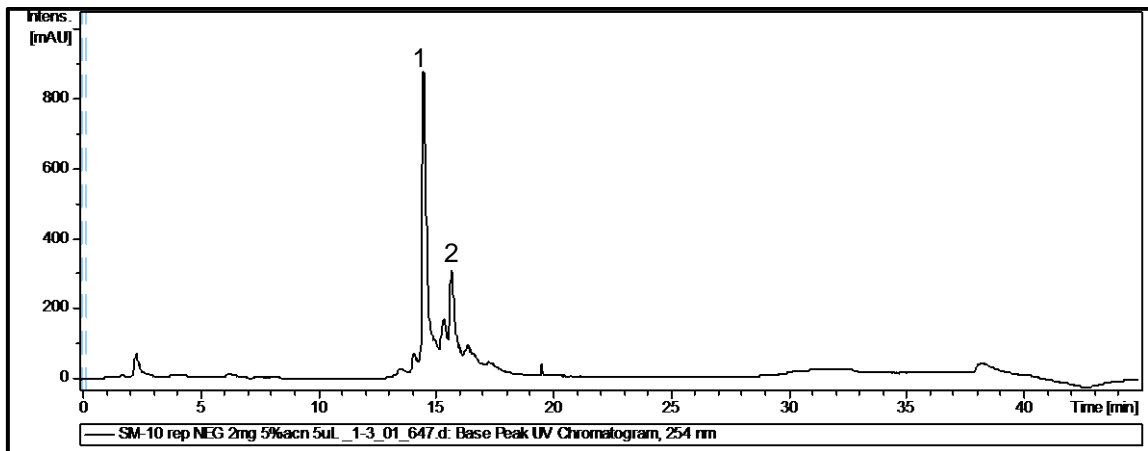


A amostra SM-10 foi submetida à análise em LC-MS utilizando o mesmo método e condições empregados para a amostra SM-08 (Tabela 10, p. 90).

Na análise por LC-MS da amostra SM-10, foram detectados dois picos majoritários com  $t_R$  a 15,0 (SM-10a, pico n° 1) e 16,4 min (SM-10b, pico n° 2).

O cromatograma dessa amostra pode ser visualizado na Figura 89.

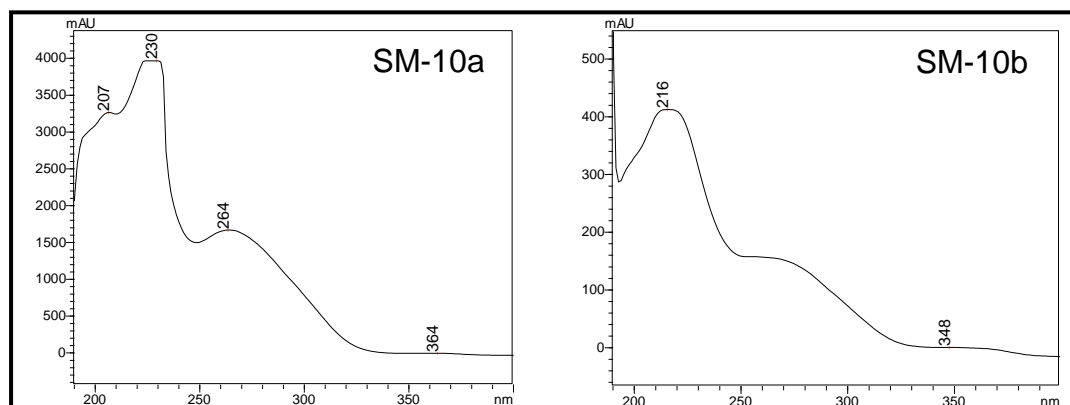
Figura 89. Cromatograma (LC-MS) da amostra SM-10.



O pico 1 (SM-10a) exibiu duas absorções máximas de UV em torno de 210-230 nm e 270-280 nm (Figura 90). Essas absorções são características de elagitaninos. Elagitaninos são ésteres do ácido hexa-hidroxidifênico (HHDP) e um poliol, geralmente glicose ou ácido quinínico, que pertencem à classe de polifenóis de taninos hidrolisáveis (Okuda et al., 2009).

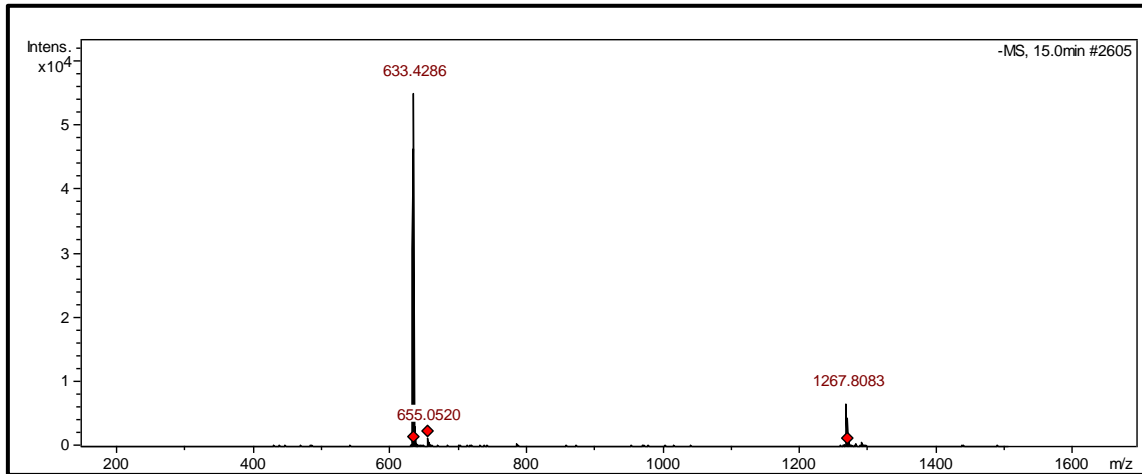
De acordo com Hanhineva et al., (2008), a intensidade das absorções dos espectros de UV reflete a proporção de grupos galoils livres presentes na molécula. Ou seja, quanto maior a quantidade de grupos galoils livres na substância, mais nítido será o perfil do espectro, no entanto se todas as unidades de galoils estiverem interligadas (HHDP), o espectro será apenas uma inclinação. O espectro de UV/Vis obtido para SM-10a mostrou-se uma boa resolução, sugerindo a presença de unidades galoils livres. O pico 2 (SM-10b) exibiu absorções máximas igual a 254 e 366 nm, que são características do ácido elágico (Figura 90).

**Figura 90.** Espectro de absorção na região UV/Vis (254 nm) das substâncias SM\_10a-b.



O espectro de massas de alta resolução do pico 1 (SM-10a, substância majoritária), obtido no modo negativo, exibiu o íon quasi-molecular  $[M-H]^- = 633,4286$ . O  $[M-H]^-$  é compatível com a fórmula molecular  $C_{27}H_{21}O_{18}^-$  (calculado  $m/z$  633,0686) (Figura 91).

Figura 91. Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da amostra SM-10a.



No espectro de segunda ordem, a substância SM-10a produziu os íons em  $m/z$  463 ( $C_{20}H_{15}O_{13}^-$ ) e  $m/z$  301 ( $C_{14}H_5O_8^-$ ), correspondente à perda de uma molécula de ácido gálico (170Da) e de um grupo galoil-glicose (332 Da) do íon precursor, respectivamente (Figura 92). Com base no padrão de fragmentação essa substância pode ser identificada como um elagitanino (HHDP)-galoil-glicose (HOFMANN et al., 2016). A proposta de fragmentação da substância SM-10a pode ser observada na Figura 93.

Figura 92. Espectro de massa/massa de alta resolução (ESI-MS<sup>2</sup>), modo negativo, do íon quasi-molecular  $[M-H]^- = 633,0722$  (amostra SM-10a).

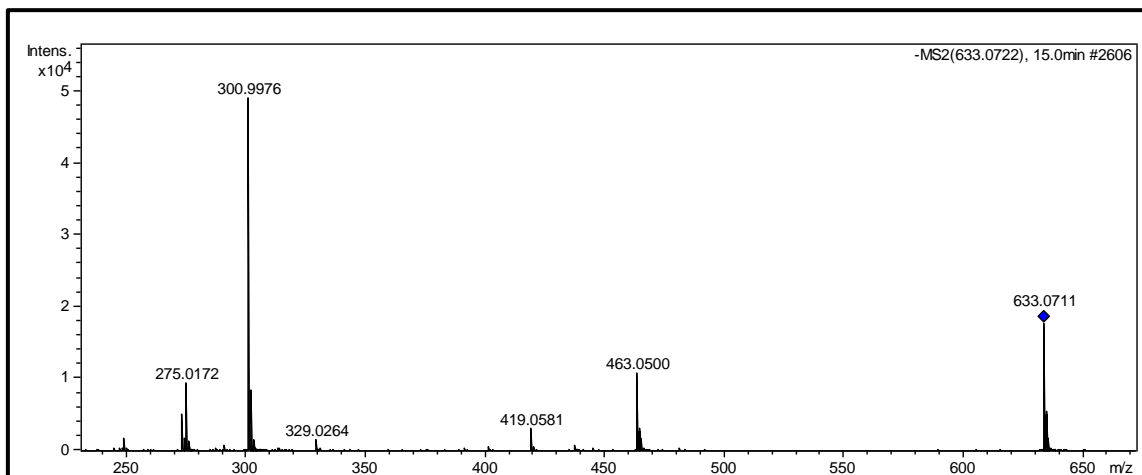
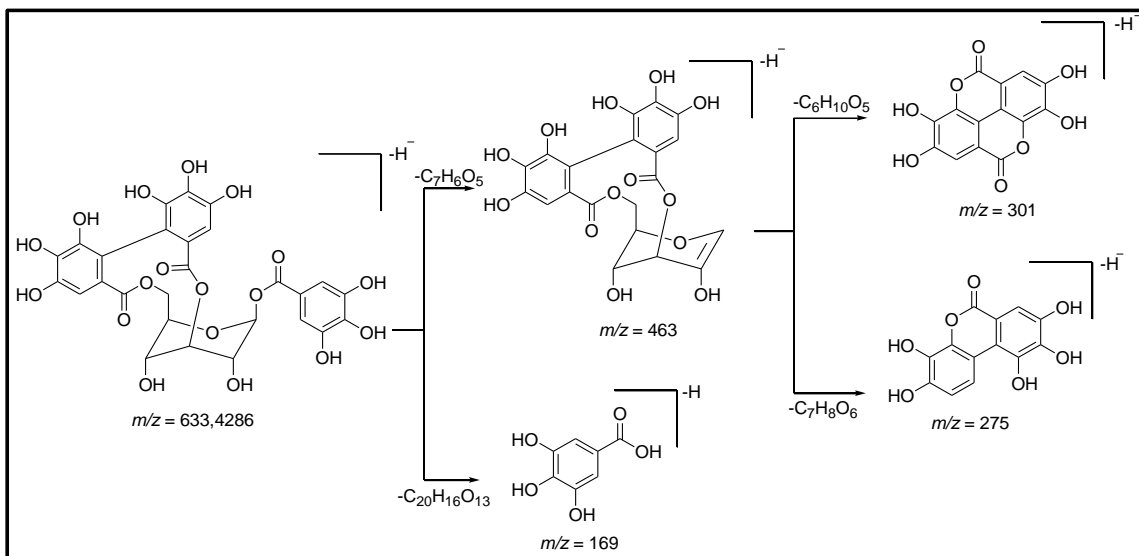


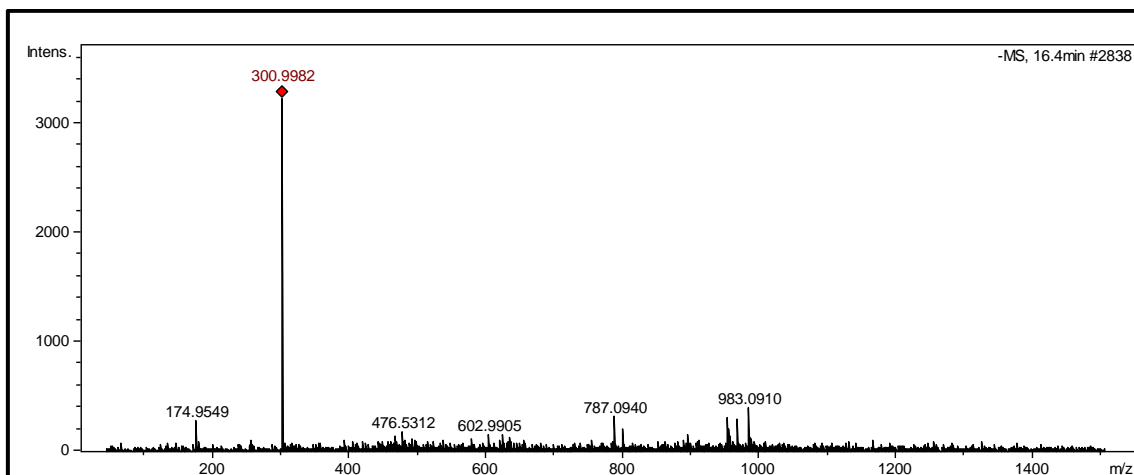
Figura 93. Proposta de fragmentação para a amostra SM-10a.



Fonte: YISIMAYILI et al., 2019.

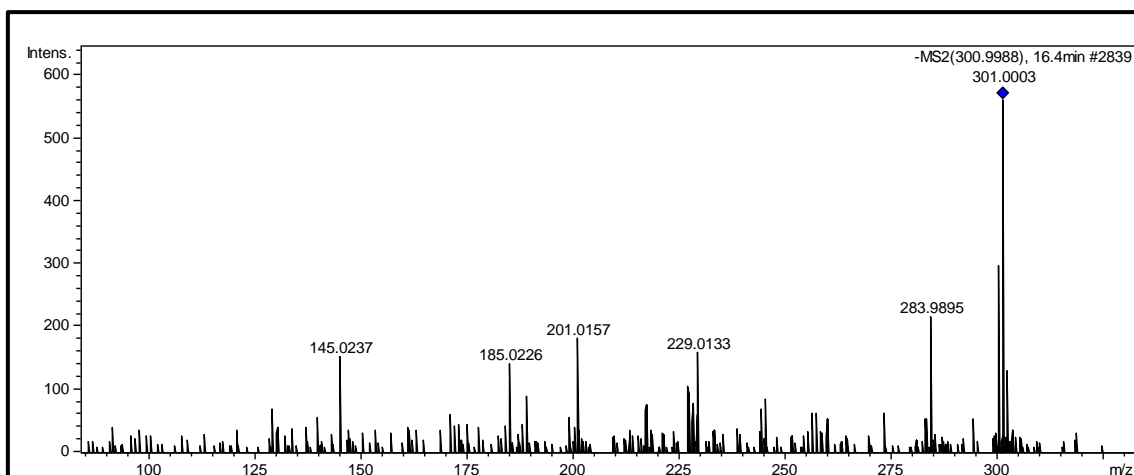
O pico 2 (SM-10b) exibiu o íon quasi-molecular  $[M-H]^- = 300,9982$ , compatível com a fórmula molecular  $C_{14}H_5O_8^-$  (calculado  $m/z$  300,9990) (Figura 94).

Figura 94. Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da amostra SM-10b.



No espectro de segunda ordem (Figura 95) foram observados fragmentos com  $m/z$  283,9895,  $m/z$  229,0133 e  $m/z$  201,0157, que são característicos do ácido elágico, anteriormente identificado (p. 79). A proposta de fragmentação pode ser visualizada na Figura 53 (p. 81).

**Figura 95.** Espectro de massa/massa de alta resolução (ESI-MS<sup>2</sup>), modo negativo, do íon quasi-molecular [M-H]<sup>-</sup> = 300,9988 (amostra SM-10b).



Na Tabela 13 estão listadas as informações sobre o tempo de retenção ( $t_R$ ), absorções de UV e dados do [M-H]<sup>-</sup> e fragmentações (MS<sup>2</sup>) das substâncias SM-10a-b.

**Tabela 13.** Dados de LC-MS das substâncias detectadas na amostra SM-10.

	$T_R$ (min)	UV (nm)	[M-H] <sup>-</sup> m/z	MS <sup>2</sup> m/z	Substância
SM-10a	15,0	230, 264	633	463, 301	Corilagina
SM-10b	16,4	254, 366	301	283, 229, 201	Ácido elágico

Fonte: elaboração própria.

Na análise dos espectros de RMN (Figura 96, p. x) foi possível observar os sinais característicos da substância SM-10a, uma vez que esta é a majoritária. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD) apresentou sinais característicos de hidrogênios aromáticos em  $\delta_H$  7,05 (s, H-2'), 6,69 (s, H-3'') e 6,66 ppm (s, H-3''') e sinais referentes a resíduo de glicose na região entre  $\delta_H$  6,36 - 3,60 ppm (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 97, p. x) exibiu a presença de treze sinais de carbono quaternários, sendo três relativos a carbonila de ésteres  $\delta_C$  170,2 (C-7'''); 168,6 (C-7'') e 166,8 ppm (C-7') e os restantes a carbonos fenólicos  $\delta_C$  120,7 (C-1'), 146,5 (C-3' e C-5'), 140,5 (C-4'), 117,3 (C-1''); 125,5 (C-2'' e C-2'''), 145,7 (C-4'' e C-6''), 138,3 (C-5''), 116,8 (C-1'''), 146,1 (C-4''' e C-6''') e 137,8 (C-5'''). Também foi possível observar sinais de carbonos metínicos

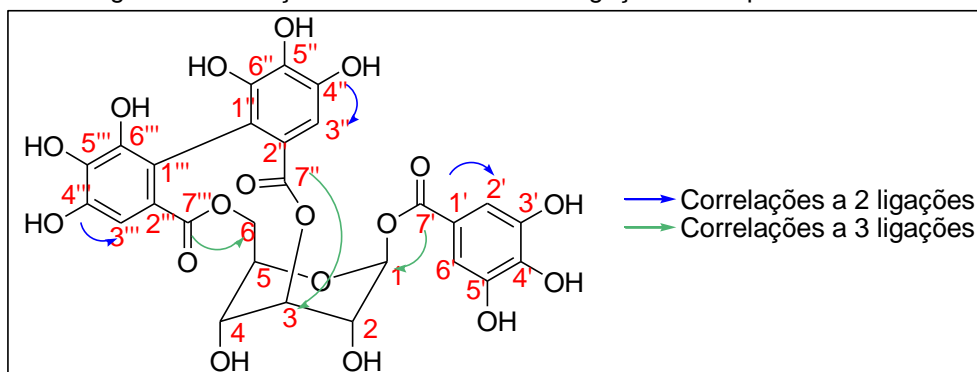


$\delta_c$  111,1 (C-2' e C-6'); 110,3 (C-3''), 108,4 (C-3'''), 95,14 (C-1), 69,54 (C-2), 71,69 (C-3), 62,57 (C-4) e 76,28 (C-5) e carbono metilênico  $\delta_c$  64,41 (C-6).

A análise do mapa de correlação heteronuclear HMQC (Figura 98) exibiu correlação direta entre os sinais  $\delta_c$  95,14 ppm (C-1) e  $\delta_H$  6,36ppm (H-1),  $\delta_c$  69,54 ppm (C-2) e  $\delta_H$  3,99 ppm (H-2),  $\delta_c$  71,69 ppm (C-3) e  $\delta_H$  4,81 ppm (H-3),  $\delta_c$  62,57 ppm (C-4) e  $\delta_H$  4,47 ppm (H-4),  $\delta_c$  76,28 ppm (C-5) e  $\delta_H$  4,52 ppm (H-5) e  $\delta_c$  64,41 ppm (C-6) e  $\delta_H$  4,16/4,95 ppm (H-6). Além dessas, também foi possível observar correlações entre  $\delta_c$  111,1 ppm (C-2') e  $\delta_H$  7,05 ppm (H-2'/H-6'),  $\delta_c$  110,3 ppm (C-3'') e  $\delta_H$  6,69 ppm (H-3'') e  $\delta_c$  108,4 ppm (C-3''') e  $\delta_H$  6,66 ppm (H-3''').

O mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figura 99) permitiu confirmar os pontos de ligações entre: o carbono C-7' ( $\delta_c$  166,8ppm) da unidade galoil e o hidrogênio H-1 ( $\delta_H$  6,36ppm) do resíduo de glicose; e os carbonos C-7'' ( $\delta_c$  168,6 ppm) e C-7''' ( $\delta_c$  170,2 ppm) com os hidrogênios H-3 ( $\delta_H$  4,81ppm) e H-6 ( $\delta_H$  4,16/4,95 ppm) da glicose, respectivamente.

Figura 100. Algumas correlações observadas a 2 e 3 ligações no espectro de HMBC.

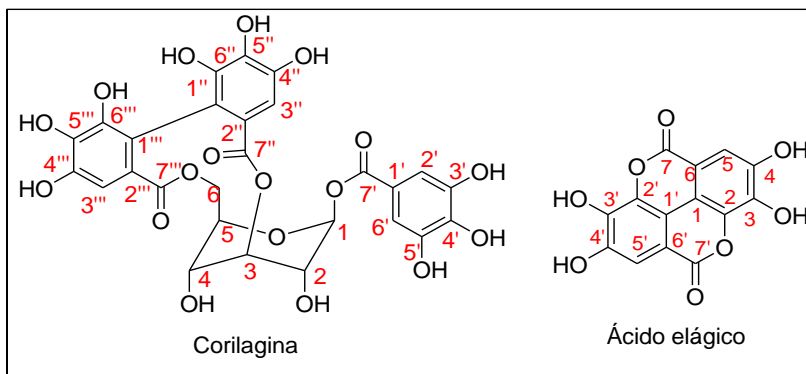


A partir dos dados espectrais obtidos e comparação com a literatura foi possível identificar a substância SM-10a como o elagitanino corilagina. Os deslocamentos químicos atribuídos para a substância estão resumidos na Tabela 14.

Na Figura 101 é possível observar as estruturas das substâncias que compõem a amostra SM-10. Na literatura não foi encontrado trabalhos que reportam a identificação de elagitaninos no gênero *Lecythis*, bem como na

família Lecythidaceae. Desta forma, a corilagina está sendo descrita pela primeira vez na espécie e na família.

Figura 101. Estrutura das substâncias identificadas na amostra SM-10.



**Tabela 14.** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz, respectivamente) da amostra SM-10a em MeOD.

SM-10a					Corilagina*	
C	$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_c$	$\delta_H$
<b>Glicose</b>						
1	95,14	6,36 (s)	-	-	95,16	6,36 (d, $J = 1,9$ Hz)
2	69,54	3,99 (s)	-	-	69,62	3,99 (dd, $J = 1,99$ e 3, 84Hz)
3	71,69	4,81 (s)	-	-	71,77	4,81 (s)
4	62,57	4,47 (s)	-	-	62,63	4,47 (s)
5	76,28	4,52 (t, $J = 9,9$ Hz)	H-6	H-1	76,36	4,52 (dd, $J = 8,15$ e 10,7 Hz)
6	64,41	4,16 (dd, $J = 8,1$ e 10,8 Hz); 4,95 (t, $J = 11$ Hz)	-	-	65,15	4,97 (t, $J = 10,9$ Hz); 4,15 (dd, $J = 8,0$ e 11,05 Hz)
<b>Galoil</b>						
1'	120,7	-	H-2'/H6'	-	120,7	-
2'	111,1	7,05 (s)	-	-	111,1	7,06 (s)
3'	146,5	-	H-2'	-	146,1	-
4'	140,5	-	-	H-2'	140,6	-
5'	146,5	-	H-6'	-	146,5	-
6'	111,1	7,05 (s)	-	-	111,1	-
7'	166,8	-	-	H-1; H2'/H6'	166,8	-
<b>HHDP</b>						
1''	117,3	-	-	H-3''	117,48	-
2''	125,5	-	-	-	125,58	-
3''	110,3	6,69 (s)	-	-	110,32	6,68 (s)
4''	145,7	-	H-3''	-	145,72	-
5''	138,3	-	-	H-3''	138,47	-
6''	145,7	-	-	-	145,62	-
7''	168,6	-	-	H-3''; H-3	168,74	-
1'''	116,8	-	-	H-3'''	117,03	-
2'''	125,5	-	-	-	125,58	-
3'''	108,4	6,66 (s)	-	-	108,42	6,66 (s)
4'''	146,1	-	H-3'''	-	146,10	-
5'''	137,8	-	-	H-3'''	137,93	-
6'''	146,1	-	-	-	145,75	-
7'''	170,2	-	-	H-3'''; H-6	170,31	-

**Legenda:** SM-10 = dados obtidos no presente trabalho (MeOD).s singlete, *t* tripleto, *dd* duplo dubleto.

Fonte: \*AZEVEDO, 2017.

Figura 96. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para SM-10 (500 MHz, MeOD).

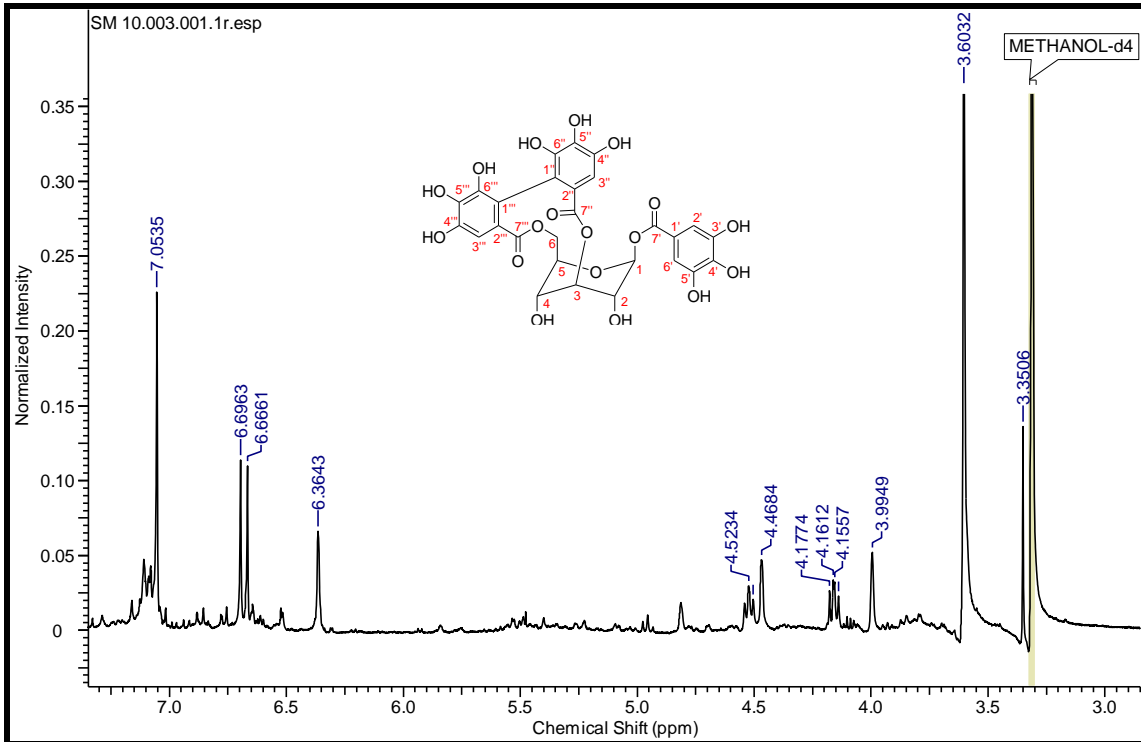


Figura 97. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para SM-10 (125 MHz, MeOD).

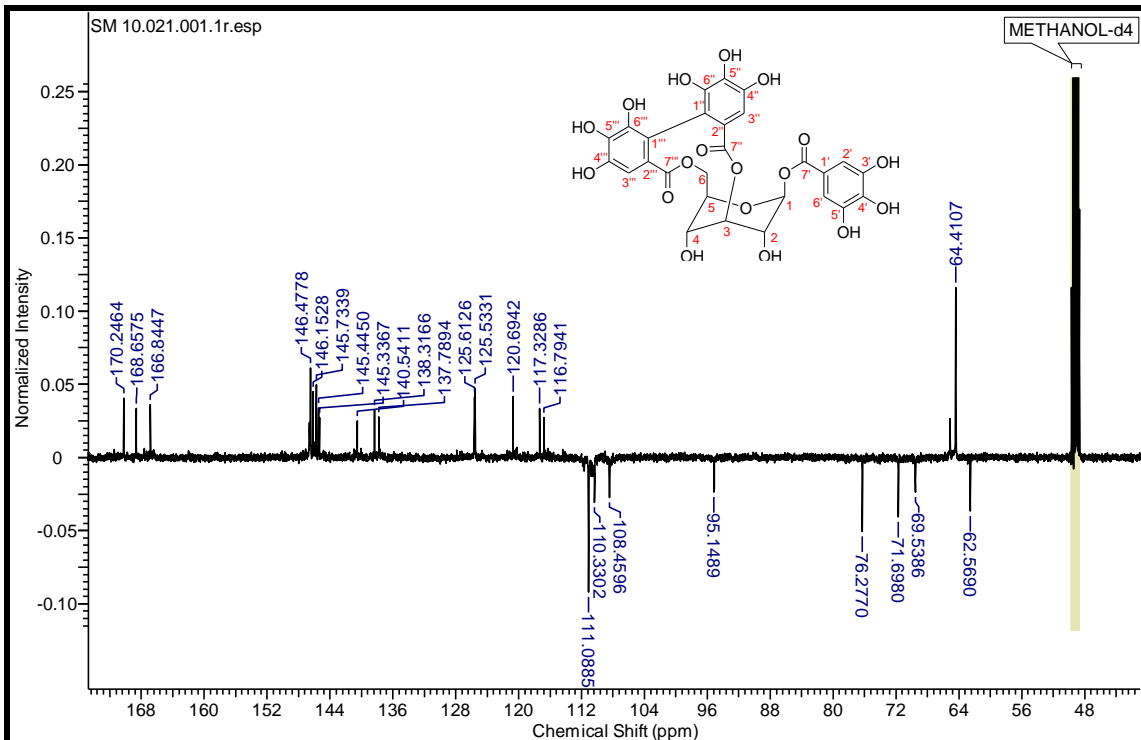


Figura 98. Espectro de HMQC obtido para SM-10 (MeOD).

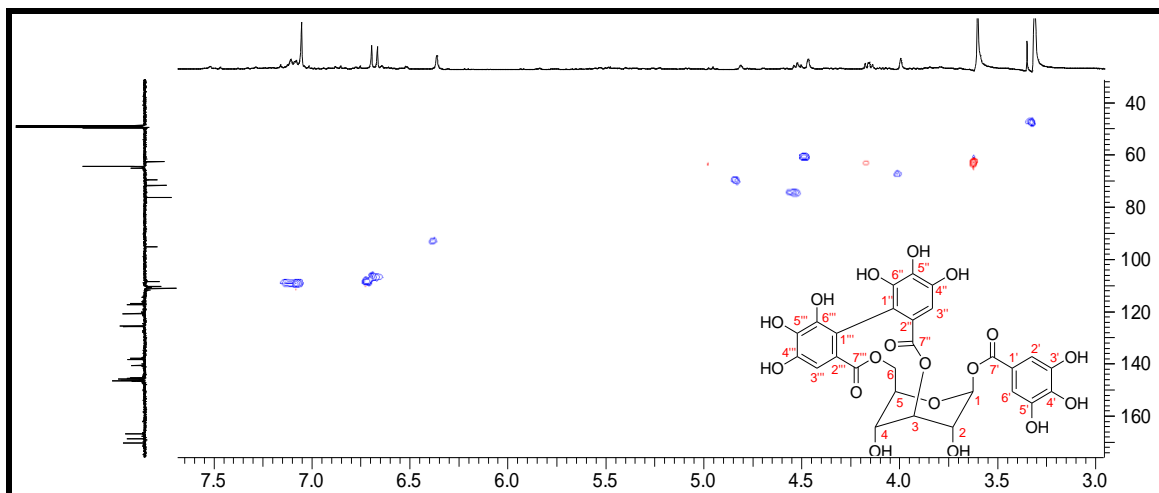
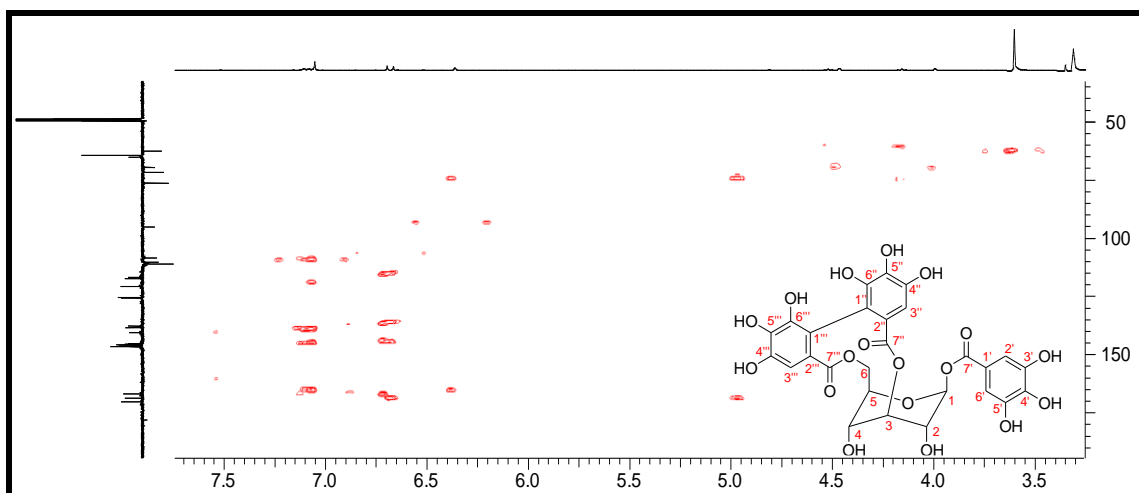


Figura 99. Espectro de HMBC obtido para SM-10 (MeOD).

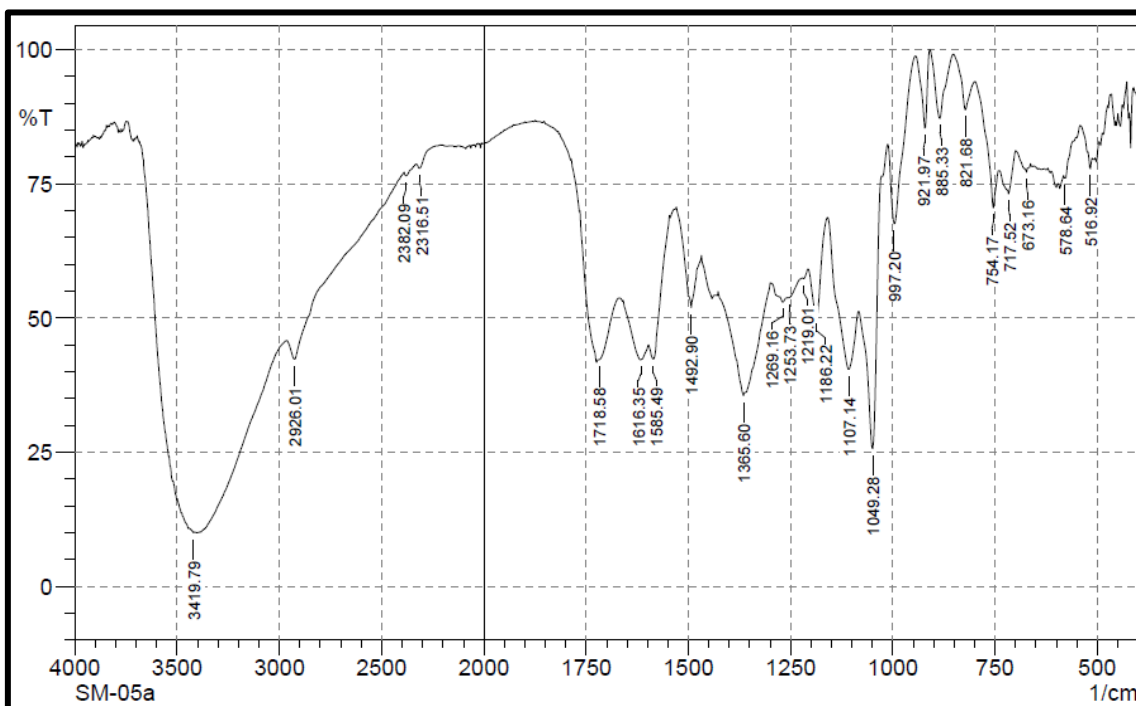


#### 5.1.4.7. Identificação estrutural da amostra SM-05a

A amostra SM-05a foi obtida a partir da adição de MeOH a fração F2S\_S1. A fração solúvel em MeOH foi separada por meio de filtração (vide metodologia na pág. 47). A análise em CCDA (em RP-18), utilizando-se como eluente uma mistura de MeOH:H<sub>2</sub>O (65:35), revelou a presença de uma mancha majoritária de coloração azul escuro quando revelada com solução de FeCl<sub>3</sub> (2%). Esta observação sugere a presença de substância fenólica. A amostra apresentou-se como um pó amorfo de coloração amarela e solúvel em DMSO.

Na Figura 102, o espectro de absorção na região do infravermelho da amostra SM-05a, obtido em KBr, exibiu bandas em  $\nu_{OH}$  3419 cm<sup>-1</sup> e  $\nu_{C=O}$  1718 cm<sup>-1</sup>, referentes a presença de grupos hidroxilas e ligação dupla C=O.

Figura 102. Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra SM-05a.



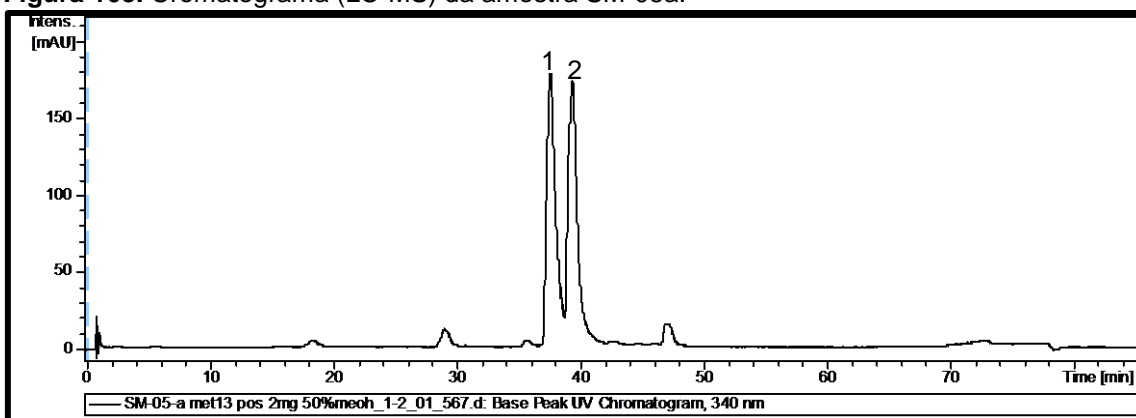
A amostra foi submetida à análise em LC-MS utilizando como fase móvel água deionizada (solvente A) e MeOH (solvente B), ambos acidificados com ácido fórmico (0,1%). A temperatura do forno empregada foi de 40 °C e fluxo a 0,25 mL/min. A solução de injeção foi preparada na concentração de 2,0 mg/mL em solução de MeOH:água deionizada (50%). O volume de injeção da amostra foi de 10 µL. A análise foi realizada com o gradiente em função da concentração do solvente B, com base na programada a seguir (Tabela 15).

Tabela 15. Programação aplicada na análise da amostra SM-05a por LC-MS.

Tempo	Módulo	Ação	Concentração (%)
0,01	Controle	Iniciar	
0,02	Bomba	Concentração B	5
1,00	Bomba	Concentração B	5
60,00	Bomba	Concentração B	45
65,00	Bomba	Concentração B	70
70,00	Bomba	Concentração B	100
75,00	Bomba	Concentração B	100
80,00	Bomba	Concentração B	5
85,00	Bomba	Concentração B	5
85,10	Controle	Parar	

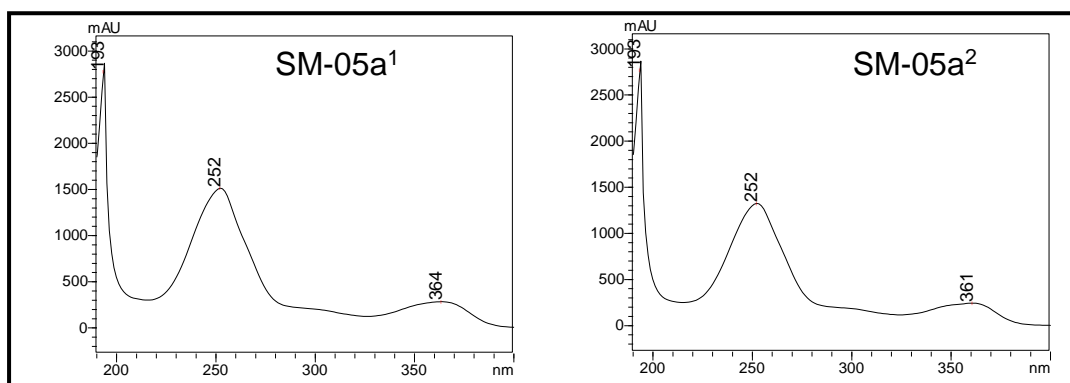
O cromatograma obtido com essa análise exibiu a presença de dois picos majoritários com tempo de retenção  $t_R$  a 38 (SM-05a<sup>1</sup>, pico n° 1) e 40,2 min (SM-05a<sup>2</sup>, pico n° 2). O cromatograma dessa amostra pode ser visualizado na Figura 103.

Figura 103. Cromatograma (LC-MS) da amostra SM-05a.



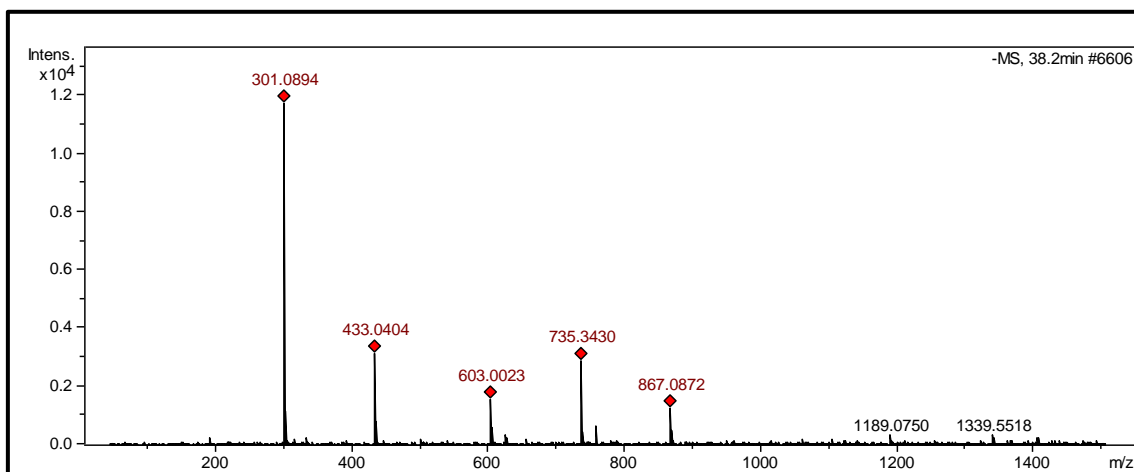
No espectro de absorção na região do UV/Vis, os dois picos exibiram duas absorções máximas em torno de 252 nm e 360 nm, que são características do ácido elágico (Figura 104).

Figura 104. Espectro de absorção na região UV/Vis (340 nm) das substâncias SM-05a<sup>1-2</sup>.



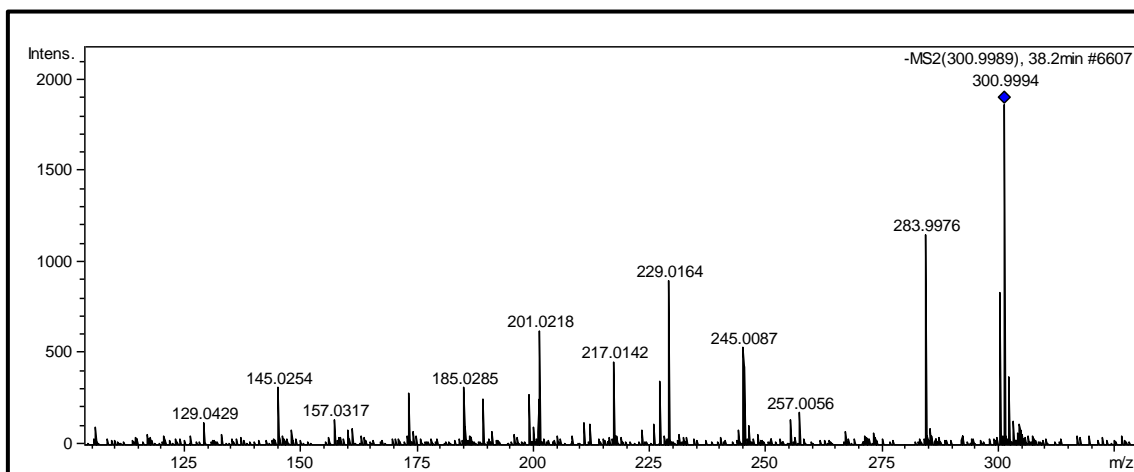
O espectro de massas de alta resolução do pico 1 (SM-05a<sup>1</sup>), obtido no modo negativo, exibiu o íon quasi-molecular  $[M-H]^- = 301,0894$ , compatível com a fórmula  $C_{14}H_5O_8^-$  (calculado  $m/z$  300,9990) (Figura 105).

**Figura 105.** Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da amostra SM-05a<sup>1</sup>.



No espectro de segunda ordem (Figura 106) foram observados fragmentos característicos do ácido elágico:  $m/z$  283,9976,  $m/z$  229,0164 e  $m/z$  201,0218, anteriormente identificado na amostra SM-03 (p. 79). A proposta de fragmentação pode ser visualizada na Figura 53 (p. 81).

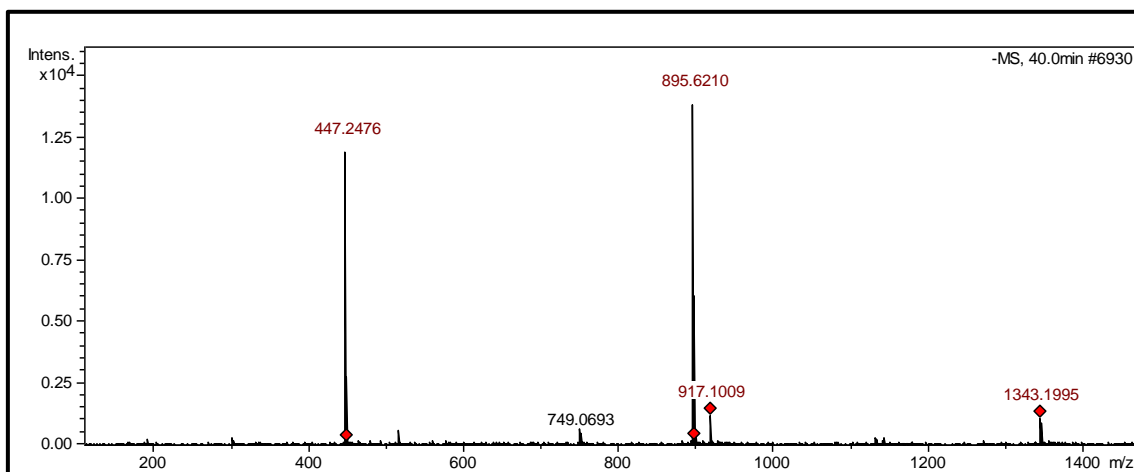
**Figura 106.** Espectro de massa/massa de alta resolução (ESI-MS<sup>2</sup>), modo negativo, do íon quasi-molecular  $[M-H]^- = 300,9994$  (amostra SM-05a<sup>1</sup>).



O espectro de massas de alta resolução do pico 2 (SM-05a<sup>2</sup>), obtido no modo negativo, exibiu o íon quasi-molecular  $[M-H]^- = 477,2476$ , compatível com a fórmula molecular  $C_{20}H_{15}O_{12}^-$  (calculado  $m/z$  477,0569) (Figura 107).



**Figura 107.** Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da amostra SM-05a<sup>2</sup>.



O espectro de segunda ordem (MS<sup>2</sup>) exibiu um único fragmento com  $m/z$  300 (C<sub>14</sub>H<sub>4</sub>O<sub>8</sub><sup>-</sup>), que foi gerado pela perda de uma unidade de ramnose (147 Da) do íon precursor (Figura 108). Com base no padrão de fragmentação, sugere-se que a substância SM-05a<sup>2</sup> pode corresponder ao derivado do ácido elágico, eschweilenol C (SILVA *et al.*, 2019). A proposta de fragmentação da substância SM-05a<sup>2</sup> está esquematizada na Figura 109.

**Figura 108.** Espectro de massa/massa de alta resolução (ESI-MS<sup>2</sup>), modo negativo, do íon quasi-molecular [M-H]<sup>-</sup> = 447,0588 (amostra SM-05a<sup>2</sup>).

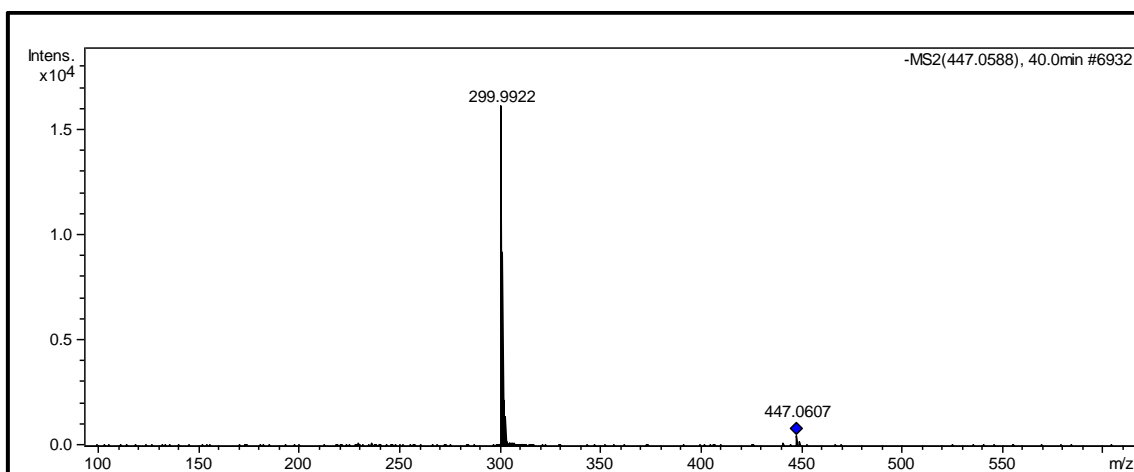
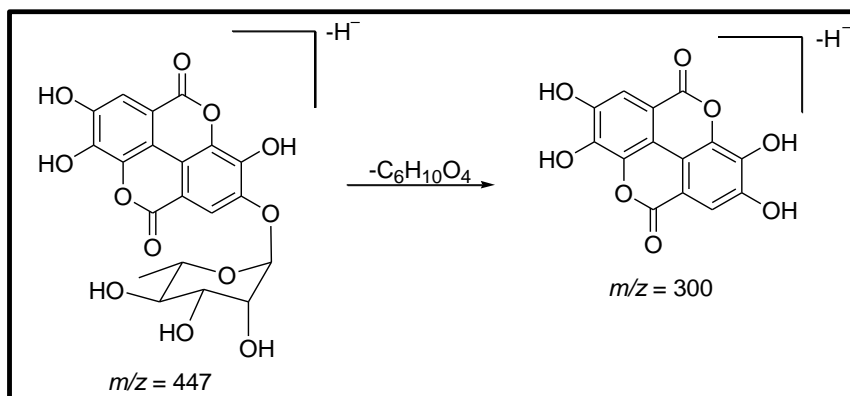


Figura 109. Proposta de fragmentação para a amostra SM-05a<sup>2</sup>.



Fonte: elaborada pela autora.

Na Tabela 16 estão listadas as informações sobre o tempo de retenção ( $t_R$ ), absorções de UV e dados do  $[M-H]^-$  e fragmentações ( $MS^2$ ) das substâncias SM-05a<sup>1-2</sup>.

**Tabela 16.** Dados de LC-MS das substâncias detectadas na amostra SM-05a.

	$T_R$ (min)	UV (nm)	$[M-H]^-/m/z$	$MS^2 m/z$	Substância
SM-05a <sup>1</sup>	38	252, 364	301	283, 229, 201	Ácido elágico
SM-05a <sup>2</sup>	40,2	252, 361	447	300	Eschweilenol C

Fonte: elaboração própria.

O espectro de RMN de  $^1H$  (500 MHz, DMSO) da amostra SM-05a, figuras 110-111 (p. x), apresentou sinais característicos de hidrogênios aromáticos na região de  $\delta_H$  7,63 – 7,40 ppm. Também foi observada a presença de sinais na região de  $\delta_H$  5,44 – 3,44 ppm e em  $\delta_H$  1,13 ppm, que juntamente com os sinais na região de  $\delta_C$  70,87 – 69,84 e 17,99 ppm, observados no espectro de RMN de  $^{13}C$  (125 MHz, DMSO), figura 112 (p. x), sugerem a presença de resíduo de ramnose (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

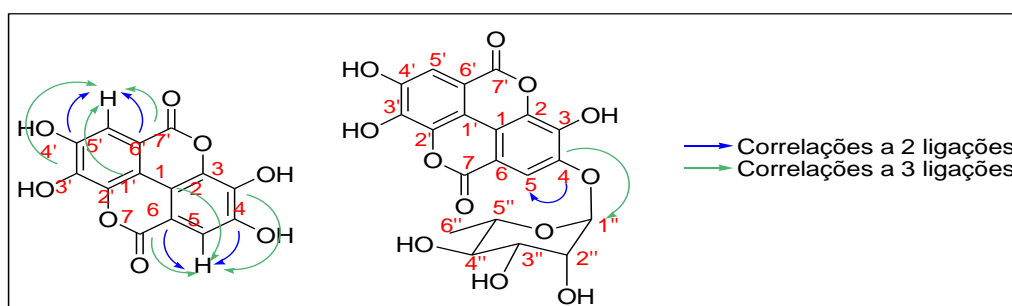
O esqueleto do ácido elágico foi caracterizado pela presença do sinal em  $\delta_C$  159,72 ppm, referente a carbonila de éster, em  $\delta_C$  112,14 e 109,51 ppm, atribuídos a carbonos metínicos e carbonos quaternários na região de  $\delta_C$  149,54 – 105,49 ppm (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

A partir do espectro de HMQC (Figura 113) foi observada a correlação direta entre os sinais de carbono  $\delta_C$  112,16 (C-5) e 109,50 ppm (C-5') com os hidrogênios  $\delta_H$  7,63 (H-5) e 7,40 ppm (H-5'), respectivamente. Além dessas,

também foi possível observar correlações entre  $\delta_C$  100,03 ppm (C-1'') e  $\delta_H$  5,44 ppm (H-1''),  $\delta_C$  18,00 ppm (C-6'') e  $\delta_H$  1,13 ppm (H-6'').

No espectro HMBC (Figura 114, p. x), os sinais de hidrogênios  $\delta_H$  7,63 (H-5) e 7,40 ppm (H-5') apresentaram padrões semelhantes para suas correlações de longo alcance. Foi observada correlação entre o sinal  $\delta_H$  7,63 (H-5) com  $\delta_C$  115,07 (C-1), 105,47 (C-6), 146,93 (C-4), 159,76 (C-7) e entre o sinal 7,40 (H-5') com  $\delta_C$  112,84 (C-1'), 105,47 (C-6'), 148,79 (C-4') e 159,72 (C-7'). Além disso, o hidrogênio anomérico  $\delta_H$  5,44 (H-1'') exibiu correlações com os átomos de carbono em  $\delta_C$  69,86 (C-2'') e 146,93 (C-4). Essas correlações confirmam a presença de um esqueleto de ácido elágico e do derivado do ácido elágico com um substituinte ramnosídeo ligado ao carbono C-4 (Eschweilenol C).

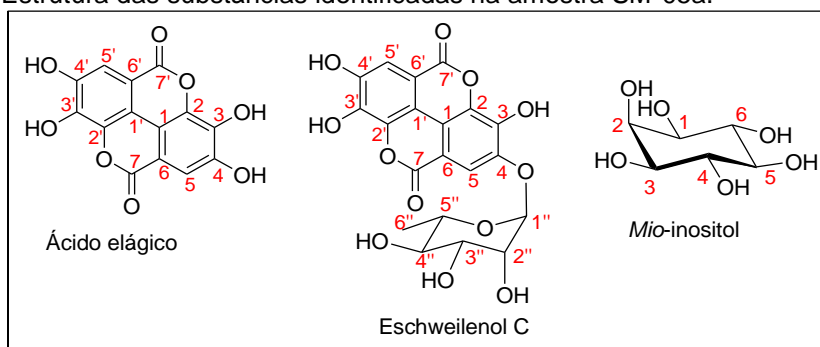
**Figura 115.** Algumas correlações observadas a 2 e 3 ligações no espectro de HMBC.



Ademais, também foram observados sinais característicos de hidrogênios de carbonos carbinólicos ( $\delta_H$  2,93, 3,14, 3,36 e 3,72 ppm). Estes sinais foram associados aos sinais de carbono na região  $\delta_C$  75,30, 71,96, 72,87 e 72,71 ppm, respectivamente. A análise desses dados permitiu verificar a presença do *mio*-inositol na amostra.

Pelo melhor do nosso conhecimento este é o primeiro relato da presença do eschweilenol C em *L. pisonis*. Esta substância foi identificada anteriormente em resíduos de biomassa de *Bertholletia excelsa* usando análises de HPLC-DAD-MS/MS (SILVA *et al.*, 2019). O eschweilenol C foi primeiramente identificado nas cascas do caule de *Eschweilera coriacea* (YANG *et al.*, 1998).

Figura 116. Estrutura das substâncias identificadas na amostra SM-05a.



Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz, respectivamente) das substâncias que foram identificadas na amostra SM-05a podem ser observados nas Tabelas 17-19.

Tabela 17. Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz, respectivamente) da amostra SM-05a<sup>1</sup> em DMSO.

SM-05a <sup>1</sup>						Ácido elágico*	
C	$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$^4J_{CH}$	$\delta_c$	$\delta_H$
1	112,84	-	-	H5	-	112,57	-
1'	112,84	-	-	H5'	-	112,57	-
2	136,37	-	-	-	H5	136,33	-
2'	136,37	-	-	-	H5'	136,33	-
3	142,48	-	-	H5	-	140,88	-
3'	142,48	-	-	H5'	-	140,88	-
4	148,79	-	H5	-	-	148,35	-
4'	148,79	-	H5'	-	-	148,35	-
5	109,50	7,40 (s)	-	-	-	109,74	7,42 (s)
5'	109,50	7,40 (s)	-	-	-	109,74	7,42 (s)
6	105,47	-	H-5	-	-	106,56	-
6'	105,47	-	H5'	-	-	106,56	-
7	159,72	-	-	H5	-	159,34	-
7'	159,72	-	-	H5'	-	159,34	-

Legenda: SM-05a<sup>1</sup> = dados obtidos no presente trabalho (DMSO). s singlet.

Fonte: \*AZEVEDO, 2017.

**Tabela 18.** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz, respectivamente) da amostra SM-05a<sup>2</sup> em DMSO.

SM-05a <sup>2</sup>						Eschweilenol C*	
C	$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$^4J_{CH}$	$\delta_c$	$\delta_H$
1	115,07	-	-	H5	-	114,45	-
1'	112,84	-	-	H5'	-	111,71	-
2	136,63	-	-	-	H5	136,30	-
2'	136,37	-	-	-	H5'	136,66	-
3	145,55	-	-	H5	-	141,15	-
3'	142,48	-	-	H5'	-	139,72	-
4	146,93	-	H5	H1''	-	146,30	-
4'	148,79	-	H5'	-	-	148,68	-
5	112,16	7,63 (s)	-	-	-	111,55	7,75(s)
5'	109,50	7,40 (s)	-	-	-	110,19	7,49(s)
6	105,47	-	H-5	-	-	107,41	-
6'	105,47	-	H5'	-	-	107,94	-
7	159,76	-	-	H5	-	158,99	-
7'	159,72	-	-	H5'	-	158,84	-
Ramnose							
1''	100,03	5,44 (s)				100,12	5,46 (s)
2''	69,86	4,02 (d, $J = 6,4$ HZ)				69,76	4,00 (d)
3''	70,34	3,83 (dd, $J = 3,05$ e 9,0 HZ)				70,03	3,85(dd)
4''	72,27	3,29 (dd, $J = 2,40$ e 7,15 HZ)	H3''	H2''/H6''		71,67	3,33(dd)
5''	70,07	3,59 (m)	H6''	H1''		69,80	3,57(ddq)
6''	18,00	1,13 (d, $J = 6,1$ HZ)		H4''		17,72	1,14 (d)

**Legenda:** SM-05a<sup>2</sup> = dados obtidos no presente trabalho (DMSO). **s** singlete; **d** dubleto; **dd** duplo dubleto.

Fonte: \*Araujo et al., 2019.

**Tabela 19.** Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz, respectivamente) da amostra SM-05a<sup>3</sup> em DMSO.

SM-05a <sup>3</sup>					Mio-inositol*	
C	$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_c$	$\delta_H$
1	71,96	3,14 ( <i>dd</i> , $J = 2,15$ e 9,65 Hz)	H6	-	73,20	3,54 ( <i>dd</i> )
2	72,71	3,72 ( <i>t</i> , $J = 3,75$ Hz)	-	-	72,98	4,07 ( <i>t</i> )
3	71,96	3,14 ( <i>dd</i> , $J = 2,15$ e 9,65 Hz)	H4	-	73,20	3,54 ( <i>dd</i> )
4	72,87	3,36 ( <i>t</i> , $J = 9,45$ Hz)	H3; H5	-	71,93	3,64 ( <i>t</i> )
5	75,30	2,93 ( <i>t</i> , $J = 9,15$ Hz)	H4; H6	-	75,15	3,29 ( <i>t</i> )
6	72,87	3,36 ( <i>t</i> , $J = 9,45$ Hz)	H1; H5	-	71,93	3,64 ( <i>t</i> )

**Legenda:** SM-05a<sup>3</sup> = dados obtidos no presente trabalho (D<sub>2</sub>O). *dd* duplete duplo; *t* tripleto;  $J$  constante de acoplamento, unidade Hertz.

Fonte: \*REBECCA; BOYCE; SOMASUNDRAM, 2012.

**Figura 110.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para SM-05a (500 MHz, DMSO).

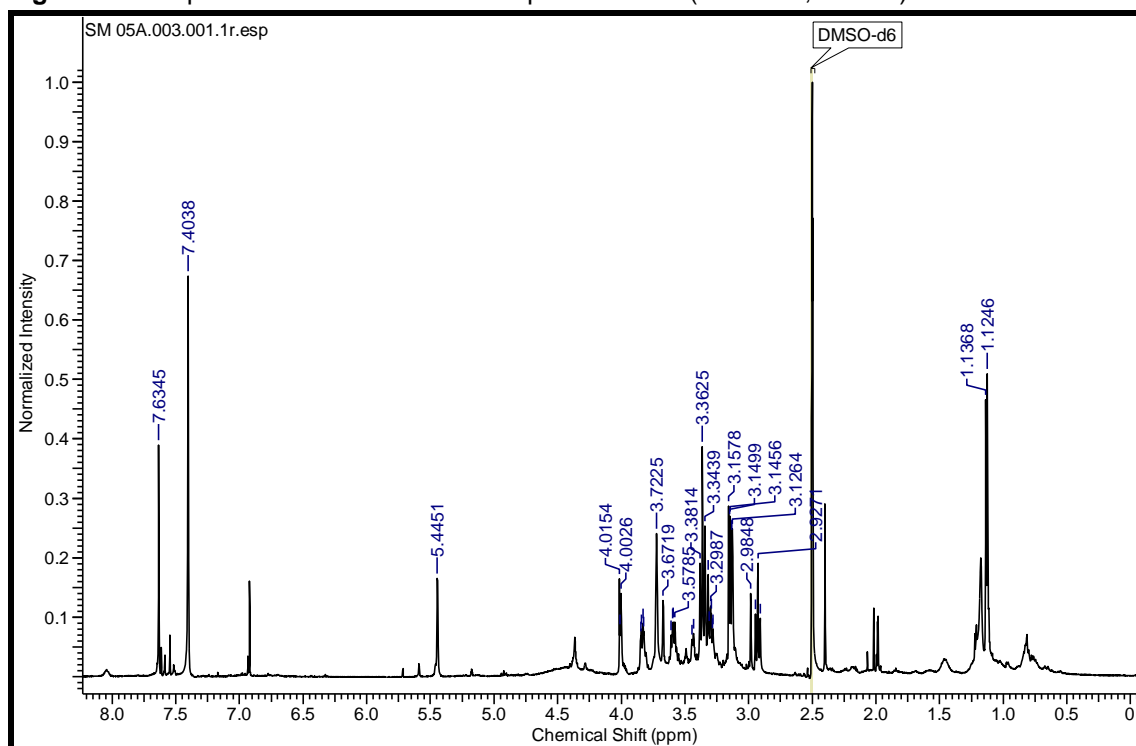


Figura 111. Ampliação da região 4,0 – 2,9 ppm do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para SM-05a (500 MHz, DMSO).

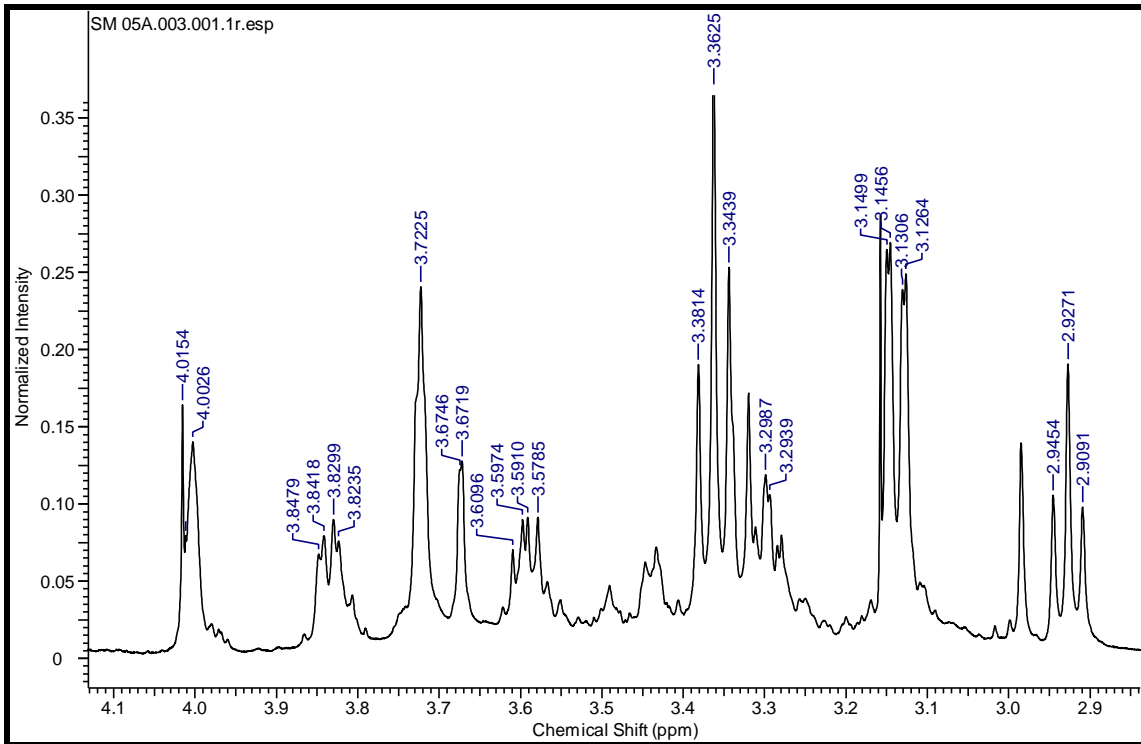


Figura 112. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para SM-05a (125 MHz, DMSO).

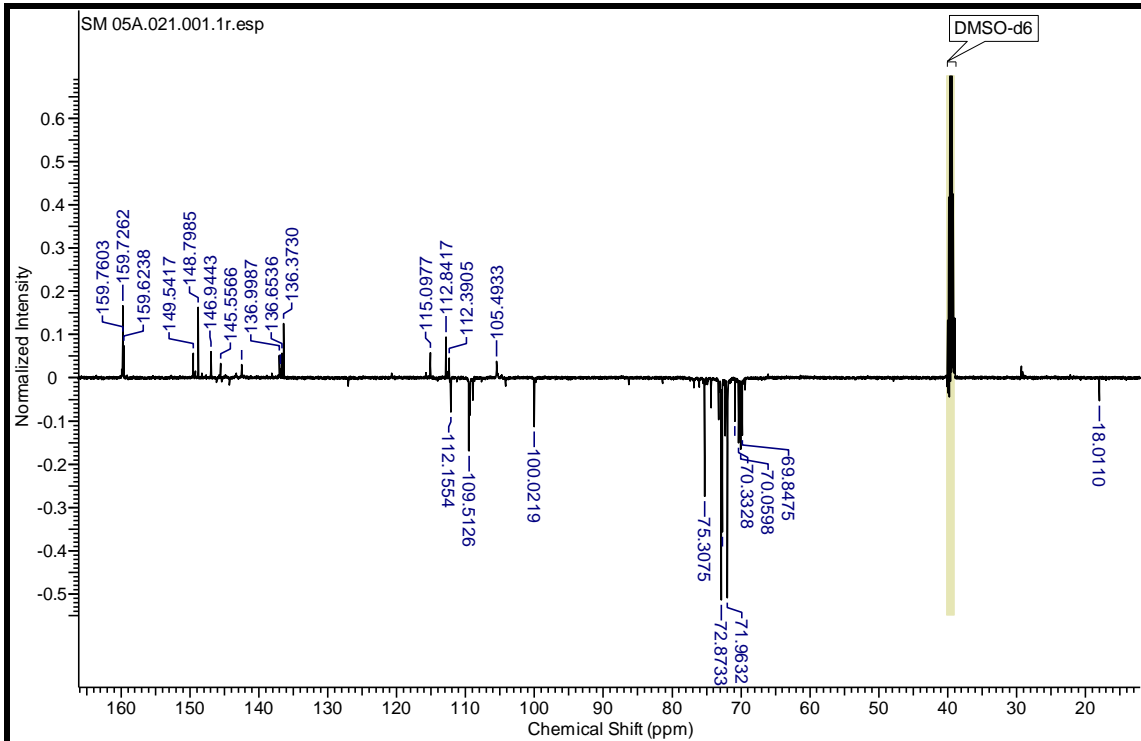


Figura 113. Espectro de HMQC obtido para SM-05a (DMSO).

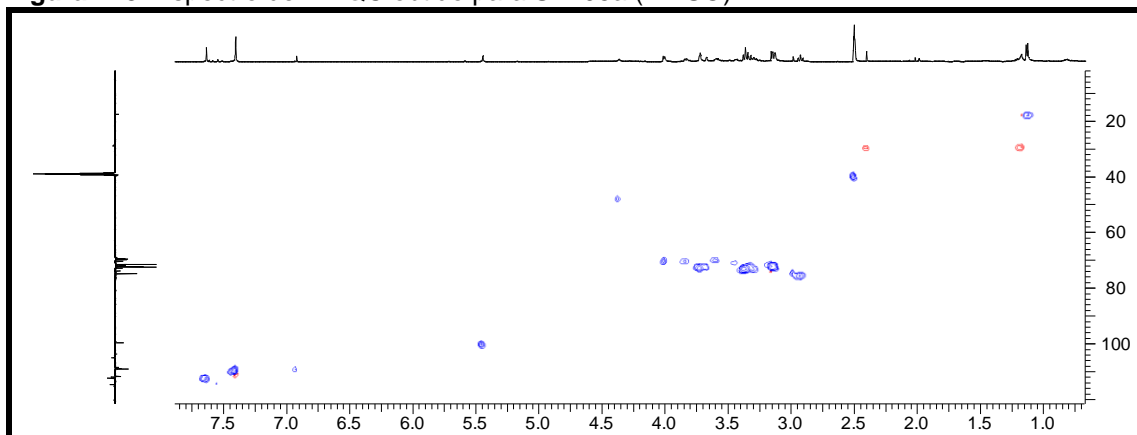
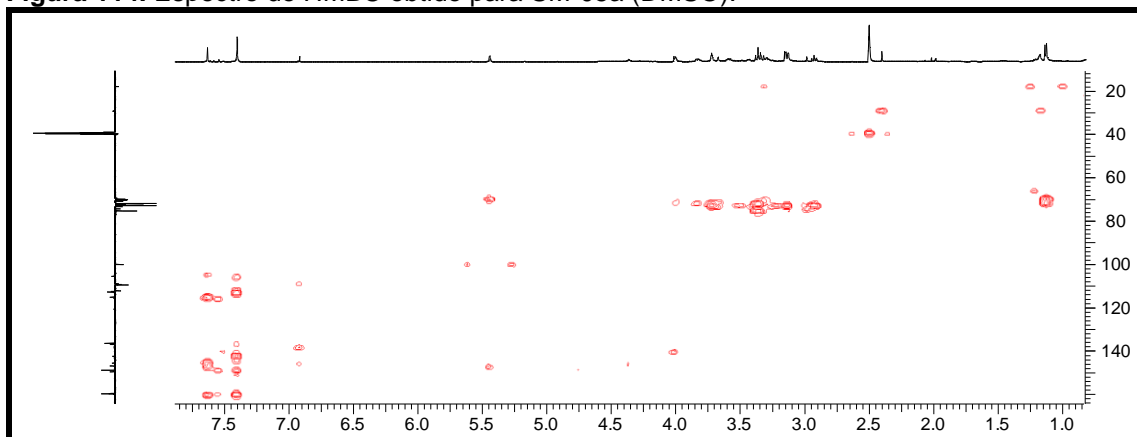


Figura 114. Espectro de HMBC obtido para SM-05a (DMSO).



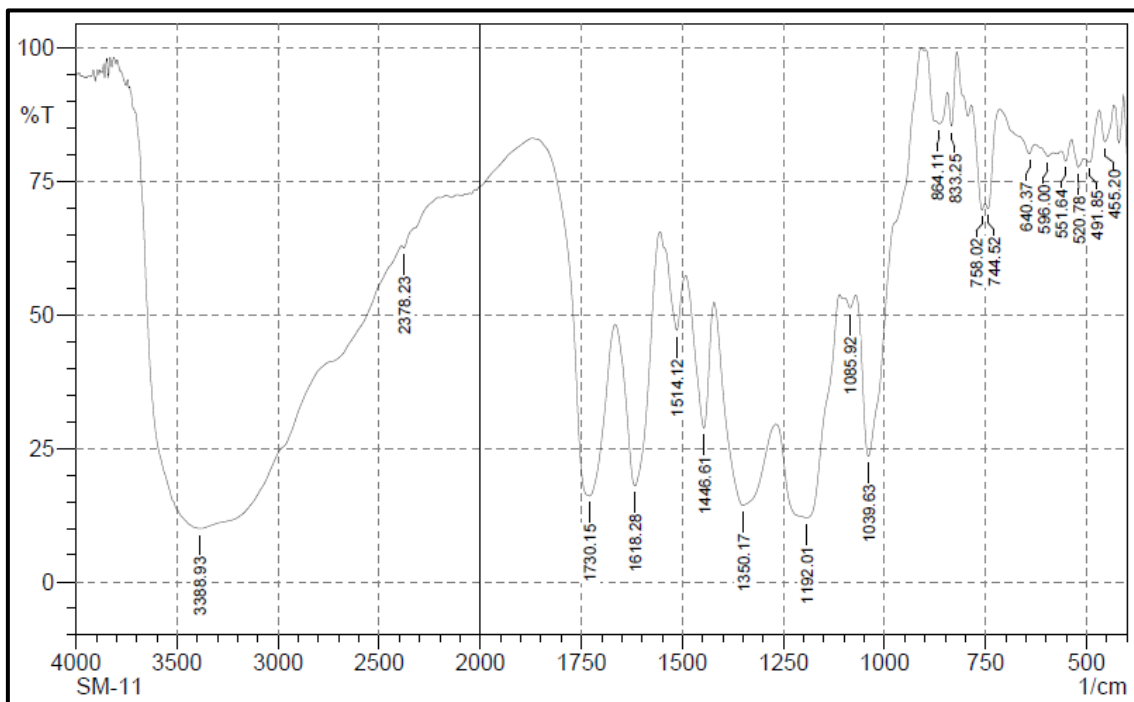
#### 5.1.4.8. Identificação estrutural da amostra SM-11R

A sub-fração 194-213 (107,7 mg) foi obtida a partir do fracionamento cromatográfico da partição em AcOEt (F1-FAc) do extrato em MeOH (o procedimento metodológico pode ser observado na p. 51). A análise em CCDA, utilizando-se como eluente uma mistura de AcOEt:HCOOH:CH<sub>3</sub>COOH:CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O (100:1:2:10:3) revelou a presença de uma mancha majoritária de coloração azul escuro quando revelada com solução de FeCl<sub>3</sub> (2%). Sendo assim, a fração foi codificada como SM-11 e enviada para análise em IV e LC-MS.

Na Figura 117, o espectro de absorção na região do infravermelho de SM-11, obtido em KBr, exibiu bandas intensas em  $\nu_{OH}$  3388 cm<sup>-1</sup> e  $\nu_{C=O}$  1730 cm<sup>-1</sup>, referentes a presença de grupos hidroxilas e ligação dupla C=O.



Figura 117. Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra SM-11.

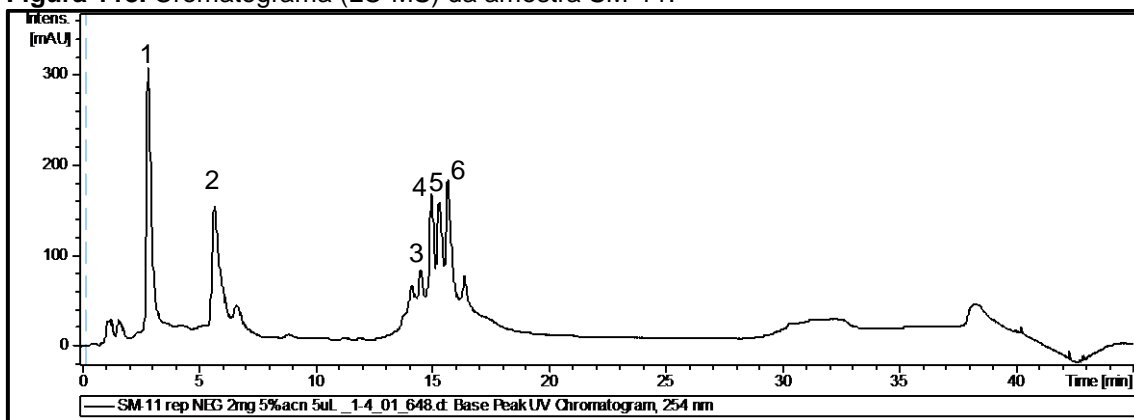


A amostra foi submetida à análise em LC-MS utilizando as mesmas condições e método de análise utilizados para a amostra SM-08 (Tabela 10, p. 90). O cromatograma obtido com essa análise (Figura 118) exibiu a presença de seis sinais com tempo de retenção  $t_R$  a 3,4 (SM\_11a, pico nº 1); 6,3 (SM\_11b, pico nº 2), 14,8 (SM\_11c, pico nº 3), 15,0 (SM\_11d, pico nº 4), 15,5 (SM\_11e, pico nº 5) e 16,2 min (SM\_11f, pico nº 6).

O tempo de retenção de um polifenol é um importante fator que auxilia na caracterização desses metabólitos. De modo geral, para os elagitaninos a formação de um grupo HHDP sempre diminui o tempo de retenção, ou seja, os elagitaninos que não possuem grupos galoil em sua estrutura tendem a eluir precocemente (MOILANEM; SINKKONEN; SALMINEN, 2013).

Essas informações sugerem que os picos 1 e 2 não possuem grupos galois em suas estruturas, visto que as substâncias apresentaram tempo de retenção precoce.

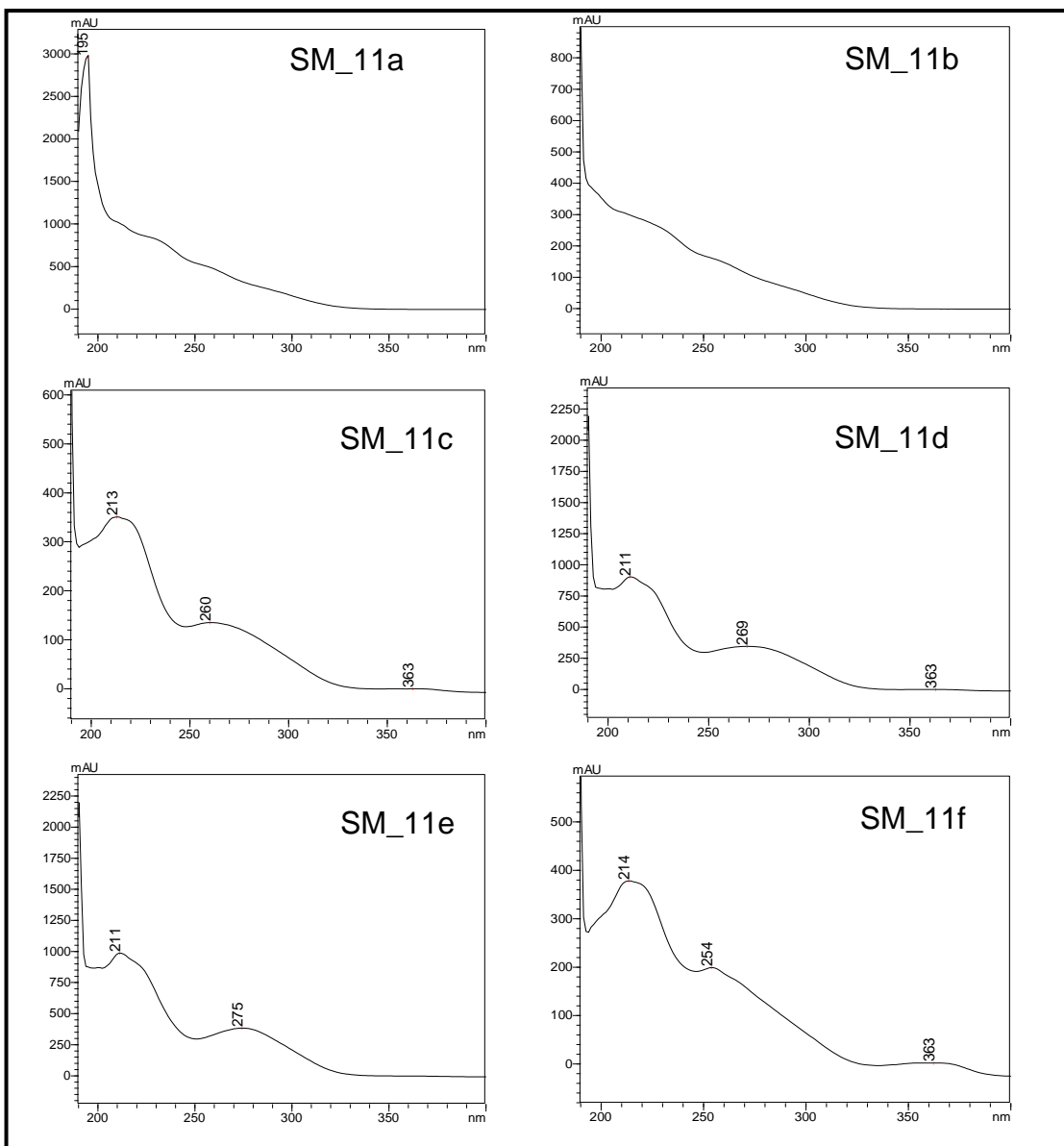
Figura 118. Cromatograma (LC-MS) da amostra SM-11.



Os espectros de absorção na região do UV/Vis do pico 1 (SM-11a) e 2 (SM-11b) se apresentaram como uma inclinação. Esse padrão de espectro sugere a ausência de unidades galoil livres em elagitaninos, ou seja, a apenas a presença de unidades de HHDP na estrutura dessas substâncias (HANHINEVA et al., 2008). Essas informações corroboram as observações feitas a partir da análise do tempo de retenção dos picos 1 e 2.

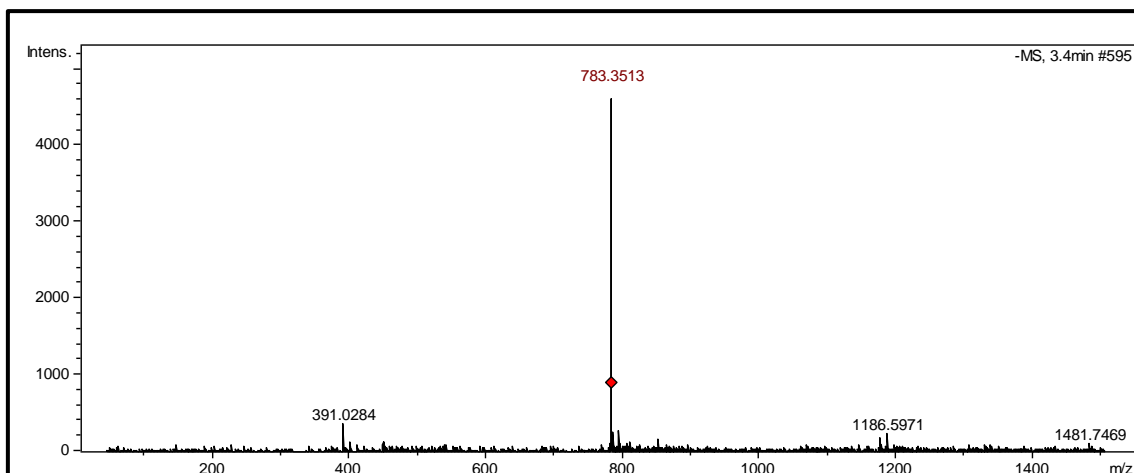
Os picos 3-5 (SM-11c-e) apresentaram absorções  $\lambda_{\max}$  em torno de 210-215 nm e 260-280 nm, que são características de elagitaninos. O pico 6 (SM-11f) apresentou absorções na região 254 nm e 363 nm, características de ácido elágico. Os espectros de UV/Vis podem ser visualizados na Figura 119.

Figura 119. Espectro de absorção na região UV/Vis (254 nm) das substâncias SM-11a-g.

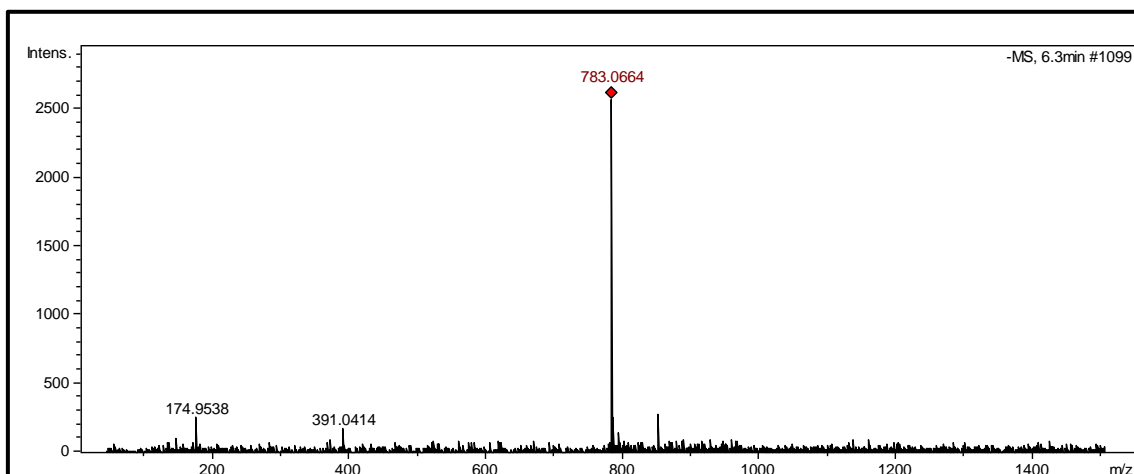


Os picos 1 (SM-11a) e 2 (SM-11b) apresentaram íon quasi-molecular  $[M-H]^- = 783,0671$  e  $783,0664$ , respectivamente. Isso sugere que as substâncias SM-11a e SM-11b são isômeros. O  $[M-H]^-$  é compatível com a fórmula molecular de  $C_{34}H_{23}O_{22}^-$  (calculado  $m/z$  783,0686). Os espectros de massas de alta resolução podem ser observados nas Figuras 120-121.

**Figura 120.** Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da substância SM11a.



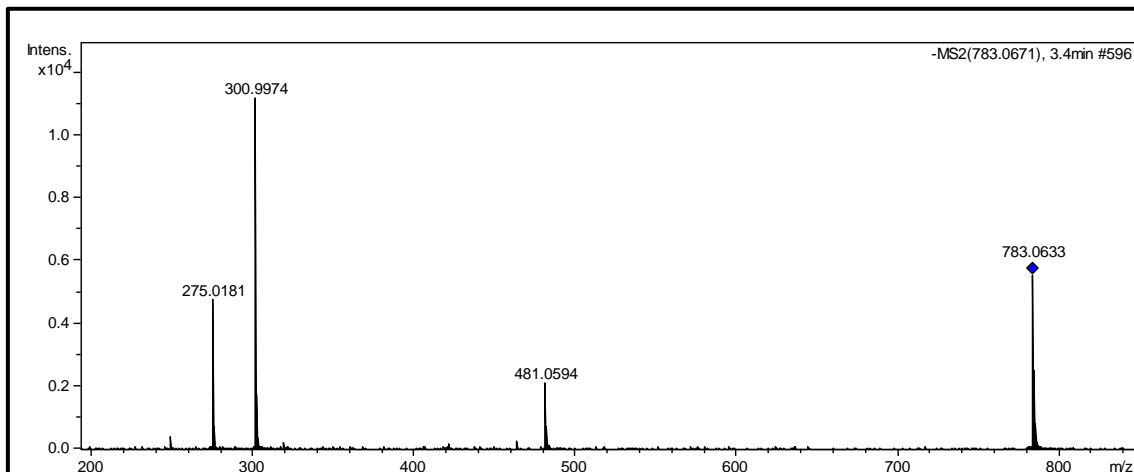
**Figura 121.** Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da substância SM-11b.



Nos espectros de segunda ordem ( $MS^2$ ) (Figuras 122-123) de ambas as substâncias, os fragmentos com  $m/z$  481 ( $C_{20}H_{17}O_{14}^-$ ) e o  $m/z$  301 ( $C_{14}H_5O_8^-$ ) foram gerados pela perda do grupo HHDP (302 Da) e HHDP-glicose (482 Da) do íon precursor, respectivamente. Com base no padrão de fragmentação, sugere-se que as substâncias são elagitaninos do tipo *bis*-HHDP-glicose. As substâncias SM-11a e SM-11b podem corresponder aos anômeros da pedunculagina (2,3;4,6-*bis*-HHDP-glicose). A ausência dos fragmentos em  $m/z$  765 e  $m/z$  451 é de grande relevância para a distinção entre a pedunculagina e seus isômeros casuariin (e seu anômero desgaloil-stachyurin) e terflavina B, respectivamente (CHANG et al., 2019; BOULEKBACHE-MAKHLOUF et al.,

2010). A proposta de fragmentação das substâncias SM-11a e SM-11b está esquematizada na Figura 124.

**Figura 122.** Espectro de massa/massa de alta resolução (ESI-MS<sup>2</sup>), modo negativo, do íon quasi-molecular [M-H]<sup>-</sup> = 783,0633 (amostra SM-11a).



**Figura 123.** Espectro de massa/massa de alta resolução (ESI-MS<sup>2</sup>), modo negativo, do íon quasi-molecular [M-H]<sup>-</sup> = 783,0602 (amostra SM-11b).

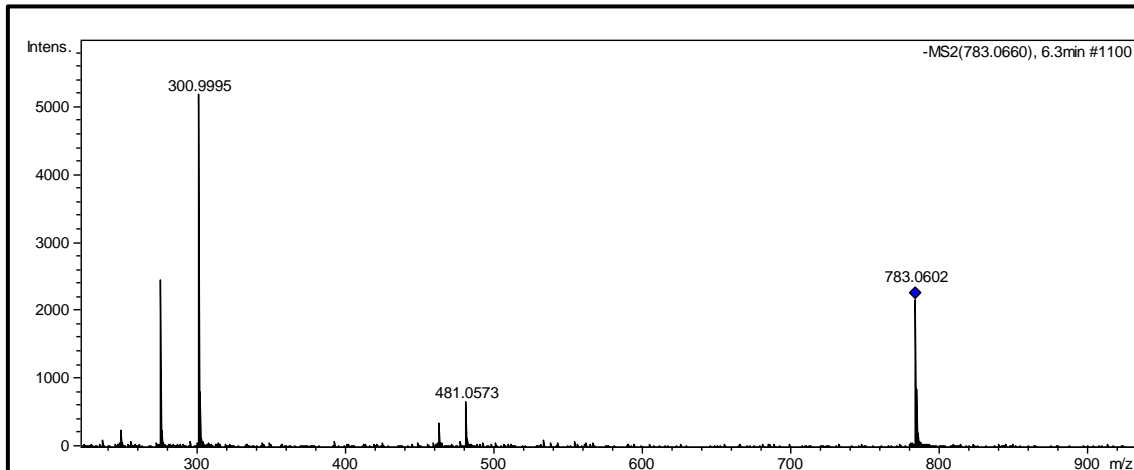
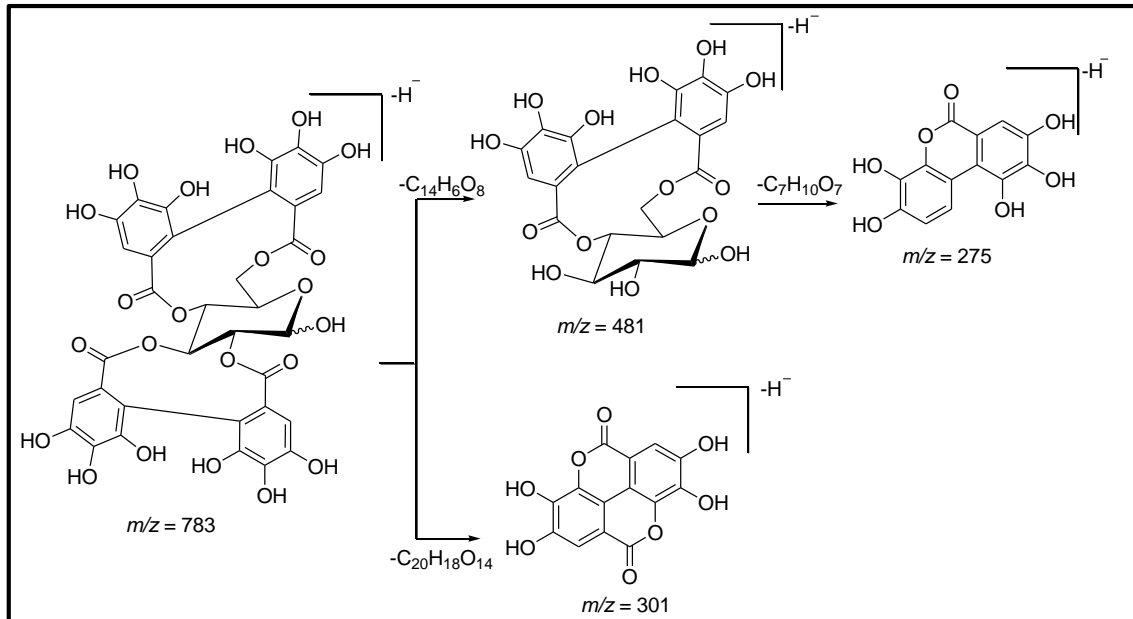


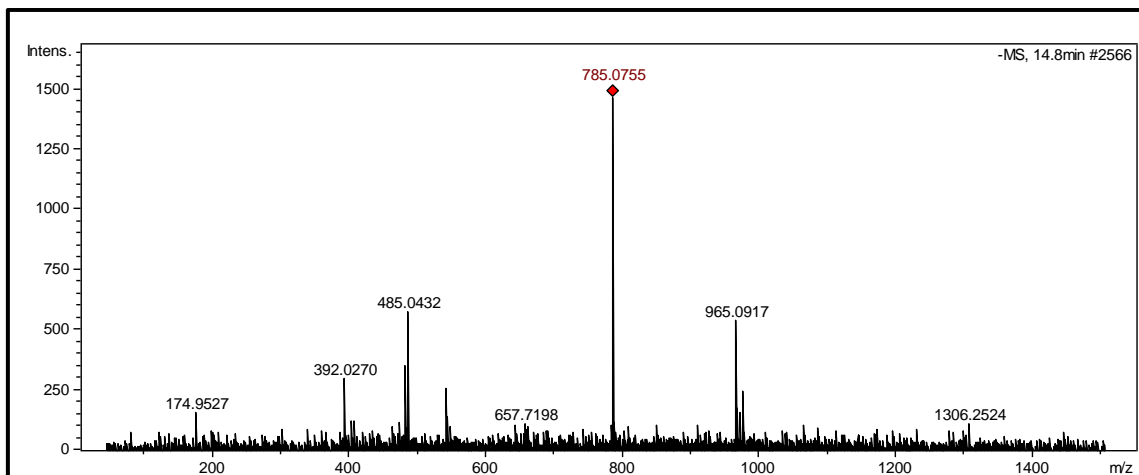
Figura 124. Proposta de fragmentação para as substâncias SM-11a e SM-11b.



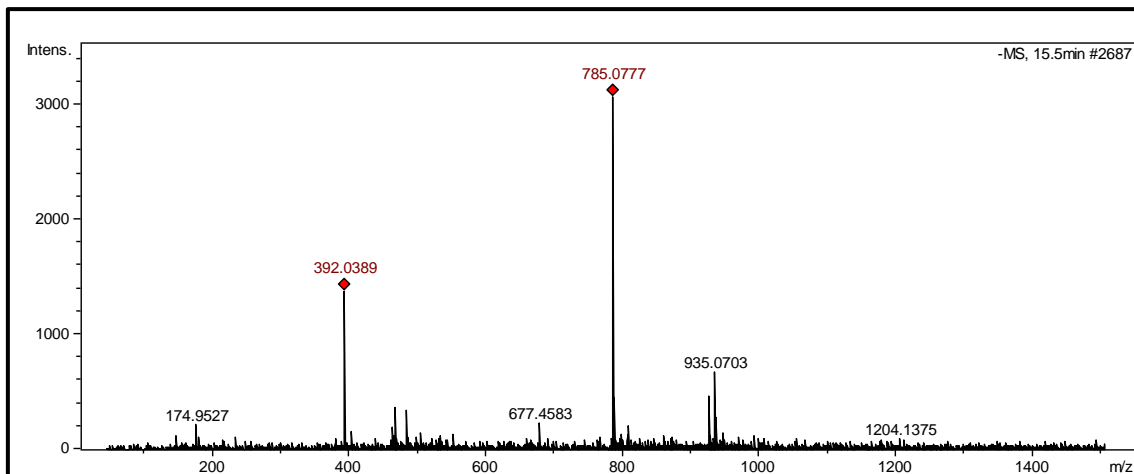
Fonte: elaborada pela autora.

Os picos 3 (SM-11c) e 5 (SM-11e) apresentaram íon quasi-molecular  $[M-H]^- = 785,0755$  e  $785,0777$ , respectivamente. Isso sugere que essas substâncias são isômeras com fórmula molecular compatível com  $C_{34}H_{25}O_{22}^-$  (calculado  $m/z$  785,0843). Os espectros de massas de alta resolução podem ser observados nas Figuras 125-126.

Figura 125. Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da substância SM-11c.

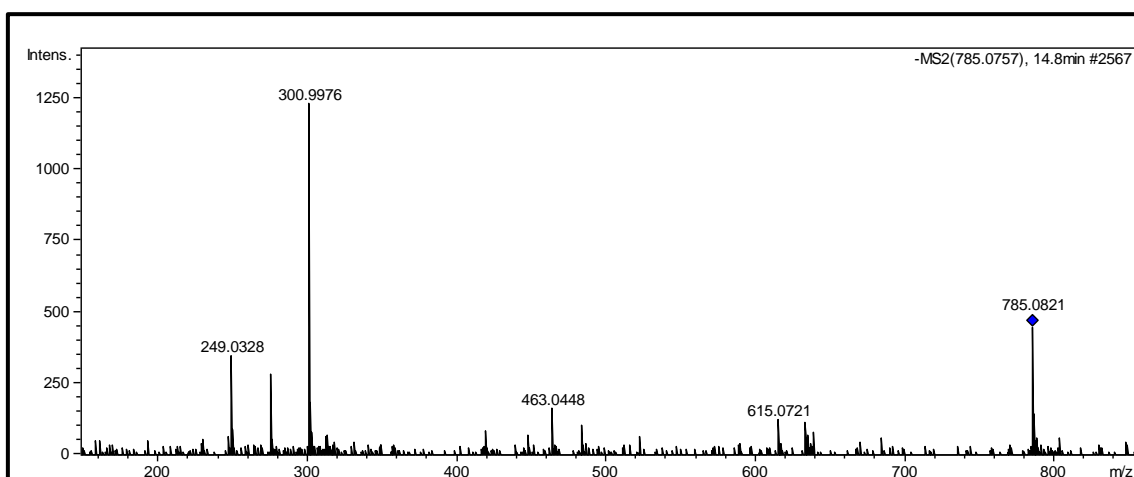


**Figura 126.** Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da substância SM-11e.

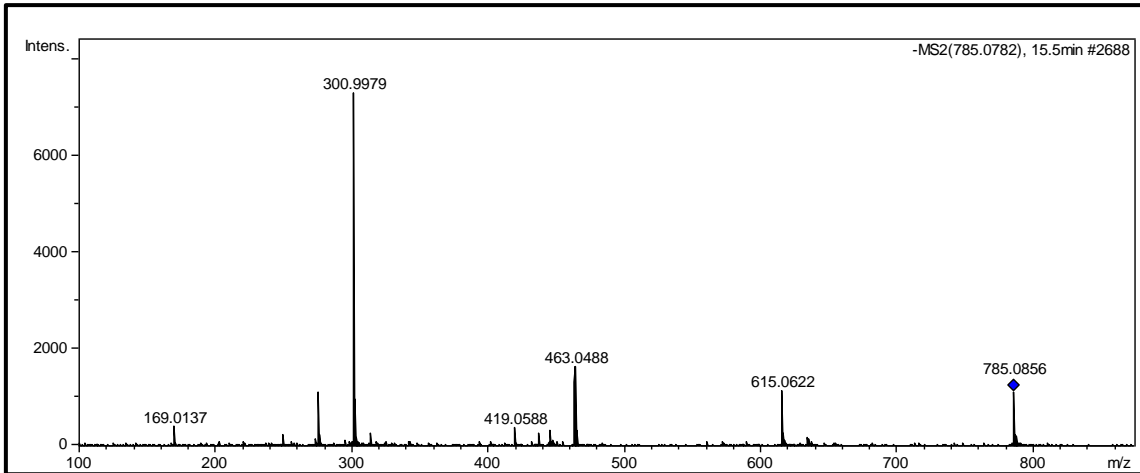


O espectro de segunda ordem ( $MS^2$ ) (Figuras 127-128) de ambas as substâncias exibiram fragmentos com  $m/z$  615 [ $M - H - 170$  Da]<sup>-</sup> (perda de ácido gálico),  $m/z$  463 [ $M - H - 170$  Da - 152 Da]<sup>-</sup> (perda do ácido gálico e unidade galoil) e o típico fragmento a  $m/z$  301. Desta forma, os picos 3 e 5 foram provisoriamente identificados como isômeros de digaloil-HHDP-glicose. Na literatura esse padrão de fragmentação é relatado para o elagitânico Tellimagrandin I, sendo assim as substâncias SM-11c e SM-11e podem corresponder aos anômeros de Tellimagrandin I (BOULEKBACHE-MAKHLOUF et al., 2012; CHANG et al., 2019). A proposta de fragmentação das substâncias SM-11c e SM-11e está esquematizada na Figura 128.

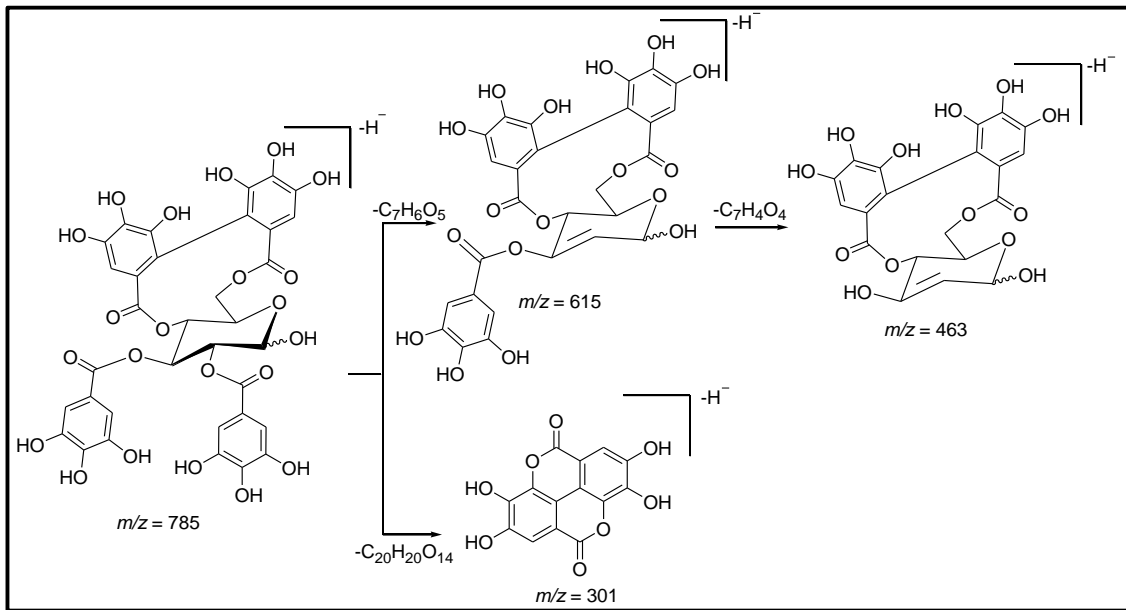
**Figura 127.** Espectro de massa/massa de alta resolução (ESI- $MS^2$ ), modo negativo, do íon quasi-molecular [ $M-H$ ]<sup>-</sup> = 783,0755 (amostra SM\_11c).



**Figura 128.** Espectro de massa/massa de alta resolução (ESI-MS<sup>2</sup>), modo negativo, do íon quasi-molecular [M-H]<sup>-</sup> = 785,0782 (amostra SM\_11e).



**Figura 129.** Proposta de fragmentação para as substâncias SM\_11c e SM\_11e.

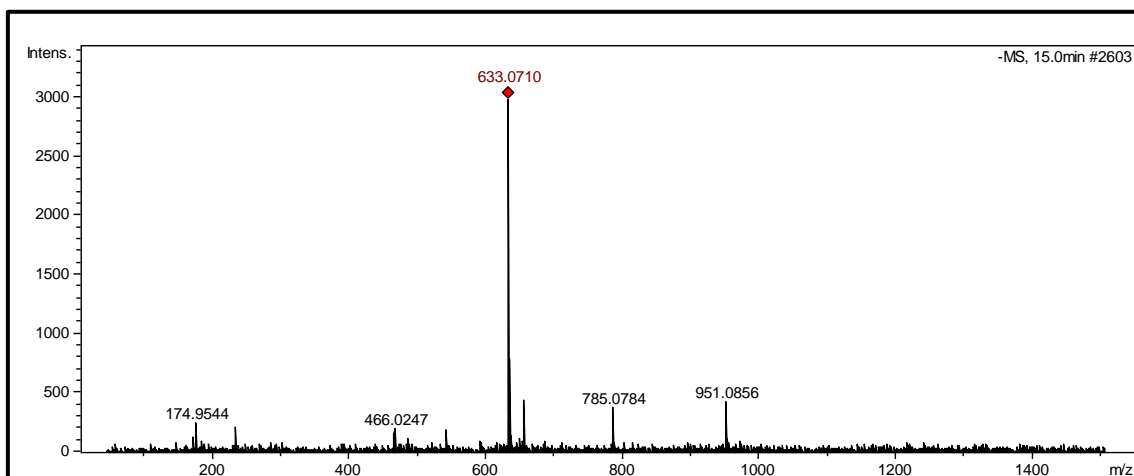


Fonte: elaborada pela autora.

O espectro de massas de alta resolução do pico 4 (SM-11d), obtido no modo negativo, exibiu o íon quasi-molecular [M-H]<sup>-</sup> = 633,0710. O [M-H]<sup>-</sup> é compatível com a fórmula molecular C<sub>27</sub>H<sub>21</sub>O<sub>18</sub><sup>-</sup> (calculado m/z 633,0686) (Figura 130).

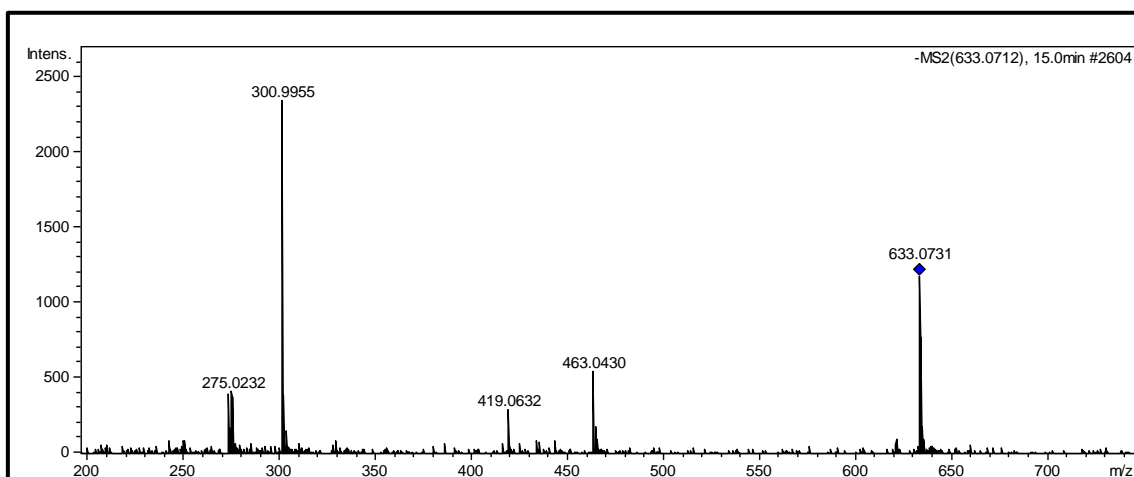


Figura 130. Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da amostra SM-11d.



O espectro de segunda ordem da substância SM-11d (Figura 131) produziu os íons em  $m/z$  463 (perda de ácido gálico) e  $m/z$  301 (perda de um grupo galoil-glicose). Esses fragmentos são característicos do elagitanino corilagina, anteriormente identificado na amostra SM-10 (p.104). A proposta de fragmentação pode ser visualizada na Figura 93 (p. 108).

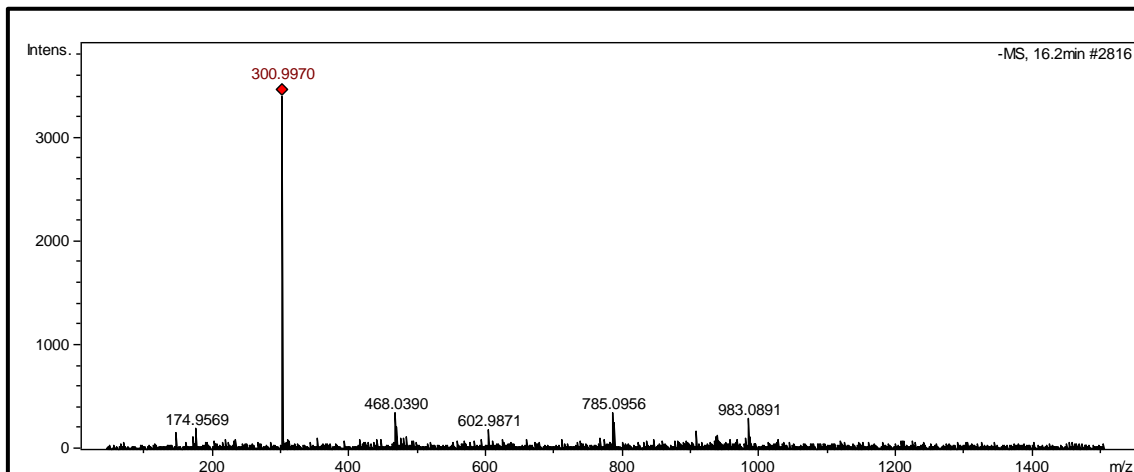
Figura 131. Espectro de massa/massa de alta resolução (ESI-MS<sup>2</sup>), modo negativo, do íon quasi-molecular  $[M-H]^- = 633,0731$  (amostra SM-11d).



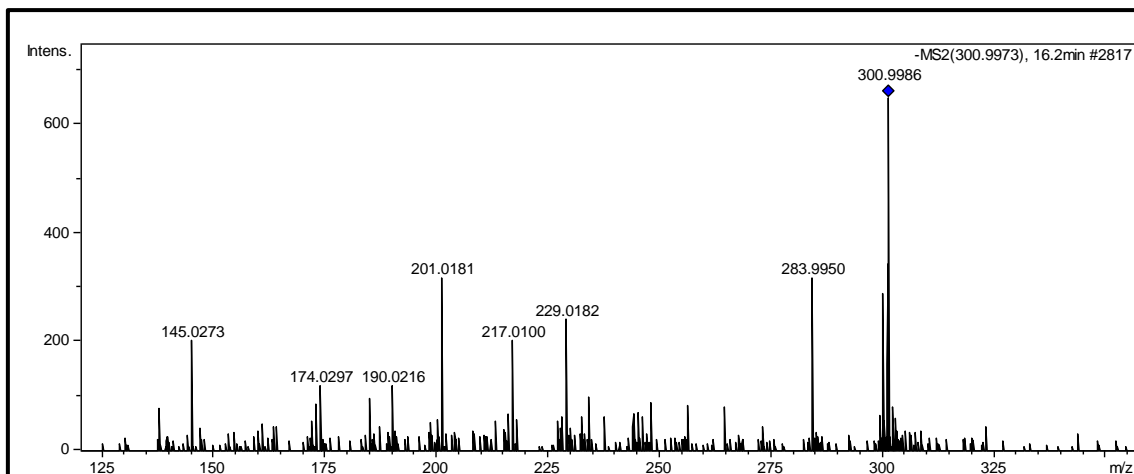
O pico 6 (SM-11f) exibiu o íon quasi-molecular  $[M-H]^- = 300,9970$ , compatível com a fórmula molecular  $C_{14}H_5O_8^-$  (calculado  $m/z$  300,9990) (Figura 132). No espectro de segunda ordem (Figura 133) foram observados fragmentos com  $m/z$  283,9895,  $m/z$  229,0133 e  $m/z$  201,0157, que são característicos do

ácido elágico, anteriormente identificado na amostra SM-03 (p. 79). A proposta de fragmentação pode ser visualizada na Figura 53 (p. 81).

**Figura 132.** Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da amostra SM-11f.



**Figura 133.** Espectro de massa/massa de alta resolução (ESI-MS<sup>2</sup>), modo negativo, do íon quasi-molecular [M-H]<sup>-</sup> = 300,9986 (amostra SM-11f).



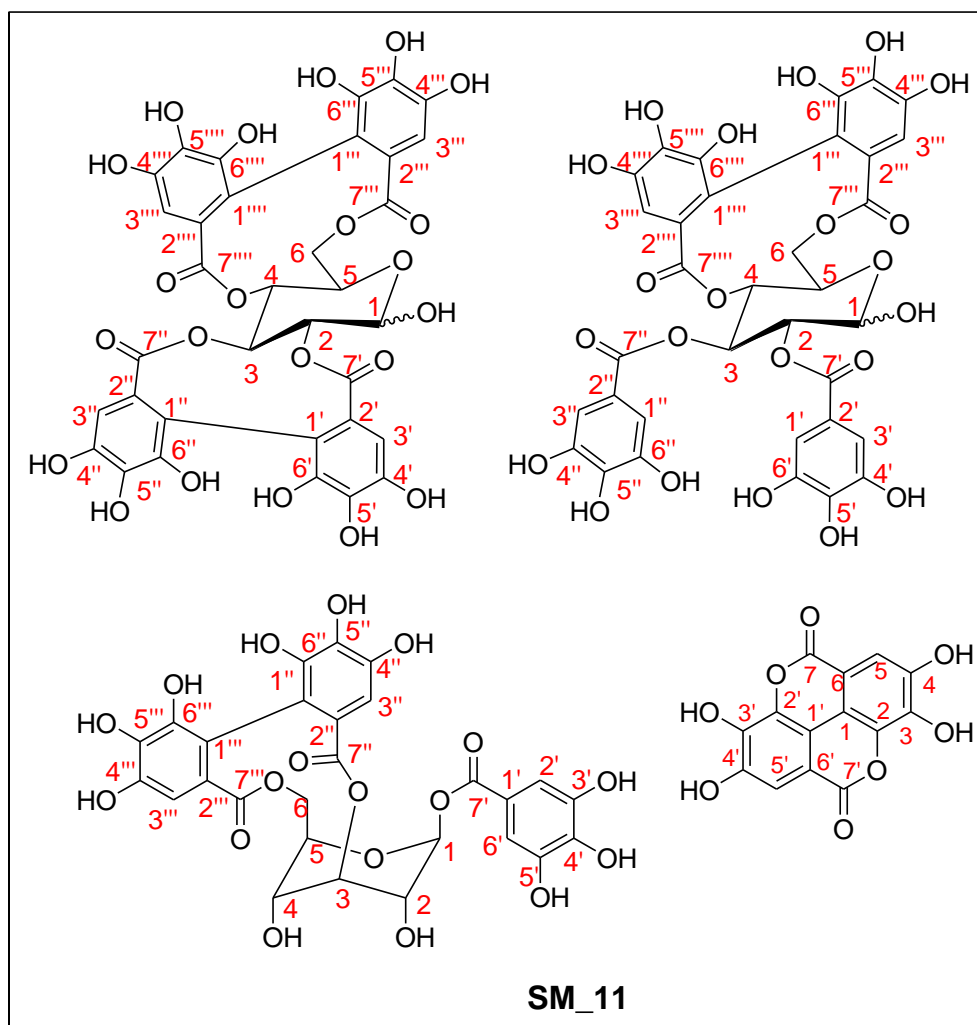
Na Tabela 20 estão listadas as informações sobre o tempo de retenção ( $t_R$ ), absorções de UV e dados do [M-H]<sup>-</sup> e fragmentações (MS<sup>2</sup>) das substâncias presentes na amostra SM-11 e na Figura 134 são apresentadas as suas estruturas.

**Tabela 20.** Dados de LC-MS das substâncias detectadas na amostra SM-11.

	T <sub>R</sub> (min)	UV (nm)	[M-H] m/z	MS <sup>2</sup> m/z	Substância
SM_11a	3,4	inclinação	783	481, 301, 275	Pedunculagina anômero
SM_11b	6,3	inclinação	783	481, 301, 275	Pedunculagina anômero
SM_11c	14,8	213, 260	785	615, 463, 301	Tellimagrandin I anômero
SM_11d	15,0	211, 269	633	463, 419, 301	Corilagina
SM_11e	15,5	211, 275	785	615, 463, 301	Tellimagrandin I anômero
SM_11f	16,2	254, 363	301	283, 229, 201	Ácido elágico

Fonte: elaboração própria.

**Figura 134.** Estrutura das substâncias identificadas na amostra SM-11.

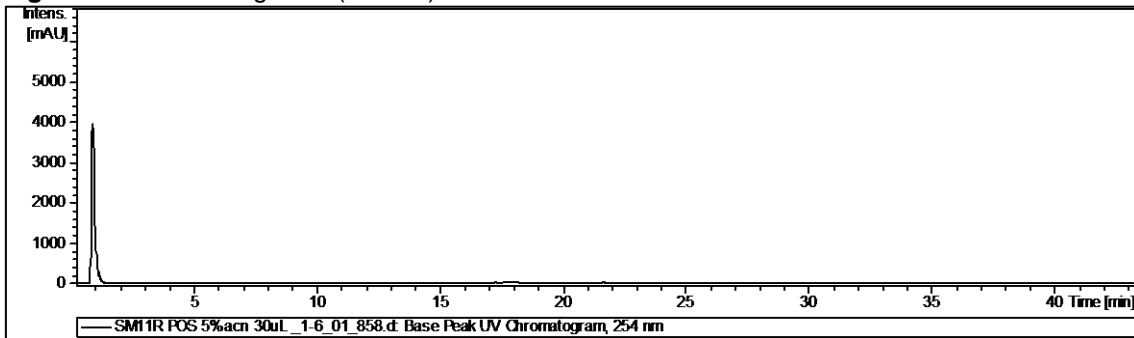


Na tentativa de purificar a fração SM-11, a mesma foi submetida a filtração em Sephadex LH-20 utilizando MeOH como eluente. Esse procedimento resultou na sub-fração 61-86 (SM-11R), que ao ser analisada em CCDA (em sílica gel) observou a presença de uma mancha de coloração azul, ao ser

analisada com  $\text{FeCl}_3$  (2%). A amostra apresentou-se como um aspecto oleoso de coloração amarelada e solúvel em MeOH.

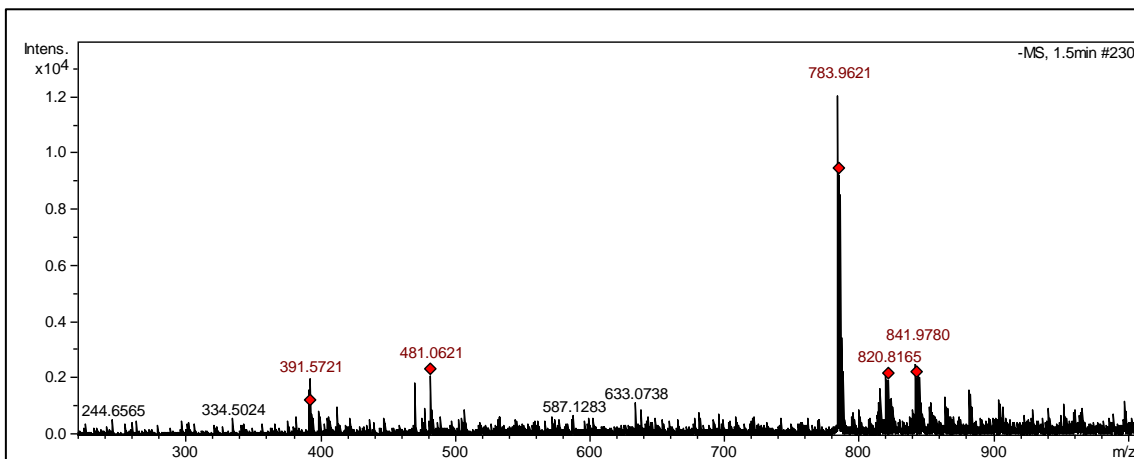
A amostra SM-11R foi submetida à análise em LC-MS utilizando as mesmas condições e método de análise utilizados para a amostra SM-08 (Tabela 10, p. 90). O cromatograma obtido com essa análise (Figura 135) exibiu a presença de um único pico com tempo de retenção  $t_R$  a 1,5 min, indicando tratar-se de um elagitanino que não possui grupos galoil em sua estrutura (MOILANEM; SINKKONEN; SALMINEN, 2013). O espectro de absorção na região do UV/Vis se apresentou como uma inclinação.

**Figura 135.** Cromatograma (LC-MS) da amostra SM-11R.



O pico apresentou íon quasi-molecular  $[\text{M}-\text{H}]^- = 783,0695$  ( $\text{C}_{34}\text{H}_{23}\text{O}_{22}^-$  calculado  $m/z$  783,0686) (Figura 136). Essas informações indicam que a amostra purificada trata-se da pedunculagina.

**Figura 136.** Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da amostra SM-11R.



Na análise dos espectros de RMN da fração SM-11R foi possível observar os sinais característicos dos anômeros da pedunculagina. Esse elagitanino possui uma hidroxila livre ligada ao C-1 da glicose, por isso ele existe como uma mistura de anômeros  $\alpha$  e  $\beta$ .

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 137, p. x) da amostra exibiu sinais na região de hidrogênios aromáticos, 6,37 – 6,63 ppm, que foram atribuídos aos hidrogênios da unidade HHDP. Em elagitaninos monoméricos (aqueles com apenas um núcleo de glicose) sinais singletos duplicados entre 6,0 e 6,8 ppm correspondem ao HHDP (SERNA, MARTÍNEZ, 2015). Além disso, também foi observado sinais na região característica de açúcar 5,47 – 3,81 ppm. Os sinais atribuídos aos hidrogênios anoméricos (H-1) foram  $\delta_{\text{H}}$  5,37 (d, J = 2,75 Hz) para o anômero  $\alpha$  e  $\delta_{\text{H}}$  4,97 (d, J = 8,55 Hz) para o  $\beta$ .

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 138, p. x) exibiu oito sinais na região de  $\delta_{\text{C}}$  170,96 – 169,22 ppm, referentes as carbonilas dos grupos HHDP. Também foram observados sinais característicos de carbonos quaternários em  $\delta_{\text{C}}$  146,58 – 115,10 ppm; carbonos metínicos em  $\delta_{\text{C}}$  108,81 – 67,89 ppm e carbono metilênico em  $\delta_{\text{C}}$  64,4 ppm.

A partir da análise do mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HSQC), Figura 139 (p. x), foi possível correlacionar os hidrogênios anoméricos  $\delta_{\text{H}}$  5,37 (H-1 $\alpha$ ) e 4,97 ppm (H-1 $\beta$ ) com os respectivos carbonos  $\delta_{\text{C}}$  92,35 e 95,84 ppm. Também foi possível associar os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,37 - 6,63 ppm (H-3') com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  108,81 – 107,82 ppm (C-3'), que correspondem aos grupos HHDP.

Na análise do mapa de correlação a longa distância  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HMBC), figura 140 (p. x), foram observadas as correlações entre os hidrogênios H-3' ( $\delta_{\text{H}}$  6,37 – 6,63 ppm) com os carbonos das carbonilas C-7' ( $\delta_{\text{C}}$  170,96 – 169,22 ppm) das unidades HHDP. Além disso, também foram observadas as correlações entre os hidrogênios H-2, H-3, H-4 e H-6 da unidade de glicose ( $\delta_{\text{H}}$  4,90, 4,49, 5,12 e 5,35/3,90 $\beta$ , 5,31/3,84 $\alpha$  ppm) com as carbonilas das unidades HHDP ( $\delta_{\text{C}}$  170,51 – 170,37, 170,96 – 169,22, 169,87 – 169,75 e 169,26 – 169,22 ppm, respectivamente).

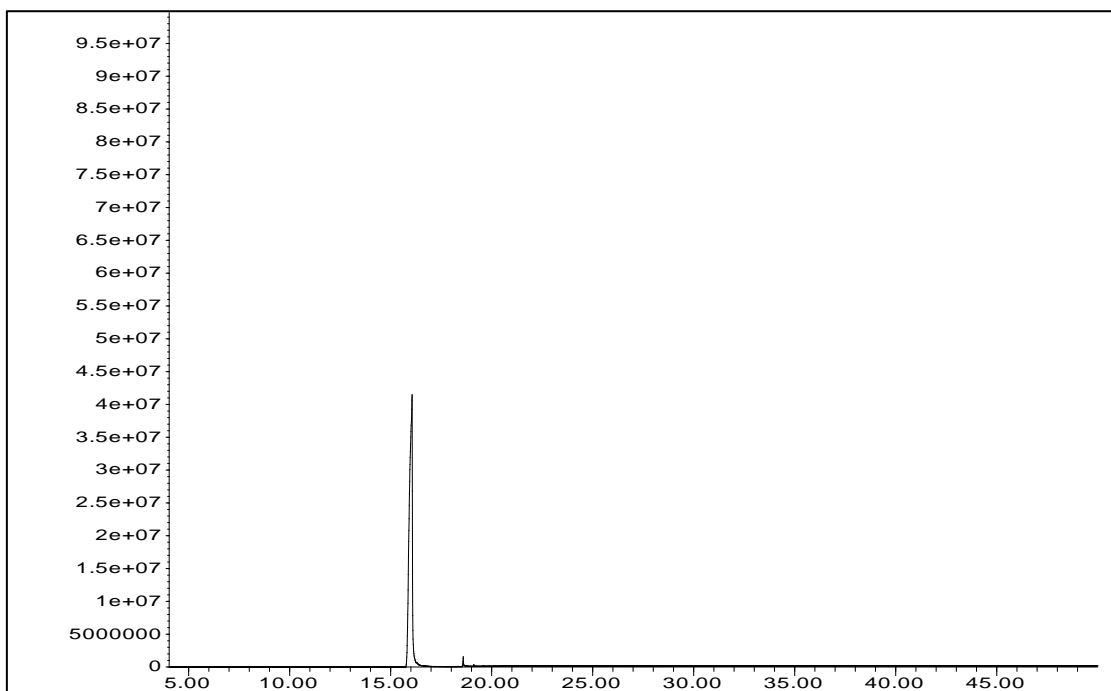
Pelo melhor do nosso conhecimento este é o primeiro relato da presença dos elagitaninos pedunculagina, tellimagrandin I e corilagina em *L. pisonis*. Até o momento não há o relato da identificação de elagitaninos na família Lecythidaceae.

#### 5.1.4.9. Identificação estrutural da amostra SM-22

O precipitado F2S-P foi submetido a uma reação de acetilação (vide metodologia (p. 48)). O produto da acetilação foi submetido a um CC com sílica tipo *Flash*. A fração SM-22 se apresentou como cristais brancos, solúveis em diclorometano. A análise em CCDA (em sílica gel), utilizando como eluente hexano:AcOEt (70:30), indicou a presença de uma mancha de coloração marrom ao ser revelada com orcinol sulfúrico.

A amostra foi analisada em CG/EM, revelando a presença de único pico (Figura 141).

**Figura 141.** Cromatograma da fração SM-22.

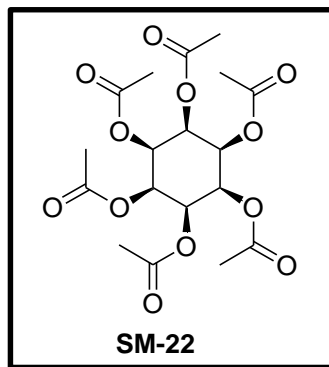


Ao comparar o  $m/z$  e o padrão de fragmentação do pico com os dados da biblioteca NIST do equipamento foi possível identificar a substância como *mio*-inositol hexacetilada (Tabela 22, Figura 142).

**Tabela 22.** Tempo de retenção ( $t_R$ ), relação massa/carga ( $m/z$ ) e porcentagem de área (%) das substâncias identificadas na fração SM-22.

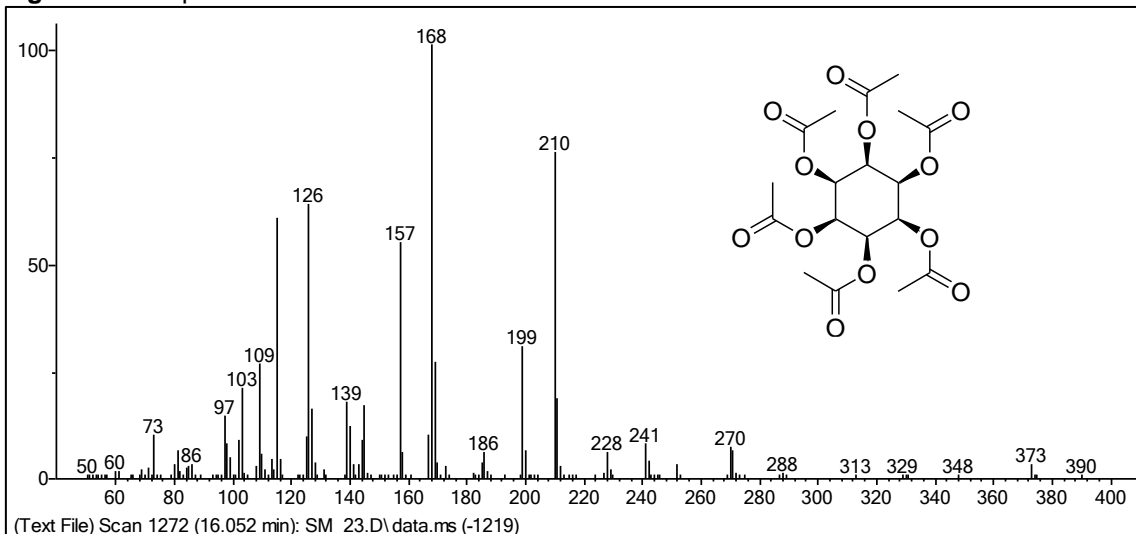
Pico	$t_R$ (min)	$m/z$	%	Substância	Código
1	16,06	432	100	<i>mio</i> -inositol hexacetilada	SM-22

**Figura 142.** Substância identificada na fração SM-22.



O espectro de massas da substância SM-22 está apresentado na Figura 143.

**Figura 143.** Espectro de massas da substância SM-22.



#### 5.1.5. Substâncias identificadas no extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) da madeira de *L. pisonis*

Identificação estrutural das amostras SM\_23, SM\_24, SM\_25, PBS\_F, PBS\_A - faltar realizar a análise de RMN e LC/MS ou ESI/MS das amostras, pois os equipamentos estavam inoperantes, e fazer a elucidação estrutural.

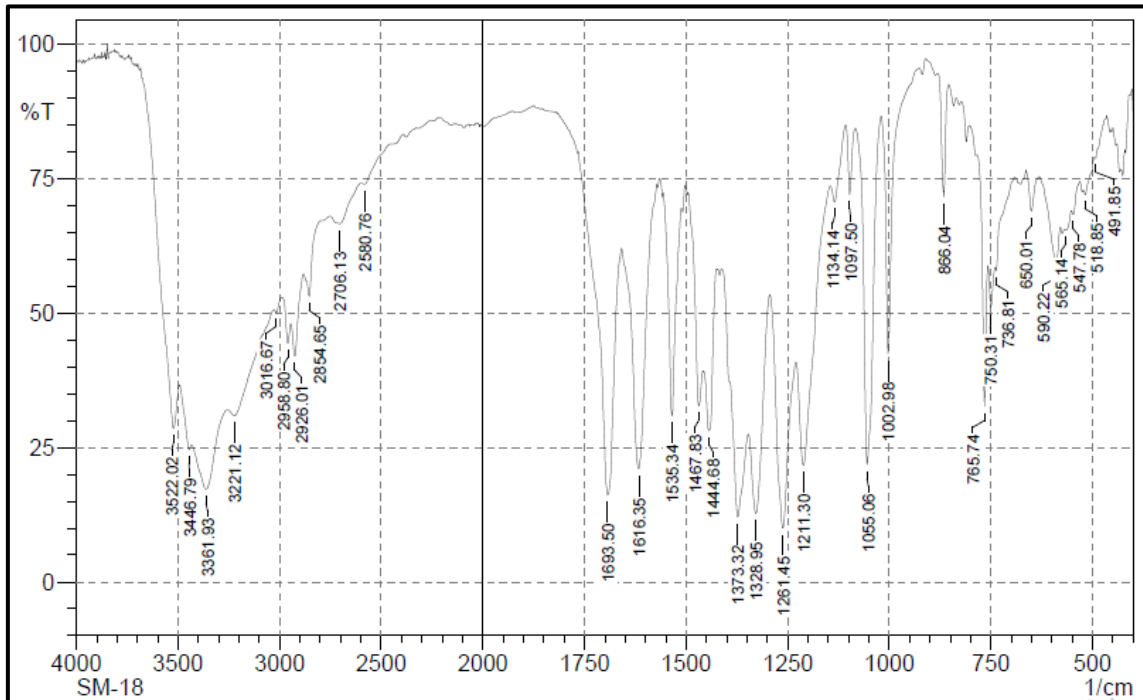
##### 5.1.5.1. Identificação estrutural da amostra SM-18

A amostra SM-18 foi obtida a partir do fracionamento cromatográfico da partição em éter etílico do extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O (item 4.1.3.4, p. 53). A análise em CCDA, utilizando-se como eluente AcOEt, revelou a presença de uma única mancha de coloração azul escuro quando revelada com solução de FeCl<sub>3</sub> (2%), esta observação sugere tratar-se de uma substância fenólica. A amostra se apresentou como cristais de coloração amarela e solúveis em MeOH.

Na Figura 144, o espectro de absorção na região do infravermelho de SM-18, obtido em KBr, exibiu uma intensa absorção em  $\nu_{OH}$  3361 cm<sup>-1</sup> atribuído a presença de grupos hidroxilas, alta intensidade em  $\nu_{C=O}$  1693 cm<sup>-1</sup> característico da deformação axial da ligação dupla C=O, além de sinais correspondentes a presença de ligação dupla C=C e de ligação C-H de anel aromático.

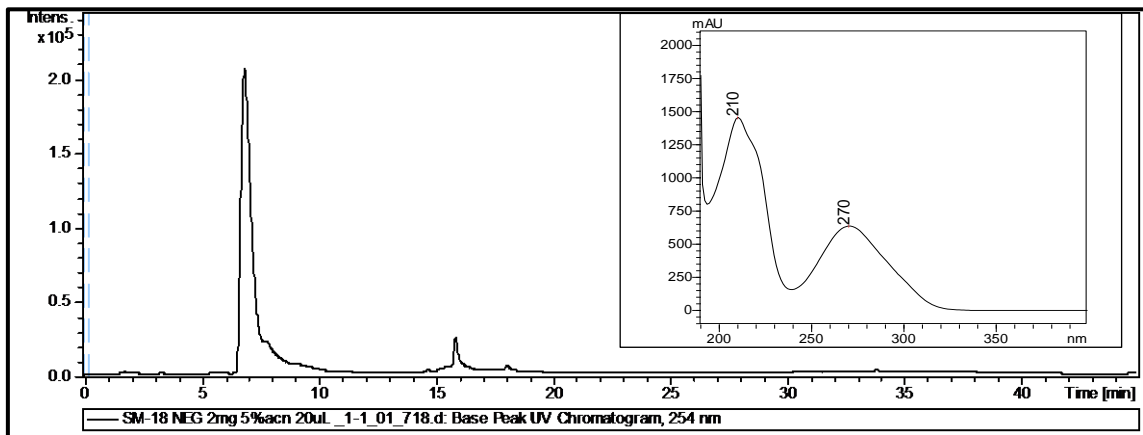


Figura 145. Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra SM-18.



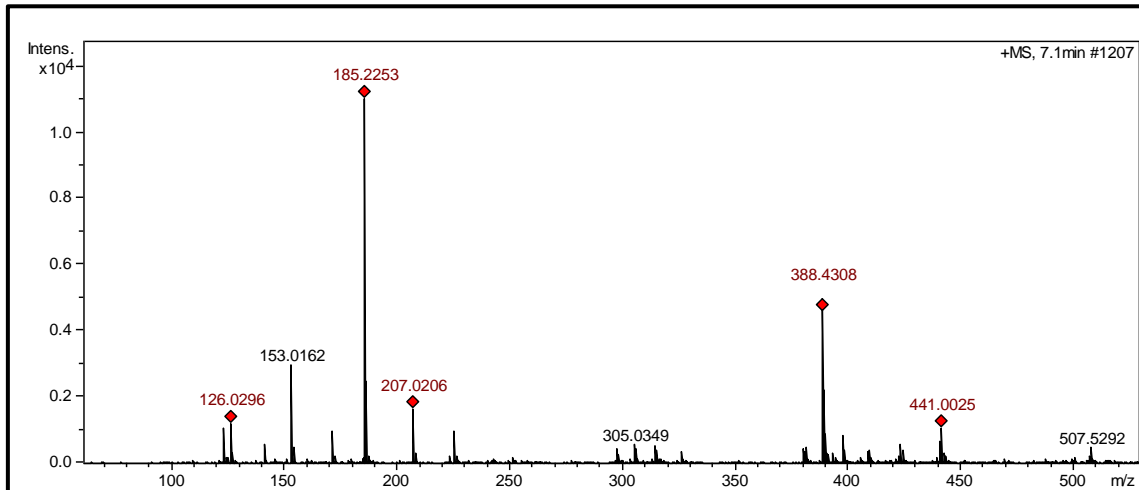
A amostra SM-18 foi submetida à análise em LC-MS utilizando o mesmo método empregado na amostra SM-08 (Tabela 10, p. 90). O cromatograma obtido com essa análise exibiu um sinal majoritário com tempo de retenção  $t_R = 7,5$  min. O espectro na região do UV/Vis do pico majoritário apresentou absorções  $\lambda_{max}$  igual a 210 e 270 nm, que são características do ácido gálico (Figura 145).

Figura 145. Cromatograma (LC-MS) e espectro na região do UV/Vis do pico majoritário da amostra SM-18.



O espectro de massas de alta resolução, obtido no modo positivo, exibiu o íon quasi-molecular  $[M-H]^+ = 185,2253$ , compatível com a fórmula molecular  $C_8H_9O_5^+$  (calculado  $m/z$  185,0444) (Figura 146).

**Figura 146.** Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo positivo, da amostra SM-18.



No espectro de segunda ordem ( $MS^2$ ) (Figura 147), foram gerados os fragmentos com  $m/z$  153  $[M - H - 32 Da]^+$  (perda do grupo metoxila) e  $m/z$  126  $[M - H - 59 Da]^+$  (perda do grupo  $COOCH_3$ ). Esses fragmentos são característicos de um derivado metoxilado do ácido gálico. A proposta de fragmentação da amostra SM-18 está esquematizada na Figura 148.

**Figura 147.** Espectro de massa/massa de alta resolução (ESI- $MS^2$ ), modo positivo, do íon quasi-molecular  $[M-H]^+ = 185,0296$  (amostra SM-18).

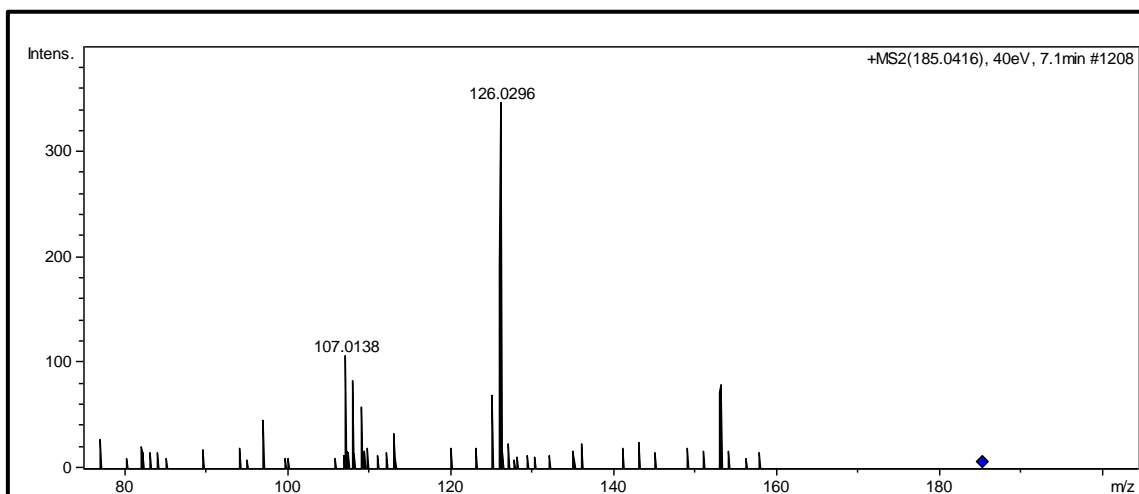
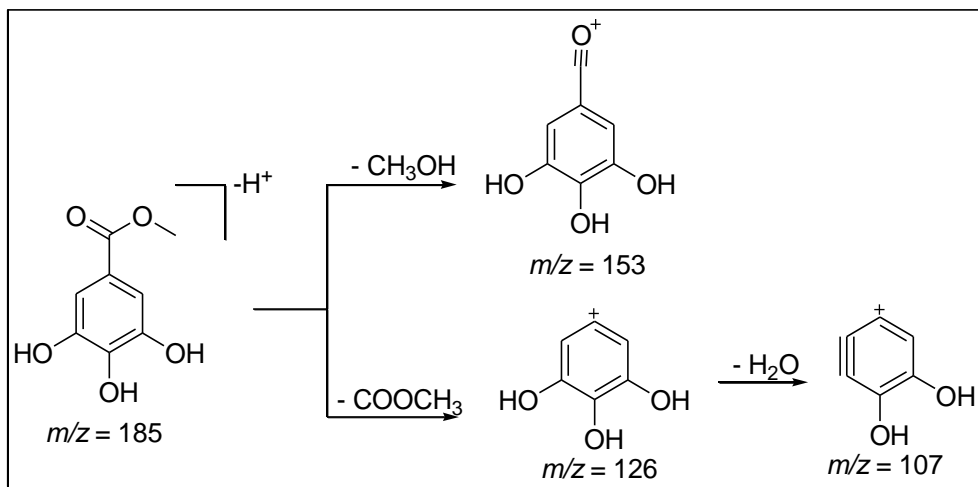


Figura 148. Proposta de fragmentação para a amostra SM-18.



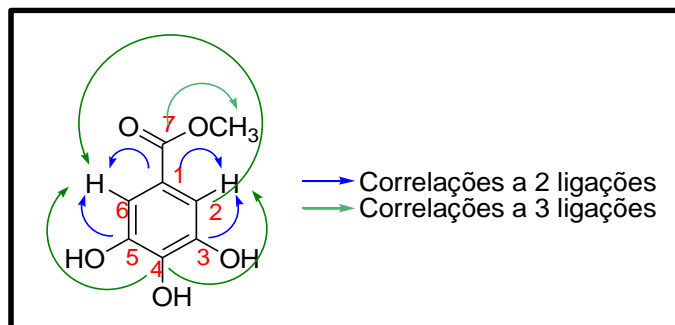
Fonte: elaboração própria.

O espectro de RMN de  $^1H$  (500 MHz, MeOD), Figura 149, revelou a presença de um sinal em  $\delta_H$  7,04 ppm (s), correspondente aos hidrogênios H-2 e H-6, e um sinal em  $\delta_H$  3,81 ppm (s) que foi atribuído aos hidrogênios do grupo metoxila.

O espectro de RMN de  $^{13}C$  (125 MHz, MeOD), Figura 150, exibiu seis sinais de carbono, sendo um de carbono metínico  $\delta_C$  110,2 ppm (C-2/C-6), 4 de carbonos quartenários  $\delta_C$  169,2 (C-7);  $\delta_C$  146,6 (C-3/C-5);  $\delta_C$  139,9 (C-4) e  $\delta_C$  121,6 ppm (C-1) e um de carbono metílico com sinal  $\delta_C$  52,4, característico de grupo metoxila.

A partir da análise do mapa de correlação HMQC foi possível estabelecer a correlação entre os sinais  $\delta_H$  7,04 (H-2/H-6) e  $\delta_C$  110,2 (C-2/C-6); e entre os sinais  $\delta_H$  3,81 e  $\delta_C$  52,4 (Figura 151). A análise do mapa de correlação HMBC (Figura 152) exibiu correlação a longa distância entre o sinal  $\delta_H$  7,03 (H-2/H-6) com todos os sinais de carbono da substância e do sinal  $\delta_H$  3,81 com  $\delta_C$  169,2 (C-7). Na Figura 153 são apresentadas algumas das correlações observadas à longa distância.

Figura 153. Algumas correlações observadas a 2 e 3 ligações no espectro de HMBC.



Com base nas informações obtidas com os espectros, que aliada à comparação com dados espectrométricos descritos na literatura, foi possível identificar a substância como o galato de metila.

A literatura reporta a presença do galato de metila nas folhas de *L. pisonis*, no entanto, nos madeira este é o primeiro relato (BARRETO et al., 2020).

Figura 154. Estrutura da substância identificada na amostra SM-18.

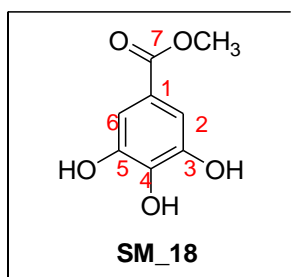


Tabela 23. Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz, respectivamente) da amostra SM-18 em MeOD.

SM_18					Galato de metila*	
C	$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_c$	$\delta_H$
1	121,6	-	H2/H6	-	119,7	-
2	110,2	7,04 (s)	-	H6	108,8	6,93 (s)
3	146,6	-	H2	-	145,5	-
4	139,9	-	-	H2/H6	138,0	-
5	146,6	-	H6	-	145,5	-
6	110,2	7,04 (s)	-	H2	108,8	6,93 (s)
7	169,2	-	-	H2/H6	165,6	-
OCH <sub>3</sub>	52,4	3,81 (s)		OCH <sub>3</sub>	52,3	3,74 (s)

Legenda: SM-18 = dados obtidos no presente trabalho (MeOD). s singletto.  
Fonte: \*MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011.

Figura 149. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para SM-18 (500 MHz, MeOD).

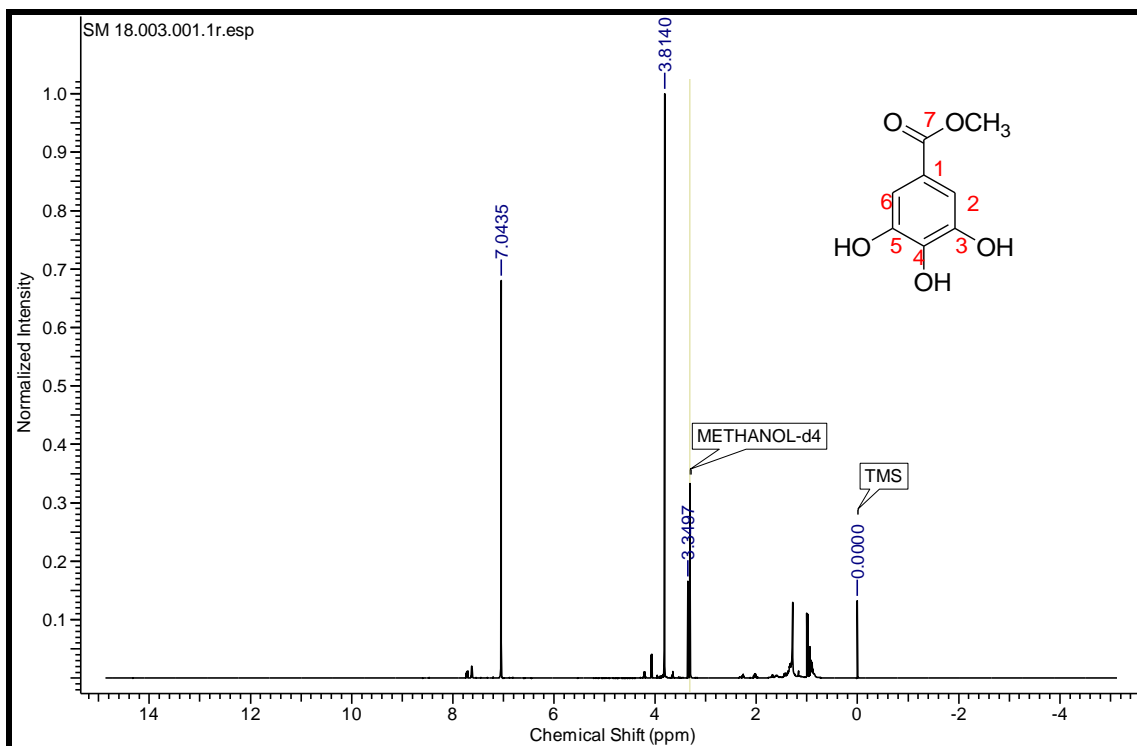


Figura 150. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para SM\_18 (125 MHz, MeOD).

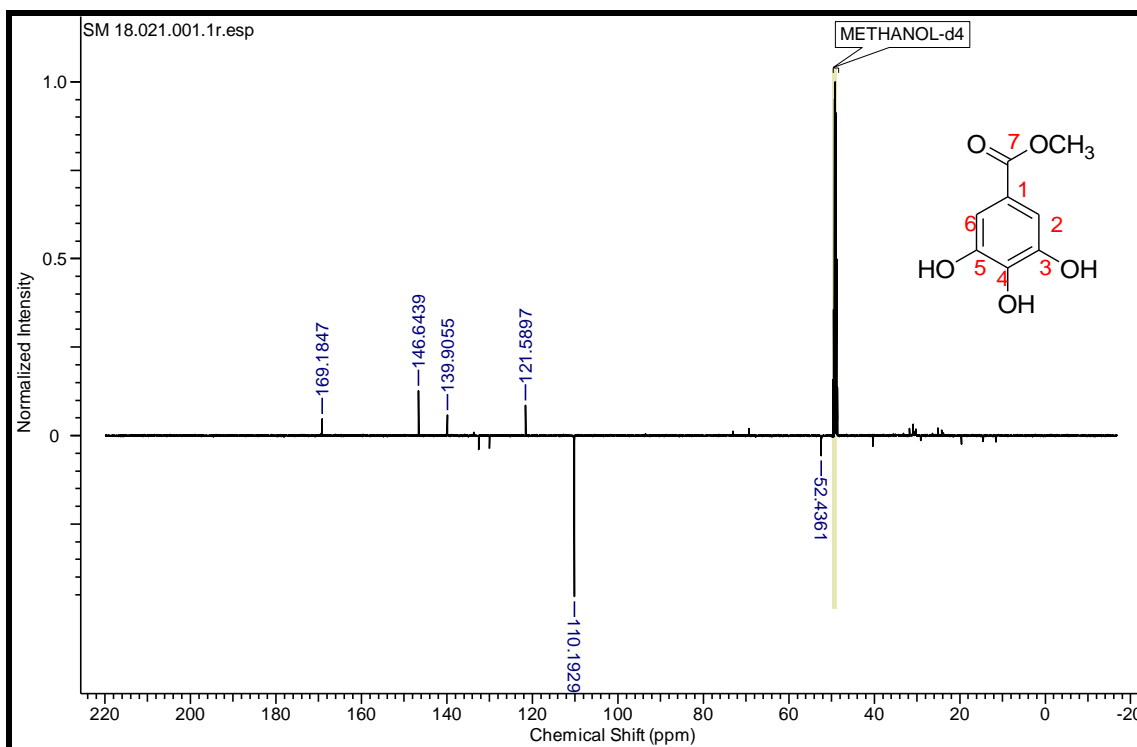


Figura 151. Espectro de HMQC obtido para SM\_18 (MeOD).

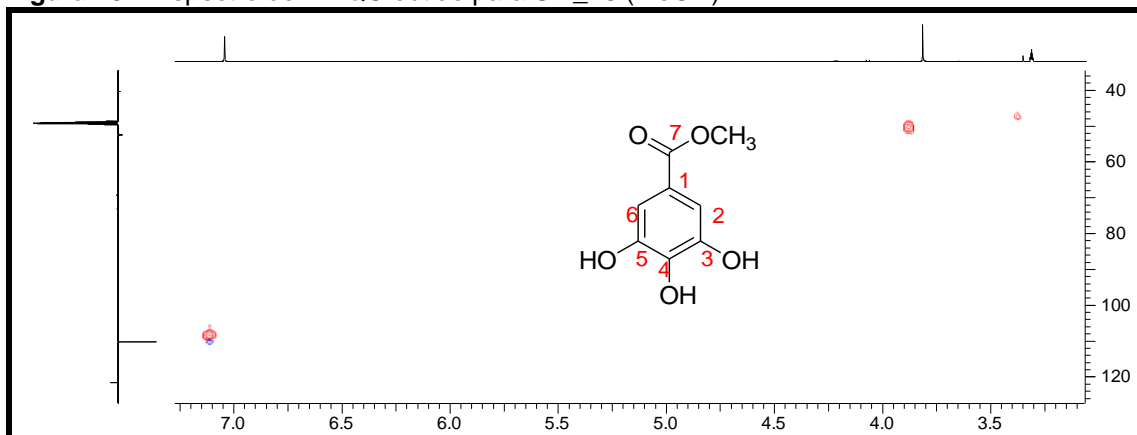
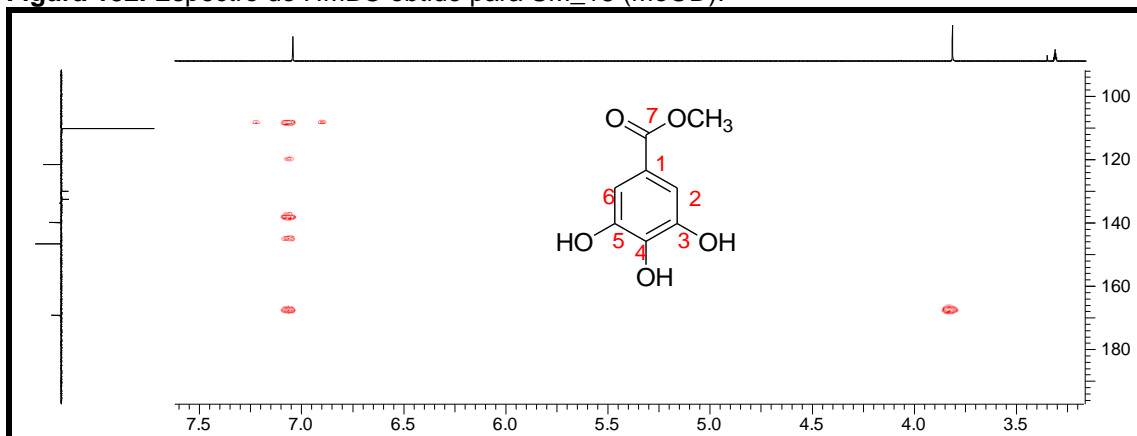


Figura 152. Espectro de HMBC obtido para SM\_18 (MeOD).



#### 5.1.5.2. Identificação estrutural da amostra SM-19

A amostra SM-19 foi obtida a partir do fracionamento cromatográfico da partição em éter etílico do extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O (item 4.1.3.4, p. 53). A análise em CCDA, utilizando-se como eluente AcOEt, revelou a presença de duas manchas de coloração azul escuro quando revelada com solução de FeCl<sub>3</sub> (2%), esta observação sugere tratar-se de uma substância fenólica. A amostra se apresentou como cristais de coloração amarela e solúveis em MeOH.

A amostra SM-19 foi submetida à análise em LC-MS utilizando o mesmo método empregado na amostra SM-08 (Tabela 10, p. 90). O cromatograma (Figura 155) obtido com essa análise exibiu a presença de dois sinais majoritários com tempos de retenção  $t_R = 2,4$  (SM-19a) e 6,9 mim (SM-19b). O espectro na região do UV/Vis, de ambos os picos, apresentou absorções  $\lambda_{max}$  igual a 210 e 270 nm, que são características do ácido gálico (Figura 156).

Figura 155. Cromatograma (LC-MS) da amostra SM-19.

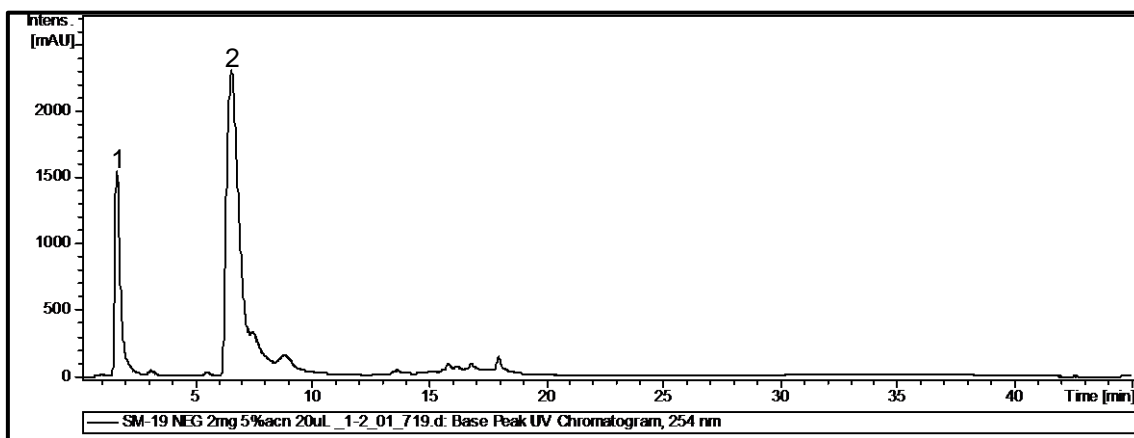
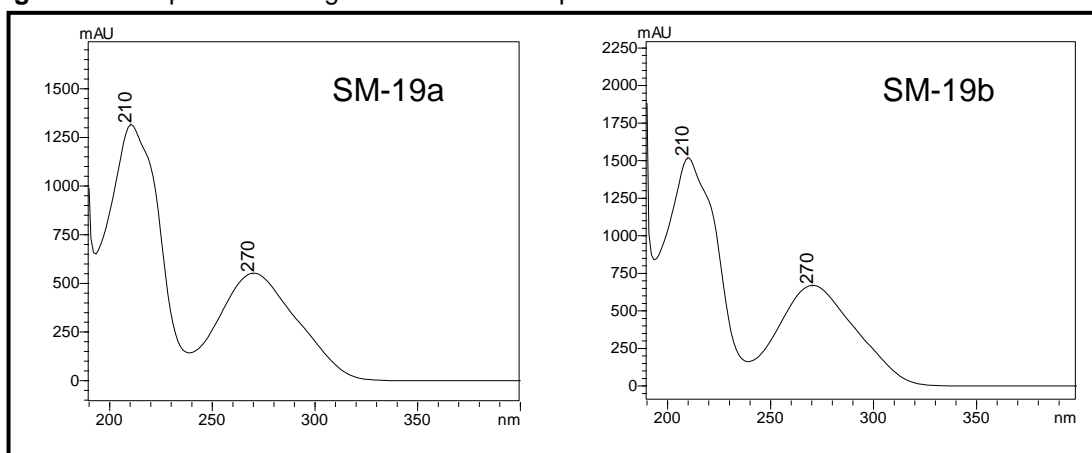


Figura 156. Espectros na região do UV/Vis dos picos 1-2 da amostra SM-19.



O espectro de massas de alta resolução (Figura 157), obtido no modo negativo, da substância SM-19a exibiu o íon quasi-molecular  $[M-H]^- = 169,0881$ , compatível com a fórmula molecular  $C_7H_5O_5^-$  (calculado  $m/z$  169,0142), característico do ácido gálico, anteriormente identificado (p. 89).

O pico 2 (SM-19b) exibiu o íon quasi-molecular, no modo positivo,  $[M-H]^+ = 185,1159$  (Figura 158), compatível com a fórmula molecular  $C_8H_9O_5^+$  (calculado  $m/z$  185,0444), característico do galato de metila, anteriormente identificado (p. 142).

Figura 157. Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo negativo, da amostra SM-19a.

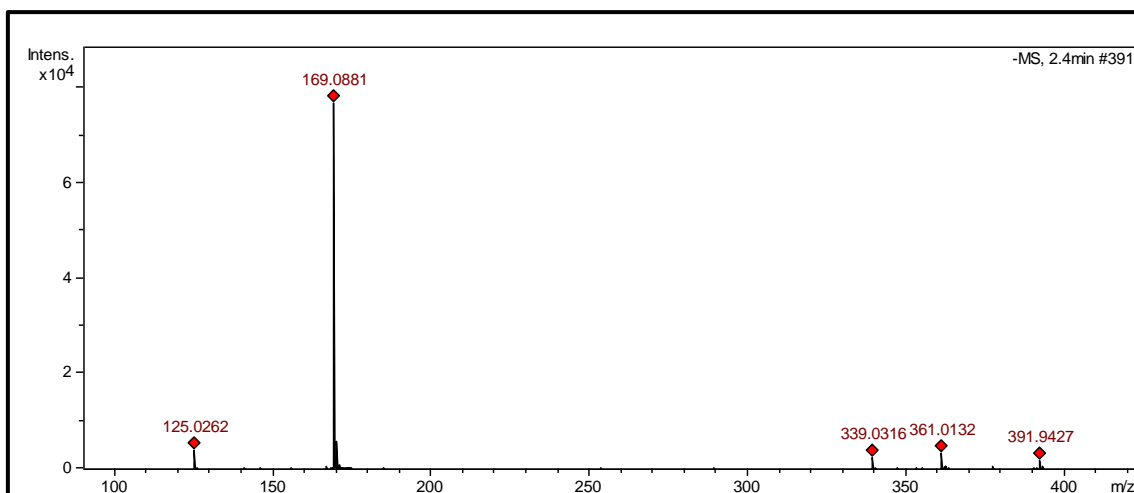


Figura 158. Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS), modo positivo, da amostra SM-19b.

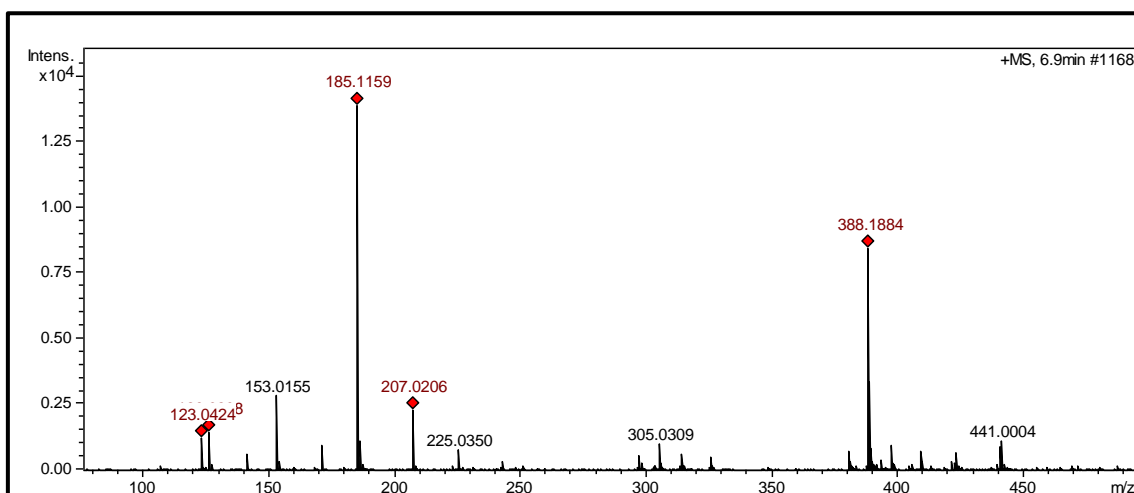
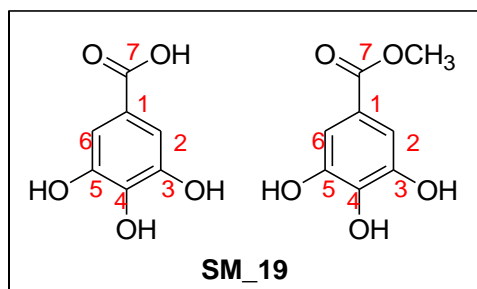


Figura 159. Estrutura da substância identificada na amostra SM-19.



Falta realizar a análise de RMN dessa amostra.



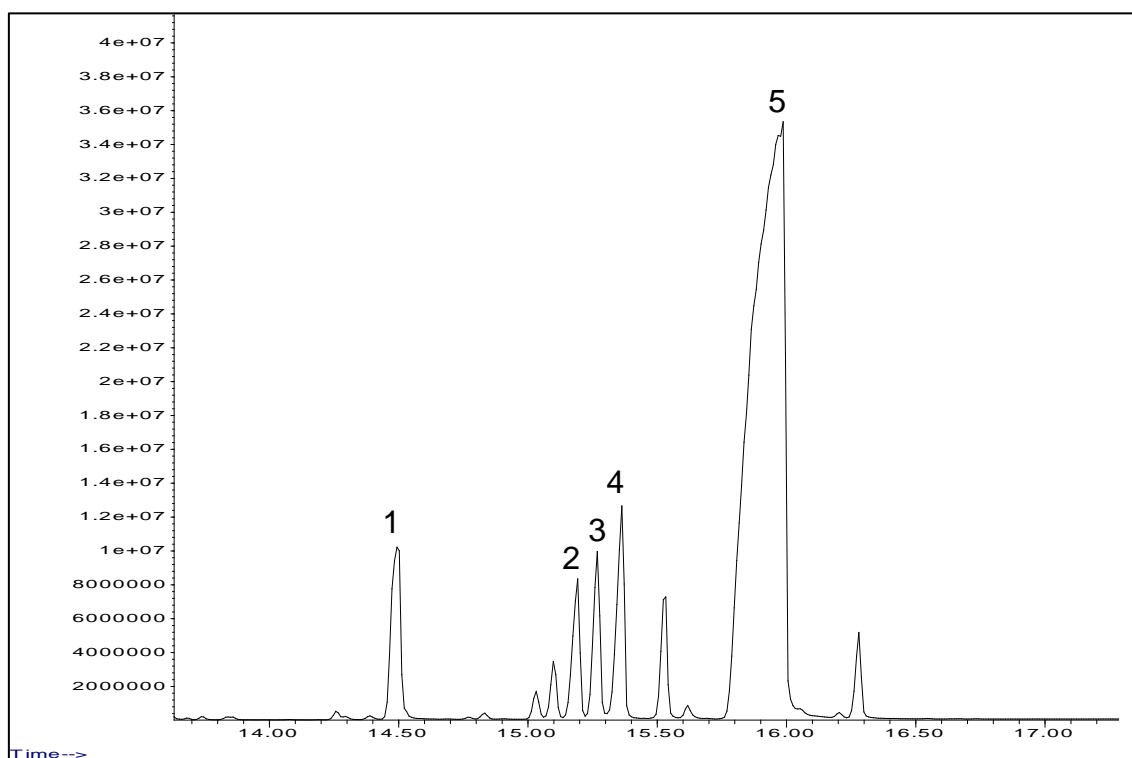
### 5.1.5.3. Identificação estrutural da amostra C8

A partição aquosa do extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O foi submetida a uma reação de acetilação (p. 54). O produto da acetilação foi submetido a CC de sílica tipo *Flash*, resultando na fração C8. A amostra apresentou-se com um aspecto oleoso, solúvel em diclorometano.

A análise em CCDA, utilizando como eluente hexano:AcOEt (65:35), indicou a presença a presença de uma mancha de coloração marrom ao ser revelada com orcinol sulfúrico.

A análise por CG/EM da fração C8 revelou a presença de 5 picos majoritários, como pode ser observado na Figura 160.

**Figura 160.** Cromatograma da fração C8.



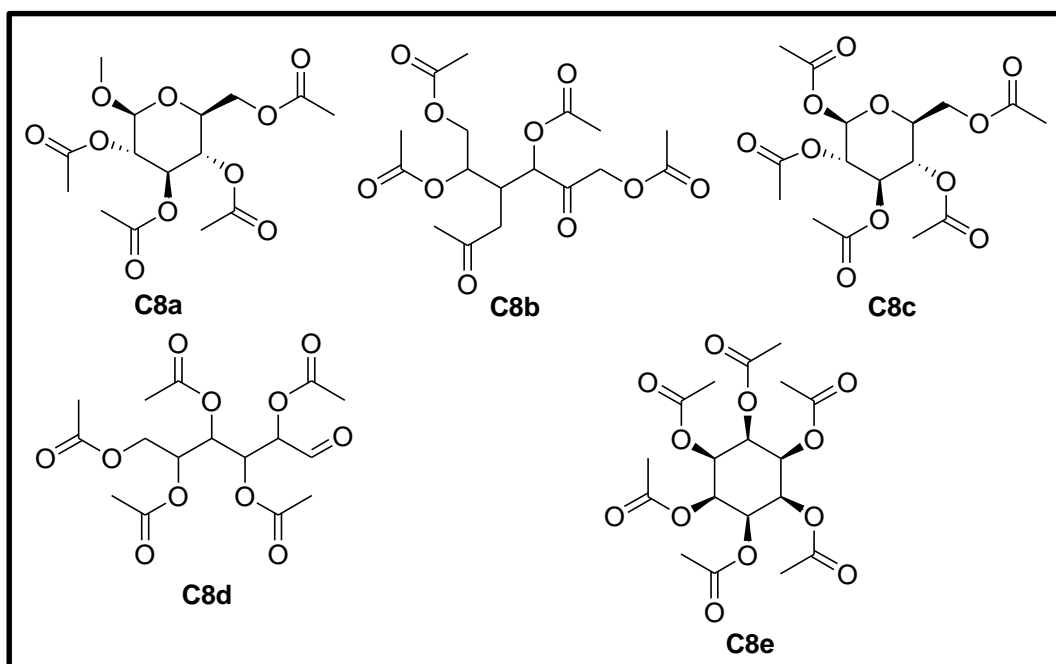
Por meio da comparação do *m/z* dos componentes da mistura com os dados da biblioteca NIST do equipamento, foi possível identificar quatro açúcares: metil-2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-gliocopiranose (C8a), D-frutose 1,3,4,5,6-pentacetato (C8b), D-gliocopiranose pentacetato (C8c), D-glicose

2,3,4,5,6-pentacetato (C8d) e um ciclitol *mio*-inositol hexacetato (C8e). Sendo o *mio*-inositol acetilado a substância majoritária (Tabela 24, Figura 161).

**Tabela 24.** Tempo de retenção ( $t_R$ ), relação massa/carga ( $m/z$ ) e porcentagem de área (%) das substâncias identificadas na fração C8.

Pico	$t_R$ (min)	$m/z$	%	Substância	Código
1	14,49	362	5,75	Metil-2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glicopirranose	C8a
2	15,19	388	3,67	D-frutose 1,3,4,5,6-pentacetato	C8b
3	15,27	390	4,08	D-glicopirranose pentacetato	C8c
4	15,36	390	5,55	D-glicose 2,3,4,5,6-pentacetato	C8d
5	15,96	432	74,95	<i>Mio</i> -inositol hexacetato	C8e

**Figura 161.** Substâncias identificadas na fração C8.



Os espectros de massas das substâncias não apresentaram os picos dos íons moleculares (Figuras 162-166).

Figura 162. Espectro de massas de C8a.

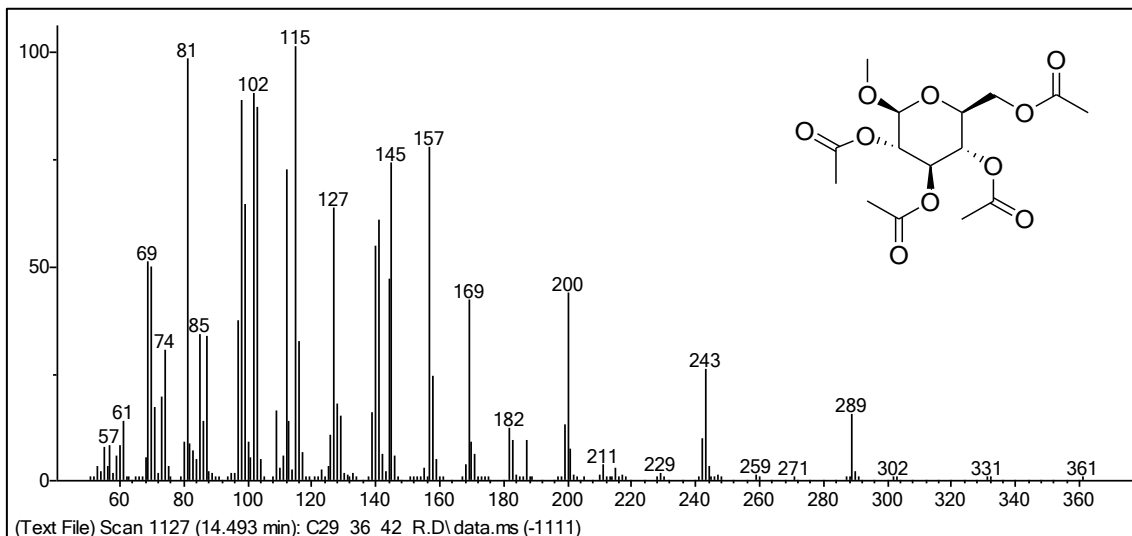


Figura 163. Espectro de massas de C8b.

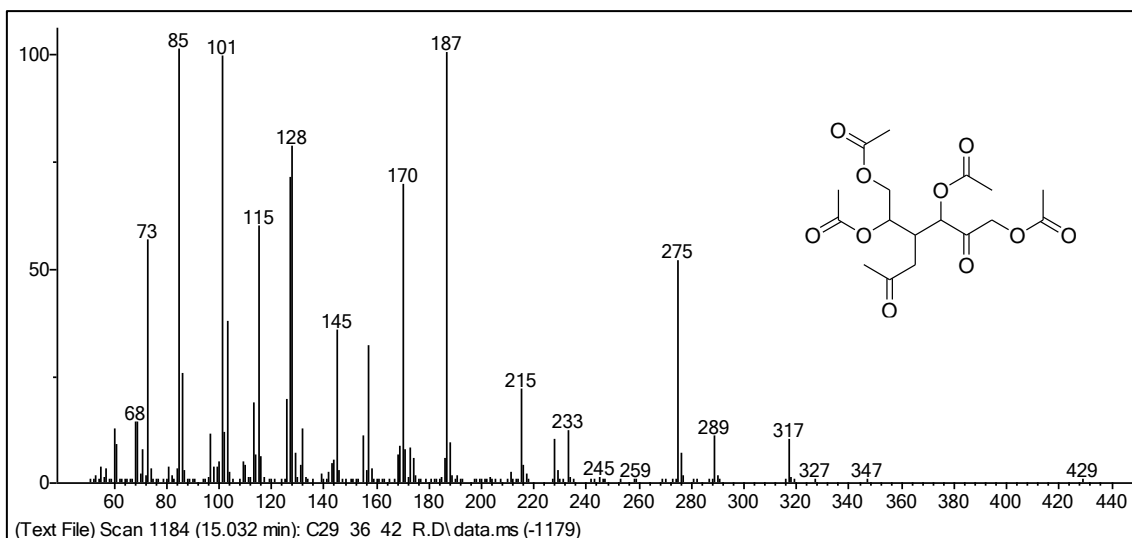


Figura 164. Espectro de massas de C8c.

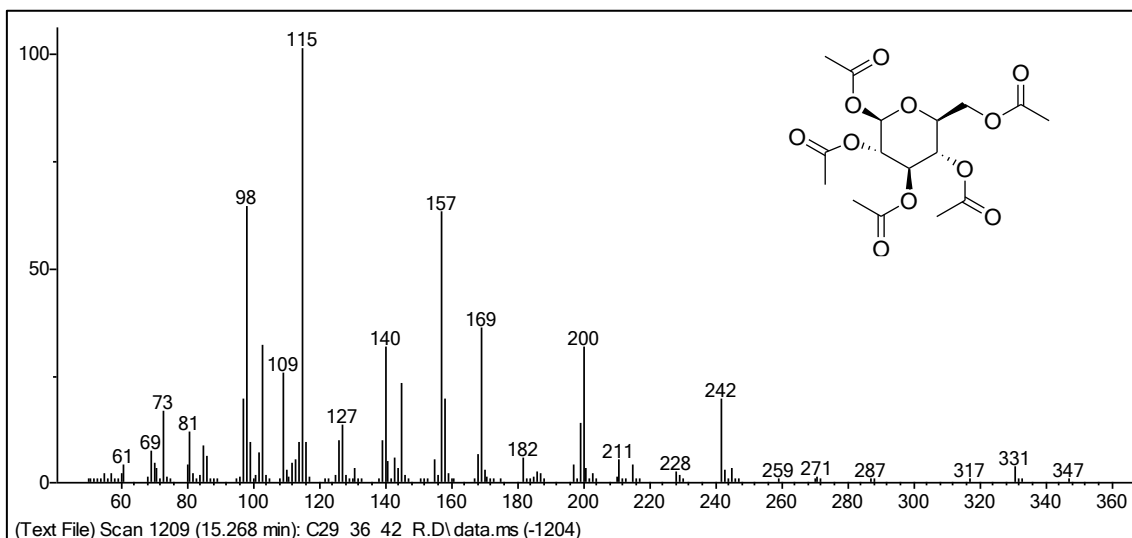


Figura 165. Espectro de massas de C8d.

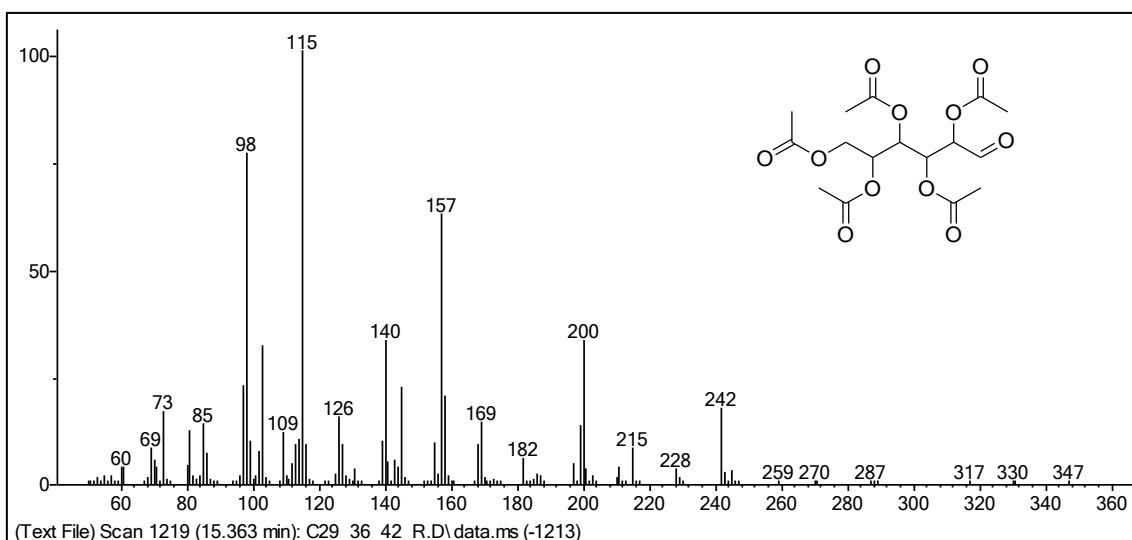
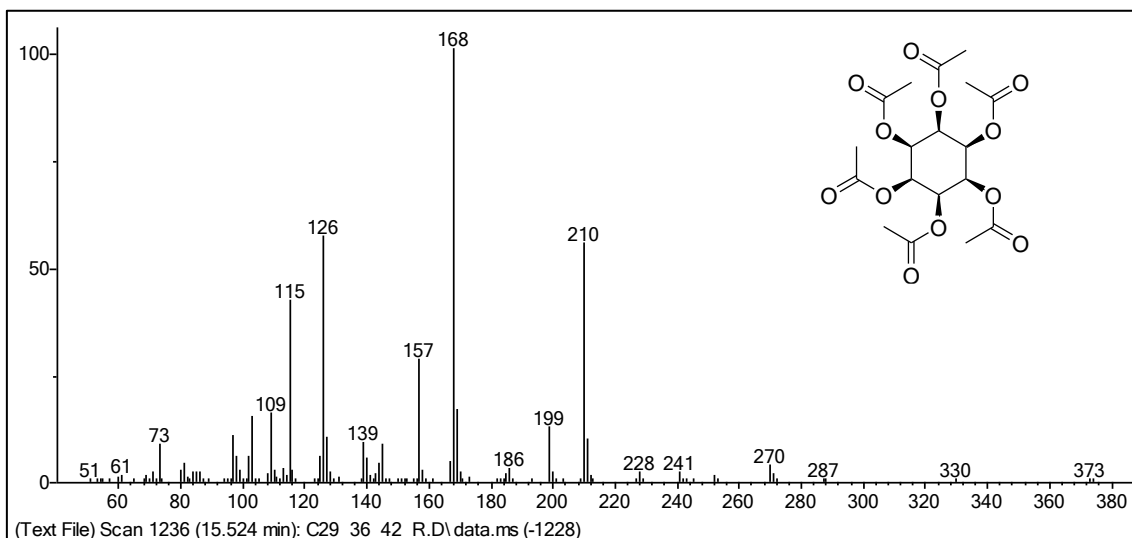


Figura 166. Espectro de massas de C8e.



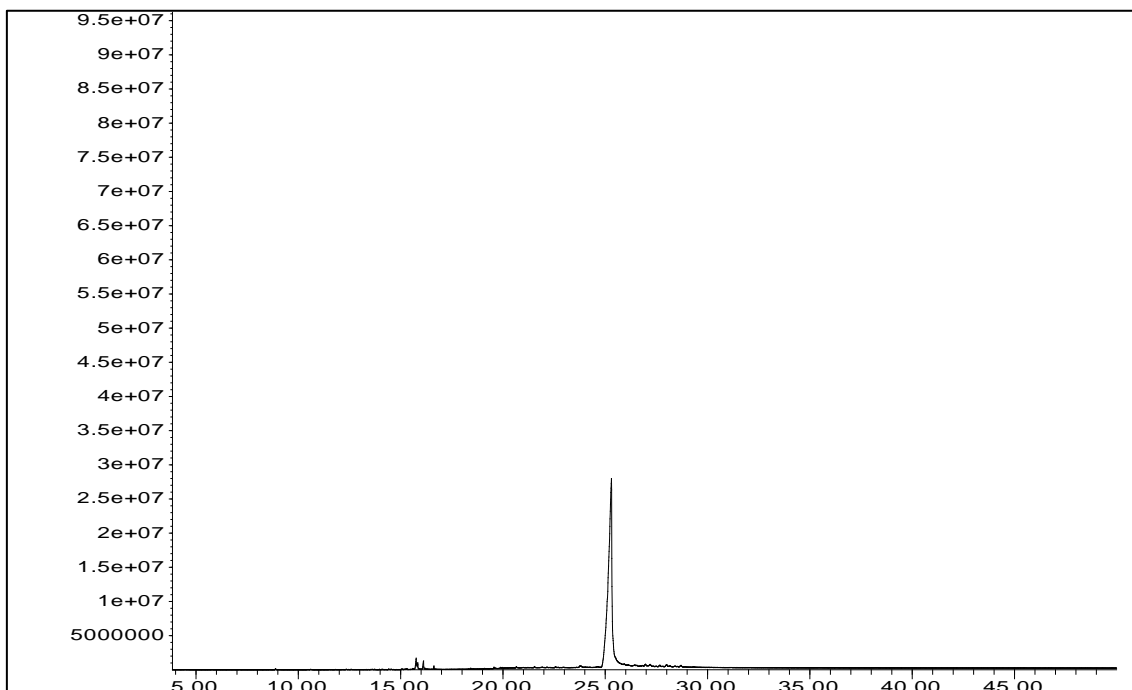
#### 5.1.5.4. Identificação estrutural da amostra C9

A partição aquosa do extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O foi submetida a uma reação de acetilação (p. 54). O produto da acetilação foi submetido a CC de sílica tipo *Flash*, resultando na fração C9. A amostra apresentou-se com um aspecto oleoso, solúvel em diclorometano.

A análise em CCDA, utilizando como eluente hexano:AcOEt (65:35), indicou a presença de uma mancha de coloração marrom ao ser revelada com orcinol sulfúrico.

A análise por CG/EM da fração C9 revelou a presença de um único pico majoritário, como pode ser observado na Figura 167.

Figura 167. Cromatograma da fração C9.

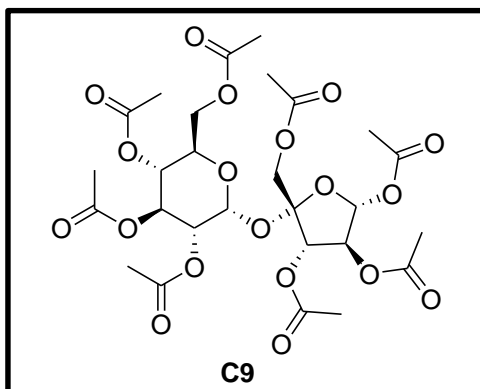


Por meio da comparação do  $m/z$  com os dados da biblioteca NIST do equipamento, foi possível identificar a substância como a sacarose octacetato (Tabela 25, Figura 168).

Tabela 25. Tempo de retenção ( $t_R$ ), relação massa/carga ( $m/z$ ) e porcentagem de área (%) das substâncias identificadas na fração C9.

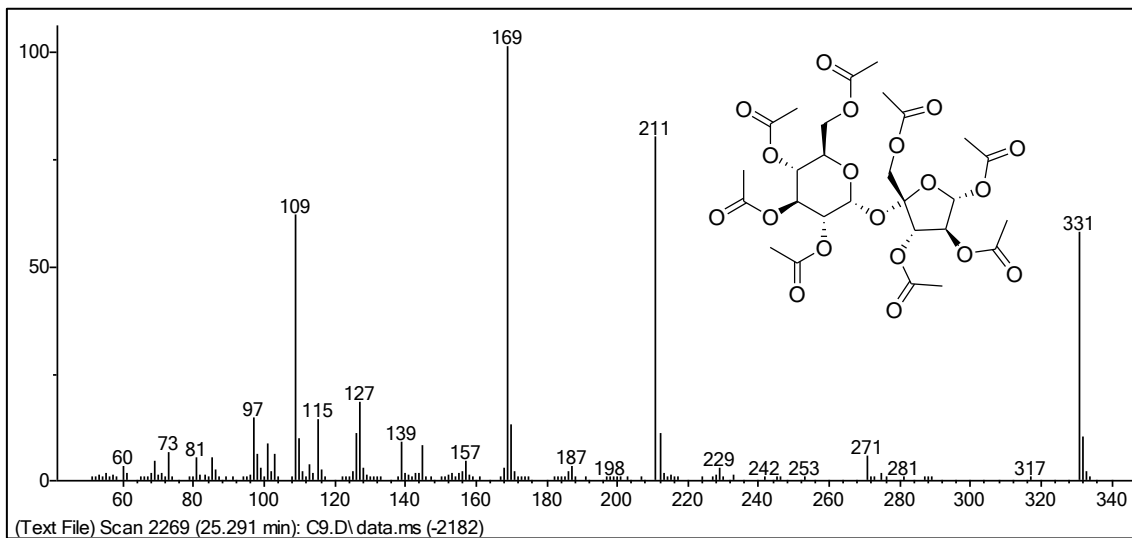
Pico	$t_R$ (min)	$m/z$	Substância	Código
1	25,29	664	Sacarose octacetato	C9

Figura 168. Substância identificada na fração C9.



O espectro de massas da substância pode ser observado na Figura 169.

Figura 169. Espectro de massas de C9.



## 6. ATIVIDADES BIOLÓGICAS E TESTES QUANTITATIVOS DOS EXTRATOS EM MeOH E MeOH:H<sub>2</sub>O DA MADEIRA DE *L. pisonis*

### 6.1. INTRODUÇÃO

A cada dia, pesquisadores desenvolvem inúmeros trabalhos sobre os aspectos químicos e farmacológicos de recursos naturais, tais como plantas, buscando a obtenção de substâncias naturais que possam apresentar algum interesse terapêutico (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Em um levantamento realizado no período entre 1991 a 2013, Zago (2018) observou que o Brasil ocupou o segundo lugar no ranking de trabalhos publicados em periódicos sobre plantas medicinais. No entanto, vale ressaltar que a quantidade de artigos científicos publicados ainda é considerada baixa quando comparada com a vasta biodiversidade da flora brasileira (Zago, 2018). Desta forma, surge uma necessidade de novos trabalhos interdisciplinares que integrem os aspectos fitoquímicos e farmacológicos buscando a descoberta de produtos naturais bioativos.

Neste trabalho, o processo de caracterização dos extratos brutos da madeira de *L. pisonis* permitiu a identificação de substâncias fenólicas nos extratos polares. As substâncias com núcleo fenólico apresentam uma ampla ocorrência no reino vegetal e importantes atividades biológicas. Devido às características de suas estruturas químicas, essas substâncias destacam-se por suas ações antioxidantes, pois são capazes de capturar as espécies reativas de oxigênio (EROs), reduzir e quelar íons férricos que catalisam a peroxidação lipídica. (NACZK; SHAHIDI, 2004).

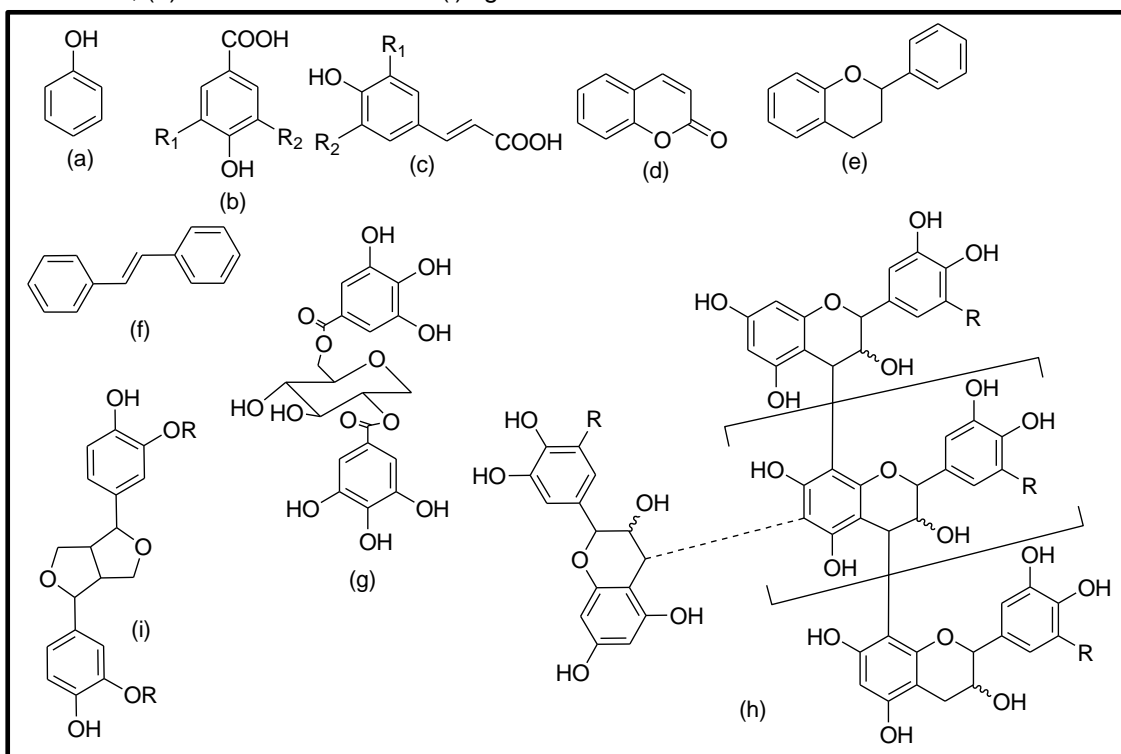
Sendo assim, diante da observação da presença de substâncias fenólicas na madeira de *L. pisonis*, os extratos brutos em MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O foram submetidos a ensaios químicos para a determinação do teor de fenóis, flavonoides e proantocianidinas (taninos condensados), bem como a avaliação da atividade antioxidante e citotóxica.



## 6.2. Determinação do teor de fenois totais pelo método de Folin-Ciocalteu

As substâncias fenólicas são divididas nos seguintes grupos: fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácido benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos hidrolisáveis, taninos condensados (proantocianidinas), lignanas e ligninas, cujos exemplos de esqueletos básicos são mostrados na Figura X (NACZK; SHAHIDI, 2004).

**Figura 170.** Esqueletos bases das substâncias fenólicas: a) fenóis simples, b) ácido hidroxibênzoico, c) ácido hidrocinâmico, (d) cumarina, (e) flavonoide, (f) estilbeno, (g) tanino hidrolisável, (h) tanino condensado e (i) lignana.



Fonte: Elaborada pela autora.

Estas, de um modo geral, são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos nas formas simples ou de polímeros. Podem estar em formas livres ou complexadas a açúcares (glicosídeos) e proteínas (DEWICK, 1997; TORSELL, 1997; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1996).

A quantificação desses metabólitos, em material vegetal, pode ser realizada por diversas técnicas. No entanto, o método que utiliza o reagente de

Folin-Ciocalteu (RFC) é o mais empregado, devido a sua simplicidade e reprodutibilidade (FOLIN; CIOCALTEU, 1927). O RFC é constituído pela mistura dos ácidos fosfotungstúico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) e fosfomolibdúico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) que reagem com substâncias redutoras, como por exemplo substâncias fenólicas, levando a formação, em meio alcalino, do oxotungstato e oxomolibdato. Os produtos da reação absorvem em comprimento de onda de 750-765 nm e exibem uma coloração azul proporcional à concentração das substâncias redutoras presentes na amostra, possibilitando assim a quantificação por espectrofotometria (LAMUELA-RAVENTÓS, 2017).

#### 6.2.1. Parte Experimental

- Reagentes e Vidrarias

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), ácido gálico (Vetec), carbonato de sódio anidro (Reagen), metanol (Synth), água destilada. Utilizaram-se vidrarias volumétricas calibradas: balão (100 e 50 mL), pipeta (1, 2, 5 e 10 mL), micropipetas automáticas (10  $\mu$ L-100  $\mu$ L e 100  $\mu$ L - 500  $\mu$ L) e tubos de ensaio.

- Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram balança analítica Adventurer, modelo AR2140, espectrofotômetro UV-Vis Bel Bel Photonics, modelo 1105, agitador de tubos, Vortex, modelo QL-901 e cronômetro.

- Metodologia

A avaliação do teor de fenóis totais foi desenvolvida adaptando a metodologia descrita por Sousa et al. (2007). As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda a 750 nm. O padrão positivo utilizado foi o ácido gálico. Os resultados foram expressos em miligrama

equivalente a ácido gálico (mg EAG) por grama de extrato bruto e por grama de material vegetal seco.

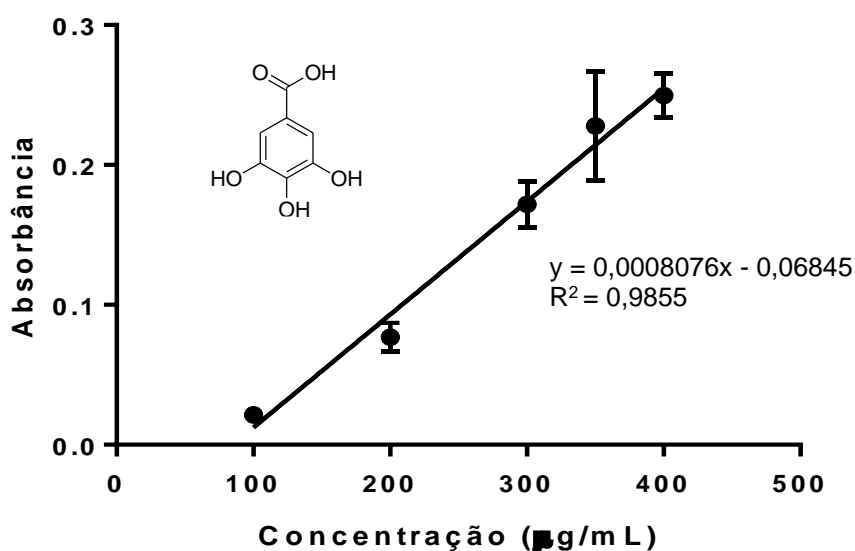
### Construção da curva de calibração

Foi preparada uma solução estoque do padrão ácido gálico na concentração de 1 mg/mL em MeOH. Em seguida, foram feitas diluições nas concentrações de 400, 350, 300, 200 e 100 µg/mL.

A preparação da mistura reacional foi realizada da seguinte forma: uma alíquota de 100 µL das diluições foram misturados com 500 µL do RFC e 6 mL de água destilada, em seguida a mistura foi agitada por 1 minuto. Decorrido o tempo, foram adicionados 2 mL da solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15%) e agitada a mistura por 30 segundos. Posteriormente, completou-se o volume para 10 mL com água destilada. O sistema ficou em repouso por 2 horas. As leituras das absorbâncias foram feitas no comprimento de onda de 750 nm.

A curva de calibração (Figura 171) foi obtida a partir da regressão linear dos valores de absorbância a 750 nm *versus* concentrações das soluções de ácido gálico (100 a 400 µg/mL). As leituras foram realizadas em triplicata.

**Figura 171.** Curva de calibração do padrão ácido gálico.



### Preparação das amostras para leitura

Foram preparadas soluções mãe dos extratos brutos em MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O na concentração de 1 mg/mL em metanol. Posteriormente, foi feita uma diluição, da solução mãe de cada extrato, na concentração de 150 µg/mL. O procedimento para o preparo da mistura reacional foi feito da mesma forma que o realizado para a curva de calibração. As leituras foram realizadas em triplicata.

Para a preparação do branco foram misturados 100 µL de metanol com 500 µL do RFC e 6 mL de água destilada, depois agitou a misturoa por 1 minuto. Em seguida, adicionou-se 2 mL da solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15%) a mistura e agitou por mais 30 segundos. Completou-se o volume para 10 mL com água destilada

O teor de fenóis totais nos extratos foi calculado por meio da equação da reta obtida na curva de calibração do ácido gálico.

#### 6.2.2. Resultado e discussão

Nesse ensaio foi utilizado o ácido gálico como padrão para construção da curva de calibração e conversão dos valores de absorbância obtidos para as amostras em teor de fenóis totais equivalentes ao ácido gálico. A equação da reta e o coeficiente de linearidade obtidos com a construção da curva de calibração foram, respectivamente,  $y = 0,0008076x - 0,06845$ ,  $R^2 = 0,9855$  (Figura x).

O teor de fenóis totais não apresentou grandes alterações em ambos os extratos avaliados. Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais (FT), expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato bruto e por g de material vegetal seco, podem ser observados na Tabela 26.

**Tabela 26.** Teor de fenóis totais (FT) e rendimento (%) dos extratos metanólico e hidroalcoólico da madeira de *L. pisonis*.

Extratos	Rendimento do extrato (%)	FT (mg de EAG/g de extrato bruto $\pm$ DP)	FT (mg de EAG/g material vegetal seco $\pm$ DP)
MeOH	7,63%	768,35 $\pm$ 23,24	58,65 $\pm$ 1,77
MeOH:H <sub>2</sub> O	5,08%	778,35 $\pm$ 110,10	43,50 $\pm$ 6,15

Estes teores podem ser considerados altos quando comparados com os dados reportados por Ferreira e colaboradores (2014), que avaliaram o conteúdo de fenóis totais do extrato etanólico dos galhos de *L. pisonis*. No respectivo trabalho, o extrato dos galhos apresentou um rendimento de 5,9% contendo 29,52  $\pm$  0,30 mg de EAG/g de material vegetal seco.

Apesar da confirmação da presença de fenóis na madeira de *L. pisonis*, até o momento, não há o relato da identificação de substâncias fenólicas nesse órgão da espécie (Tabela X, pag. X). Este fato ressalta a necessidade da realização de mais estudos fitoquímicos com a madeira, a fim da identificação desses metabólitos secundários.

### 6.3. Determinação do teor de flavonoides totais pelo método do $AlCl_3$

Os flavonoides constituem a classe de compostos polifenólicos mais diversificada no reino vegetal e grande parte desses metabólitos possuem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental (DEWICK, 1997; TORSSELL, 1997; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1996). Estão presentes em vegetais e frutas, sendo estas a principal fonte dessas substâncias para a dieta humana (ALVES et al., 2007). Nas plantas, essa classe de substância desempenha várias funções, como por exemplo: proteção contra os efeitos da radiação UV, ação antioxidante, ação antimicrobiana, repelente de insetos, entre outras (ALVES et al., 2007).

A quantificação de flavonoides em material vegetal pode ser realizada por inúmeras técnicas. Entretanto, em consequência do baixo custo de execução, sua simplicidade e rapidez, a mais empregada é a espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), na qual utiliza-se o reagente  $AlCl_3$  (MARQUES et al., 2012; GALO; COLOMBO, 2009).

O cátion  $Al^{3+}$  forma um complexo estável com as hidroxilas livres de alguns flavonoides. O complexo flavonoide-Al, quando analisado por espectrofotometria de UV-Vis, apresenta máximo de absorção em região de comprimento de onda superior ao apresentado apenas pelo flavonoide. Esse fenômeno chamado de desvio batocrômico, ocorre devido à extensão do sistema conjugado (MARQUES et al., 2012). Este fato permite a determinação do teor de flavonoides sem a interferência de outras substâncias fenólicas. Uma vez que, mesmo que outras substâncias fenólicas formem um complexo com o  $Al^{3+}$ , estas espécies absorvem em comprimento de onda inferiores ao empregado no ensaio de dosamento do teor de flavonoides em materiais vegetais (MARQUES et al., 2012).

### 6.3.1. Parte Experimental

- Reagentes e Vidrarias

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: Cloreto de alumínio hexaidratado 99,5% (Vetec), metanol (Synth), quercetina (Sigma Aldrich). Utilizaram-se vidrarias volumétricas calibradas: balão (100 e 50 mL) e pipeta (0,5, 1, 2, 5 e 10 mL).

- Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram balança analítica Adventurer, modelo AR2140 e espectrofotômetro UV-Vis Bel Bel Photonics, modelo 1105.

- Metodologia

A avaliação do teor de flavonoides foi desenvolvida com base na metodologia descrita na literatura por Rio (1996). As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda a 425 nm. O padrão positivo utilizado foi o flavonoide quercetina. O resultado foi expresso em miligrama equivalente a quercetina por grama de extrato (mg EQ/g).

### Construção da curva de calibração

Foi preparada uma solução estoque de quercetina na concentração de 100 µg/mL em MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v). Conforme a Tabela 27, alíquotas da solução estoque foram transferidas para balões volumétricos para a obtenção das diluições nas seguintes concentrações: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 µg/mL.

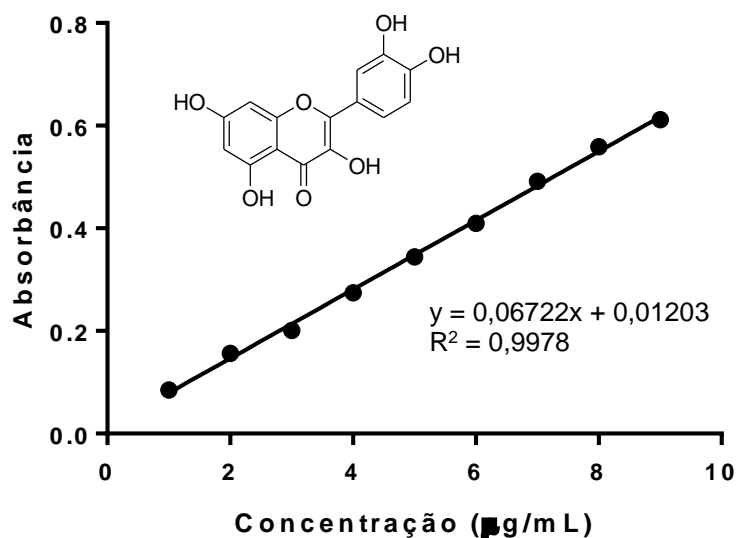
**Tabela 27.** Alíquotas da solução estoque de quercetina e concentrações finais das diuições empregadas para a construção da curva de calibração.

<b>Alíquotas (mL)</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>
0,5	1,0
1,0	2,0
1,5	3,0
2,0	4,0
2,5	5,0
3,0	6,0
3,5	7,0
4,0	8,0
4,5	9,0

Cada alíquota foi transferida para um balão de 50 mL, em seguida foi adicionado 1 mL de solução etanólica de AlCl<sub>3</sub> (5%, m/v). O volume do balão foi completado com solução hidroalcoólica (70:30 v/v). A solução ficou em repouso por 30 minutos, decorrido o tempo as leituras foram realizadas. Para a preparação do branco foi transferido 1 mL da solução etanólica de AlCl<sub>3</sub> (5% m/v) para um balão de 50 mL, sendo o volume completado com o sistema MeOH:H<sub>2</sub>O (70% v/v).

A curva de calibração (Figura 172) foi obtida a partir da regressão linear dos valores de absorbância do complexo flavonoide-Al a 425 nm *versus* concentrações das soluções de quercetina (1,0 a 9,0 µg/mL). As leituras foram realizadas em triplicata.

Figura 172. Curva de calibração da quercetina-Al.



#### Preparação das amostras para leitura

Foram preparadas soluções mãe dos extratos brutos em MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O na concentração de 1 mg/mL em solução hidroalcoólica (70% v/v). Alíquotas de 15 mL das soluções mãe foram transferidas para balões de 50 mL, onde se adicionou 1,0 mL de solução etanólica de AlCl<sub>3</sub> (5% m/v). Em seguida, ajustou-se o volume do balão com solução hidroalcoólica (70% v/v). A solução foi deixada em repouso por 30 minutos. Decorrido o tempo de repouso, foi realizada a leitura a 425 nm em espectrofotômetro UV/vis. Para a preparação do branco foi transferido 1 mL da solução etanólica de AlCl<sub>3</sub> (5% m/v) para um balão de 50 mL, sendo o volume completado com o sistema MeOH:H<sub>2</sub>O (70% v/v). As leituras foram realizadas em triplicata.

O teor de flavonoide nos extratos foi calculado por meio da equação da reta obtida na curva de calibração da quercetina-Al.

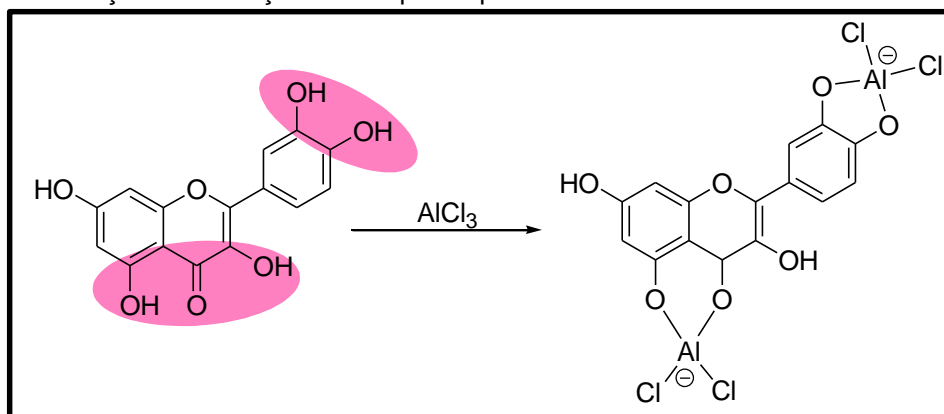
#### 6.3.2. Resultado e discussão

Nesse ensaio foi utilizada a quercetina como padrão para construção da curva de calibração e conversão dos valores de absorbância obtidos para as amostras em teor de flavonoides totais equivalentes a quercetina.



A quercetina forma um complexo estável com o  $\text{Al}^{3+}$ , a ligação ocorre com os grupos hidroxilas livres nas posições 3-,5- e 3'-4'- (Figura 173).

Figura 173. Reação de formação do complexo quercetina-Al.



Fonte: Adaptada de Mabry et al., 1970 (apud PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012).

A equação da reta e o coeficiente de linearidade obtidos com a construção da curva de calibração foram, respectivamente,  $y = 0,0673x + 0,0119$  e  $R^2 = 0,9979$  (Figura 172). Os valores de absorbância de cada amostra foram aplicados na equação da reta a fim de se obter o teor de flavonoides em cada extrato.

Foram obtidas as concentrações de  $14,15 \pm 0,14$  mg EQ/g e  $20,72 \pm 0,33$  mg EQ/g de extrato bruto para o extrato em MeOH e em MeOH:H<sub>2</sub>O, respectivamente. O resultado do extrato hidroalcoólico pode ser considerado alto quando comparado com os relatados em outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, em que foi observado um teor de cerca de  $15,19 \pm 0,18$  e  $15,23 \pm 0,01$  mg EQ/g de extrato bruto para os extratos em MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O das folhas de *L. pisonis*, respectivamente (BARRETO et al., 2020).

Na literatura, até o momento, há o relato da identificação de onze substâncias com esqueleto flavonoídico na espécie *L. pisonis*, no entanto nenhuma destas foi encontrada na madeira, conforme mostrado na Tabela X (pag. X). Este fato ressalta a necessidade da realização de mais estudos fitoquímicos com a madeira da espécie, a fim da identificação dos compostos flavonoídicos.

#### 6.4. Determinação do teor de proantocianidinas pelo método da vanilina

As proantocianidinas, também conhecidas como taninos condensados (TC), são, normalmente, formadas pela ligação entre o carbono 4 de um monômero flavan-3-ol e o carbono 8 de outra unidade. As substâncias se diferem pelos “números de monômeros ligados, pela posição de ocorrência das ligações, pelo padrão de oxigenação nos anéis A e B e pela estereoquímica dos substituintes do anel C” (QUEIROZ; MORAIS; NASCIMENTO, 2002).

Os taninos condensados possuem um importante papel na área de curtimento de couros e peles, fabricação de bebidas, na indústria farmacêutica, tratamento de água, na fabricação de tintas e adesivos especiais para colagem de madeira e derivados (SHIRMOHAMMADLI et al., 2018).

Dentre os ensaios que podem ser empregados para a quantificação de taninos condensados, o mais utilizado é o método da vanilina. Esse ensaio se baseia na reação (em meio ácido) de um aldeído aromático, vanilina, com o anel meta substituído do flavanol levando a formação de um complexo de coloração avermelhada (HAGERMAN, 2002).

##### 6.4.1. Parte Experimental

- Reagentes e Vidrarias

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: Catequina 98% (Sigma), vanilina (Synth), ácido sulfúrico (Synth) e água destilada. Utilizaram-se vidrarias volumétricas calibradas: balão (100, 50, 25 e 10 mL) e pipeta (1, 2, 5, 10 e 20 mL), tubo de hidrólise e termômetro.

- Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram balança analítica Adventurer, modelo AR2140, espectrofotômetro UV-Vis Bel Bel Photonics, modelo 1105 e banho-Maria Fisatom, modelo 550.

- Metodologia

O teste foi desenvolvido adaptando a metodologia descrita por Queiroz, Morais e Nascimento (2002). As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda a 500 nm. O controle positivo usado foi a catequina. O resultado foi expresso em miligrama equivalente a catequina por grama de extrato (mg ECAT/g).

Preparo da solução reagente: vanilina a 2% em ácido sulfúrico (70% v/v)

A solução reagente foi preparada adicionando-se 2 g de vanilina à 100 mL de uma solução aquosa de ácido sulfúrico (70%).

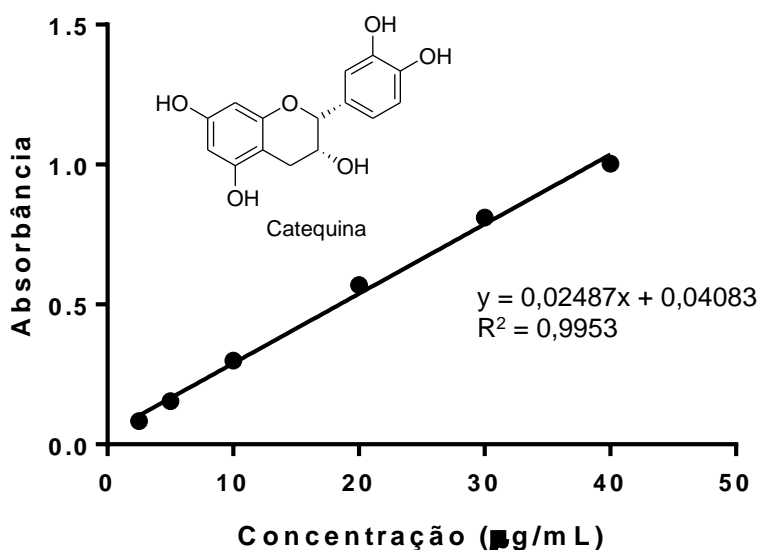
Construção da curva de calibração

Uma solução aquosa do padrão catequina foi preparada na concentração de 40 µg/mL. Posteriormente foram preparadas diluições nas concentrações de 2,5, 5,0, 10, 20 e 30 µg/mL.

A tubos de ensaio, foram transferidos 1 mL de cada diluição e 2 mL da solução reagente. Os tubos de ensaio foram colocados em um banho-maria (50°C) por 15 minutos. Após esse tempo, as soluções foram resfriadas à temperatura ambiente e depois foram feitas as leituras das absorbâncias a 500 nm. O branco foi preparado substituindo a solução de vanilina na mistura de reação por água destilada. As leituras foram realizadas em triplicata.

A curva de calibração foi construída com valores das absorbâncias *versus* concentrações das soluções de catequina (Figura 174).

Figura 174. Curva de calibração da catequina.



#### Preparação das amostras para leitura

Foram preparadas soluções aquosas na concentração de 2 mg/mL, dos extratos brutos em MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O. Uma alíquota de 1 mL de cada solução e 2 mL do reagente foram transferida para tubos de hidrólise. Após incubação por 15 minutos em banho-maria (50°C), e posterior resfriamento à temperatura ambiente, foram realizadas as leituras das absorbâncias a 500 nm. A análise foi realizada em triplicata.

O teor de proantocianidinas nos extratos foi calculado por meio da equação da reta obtida na curva de calibração da catequina.

#### 6.4.2. Resultado e discussão

O teor de proantocianidinas nos extratos foi determinado por meio da equação da reta ( $y = 0,0249x + 0,0411$ ,  $R^2 = 0,9954$ ) obtida na curva de calibração da catequina (Figura 174). Os resultados obtidos foram expressos em mg equivalente de catequina por grama de extrato bruto.

O conteúdo de proantocianidina obtido para os extratos metanólico e hidroalcoólico foi igual a  $14,35 \pm 0,14$  mg ECAT/g e  $22,39 \pm 0,32$  mg ECAT/g de extrato bruto, respectivamente. Estes teores podem ser considerados altos

quando comparado com o relatado para as folhas (8,6 mg ECAT/g) (BARRETO et al., 2020).

Apesar da quantificação deste metabólito na madeira de *L. pisonis*, até o momento nenhuma substância pertencente a essa classe de metabólito foi isolada/identificada na planta. Desta forma, surge a necessidade da realização de trabalhos fitoquímicos com a madeira, a fim de caracterizar essa classe de metabólitos secundários.

### 6.5. Atividade antioxidante

Nas últimas décadas, houve um aumento no número de pesquisas científicas na área de antioxidantes. A busca por substâncias com ação antioxidante foi motivada pela descoberta do efeito dos radicais livres no organismo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Existem duas formas reativas desses radicais: espécies reativas de oxigênio (ERO), cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado no átomo de oxigênio; e espécies reativas de nitrogênio (ERN), quando o elétron desemparelhado está no átomo de nitrogênio. Vale ressaltar que estas espécies podem ser produzidas naturalmente pelo organismo ou em consequência de alguma disfunção biológica. (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

No organismo, os radicais livres estão envolvidos em inúmeras funções biológicas importantes. Todavia, seu excesso pode conduzir a diversas formas de dano celular, bem como estar relacionado a causa de diversas patologias, como por exemplo artrite, doenças cardiovasculares, catarata, disfunções cerebrais, câncer, envelhecimento precoce, entre outras (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O estresse oxidativo ocorre quando há uma produção excessiva de ERO e ERN e/ou a diminuição do sistema de defesa antioxidante, ou seja, um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes. Sendo este processo responsável por causar os danos (oxidação) as diversas biomoléculas, levando a perda de suas funções biológicas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; HALLIWELL, 2007; HALLIWELL; WHITEMAN, 2009).

O estresse oxidativo pode ser controlado por meio da ação antioxidante de inúmeras substâncias. Estas substâncias antioxidantes podem ser produzidas pelo próprio corpo (origem endógena) ou podem ser encontradas em diversos vegetais (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; HALLIWELL, 2007).

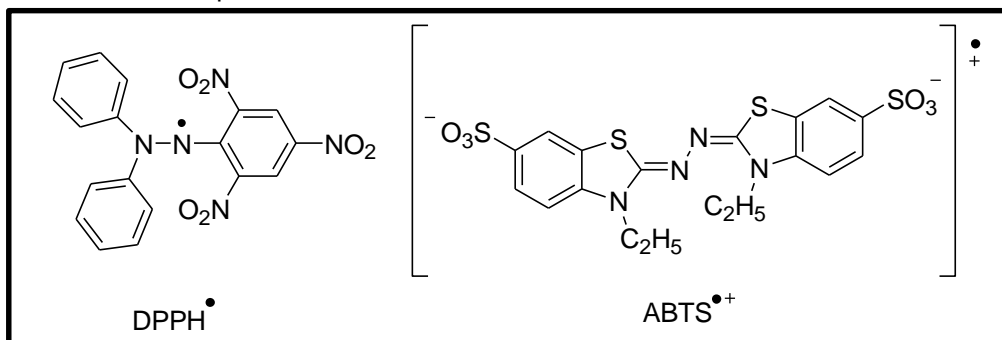
Os antioxidantes também são utilizados na indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos, prevenindo a decomposição oxidativa dos produtos (KHAN et al., 2013).

Halliwell e Gutteridge (1995), definem antioxidante como “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, diminui ou previne significativamente, a oxidação do mesmo”.

Dentre as substâncias antioxidantes produzidas pelas plantas, a classe das substâncias fenólicas tem se destacado devido a sua capacidade de impedir a ação oxidante das EROs e/ou ERNs (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Sobre a ação antioxidante, é pertinente destacar que a atividade dos compostos fenólicos está relacionada, principalmente, a dois aspectos: a reatividade como agente doador de hidrogênio para um radical livre; e a estrutura química (capacidade de estabilizar o intermediário formado por deslocalização do elétron desemparelhado, o número total e a localização dos grupos hidroxila em anéis aromáticos) (ŠKERGET et al., 2005; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). De acordo com Barreiros, David e David (2006), entre os polifenóis, os flavonoides possuem a melhor estrutura para o sequestro de radicais livres, apresentando capacidade antioxidante superior à do ácido ascórbico (vitamina C) e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E).

Diante da relevância das substâncias antioxidantes, nos últimos anos houve um aumento no número de pesquisas científicas na área de antioxidantes, envolvendo o efeito de extratos brutos, frações e/ou substâncias puras (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Os métodos mais empregados na determinação da atividade antioxidante são o do radical livre 2,2'-difetil-1-picriidrazil (DPPH) e do 2,2-azino-bis-3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS). Suas estruturas são apresentadas na Figura 175.

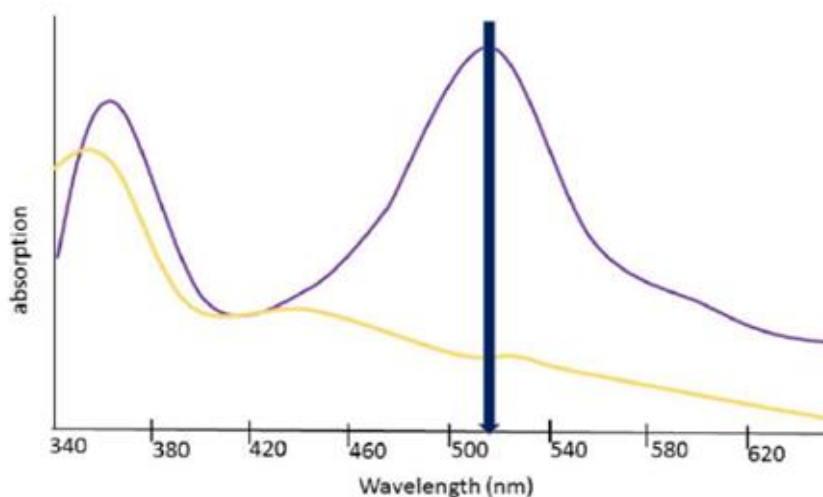
Figura 175. Estrutura química dos radicais DPPH e ABTS<sup>•+</sup>.



### 6.5.1. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

O DPPH<sup>•</sup> é um radical orgânico nitrogenado, estável, de cor violeta e possui absorção máxima na faixa de 515 - 520 nm. Na presença de um doador de hidrogênio ou elétron, o DPPH<sup>•</sup> é reduzido levando a diminuição da intensidade de absorção e a perda da coloração da solução com o radical, tornando-se amarela (formação do difenil-picril-hidrazina), conforme mostra a Figura 176 (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

Figura 176. Espectro de absorção do radical DPPH<sup>•</sup> e do difenil-picril-hidrazina.



Fonte: Adaptado de KLEINRICHERT; ALAPPAT, 2019

A partir dos dados obtidos é determinada a porcentagem de atividade antioxidante (%AA), que corresponde à quantidade do radical DPPH consumido pelo antioxidante, e a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a

concentração inicial do radical DPPH em 50% (CE<sub>50</sub> ou CI<sub>50</sub>). Quanto menor o valor de CE<sub>50</sub>, maior é a atividade antioxidante da amostra (SOUSA et al., 2007).

#### 6.5.1.1. Parte Experimental

- Reagentes e Vidrarias

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (Aldrich), quercetina (Sigma Aldrich) e metanol (Synth). Utilizaram-se vidrarias volumétricas calibradas: balão (200, 100, 50, 25 e 20 mL), pipeta (0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 mL) e tubos de ensaio.

- Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram balança analítica Adventurer, modelo AR2140 e espectrofotômetro UV-Vis Bel Bel Photonics, modelo 1105.

- Metodologia

O teste foi desenvolvido adaptando a metodologia descrita por Sousa et al. (2007). As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda a 515 nm. O controle positivo usado foi a quercetina. Os resultados foram expressos em %AA e CE<sub>50</sub>.

#### Construção da curva de calibração

Foi preparada uma solução metanólica do radical de DPPH na concentração de 40 µg/mL, mantida sob-refrigeração e protegida da luz. Posteriormente, foram feitas diluições de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 µg/mL. A curva de calibração (Figura 177) foi construída a partir dos valores de absorbância do radical a 515 nm *versus* concentração das soluções (1 a 40





seguida, foi realizada a leitura no comprimento de onda de 515 nm. A mistura de 2,7 mL de MeOH e 0,3 mL da solução do extrato ou do controle positivo foi utilizada como branco. As leituras foram feitas em triplicatas.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi determinada a partir da seguinte equação:

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

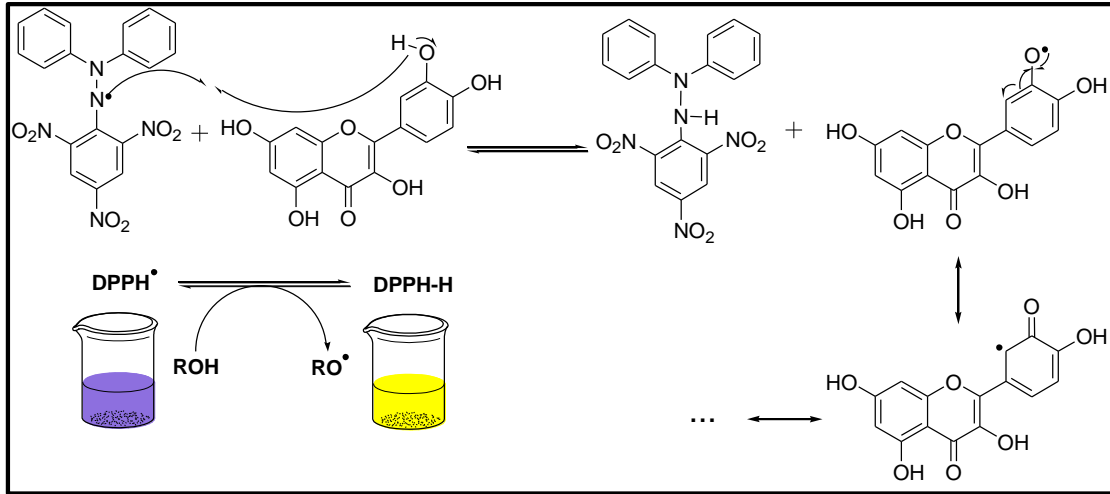
Onde:  $Abs_{controle}$  é a absorbância inicial da solução estoque de DPPH (40 µg/mL);  $Abs_{amostra}$  é a absorbância da mistura reacional (DPPH+amostra) e  $Abs_{branco}$  é a absorbância da mistura MeOH e amostra.

Foi plotado um gráfico da porcentagem de atividade antioxidante *versus* as concentrações das amostras e por meio da equação de reta foi calculada a concentração necessária da amostra para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% ( $CE_{50}$ ).

#### 6.4.1.2. Resultado e discussão

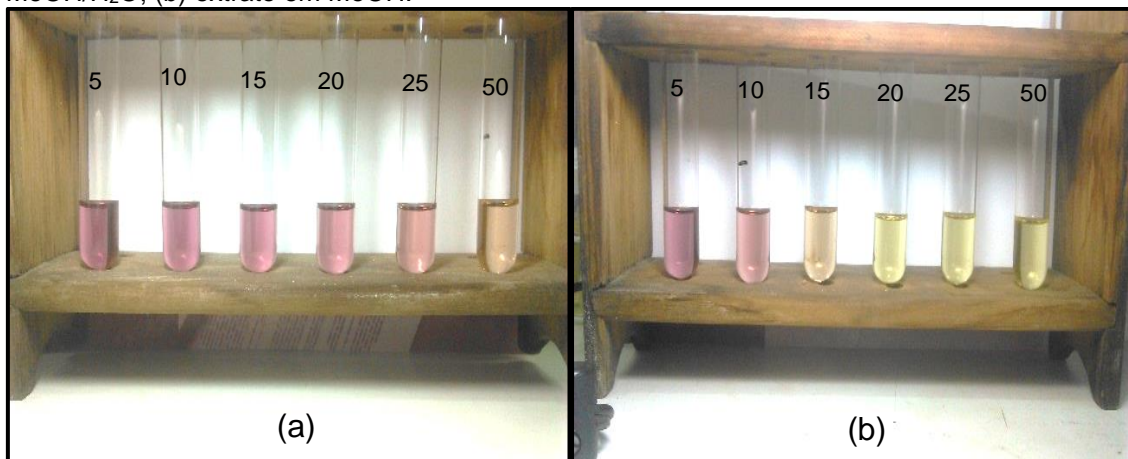
O radical DPPH, quando na presença de um doador de hidrogênio ou elétron, é reduzido. A Figura 178 mostra como exemplo, a reação entre o radical DPPH e o flavonoide quercetina.

Figura 178. Reação de redução do radical DPPH pelo flavonoide quercetina.



A Figura 179 ilustra o ensaio de DPPH realizado com as soluções dos extratos em MeOH e MeOH/H<sub>2</sub>O da madeira nas concentrações de 5-50 µg/mL. Na imagem, pode-se observar o surgimento de coloração amarelada nas soluções mais concentradas. Desta forma, pode-se verificar a presença de substâncias com capacidade antioxidante em ambos os extratos. Sendo que no extrato em MeOH/H<sub>2</sub>O, o surgimento da coloração amarela foi observado nas concentrações de 15-50 µg/mL e no extrato em MeOH apenas na de 50 µg/mL.

Figura 179. Teste do DPPH em diferentes concentrações (µg/mL) após 30 min. (a) extrato em MeOH/H<sub>2</sub>O; (b) extrato em MeOH.



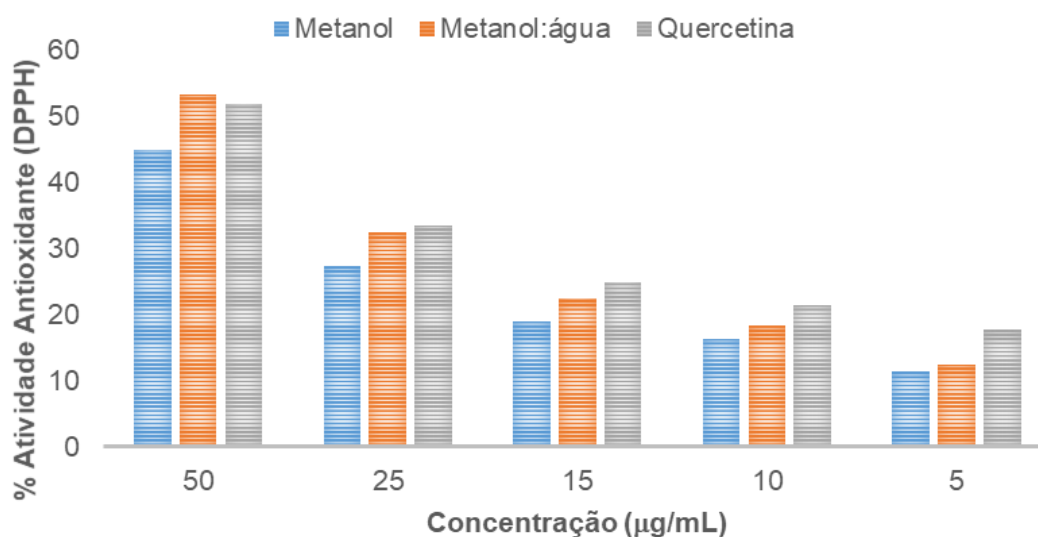
Os resultados da %AA das amostras estão apresentados na Tabela 29 e Figura 180, onde observa-se que ambos os extratos revelaram capacidade de sequestrar o radical DPPH. O extrato em MeOH/H<sub>2</sub>O e o controle positivo

quercetina apresentaram %AA similares. Na concentração de 50 µg/mL, o extrato MeOH/H<sub>2</sub>O foi superior a quercetina, atingindo um máximo atividade antioxidante de 53,31% contra 51,76% da quercetina.

**Tabela 29.** Porcentagem de atividade antioxidante (%AA) dos extratos brutos da madeira de *L. pisonis* e do controle positivo quercetina.

Atividade Antioxidante (%)	Concentração (µg/mL)	Amostras		
		MeOH	MeOH/H <sub>2</sub> O	Quercetina
	100	-	-	87,79
	50	44,97	<b>53,31</b>	<b>51,76</b>
	25	27,38	32,43	33,38
	20	23,76	27,39	-
	15	19,06	22,36	24,85
	10	16,38	18,30	21,47
	5	11,41	12,53	17,79
	1	-	-	11,91

**Figura 180.** Atividade antioxidante dos extratos da madeira de *L. pisonis* e do padrão quercetina (% AA versus concentração)



A CE<sub>50</sub> foi calculada a partir da equação da reta obtida do gráfico da %AA versus as concentrações (µg/mL). Os resultados estão apresentados na Tabela 30.

**Tabela 30.** Dados da atividade antioxidante obtidos para os extratos da madeira de *L. pisonis* e quercetina.

Amostras	CE <sub>50</sub> (µg/mL)	y = a.x+ b	R <sup>2</sup>
Extrato MeOH	55,81 ± 0,07	y = 0,737x + 8,4723	0,9975
Extrato MeOH/H <sub>2</sub> O	45,36 ± 0,11	y = 0,8971x + 9,0298	0,9975
Quercetina	48,41 ± 0,44	y = 0,7504x + 13,48	0,9980

Os valores de CE<sub>50</sub> obtidos para os extratos foram similares ao valor de CE<sub>50</sub> do padrão quercetina, nas faixas de concentrações utilizadas neste trabalho. Sendo que, o extrato em MeOH/H<sub>2</sub>O apresentou atividade superior ao controle positivo, uma vez que, quanto menor o valor de CE<sub>50</sub>, melhor é a capacidade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

Ao analisar os dados da Tabela 30, supõe-se que as substâncias com maior ação antioxidante são mais polares, visto que o extrato com maior polaridade, extrato MeOH/H<sub>2</sub>O, apresentou o menor valor de CE<sub>50</sub>.

De acordo com a Tabela 31, os valores de CE<sub>50</sub> obtidos para os extratos em MeOH e MeOH/H<sub>2</sub>O, pelo método do DPPH, podem ser classificados como moderado e elevado, respectivamente, o que estimula a continuidade do trabalho.

**Tabela 31.** Relação entre a CE<sub>50</sub> e a capacidade antioxidante.

CE <sub>50</sub> (µg/mL)	Capacidade antioxidante
< 50	Elevada
50 – 100	Moderada
100 – 200	Baixa
>200	Inativa

Fonte: Reynertson, Basile e Kennelly (2005).

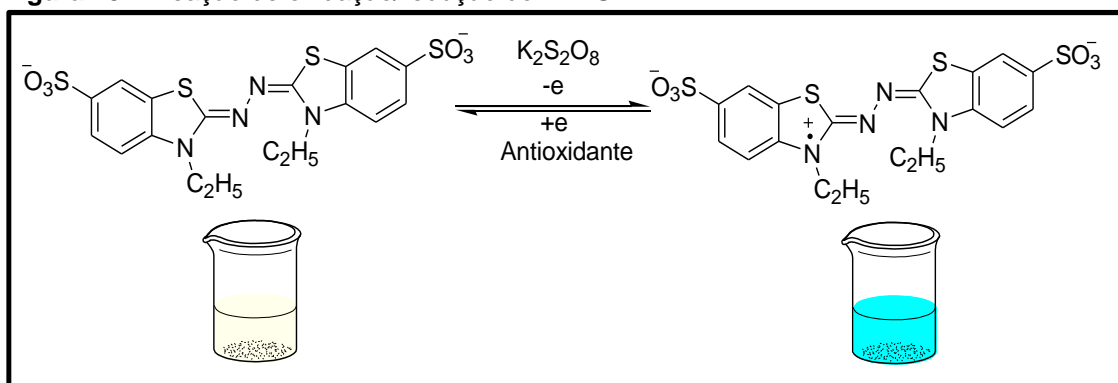
#### 6.4.2. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante pelo método do ácido 2,2 azino-bis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico (ABTS<sup>•+</sup>)

Diferente do radical DPPH, o radical ABTS<sup>•+</sup> tem que ser produzido *in loco* podendo ser por meio de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Este método permite avaliar a capacidade antioxidante de substâncias de natureza hidrofílica e lipofílica. Enquanto o método do DPPH é aplicável a sistemas

hidrofóbicos (RE *et al.*, 1999; ARNAO, CANO, ACOSTA, 2001; FLOEGEL *et al.*, 2011).

O bioensaio baseia-se na formação do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>, de coloração azul esverdeado, por meio da reação do sal ABTS com persulfato de potássio. Na presença de uma substância antioxidante ocorre a redução do ABTS<sup>•+</sup>, promovendo a perda da coloração do meio reacional (Figura 181). O cátion radical apresenta absorção máxima em 415, 645, 734 e 815 nm (RUFINO *et al.*, 2007).

**Figura 181.** Reação de oxidação/redução do ABTS.



Fonte: adaptado de RUFINO *et al.*, 2007

Os resultados do ensaio são expressos como porcentagem de inibição do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>, que é determinado em relação à reatividade do padrão Trolox (RE *et al.*, 1999).

#### 6.4.2.1. Parte Experimental

- Reagentes e Vidrarias

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: ácido 2,2 azino-bis-3-etil-benzotiazolína-6-sulfônico (ABTS) (Sigma), quercetina (Sigma Aldrich), persulfato de potássio (Sigma Aldrich), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Aldrich) e etanol (Synth). Utilizaram-se vidrarias volumétricas calibradas: balão (100, 50, 25, 20 e 10 mL), pipeta (1, 2, 5 e 10 mL), micropipeta automática (10 µL-100 µL) e tubos de ensaio.

- Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram balança analítica Adventurer, modelo AR2140, espectrofotômetro UV-Vis Bel Bel Photonics, modelo 1105 e agitador de tubos, Vortex, modelo QL-901.

- Metodologia

O teste foi desenvolvido adaptando a metodologia descrita por Rufino et al. (2007). As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda a 734 nm. Os controles positivos usados foram um análogo da vitamina E, Trolox e o flavonoide quercetina. Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (CAET) e em %AA.

#### Preparação do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>

Para um frasco âmbar, foi transferido 5 mL de uma solução aquosa do sal ABTS (7mM) e 88 µL de solução aquosa de persulfato de potássio (2,45 mM). A reação ficou em repouso, no escuro e à temperatura ambiente por aproximadamente 12 – 16h. Em seguida o produto da reação (cátion radical ABTS<sup>•+</sup>) foi diluído com EtOH até atingir uma absorbância de  $0,7 \pm 0,02$  no comprimento de onda de 734 nm.

#### Construção da curva de calibração do Trolox

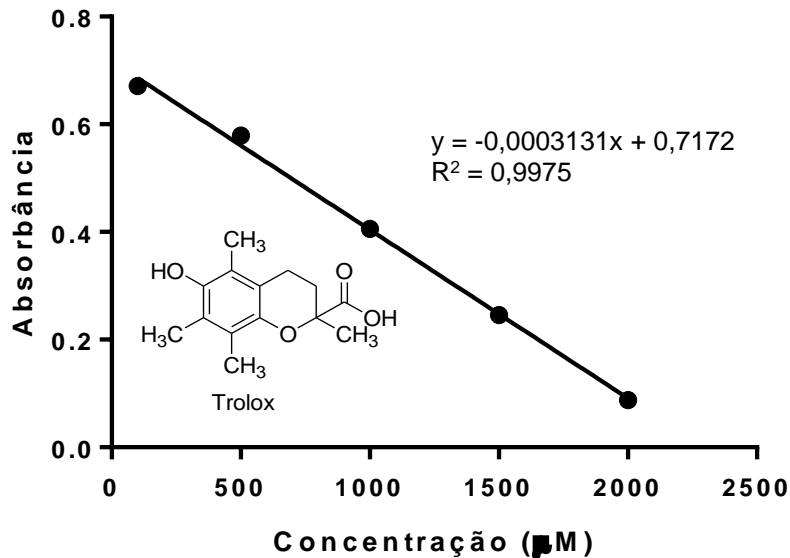
Foi preparada uma solução etanólica do padrão trolox na concentração de 2000 µM. Posteriormente, foram preparadas diluições nas concentrações de 100, 500, 1000 e 1500 µM.

Em um ambiente escuro, foi transferida, para tubos de ensaio, uma alíquota de 30 µL de cada diluição, em seguida foram acrescentados 3,0 mL da solução do radical ABTS<sup>•+</sup>. A mistura foi homogeneizada em agitador de tubos e, posteriormente, deixada em repouso por 6 min. A leitura foi realizada em

espectrofotômetro a 734 nm. Como branco utilizou o EtOH. As leituras foram realizadas em triplicata.

A partir das absorvâncias obtidas das diferentes diluições de Trolox plotou-se um gráfico absorvâncias *versus* concentração (Figura 182).

Figura 182. Curva de calibração do Trolox.



#### Preparação das amostras para leitura

Foram preparadas soluções hidrometanólicas (1:1) dos extratos brutos da madeira (MeOH e MeOH/H<sub>2</sub>O), na concentração de 1000 µg/mL, e do controle positivo (quercetina) na concentração de 500 µg/mL. Em seguida, as soluções foram diluídas nas concentrações de 250, 375, 500, 750 µg/mL, para os extratos, e 25, 125, 250, 375 µg/mL, para a quercetina.

Posteriormente, o procedimento realizado com as soluções do trolox foi repetido com as soluções dos extratos e da quercetina. O teste realizado em triplicata.

Os resultados obtidos foram expressos como micromolar equivalente de Trolox por grama de extrato seco (µMET/g) e porcentagem de atividade antioxidante (%AA) a partir da equação:

$$E = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$



Onde: Ac é a absorbância da solução do radical ABTS<sup>•+</sup>, At é a absorbância da amostra testada.

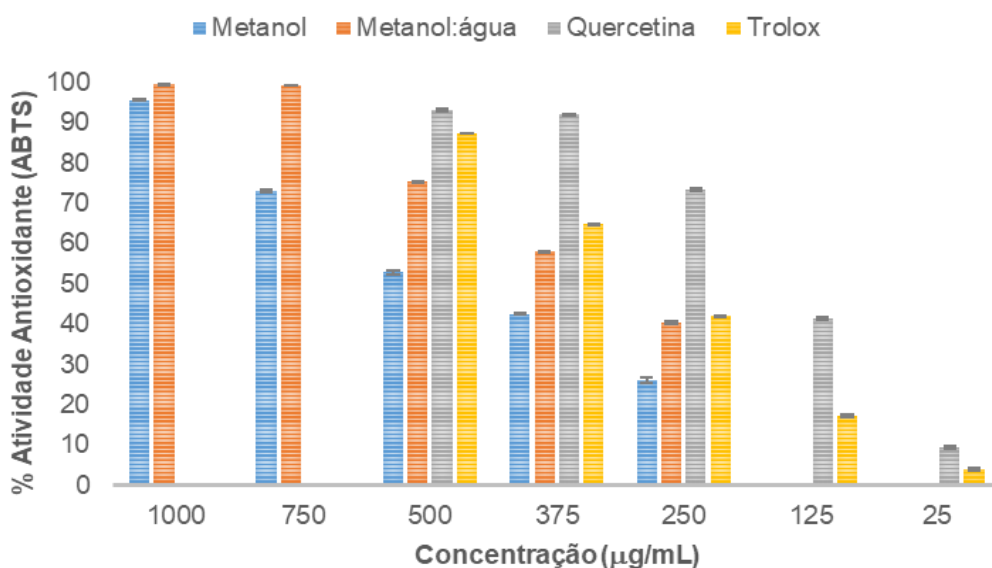
#### 6.4.2.2. Resultado e discussão

O resultado da avaliação da atividade antioxidante utilizando o cátion radical ABTS<sup>•+</sup> foi expressa como capacidade antioxidante equivalente à do trolox (CAET). Os valores de CAET foram calculados a partir da equação da reta obtida do gráfico das absorbâncias dos extratos *versus* as concentrações.

Os valores médios obtidos para os extratos em MeOH e MeOH/H<sub>2</sub>O foram iguais a 2540,63 ± 40,34 e 6939,20 ± 36,18 µM ET/g de extrato, respectivamente. Sendo este último comparável a quercetina (7599,63 ± 55,35 µM ET/g). Quanto maior o valor de CAET, melhor é a capacidade antioxidante da amostra, pelo método do ABTS<sup>•+</sup>. Sendo assim, o extrato hidroalcoólico apresentou o melhor potencial antioxidante.

Por meio da análise dos resultados da %AA (Figura 183), pode-se verificar que os extratos apresentaram significativa capacidade antioxidante, quando comparados a quercetina e ao trolox.

**Figura 183.** Porcentagem de atividade antioxidante, pelo método do ABTS<sup>•+</sup>, dos extratos brutos da madeira de *L. pisonis*, quercetina e trolox.



Comparando os resultados obtidos para fenóis, flavonoides totais e proantocianidinas, é possível observar uma relação entre a presença desses metabólitos e a atividade antioxidante. Uma vez que, o aumento das concentrações desses metabólitos nos extratos foi acompanhado por capacidades antioxidantes mais fortes (Tabela 32).

Apesar de nenhum flavonoide ou proantocianidinas terem sido identificados neste trabalho, a alta atividade antioxidante também pode ser justificada pela presença dos ácidos fenólicos (ácido gálico e derivado, ácido elágico e derivado) e dos taninos hidrolisáveis (corilagina, pedunculagina e tellimagrandin I) identificados neste trabalho. Uma vez que estas substâncias são capazes de doar hidrogênio de seus grupos de hidroxila fenólica ou doar elétrons para interromper as reações em cadeia de radicais livres (JOHN, SHAHIDI, 2010).

**Tabela 32.** Teor de fenóis (FT), flavonoides totais (FLT), teor de proantocianidinas (TP) e capacidade antioxidante (DPPH e ABTS) dos extratos da madeira de sapucaia.

	Extrato MeOH	Extrato MeOH:H <sub>2</sub> O	Quercetina
<sup>1</sup> FT	768,35 <sup>a</sup> ± 23,24	778,35 <sup>a</sup> ± 110,10	-
<sup>2</sup> FLT	14,15 <sup>b</sup> ± 0,14	20,72 ± 0,33 <sup>a</sup>	-
<sup>3</sup> TP	14,35 <sup>b</sup> ± 0,14	22,39 ± 0,32 <sup>a</sup>	-
<sup>4</sup> DPPH	55,81 <sup>a</sup> ± 0,07	45,36 <sup>b</sup> ± 0,11	48,41 ± 0,44
<sup>5</sup> ABTS	2540,63 <sup>b</sup> ± 40,34	6939,20 <sup>a</sup> ± 36,18	7599,63 ± 55,35

Valores das médias ± desvio padrão; <sup>1</sup>FT (mg EAG/g de extrato bruto); <sup>2</sup>FLT (mg EQ/g de extrato bruto); <sup>3</sup>TP (mg ECAT/g de extrato bruto); <sup>4</sup>DPPH (CE<sub>50</sub> µg/mL); <sup>5</sup>ABTS (µM ET/g de extrato bruto); Médias seguidas pela mesma letra, numa mesma linha, não diferem estatisticamente entre si (p≤0,05).

Com base nos resultados obtidos, o potencial antioxidante dos extratos da madeira de *L. pisonis* é evidenciado, podendo a espécie tornar-se uma possível matéria-prima para a medicina. Sendo de suma importância a identificação das principais substâncias ativas dos extratos responsáveis pelas propriedades antioxidantes.

### 6.5. Avaliação da toxicidade frente a larvas de *Artemia salina* Leach

O ensaio biológico, utilizando cistos de *Artemia salina* Leach (microcrustáceo de água salgada) é realizado como um bioensaio preliminar para avaliação de toxicidade. O bioensaio baseia-se na mortalidade de um organismo de menor complexidade na escala zoológica, quando em contato com o material a ser analisado. Ou seja, o teste apoia-se no princípio de que substâncias bioativas em altas doses são tóxicas (MEYER et al. 1982).

A praticidade e simplicidade que envolve o bioensaio favorecem sua utilização sistemática dentro de um laboratório de pesquisa, pois a técnica tem a vantagem de apresentar baixo custo, rapidez e não exigir técnicas assépticas (MEYER et al., 1982).

Os resultados são expressos em dose necessária do material analisado (substância pura, extrato bruto ou fração) capaz de matar 50% da população em teste ( $DL_{50}$ ). O único indicador envolvido no teste é a morte ou vida dos microcrustáceos quando em contato com a amostra. Valores de  $DL_{50} \leq 1000$   $\mu\text{g/mL}$  são considerados ativos para extratos brutos e  $< 30$   $\mu\text{g/mL}$ , para substâncias puras (MEYER et al., 1982).

#### 6.5.1. Parte Experimental

- Reagentes e Vidrarias

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: dicromato de potássio (Sigma Aldrich), cistos de *Artemia salina* (comercial), dimetilsufóxido (Synth) e água do mar. Utilizaram-se vidrarias volumétricas calibradas: balão (5 mL), micropipetas automáticas (10  $\mu\text{L}$ -100  $\mu\text{L}$  e 100  $\mu\text{L}$  - 500  $\mu\text{L}$ ), tubos de ensaio e “mini aquário”.

- Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram balança analítica Adventurer, modelo AR2140 e luminária.

- Metodologia

O bioensaio foi realizado adaptando a metodologia descrita por Meyer et al. (1982). O controle positivo usado foi o dicromato de potássio. Os resultados foram expressos como DL<sub>50</sub> (µg/mL).

#### Obtenção das larvas de *A. salina*

Em um “mini aquário”, contendo água do mar filtrada, foram adicionados cistos de *A. salina* por 48h, período necessário para eclosão dos cistos.

#### Preparação das soluções dos extratos, controle positivo e negativo

Uma alíquota de 50 mg de cada extrato foi dissolvida em 5 mL do sistema H<sub>2</sub>O:DMSO na proporção 3:2 (v/v), dando origem a solução estoque dos extratos na concentração de 10 mg/mL.

A tubos de ensaio foram transferidas alíquotas de 50, 100, 200, 300 e 500 µL das soluções estoques. Posteriormente, os volumes dos tubos de ensaio foram aferidos para 5 mL utilizando água do mar filtrada. As concentrações finais empregadas no bioensaio com *A. salina* foram de 100, 200, 400, 600 e 1000 µg/mL.

Como controle positivo foi utilizado uma solução de dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) nas mesmas concentrações preparadas para os extratos. Como controle negativo foi preparada uma mistura de H<sub>2</sub>O:DMSO na proporção 3:2 (v/v), posteriormente 50 µL da mistura foram diluídos com água do mar filtrada até o volume de 5 mL.

#### Exposição das larvas de *A. salina* as amostras

Aos tubos de ensaio contendo as soluções das amostras (extratos, controle positivo e negativo) foram transferidas 15 larvas do microcrustáceo.

Após 24 horas, sob iluminação artificial, foi realizada a contagem dos indivíduos vivos e mortos. A quantificação dos resultados foi realizada através do programa Finey Probit, que permite calcular o valor de DL<sub>50</sub>. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### 6.5.2. Resultado e discussão

Uma vez demonstrado o potencial antioxidante dos extratos em MeOH e MeOH/H<sub>2</sub>O da madeira de *L. pisonis*, tornou-se importante verificar a citotoxicidade que estes extratos poderiam apresentar. Para tal, a avaliação da atividade citotóxica dos extratos em MeOH, MeOH/H<sub>2</sub>O e do controle positivo (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) foi realizada segundo metodologia proposta por Meyer (1982). Os resultados foram expressos em dose necessária para matar 50% da população em teste (DL<sub>50</sub>) e podem ser observados na Tabela x.

Segundo Meyer et al. (1982), valores de DL<sub>50</sub> ≤ 10<sup>3</sup> µg/mL indicam que os extratos brutos são tóxicos. Nguta et al. (2011), considera extratos com DL<sub>50</sub> < 100 µg/mL com alta toxicidade, com DL<sub>50</sub> entre 100 - 500 µg/mL, moderadamente tóxicos e com DL<sub>50</sub> entre 500 – 1000 µg/mL, levemente tóxicos.

Sendo assim, os resultados obtidos apontam que ambos os extratos são fracamente tóxicos frente as larvas de *A. salina*. No entanto, o extrato MeOH:H<sub>2</sub>O apresentou uma maior citotoxicidade, quando comparado com o extrato em MeOH.

**Tabela 33.** DL<sub>50</sub> obtidos para os extratos brutos da madeira de *L. pisonis*.

Amostras	DL <sub>50</sub> (µg/mL)
EMM	829,2
EMHM	630,4
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	110,5

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. *Diálogos & Ciência*, v. 5, n. 12, p. 1-8, 2007.
- ARNAO, M. B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The Hydrphilic and Lipophilic Contribution to Total Antioxidant Activity. *Food Chemistry*, v. 73, p. 239-244, 2001.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espéciesreativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BARRETO, K. G.; MOREIRA, L. L. P. F.; GOMES, J. S. X.; MATOS, C. R. R.; MATHIAS, L. Perfil Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antioxidante e Citotóxica de umEspécime de *Lecythispisonis*Cambess. (Lecythidaceae). *Rev Virtual Quim*, 12, p. 1-18, 2020.
- BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CECHINEL FILHO. V; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização. *Química Nova*, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual de Química*, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- DEWICK, P. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. Universidade de Michigan: Wiley, 1997.
- FLOEGEL, A.; KIM, D-O.; CHUNG, S-J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, 2011.
- GALO, A. L.; COLOMBO, M. F. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. *Química Nova*, v. 32, n. 2, p. 488-492, 2009.

HAGERMAN, A. E. The Tannin Handbook Page. 2002. Disponível em: <<https://www.users.miamioh.edu/hagermae/>>. Acesso em: 30 julho 2021.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemistry of oxidative stress*. v. 35, n. 3, p. 1147 – 1150, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 18, n. 1, p. 125–126, 1995.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2009.

JOHN, J. A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). *J. Func. Foods*, v. 2, p. 196-209, 2010.

KHAN, B. A.; AKHTAR, N.; KHAN, H.; BRAGA, V. A. Development, characterization and antioxidant activity of polysorbate based O/W emulsion containing polyphenols derived from *Hippophae rhamnoides* and *Cassia fistula*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 49, n. 4, p. 763-773, 2013.

KLEINRICHERT, K.; ALAPPAT, B. Comparative Analysis of Antioxidant and Anti-Amyloidogenic Properties of Various Polyphenol Rich Phytoceutical Extracts. *Antioxidants*, v. 8, n. 13, p. 1-11, 2019.

LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. In: Apak, R.; Capanoglu, E.; Shahidi, F. *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications*. Wiley, 2017, p. 107-114.

MARQUES, G. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; ROLIM-NETO, P. J.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. *Química Nova*, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brineshrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, v. 45, n. 5, p. 31-4, 1982.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A*, v. 1054, n. 1-2, p. 95- 111, 2004.

NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D. W.; GATHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. G. Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). *Pharmacologyonline*, v. 2, p. 458-578, 2011.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; GOMES, T. L. B.; CARDOSO, K. C. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. *Revista Brasileira de plantas medicinais*, v. 14, n. 4, p. 586-591, 2012.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*), v. 26, n. 4, p. 485-492, 2002.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. *Ethnobotany Research & Applications*, v. 3, n. 1, p. 25–35, 2005.

RIO, R. G. W. Métodos de controle químico de amostras de própolis. 1996. 81f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Universidade de São Paulo.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V.E. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>0+</sup>. *Embrapa Amazônia Oriental-Comunicado Técnico on-line n° 128*, 2007.

SHIRMOHAMMADLI, Y.; EFHAMISISI, D.; PIZZI, A. Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: a review. *Ind. Crop. Prod.* v. 126, p. 316-332, 2018.

ŠKERGET, M., KOTNIK, P., HADOLIN, M., HRAŠ, A. R., SIMONIČ, M., & KNEZ, Ž. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, v. 89, n. 2, p. 191–198, 2005.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, 351-355, 2007.

TORSSELL, K. B. G. *Natural Product Chemistry: A mechanistic, biosynthetic and ecological approach*. Taylor & Francis, 1997.

ZAGO, L. M. S. Vinte e dois anos de pesquisa sobre plantas medicinais: uma análise cienciométrica. *Tecnia*, v. 3, n. 1, p. 157-173, 2018.



## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como objetivo principal dar continuidade ao estudo fitoquímico da espécie *L. pisonis* Cambessedes, tendo em vista o isolamento/identificação de substâncias dos extratos das folhas e madeira da planta, bem como a determinação dos teores de fenóis, flavonoide total, proantocianidinas e avaliação da capacidade antioxidante e citotóxica dos extratos polares da madeira.

Para tal, foram preparados os extratos das folhas e madeira utilizando os solventes hexano, metanol e a mistura metanol:água, na proporção 1:1 (v/v). Para o fracionamento dos extratos foram empregadas técnicas cromatográficas clássicas e modernas. A elucidação estrutural das substâncias foi realizada por meio de métodos espectrométricos, tais como IV, UV, CG-EM, EM, ESI-EM, LC-MS e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

O fracionamento cromatográfico do extrato em MeOH das folhas permitiu a identificação de um triterpeno: ácido arjúnico. Com base na literatura, este é o primeiro relato da presença desse triterpeno na espécie.

No extrato em MeOH da madeira foram identificadas 9 substâncias, sendo um ciclitol: mio-inositol; três ácidos fenólicos e derivados: ácido gálico, ácido elágico e eschweilenol C; cinco elagitaninos: corilagina, pedunculagina (anômeros) e tellimagrandin I (anômeros). No extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O da madeira foram identificadas 2 substâncias fenólicas: o ácido gálico e o galato de metila.

Diante das informações encontradas na literatura, esta pesquisa relata pela primeira vez a presença do mio-inositol, eschweilenol C e dos elagitaninos em *L. pisonis*.

Os extratos polares da madeira apresentaram altos teores de fenóis totais, com valores de  $768,35 \pm 23,24$  mg EAG/g de extrato bruto (extrato em MeOH) e  $778,35 \pm 110,10$  mg EAG/g de extrato bruto (extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O). Na determinação do teor de flavonoide total pelo método do cloreto de alumínio, os extratos em MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O apresentaram teores  $14,15 \pm 0,13$  e  $20,72 \pm 0,33$  mg EQ/g de extrato bruto, respectivamente. Apesar dos teores, até o momento, nenhum flavonoide foi isolado/identificado na madeira de *L. pisonis*.

No teste de quantificação de proantocianidinas pelo método da vanilina sulfúrica, os extratos em MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O apresentaram teores 14,35 ± 0,14 e 22,39 ± 0,32 mg ECAT/g extrato bruto, respectivamente. Vale ressaltar que, neste trabalho está sendo descrita pela primeira vez a quantificação desse metabólito na madeira da espécie. Sendo assim, esses resultados podem servir de referência para futuros estudos com a madeira de *L. pisonis*.

A atividade antioxidante *in vitro* dos extratos polares da madeira foi verificada pelos métodos dos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e 2,2-azino-bis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS<sup>•+</sup>). Em ambos os ensaios, os extratos apresentaram uma boa capacidade antioxidante, quando comparados ao padrão quercetina. No entanto, o extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O apresentou o melhor potencial antioxidante quando comparado com o metanólico, tanto pelo método do DPPH (CE<sub>50</sub> = 45,4 ± 0,12 e 55,8 ± 0,07 µg/mL, respectivamente), quanto pelo método do ABTS (6939,2 ± 36,2 e 2540,6 ± 40,3 µM ET/g, respectivamente).

Vale ressaltar que, os resultados obtidos para o extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O foram similares ao observado para o padrão quercetina no método do DPPH (CE<sub>50</sub> = 47,8 µg/mL) e no método do ABTS (7599,6 µM ET/g). Esses resultados revelam o grande potencial do extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O como fonte de substâncias com ação antioxidante.

A alta atividade antioxidante observada pode estar relacionada com a presença de flavonoides e proantocianidinas nos extratos. Visto que, o aumento do teor desses metabólitos nos extratos potencializou a atividade antioxidante. Ademais, as substâncias fenólicas identificadas neste trabalho também podem contribuir com a atividade observada, pois possuem as características estruturais responsáveis por tal atividade.

No ensaio de citotoxicidade dos extratos em MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O da madeira, foi observado valores de DL<sub>50</sub> = 829,2 e 630,4 µg/mL, respectivamente. Os extratos foram considerados levemente tóxicos, pois apresentaram valores de DL<sub>50</sub> entre 500 – 1000 µg/mL.

Os resultados obtidos apresentam-se promissores, visto que contribuíram para o conhecimento da composição química da espécie. Além de evidenciarem um notável potencial antioxidante dos extratos da madeira de *L. pisonis*.