

**Perfil químico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos polares das
folhas de *Lecythis pisonis* (Lecythidaceae)**

Laysa Lanes Pereira Ferreira

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Centro de Ciências e Tecnologia

Campos dos Goytacazes – RJ

Janeiro de 2016

**Perfil químico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos polares das
folhas de *Lecythis pisonis* (Lecythidaceae)**

Laysa Lanes Pereira Ferreira

Monografia apresentada ao Centro
de Ciências e Tecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das
exigências para obtenção do título de
Licenciado em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leda Mathias

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Centro de Ciências e Tecnologia

Campos dos Goytacazes – RJ

Janeiro de 2016

**Perfil químico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos polares das
folhas de *Lecythis pisonis* (Lecythidaceae)**

Laysa Lanes Pereira Ferreira

Monografia apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Licenciado em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Leda Mathias (Doutora em Química de Produtos Naturais) – UENF

(Orientadora)

Prof^o. Dr^o. Carlos Roberto Ribeiro Matos (Doutor em Química de Produtos Naturais) – UENF

Prof^a. Me. Roberta Ferreira Nagipe da Silva (Mestre em Ciências Naturais) – UENF

Ora, a fé é o firme fundamento daquilo que esperamos e a prova das coisas que não vemos. (Hebreus 11:1)

Pedi, e vos será concedido; buscai, e encontrareis; batei, e a porta será aberta para vós. Porque, aquele que pede, recebe; e, o que busca, encontra; e, ao que bate, abrir-se-lhe-á. (Matheus 7:7-8)

Ainda que minha mente e meu corpo enfraqueçam, Deus é a minha força, Ele é tudo o que sempre preciso. (Salmos 73:26)

Aos meus pais, Genézio e Marisa.

À minha irmã, Marysse.

À minha avó, Maria.

AGRADECIMENTOS

À Deus que, por Seu imenso amor, misericórdia e fidelidade, tens cuidado de mim em todos os momentos.

Agradeço aos meus pais, Genézio e Marisa, pelo amor incondicional, apoio, incentivo e por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu mesma duvidei.

À minha irmã, Marysse, que sempre esteve ao meu lado, me protegendo e criando uma ponte para que este momento chegasse.

À minha avó Maria, que sempre se orgulhou de mim e não mediu esforços juntamente com meus pais na minha educação.

Aos professores, Leda e Carlos, pela orientação, paciência e amizade no decorrer dos anos de convivência.

Aos amigos Anaína, Fernanda, Henrique, Jéssica, Laís, Laíssa, Larissa e Marina, pela ajuda, amizade e por fazerem o tempo na universidade ainda mais prazeroso.

Aos colegas de laboratório.

Às minhas amigas de longos anos, Ana, Letícia, Nayara e Nídia, por estarem sempre comigo, mesmo que a distância e os caminhos trilhados impedissem maior presença de uma na vida da outra. O carinho permanece!

Aos meus amigos do Programa Ciências sem Fronteira que foram uma verdadeira família e foram os melhores parceiros de viagem que eu poderia ter. Brockport e Plattsburgh fazem falta!

À universidade, seu corpo docente e discente, e aos técnicos, que de formas diferentes fizeram parte de minha formação.

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Esquemas.....	XI
Lista de Figura.....	XII
Lista de Gráficos.....	XV
Lista de Tabelas.....	XVI
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XVII
Resumo.....	XVIII
Abstract.....	XIX
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1. Objetivos Gerais.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. Revisão da Literatura.....	5
3.1. Enquadramento Taxonômico.....	5
3.2. Considerações sobre a Família Lecythidaceae.....	5

3.2.1. Aspectos fitoquímicos da Família Lecythidaceae.....	7
3.3. Considerações sobre o Gênero <i>Lecythis</i>	9
3.3.1. Aspectos farmacológicos e/ou Biológicos do Gênero <i>Lecythis</i>	9
3.4. Considerações sobre a Espécie <i>Lecythis pisonis</i>	10
3.4.1. Sinonímia Vulgar.....	10
3.4.2. Sinonímia Científica.....	11
3.4.3. Distribuição Geográfica.....	11
3.4.4. Usos Populares.....	12
3.4.5. Descrição Botânica.....	12
4. Materiais e Métodos.....	13
4.1. Equipamentos.....	13
4.1.1. Concentração dos extratos brutos.....	14
4.1.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	14
4.1.3. Espectroscopia na Região do Ultravioleta.....	14
4.1.4. Cromatografia gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas.....	14
4.1.5. Centrífuga.....	14
4.1.6. Ressonância Magnética Nuclear.....	15
4.2. Reagentes.....	15
4.3. Materiais.....	16
4.4. Soluções Reveladoras.....	17
4.5. Experimental.....	17
4.5.1. Coleta do material vegetal.....	17
4.5.2. Obtenção dos extratos brutos.....	18

4.5.2.1. Extração a quente com extrator tipo Soxhlet.....	18
4.5.2.2. Extração com aparelho de Clevenger e fracionamento dos resíduos aquosos da extração	19
4.5.3. Testes Químicos para Identificação de Metabólitos Secundários.....	21
4.5.3.1. Teste para identificação de Triterpenos e Esteroides.....	21
4.5.3.2. Teste para Identificação de Fenólicos totais e Flavonoides em Geral.....	22
4.5.3.3. Determinação do Teor de Proantocianidinas através da análise Colorimétrica.....	25
4.5.3.4. Avaliação da atividade Antioxidante.....	27
4.5.3.5. Avaliação do teor de Flavonoides Totais.....	27
5. Resultados e Discussão.....	28
5.1. Testes para identificação de metabólitos Secundários.....	28
5.1.1. Triterpenos e Esteroides.....	29
5.1.2. Fenólicos totais e Flavonoides em Geral.....	32
5.1.3. Identificação de Proantocianidinas.....	37
5.1.4. Atividade Antioxidante.....	39
5.2. Determinação de Proantocianidinas (Taninos Condensados) pelo método da Vanilina Sulfúrica.....	40
5.3. Avaliação do Teor de Flavonoides Totais.....	42
5.4. Identificação dos Metabólitos Isolados oriundo da extração com o aparelho Clevenger.....	44
5.4.1. Substância LPM-01.....	44
5.4.2. Substância LPM-02.....	51

5.5. Proposta Biosintética para os ácidos Gálico e Elágico.....	58
6. Considerações Finais.....	59
7. Referências Bibliográficas.....	60

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Fluxograma resumido do fracionamento do extrato aquoso das folhas de <i>L. pisonis</i>	20

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Morfina, alcaloide isolado em 1804.....	1
Figura 2. Pau Brasil (<i>C. echinata</i>) e estrutura do corante extraído do pau Brasil.....	3
Figura 3. Substâncias isoladas de espécies da família Lecythidaceae.....	8
Figura 4. <i>Lecythis pisonis</i> Camb.: árvore, folhas e flores, e frutos.....	10
Figura 5. Mapa representativo da distribuição de <i>Lecythis pisonis</i> no Brasil.....	11
Figura 6. Local de coleta: Campus da UENF.....	17
Figura 7. Extrator tipo Soxhlet.....	18
Figura 8. Extração com aparelho de Clevenger.....	19
Figura 9. Alguns dos padrões da curva de calibração.....	28
Figura 10. Mecanismo proposto para a reação de Liebermann-Buchard.....	30
Figura 11. Precursor para a formação de cor na reação de Liebermann-Buchard....	30
Figura 12. Reação de Liebermann-Buchard e de Salkowski para os extratos alcoólicos e hidroalcoólicos.....	31
Figura 13. Reação de Shinoda.....	32
Figura 14. Reação de Shinoda para os Extratos Alcoólico e Hidroalcoólico.....	32
Figura 15. Reação com Cloreto de Alumínio para os Extratos Alcoólico e Hidroalcoólico.....	33
Figura 16. Reação com Cloreto Férrico para os Extratos Alcoólico e Hidroalcoólico.....	34
Figura 17. Complexo: Flavonoide-Al e Flavonoide-Fe.....	34
Figura 18. Reação de Taubouk para o Extrato Hidroalcoólico.....	35
Figura 19. Reação de Taubouk para o extrato alcoólico.....	35

Figura 20. Ionização das hidroxilas do flavonóide em presença de NaOH aquoso....	36
Figura 21. Reação com Hidróxido de sódio para os Extratos Alcoólico e Hidroalcoólico.....	36
Figura 22. Sobreposição dos Espectros de UV para o método da butanólise.....	38
Figura 23. Antes e depois da redução do betacaroteno para os extratos alcoólico e hidroalcoólico.....	39
Figura 24. Reação da vanilina com o anel A da proantocianidina.....	42
Figura 25. Espectro absorção na região do infravermelho (KBr) da substância LPM-01.....	45
Figura 26. Espectro de RMN ^1H da substância LPM-01 (500 MHz, MeOD)	46
Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C da substância LPM-01 (125 MHz, MeOD).....	47
Figura 28. Espectro de RMN de correlação heteronuclear, ^1H X ^{13}C (HMCQ) da substância LPM-01 (500 MHz, MeOD)	48
Figura 29. Espectro de RMN de correlação heteronuclear, ^1H X ^{13}C (HMBC) da substância LPM-01 (500 MHz, MeOD)	49
Figura 30. Espectro de massas da substância LPM-01 obtido via inserção direta e ionização por impacto de elétron 70 eV.....	49
Figura 31 Fragmentos do íon molecular do ácido gálico.....	50
Figura 32. Estrutura da substância LPM-01 (ácido gálico)	50
Figura 33. Espectro absorção na região do infravermelho (KBr) da substância LPM-02.....	51
Figura 34. Espectro de RMN ^1H da substância LPM-02 (500 MHz, DMSO)	53
Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C (APT) da substância LPM-01 (125 MHz, DMSO).53	
Figura 36. Espectro de RMN de correlação heteronuclear, ^1H X ^{13}C (HMQC) da substância LPM-01 (500 MHz, DMSO)	54

Figura 37. Espectro de RMN de correlação heteronuclear, $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância LPM-01 (500 MHz, DMSO) – Ampliação da região entre 106,85 – 159,32 δ	55
Figura 38. Espectro de RMN de correlação heteronuclear, $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância LPM-02 (500 MHz, DMSO)	56
Figura 39. Espectro de Massa (via inserção direta) da substância LPM-02.....	57
Figura 40. Estrutura da substância LPM-02.....	57
Figura 41. Proposta Biossintética do ácido gálico e do ácido elágico.....	59

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Curva de calibração da catequina (padrão).....	40
Gráfico 2. Absorbância versus concentração para Proantocianidinas no extrato alcoólico de <i>L. pisonis</i>	41
Gráfico 3. Curva de calibração da rutina (padrão).....	43
Gráfico 4. Absorbância versus concentração para flavonoides totais do extrato hidroalcoólico de <i>L. pisonis</i>	43

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Enquadramento Taxonômico de <i>Lecythis pisonis</i>	5
Tabela 2. Substâncias isoladas de espécies da família Lecythidaceae.....	7
Tabela 3. Resultado dos testes para Triterpenos e Esteroides dos extratos alcoólico e hidroalcoólico das folhas de <i>L. pisonis</i>	31
Tabela 4. Resultado dos testes para Fenólicos totais e Flavonoides dos extratos alcoólico e hidroalcoólico das folhas de <i>L. pisonis</i>	37
Tabela 5. Resultado do teste para proantocianidinas do extrato alcoólico das folhas de <i>L. pisonis</i>	38
Tabela 6. Resultado do teste para atividade antioxidante dos extratos alcoólico e hidroalcoólico das folhas de <i>L. pisonis</i>	40
Tabela 7. Resultado das absorbâncias obtidas para o extrato alcoólico no teste de determinação de Proantocianidinas.....	41
Tabela 8. Resultado das absorbâncias obtidas para o extrato alcoólico na avaliação do teor de flavonoides totais.....	43
Tabela 9. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C (500, 125 MHz; MeOD) da substância LPM-01.....	50
Tabela 10. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C (500, 125 MHz; MeOD) da substância LPM-02.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

δ	Deslocamento químico
δ_c	Deslocamento químico do carbono
δ_H	Deslocamento químico do hidrogênio
Abs	Absorbância
AcOEt	Acetato de Etila
APT	Attached proton test
Ar	Aromático
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CG/EM	Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas
cm^{-1}	Centímetro recíproco (unidade de número de onda)
DMSO	Dimetilsulfóxido
eV	Eletrovolt
Hz	Hertz
J_{CH}	Constante de acoplamento de carbono e hidrogênio
$M.^+$	Íon molecular no espectro de massas
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
m/z	Relação massa/carga
ppm	Parte por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono
s	Singleto
UV	Ultravioleta

RESUMO

A espécie *Lecythis pisonis*, mais conhecida como Sapucaia, é um vegetal pertencente à família Lecythidaceae e pode ser encontrada em diversas regiões do país. É bastante utilizada na indústria civil e naval, em banhos para tratar patologias dermatológicas, na fabricação de brinquedos e como artigo de decoração doméstica.

A família Lecythidaceae possui atividades farmacológicas interessantes que tem impulsionado pesquisadores a explorar suas espécies, de forma a cooperar com o bem estar da humanidade. Algumas dessas atividades conhecidas são antioxidante, antibacteriana, antitumoral, anti-inflamatória e antifúngica.

O principal objetivo do presente trabalho é traçar o perfil químico das folhas de *Lecythis pisonis* bem como avaliar suas atividades antioxidante.

Os testes qualitativos realizados identificaram a presença de flavonoides, fenólicos em geral e substâncias antioxidante para os extratos alcoólico e hidroalcoólico.

A avaliação do teor de proantocianidinas deu-se através do método da vanilina sulfúrica, obtendo-se 8,655 mg/g de extrato seco.

A avaliação do teor de flavonoides totais deu-se através do método do cloreto de alumínio, obtendo-se 6,583 mg/g de extrato seco.

Os extratos alcoólico, hidroalcoólico e aquoso brutos das folhas de *L. pisonis* foram obtidos através da extração contínua com extrator do tipo Soxhlet. A identificação dos metabólitos secundários isolados nesses extratos através de técnicas cromatográficas, foi feita através da interpretação dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C e ^1H , Massas e Infravermelho. Somadas a essas técnicas, a comparação dos compostos com a literatura permitiu a identificação dos compostos.

ABSTRACT

Lecythis pisonis, the most known as Sapucaia, is a vegetable which belongs the Lecythidaceae family and might be found in several regions of the country. It is commonly used in civil and naval construction, in showers to treat dermatologic pathologies, in toys manufacture, and as domestic ornamentation article.

The Lecythidaceae family has interesting pharmacologic activities which has motivating researchers to explore their species, so that to cooper with the good life of the humanity. Some of these known activities are antioxidant, antibacterial, antitumor, anti-inflammatory, and antifungal.

The major objective of the present work is to obtain the chemical profile of the *Lecythis pisonis* leaves, as well as to evaluate their antioxidant activities.

The qualitative tests performed identified the presence of flavonoids, general phenolic, and antioxidants substances for the alcoholic and hydro alcoholic extracts.

The evaluation of the proanthocyanidins content was given by the method of sulfuric vanillin, obtaining 8,655 mg/g of dry extract.

The evaluation of the total flavonoid content was given by the method of aluminum chloride, obtaining 6,583 mg/g of dry extract.

Alcoholic, hydro alcoholic, and aqueous crude *L. pisonis* leaves extracts were obtained through the continue extraction using Soxhlet type extractor. The identification of secondary metabolites isolated in these extracts using chromatograph techniques, was done through the interpretation of Nuclear Magnetic Resonance spectra of de ^{13}C e ^1H , Mass, and infrared spectra. Added to these techniques, the comparison of the compounds with the literature, allowed the identification of the compounds.

1. INTRODUÇÃO

A química de produtos naturais é uma das mais antigas áreas de pesquisa e, talvez, seja a área que concentra o maior número de pesquisadores dentro da química brasileira (Pinto *et al.*, 2002).

Os produtos naturais vêm sendo utilizados pela humanidade há tempos e o seu uso varia desde a aplicação sobre queimaduras a ingestão de ervas, em busca de cura e alívio para dores (Pinto, 1995; Viegas Júnior & Bolzani, 2006). Hoje em dia, tanto em regiões pobres quanto ricas, existem feiras e mercados que comercializam plantas medicinais e até residências que praticam a arte do cultivo para uso familiar (Amorozo, 2001).

Os primeiros registros sobre produtos fitoterápicos ocorreram entre os anos de 2838-2698 a.C., quando foram catalogadas pelo imperador chinês Shen Nung 365 ervas medicinais e venenos que eram usados sob inspiração do “deus da criação”. No século XIX, o empirismo da alquimia foi substituído pela química experimental, dando início a síntese laboratorial de substâncias orgânicas e impulsionando a produção acelerada de novos fármacos (França *et al.*, 2008).

Em 1803, estudando sobre a espécie *Papaver somniferum*, Derosne descreveu sobre o “sal do ópio”, dando início aos primeiros estudos sobre sua constituição química e abrindo caminho para que em 1804, Armand Séquin isolasse o alcaloide morfina, seu componente majoritário. Devido sua função anestésica, a morfina (Figura 1) foi muito utilizada pelas tropas Americanas no período da Guerra da Secessão, 1861-1865 (Pinto, 1995; Viegas Júnior & Bolzani, 2006).

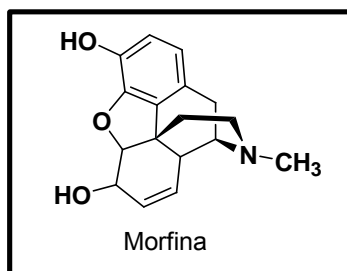


Figura 1. Morfina, alcaloide isolado em 1804

A atividade farmacológica de uma espécie geralmente está ligada à presença de metabólitos secundários, tais como alcaloides, terpenoides, compostos fenólicos, entre outros. Esse tipo de metabólito pode ser restritivo a um táxon específico ou pode ainda caracterizar quimicamente grandes grupos vegetais (Nascimento, 2008).

Estudos sobre a medicina popular vêm recebendo maior atenção devido as informações sobre profilaxia que tem trago à Ciência. O interesse governamental tem estado em evidência, implementando a união do avanço tecnológico ao conhecimento popular e ao desenvolvimento sustentável, de forma a tornar a política de assistência em saúde mais eficaz, abrangente e humanitária. Devido a isso, foi instituído a Portaria n° 22/1967 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a Resolução – RDC n° 17/2000, classificando os fitoterápicos como medicamentos. (França *et al.*, 2008).

A Organização Mundial de Saúde divulgou em 1990 que 65-80% da população que vivia em países desenvolvidos dependiam unicamente de plantas medicinais para cuidados básicos de saúde (Veiga Júnior & Pinto, 2005). Plantas medicinais foram definidas pela OMS como todo vegetal que possui em seus órgãos substâncias com funções terapêuticas ou que seja base para produção de fármacos (Veiga Júnior & Pinto, 2005).

Entre 1981 e 2002, trinta por cento das substâncias químicas descobertas advinham de produtos naturais ou de derivados desses, e outros vinte por cento dessas substâncias eram produtos sintetizados, equivalendo-se a estruturas existentes na natureza. Nos anos de 2001 e 2002, aproximadamente um quarto dos fármacos mais vendidos mundialmente eram de origem ou derivado de vegetais (Carvalho, 2006).

A história do Brasil está fortemente conectada a esses produtos, uma vez que, por se tratar de um país rico em biodiversidade natural, atraiu portugueses para colonização e exploração, principalmente da árvore pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), de onde era extraído um corante vermelho

(brasileína) muito utilizado para tingir tecidos na Índia Oriental (Pinto, 1995; Viegas Júnior & Bolzani, 2006) (Figura 2).



Figura 2. (a) Pau Brasil (*C. echinata*); (b) Estrutura do corante extraído do pau Brasil

A razão pela qual o pau-brasil tenha sido explorado até a sua quase extinção foi que, até o final do século XIX, ainda não eram produzidos corantes artificiais, deixando toda produção dependente das explorações. Além do pau-brasil, outros produtos interessaram os colonizadores, como o corante amarelo Morina, obtido da *Chlorophora tinctoria* e a descoberta de substâncias alucinógenas, largamente utilizada em cultos religiosos pelos nativos. O grande conhecimento dos povos antigos no poder da utilização dos produtos naturais foi importante para o início das pesquisas sobre suas propriedades terapêuticas (Pinto, 1995; Viegas Júnior & Bolzani, 2006).

Muitos são os fatores que impulsionam o estudo desses produtos. Pode-se citar a procura de um fármaco que aja no combate ao câncer, a falta de acesso a alguns medicamentos por parte da sociedade mais abastada, o conhecimento da biodiversidade e preservação das espécies (Carvalho, 2006).

Em contrapartida, a tentativa de encontrar outra maneira para tratamento, fez surgir alguns métodos de eficácia duvidosa, tais como homeopatia, medicina chinesa, cromoterapia, florais, medicina ayurveda, entre outros, que prometem a cura sem efeitos colaterais. A falta de conscientização no uso do medicamento provoca o insucesso do tratamento ou efeitos colaterais indesejados, disseminando ainda mais a descrença em sua eficácia (Carvalho, 2006).

A cada instante, novas moléculas são relatadas na literatura graças a otimização das técnicas espectrométricas. Essas técnicas permitem a elucidação estrutural de metabólitos complexos de forma mais rápida, sendo possível a identificação de novas moléculas que antes eram de difícil caracterização (Cechinel-Filho & Yunes, 1998).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Conhecer o estrato arbóreo da região Norte Fluminense através do estudo do perfil químico e avaliação da atividade antioxidante de um espécime de *L. pisonis*.

2.2. Objetivos Específicos

- Aprender sobre pesquisas bibliográficas, técnicas e uso de equipamentos básicos de laboratório de química orgânica;
- Preparar e fracionar os extratos brutos polares de folhas de *L. pisonis*
- Realizar testes químicos para identificação de metabólitos secundários;
- Avaliar a atividade antioxidante de extratos brutos;
- Avaliar o teor de fenólicos e flavonoides totais;
- Identificar o perfil químico dos extratos através de testes químicos específicos para a identificação de metabólitos secundários e métodos espectrométricos (UV, IV, CG/EM, RMN¹H e ¹³C a uma e duas dimensões);
- Isolar e purificar os constituintes químicos dos extratos brutos de *L. pisonis* através de técnicas cromatográficas (cromatografia de adsorção em coluna, cromatografia de partição e cromatografia líquida de média pressão).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Enquadramento Taxonômico

O enquadramento taxonômico de *Lecythis pisonis*, Lecythidaceae, segundo (Cambessèdes, 1833) está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Enquadramento Taxonômico de *L. pisonis*

Enquadramento Taxonômico	
Divisão	Angiospermae
Classe	Equisetopsida C. Agardh
Subclasse	Magnoliidae Novákex Takht.
Ordem	Ericales Bercht. & J. Presl
Família	Lecythidaceae A. Rich.
Gênero	<i>Lecythis</i> Loefl.
Espécie	<i>Lecythis pisonis</i> Cambess

Fonte: <http://www.tropicos.org/Name/17900351> (Acesso em 14 de setembro de 2015)

3.2. Considerações sobre a Família Lecythidaceae

A família Lecythidaceae apresenta grande diversidade em regiões com solo muito úmido (Mori, 1988). Ela é encontrada na América Central e do Sul, África, Sudeste da Ásia e Madagascar (Mori, 2014) sendo dividida em três subfamílias: Foetidioideae, Planchonioideae e Lecythidoideae, das quais as duas primeiras encontram-se nas regiões dos trópicos africanos e asiáticos e a última, é exclusiva dos trópicos americanos (Mori *et al.*, 2007). No continente americano, a família Lecythidaceae é encontrada nas regiões desde o México até o Paraguai, sendo sua maior diversidade e concentração mundial na região Amazônica (Mori *et al.*, 2001).

Esta família é considerada a terceira árvore mais abundante da região Amazônica (Steege *et al.*, 2006) com cerca de 25 gêneros e 489 espécies

(Mori, 2007; Mori, 2014). A razão para a ocorrência de tantas espécies pertencentes à mesma família é devido a muitos fatores, podendo ser destacado o clima da Amazônia central com água e luz abundantes, temperaturas amenas, diversificação dos habitats, entre outros (Mori *et al.*, 2001).

Mesmo com tantos gêneros e espécies, existem poucos estudos realizados e eles foram baseados em apenas 21 espécies contidas em 13 gêneros: *Barringtonia*, *Bertholletia*, *Careya*, *Cariniana*, *Couroupita*, *Eschweilera*, *Foetidia*, *Grias*, *Gustavia*, *Lecythis*, *Napoleonaea*, *Planchonia* e *Petersianthus*. O primeiro gênero, *Barringtonia*, é o mais estudado contendo cinco espécies conhecidas (*B. acutangula*, *B. racemosa*, *B. maunwongyathiae*, *B. asiaticae*, *B. speciosa*) (Oliveira, 2012).

O tamanho das árvores da família varia desde árvores pequenas a árvores grandes e frondosas, variando seu tipo de solo de acordo com cada espécie. A maioria das espécies cresce em terra firme, mas há aquelas que se encontram em várzeas como as *Allantomalineata* (Mart. ex Berg) Miers, *Couratari oligantha* A. C. Smith, *C. tenuicarpa* A. C. Smith, *Eschweilera ovalifolia* (DC) Niedenzu, *E. parvifolia* Mart. ex DC., e *E. tenuifolia* (Berg) Miers, e outras que são típicas de cerrado como as *Eschweilera nana* (Berg) Miers, *Cariniana rubra* Gardner ex Miers, *Lecythis miersiana* Mori e *L. schomburgkii* Berg (Mori, 1988).

Em regiões onde as estações secas são bem definidas, as espécies de Lecythidaceae florescem no período seco e frutificam no início do período de chuva. No entanto, se não há estações secas bem definidas, as espécies podem florescer do final do inverno até o final da primavera, o que pode ser resposta ao aumento do período do dia ou da temperatura (Mori, 1988).

Segundo Mori (2001), a existência de muitos indivíduos e gêneros nesta família define a preservação da mata. Florestas que foram queimadas por causas naturais ou ação humana são pobres em espécies de Lecythidaceae. Além disso, elas têm a capacidade de regenerar o ambiente, caso a razão da modificação não tenha sido a queima, pois uma vez não sendo queimados, os troncos podem se regenerar. A única maneira de haver a recolonização da

família em uma área que sofreu ação da queima seria através da dispersão de suas sementes vindas de solos intactos. Além de eliminar as espécies de Lecythidaceae, a queima ainda destroe as sementes e, por consequência, eliminaria os animais que alimentam-se delas, causando grandes danos no ciclo de vida animal e vegetal (Mori, 2001).

Das 200 espécies da família Lecythidaceae da região neotropical, 54 % estão localizadas em solo brasileiro e grande parte delas são, principalmente, compostas pelas espécies que apresentam flores zigomorfas. Destas, 59 % encontram-se parcialmente ou totalmente no Brasil. Já aquelas espécies que apresentam flores actinomorfas, somente 43% são nativas no Brasil (Mori, 1988).

3.2.1. Aspectos Fitoquímicos da Família Lecythidaceae

Estudos sobre os constituintes encontrados nas plantas dessa família indicaram a presença de flavonoides, monoterpénóides, diterpenóides de esqueleto neo-clerodano, triterpenóides pentacíclico e seus glicosídeos, sesquiterpenóides, ácido elágico e seus derivados, esteróides, alcalóides, substâncias fenólicas simples, vitamina E, ácidos graxos, sacarose, ésteres etílicos e ceras, entre outros. Além disso, através dos testes de avaliação das atividades farmacológicas, pode-se verificar a atividade citotóxica, antioxidante, antibacteriana, antitumoral, anti-inflamatória, antifúngica, antinociceptivo, leishmanicida e proteção hepática (Oliveira, 2012). Na Tabela 2 e Figura 3 são apresentadas algumas substâncias isoladas de espécies da família Lecythidaceae.

Tabela 2. Algumas substâncias isoladas de espécies da família Lecythidaceae

Substâncias	Espécies	Referencia
1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 32, 33	<i>Eschweillera longipes</i>	Carvalho <i>et al.</i> , 1998
15, 16, 19, 29		Costa <i>et al.</i> , 2003
11, 12, 13, 14, 21, 22, 23	<i>Gustavia augusta</i>	Souza <i>et al.</i> , 2001
25, 26, 27	<i>Cariniana rubra</i>	Lima <i>et al.</i> , 2002
29, 30, 31	<i>Planchonia careya</i>	McRae <i>et al.</i> , 2008
5, 6, 8, 12, 17, 18, 23, 28, 34	<i>Lecythis pisonis</i>	Duarte <i>et al.</i> , 2015

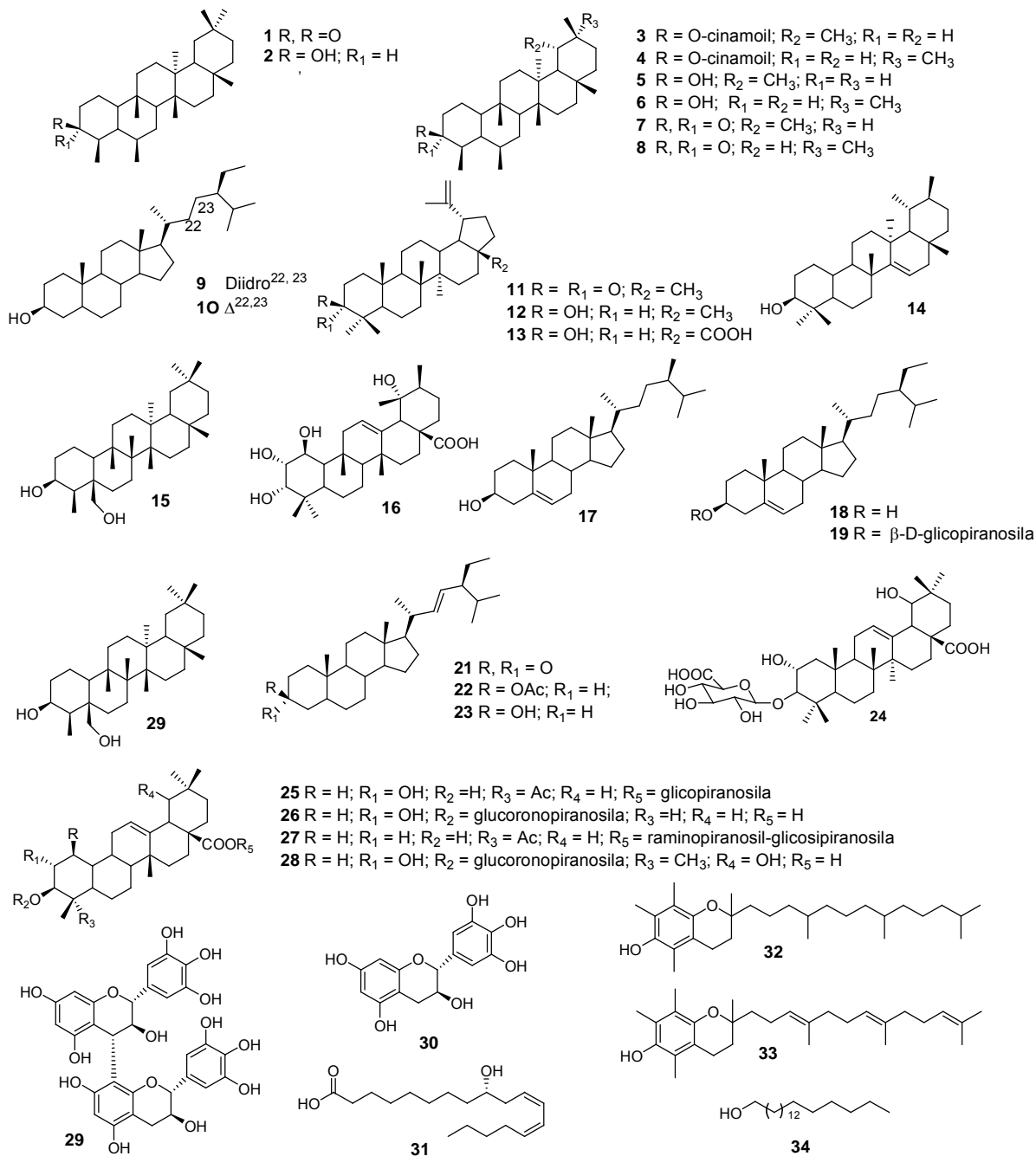


Figura 3. Substâncias isoladas de espécies da família Lecythidaceae

3.3. Considerações sobre o Gênero *Lecythis*

Dentro da família, o gênero *Lecythis* é um dos mais diversificado em termos de flores e frutos e é muito relacionado com outros três, tais como *Eschweilera*, *Bertholletia* e *Corythophora*. Em comparação com o *Eschweilera*, o maior gênero da família, foram relatadas características que tornavam esses dois gêneros distintos, porém alguns autores subsequentes ainda consideravam *Eschweilera* como parte de *Lecythis*. Em 1874, Miers manteve a ideia inicial desses gêneros e organizou uma lista de características que as distinguiam e que são consideradas até os dias de hoje. (Huang; Mori; Kelly, 2011).

Em 1990, Mori dividiu o gênero em quatro grupos: *Eschweilera*, contendo 2 espécies; *Corrugata*, contendo 5 espécies; *Pisonis*, contendo 4 espécies e *Poiteau*, contendo 3 espécies (Huang; Mori; Kelly, 2011).

As espécies de *Lecythis* estão distribuídas desde Nicarágua até o Rio de Janeiro. A primeira descrição do gênero *Lecythis* Loefl., foi publicada em 1758 por Linnaeus, dois anos após a morte de Loefling, o primeiro a descrevê-lo (Huang; Mori; Kelly, 2011).

3.3.1. Aspectos Farmacológicos e/ou Biológicos do Gênero *Lecythis*

De acordo com Ferreira (2014), não existem muitos estudos sobre o gênero *Lecythis* em termos químicos, mesmo sendo o terceiro maior gênero da família (Ferreira, 2014). Há registros na literatura de especiação química de Selênio em nozes de *Lecythis minor*, análise química de óleos essenciais das flores de *Lecythis usitata* e folhas de *Lecythis persistens* e *Lecythis poiteau*.

3.4. Considerações sobre a espécie *Lecythis pisonis*

Para Mori, a espécie *Lecythis pisonis*, sapucaia (Figura 4), é uma das mais interessantes árvores do planeta Terra devido seus aspectos físicos e fitoquímicos, já que há a presença metabólitos de outras vias (Mori, 2015).



Figura 4. *Lecythis pisonis* Camb.: (a) Árvore; (b) Folhas e Flores; (c) Frutos.

3.4.1. Sinonímia Vulgar

A planta é conhecida popularmente por diversos nomes. Dentre eles estão sapucaia, marmitta-de-macaco, castanha de sapucaia, cumbuca-de-macaco (Carvalho *et al.*, 2002), sapucainha, pau de cachimbo, papo de anjo, fruta de cotia e fruta da lepra (Braga *et al.*, 2007), castanha rana, castanheira-sapucaia, árvore-de-caçamba, árvore-de-cambuca, caçamba-do-mato, cambuca-de-macaco, chapéu-de-sol, cuia-de-macaco, embira-de-jacuíba, embiratã, fruta-de-macaco, fruto-de-caçamba, jaçapucã, jaçapucaia, jaçapucari, jecuibá, jequitibá, juquetibá, pacoba-de-macaco, pau-carga, pau-d'arco-branco, pau-de-caixão, quetelê, ruchuchu, sapucaí, sapucaiaçu, sapucaia-branca, sapucaia-de-castanha, sapucaia-de-pilão, sapucaia-do-amazonas, sapucaia-grande, sapucaia-verdadeira, sapucaia-vermelha, sapucarana (Souza *et al.*, 2014).

3.4.2. Sinonímia Científica

A planta foi nomeada como *Lecythis pisonis* por Cambessèdes em 1829 e nomeada como *Lecythis usitata* por Miers em 1874. Após estudo da mesma por Mori e Prance em 1990, foi concluído que ambas se tratavam da mesma espécie, prevalecendo o nome *L. pisonis* por ser o mais antigo (Souza *et al.*, 2014).

3.4.3. Distribuição Geográfica de *Lecythis pisonis*

A espécie pode ser encontrada em grande parte do Brasil, estendendo-se do Ceará, nordeste do país, ao Rio de Janeiro, localizado na região sudeste (Carvalho *et al.*, 2012), na floresta pluvial da Mata Atlântica (Braga *et al.*, 2007). É encontrada também no sul da Bahia, no norte do Espírito Santo (Braga *et al.*, 2007). Porém, em todo território brasileiro, sua maior concentração e diversidade encontra-se na Amazônia (Mori, 2001; Moutinho, 2008) (Figura 5).



Figura 5. Mapa representativo da distribuição de *Lecythis pisonis* no Brasil

3.4.4. Usos Populares de *Lecythis pisonis*

As folhas da planta são utilizadas popularmente em banhos para tratar patologias dermatológicas como o prurido (Silva *et al.*, 2011). Já o óleo retirado das sementes é utilizado para redução de dor muscular (Franco & Barros, 2006; Agra; Freitas; Barbosa-Filho, 2007).

A madeira pode ser utilizada na indústria civil, na construção de ripas e caibros (Braga, 2007), na construção naval, e também podem ser usadas como matéria-prima para fabricação de móveis, artigos de decoração doméstica, brinquedos e instrumentos musicais (Souza *et al.*, 2014).

3.4.5. Descrição Botânica

Sua madeira é resistente, dura e pesada, com o cerne de coloração vermelho-amarelada (Braga *et al.*, 2007). É muito resistente ao ataque de organismos xilófagos. Suas folhas são lisas, oblongas, de base arredondada, medindo aproximadamente 15 cm (Braga *et al.*, 2007; Simões, 2007).

Suas flores são de coloração rosa/roxa quando novas e tornam-se completamente brancas quando velhas (Huang; Mori & Kelly, 2011). São flores odoríferas que medem aproximadamente 7 cm de diâmetro, são solitárias ou agrupadas em pequenos racemos (Simões, 2007). O período para floração acontece no período de setembro a outubro com coloração roxa e branca. Já o período para frutificação é ligeiramente maior, ocorrendo no período de junho a setembro, gerando frutos grandes de aproximadamente 20 cm.

Seu fruto é arredondado, com casca espessa e rígida, de coloração amarronzada, medindo cerca de 25 cm de comprimento (Simões, 2007). Sua casca é adstringente, dura e solta quando o fruto está maduro, servindo como uma tampa e dando acesso às sementes. Essas, por sua vez, são comestíveis,

apresentam coloração marrom claro e levam cerca de 40 a 70 dias para germinar (Braga *et al.*, 2007).

A produção de mudas gera-se através das sementes e não requer nenhum tipo de tratamento pré-germinativo. Suas sementes são muito procuradas como alimento, e muito apreciadas por macacos. Os morcegos, principalmente os da espécie *Phyllostomus hastatus*, são seus principais disseminadores (Simões, 2007).

As características de suas sementes são muito distintas em algumas de suas espécies. No entanto, a variação de suas características não foi completamente elucidada e muitos táxons não apresentam nenhuma informação para a codificação destas diferenças (Huang, Mori, Kelly, 2011).

Segundo Carvalho e colaboradores (2012), as sementes da espécie são ricas em vitaminas, minerais, proteínas e ácidos graxos essenciais. Desta maneira, o estudo de sua composição centesimal revelou a presença de 54,8% de lipídios; 26,82% de proteínas; 5,01% de carboidratos. O consumo da semente pode ser benéfico à dieta humana e animal, além de substituir outras sementes que são muito consumidas, como a castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.) e a castanha do Pará ou castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* Kunth). (Carvalho, 2012; Alimentos Regionais Brasileiros, 2007; Vallilo *et al.*, 1999).

Porém, de acordo com Vallilo e colaboradores (1999), algumas amostras de amêndoas de *L. pisonis* coletadas em 4 municípios de São Paulo apresentaram alto teor de chumbo, tornando-a imprópria para o consumo humano. Os valores nutricionais dessas sementes variam de região para região devido as diferenças de clima e solo (Carvalho *et al.*, 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Equipamentos

4.1.1. Concentração dos Extratos Brutos

Os extratos brutos foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotativo Fisatom 802. As soluções aquosas foram liofilizadas no liofilizador Thermo Savant.

4.1.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos a partir do espectrofotômetro IR Affinity-1 Shimadzu, utilizando pastilhas de KBr grau espectroscópico, com leituras na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.1.3. Espectroscopia na Região do Ultravioleta

Para análise na região do ultravioleta, as amostras foram dissolvidas em metanol, etanol ou butanol em cubetas de 1,0 cm, utilizando o espectrofotômetro Bel Photonics 1105 com leituras na região de 320 a 1000 nm e espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu, com faixa espectral entre 200 e 1000 nm.

4.1.4. Cromatografia gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas

Os fragmentogramas de massas foram obtidos nos aparelhos GC-EM QP 5050 Shimadzu e GC-EM 5975C Inert XL EI/CI/MS Agilent Technologies.

4.1.5. Centrífuga

Para melhor separação entre as partículas insolúveis e a solução, foi utilizada a centrífuga Daiki, modelo 80-2B.

4.1.6. Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C foram realizados com as amostras dissolvidas em metanol deuterado (MeOD) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO) à temperatura ambiente, empregando o tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). O espectrofotômetro utilizado foi o Bruker Ascend 500 MHz com frequência de 500 MHz (RMN ^1H) e 125 MHz (RMN ^{13}C).

4.2. Reagentes

- Acetato de Etila P.A., Synth;
- Acetona P.A., Synth;
- Ácido Bórico P.A., Vetec;
- Ácido Clorídrico P.A., Synth;
- Ácido Oxálico P.A., Vetec;
- Ácido Sulfúrico, Merck;
- Água destilada;
- Anidrido Acético P.A., Vetec;
- Betacaroteno, Sigma;
- Butanol P.A., Synth;
- Cloreto de Alumínio, Vetec;
- Cloreto Férrico, Vetec;
- Clorofórmio P.A., Synth;
- Diclorometano P.A., Synth;
- Difenilboriloxetilamina, Vetec;
- Dimetilsulfóxido, CIL - Cambridge Isotope Laboratories, Inc.;
- Etanol P.A., Synth;
- Éter Etilico P.A., Vetec;
- Hexano P.A., Synth;
- Hidróxido de Sódio P.A., Vetec;

- Magnésio Metálico;
- Metanol Deuterado, CIL –Cambridge Isotope Laboratories, Inc.;
- Metanol P.A., Synth;
- Polietilenoglicol 4000, Vetec;
- Sulfato de Sódio Anidro P.A., Vetec.
- Vanilina, Vetec;

4.3. Materiais

- Argola;
- Balança Analítica;
- Balão de fundo redondo de 1000 mL;
- Balão volumétrico de 1000 mL;
- Bastão de vidro;
- Banho ultratermostático SL 152;
- Béquer de 50, 150, 400, 1000 mL;
- Bulbo;
- Cromatofolha de sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck;
- Espátula;
- Estante com tubos de ensaio de plástico;
- Funil de separação de 60 mL;
- Funil de sólidos;
- Garra;
- Manta de aquecimento;
- Mufa;
- Papel Alumínio;
- Papel de filtro qualitativo, Nalgon Equipamentos científicos LTDA;
- Pérolas de vidro;
- Pipetas Pasteur de vidro;
- Suporte Universal;
- Tampa para funil de separação;

- Tampa para balão volumétrico;
- Tesoura.

4.4. Soluções Reveladoras

- Vanilina Sulfúrica;
- Solução alcoólica de cloreto férrico;

4.5. EXPERIMENTAL

4.5.1. Coleta do Material Vegetal

O material vegetal (folhas) de *L. pisonis* foi coletado no campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, localizada no município de Campos dos Goytacazes (Figura 6), na região norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil (Latitude: -21.7545, longitude: -41.3244, 21°, 45' 16" Sul, 41° 19'28" Oeste) (Cidade-Brasil, 2015).

As folhas foram coletadas em Junho de 2015 e foi feita uma triagem de forma a utilizar somente folhas que não apresentavam fungos. Elas foram pesadas e cortadas com tesoura. Posteriormente, o processo foi repetido utilizando folhas secas.



Figura 6. Local de coleta (Campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro).

4.5.2. Obtenção dos Extratos Brutos

4.5.2.1. Extração a quente com extrator tipo Soxhlet

As folhas (2,0024 g), já secas, foram extraídas a quente utilizando algodão no extrator para não permitir que pequenas partes das folhas fossem para o balão onde o extrato foi recolhido. Este procedimento ocorreu durante 3h e 30 min e resultou em aproximadamente 0,5907g de extrato hidroalcoólico, MeOH/H₂O (70:30). Este extrato foi utilizado na dosagem de flavonoides.

O extrato metanólico também foi obtido a partir da extração contínua. As folhas secas e moídas (69,4143 g) em moinho de facas tipo Willey foram colocadas dentro do papel de filtro adaptado ao equipamento. A extração ocorreu por aproximadamente 10 horas. Usou-se 500 mL de solvente. (Figura 7). O resíduo resultante foi extraído com MeOH/H₂O na proporção 70:30. Este procedimento resultou em 27,4114 g de extrato metanólico e 10,5362 g de extrato hidroalcoólico.



Figura 7. Extrator tipo Soxhlet

4.5.2.2. Extração com aparelho de Clevenger e fracionamento dos resíduos aquosos da extração

47,2 g de folhas recém colhidas foram cortadas, com tesoura, e colocadas em um balão com 500 mL de água destilada. No balão foi acoplado um aparelho de destilação tipo Clevenger, refrigerado com banho ultratermostático a 10°C. A destilação a vapor ocorreu durante 2 horas (Figura 8). O hidrolato foi extraído com CH_2Cl_2 e analisado por CG-EM, como não havia compostos voláteis, iniciou-se o trabalho com o resíduo da destilação. Este resíduo foi filtrado e extraído com AcOEt, obtendo-se uma fração em AcOEt (F. em AcOEt), obtendo-se 13,137g de extrato, e outra em água (F. aquosa).



Figura 8. Extração com aparelho de Clevenger

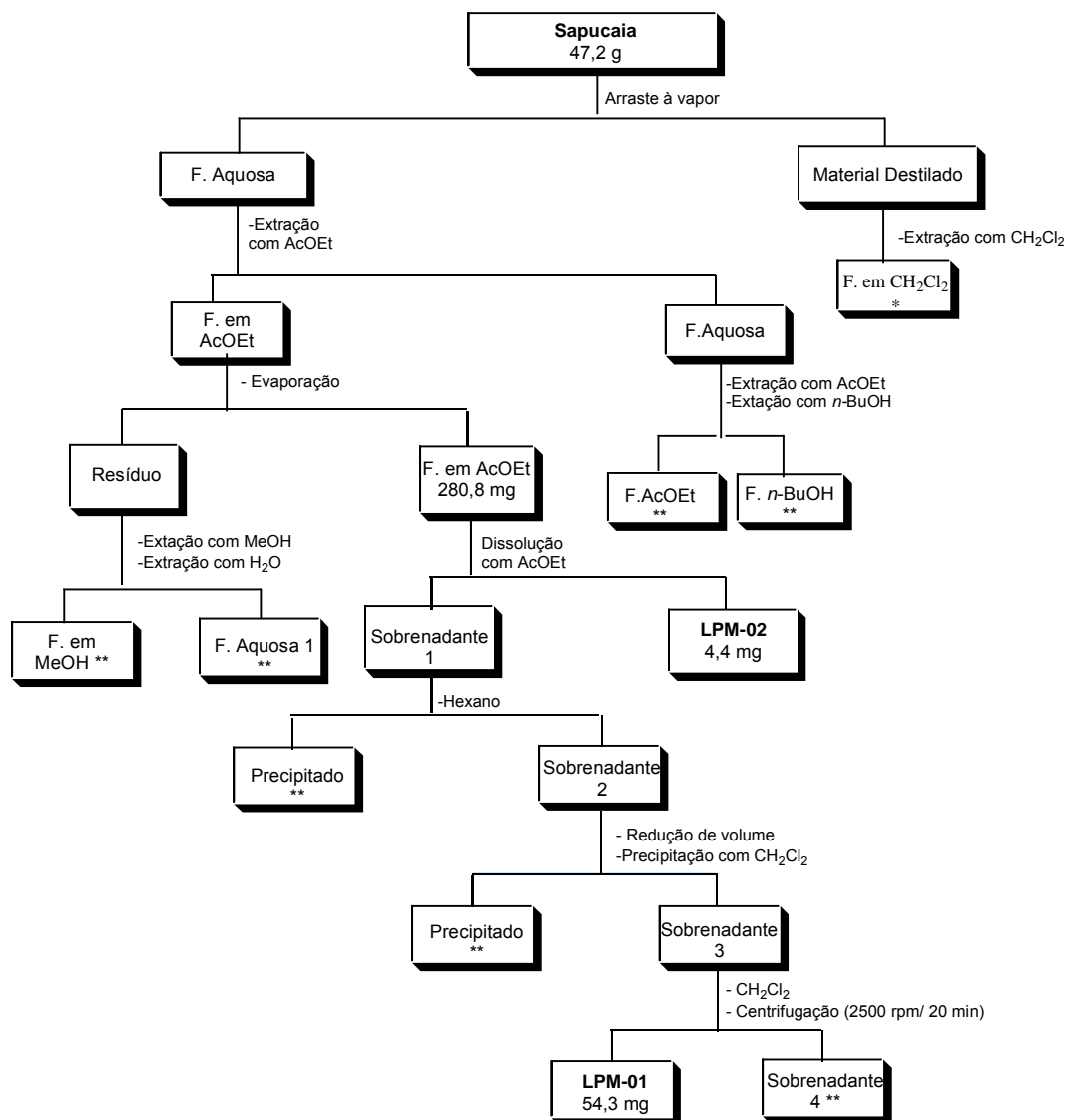
Após a remoção do solvente da fração em AcOEt, esta foi novamente solubilizada em AcOEt, resultando na precipitação de um sólido amarelo-pálido (LPM-02).

No sobrenadante resultante (sobrenadante 1), foi adicionado hexano, para forçar a formação de precipitado. Com mesmo objetivo, foi adicionado CH_2Cl_2 ao sobrenadante 2, obtendo-se mais uma vez partículas insolúveis. Ao adicionar mais uma porção de CH_2Cl_2 , houve a formação de mais precipitado, o qual foi separado do sobrenadante através de uma centrifugação a 2500 rpm,

durante 20 min. Este procedimento deu origem a substância codificada como LPM-01.

O resíduo insolúvel da fração em AcOEt foi removido com metanol e em seguida com água destilada.

A fração aquosa restante da primeira extração com AcOEt foi extraída novamente com AcOEt e posteriormente com BuOH (Esquema 1).



Esquema 1. Fluxograma resumido do fracionamento do extrato aquoso das folhas de *L. pisonis*

Obs. *Análise em CG-EM apresentou somente ácidos graxos

**Fração não trabalhada

4.5.3. Testes Químicos para Identificação de Metabólitos Secundários

4.5.3.1. Identificação de Triterpenos e Esteróides

O teste para identificar a presença de triterpenos e esteroides foi iniciado com a preparação de uma solução contendo 11,0 mg do extrato alcoólico e hidroalcoólico das folhas de *L. pisonis* diluído em 4,0 mL de MeOH. A uma alíquota de 2,0 mL da solução foram adicionados 10,0 mL de clorofórmio. Filtrou-se com papel de filtro e dividiu-se o extrato em duas porções iguais utilizando dois tubos de ensaio. No tubo nº 1 realizou-se a reação de Liebermann-Burchard e no tubo nº 2 a reação de Salkowski.

- **Reação de Liebermann-Buchard** (Costa, 1994)
 - **Materiais**
Estante com tubos de ensaio;
 - **Reagentes**
Reagente de Liebermann-Buchardt (2 mL de anidrido acético mais duas gotas de ácido sulfúrico);
 - **Protocolo Experimental**
Misturou-se 10,0 mL de anidrido acético e 2,0 gotas de Ácido sulfúrico concentrado, em seguida, adicionou-se ao tubo de ensaio nº.1.

- **Reação de Salkowski** (Costa, 1994)
 - **Materiais**
Estante com tubos de ensaio;
 - **Reagentes**

Ácido Sulfúrico, Merck;

➤ **Protocolo Experimental**

Ao tubo de ensaio nº 2 adicionou-se algumas gotas de ácido sulfúrico concentrado.

4.5.3.2. Teste para Identificação de Fenólicos totais e Flavonoides em

Geral

- **Reação de Shinoda**

- **Materiais**

- Estante com tubos de ensaio;

- **Reagentes**

- Ácido Clorídrico P.A., Synth;

- Magnésio Metálico;

- Metanol P.A., Synth;

- **Protocolo Experimental**

- Em dois tubos de ensaio, adicionou-se 2 mL do extrato alcoólico em um tubo e 2 mL do extrato hidroalcoólico em outro, 6 fragmentos de magnésio metálico e 1 mL de ácido clorídrico em ambos.

Fonte: http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/flavonoides_e_antocianinos.html

- **Reação com Cloreto de Alumínio**

- **Materiais**

- Placa de toque;

- Câmara com lâmpada de luz ultravioleta;

- **Reagentes**

- Cloreto de Alumínio 5%;

➤ **Protocolo Experimental**

Em uma placa de toque, colocou-se o extrato alcoólico e o hidroalcoólico, separadamente, em duas cavidades. Em uma cavidade de cada extrato, acrescentou-se cloreto de alumínio a 5% e observou-se sob a luz ultravioleta.

Fonte: http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/flavonoides_e_antocianinos.html

• **Método do Cloreto Férrico (Shriner *et al.*, 1983)**

➤ **Materiais**

Placa de toque;

➤ **Reagentes**

Cloreto Férrico 2% em etanol;

➤ **Protocolo Experimental**

Em uma placa de toque, colocou-se os extratos alcoólico e hidroalcoólico, cada um em duas cavidades, separadamente, e adicionou-se 3,0 gotas de cloreto férrico 2% em etanol. A coloração resultante foi analisada visualmente.

• **Reação de Taubouk**

➤ **Materiais**

Cápsula de Porcelana;

Placa de Aquecimento;

Placa de Petri;

Câmara com lâmpada de luz ultravioleta;

➤ **Reagentes**

Acetona P.A., Synth;

Ácido Bórico P.A., Vetec;

Ácido Oxálico P.A., Vetec;

Éter Etilico P.A., Vetec.

➤ **Protocolo Experimental**

Em duas cápsulas de porcelana, colocou-se 3 mL dos extratos alcoólico e hidroalcoólico, separadamente, e levou-os ao banho-maria até secura. Esfriou-se e umedeceu-se os resíduos com gotas de acetona. Adicionou-se alguns cristais do ácido bórico e do ácido oxálico. Evaporou-os em banho-maria até a secura, evitando aquecimento prolongado. Dissolveu-se os resíduos em 3 mL de éter etílico e observou-se sob a luz ultravioleta.

Fonte: http://www.sbfqnosia.org.br/Ensino/flavonoides_e_antocianinos.html

• **Reação com Hidróxido de Sódio** (Mouco; Bernardino; Cornélio, 2003)

➤ **Materiais**

Estante de tubo de ensaio

➤ **Reagentes**

Hidróxido de Sódio P.A., Vetec

➤ **Protocolo Experimental**

Em 2 tubos de ensaio foram adicionados 5,0 mg do extrato bruto alcoólico e hidroalcoólico, cada extrato em um tubo, diluído em 5,0 mL de água destilada, e em ambos tubos foram adicionadas duas gotas de hidróxido de sódio 5%. A coloração resultante foi observada visualmente.

• **Teste com [NP(difenilboriloxetilamina)/PEG (polietilenoglicol)]** (Rodrigues *et al.*, 2009)

➤ **Materiais**

Cromatofolha de sílica gel;

Câmara com lâmpada de luz ultravioleta;

➤ **Reagentes**

Difenilboriloxetilamina, Vetec;

Etanol P.A., Synth;
Metanol P.A., Synth;
Polietilenoglicol 4000, Vetec;

➤ **Protocolo Experimental**

Foram preparadas soluções de NP 1% em MeOH e PEG 5% em EtOH. Em uma placa cromatográfica foram feitos 4 círculos, 2 para cada extrato, para comparação do antes e depois. Passou-se, primeiramente, a solução de NP e, em seguida, passou-se a solução de PEG. Os resultados foram analisados sob a lâmpada de luz ultravioleta.

4.5.3.3. Determinação do Teor de Proantocianidinas Através de Análise Colorimétrica

- **Método da Butanolise** (Santos & Mello, 2003)

➤ **Materiais**

Balão volumétrico;
Pipeta volumétrica de 1,0 mL;
Tubo de hidrólise;
Termômetro;
Banho-maria;
Espectrofotômetro de Ultravioleta;

➤ **Reagentes**

Metanol P.A., Synth;
Ácido Clorídrico P.A., Synth;
Butanol P.A., Synth;

➤ **Protocolo Experimental**

5,0 mg do extrato em MeOH das folhas de *L. pisonis* foi solubilizado em 10,0 mL de MeOH (solução 0,5 mg/mL) em balão volumétrico. Com auxílio de uma pipeta volumétrica 1,0 mL dessa solução foi colocado em um tubo de hidrólise contendo 4,0 mL de solução 5% de HCl em BuOH. O tubo foi fechado e a mistura

reacional foi aquecida em banho Maria a 95°C por cerca de 2 h. Após esse período a mistura reacional foi resfriada e submetida à leitura em espectrofotômetro de ultravioleta a 540 nm, comparando-se os valores obtidos com os valores da solução inicial, ou seja, o extrato metanólico bruto.

- **Método da Vanilina Sulfúrica** (adaptado de Martins e Aquino, 2015; Queiroz *et al.*, 2001)

- **Materiais**

Balão volumétrico de 50, 100 e 200 mL;

Banho-maria;

Estante com tubos de ensaio;

Espectrofotômetro de ultravioleta;

Pipeta volumétrica de 1, 2, 5 e 10 mL;

- **Reagentes**

Água destilada;

Vanilina 2% em ácido sulfúrico 70%;

- **Protocolo Experimental**

Diluiu-se 20 mg do extrato alcoólico em 10 mL de água. Filtrou-se e adicionou-se 1,0 mL em um tubo de ensaio. A este sistema, adicionou-se 2 mL da solução de vanilina a 2% em ácido sulfúrico 70%. Aqueceu-se a solução em banho-maria a 50°C durante 15 minutos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de ultravioleta a 500 nm. Foi construída uma curva de calibração com a catequina nas concentrações de 10,20 a 25,50 µg/mL, completando o volume para 50 mL de água destilada. O mesmo procedimento da amostra foi seguido para a curva de calibração.

4.5.3.4. Avaliação da Atividade Antioxidante (adaptado de Zeraik, 2008)

- **Método da Redução do Betacaroteno**

- **Materiais**

Balão volumétrico de 10 mL;
Placa Cromatográfica;

- **Reagentes**

Betacaroteno, Sigma;
Diclorometano P.A., Synth;

- **Protocolo Experimental**

Preparou-se uma solução de betacaroteno (1mg/mL) em diclorometano. Em uma cromatoplaça foram divididas 4 áreas circulares, 2 áreas para cada extrato para fazer o comparativo entre o antes e o depois. Com um algodão, os círculos representando o depois foram umedecidos com a solução de betacaroteno. O resultado é dado como positivo caso a coloração amarela permanecesse, pelo menos, durante 2 horas.

4.4.3.5. Avaliação do Teor de Flavonoides Totais (Santos & Blatt, 1988)

- **Método do Cloreto de Alumínio**

- **Materiais**

Balão volumétrico de 50, 100 e 250mL;
Pipeta volumétrica de 1, 2, 5 e 10 mL;
Espectrofotômetro de Ultravioleta- visível;

- **Reagentes**

Cloreto de alumínio a 5%;
Metanol P.A., Synth;
Metanol a 70%;

- **Protocolo Experimental**

Para a avaliação do teor de flavonoides totais foi feita uma curva de calibração, variando as concentrações da rutina de 7 a 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (com exceção da concentração 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Foi acrescentada a solução 1 mL da solução de cloreto de alumínio (5,0 g de cloreto de alumínio em 100 mL de metanol), sendo o volume completado para 50 mL com metanol 70% (Figura 9). Após 30 min em repouso, foi realizada a leitura a 425 nm no espectrofotômetro de UV/ Visível. Foi preparada uma solução de concentração 13,3 mg/mL da amostra e completado o volume para 250 mL. Desta solução, foi pego uma alíquota de 15 mL, adicionado 1 mL de cloreto de alumínio e completado o volume para 50 mL com metanol 70%. Após 30 min em repouso, foi realizada a leitura no espectrofotômetro.

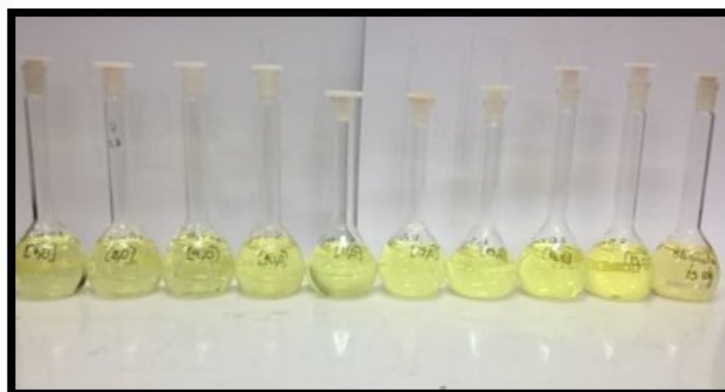


Figura 9. Alguns dos padrões da curva de calibração

O branco foi preparado com 70% metanol. O resultado da absorbância obtido foi comparado com a curva de calibração da rutina, de modo a poder determinar a concentração de flavonoides.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Testes para Identificação de Metabólitos Secundários

5.1.1. Triterpenos e Esteroides

- **Reação de Leibermann-Buchard**

A reação de Leibermann-Buchard permite a identificação do esqueleto esteroidal, segundo o mecanismo reacional proposto por Burke *et al.* (1974), demonstrado de acordo com a figura 10. Para a identificação de triterpenos e esteroides, é esperado uma mudança na coloração do extrato para uma cor próxima a violeta/azul (Burke *et al.*, 1974). Esta mudança na coloração é devida a formação do íon de carbono do 3,5 colestadieno, uma vez que o colesterol é o precursor de hormônios esteroides (Castro *et al.*, 2001). A reação para mudança na coloração é mostrada na figura 11. A ressonância estrutural envolvendo o carbono 5 é a responsável pela estabilização deste íon. Quando o colesterol é dissolvido, o OH é protonado, havendo uma reação de desidratação, gerando o íon. O aparecimento da coloração violeta/azul está relacionada com a formação de um derivado sulfônico que absorve em torno de $\lambda_{\max} = 410 \text{ nm}$ (Figura 10 e 11) (Burke *et al.*, 1974).

As amostras vindas dos extratos alcoólico (Figura 12, a) e hidroalcoólico (Figura 12, c) não alteraram sua coloração, sofrendo, apenas, uma intensificação da coloração amarela, que é sua cor natural.

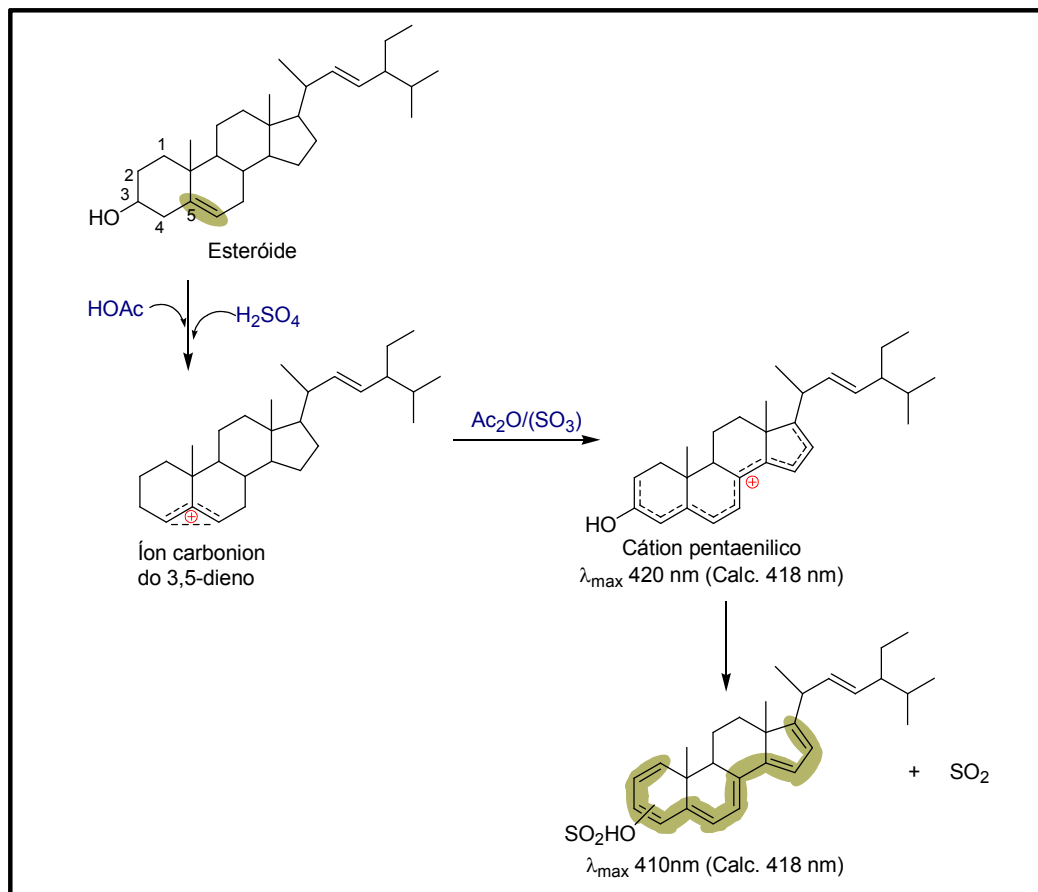


Figura 10. Mecanismo proposto para a reação de Liebermann-Buchard (Adaptado de Burke *et al.*, 1974)

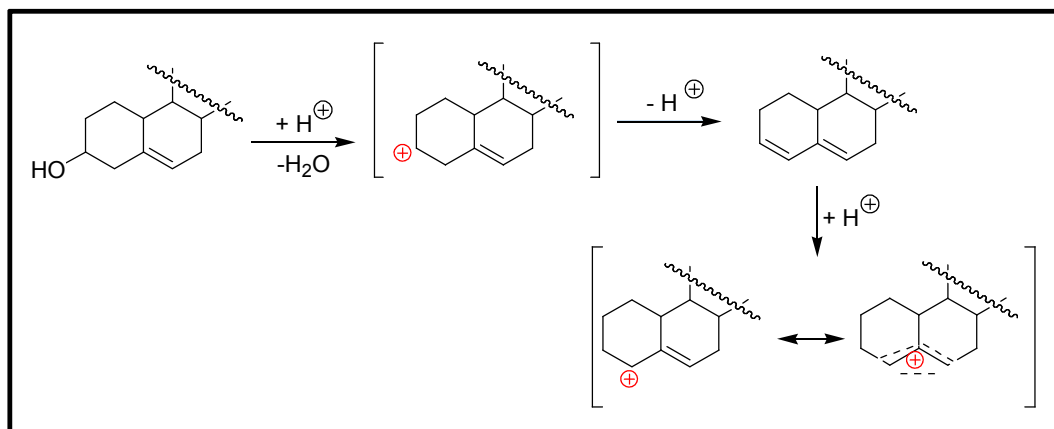


Figura 11. Precursor para a formação de cor na reação de Liebermann-Buchard (Adaptado de Burke *et al.*, 1974)

- **Reação de Salkowski**

Na reação de Salkowski, o teste é dado como positivo se houver a mudança na coloração para castanho-escuro-avermelhado (Regis, 2015).

No teste realizado, houve formação de fase e turbidez na parte inferior nas amostras vindas dos extratos alcoólico (Figura 12, b) e hidroalcoólico (Figura 12, d) ao ser diluídas em clorofórmio. Porém, após ser acrescentado o ácido sulfúrico concentrado, somente a amostra d permaneceu turva. Uma vez que a coloração destas amostras não foi alterada, o resultado para esta reação foi negativo, indicando ausência de triterpenos e esteroides.



Figura 12. Reação de Liebermann-Buchard para os extratos (a) alcoólico e (c) hidroalcoólico; Reação de Salkowski para os extratos (b) alcoólico e (d) hidroalcoólico

Abaixo, a Tabela 3 resume os resultados obtidos para a identificação de triterpenos e esteroides.

Tabela 3. Resultado dos testes para Triterpenos e Esteroides dos extratos alcoólico e hidroalcoólicos das folhas de *L. pisonis*

Teste/Reação	Extrato MeOH	Extrato MeOH/H ₂ O
Liebermann-Buchard	Negativo	Negativo
Salkowski	Negativo	Negativo

5.1.2. Fenólicos Totais e Flavonoides em Geral

- **Reação de Shinoda**

A reação de Shinoda (Figura 13) se baseia na oxidação do magnésio e é muito utilizada para a identificação qualitativa de flavonoides como, por exemplo, flavononas e flavonas. A coloração rósea-avermelhada é indicativa da presença de flavononas enquanto a coloração laranja é indicativa da presença de flavonas. É também uma reação onde há liberação do gás hidrogênio, como observado na Figuras 13 e 14 (Mouco *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2007). Para esta reação, o teste com o extrato alcoólico foi positivo, obtendo-se coloração avermelhada, indicando a presença de flavononas, enquanto que para o extrato hidroalcoólico o teste foi negativo, pois obteve-se coloração amarela.

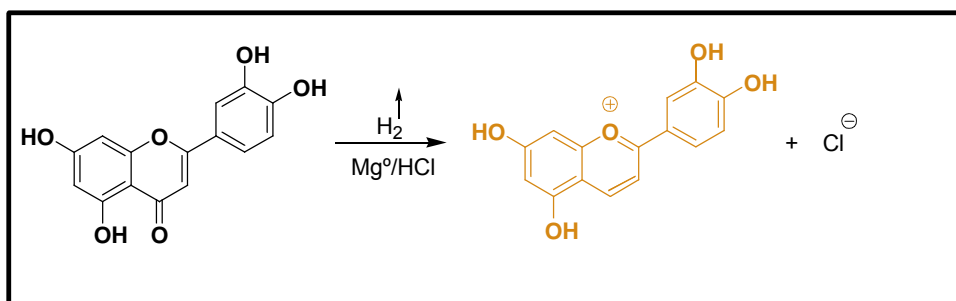


Figura 13. Reação de Shinoda

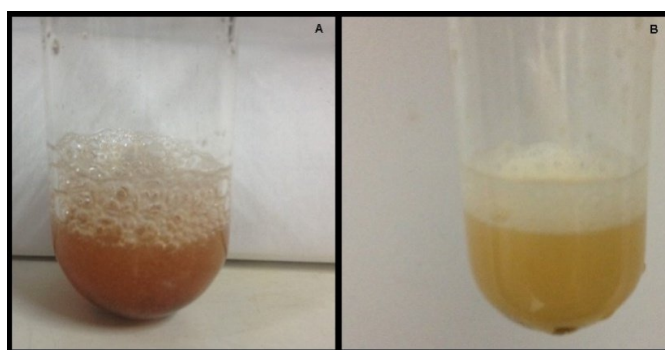


Figura 14. Reação de Shinoda para os extratos (a) alcoólico e (b) hidroalcoólico

- **Reação com cloreto de alumínio**

A reação com cloreto de alumínio identifica a presença de flavonoides em geral através da fluorescência em presença da luz ultravioleta, sendo o cloreto de alumínio o componente responsável por intensificar esta fluorescência, já que os cátions Al^{+3} formam complexos estáveis com as hidroxilas presentes nos flavonoides, aumentando o sistema conjugado (Buriol *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2002; Mouco *et al.*, 2003).

De acordo com a Figura 15, pode-se verificar a presença de flavonoides nos extratos trabalhados. Por medida de comparação, foi feito o teste também para o flavonoide rutina. A Figura 17 mostra a reação entre o flavonoide e o cloreto de alumínio.

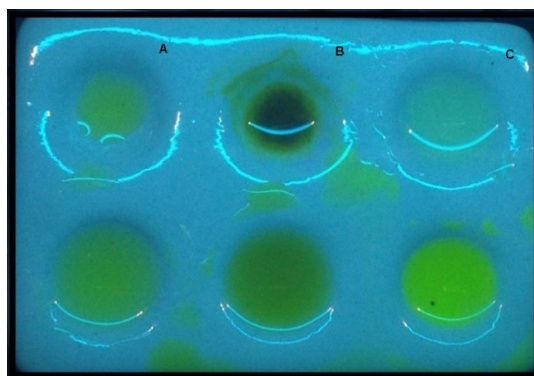


Figura 15. Reação com Cloreto de Alumínio. (a) Extrato Hidroalcoólico; (b) Extrato Alcoólico; (c) Padrão Rutina

- **Reação com cloreto férrico**

A reação com cloreto férrico possibilita identificar a presença de substâncias fenólicas através da mudança de coloração que pode variar entre violeta, azul, verde e amarelo-castanho, dependendo do tipo de substância fenólica (Mouco *et al.*, 2003).

Por razão de comparação, também foi feito o teste em uma amostra de rutina. Ao acrescentar o $FeCl_3$, ocorreu mudança de coloração e formação de precipitado azul escuro. De acordo com a Figura 16, pode-se verificar a

presença de substâncias fenólicas nos extratos alcoólico e hidroalcoólico, e na Figura 17, pode-se observar a reação entre o flavonoide e o cloreto férrico.

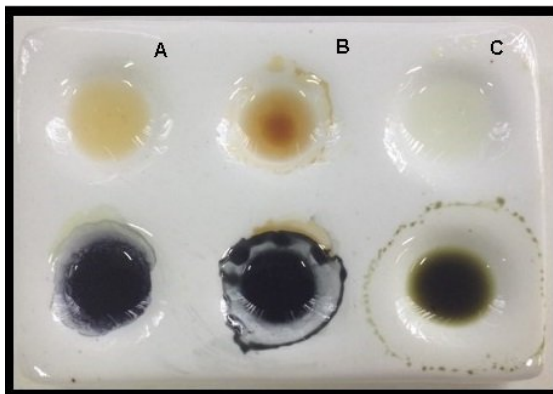


Figura 16. Reação com Cloreto Férrico. (a) Extrato Hidroalcoólico; (b) Extrato Alcoólico; (c) Padrão Rutina

A Figura 16 mostra a reação genérica envolvendo o flavonoide e o cloreto férrico.

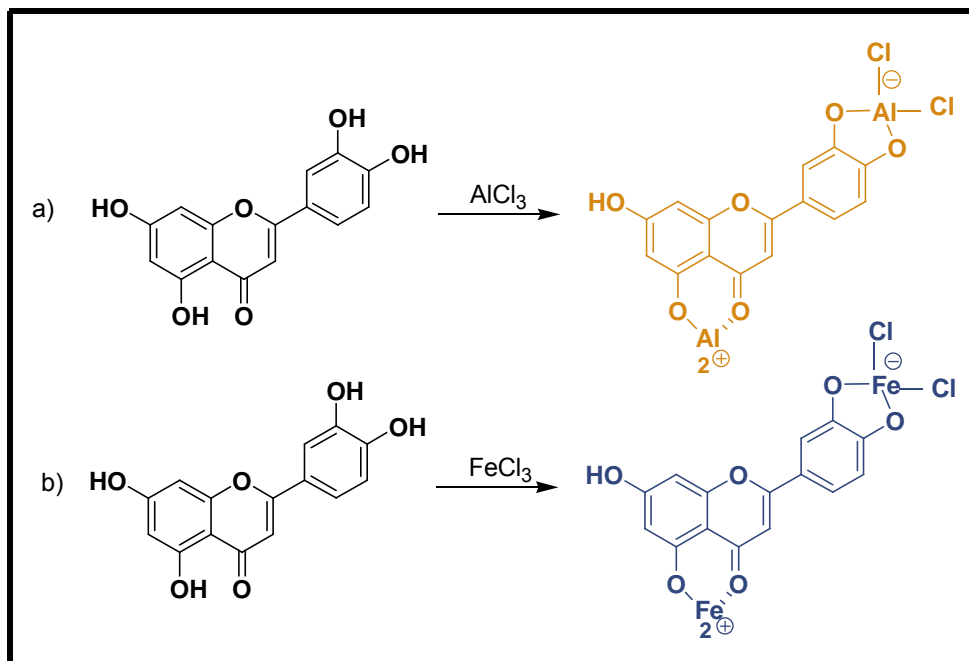


Figura 17. Complexo: a) flavonóide-Al; b) flavonóide-Fe

- **Reação de Taubouk**

A reação de Taubouk é realizada para a identificação de flavonoides e é dada como positiva caso haja o aparecimento da coloração amarelo-esverdeado fluorescente (Sociedade Brasileira de Farmacognosia, 2015).

De acordo com as Figuras 18 e 19, o resultado para o teste foi positivo.



Figura 18. Reação de Taubouk para o extrato hidroalcoólico

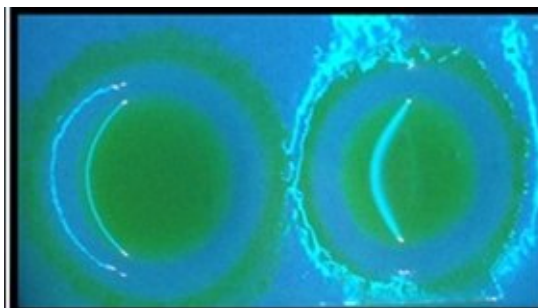


Figura 19. Reação de Taubouk para o extrato alcoólico realizada em duplicata após visualização no UV (aparecimento de fluorescência)

- **Reação com Hidróxido de sódio**

A reação com hidróxido de sódio também é empregada para a identificação da presença de flavonoides em geral, por reagir desenvolvendo a coloração amarela. (Mouco *et al.*, 2003). O NaOH é uma base forte e em contato com o flavonóide é capaz de ionizar todas as hidroxilas presentes

causando um desvio batocrômico seguido de um efeito hipercrômico no espectro na região do UV de um flavonoide (Figura 20).

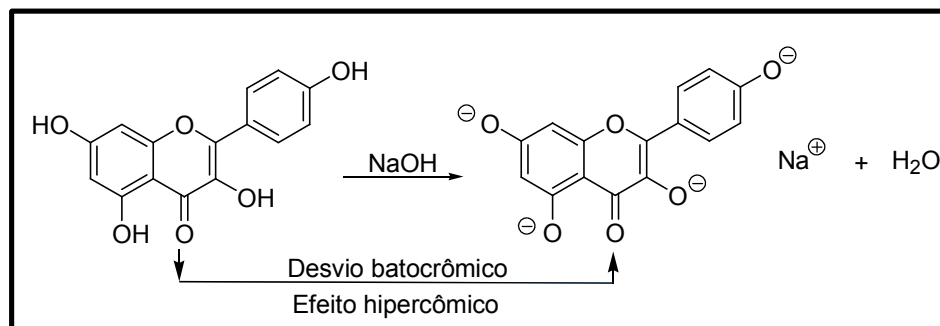


Figura 20. Ionização das hidroxilas do flavonóide em presença de NaOH aquoso

Como pode ser observado através da Figura 21, ambos os extratos intensificaram sua coloração (efeito hipercrômico), obtendo-se resultado positivo para esta reação. Quanto maior a intensificação da coloração maior a presença de grupos hidroxilas ionizáveis.



Figura 21. Reação com Hidróxido de sódio. (a) e (c) extratos hidroalcoólico e alcoólico antes da reação, respectivamente; (b) e (d) extratos hidroalcoólico e alcoólico após a reação, respectivamente.

- **Teste com [NP(difenilboriloxietilamina)/PEG (polietilenoglicol)]**

Teste químico cuja característica é a intensificação da absorção da luz ultravioleta por flavonoides em geral. Este teste foi positivo para ambos os extratos.

Os resultados obtidos para a identificação de fenólicos totais e flavonoides estão resumidos na tabela 4.

Tabela 4. Resultado dos testes para Fenólicos totais e Flavonoides dos extratos alcoólico e hidroalcoólico das folhas de *L. pisonis*

Teste/Reação	Extrato MeOH	Extrato MeOH/H ₂ O
Shinoda	Positivo	Negativo
AlCl ₃	Positivo	Positivo
FeCl ₃	Positivo	Positivo
Reação de Taubouk	Positivo	Positivo
Reação com Hidroxido de Sódio	Positivo	Positivo
NP/PEG	Positivo	Positivo

5.1.3. Identificação de Proantocianidinas

- **Método da Butanólise**

Para a identificação de proantocianidinas pelo método da butanólise, é esperado um deslocamento da banda em 540 nm após tratamento com ácido, através de uma reação colorimétrica (Santos & Mello, 2003).

O produto desta reação é a formação quantitativa de antocianidinas, resultante da quebra das ligações entre as flavonas pelo ácido. Essas substâncias possuem coloração avermelhada, cuja densidade óptica é proporcional a quantidade de proantocianidinas nas amostras, de acordo com a Lei de Lambert-Beer.

Após o tempo de reação em banho-maria, a amostra não desenvolveu mudança de coloração, e como pode ser percebido através da Figura 22, não houve deslocamento nesta região para o extrato metanólico, mas sim na região de 660 nm. Pode ter ocorrido a protonação da molécula, mas não sua quebra.

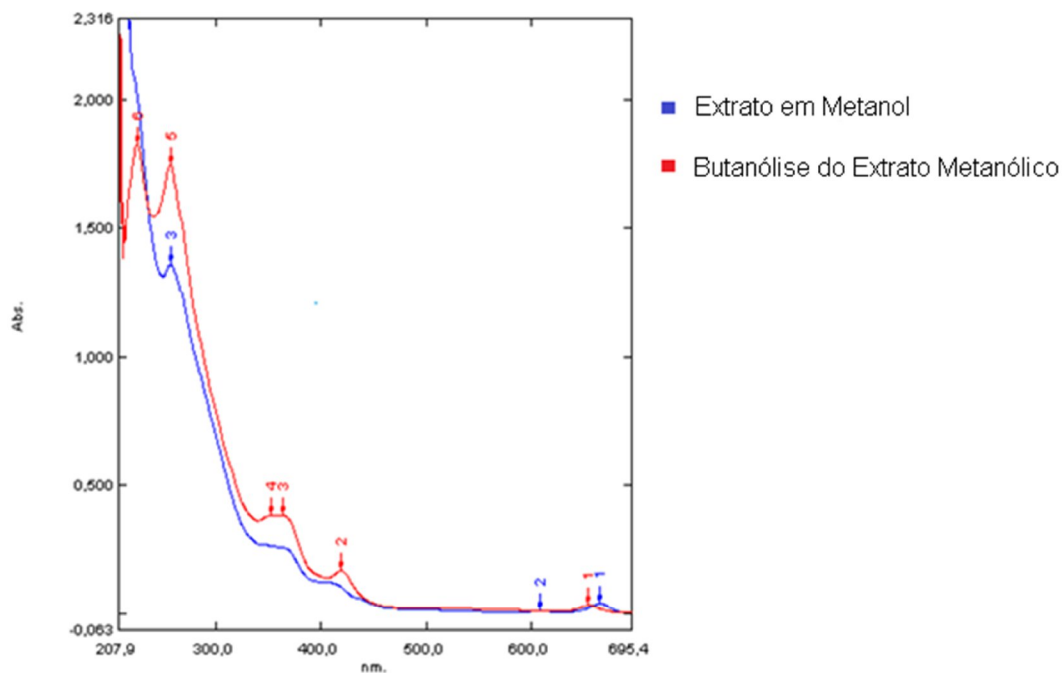


Figura 22. Sobreposição dos Espectros de UV para o método da butanolise.

Abaixo, a Tabela 5 resumindo o resultado obtido para a identificação de proantocianidinas.

Tabela 5. Resultado do teste para proantocianidinas do extrato alcoólico das folhas de *L. pisonis* pelo método da Butanolise

Teste/Reação	Extrato MeOH	Extrato MeOH/H ₂ O
Método da butanolise	Negativo	-

5.1.4. Atividade Antioxidante

- **Método da redução do betacaroteno**

O carotenoide betacaroteno tem a capacidade de oxidar-se na presença de luz. Desta forma, ele é utilizado para avaliação da capacidade antioxidante de substâncias presentes na amostra caso haja um impedimento de sua oxidação (Zeraik *et al.*, 2008).

Quando a solução de betacaroteno foi aplicada sobre a área onde não haviam os extratos, na presença de luz, iniciou-se o processo de oxidação, percebido pela descoloração da placa cromatográfica. Porém quando aplicada sobre os extratos, a coloração amarela permaneceu por mais de 2 horas, evidenciando a presença de substâncias antioxidantes nos extratos (Figura 23) (Zeraik *et al.*, 2008).

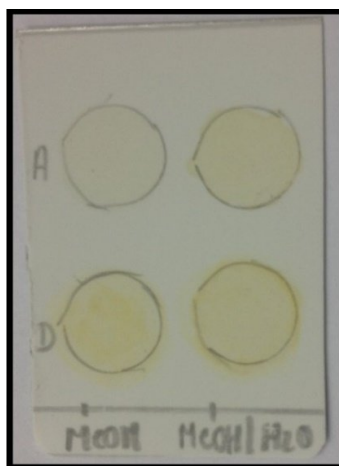


Figura 23. Antes (A) e depois (D) da redução do betacaroteno para os extratos alcoólico e hidroalcoólico

Abaixo, a Tabela 6 resumindo o resultado obtido para a identificação de substâncias antioxidantes.

Tabela 6. Resultado do teste para atividade antioxidante dos extratos alcoólico e hidroalcoólico das folhas de *L. pisonis*

Teste/Reação		Extrato MeOH	Extrato MeOH/H ₂ O
Método da redução do Betacaroteno		Positivo	Positivo

5.2. Determinação de Proantocianidinas (taninos condensados) pelo Método da Vanilina Sulfúrica

A curva de calibração para a determinação de proantocianidinas apresenta-se no Gráfico 1. Através dele, pode-se obter a equação da reta $y = 0,0297x + 0,201$ com o coeficiente de linearidade $R^2 = 0,9967$.

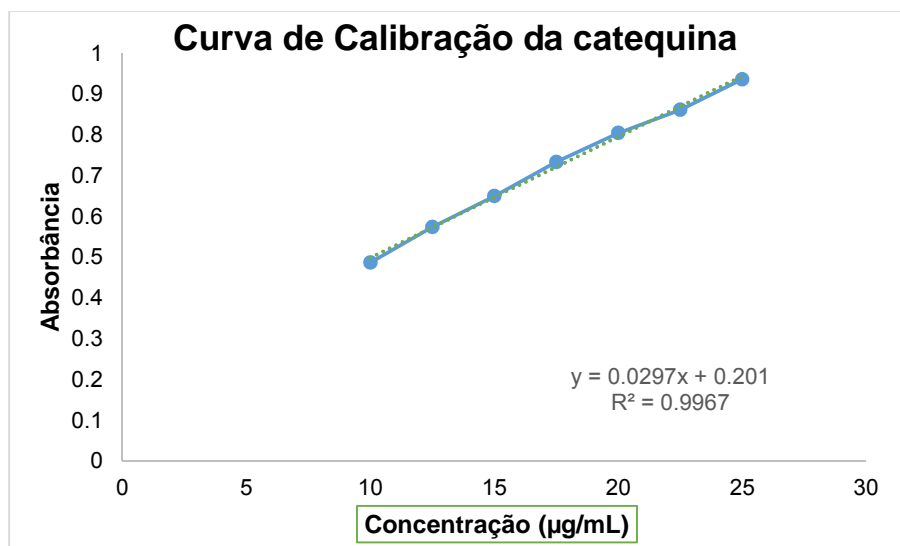


Gráfico 1. Curva de calibração da catequina (padrão)

Posterior a obtenção da curva de calibração para o padrão de catequina, foi realizada a medida da absorbância do extrato metanólico com leitura em triplicata. Os resultados estão expostos na Tabela 7.

Tabela 7. Resultado das absorvâncias obtidas para o extrato alcoólico no teste de determinação de Proantocianidinas

Extrato MeOH	Absorbância
1	0,715
2	0,715
3	0,715

Utilizando a equação da reta obtida na curva de calibração com a catequina e o valor médio das absorvâncias encontradas para o extrato alcoólico, foi possível determinar a concentração de proantocianidinas presentes neste extrato. Esta concentração foi de 17,31 µg/mL ou 8,655 mg/g de extrato.

O Gráfico 2 inclui os padrões de catequina e a amostra do extrato alcoólico, relacionando a absorvância com a concentração de proantocianidinas em cada análise.

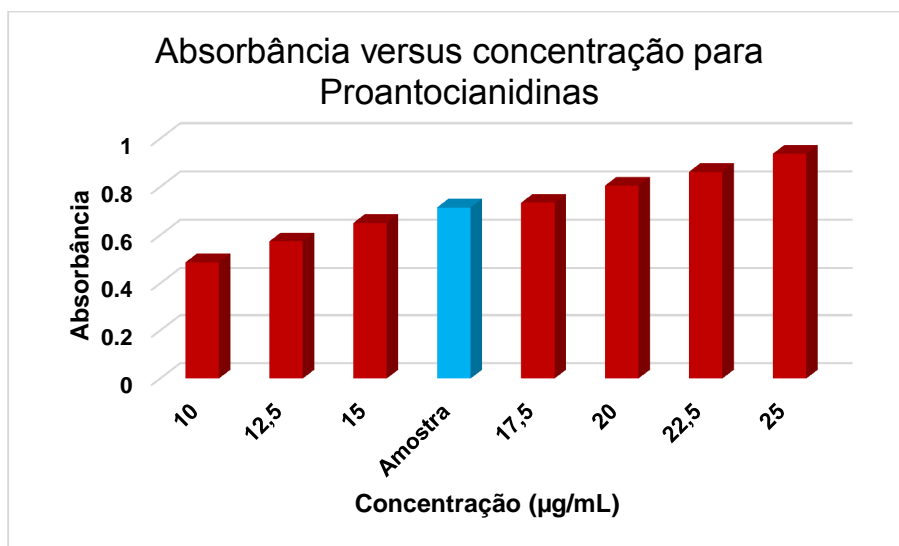


Gráfico 2. Absorbância versus Concentração de Proantocianidinas no extrato alcoólico de *L. pisonis*

A Figura 24 mostra a reação entre a vanilina e a proantocianidina, adaptado de Moraes *et al.* (2009).

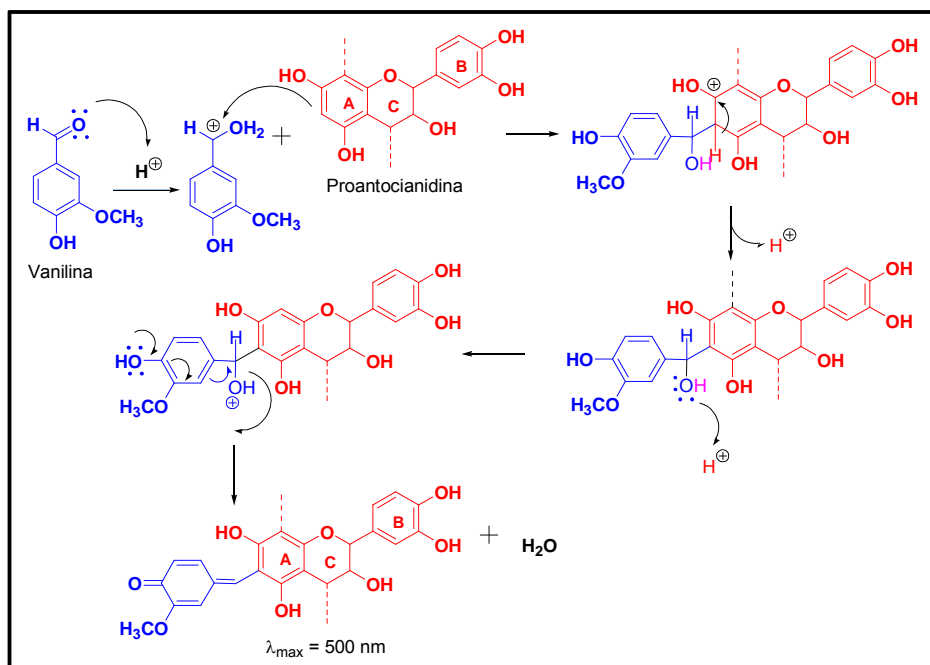


Figura 24. Reação da vanilina com o anel A da proantocianidina (Adaptado de Moraes *et. al.*, 2009).

5.3. Avaliação do Teor de Flavonóides Totais

Para a medida do teor de flavonoides totais das folhas de *L. pisonis*, inicialmente construiu-se uma curva de calibração (Gráfico 3) de diferentes concentrações do padrão de rutina *versus* absorvância e em seguida calculou-se a equação da reta ($y = 0,0212x + 0,015$) e seu coeficiente de linearidade ($R^2 = 0,9961$).

Posterior a obtenção da curva de calibração para o padrão de rutina, realizou-se a medida da absorvância do extrato metanólico com leitura feitas em triplicata. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Com a equação da reta obtida na curva de calibração com o padrão rutina e o valor médio das absorvâncias encontradas para o extrato alcoólico, determinou-se a concentração de flavonoides totais presentes no extrato. Esta concentração foi equivalente a 15,8 $\mu\text{g/mL}$ ou 6,583 mg/g de extrato seco.

O Gráfico 4 foi construído de forma a relacionar a absorvância e concentração da amostra do extrato alcoólico com os padrões de rutina.

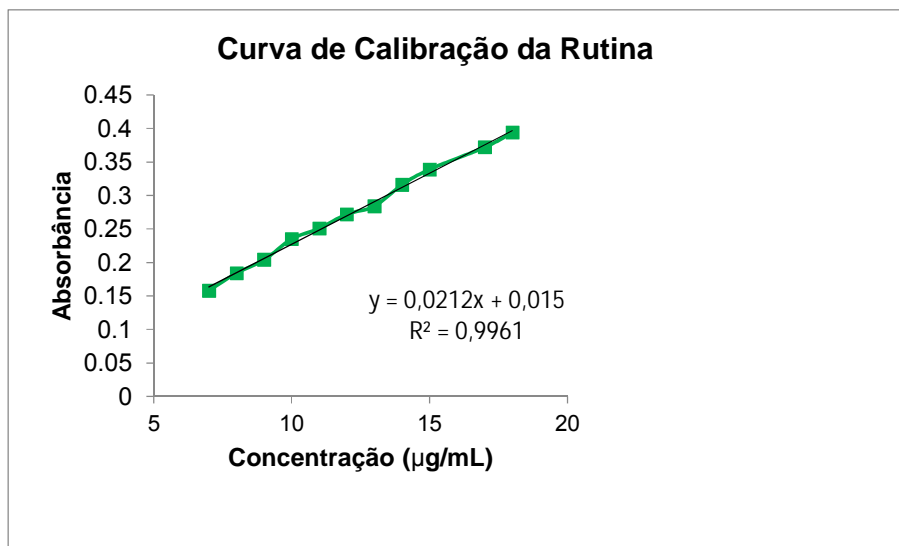


Gráfico 3. Curva de calibração da rutina (padrão)

Tabela 8. Resultado das absorvâncias obtidas para o extrato alcoólico na avaliação do teor de flavonoides totais

Extrato MeOH	Absorvância
1	0,350
2	0,344
3	0,349

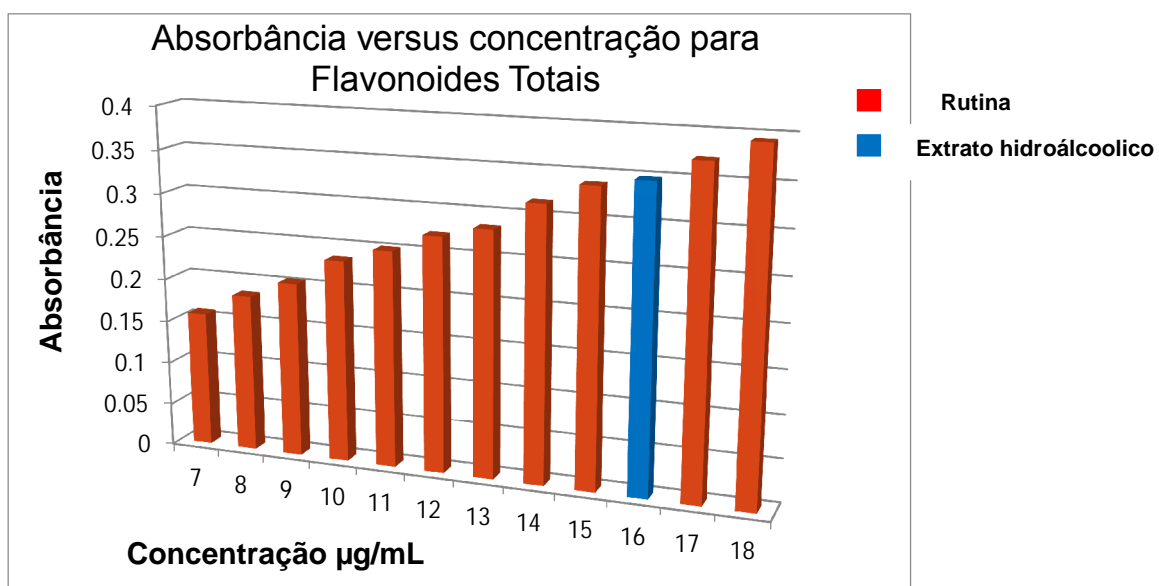


Gráfico 4. Absorbância versus concentração para flavonoides totais do extrato hidroalcoólico de *L. pisonis*

5.4. Identificação dos Metabólitos Isolados oriundo da extração com o aparelho Clevenger

A destilação por arraste a vapor não forneceu óleo essencial. O hidrolato foi extraído com CH_2Cl_2 e analisado por CG-EM, não revelando a presença de componentes voláteis. Entretanto, na fase aquosa residual foram encontrados metabólitos fenólicos, os quais foram analisados e identificados como os sólidos LPM-01 e LPM-02.

5.4.1. Substância LPM-01

A substância LPM-01 (sólido cristalino, incolor e inodoro; 54,3 mg), solúvel em MeOH.

Foi obtida através do sobrenadante 1, vindo das folhas recém retiradas de *L. pisonis*, que sofreu três sucessivas precipitações forçadas com o solvente CH_2Cl_2 .

Análise da substância através de CCDA em cromatoplaça de sílica gel apresentou uma única mancha.

O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) apresentou banda larga e forte em 3460 cm^{-1} relativa a deformação axial do grupo hidroxila (OH); $1545 - 1610\text{ cm}^{-1}$ relativa a deformação axial de ligação C-C de anel aromático e $1030 - 1265\text{ cm}^{-1}$ relativa a deformação da ligação C-O de fenol (Ar-C-O). Além dessas absorções o espectro também apresentou absorções intensas a 1317 cm^{-1} relativas ao estiramento de ligação C-O (carbinólico) e a $1658,0\text{ cm}^{-1}$ relativa a deformação axial de grupo carbonila (C=O) (Figura 25, p. 45).

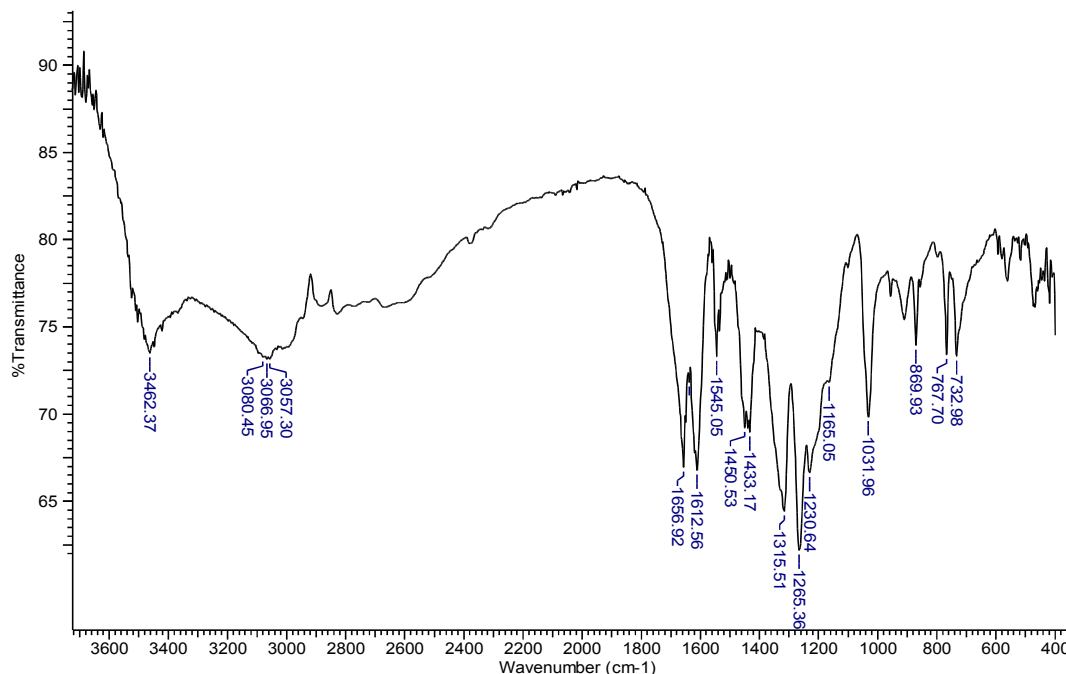


Figura 25. Espectro absorção na região do infravermelho (KBr) da substância LPM-01

Os dados de deslocamento químico obtidos no espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD) da substância LPM-01 confirmam as informações obtidas no espectro de IV sobre o caráter aromático da substância (sinais entre 110,46 – 146,46 δ). Nele pode se observar um sinal a 170,57 δ relativo a um substituinte carbonila (Figura 27, p. 47).

O conjunto de dados observados no espectro de RMN ^{13}C associados a presença de um sinal simples intenso a 7,07 δ no espectro de RMN ^1H e um sinal no espectro de correlação heteronuclear (HMQC), relativa a correlação existente entre os hidrogênios a 7,07 δ e os carbonos a 110,46 δ e também a maior intensidade do sinal a 110,66 δ e 146,46 δ , sugerem a existência de simetria no anel aromático, que apresenta somente um carbono metílico e quatro carbonos não hidrogenados (Figuras 26 e 27; p. 46 e 47).

Esses resultados também puderam ser confirmados observando-se o espectro de correlação heteronuclear (HMBC) onde se verifica a existência de

correlação entre os cinco carbonos da molécula com o sinal dos hidrogênios a 7,07δ (Figura 29; p. 49).

O espectro de massas da substância LPM-01, obtido via inserção direta e ionização por impacto de elétron a 70 eV (Figura 30, p. 49) apresentou pico do íon molecular a m/z 170 ($M^{+\bullet}$). Os fragmentos a m/z 153 ($M^{+\bullet} - 17$) relativo a perda de HO^{\bullet} e o fragmento a m/z 125 ($M^{+\bullet} - 17; -28$) relativo a perda concomitante de HO^{\bullet} e de um fragmento neutro CO (Figura 31, p. 50), confirmam as observações verificadas nos espectros de IV e RMN 1H e ^{13}C .

O conjunto de dados espectrais obtidos para a substância LPM-01, associado aqueles observados na literatura (Moura *et al.*, 2011) possibilitaram a identificação da substância como sendo o ácido gálico (Figura 32; Tabela 9).

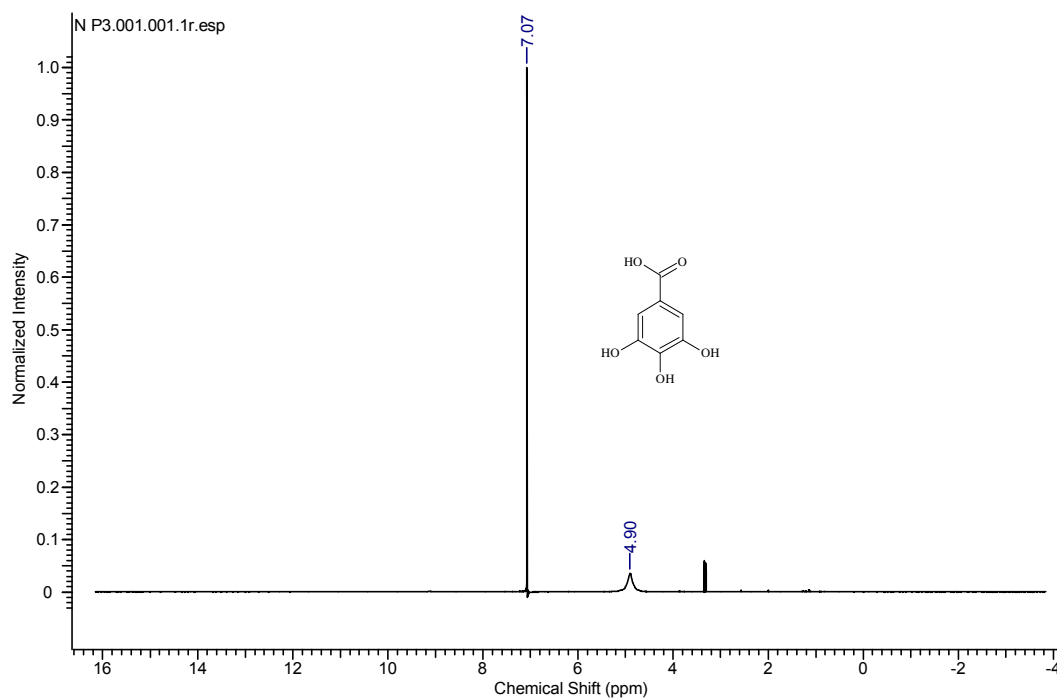


Figura 26. Espectro de RMN 1H da substância LPM-01 (500 MHz, MeOD)

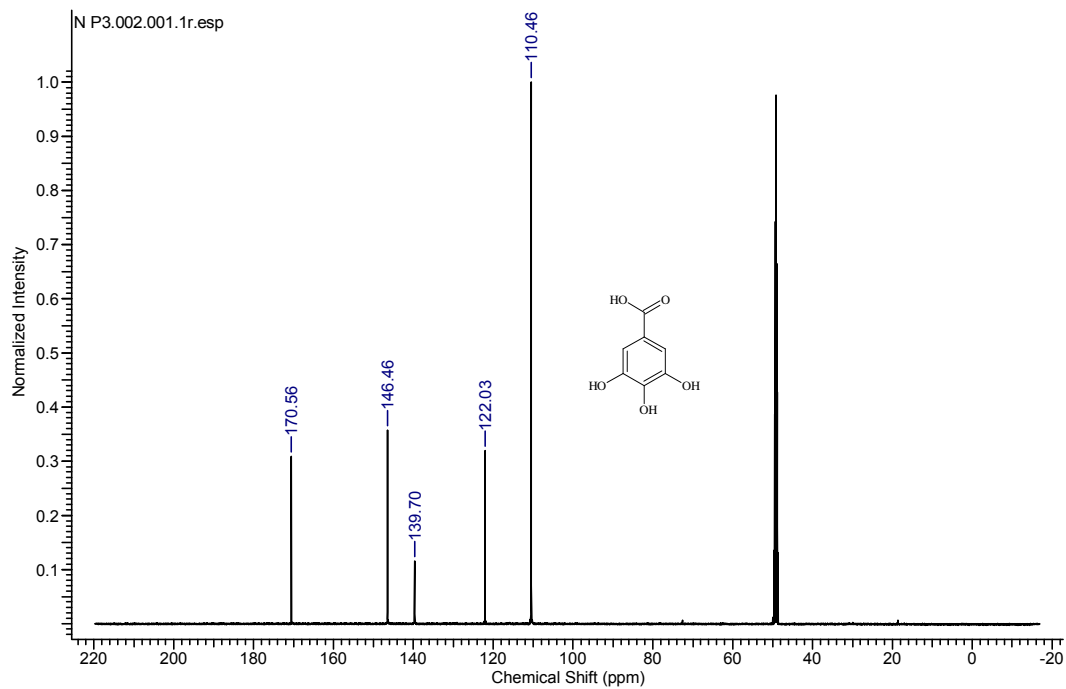


Figura 27. Espectro de RMN ¹³C da substância LPM-01 (125 MHz, MeOD)

N P3.200.001.2rr.esp

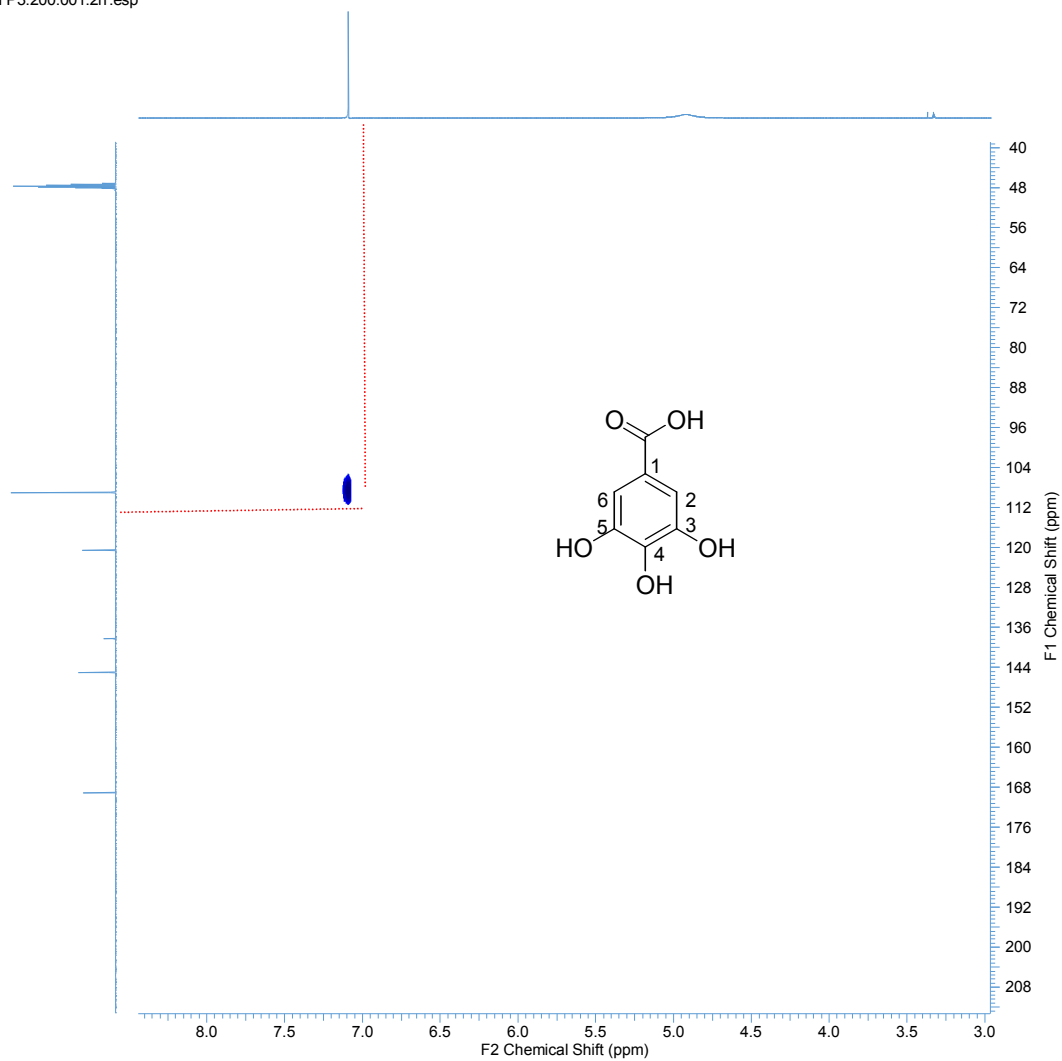


Figura 28. Espectro de RMN de correlação heteronuclear, $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância LPM-01 (500 MHz, MeOD)

N P3.302.001.2rr.esp

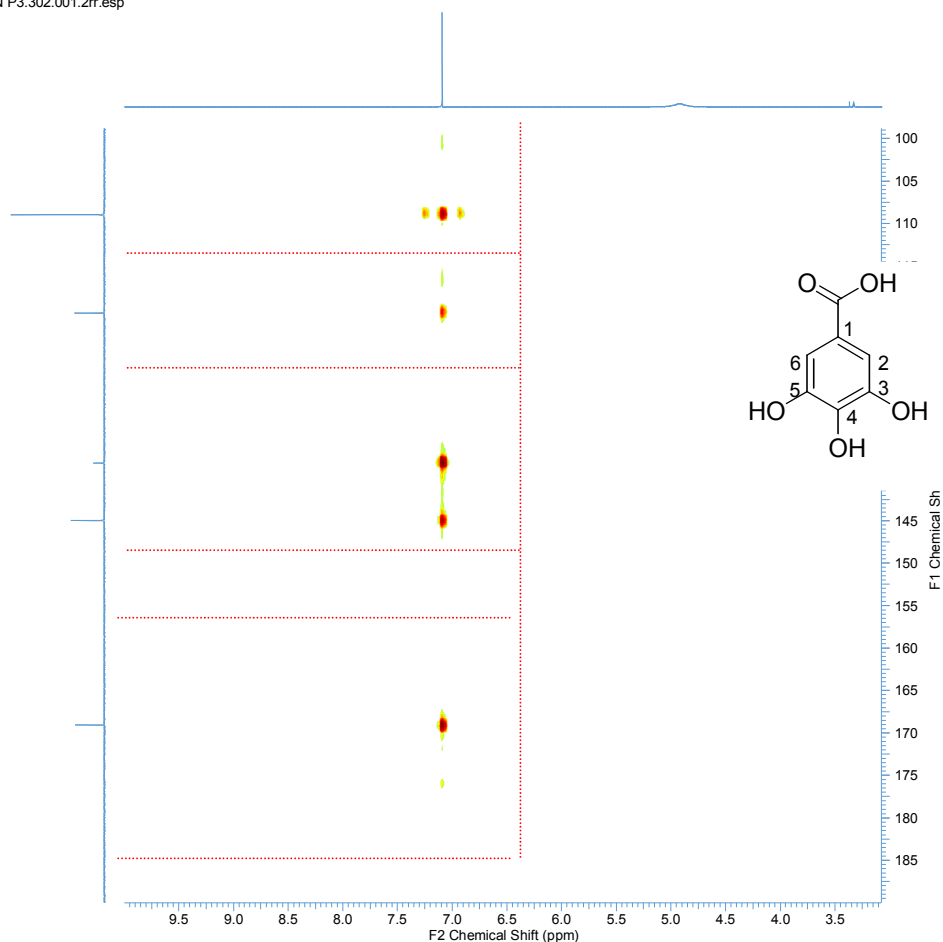


Figura 29. Espectro de RMN de correlação heteronuclear, $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância LPM-01 (500 MHz, MeOD)

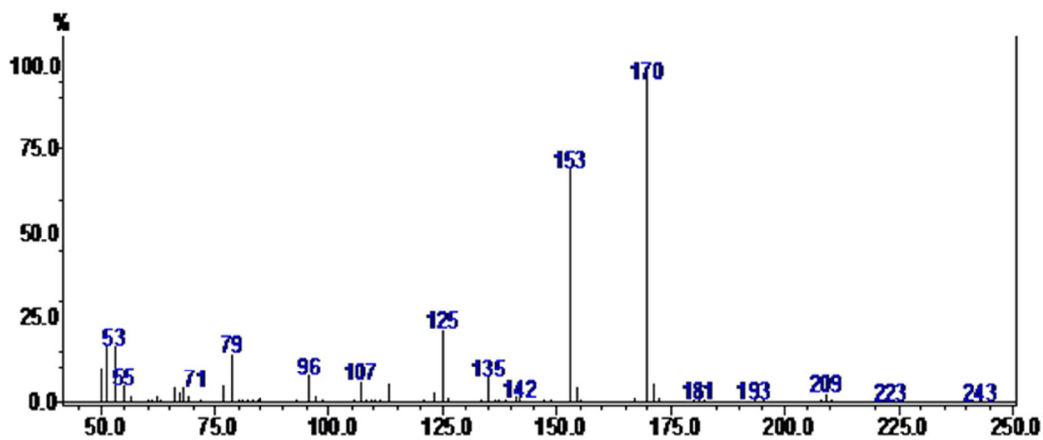


Figura 30. Espectro de massas da substância LPM-01 obtido via inserção direta e Ionização por impacto de elétron 70 eV

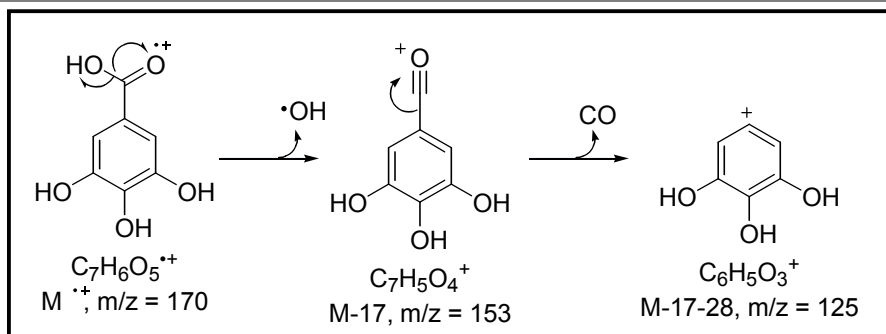


Figura 31. Fragmentos do íon molecular do ácido gálico

Tabela 9. Deslocamentos químicos de RMN 1H e ^{13}C (500, 125 MHz; MeOD) da substância LPM-01

Substância LPM-01					Ácido gálico* (DMSO- d_6)	
C	HMQC		HMBC		δ_C	δ_H
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$		
1	122,03				120,7	
2	110,66	7,07 (s)			108,8	6,92
3	146,46		C-3; H-2		145,4	
4	139,70			C-4; H-2	138,0	
5	146,46		C-5; H-6		145,4	
6	110,66	7,07 (s)		C-4; H-6	108,8	6,92
1'	170,56			C-7; H2/H6	167,6	

*Referencia: Moura *et al.*, 2011

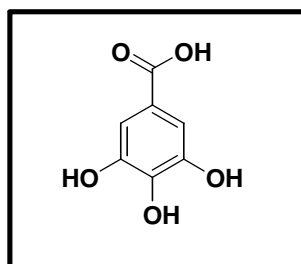


Figura 32. Estrutura da substância LPM-01 (ácido gálico)

5.4.2. Substância LPM-02

A substância LPM-02 (4,4 mg) foi obtida a partir do extrato aquoso das folhas recém coletadas de *L. pisonis*, como um sólido amarelo pouco solúvel em metanol e solúvel em dimetilsulfóxido.

Ela foi obtida a partir da precipitação da fração em AcOEt (280,8 mg) com AcOEt, vinda do extrato aquoso das folhas recém retiradas de *L. pisonis*.

O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) da substância LPM-02 apresentou banda larga em 3460 cm^{-1} relativa a deformação axial do grupo hidroxila (OH); $1570 - 1620\text{ cm}^{-1}$ relativa a deformação axial de ligação C-C de anel aromático e $1051 - 1186\text{ cm}^{-1}$ relativa a deformação da ligação C-O de fenol (Ar-C-O). Além dessas absorções o espectro também apresentou absorções intensas a 1332 cm^{-1} relativas ao estiramento de ligação C-O (carbinólico) e a 1712 cm^{-1} relativa a deformação axial de grupo carbonila (C=O) (Figura 33, p. 51).

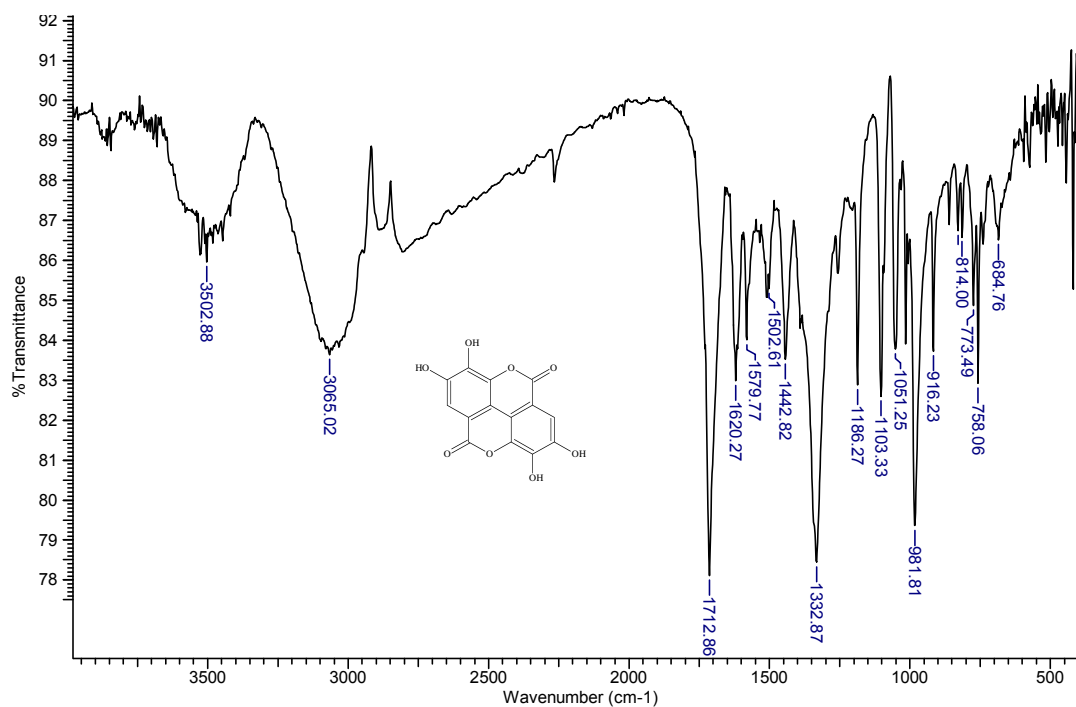


Figura 33. Espectro absorção na região do infravermelho (KBr) da substância LPM-02

O espectro de RMN¹H da substância apresentou um sinal simples a 7,4δ (Figura 34, p. 53), enquanto que o de RMN¹³C (APT) apresentou sinais entre 106,85 δ – 159,32 δ sugerindo a presença de anel aromático substituído por carbonila de éster (sinal a 159,32 δ) (Figura 35, p.53).

O espectro de correlação heteronuclear a uma ligação HMQC, mostrou no espectro de ¹H um único sinal intenso em 7,40 δ em correlação com o sinal a 109,86 δ no espectro de ¹³C (Figura 36, p. 54). Essa observação sugere tratar-se de uma substância com apenas um carbono metínico e o restante quaternário. O espectro de correlação heteronuclear a longa distância, HMBC, mostrou a existência de correlação do hidrogênio com todos os carbonos da molécula. A análise dos dados de RMN sugere trata-se de uma molécula simétrica, possuindo dois carbonos metínicos equivalentes (C-5/C-5") e seis pares de carbonos quaternários equivalentes (C1/C1'; C-2/C-2'; C-3/C-3'; C-4/C-4'; C-6/C-6' e C-7/7') (Moura *et al.*, 2011; Tabela 10, p.57).

O espectro de massas da substância LPM-02, obtido via inserção direta e ionização por impacto de elétron a 70 eV (Figura 39, p. 57) apresentou pico do íon molecular a *m/z* 302 (M⁺), compatível com a fórmula molecular C₁₄H₆O₈ que confirma as observações verificadas nos espectros de IV e RMN ¹H e ¹³C.

O conjunto desses dados associados com aqueles obtidos na literatura (Carvalho *et al.*, 1998) permitiram identificar a substância LMP-02 como sendo a molécula simétrica do ácido elágico (Figura 40, p.58).

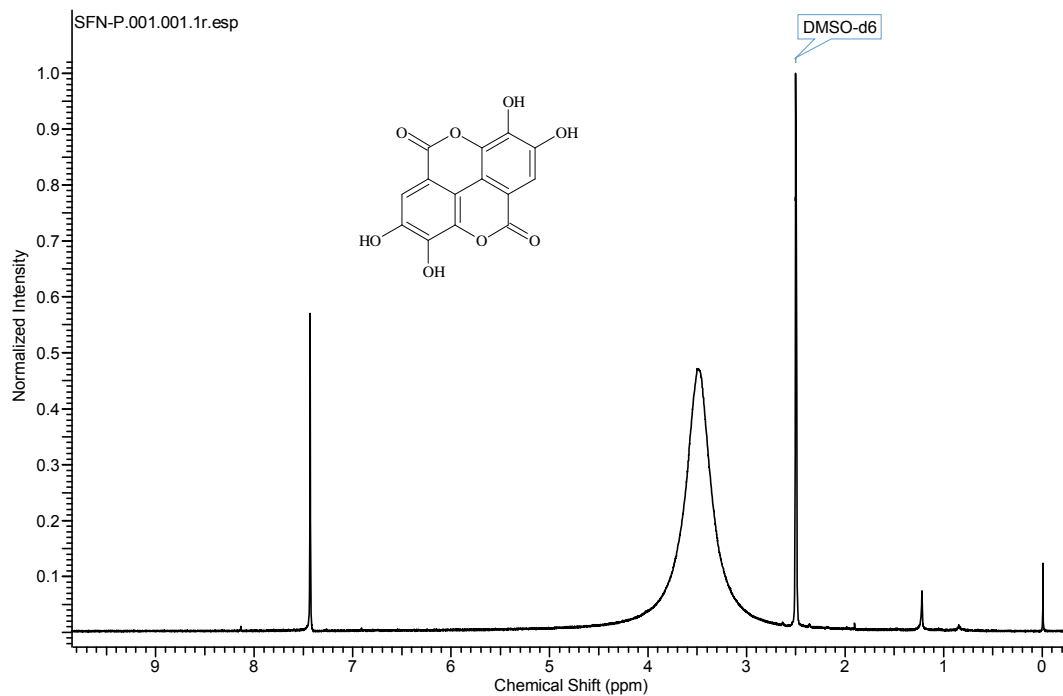


Figura 34. Espectro de RMN ^1H da substância LPM-02 (500 MHz, DMSO)

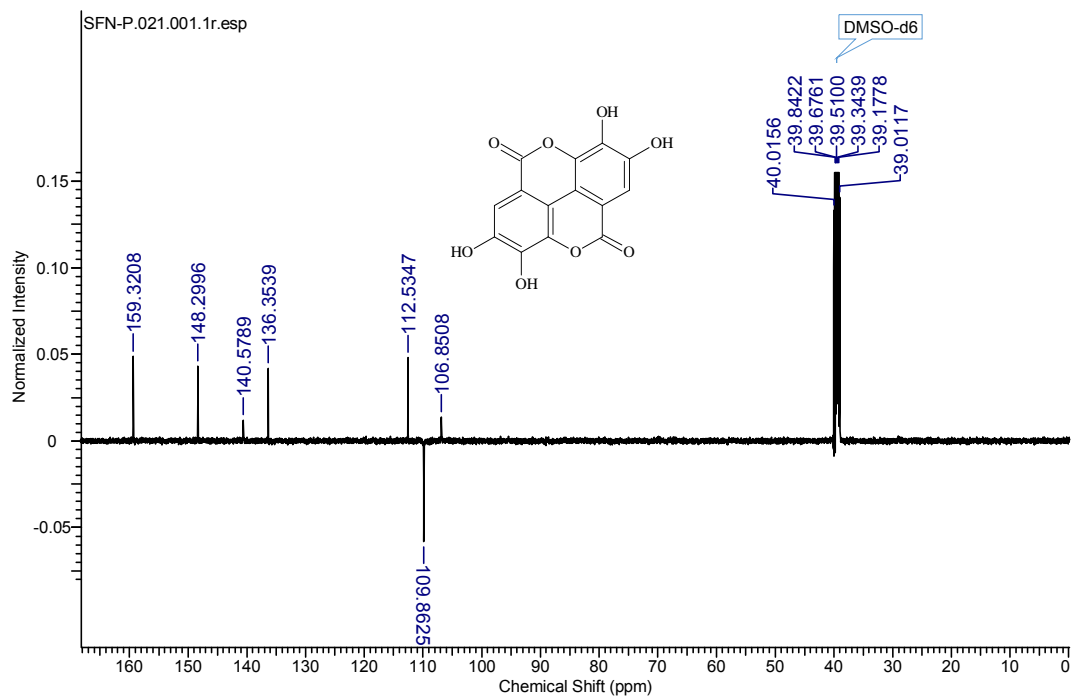


Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C (APT) da substância LPM-01 (125 MHz, DMSO)

SFN-P.200.001.2rr.esp

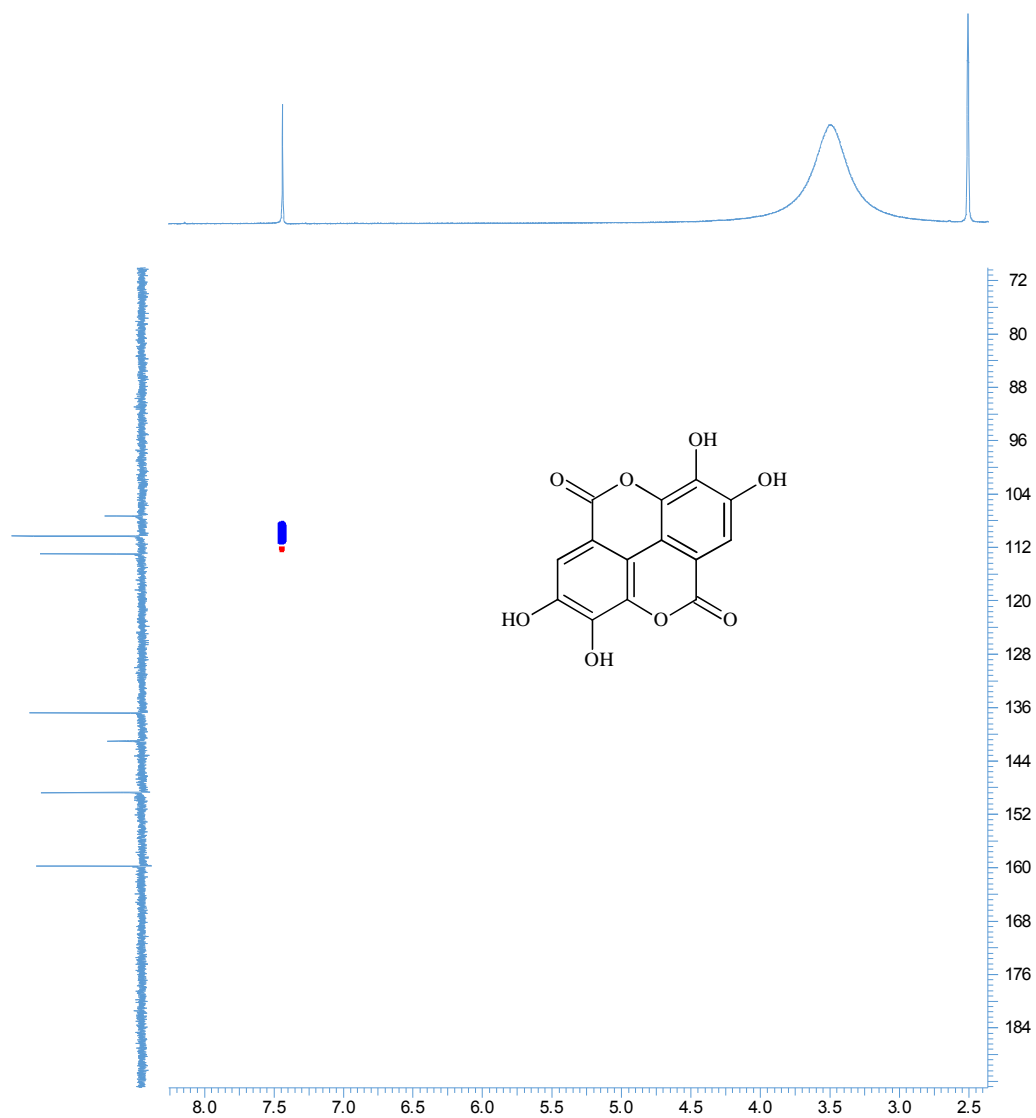


Figura 36. Espectro de RMN de correlação heteronuclear, $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância LPM-01 (500 MHz, DMSO)

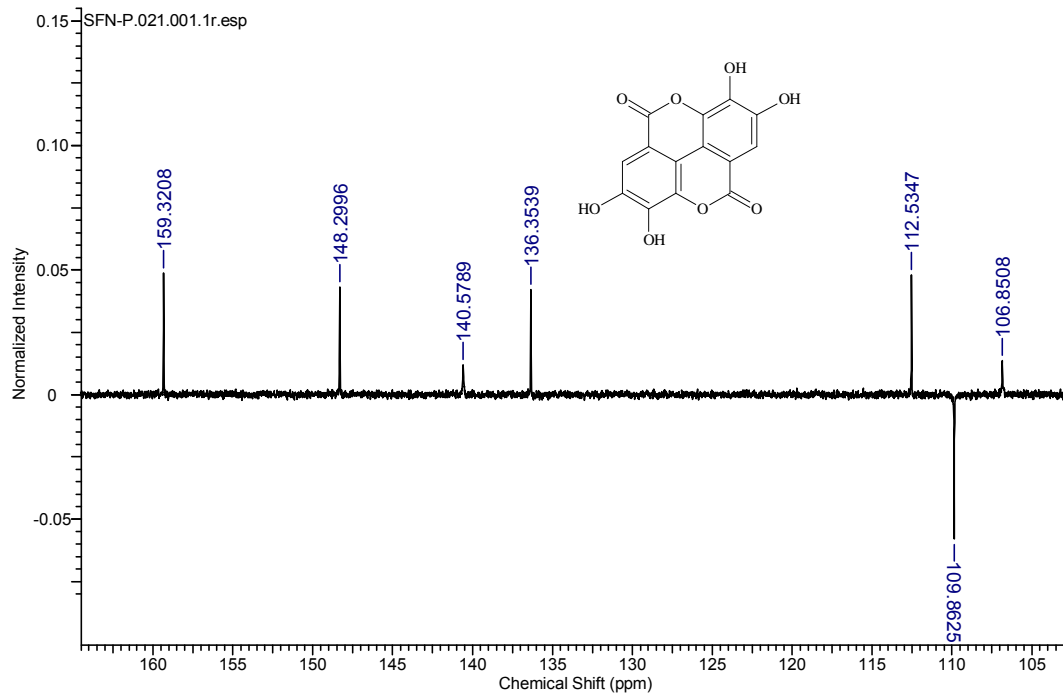


Figura 37. Espectro de RMN de correlação heteronuclear, $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) da substância LPM-01 (500 MHz, DMSO) – Ampliação da região entre 106,85 – 159,32 δ .

SFN-P.300.001.2rr.esp

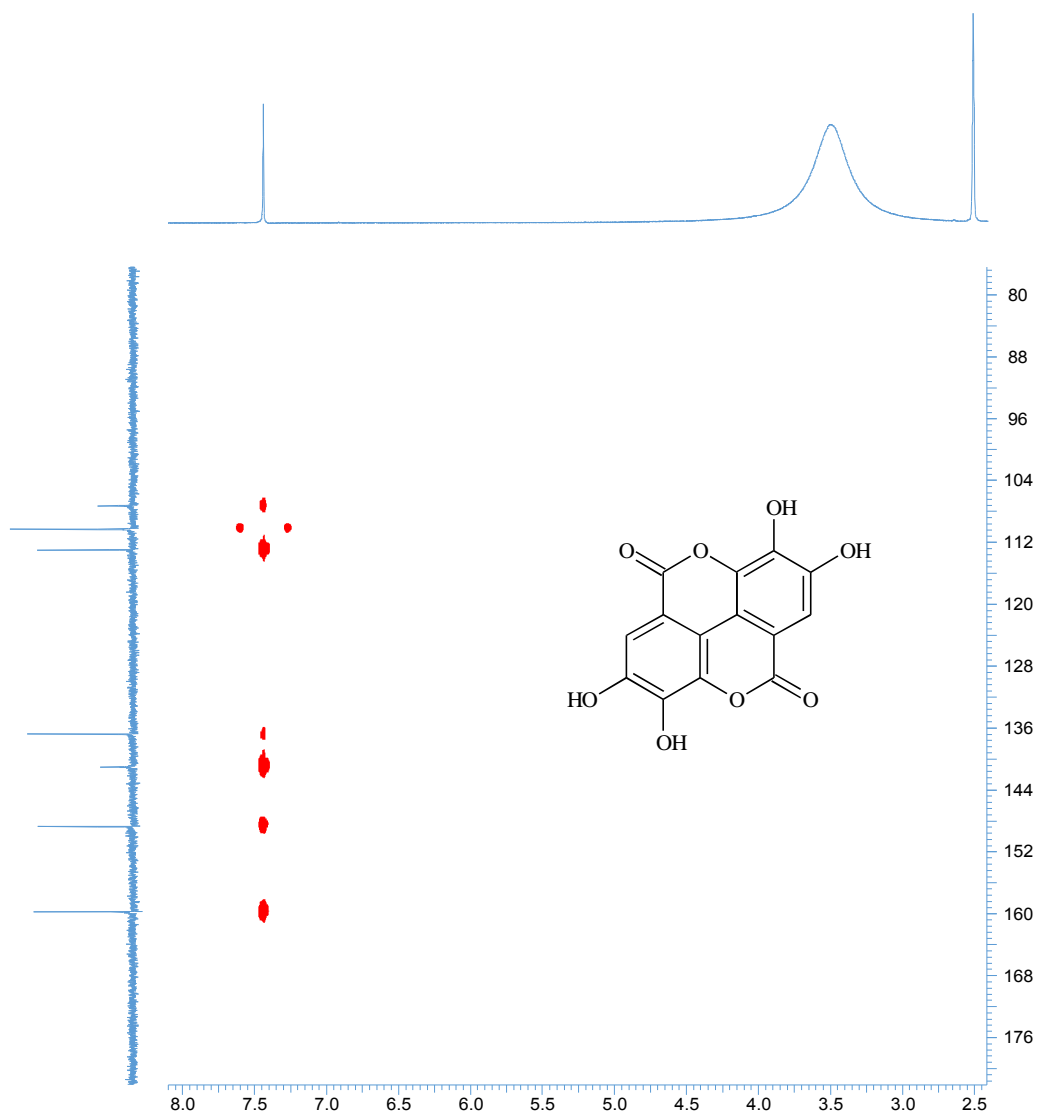


Figura 38. Espectro de RMN de correlação heteronuclear, $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância LPM-02 (500 MHz, DMSO)

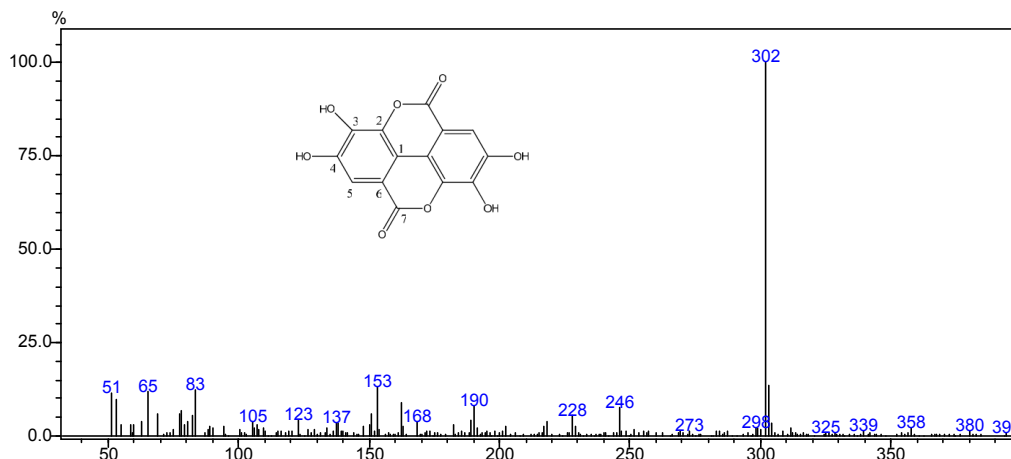


Figura 39. Espectro de Massa (via inserção direta) da substância LPM-02

Tabela 10. Deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C (500, 125 MHz; MeOD) da substância LPM-02

Substância LPM-02						Ácido Elágico*	
HMQC			HMBC				
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$^4J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
1;1'	106,85			C-1; H-5		107,58	
2;2'	136,35				C-2; H-5	136,37	
3;3'	140,57				C-3; H-5	139,63	
4;4'	148,29		C-4; H-5			148,11	
5;5'	109,86	7,40 (s)				110,20	7,44 (s)
6;6'	112,53		C-6; H-5			112,32	
7;7'	159,32				C-7; H-5	159,13	

*Literatura: Moura *et al.*, 2011

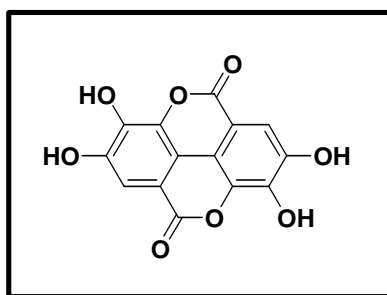


Figura 40. Estrutura da substância LPM-02

5.5. Proposta Biossintética para os ácidos Gálico e Elágico

Os ácidos gálico e elágico são substâncias fenólicas derivadas da via do chiquimato (combinação de fosfoenolpiruvato, um intermediário da via glicolítica e eritrose 4-fosfato da via das pentoses). O ácido chiquimico é oxidado a ácido 3-desidrochiquimico que por sua vez sofre oxidação, enolização e perda de dois átomos de hidrogênio para formar o ácido gálico. Posterior acoplamento carbono/carbono de duas moléculas de ácido gálico, seguido de lactonização espontânea dá origem ao ácido elágico (Dewick, 2001). O ácido elágico, conhecido por sua atividade anti-inflamatória (Corrêa; Melo; Costa, 2008), antioxidante (Bianchi & Antunes, 1999) e antifúngica (Silva Júnior, *et. al.*, 2010), também pode ser produzido a partir da hidrólise de taninos hidrolisáveis (formados por unidades de ácido hexaidroxidifenóico esterificadas com unidades de glicose – taninos elágicos). Sendo assim, a presença de ácido elágico no extrato aquoso de folhas de *L. pisonis* também pode ser atribuída à ocorrência de hidrólise durante o processo extrativo. O ácido gálico por sua vez, é conhecido como marcador químico em análise de controle de qualidade de drogas e bebidas, como por exemplo, vinhos e sucos. É considerado um antioxidante e possui características adstringentes (Bezerra, 2012). Na Figura 41 apresenta-se a biossíntese resumida dos ácidos gálico e elágico.

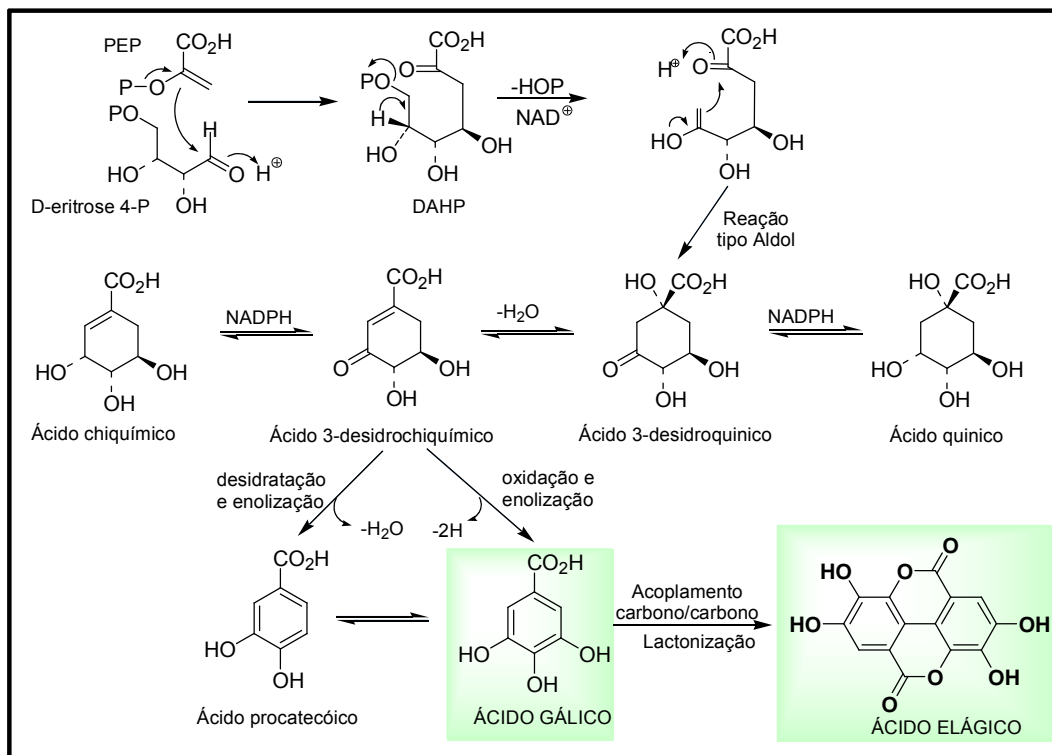


Figura 41. Proposta Biossintética para os ácidos gálico e elágico (Adaptado de Dewick, 2001)

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação do perfil químico realizada com as folhas da espécie *Lecythis pisonis* indicou a presença dos seguintes grupos fitoquímicos: flavonoides, fenólicos totais e substâncias antioxidante para ambos os extratos alcoólico e hidroalcoólico.

A avaliação do teor de flavonoides totais mostrou um resultado significativo equivalente a 15,8 µg/mL ou 6,583 mg/g de extrato seco.

A análise do teor de proantocianidinas pelo método da vanilina sulfúrica também foi significativo, apresentando quantidade igual a 17,31 µg/mL ou 8,655 mg/g de extrato seco.

Foi possível isolar e identificar as substâncias ácido Gálico e ácido Elágico que são metabólitos secundários oriundos da via do ácido chiquímico.

Os resultados obtidos com a espécie mostraram-se promissores, estimulando a continuidade do estudo fitoquímico da espécie *L. pisonis*.

7. REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol.17, n.1, p. 114-140, Jan/Mar. 2007.

Alimentos Regionais Brasileiros. Região Sudeste. Frutas. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/partes/aliment_reg7.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2015.

AMOROZO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. *Acta. bot. bras.*, vol.16, n.2, p.189-203, Dezembro, 2001.

BEZERRA, B. P. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de teor de ácido gálico e catequina no fitoterápico Sanativo por cromatografia líquida de alta eficiência. 2012. 140f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Natal.

BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.*: Campinas, vol. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E. M.; DOS SANTOS, J. M. T.; DA ROSA, M. R.; QUINÁIA, S. P.; TORRES, Y. N.; SANTA, H. S. D.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; FERREIRA, P. M. P. SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Química nova*. vol. 32, n. 2, p. 296, 2009.

BURKE, R. W.; DIANONDSTONE, B. I.; VELAPOLDI, R. A.; MENIS, O.(1974). Mechanisms of the Liebermann-Buchard and Zak Color Reactions for Cholesterol. *Clin. Chem.* vol.20, n. 7, p. 794-801.

BRAGA, L. F. SOUSA, M. P.; GILBERT, S.; CARVALHO, M. A. C. DE. *Caracterização morfológica de sementes de castanha de Sapucais (Lecythis pisonis Cambess - Lecythidaceae)*. 2007Disponível em:<[http://www.researchgate.net/profile/Marco_Carvalho8/publication/237484142_CHARACTERIZAO_MORFOMTRICA_DE_SEMENTES_DE_CASTANHA_DE_SAPUCAIA_\(Lecythis_pisonis_CAMBESS_-_LECYTHIDACEAE\)/links/0c96053c689525a654000000.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Marco_Carvalho8/publication/237484142_CHARACTERIZAO_MORFOMTRICA_DE_SEMENTES_DE_CASTANHA_DE_SAPUCAIA_(Lecythis_pisonis_CAMBESS_-_LECYTHIDACEAE)/links/0c96053c689525a654000000.pdf)>. Acesso em: 11 set. 2015.

CARVALHO, I. M. M. DE; QUEIRÓS, L. D.; BRITO, L. F.; SANTOS, F. A.; BANDEIRA, A. V. M.; SOUZA, A. L. DE; QUEIROZ, J. H. DE. *Caracterização química da castanha de Sapucaia (Lecythis pisonis Cambess.) da região da Zona da Mata Mineira*, Uberlândia, vol.28, n.6, p.971-977, Nov./Dec. 2012.

CARVALHO, J. E. DE. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. *Revista MultiCiência*, São Paulo, n. 7, p. 1, out. 2006.

CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, L. F. DE.; BEZERRA, F. B. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). *Quim. Nova*, vol. 21, n. 6, 1998.

CHAVES, M. H.; BARBOSA, A. S.; MOITA NETO, J.M. Caracterização química do óleo da amêndoa de *Sterculia striata* Hill et Nauda. *Química Nova*, São Paulo, vol.27, n. 3, p. 404-408, 2004.

Cidade-Brasil. Município de Campos dos Goytacazes. Disponível em: <<http://www.cidade-brasil.com.br/municipio-campos-dos-goytacazes.html>>. Acesso: 3 out. 2015.

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

CORRÊA, M. F. P.; MELO, G. O. DE; COSTA, S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. *Rev. Bras. Farmacogn.*, vol. 19, p. 785-797, 2008.

COSTA, A. F. *Farmacognosia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

COSTA, P. M. DA; CARVALHO, M.G. DE. New Triterpene isolated from *eschweilera longipes* (Lecythidaceae). *An Acad Bras Cienc*, vol. 75, n. 1, 2003.

DEWICK, P.M. Medicinal natural products: A biosynthetic approach.
London: John Wiley, 2° ed., 2001, p. 507.

DUARTE, R. C.; MATOS, C. R.; BRAZ-FILHO, R.; MATHIAS, L.
Chemical constituents of *Lecythis pisonis* (Lecythidaceae) – A New
Saponin and Complet 1H and 13C Chemical Shift Assignments. *Nat
Prod Commun*, vol. 10, n. 6, p. 871-4, 2015.

FERREIRA, E. L. F. *et al.* Phytochemical investigation and antioxidant
activity of extracts of *Lecythis Pisonis* Camb. *Journal of medicinal plants
research*, vol. 8, n. 8, p.356-360, Fev. 2014.

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

FRANÇA, I. S. X. DE; SOUZA, J. A. DE; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V.
R. DE S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas
medicinais. *Revista Brasileira de Enfermagem*. vol. 61, 2008.

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

LIMA, E.; SOUSA-FILHO, T. DE; BATISDA, J.; SCHMEDA-HIRSCHMA,
G. Saponins from *Cariniana rubra* (Lecythidaceae). *Bol. Soc. Chil. Quim.*,
vol. 47, n. 4, p. 441-447, 2012.

MARTINS, C. M.; AQUINO, F. J. T. de. Análise química e sensorial de variedades de café do sul de Minas Gerais utilizadas na formulação de misturas para a preparação de café espresso. In: IX ENCONTRO INTERNO XIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Uberlândia. **Anais...**Uberlândia.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. M.; CULEBRAS; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, vol. 6, p. 271-278, 2002.

MARQUES, G. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. DE F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; ROLIM-NETO, P. J.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. DE L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *bauhinia forficata*. *Química Nova*. vol. 35, n.3, 2012.

MC RAE, J. M.; YANG, Qi; CRAWFORD, R. J.; PALOMBO, E. A. Antibacterial compounds from *Planchonia careya* leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 116, p. 554-560, 2008.

MORAIS, S. A. L. DE; AQUINO, F. J. T. DE; NASCIMENTO, P. M. DO; NASCIMENTO, E. A. DO; CHANG, R. Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante do Café Conilon Submetidos a Diferentes Graus de Torra. *Quim Nova*, vol. 2, n. 2, p. 327-331, 2009.

MORI, S. Brazil nut family (Lecythidaceae) in the New World. 2014 Disponível em: <<http://www.eoearth.org/view/article/150771>>. Acesso em: 20 ago. 2015.

MORI, S. Diversificação e conservação das lecythidaceae neotropicais. *Acta. bot. bras.*, vol. 4, n. 1, 1990. Monografia (Conclusão de curso) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Florestas, Seropédica.

MORI, S. (2013). The Sapucaia Tree. New York Botanical Garden. Disponível em: <<http://blogs.nybg.org/plant-talk/2013/02/science/the-sapucaia-tree/nggallery/image/image-244/>>. Acesso em 20 nov. 2015.

MORI, S. A. Biologia da polinização em Lecythidaceae. *Acta Bot. Bras.* Feira de Santana, vol.1, n.2, supl.1, p.121-124, 1988.

MORI, S. A. TSOU, C. WU, 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*, Columbus, vol.94, n.3, p.289-301, 2007.

MORI, S. A.; OLIVEIRA, A. A.; DALY, D. A família da castanha-do-Pará: Símbolo do Rio-Negro. In: Mori, A.S. *Florestas do Rio Negro*. São Paulo: UNIP, NYBG e Companhia das Letras, 2001. Cap. 4, p. 121.

MOUCO, G.; BERNARDINO, M. J.; CORNÉLIO, M. L. Controle de Qualidade de Ervas Medicinas. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. vol. 31, 2003.

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

MOUTINHO, V. H. P. *Caracterização das madeiras conhecidas na Amazônia Brasileira como mata-matá (Lecythidaceae fam. A. Rich.)*. 2008. 78f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Madeira. Disponível em: <<http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/4457>>. Acesso em: 21 ago. 2015.

NASCIMENTO, L. M. DO. *Anatomia, histoquímica e prospecção fitoquímica do caule de Tynnanthus fasciculatus Miers (BIGNONEACEAE)*. Dissertação (Pós-graduação em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2008.

OLIVEIRA, J. P. C. FERREIRA, E. L. F.; CHAVES, M. H.; MILITÃO, G. C. G.; JÚNIOR, G. M. V.; COSTA, A. DE M.; PESSOA, C. DO Ó.; MORAES, M. O. DE; COSTA-LOTUFO, L. V. Chemical constituents of *Lecythis pisonis* and cytotoxic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 22, n. 5, p.1140-1144, Sep./Oct. 2012.

PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. *Química Nova*, vol.18, n.6, p. 608-615, Set. 1995.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. DA S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. DE A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quím. Nova*, vol. 25, n.1, p. 45-61, 2002.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L. DE.; NASCIMENTO, E. A. DO. *Caracterização dos taninos da Aroeira-Preta (Myracrodruon urundeuva)*. *Sociedade de Investigações Florestais*, Viçosa, vol. 26, n.4, p. 485-492, jun.2002.

RODRIGUES, I. M. C.; SOUZA FILHO, A. P. S. (2009). Estudos fitoquímicos de *Senna alata* por duas metodologias. *Planta Daninha: Viçosa-MG*: 3° ed., p. 507-513.

SANTOS, M. D. DOS; BLATT, C. T. T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. *Brazilian Journal of Botany*. vol. 21, n. 2, 1998.

SANTOS, S. DA C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 5° ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 2003.

SHRINER, R. L.; FUSON, R. C.; CUTIN, B. Y.; MORRIL, T. C. *Identificação sistemática dos compostos orgânicos*. 6° ed. Rio de Janeiro, 520 p.,1983.

SILVA JUNIOR, I. F.; RAIMOND, M.; ZACCHINO, S.; CECHINEL-FILHO, V.; NOLDIN, V. F.; RAO, V. S.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoesia*

pacari A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. *Rev. Bras. Farmacogn.*, vol. 23, n. 3, p. 422-428, 2010.

SILVA, L. L.; GOMES, B. S.; SOUSA-NETO, B. P.; OLIVEIRA, J. P. C.; FERREIRA, E. L. F.; CHAVES, M. H.; OLIVEIRA, F. A. Effects of *Lecythis pisonis* Camb. (Lecythidaceae) in a mouse of pruritus. *Journal of Ethnopharmacology*. vol.139, n.1, p. 90-97, Out, 2011.

SIMÕES, M. A. *Relações dendrométricas em Sapucaia (Lecythis pisonis Cambess) na floresta nacional Mário Xavier, Seropédica, RJ. 2007. 22f. Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Flavonoides e Antocianos.*

Disponível em:

http://www.sbfognosia.org.br/Ensino/flavonoides_e_antocianinos.html.

Acesso em 2 dez. 2015.

SOUZA, A. D. L. DE; ROCHA, A. F. I. DA.; PINHEIRO, M. L. B.; ANDRADE, C. H. DE S.; GALOTTA, A. L. DE A. Q.; SANTOS, M. DO P. S. S. DOS. Constituintes químicos de *Gustavia Augusta* L. (Lecythidaceae). *Quim. Nova*, vol. 24, n. 4, p. 439-442, 2001.

SOUZA, A. S.; MARGALHO, L.; PRANCE, G. T.; GURGEL, E. S. C.; GOMES, J. I.; CARVALHO, L. T. DE; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V. *Conhecendo Espécies de Plantas da Amazônia: Sapucaia (Lecythis pisonis Cambess. – Lecythidaceae).* 2014

SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R.C. L. R.; ISAAC, V. L. B. (2007). Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Atryphnodendron adstringes* (Mart.) Coville e de preparação cosmética

contendo este extrato. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. vol. 17, p. 71-75.

STEEGE, H. Continental-scale patterns of canopy tree composition and function across Amazonia. *Nature*, Londres, vol. 443, p. 444-447, 2006.

VALLILO, M. I.; TAVARES, M.; AUED-PIMENTEL, S.; CAMPOS, N. C.; MOITA NETO, J. M. *Lecythis Pisonis Camb. Nuts: oil characterization, fatty acids and minerals*. vol. 66, n.2, p.197-200, Ago 1999.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, vol. 29, n.2, p.326-337, 2006.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura?. *Quim. Nova*, vol.28, n.3, p. 519-529, 2005.

ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. (2008). Extração de Betacaroteno de cenouras: uma proposta para disciplinas experimentais de química. *Química Nova*, vol. 31, p. 1259-1262.