

**Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante e biológica da espécie  
*Sparattosperma leucanthum* (VELL.) Schum, (BIGNONIACEAE)**

Laís Nascimento Viana

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Centro de Ciências e Tecnologia

Campos dos Goytacazes – RJ

Agosto de 2015

**Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante e biológica da espécie  
*Sparattosperma leucanthum* (VELL.) Schum, (BIGNONIACEAE)**

Laís Nascimento Viana

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leda Mathias

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Centro de Ciências e Tecnologia

Campos dos Goytacazes – RJ

Agosto de 2015

**Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante e biológica da espécie  
*Sparattosperma leucanthum* (VELL.) Schum, (BIGNONIACEAE)**

Laís Nascimento Viana

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leda Mathias (Doutora em Química de Produtos Naturais) - UENF

(Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana Giacomini (Doutora em Ciências) - UENF

---

Vinicius Fernandes Moreira (Mestre em Produção Vegetal) – UENF

O coração do homem planeja o seu caminho, mas o Senhor lhe dirige os passos.

(Provérbios 16:9)

Guiar-me-ás com Teu conselho e, depois, me receberás em glória. (Salmos 73:24)

Em Deus faremos proezas. (Salmos 60:12a)

Aos meus pais, José e Sônia.

Aos meus irmãos, Danyel e Felipe.

Às minhas primas, Luiza e Milena.

Ao meu namorado, Vinícius.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pois, sem Ele nada sou e nada faço. Agradeço pelo dom da vida, e pelo sustento em todos esses anos de caminhada.

Agradeço aos meus pais, José e Sônia, pelo amor, incentivo, apoio incondicional e por não medirem esforços para que eu chegasse onde estou. Aos meus irmãos e primos por todo o carinho, compreensão e palavras de incentivo.

Aos professores Leda e Carlos pela paciência, orientação, pelos ensinamentos e pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

Aos amigos Anaína, Henrique, Jéssica, Laissa, Laysa, Marina, Rennê, Rosana, Sthefanie e Thaís pelo incentivo, ajuda, amizade e por alegrarem os meus dias na universidade.

Aos meus amigos do Ciências Sem Fronteiras por terem sido uma família para mim, pelo apoio, pelas risadas e pelos momentos inesquecíveis juntos.

À Vinícius por me ouvir todos os dias, me confortar, apoiar, incentivar e por acreditar em mim.

Aos meus irmãos em Cristo que me sustentaram em oração nos momentos difíceis.

À universidade, seu corpo docente e discente, e a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

## SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Esquema.....	IX
Lista de Figuras.....	X
Lista de Gráficos .....	XIII
Lista de Tabelas.....	XIV
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XV
Resumo .....	XVI
Abstract .....	XVII
1. Introdução .....	1
2. Objetivos .....	4
2.1. Objetivos Gerais .....	4
2.2. Objetivos específicos .....	4
3. Revisão Bibliográfica .....	5
3.1. Enquadramento Taxonômico.....	5
3.2. Considerações Sobre a Família Bignoniaceae .....	5
3.2.1. Triterpenóides e Esteróides.....	7
3.2.1.1. Biossíntese de Triterpenóides e Esteróides.....	7
3.2.2. Flavonóides.....	9
3.2.2.1. Biossíntese de Flavonóides.....	9
3.2.3. Aspectos Farmacológicos da Família Bignoniaceae .....	9
3.3. Considerações Sobre o Gênero <i>Sparattosperma</i> .....	11
3.4. Considerações sobre a espécie <i>Sparattosperma leucanthum</i> .11	
3.4.1. Sinonímia Vulgar.....	12
3.4.2. Sinonímia Científica.....	12
3.4.3. Distribuição Geográfica .....	12
3.4.4. Usos Populares.....	12
3.4.5. Descrição Botânica.....	13
3.4.6. Aspectos Fitoquímicos .....	13
3.5. Considerações Sobre <i>Artemia Salina</i> .....	13

3.6.	Considerações sobre a Atividade Antioxidante .....	14
4.	Material e Métodos .....	16
4.1.	Equipamentos .....	16
4.1.1.	Concentração dos Extratos Brutos e Frações .....	16
4.1.2.	Espectroscopia no Infravermelho .....	16
4.1.3.	Espectroscopia na Região do Ultravioleta .....	16
4.1.4.	Cromatografia gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas .....	16
4.1.5.	Ressonância Magnética Nuclear.....	16
4.2.	Material Vegetal .....	17
4.3.	Preparação dos Extratos Brutos .....	17
4.4.	Testes Químicos para Identificação de Metabólitos Secundários ....	18
4.4.1.	Testes Genéricos para Identificação de Triterpenos e Esteróides .....	18
4.4.2.	Testes Químicos Para Fenólicos em Geral .....	19
4.5.	Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método do Sequestro do Radical Livre 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH) (Mensor <i>et al.</i> , 2001).....	20
4.6.	Ensaio Biológico.....	21
4.6.1.	Letalidade Frente às Larvas do Microcrustáceo <i>Artemia salina</i> LEACH .....	21
4.7.	Fracionamento dos Extratos Brutos.....	21
4.7.1.	Técnicas Cromatográficas Utilizadas no Processo de Isolamento.....	21
4.7.2.	Fracionamento do Extrato em Hexano.....	22
4.7.3.	Fracionamento do Extrato em Metanol .....	25
4.7.3.1.	Fração em Acetato de Etila .....	25
4.7.3.1.1.	Partição em Diclorometano.....	25
5.	Resultados e Discussão .....	27
5.1.	Testes Químicos Para Identificação de Metabólitos Secundários Nos Extratos Brutos do Caule de <i>S. leucanthum</i> .....	27
5.1.1.	Triterpenos e Esteróides .....	27
5.1.2.	Fenólicos Totais e Flavonóides.....	28
5.2.	Avaliação do Teor de Flavonóides Totais.....	29
5.3.	Avaliação da Atividade Antioxidante (Método do DPPH) .....	31
5.4.	Ensaio Biológico.....	32
5.4.1.	Atividade Citotóxica Frente às Larvas de <i>Artemia salina</i> .....	32

5.5. Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos Isolados e/ou Identificados dos Extratos Brutos de <i>S. leucanthum</i> .....	33
5.5.1. Extrato Hexânico do Caule de <i>S. leucanthum</i> .....	33
5.5.1.1. Substância SLH-01 .....	33
5.5.2. Extrato Metanólico do Caule de <i>S. leucanthum</i> .....	40
5.5.2.1. Substância SLMAD-01.....	41
5.5.2.2. Substância SLMAD-02.....	45
6. Conclusões .....	56
7. Referências Bibliográficas .....	57

## LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
<b>Esquema 1.</b> Fluxograma resumido do fracionamento parcial dos extratos brutos de <i>S. leucanthum</i> .....	24
<b>Esquema 2.</b> Fluxograma resumido do fracionamento para o extrato metanólico .....	26

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Substâncias isoladas no século XIX.....	2
<b>Figura 2.</b> Metabólitos secundários com importantes ações farmacológicas.....	3
<b>Figura 3.</b> Biossíntese de Terpenóides .....	8
<b>Figura 4.</b> Biossíntese de Flavonóides .....	10
<b>Figura 5.</b> Fotografia das flores da <i>Sparattosperma leucanthum</i> .....	11
<b>Figura 6.</b> Extratos brutos em hexano (a), diclorometano (b) e metanol (c).....	18
<b>Figura 7.</b> Cromatograma da mistura de substâncias SLH-01.....	34
<b>Figura 8.</b> Fragmentograma 70 eV da substância SLH-01a - Ácido hexadecanóico .....	34
<b>Figura 9.</b> Fragmentograma 70 eV da substância SLH-01b- Ácido octadecanóico .....	35
<b>Figura 10.</b> Fragmentograma 70 eV da substância SLH-01c – Campesterol....	35
<b>Figura 11.</b> Fragmentograma 70 eV da substância SLH-01d – Estigmasterol ..	35
<b>Figura 12.</b> Fragmentograma 70 eV da substância SLH-01e – Sitosterol.....	36
<b>Figura 13.</b> Estrutura da mistura de substâncias SLH-01 .....	36
<b>Figura 14.</b> Espectro na região do infravermelho de SLH-01 .....	37
<b>Figura 15.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C, 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> de SLH-01 .....	37
<b>Figura 16.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H, 500 MHz, CDCl <sub>3</sub> de SLH-01.....	38
<b>Figura 17.</b> Similaridades estruturais entre SLH-01d e SLH-01e.....	39

<b>Figura 18.</b> Principais fragmentos de massa propostos para a mistura de substâncias SLH-01.....	40
<b>Figura 19.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H, 500 MHz, MeOD de SLMAD-01 .....	41
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H, 500 MHz, MeOD de SLMAD-01 (ampliação) .....	42
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (DEPTQ), 125 MHz, MeOD de SLMAD-01..	43
<b>Figura 22.</b> Estrutura da substância SLMAD-01 .....	43
<b>Figura 23.</b> Espectro de massas (Inserção direta) Ionização eletrônica 70 eV da substância SLMAD-02 .....	45
<b>Figura 24.</b> Fragmentograma de massas da substância SLMAD-02.....	45
<b>Figura 25.</b> Principais fragmentos propostos para a substância SLMAD-02 ....	46
<b>Figura 26.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H 500 MHz da substância SLMAD-02.....	47
<b>Figura 27.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H 500 MHz da substância SLMAD-02 (expansão)	47
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H 500 MHz da substância SLMAD-02 (expansão)	48
<b>Figura 29.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da substância SLMAD-02 .....	49
<b>Figura 30.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da substância SLMAD-02 (expansão) .....	49
<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (DEPTQ) da substância SLMAD-02 .....	50
<b>Figura 32.</b> Espectro de correlação homonuclear <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H (RMN-COSY) da substância SLMAD-02 .....	51
<b>Figura 33.</b> Espectro de correlação heteronuclear <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (RMN-HSQC) da substância SLMAD-02 .....	52
<b>Figura 34.</b> Espectro de correlação heteronuclear <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C (RMN-HMBC) da substância SLMAD-02 .....	53

<b>Figura 35.</b> Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (RMN-HMBC) da substância SLMAD-02 (expansão).....	54
<b>Figura 36.</b> Estrutura da substância SLMAD-02.....	54

## LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
<b>Gráfico 1.</b> Curva de calibração para o padrão de rotina.....	30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Enquadramento Taxonômico de <i>Sparattosperma leucanthum</i> .....	5
<b>Tabela 2.</b> Resultados dos testes químicos de identificação de triterpenos e esteroides .....	28
<b>Tabela 3.</b> Resultados dos testes químicos de identificação de fenólicos em geral e flavonóides.....	29
<b>Tabela 4.</b> Resultado das absorbâncias encontradas para o padrão de rutina no teste do Teor de Flavonóides Totais.....	30
<b>Tabela 5.</b> Resultado das absorbâncias encontradas para o extrato metanólico no teste do Teor de Flavonóides Totais.....	31
<b>Tabela 6.</b> Picos obtidos no CG/EM da mistura de substâncias SLH-01 .....	34
<b>Tabela 7.</b> Dados espectrométricos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para a substância SLMAD-01 .....	44
<b>Tabela 8.</b> Dados espectrométricos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para a substância SLMAD-02 .....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

$\delta_C$	Deslocamento químico do carbono
$\delta_H$	Deslocamento químico do hidrogênio
AA%	Porcentagem de atividade antioxidante
Abs	Absorbância
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CG/EM	Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas
$cm^{-1}$	Centímetro recíproco (unidade de número de onda)
$DL_{50}$	Dose letal suficiente para matar 50% da população testada
d	Dubleto
$EC_{50}$	Concentração efetiva máxima obtida em 50% do padrão
eV	Eletrovolt
Hz	Hertz
$J$	Constante de acoplamento
$M^+$	Íon molecular no espectro de massas
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
$m/z$	Relação massa/carga
ppm	Parte por milhão
rf	Fator de retenção
RMN $^1H$	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN $^{13}C$	Ressonância magnética nuclear de carbono
s	Singleto
sl	Singleto largo
UV	Ultravioleta

## RESUMO

A *Sparattosperma leucanthum* é uma espécie pertencente à família Bignoniaceae. É comumente utilizada na ornamentação, construção naval, e na medicina popular no tratamento de reumatismos, úlceras de garganta, estomatite, sífilis, pedras na bexiga e, como purificador de sangue.

A família Bignoniaceae é conhecida por suas propriedades antimicrobianas, antiprotozoários e antiinflamatória. Este conhecimento motiva o estudo de suas espécies em busca de substâncias que possam apresentar atividades biológicas.

A presente monografia tem por principal objetivo o estudo fitoquímico da *Sparattosperma leucanthum*, bem como a avaliação de sua atividade citotóxica e antioxidante.

Em análise preliminar, os testes químicos realizados mostraram a presença de triterpenos, esteroides, flavonóides e fenólicos em geral.

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada através do método do DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazil) como radical livre.

Na avaliação da toxicidade dos extratos brutos, utilizou-se a metodologia proposta por McLaughlin para larvas de *Artemia Salina*.

A avaliação do teor de flavonóides totais deu-se através do método do cloreto de alumínio.

O fracionamento dos extratos brutos hexânico, diclorometânico e metanólico do caule de *S. leucanthum* foi feito utilizando-se técnicas cromatográficas. A identificação dos metabólitos secundários isolados nesses extratos foi feita através da interpretação dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , combinado com informações obtidas no Cromatógrafo de gás acoplado ao espectrômetro de Massas e com os espectros de Infravermelho. A combinação destas técnicas, somadas à comparação com a literatura, permitiu a identificação dos compostos.

## ABSTRACT

*Sparattosperma leucanthum* is one of the species that belongs to the Bignoniaceae family. It is commonly used in ornamentation, naval construction, and as medical treatment of treat rheumatism, throat ulcers, stomatitis, syphilis, bladder stones and as blood cleanser.

The Bignoniaceae family is known by its antimicrobial properties, antiprotozoal and anti-inflammatory. This knowledge motivates the study of its species in the pursuit of substances that may present biological activities.

This monograph has as major objective the phytochemical study of *Sparattosperma leucanthum*, as well as an evaluation of its cytotoxic and antioxidant activities.

In a preliminary analysis, chemical tests showed the presence of triterpenes, steroid, flavonoid and phenolic groups.

The evaluation of antioxidant activity was performed using the method of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrihidrazil) as a free radical.

In the evaluation of toxicity of crude extracts, the methodology proposed by McLaughlin for larvae of *Artemia Salina* was used.

The evaluation of the total flavonoid content was given by the method of aluminum chloride.

Fractionation of crude hexane, dichloromethane and methanol extracts of the stem of *S. leucanthum* was done using chromatographic techniques. The identification of secondary metabolites isolated in these extracts was made through the interpretation of nuclear magnetic resonance spectra of  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ , combined with information obtained in the gas chromatograph coupled with Mass spectrometer and the infrared spectra. The combination of these techniques, and the comparison with literature, allowed the identification of the compound

## 1. Introdução

As plantas medicinais são aquelas que, quando administradas ao homem ou animal por qualquer via ou forma, exerce alguma ação terapêutica. (Lopes *et. al.*, 2005). Elas são utilizadas por diversas comunidades na fabricação de remédios caseiros, sendo também consideradas matéria prima para a fabricação de fitoterápicos e outros tipos de medicamentos. (Leão *et. al.*, 2007).

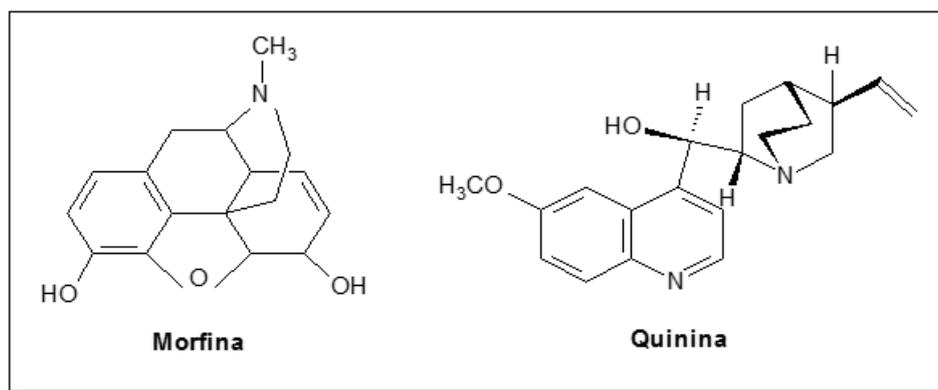
O uso de ervas como matéria prima básica para a produção de remédios remonta às tribos primitivas nas quais as mulheres se encarregavam de extrair das plantas seus princípios ativos para utiliza-los na cura de doenças. Com o passar dos anos os povos da época se tornaram mais habilitados em suprir as suas necessidades de sobrevivência, assim estabeleceram-se papéis sociais específicos para os membros da comunidade em que viviam. O primeiro desses papéis foi o de curandeiro. (França *et. al.*, 2008).

O isolamento das primeiras substâncias puras começou a ocorrer nos séculos XVIII e XIX, caracterizando-se pelos trabalhos de extração, principalmente, de ácidos orgânicos e alcalóides (Pinto *et. al.*, 2003). Com o desenvolvimento da química experimental no século XIX, a síntese de novas substâncias tornou-se possível, assim como o isolamento mais eficiente de substâncias naturais; estes acontecimentos contribuíram para o desenvolvimento da humanidade visto que permitiram o surgimento de novos medicamentos e materiais (França *et. al.*, 2008).

Nessa época, ocorreu o isolamento de substâncias ainda hoje bastante conhecidas, como o alcalóide morfina, isolado pela primeira vez em 1806 da planta *Papaver somniferum*, que é utilizado como anestésico em casos de dores intensas (câncer) e a quinina, isolada pela primeira vez em 1820 de uma espécie de *Cinchona*, utilizada como antimalárico (Robbers *et. al.*, 1988; Cechinel-Filho & Yunes, 1998) (Figura 1, página 2).

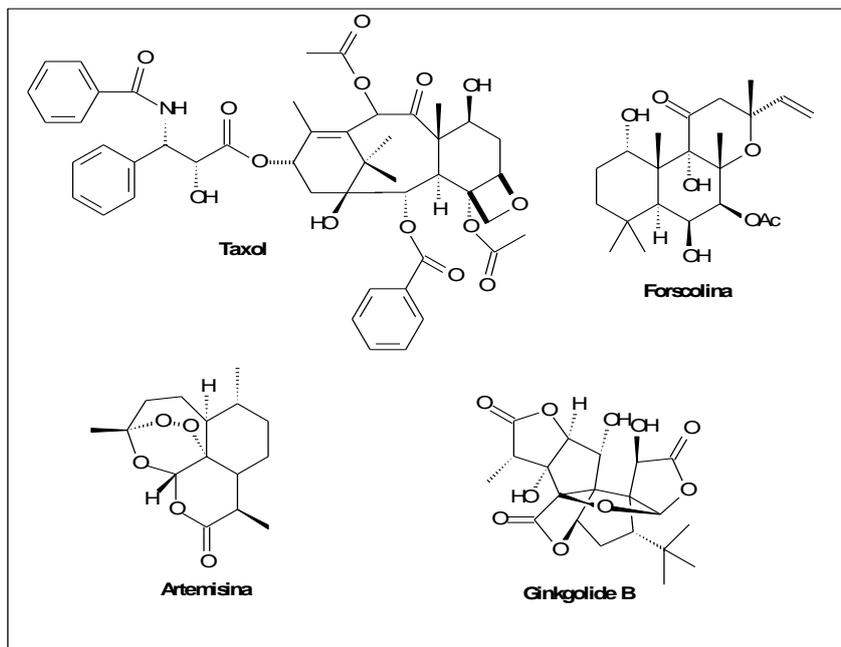
A função dessas substâncias nas plantas ficou por muito tempo desconhecida. No entanto, já está estabelecido que essas substâncias, denominadas de metabólitos especiais, possuem uma distribuição restrita no

reino vegetal, sendo encontrados tipicamente em algumas espécies ou grupos taxonomicamente relacionados. A concentração desses metabólitos nas plantas depende de estímulos proporcionados pelo meio, que podem ativar genes biossintéticos, como no caso de agressão por microrganismos ou pragas que estimulam a superprodução de substâncias defensivas, ou seja, os metabólitos especiais atuam diferentemente dos metabólitos primários que estão envolvidos principalmente em processos de assimilação, transporte e diferenciação celular (Castro *et. al.*, 2001).



**Figura 1.** Substâncias isoladas no século XIX

O uso de plantas medicinais vem atingindo um público cada vez maior, recebendo incentivo da Organização Mundial da Saúde (Castro, *et. al.*, 2001). Com o desenvolvimento de novas técnicas espectrométricas, a etapa de elucidação estrutural de novos metabólitos está sendo mais rápida e, portanto, a cada momento é relatada na literatura a identificação de novas moléculas. Algumas dessas substâncias possuem importante ação farmacológica, como o diterpeno taxol, que atua como antineoplásico e constitui uma esperança para portadores de câncer nos ovários e pulmões; a forskolina, que apresenta efeitos contra hipertensão, glaucoma, asma e certos tumores; a artemisina, que possui potente atividade antimalárica; o flavonóide ginkgolide B, que atua como inibidor do fator de agregação plaquetária (PAF), no tratamento de claudicação intermitente devido à doença de oclusão arterial crônica e sintomas de insuficiência cerebral senil; entre outras (Bruneton, 1995; Cechinel-Filho & Yunes, 1998) (Figura 2).



**Figura 2.** Metabólitos secundários com importantes ações farmacológicas

A atividade farmacológica de determinadas espécies de plantas está relacionada à presença de metabólitos secundários, como terpenos, compostos fenólicos (flavonóides), alcalóides, entre outros (Nascimento, 2008).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo central da presente monografia é a prospecção fitoquímica de extratos vegetais do caule de um espécime de *Sparattosperma leucanthum*, visto que não há atualmente estudos semelhantes para a espécie em questão.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Aprender sobre pesquisas bibliográficas, técnicas e uso de equipamentos básicos de laboratório de química orgânica;
- Realizar testes químicos para identificação de metabólitos secundários na espécie;
- Avaliar o potencial antioxidante de extratos brutos;
- Quantificar o teor de fenólicos e flavonóides totais presentes nos extratos;
- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos brutos frente às larvas do microcrustáceo *Artemia salina* Leach.
- Isolar metabólitos especiais presentes nos extratos brutos, e elucidar suas estruturas utilizando métodos espectrométricos usuais (IV, CG/EM, RMN);

### 3. Revisão da Literatura

#### 3.1. Enquadramento Taxonômico

O enquadramento taxonômico de *Sparattosperma leucanthum*, Bignoniaceae, segundo (Schumann, 1894) esta apresentado no Quadro 1.

**Tabela 1.** Enquadramento Taxonômico de *Sparattosperma leucanthum*

Taxonômia	
<b>Classe</b>	Equisetopsida C. Agardh
<b>Subclasse</b>	Magnoliidae Novák ex Takht.
<b>Ordem</b>	Lamiales Bromhead
<b>Família</b>	Bignoniaceae Juss.
<b>Gênero</b>	<i>Sparattosperma</i> Mart. ex Meisn.
<b>Espécie</b>	<i>Sparattosperma leucanthum</i> (Vell.) K. Schum.

Fonte: <http://www.tropicos.org/Name/3701059> (Acesso em 06 de maio de 2015)

#### 3.2. Considerações Sobre a Família Bignoniaceae

A família Bignoniaceae é constituída por cerca de 82 gêneros e 827 espécies (Lohmann e Ulloa, 2007) de plantas arbustivas, arbóreas e trepadeiras. As espécies deste táxon se apresentam distribuídas nas regiões tropicais do mundo inteiro, sendo de ocorrência frequente no continente americano. No Brasil, plantas desta família ocorrem desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, não possuindo um habitat único, podendo ser encontradas nos cerrados, Mata Atlântica e região amazônica (Carvalho *et. al.*, 2009), sendo considerado um centro de dispersão da família (Nascimento, 2008).

Há uma grande divergência no que diz respeito a classificação intrafamiliar da Bignoniaceae. Oito subclasses (tribos) da família são reconhecidas atualmente (Bignonieae, Catalpeae, Jacarandaeae, Oroxyleae, Tecomeae, Tourrettieae, clado Paleotropical e Tabebuia Alliance). Alguns gêneros ainda não tem um posicionamento definido. A tribo Catalpeae não tem uma posição bem resolvida no núcleo da família Bignoneaceae. A tribo Tecomeae possui 12 gêneros com distribuição mundial tanto em ecossistemas temperados como tropicais. A tribo Bignonieae é uma das maiores da família (Olmstead *et. al.*, 2009; Cipriani *et. al.*, 2012).

Os jacarandás (*Jacaranda brasiliana*) e Ipês amarelo e roxo (*Tabebuia alba* e *T. avellanedae*) presentes no continente americano são os exemplos mais representativos da família. Plantas destas espécies são muito utilizadas na construção civil, carpintaria e construção de instrumentos musicais devido à natureza rígida de sua madeira. Além disso, é também utilizada no planejamento urbano como planta ornamental, devido as suas belas florações, sendo o Ipê o exemplo mais conhecido no paisagismo urbano (Carvalho *et. al.*, 2009). Diversas espécies da família apresentam importância econômica o que, somado à importância florística dessa família, justifica o aprofundamento do conhecimento taxonômico da mesma.

Nas últimas décadas, as espécies da família Bignoniaceae foram extensamente estudadas do ponto de vista fitoquímico. No entanto, existem poucos trabalhos que empregam esse extenso conhecimento químico como ferramenta em estudos taxonômicos. O perfil químico da Bignoniaceae é caracterizado pela ocorrência de terpenóides, quinonas, derivados aromáticos especiais e flavonóides (Cipriani *et. al.*, 2012).

A biossíntese dos metabólitos especiais em Bignoniaceae baseia-se, principalmente, na via do ácido acético, o que está de acordo com o posicionamento da mesma entre as angiospermas mais derivadas. Os iridoides se apresentam como verdadeiros marcadores taxonômicos para a família. Do ponto de vista químico, o clado Paleotropical é o mais estudado, sendo essa química dominada por derivados de cadeia longa da via do ácido acético e derivados aromáticos especiais. O clado Bignonieae também apresenta um grande número de registros sendo as principais ocorrências de terpenóides, juntamente

com o clado Tecomeae, cuja química também é caracterizada por terpenóides e o clado *Tabebuia alliance*, que é dominado por quinonas e terpenóides. O clado Catalpeae apresenta uma química caracterizada principalmente por quinonas. O clado Oroxyleae já é um grupo menos estudado quimicamente e apresenta, proporcionalmente em relação aos demais, a maior química flavonoídica. O Clado Jacarandae também é pouco estudado e caracterizado por terpenóides e derivados aromáticos especiais. Já o grupo Tourrettieae tem somente uma de suas espécies estudadas do ponto de vista químico e apresentou somente terpenóides (Cipriani *et. al.*, 2012).

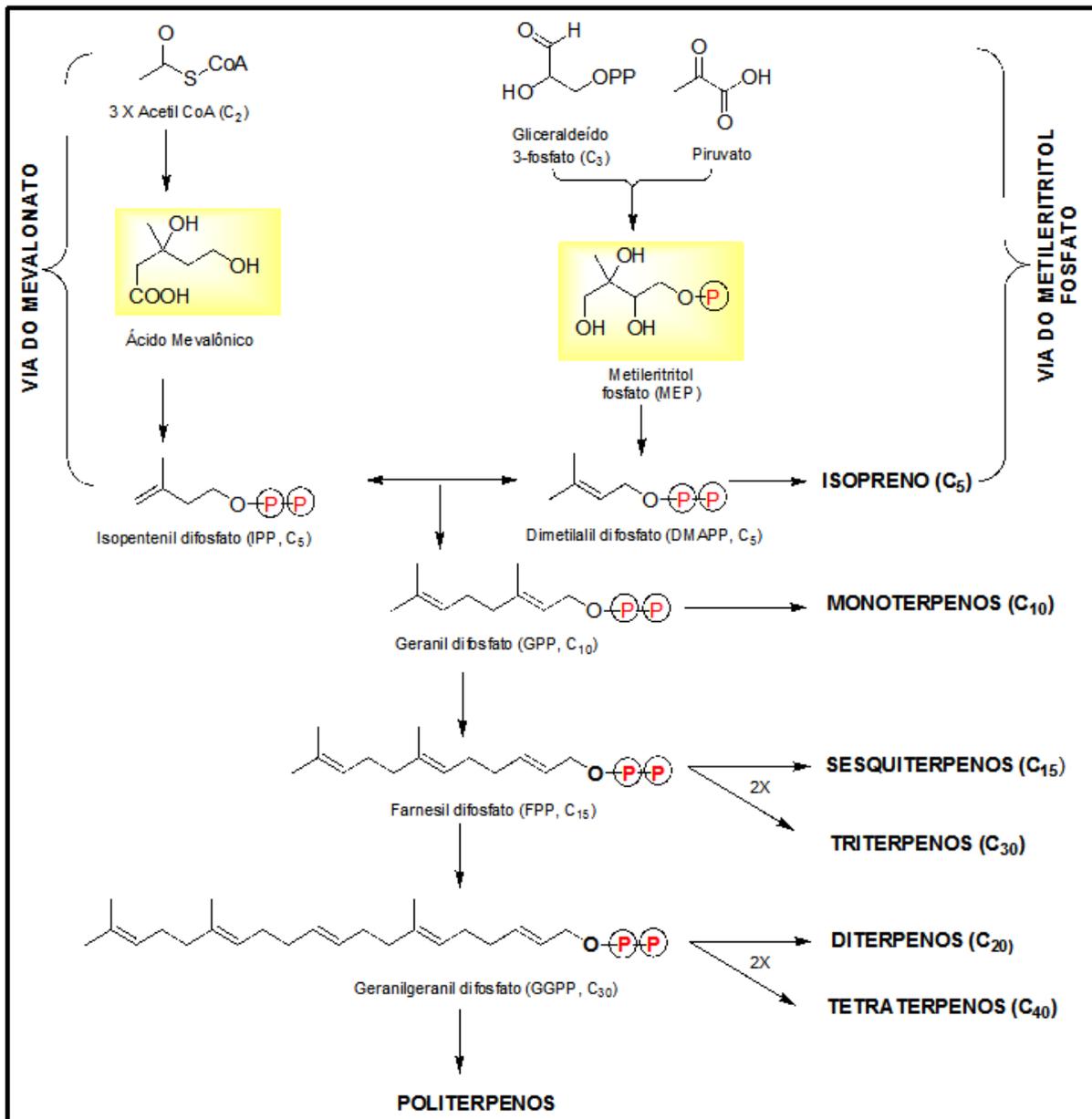
### **3.2.1. Triterpenóides e Esteróides**

Os triterpenos pertencem a classe dos metabólitos secundários terpenos. Eles possuem seis unidades de isopreno. Entre os triterpenos presentes na família Bignoneaceae destaca-se o ácido ursólico, com propriedades antiinflamatória, hepatoprotetora, antitumoral e antimicrobiana ativo contra o *trypanossoma Cruzi* (Nascimento, 2008).

Os esteroides são uma subclasse dos triterpenóides e compreendem uma grande classe de compostos encontrados em diferentes regiões das plantas sendo, no reino vegetal, o equivalente ao colesterol entre os mamíferos. Há evidências de que alguns esteróides são eficazes contra doenças cardiovasculares, reduzindo os níveis de colesterol (Queiroz, 2009).

#### **3.2.1.1. Biossíntese de Triterpenóides e Esteróides**

Os terpenos são biossintetizados a partir de metabólitos primários por no mínimo duas rotas diferentes, uma via citosólica ou rota do mevalonato (MVA) e outra do 2-C-metileritritol-4-fosfato, com procedência na via 1-deoxilulose-5-fosfato ocorrendo nos plastídeos (Barros *et. al.*, 2008; Jakiemiu, 2008; Lacerda *et. al.*, 2004) (Figura 3).



**Figura 3.** Biossíntese de Terpenóides

Fonte: Taiz & Zeiger, 2004

### 3.2.2. Flavonóides

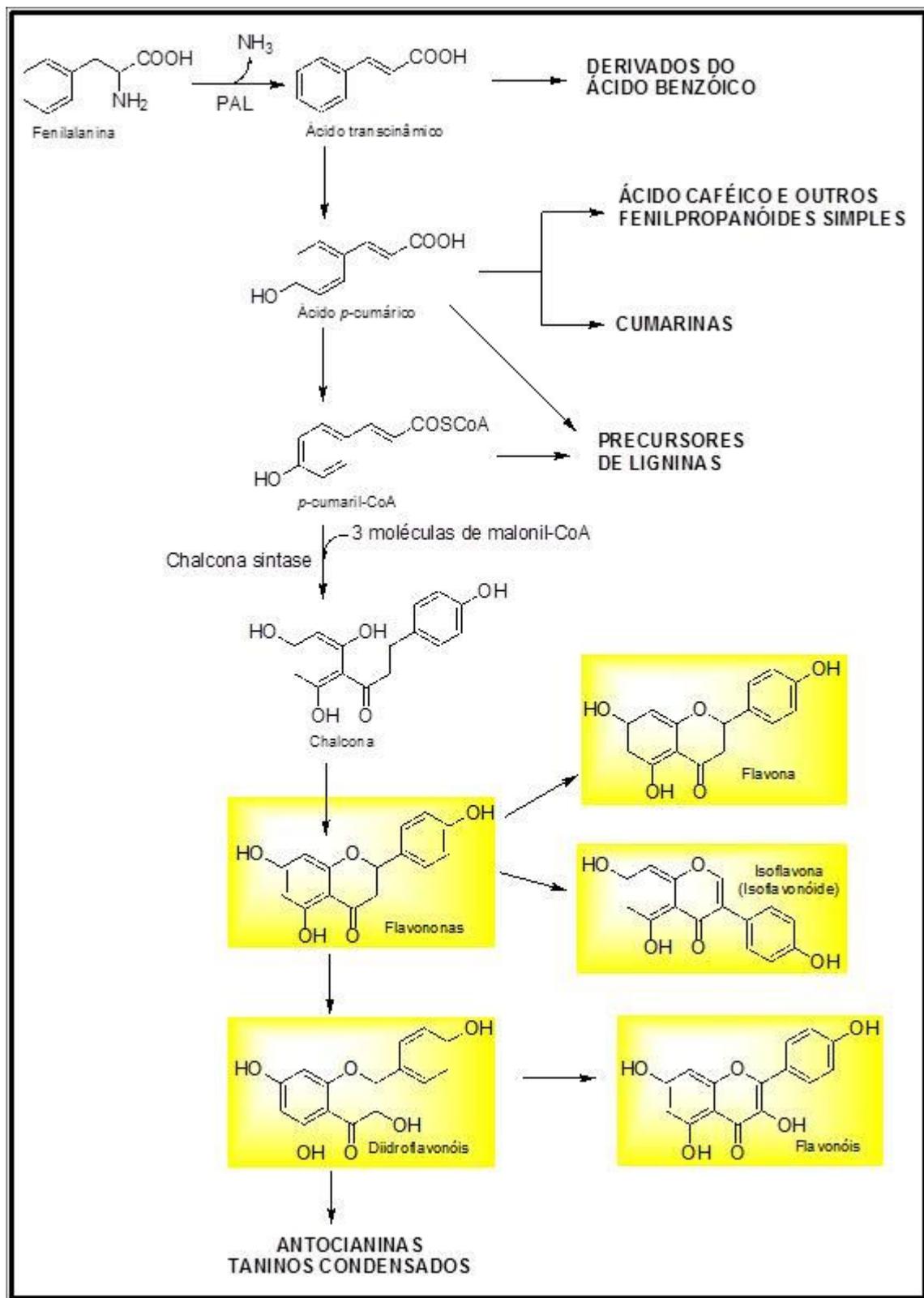
Flavonóides estão presentes em diversas partes das plantas como caules, folhas, raízes, sementes, cascas e pólen. Eles representam um dos principais grupos fenólicos e mais diversificados dentre os produtos naturais. O uso terapêutico de plantas contendo flavonóides é reconhecidamente importante. Diversas atividades biológicas são atribuídas a eles, como propriedades antiinflamatória, antiviral, antibacteriana, vasodilatadora, anticâncer, entre outras (Severi, 2010).

#### 3.2.2.1. Biossíntese de Flavonóides

Os flavonóides são biossintetizados através de uma via mista gerada pela combinação da via do acetato e do ácido chiquímico (Barbosa, 2010; Dôres, 2007; Karam *et al.*, 2013). O alongamento das substâncias C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> ocorre pela adição de duas unidades de carbono em cada etapa, o que é um procedimento comum em plantas. Origina-se assim as estilpironas (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> + 2x malonil-CoA), estilbenóides, flavonóides e isoflavonóides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> + 3x malonil-CoA). Em alguns casos, ocorre inicialmente uma  $\beta$ -oxidação formando (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) seguido da adição de (3x malonil-CoA), o que ocorre com as xantonas (Figura 4, página 10) (Dewick, 2006; Bruneton, 1995).

#### 3.2.3. Aspectos Farmacológicos da Família Bignoniaceae

Atividades farmacológicas e/ou biológicas têm sido atribuídas aos metabolitos ou plantas da família Bignoniaceae. Dentre elas podemos destacar, entre outras: atividade hipoglicêmica (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005), antiinflamatória (Ferreira *et al.*, 2000), antifúngica e antibacteriana (Gafner *et al.*, 1996; Lima *et al.*, 1962; Hussain *et al.*, 2007), antioxidante (Park *et al.*, 2003), antitumoral (Oliveira *et al.*, 1990), e antimalárico (Fonseca *et al.*, 2003; Hussain *et al.*, 2007).



**Figura 4.** Biossíntese de Flavonóides

**Fonte:** Taiz & Zeiger, 2004

### 3.3. Considerações Sobre o Gênero *Sparattosperma*

*Sparattoesperma* é um gênero neotropical pertencente a tribo Tecomeae da família Bignoniaceae (Pereira *et. al.*, 2007; Bittencourt, 2003). Este gênero é composto por duas espécies reconhecidas, *Sparattosperma catinae* A. H. Gentry e *Sparattosperma leucanthum* (Vell.) K. Schum (Lohmann, 2015).

O gênero *Sparattosperma* é encontrado no Brasil em diversos estados das regiões Norte, Nordeste, Sudeste e centro-oeste, nos domínios fitogeográficos Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (Lohmann, 2015). Suas plantas apresentam vários lobos (aproximadamente 5-7) cuja nervura mediana irradia de um único ponto (Groese *et. al.*, 2007).

### 3.4. Considerações sobre a espécie *Sparattosperma leucanthum*

A floração de um exemplar da espécie *Sparattosperma leucanthum* pode ser vista na Figura 5.



**Figura 5.** Fotografia das flores da *Sparattosperma leucanthum*

**Fonte:** Fern, 2014

### 3.4.1. Sinonímia Vulgar

A espécie *Sparattoesperma leucanthum* também é conhecida por seus nomes populares: “caroba-branca” (SP), “caroba-de-flor-branca”, “cinco-chagas”, “cinco-folhas” (ES, MG), “ipê-batata”, “ipê-bóia”, “ipê-branco” e “tarumã” (MS) (Lorenzi, 2000).

### 3.4.2. Sinonímia Científica

*S. vernicosum* Bur&Schum., *Bignonia leucantha* Vell., *S. lithontripticum* M., *Spathodeavernicosa* Cham., *Tecoma leucantha* All. e *T. subvernica* DC (Lorenzi, 2000).

### 3.4.3. Distribuição Geográfica

A espécie *Sparattosperma leucanthum* é nativa do Brasil, e consiste em uma planta semidecídua, heliófita, pioneira, indiferente às condições físicas do solo, característica de floresta pluvial da encosta atlântica. É também vastamente dispersa na floresta latifoliada semidecídua no Mato Grosso do Sul, onde apresenta um hábito invasor e é considerada planta daninha de pastagens. Na floresta pluvial é bastante frequente na zona da mata de Minas Gerais e norte do Espírito Santo. A espécie também tem ocorrência nos estados da Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo e Goiás em várias formações vegetais (Lorenzi, 2000).

### 3.4.4. Usos Populares

A madeira tem sua aplicação principalmente na construção naval, canoas, bordas de escalares, obras internas na construção civil, carpintaria e caixotaria. A espécie apresenta crescimento rápido, podendo ser empregada para plantios mistos em áreas degradadas e áreas de preservação permanente.

A árvore é bastante ornamental, tanto pelo seu florescimento como por sua copa de ramos pendentes; pode ser aproveitada no paisagismo em geral (Folli *et. al.*, 2005; Lorenzi, 2000).

### 3.4.5. Descrição Botânica

A *S. leucanthum* (Vell.) Schum., uma das espécies do gênero Sparattosperma, consiste em uma árvore de 6-14 m de altura e tronco descamante de 30-50 cm de diâmetro. Folhas compostas 5-digitadas, sustentadas por pecíolo de 6-12 cm. Folíolos de 10-15 cm de comprimento por 4-5 cm de largura (Lorenzi, 2000).

A madeira desta espécie apresenta-se leve (densidade 0,57 g/cm<sup>3</sup>), firme, dotada de fibras retas e superfície lúzida, de baixa durabilidade natural. Apresenta florescimento de março a janeiro, com floração branca e rósea não muito vistosas. Seus frutos amadurecem nos meses de agosto a novembro (Polatto *et. al.*, 2008; Lorenzi, 2000).

### 3.4.6. Aspectos Fitoquímicos

Segundo Costa & Leitão (2011) os principais constituintes químicos encontrados em *S. leucanthum* são os flavonóides 2',4',6'-triidroxi-4'-O- β- D-glicopiranosil diidrochalcona, pinocembrin-7-O-(neohesperidosideo) e pinocembrin-7-O-(6"-O-acetil) neohesperidosideo, que foram isolados através da técnica de cromatografia de gotas contracorrente do extrato em EtOAc das folhas.

### 3.5. Considerações Sobre *Artemia salina*

Os compostos bioativos são geralmente tóxicos quando em alta concentração. Por isso, uma avaliação da letalidade em um organismo menos complexo pode ser usada como uma forma de avaliação rápida e simples durante o fracionamento de extratos (Lhullier *et al.*, 2006). O teste de toxicidade frente a *Artemia salina* é um ensaio biológico considerado como uma das principais ferramentas para uma avaliação preliminar da toxicidade (Hocayen *et al.*, 2012).

A *Artemia Salina*, que é conhecida comumente como o “camarão de água salgada”, é um pequeno crustáceo que possui alta sensibilidade a diversos compostos. A espécie é capaz de estocar seus ovos por anos em temperatura ambiente e permite a obtenção de grande quantidade de larvas em 24-48h, por estas razões seu uso tem sido promovido como organismo teste para bioensaios (Harada, 2009).

O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*, é um ensaio biológico rápido, de baixo custo, que não requer ambiente asséptico, não requer equipamentos especiais e a quantidade de amostra é relativamente pequena (2-20 mg) (Meyer *et al.*, 1982; Dall’Stella, 2008). O bioensaio foi proposto por McLaughlin *et al.* (1995) para determinar a DL<sub>50</sub> (µg/mL) para substâncias puras e extratos. Os valores de DL<sub>50</sub> considerados ativos são ≤ 1000 µg/mL para extratos brutos e < 30 µg/mL para substâncias puras. O único parâmetro envolvido no ensaio é a vida ou morte dos microcrustáceos quando em contato com o material analisado, e os dados obtidos são facilmente tratados estatisticamente (Cavalcante *et al.*, 2000).

Vários trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida (Siqueira *et al.*, 1998; Kalegari, 2009).

### **3.6. Considerações sobre a Atividade Antioxidante**

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Os mecanismos de atuação dos antioxidantes podem ser diferenciados. Seus efeitos consistem na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos para produtos incapazes de formar radicais livres e produtos de decomposição. Há um interesse crescente em antioxidantes naturalmente encontrados em frutos e plantas para uso em fitoterápicos. Esses antioxidantes podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, inibidores de enzimas e como quelantes de metais (Vedana, 2008).

Um grande número de plantas aromáticas e medicinais contém compostos químicos que exibem propriedades antioxidantes, e estes efeitos devem-se principalmente aos compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos (Vedana, 2008).

Existem diversos métodos para determinação da atividade antioxidante em extratos e substâncias puras, dentre os mais utilizados encontra-se o método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Este método foi desenvolvido por Brand-Willams *et al.* (1995), e tem como base a redução da absorbância na região visível de comprimento de onda de 515 nm do radical DPPH• por antioxidantes (Welter *et al.*, 2007). O método baseia-se na transferência de elétrons, onde, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, o DPPH•, que possui cor púrpura, é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela; isto gera um conseqüente desaparecimento da absorção que pode ser observado facilmente pela mudança na coloração. Quanto maior o potencial oxidante da amostra, mais rápida será descoloração do DPPH (Nascimento *et al.*, 2011; Roginsky e Lissi, 2005).

As vantagens do método DPPH são:

- Avaliar uma grande quantidade de amostras em um período curto de tempo e rapidamente;
- Um método sensível que detecta pequenas concentrações do ativo testado;
- Permite avaliar antioxidantes lipofílicos, já que o solvente do processo é metanol ou etanol (Vedana, 2008).

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Equipamentos**

#### **4.1.1. Concentração dos Extratos Brutos e Frações**

A concentração dos extratos brutos e das frações obtidas foi realizada sob pressão reduzida em evaporador rotativo, Fisatom 802. As soluções aquosas foram liofilizadas em liofilizador Thermo Savant.

#### **4.1.2. Espectroscopia no Infravermelho**

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos utilizando-se pastilhas de KBr grau espectroscópico, com leituras na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  em um espectrômetro IRAffinity-1 Shimadzu.

#### **4.1.3. Espectroscopia na Região do Ultravioleta**

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

#### **4.1.4. Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas**

Os espectros de gás acoplados ao massas (CG-EM) foram obtidos em aparelhos GC-MS QP 5050 Shimadzu e GC-MS 5975C Inert XL EI/CI/MS Agilent Technologies.

#### **4.1.5. Ressonância Magnética Nuclear**

Os espectros de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio e Carbono 13 foram realizados em temperatura ambiente dissolvidas em metanol, dimetilsulfóxido ou clorofórmio deuterados, empregando-se tetrametilsilano

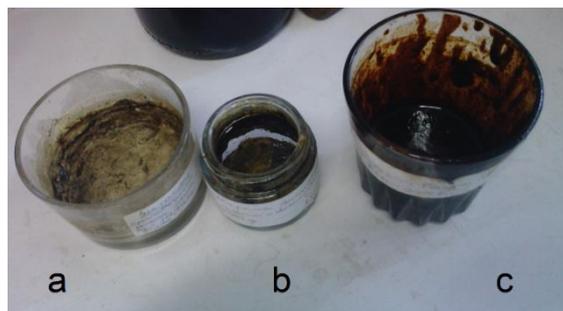
(TMS) como referência. Utilizou-se espectrômetro Bruker Ascend 500 MHz em campo de 500 MHz (RMN  $^1\text{H}$ ) e 125 MHz (RMN  $^{13}\text{C}$ ). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram indicados em ppm e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hertz (Hz).

## 4.2. Material Vegetal

A espécie *Sparattosperma leucanthum* foi coletada na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no município de Seropédica, localizado no Rio de Janeiro, RJ, em maio de 2010. A identificação da espécie foi feita por uma especialista em botânica. Inicialmente foi realizada a triagem do material coletado, quando foram separadas folhas e caule. O material vegetal (caule) foi diretamente submetido à secagem em temperatura ambiente durante 7 dias. Após seco, o caule foi moído em moinho de facas tipo Willey e o material pulverizado foi submetido à pesagem (1 kg do material seco foi utilizado) e maceração exaustiva com hexano, diclorometano e metanol.

## 4.3. Preparação dos Extratos Brutos

Os extratos brutos obtidos através da extração com os solventes hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e metanol ( $\text{MeOH}$ ) foram concentrados em evaporador rotatório, a aproximadamente  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , sob pressão reduzida, até obtenção de um resíduo. Os extratos brutos obtidos foram transferidos para frasco previamente tarados e mantido em capela de exaustão por, no mínimo, 48h. Esse procedimento forneceu 1,8 g de extrato em hexano, 2,9 g de extrato em diclorometano e 45,1 g de extrato em metanol (Figura 6).



**Figura 6.** Extratos brutos em hexano (a), diclorometano (b) e metanol (c).

#### **4.4. Testes Químicos para Identificação de Metabólitos Secundários**

##### **4.4.1. Testes Genéricos para Identificação de Triterpenos e Esteróides**

Para realização dos testes de identificação de triterpenos e esteróides, inicialmente pesou-se uma massa de 10,8 mg do extrato bruto em hexano, a qual foi diluída em 4,0 mL de metanol. A uma alíquota de 2,0 mL da solução mencionada, foram adicionados 10,0 mL de clorofórmio. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro e dividida igualmente em duas porções utilizando dois tubos de ensaio. No primeiro tubo (tubo 1) foi realizada a reação de Liebermann-Burchard e no segundo tubo (tubo 2) a reação de Salkowski.

➤ **Reação de Liebermann-Burchard (Bessa, 2007; Costa, 1994)**

Na preparação do reagente de Liebermann-Burchard, misturou-se 10 mL de anidrido acético e 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Em seguida, adicionou-se a mistura ao tubo de ensaio 1.

➤ **Reação de Salkowski (Bessa, 2007; Joly, 1998)**

Ao tubo 2 adicionou-se algumas gotas de ácido sulfúrico concentrado.

#### 4.4.2. Testes Químicos Para Fenólicos em Geral

Para todos os testes realizados para a identificação de compostos fenólicos, foi utilizado o extrato bruto em metanol do caule da *S. leucanthum*.

➤ Flavonóides Totais (Rio, 1996)

Preparou-se uma curva de calibração com o padrão de rutina em uma faixa de concentração de 7,5 a 15,0 µg/mL acrescida de 1,0 mL de solução de cloreto de alumínio (5,0 g de cloreto de alumínio em 100 mL e metanol) e tendo o volume completado para 50,0 mL. Após repouso de 30 minutos, realizou-se a leitura em 425 nm no espectrofotômetro de UV/Visível.

O preparo do branco foi feito adicionando-se 1,0 mL da solução de cloreto de alumínio 5% a 50,0 mL de metanol.

Foi preparada uma solução de 1,0 mg/mL do extrato metanólico e adicionou-se 1,0 mL da solução de cloreto de alumínio a 15,0 mL da solução do extrato, completando-se o volume com metanol até 50,0 mL em um balão volumétrico. Após repouso por meia hora, fez-se a leitura em espectrofotômetro. O resultado de absorvância obtido foi comparado com a curva de calibração da rutina, a fim de determinar-se a concentração de flavonóides.

➤ Reação com Cloreto Férrico (Shriner *et al.*, 1983)

Preparou-se uma solução alcoólica de FeCl<sub>3</sub> 5%. Em um tubo de ensaio adicionou-se cerca de 1,0 mL da solução extrativa diluída em metanol. A esta solução acrescentou-se 5,0 mL de água destilada e 1 gota da solução de cloreto férrico escorrendo pela parede do tubo. Analisou-se os resultados.

➤ Reação com Cloreto de Alumínio (Mouco e Cornelio, 2003)

Em um papel de filtro foram demarcadas duas áreas A e B. Nestas foram depositadas algumas gotas do extrato bruto metanólico (5,0 mg/mL). Em

seguida foi adicionada na área A uma gota de solução de cloreto de alumínio 5% em etanol. Após analisou-se as áreas sob luz ultravioleta.

➤ Reação com Hidróxido de Sódio (Mouco e Cornelio, 2003)

Em um tubo de ensaio foram adicionados 5,0 mL do extrato bruto diluído com água na proporção de 1:5 extrato/água, e a este foram adicionadas duas gotas de hidróxido de sódio 5%. Analisaram-se os resultados.

➤ Reação de Shinoda (Mouco e Cornelio, 2003)

Em um tubo de ensaio contendo uma pequena quantidade de magnésio metálico, foram adicionados 5,0 ml do extrato bruto metanólico dissolvido. A este foram adicionados 1,0 mL de ácido clorídrico. Analisaram - se os resultados.

#### **4.5. Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método do Sequestro do Radical Livre 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH) (Mensor *et al.*, 2001)**

As análises foram realizadas reagindo-se 1 mL de solução etanólica de DPPH 0,3 mM com 2,5 mL da amostra (extrato bruto) solubilizada em etanol nas seguintes concentrações 25,0; 50,0; 125,0 e 250,0 µg/mL. Após 30 minutos em repouso mediu-se as absorvâncias a 518 nm.

Todas as análises foram realizadas em triplicata. O branco foi preparado adicionando-se 2,5 mL de cada uma das soluções dos extratos acrescidos de 1,0 mL de etanol. O controle negativo foi feito com 1,0 mL de solução de DPPH e 2,5 mL de etanol. A leitura do branco foi realizada com 2,5 mL de solução das amostras mais 1,0 mL de etanol. Como padrão foi utilizado o flavonóide rutina, efetuando-se o mesmo procedimento realizado para os extratos brutos.

## **4.6. Ensaio Biológicos**

### **4.6.1. Letalidade Frente às Larvas do Microcrustáceo *Artemia salina* LEACH**

Na avaliação da citotoxicidade frente às larvas de *A. salina* foi utilizada a metodologia proposta por McLaughlin (McLaughlin *et al.*, 1982).

Inicialmente os cistos de *A. salina* foram introduzidos em um recipiente semelhante a um aquário, parcialmente protegido da luz e contendo água do mar. Após 48 em ausência de luz, ocorreu a eclosão dos cistos. As larvas então obtidas foram colocadas em contato com a amostra a ser analisada.

O extrato bruto metanólico do caule da *S. leucanthum* foi utilizado no bioensaio para o preparo de uma solução estoque solubilizada em água do mar/ DMSO 1% na proporção de 3:2 (v/v). A partir da solução estoque, foram feitas diluições para as seguintes concentrações 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 e 1 mg/mL. Foi utilizado como controle positivo o dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), e o controle negativo foi o branco (solução sem a presença da amostra). O ensaio foi realizado em triplicata e após 24 horas foi feita a contagem dos indivíduos mortos e vivos. Os dados obtidos foram tratados estatisticamente pelo método log-Probit e assim, realizou-se a determinação dos valores de  $DL_{50}$ , que é considerada ativa para extratos brutos, quando igual ou inferior a 1000  $\mu\text{g/mL}$  e inferior 30  $\mu\text{g/mL}$  para substância pura.

## **4.7. Fracionamento dos Extratos Brutos**

Visando o isolamento de constituintes dos extratos brutos do caule de *Sparattosperma leucanthum*, foram empregadas técnicas específicas para purificação de substâncias que estão descritas nos tópicos a seguir, assim como o procedimento geral.

### **4.7.1. Técnicas Cromatográficas Utilizadas no Processo de Isolamento**

As técnicas cromatográficas utilizadas durante este trabalho, no isolamento e análise das frações, foram a cromatografia em camada delgada

analítica, cromatografia em coluna de sílica gel 60G (0,063-0,200mm; 70-230 mesh ASMT, Merck), sílica gel 60G (0,04-0,063mm; 230-400 mesh ASMT, Merck), cromatografia em coluna *flash* (Merck), cromatografia em coluna de Sephadex-LH20 (Pharmacia).

A cromatografia em camada delgada analítica é útil para a observação da pureza e semelhança de amostras com base no fator de retenção das substâncias observadas. Ela é fundamental no processo de tomada de decisões a respeito das próximas técnicas que devem ser utilizadas no isolamento. As cromatografias que visam o isolamento dos compostos são chamadas preparativas. Estas possuem uma fase estacionária empacotada em coluna (aberta ou fechada) ou em superfície plana. No geral as cromatografias preparativas são desenvolvidas de acordo com as seguintes etapas:

- ❖ Montagem da coluna: Disposição adequada da fase estacionária na coluna ou placa. A fase estacionária varia de acordo com a técnica cromatográfica escolhida;
- ❖ Aplicação da amostra: Disposição da amostra sobre a fase estacionária. A amostra pode ser adicionada pura ou misturada com sílica gel, dependendo da cromatografia utilizada.
- ❖ Desenvolvimento: Esta etapa consiste na passagem do solvente (puro ou mistura) escolhido para trabalho. O solvente é a fase móvel que vai arrastar a amostra pela fase estacionária permitindo a separação das substâncias.
- ❖ Revelação e visualização: Nesta etapa uma pequena quantidade das frações obtidas é aplicada em cromatografia em camada delgada analítica para observação da composição de cada fração. Esta placa é revelada utilizando diversas soluções como vanilina sulfúrica, cloreto férrico, solução ácida de anisaldeído e reagente de dragendorf. A placa é então visualizada em luz ultravioleta com comprimentos de onda entre 254 e 365 nm.

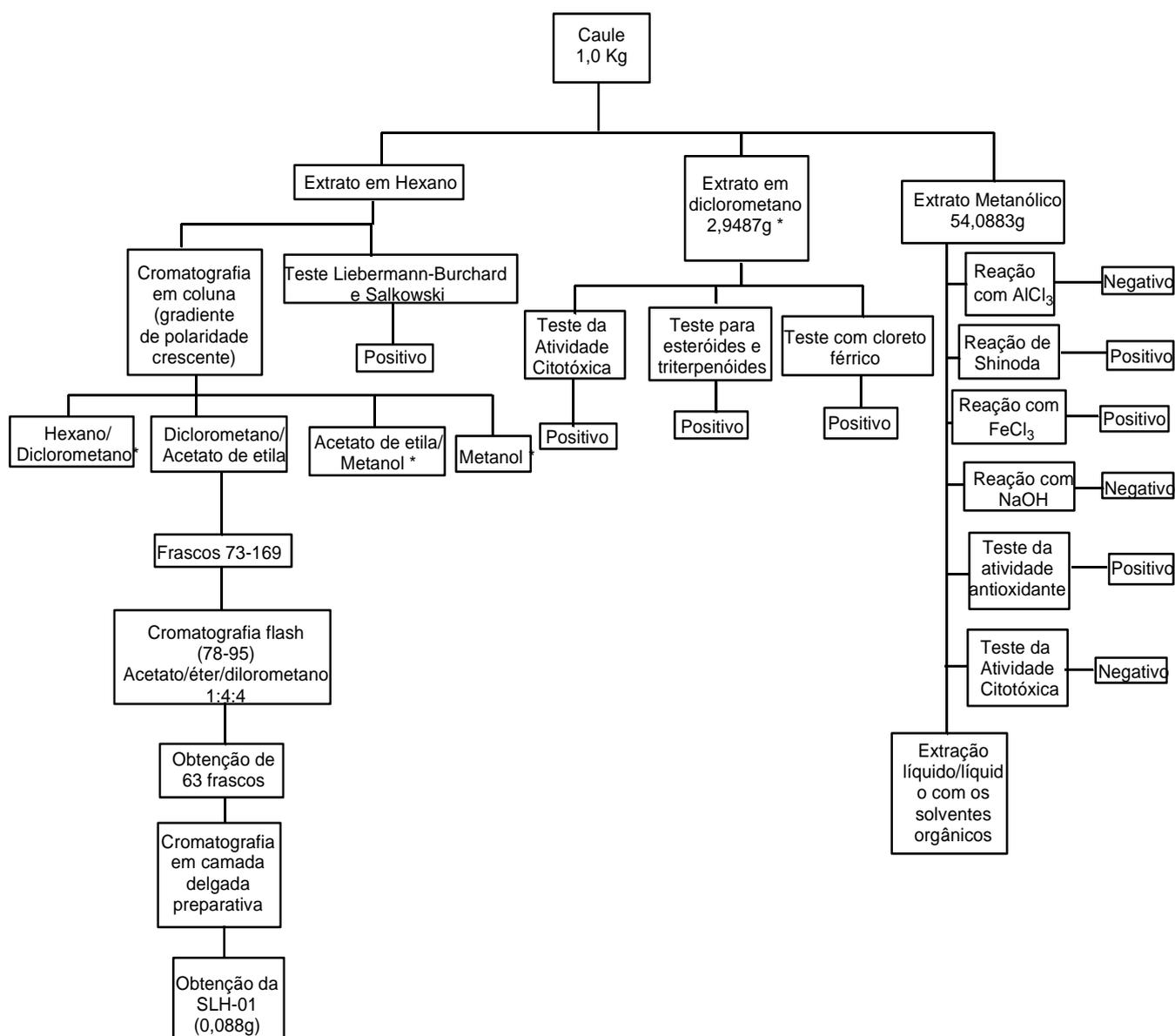
#### **4.7.2. Fracionamento do Extrato em Hexano**

O extrato hexânico foi submetido a fracionamento em coluna aberta de gel de sílica, utilizando-se um gradiente de polaridade crescente com os seguintes solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Esse

procedimento resultou em 201 frações. As frações foram reunidas de acordo com a semelhança no fator de retenção (RF) em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA).

As frações de número 78-95 foram reunidas e submetidas a purificação utilizando cromatografia em coluna fechada de gel de sílica tipo *flash* utilizando como eluente acetato de etila/éter de petróleo/clorofórmio na proporção 1:4:4.

Este procedimento resultou em 63 frações. A fração de número 8 a 38 foi reunida e submetida a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando o mesmo eluente utilizado na cromatografia *flash* até obtenção da substância SLH-01 (0,088g). O procedimento encontra-se resumido da Esquema 1, página 24.



**Esquema 1.** Fluxograma resumido do fracionamento parcial dos extratos brutos de *S. leucanthum*

\* Frações não trabalhadas ou sem apresentação de resultados.

### **4.7.3. Fracionamento do Extrato em Metanol**

O extrato em metanol (44,1 g) foi solubilizado em MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20) e submetido a extração líquido/líquido em funil de decantação utilizando os seguintes solventes: diclorometano, acetato de etila, butanol e água.

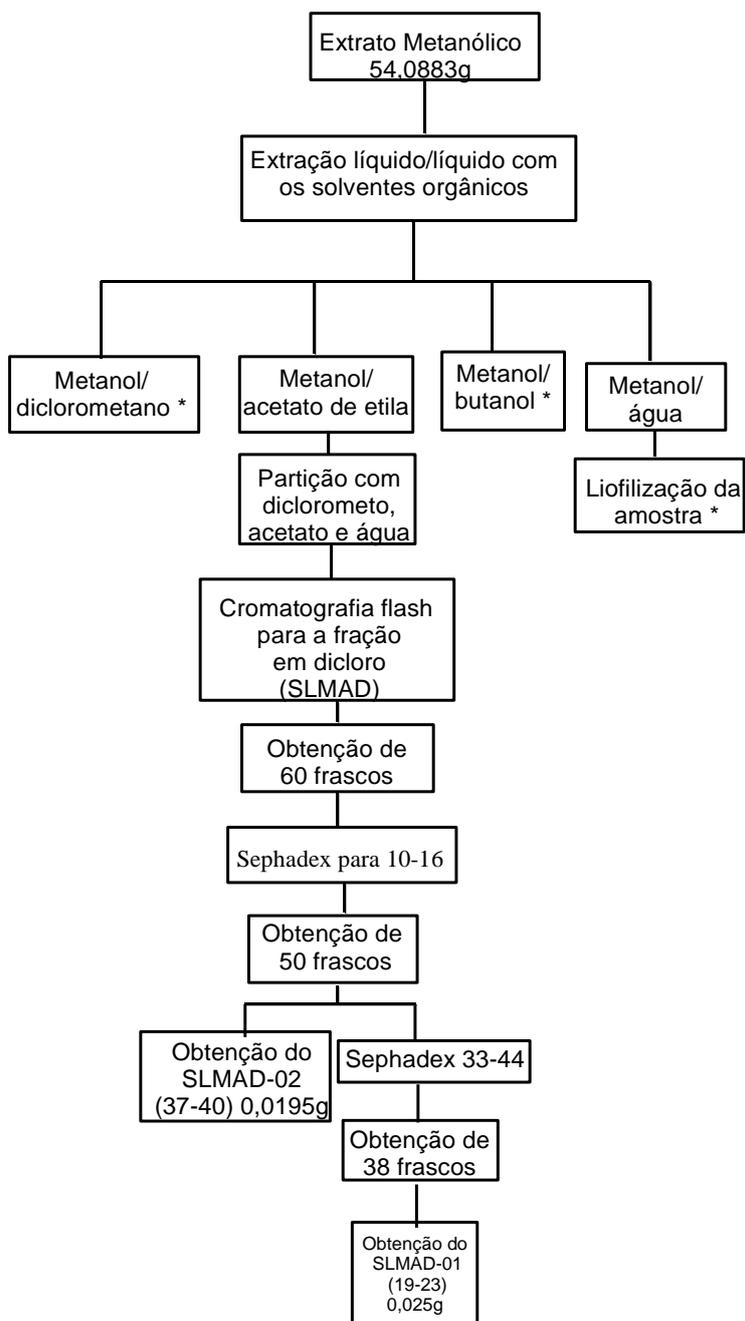
#### **4.7.3.1. Fração em Acetato de Etila**

Foi feita uma nova partição para esse extrato em diclorometano, acetato de etila e água.

##### **4.7.3.1.1. Partição em Diclorometano**

Foi realizada uma cromatografia flash para essa fração (2,87g) utilizando como eluente o acetato de etila, de onde foram obtidos 60 frascos.

Os frascos de número 10 a 16 (0,2427g) foram reunidos e utilizados em uma cromatografia em Sephadex-LH20, gerando 50 frascos. A união dos frascos de número 37 a 40 forneceu uma substância que foi codificada de SLMAD-02 (0,0145g). Ainda nesta coluna, as frações de número 33 a 36 e 41 a 44 foram reunidas e submetidas a nova coluna em Sephadex-LH20, obtendo-se 38 frascos. As frações de número 19 a 23 forneceram a substância SLMAD-01 (0,0025g). O procedimento encontra-se resumido da Esquema 2, página 25.



**Esquema 2.** Fluxograma resumido do fracionamento para o extrato metanólico.

\* Frações não trabalhadas ou sem apresentação de resultados.

## **5. Resultados e Discussão**

Visando identificar as principais classes de compostos secundários do caule de *S. leucanthum*, realizou-se um estudo fitoquímico do extrato hexânico, em diclorometano e metanol utilizando reagentes específicos de reconhecimento de triterpenos e esteroides, fenólicos em geral e flavonóides.

### **5.1. Testes Químicos Para Identificação de Metabólitos Secundários Nos Extratos Brutos do Caule de *S. leucanthum***

#### **5.1.1. Triterpenos e Esteróides**

Os terpenóides são os constituintes fundamentais dos óleos essenciais e possuem atividades biológicas como o fortalecimento do sistema imunológico e reparação dos tecidos.

Os testes mais comumente usados para a identificação de triterpenóides e esteroides são as reações de Liebermann-Burchard e de Salkowski. A reação de liebermann-Burchard consiste no tratamento da amostra com anidrido acético em presença de ácido acético e algumas gotas de ácido sulfúrico. Ocorre, assim, a desidratação seguida de oxidação do sistema de anéis do ciclopentanoperidrofenantreno dando formação a um esteróide aromático que é evidenciado pelo aparecimento de uma coloração azul esverdeada (Burke *et al.*, 1974; Xiong *et al.*, 2007). Na reação de Salkowski ocorre uma variação da coloração de amarelo a roxo sangue, devido à presença de um núcleo esteroidal (Rezende *et al.*, 2011).

Após a adição dos reagentes de Liebermann-Burchard e Salkowski nos extratos hexânico e diclorometânico, houve, respectivamente o surgimento de uma cor verde para o primeiro reagente e uma intensificação da cor amarelada para o segundo. Os resultados obtidos para os testes mencionados encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados dos testes químicos de identificação de triterpenos e esteroides

Extrato	Teste Químico	Resultado
<b>Hexânico</b>	Reação de Liebermann-Burchard	Positivo
	Reação de Salkowski	Positivo
<b>Diclorometânico</b>	Reação de Liebermann-Burchard	Positivo
	Reação de Salkowski	Positivo

### 5.1.2. Fenólicos Totais e Flavonóides

Flavonóides são compostos polifenólicos naturais que constituem uma das classes de compostos mais características de plantas superiores.

Diversas técnicas são utilizadas para quantificar os flavonóides em uma amostra. No entanto, muitas delas não possuem a sensibilidade necessária para realizar esta análise em matrizes mais complexas, como os extratos vegetais, em gerar interferência no analito. Uma das técnicas mais utilizadas para evitar a interferência de outros compostos fenólicos na análise de flavonóides é a empregação do método colorimétrico com cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ). Os cátions  $Al^{3+}$  formam complexos estáveis com as hidroxilas livres presentes nos flavonóides, o que gera um aumento do sistema conjugado e, portanto, um desvio dos máximos de absorção para regiões de maiores comprimentos de onda (desvio batocrômico) (Buriol *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2012).

As reações com cloreto férrico permitem a identificação da presença de substâncias fenólicas. A mudança de coloração pode variar entre verde, azul, amarelo-castanho e violeta, dependendo do tipo do composto (Mouco *et al.*, 2003).

A reação de Shinoda também permite a identificação genérica de flavonóides. O desenvolvimento de uma coloração rósea-avermelhada indica a presença de flavonóis, a cor violeta indica flavanonas e a cor laranja indica a presença de flavonas (Mouco *et al.*, 2003).

A reação com hidróxido de sódio permite a confirmação da presença de flavonóides através do surgimento de uma coloração amarela (Viana *et al.*, 2012). Os resultados obtidos para os testes mencionados podem ser observados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Resultados dos testes químicos de identificação de fenólicos em geral e flavonóides

<b>Testes Químicos</b>	<b>Resultados Extrato Diclorometânico</b>	<b>Resultados Extrato Metanólico</b>
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Positivo	Positivo
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	-	Negativo
<b>NaOH</b>	-	Negativo
<b>Shinoda</b>	-	Positivo

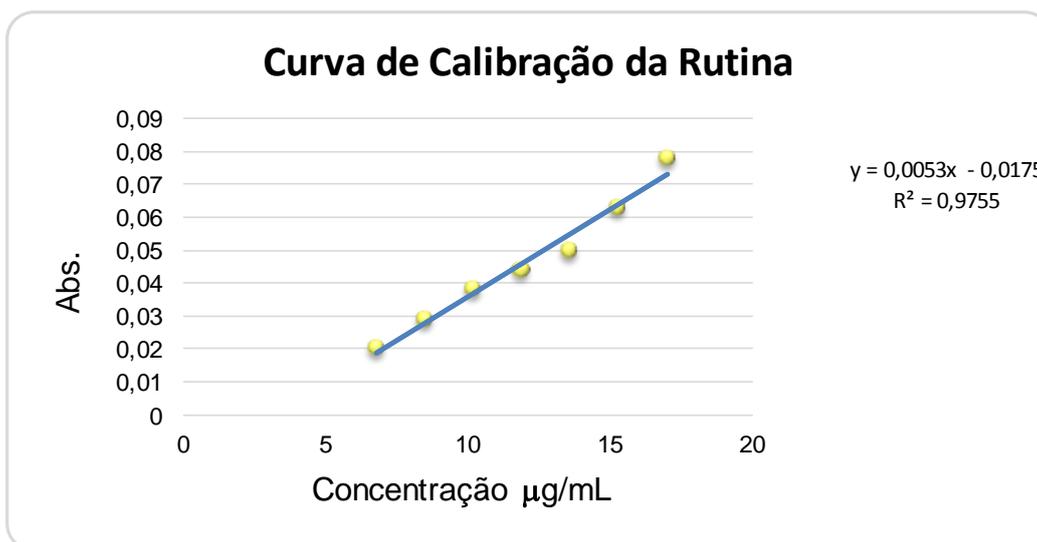
A reação com cloreto férrico apresentou a formação de um precipitado e uma coloração esverdeada indicando a presença de fenólicos em geral. A reação de Shinoda indica a presença de flavonóides em geral, a coloração alaranjada que resultou é um indicativo da presença de flavonas.

## 5.2. Avaliação do Teor de Flavonóides Totais

Para a realização do teste foi preparada inicialmente soluções de diferentes concentrações do padrão de rutina. As absorvâncias destas soluções foram medidas a 425 nm e os resultados podem ser observados na Tabela 4. A curva de calibração apresenta-se no Gráfico 1. Através dela pôde-se obter a equação da reta  $y = 0,0053x - 0,0175$  com um coeficiente de linearidade  $R^2 = 0,9755$ .

**Tabela 4.** Resultado das absorvâncias encontradas para o padrão de rutina no teste do Teor de Flavonóides Totais

Concentração da Rutina	Absorbância
6,8 µg/mL	0,02
8,5 µg/mL	0,029
10,2 µg/mL	0,038
11,9 µg/mL	0,044
13,6 µg/mL	0,05
15,3 µg/mL	0,063
17 µg/mL	0,078



**Gráfico 1.** Curva de calibração para o padrão de rutina.

Após a obtenção da curva de calibração para o padrão de rutina, realizou-se a medida da absorvância da amostra do extrato metanólico em triplicata. Os resultados encontram-se na Tabela 5.

**Tabela 5.** Resultado das absorvâncias encontradas para o extrato metanólico no teste do Teor de Flavonóides Totais

MeOH	Absorbância
Frasco 1	0,011
Frasco 2	0,010
Frasco 3	0,011
<b>Média das absorvâncias: 0,0106</b>	

Utilizando a equação da reta obtida na curva de calibração com a rutina e o valor médio das absorvâncias encontradas para o extrato metanólico, é possível determinar a concentração de flavonóides presente no extrato. Foi obtido como resultado para esse teste, uma concentração de flavonóides igual a 5,3 µg/mL. O resultado obtido indica um alto potencial antioxidante para o extrato.

### 5.3. Avaliação da Atividade Antioxidante (Método do DPPH)

Na avaliação da atividade antioxidante aplicou-se um método indireto. O ensaio está caracterizado por uma reação de oxirredução entre o oxidante e o antioxidante (Tomei & Salvador, 2007)

Neste teste todas as soluções analisadas são medidas a temperatura ambiente. A utilização de temperatura ambiente elimina o risco de degradação térmica das substâncias.

O mecanismo da reação entre o antioxidante e o DPPH depende da conformação estrutural do antioxidante. Algumas substâncias reagem rapidamente com o DPPH, reduzindo um número igual de moléculas de DPPH equivalente ao número de grupos hidroxilas presente. Por outro lado, para a maioria das substâncias a reação é lenta, sugerindo um mecanismo mais complexo (Bondet *et al.*, 1997).

Para realização da análise, inicialmente foi construída uma curva de calibração com diferentes concentrações do padrão de DPPH versus as absorbâncias respectivas. A seguir foram preparadas soluções de concentração conhecida com o padrão rotina, o qual fez-se reagir com o DPPH. Essas soluções tiveram suas absorbâncias medidas. O mesmo procedimento foi realizado para a amostra do extrato bruto metanólico da *S. leucanthum*. Após a medida das absorbâncias em espectrofotômetro, efetuou-se o cálculo da porcentagem de atividade antioxidante, utilizando a equação 1. Os resultados obtidos devem ser apresentados em concentração efetiva 50% (EC<sub>50</sub>).

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

**Equação 1:** Equação para cálculo da porcentagem de atividade antioxidante

Os valores de concentração efetiva encontrados para o extrato em metanol uma EC<sub>50</sub> = 19,04 µg/mL, enquanto o padrão (flavonóide rutina) apresentou EC<sub>50</sub> = 9,55 µg/mL. Observa-se que o resultado encontrado para o extrato bruto em metanol é superior ao encontrado para a rutina, o que nos mostra o potencial das substâncias presentes nos extratos e incentiva o processo de isolamento e identificação.

## 5.4. Ensaio Biológicos

### 5.4.1. Atividade Citotóxica Frente às Larvas de *Artemia salina*

Na avaliação preliminar da atividade citotóxica frente às larvas de *A. salina* os resultados obtidos para os extratos diclorometânico e metanólico foram tratados estatisticamente com o método log-Probit. Isto gerou um valor de DL<sub>50</sub> > 1000 µg.mL<sup>-1</sup> para o extrato metanólico e DL<sub>50</sub> = 289,4 µg.mL<sup>-1</sup> para o extrato diclorometânico.

Segundo McLaughlin e colaboradores (1982) valores de DL<sub>50</sub> ≤ 1000 µg.mL<sup>-1</sup> são considerados ativos para extratos brutos. Assim sendo, apenas o extrato em diclorometano apresenta atividade citotóxica.

## 5.5. Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos Isolados e/ou Identificados dos Extratos Brutos de *S. leucanthum*

### 5.5.1. Extrato Hexânico do Caule de *S. leucanthum*

Após a obtenção dos resultados dos testes realizados para o extrato hexânico, uma alíquota do mesmo (1,8 g) foi submetida a fracionamento utilizando os procedimentos descritos no item 4.7.2., página 22. Desse extrato foi isolada a amostra SLH-01 (Esquema 1, página 24).

#### 5.5.1.1. Amostra SLH-01

A amostra SLH-01 (88,0 mg) apresentou-se como um sólido branco solúvel em clorofórmio.

As primeiras informações estruturais para essa amostra foram obtidas através do cromatograma obtido na análise por CG/EM, onde se observa a existência não de uma, mas de cinco substâncias (Figura 7), com tempos de retenção de 8,84 min., 10,08 min., 19,27 min., 19,89 min e 21,02 min. O espectro de massas para a substância SLH-01a com o tempo de retenção 8,84 min. (Figura 7), apresenta o pico do íon molecular em  $m/z$  256 [M.+] (Figura 8). O espectro de massas para a substância SLH-01b com o tempo de retenção 10,08 min. (Figura 7), apresenta o pico do íon molecular em  $m/z$  284 [M.+] (Figura 9). O espectro de massas para a substância SLH-01c com o tempo de retenção 19,27 min. (Figura 7), apresenta o pico do íon molecular em  $m/z$  400 [M.+] (Figura 10, página 35). A substância SLH-01d com o tempo de retenção 19,89 min. (Figura 7), apresenta o pico do íon molecular em  $m/z$  412 [M.+] (Figura 11, página 35), enquanto que para a substância SLH-01e com tempo de retenção 21,02 min. (Figura 7), o pico do íon molecular ocorre em  $m/z$  414 [M.+] (Figura 12, página 36).

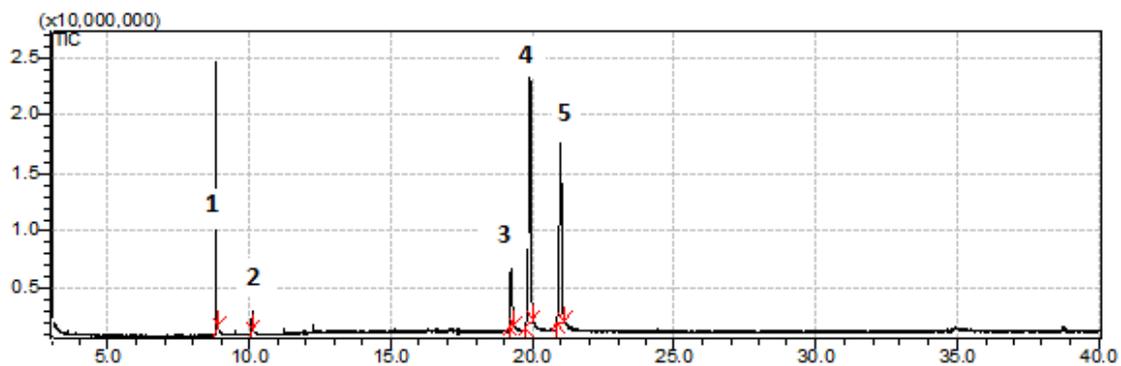


Figura 7. Cromatograma da mistura de substâncias SLH-01

Tabela 6. Picos obtidos no CG/EM da mistura de substâncias SLH-01

Pico	T <sub>R</sub>	m/z	Área %	Substância
1	8,841	256	12,01	Ácido Hexadecanóico
2	10,081	284	1,35	Ácido Octadecanóico
3	19,276	400	9,63	Campesterol
4	19,894	412	43,77	Estigmasterol
5	21,019	414	33,24	Sitosterol

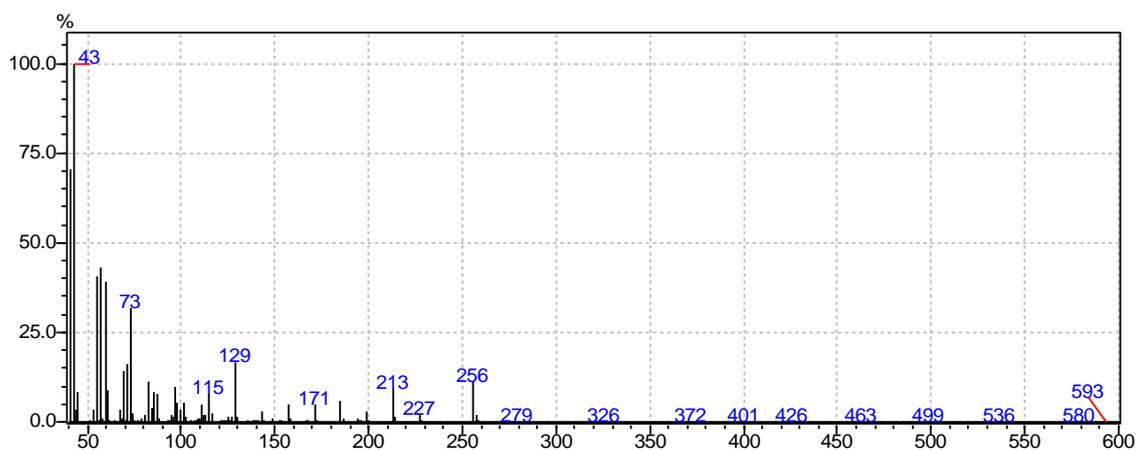
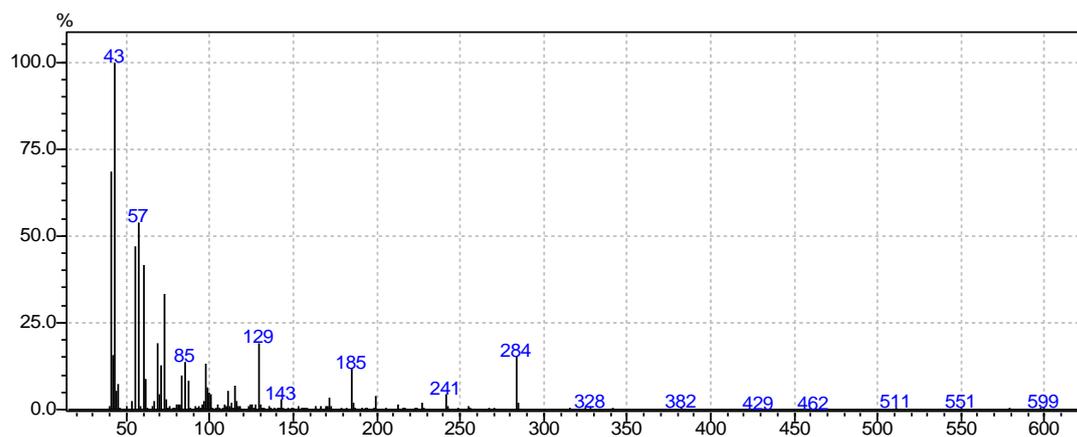
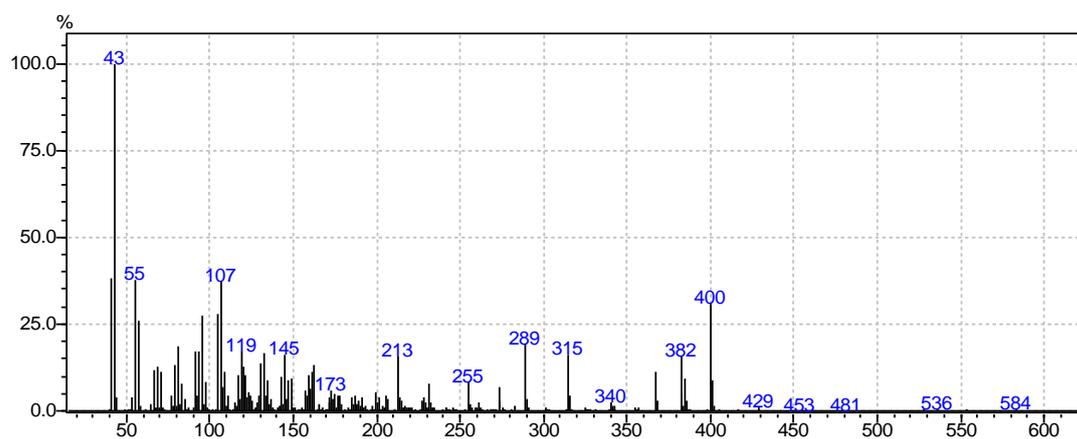


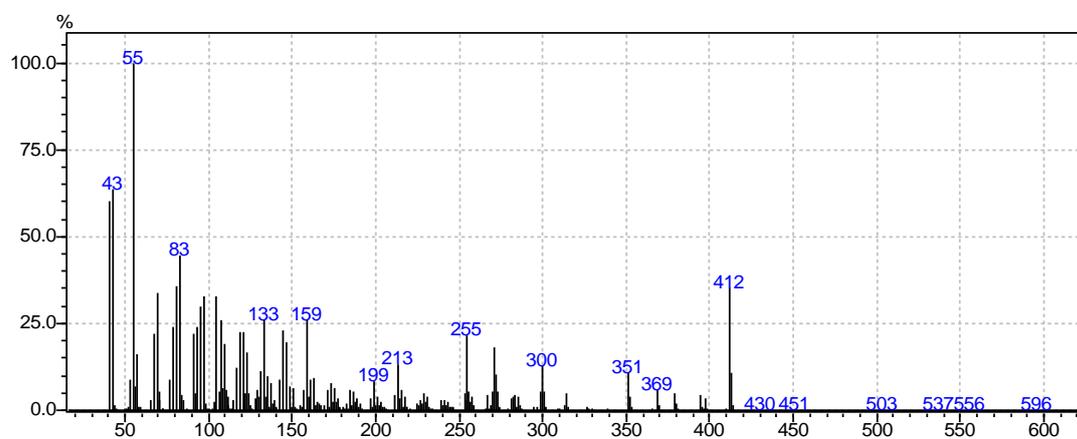
Figura 8. Fragmentograma 70 eV da substância SLH-01a - Ácido hexadecanóico



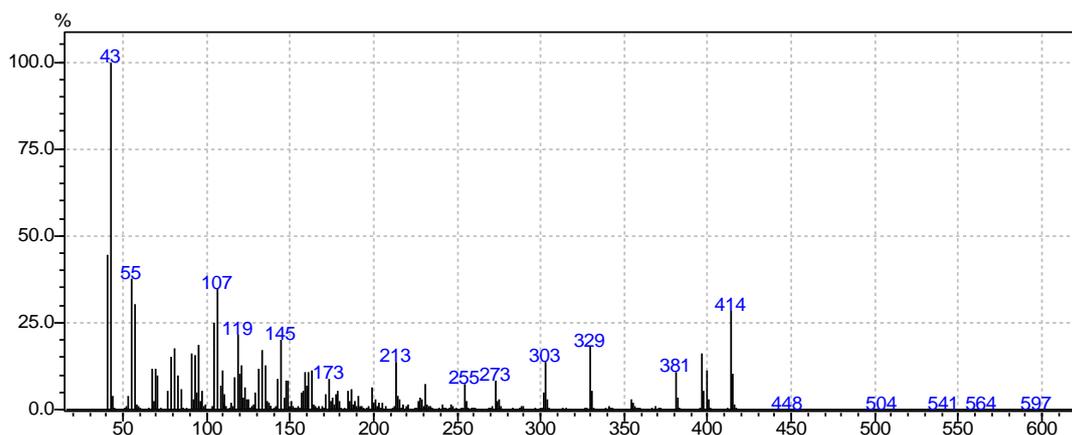
**Figura 9.** Fragmentograma 70 eV da substância SLH-01b - Ácido octadecanóico



**Figura 10.** Fragmentograma 70 eV da substância SLH-01c - Campesterol

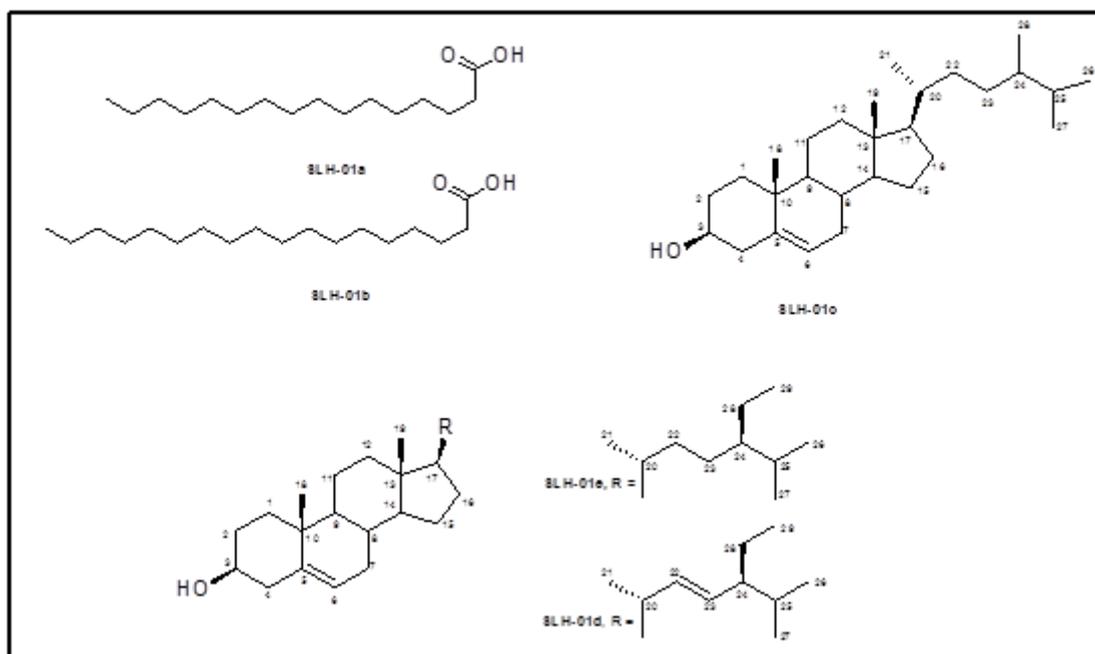


**Figura 11.** Fragmentograma 70 eV da substância SLH-01d - Estigmasterol



**Figura 12.** Fragmentograma 70 eV da substância SLH-01e – Sitosterol

O conjunto desses dados caracteriza, a princípio, tratar-se da mistura dos ácidos graxos de cadeia longa ácido hexadecanóico (SLH-01a) e ácido octadecanóico (SLH-01b) e dos esteróides campesterol SLH-01c, estigmasterol SLH-01d e sitosterol SLH-01e (Figura 13).

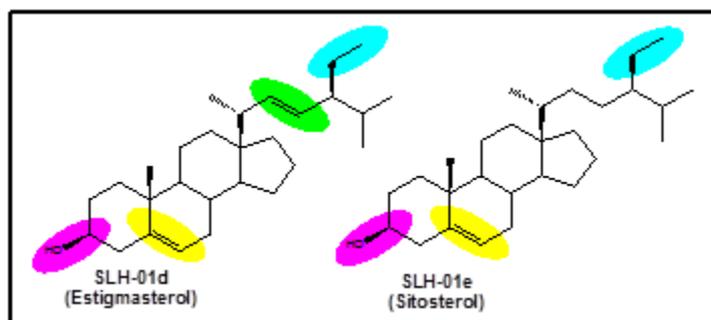


**Figura 13.** Estrutura da mistura de substâncias SLH-01





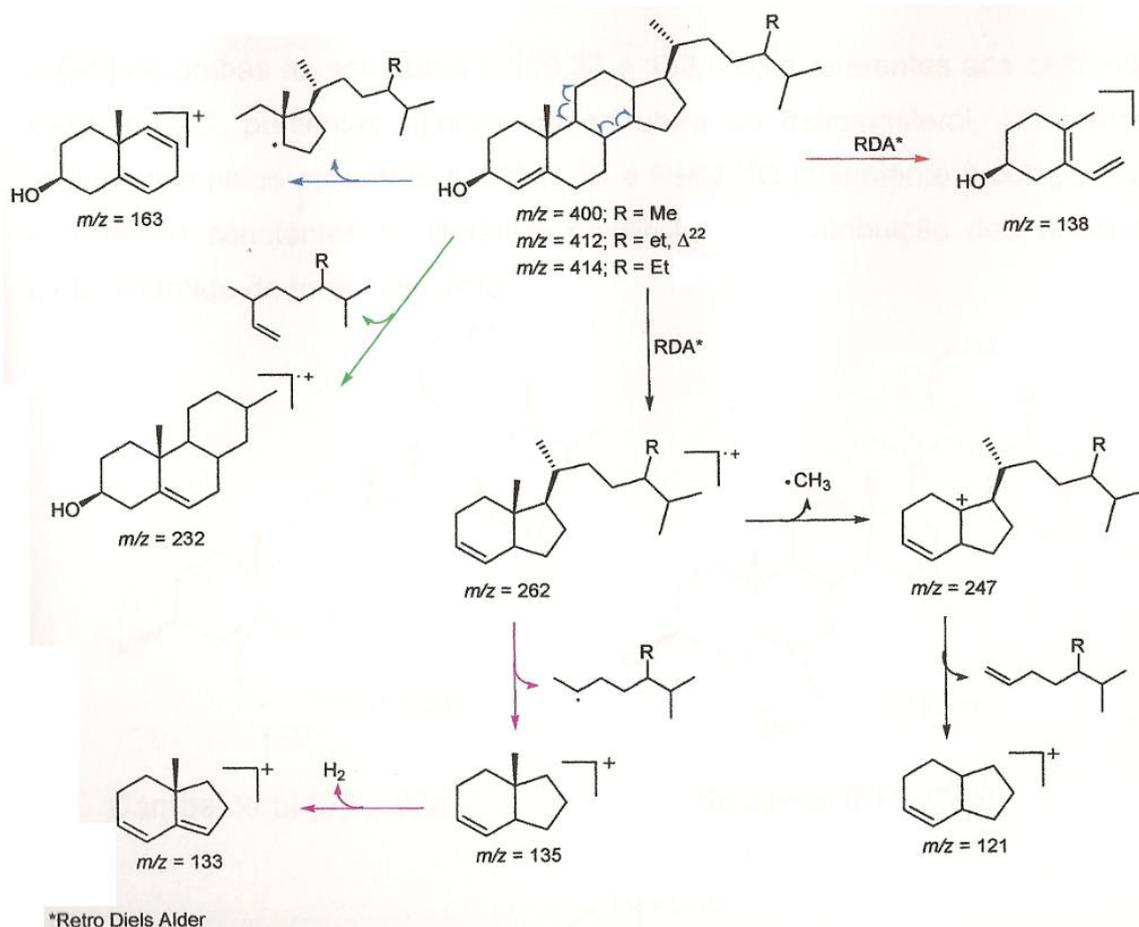
C-28 da substância SLH-01e, a presença dessa na mistura de substâncias só pode ser confirmada através da análise do espectro de CG/EM onde se verifica a presença de uma substância com m/z 400. As similaridades estruturais estão resumidas na Figura 17.



**Figura 17.** Similaridades estruturais entre SLH-01d e SLH-01e

A confirmação que a amostra SLH-01 trata da mistura de esteróides estigmasterol (SLH-01d), sitosterol (SLH-01e) e campesterol (SLH-01c) foi feita através de comparação com dados espectrais constantes da literatura (Jutiviboonsuk *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 1998).

Na Figura 18 são mostrados alguns fragmentos de massa propostos para a mistura de substâncias SLH-01.



**Figura 18.** Principais fragmentos de massa propostos para a mistura de substâncias SLH-01

### 5.5.2. Extrato Metanólico do Caule de *S. leucanthum*

Após a obtenção dos resultados dos testes realizados para o extrato metanólico, uma alíquota do mesmo (aproximadamente 54,0 g) foi submetida a fracionamento utilizando os procedimentos descritos no item 4.7.3., página 25. Desse extrato foram isoladas as substâncias SLMAD-01 e SLMAD-02 (Esquema 2, página 26).

### 5.5.2.1. Substância SLMAD-01

A substância SLMAD-01 (25 mg) apresentou-se como um sólido branco solúvel em metanol.

Os dados espectrais (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) da substância SLMAD-01 mostrou tratar-se de um flavonóide. Com base no valor de absorção no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 19 e 20) do H-3 do anel C a  $\delta_{\text{H}}$  6,83 (1H, s) foi possível inferir tratar-se da subclasse das flavonas.

O anel **A** foi caracterizado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  pelos sinais a  $\delta_{\text{H}}$  6,38 (1H, sl) e  $\delta_{\text{H}}$  6,66 (1H, sl) referentes aos hidrogênios H-6 e H-8 em acoplamento *meta*. O anel **B** foi caracterizado pelos sinais referentes aos hidrogênios H-2'/H-6' a  $\delta_{\text{H}}$  7,88 (*sl*, 1H) e H-3'/H-5' a  $\delta_{\text{H}}$  6,96 (*sl*, 1H).

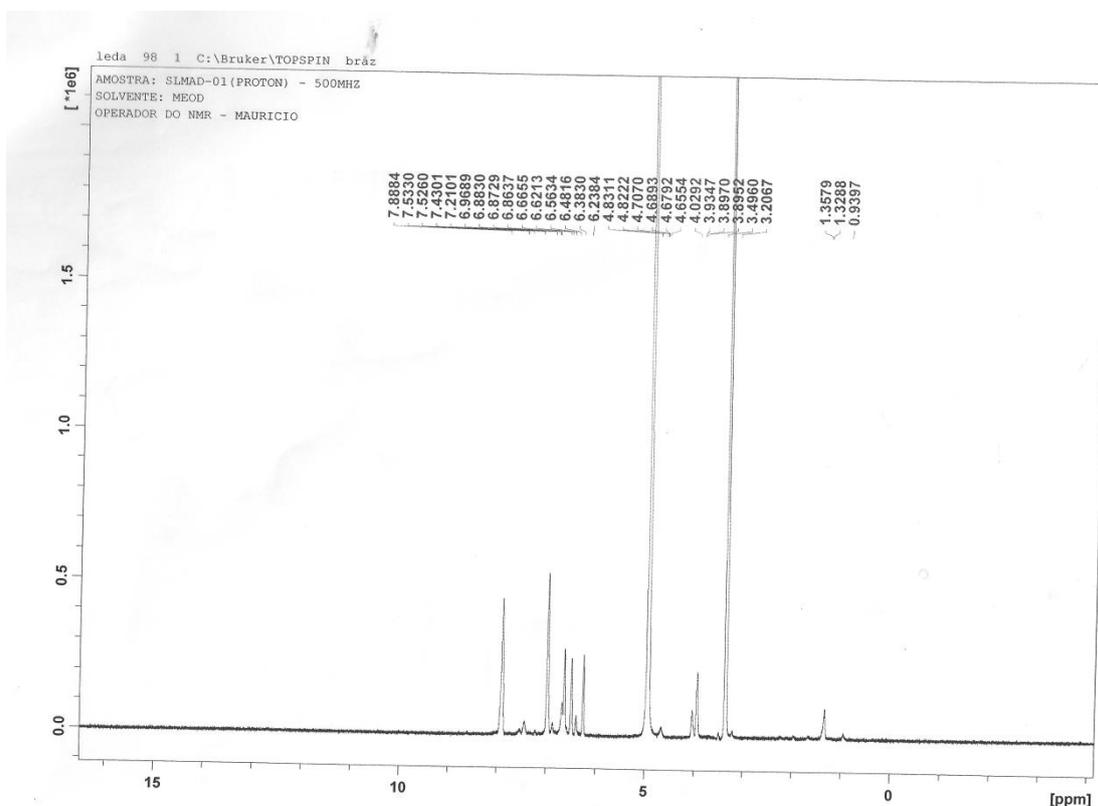
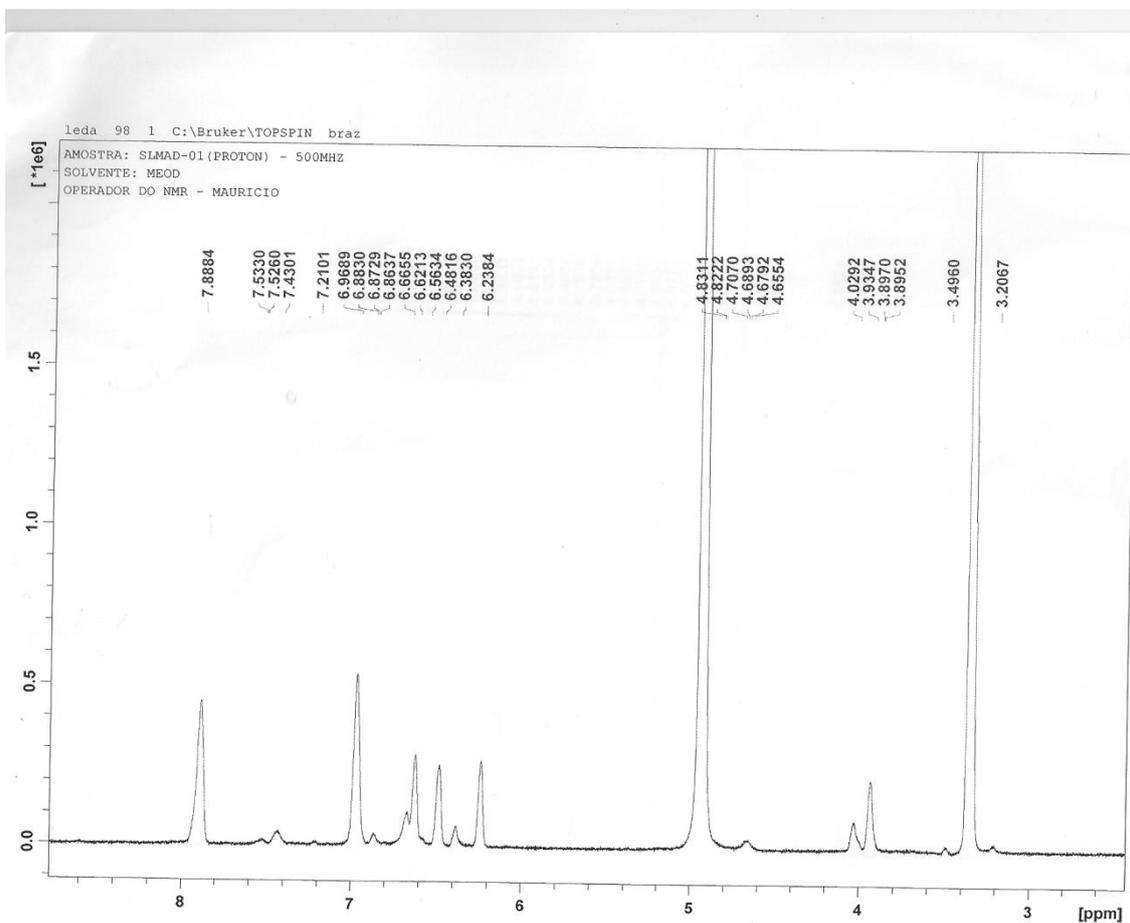


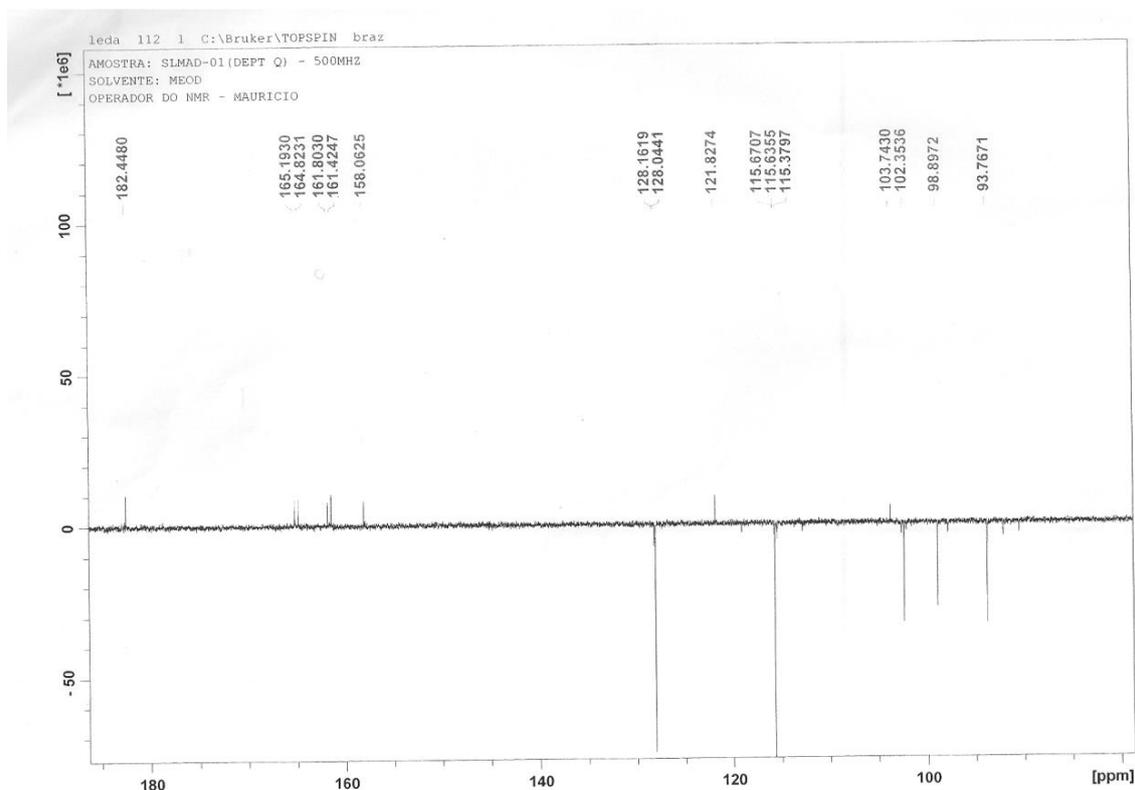
Figura 19. Espectro de RMN- $^1\text{H}$ , 500 MHz, MeOD de SLMAD-01



**Figura 20.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$ , 500 MHz, MeOD de SLMAD-01 (ampliação)

O espectro de RMN $^{13}\text{C}$  (Figura 21) confirmou a presença da carbonila em C-4  $\delta_c$  182,44 em ligação de hidrogênio com a hidroxila ligada em C-5.

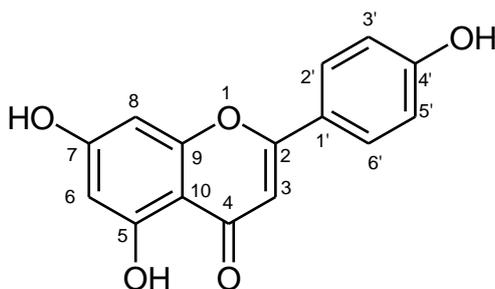
Os demais deslocamentos químicos de SLMAD-01 estão resumidos na Tabela 7 (página 46).



**Figura 21.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (DEPTQ), 125 MHz, MeOD de SLMAD-01

A estrutura da substância SLMAD-01 encontra-se na Figura 22. Trata-se do flavonóide 5,7,4'-tridroxiflavona já conhecido na literatura, e, pelo melhor do nosso conhecimento, sendo relatado pela primeira vez no gênero *Sparattosperma*.

A classe dos flavonóides é reconhecidamente importante por apresentar propriedades antiinflamatória, antiviral, antibacteriana, vasodilatadora, anticâncer, entre outras.



**Figura 22.** Estrutura da substância SLMAD-01 - 5,7,4'-tridroxiflavona

**Tabela 7.** Dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a substância SLMAD-01

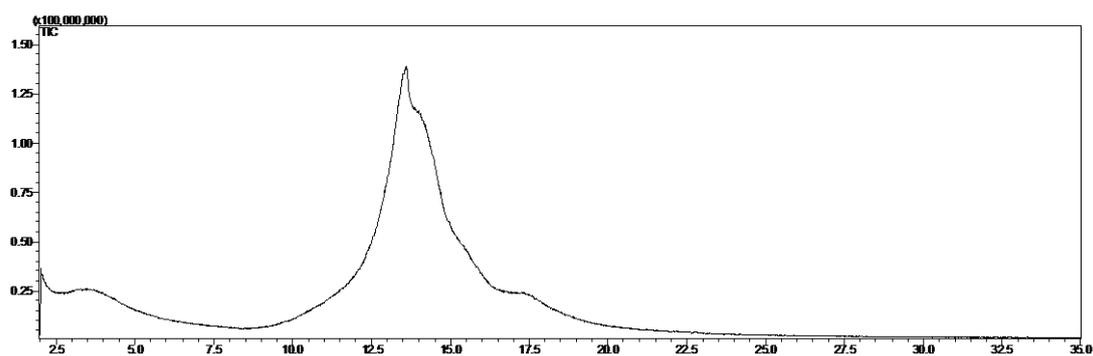
Dados da Amostra			Literatura	
<b>C</b>	$\delta_c$	$\delta_H$	$\delta_c$	$\delta_H$
<b>2</b>	164,82	-	164,07	-
<b>3</b>	128,16	6,86 (s)	130,03	6,82 (s)
<b>4</b>	182,44	-	181,95	-
<b>5</b>	161,42	-	161,30	-
<b>6</b>	98,89	6,38 (sl)	97,96	6,32 (sl)
<b>7</b>	158,06	-	156,13	-
<b>8</b>	93,77	6,66 (sl)	92,67	6,71 (sl)
<b>9</b>	158,06	-	157,24	-
<b>10</b>	103,74	-	104,68	-
<b>1'</b>	121,82	-	121,09	-
<b>2'</b>	128,04	7,88 (sl)	128,57	7,94 (sl)
<b>3'</b>	115,67		115,99	6,92 (d)
<b>4'</b>	161,42	-	161,22	-
<b>5'</b>	115,67	6,96 (sl)	115,99	6,92 (d)
<b>6'</b>	128,04	7,88 (sl)	128,52	7,94 (d)
<b>OH</b>	-	-	-	12,55 (s)

(Silva *et al.*, 2009)

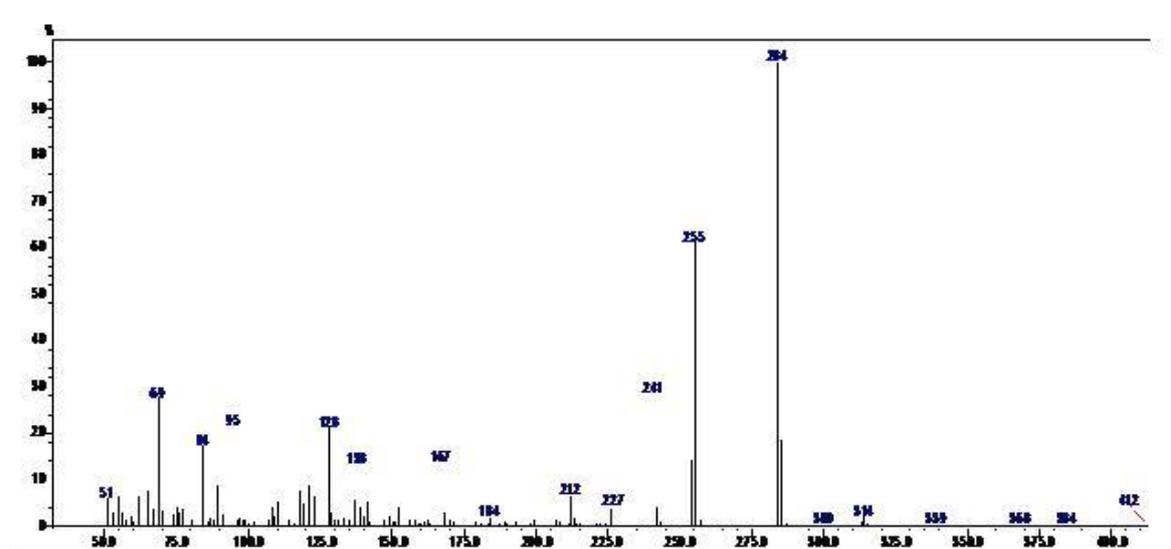
### 5.5.2.2. Substância SLMAD-02

A substância SLMAD-02 (19,5 mg) apresentou-se como um sólido amarelado solúvel em metanol.

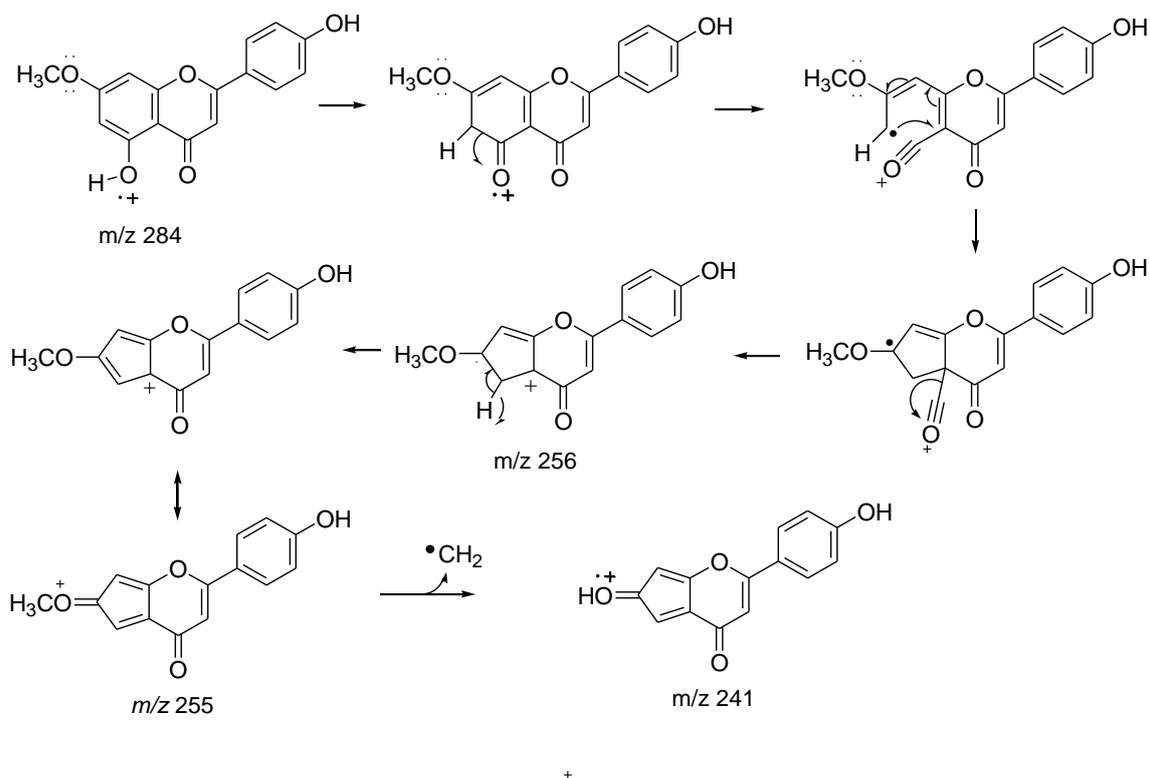
O espectro de massas (inserção direta) da substância SLMAD-02 apresentou íon molecular (abundância de 100%) a 285 u.m.a. e compatível com a fórmula molecular  $C_{16}H_{12}O_5$  (Figura 24). Os principais fragmentos propostos para a substância encontram-se na Figura 25.



**Figura 23.** Espectro de massas (Inserção direta) Ionização eletrônica 70 ev da substância SLMAD-02



**Figura 24.** Fragmentograma de massas da substância SLMAD-02



**Figura 25.** Principais fragmentos propostos para a substância SLMAD-02

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de SLMAD-02 também apresentou sinal característico de H-3 de flavona à  $\delta_{\text{H}}$  6,38 (1H, s) (Figuras 26 e 27).

O anel **A** foi caracterizado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  pelos sinais a  $\delta_{\text{H}}$  6,37 (1H, s) e  $\delta_{\text{H}}$  6,77 (1H, s) referentes aos hidrogênios H-6 e H-8 em acoplamento *meta*. O anel **B** foi caracterizado pelos sinais referentes à os hidrogênios H-2'/H-6' a  $\delta_{\text{H}}$  7,96 (1H, *d*,  $J=9$  Hz) e H-3'/H-5' a  $\delta_{\text{H}}$  6,93 (1H, *d*,  $J=8,8$  Hz).

A presença de um grupamento metoxila foi confirmada pelo sinal a  $\delta_{\text{H}}$  3,56 (3H, s)

O espectro de correlação homonuclear COSY (Espectro 32) confirmou as relações de acoplamento entre os hidrogênios H-6/H-8 (anel A) e entre os hidrogênios H-2'/H-3' e H-5'/H-6' (anel B).

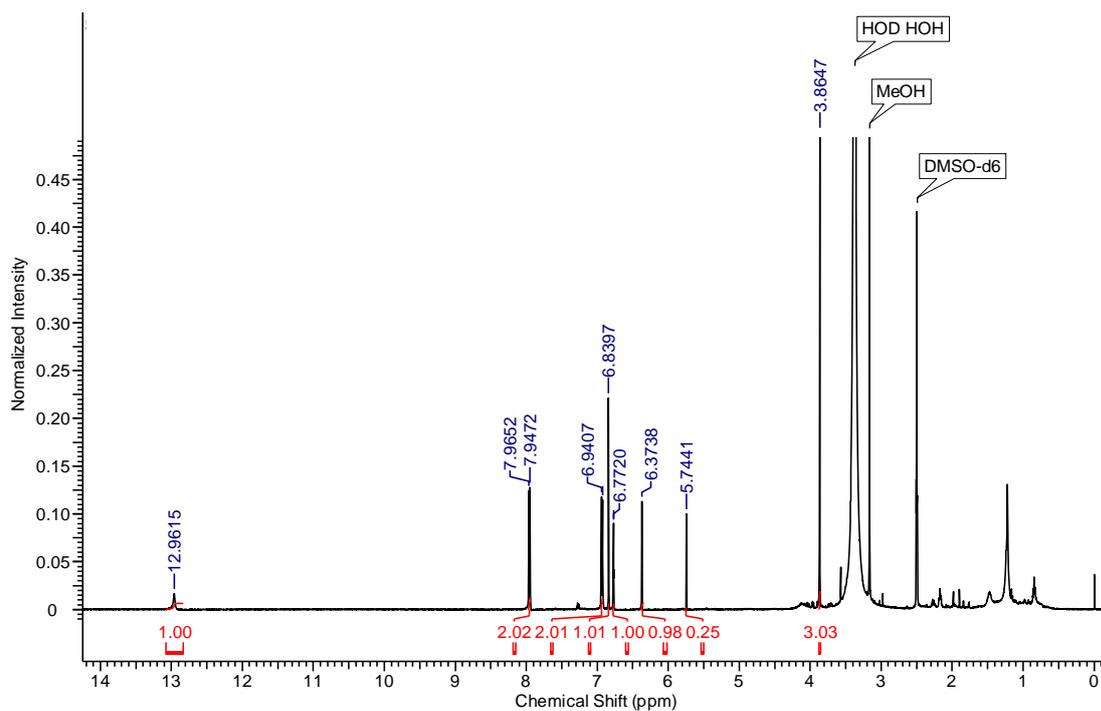


Figura 26. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  500 MHz da substância SLMAD-02

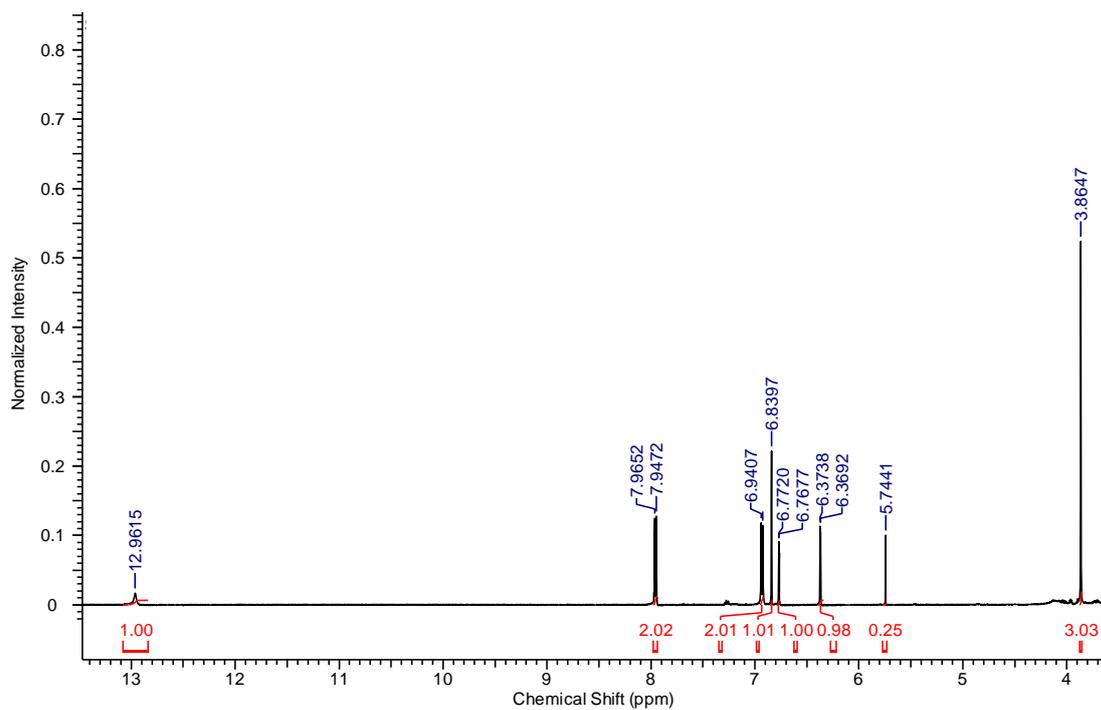
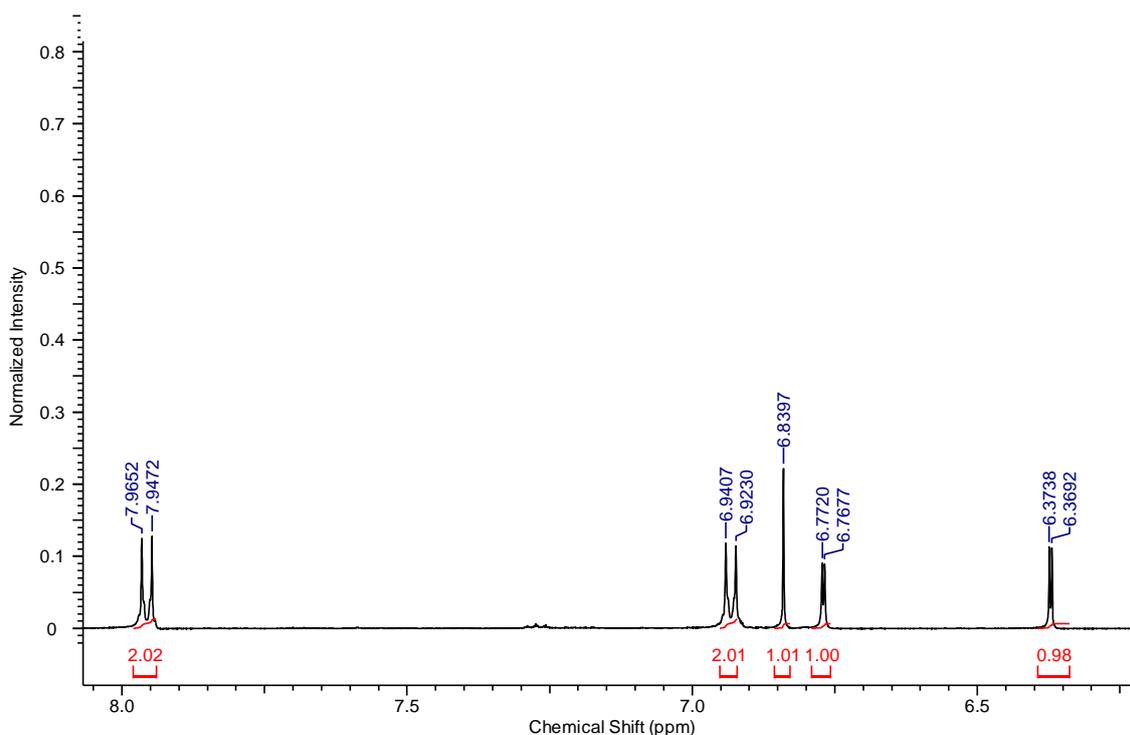


Figura 27. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  500 MHz da substância SLMAD-02 (expansão)



**Figura 28.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H 500 MHz da substância SLMAD-02 (expansão)

RMN <sup>13</sup>C confirmou a presença metoxila ligada a C-7 com  $\delta_c$  56,09 e da carbonila em C-4 com  $\delta_c$  181,97 em ligação de hidrogênio com a hidroxila ligada em C-5 (Figura 29).

No espectro de correlação heteronuclear (HSQC) (Espectro 33) foi possível ver a correlação entre os hidrogênios da metoxila  $\delta_H$  3,56 e o carbono a  $\delta_c$  56,09.

As demais atribuições para a substância SLMAD-02 estão resumidas na Tabela 8.

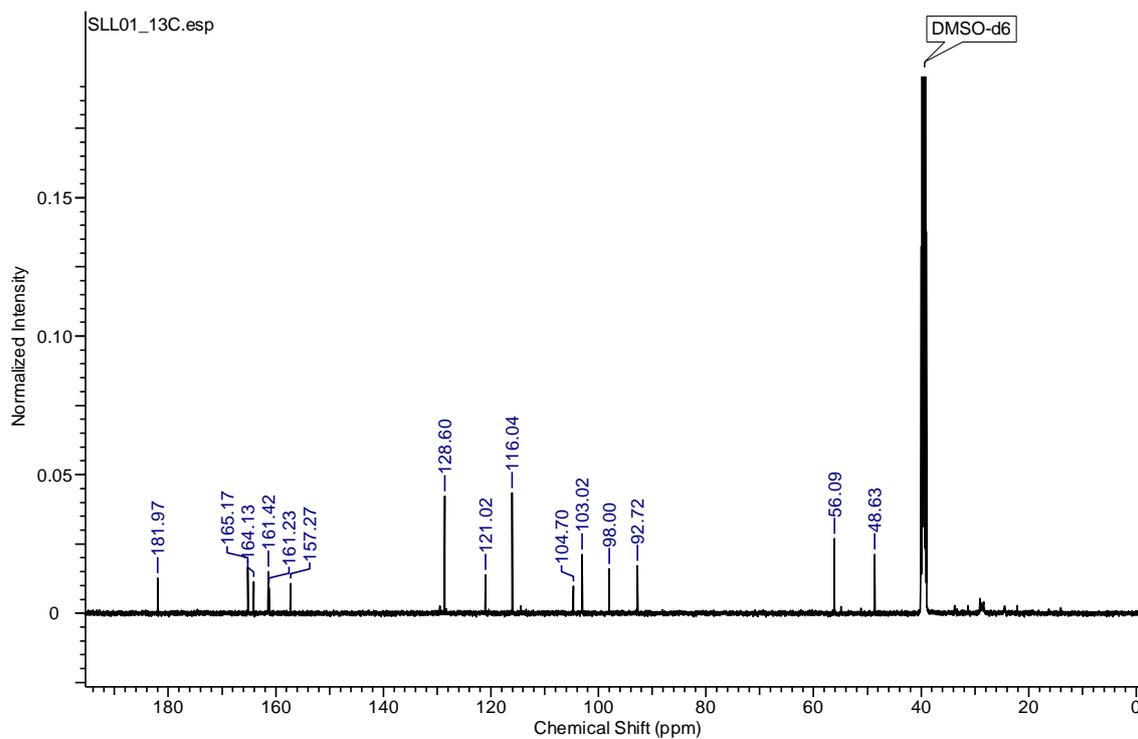


Figura 29. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da substância SLMAD-02

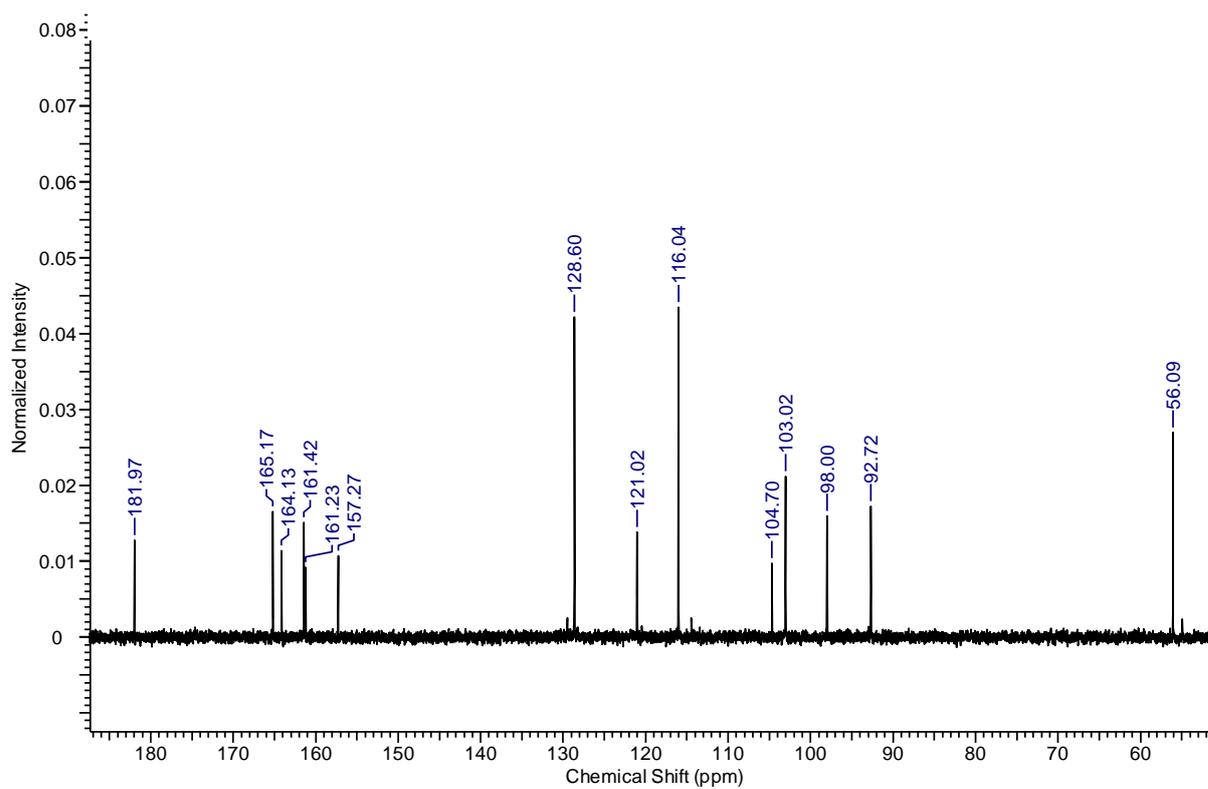
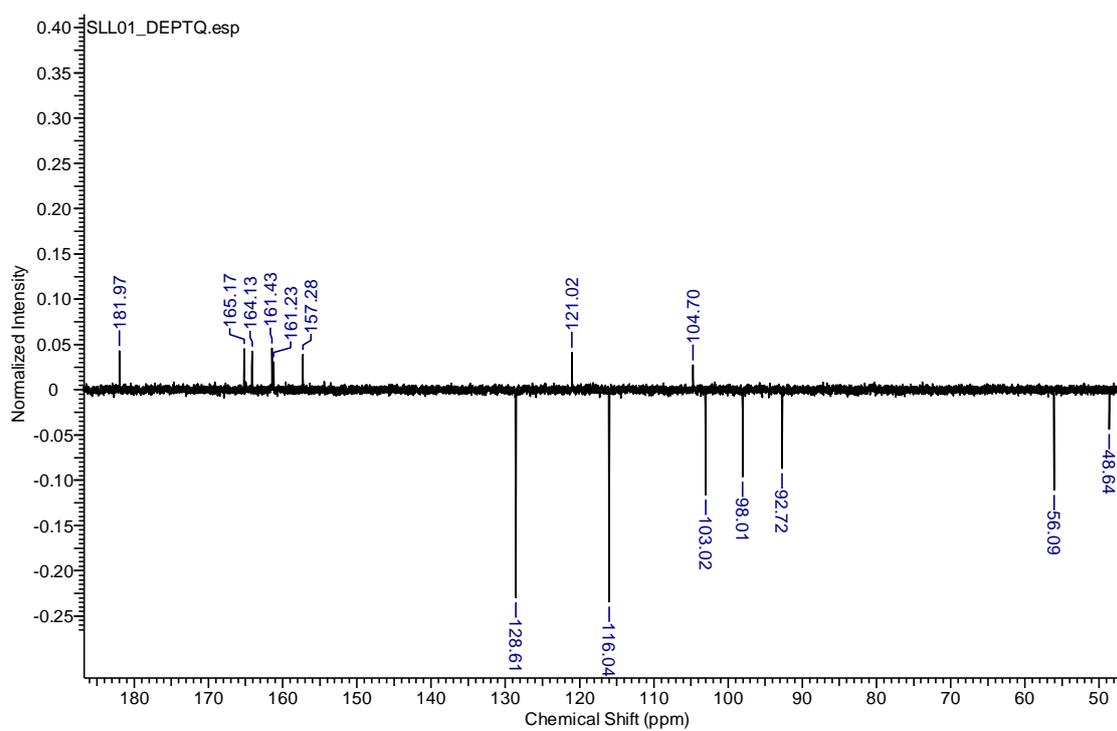
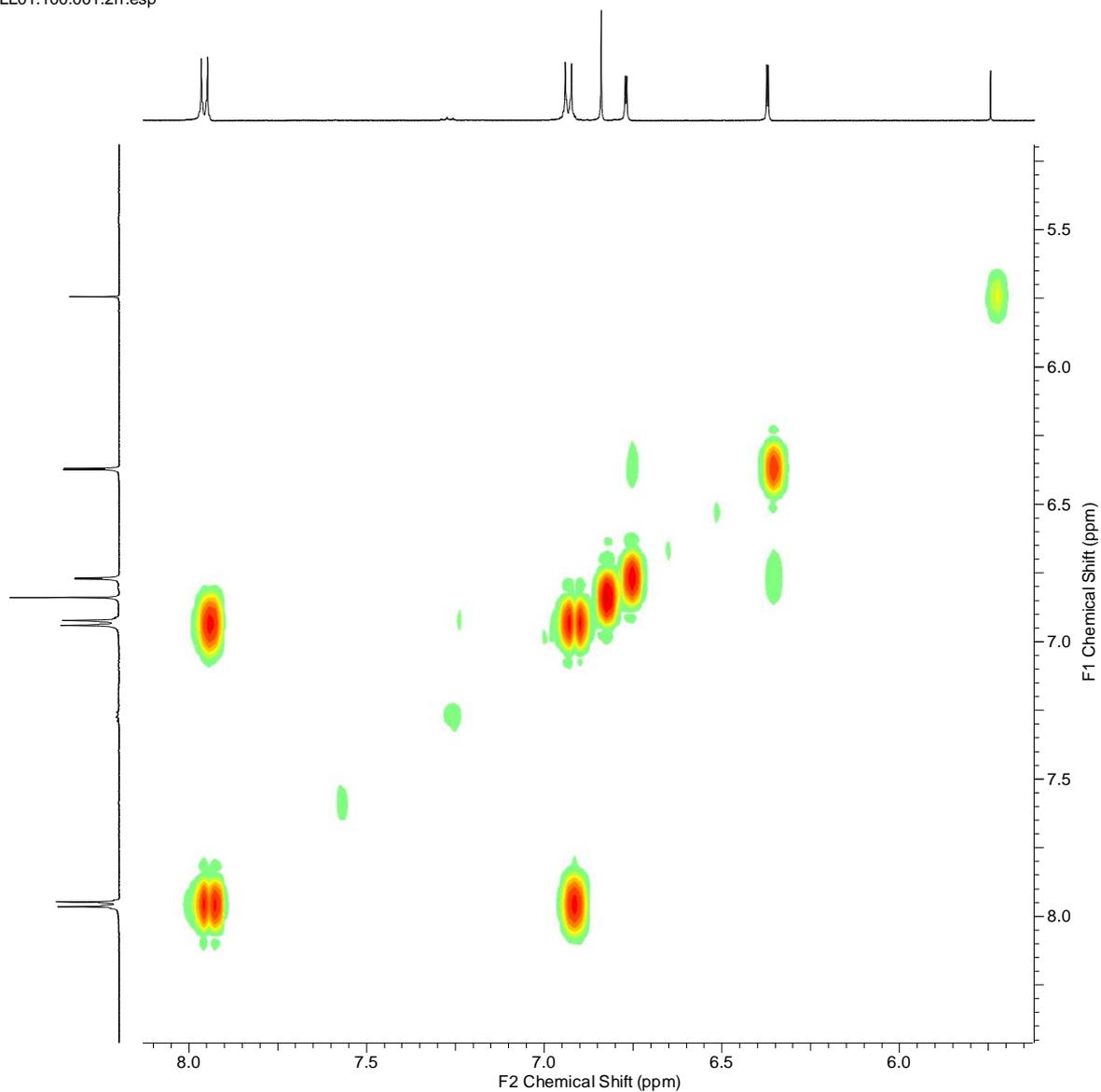


Figura 30. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da substância SLMAD-02 (expansão)



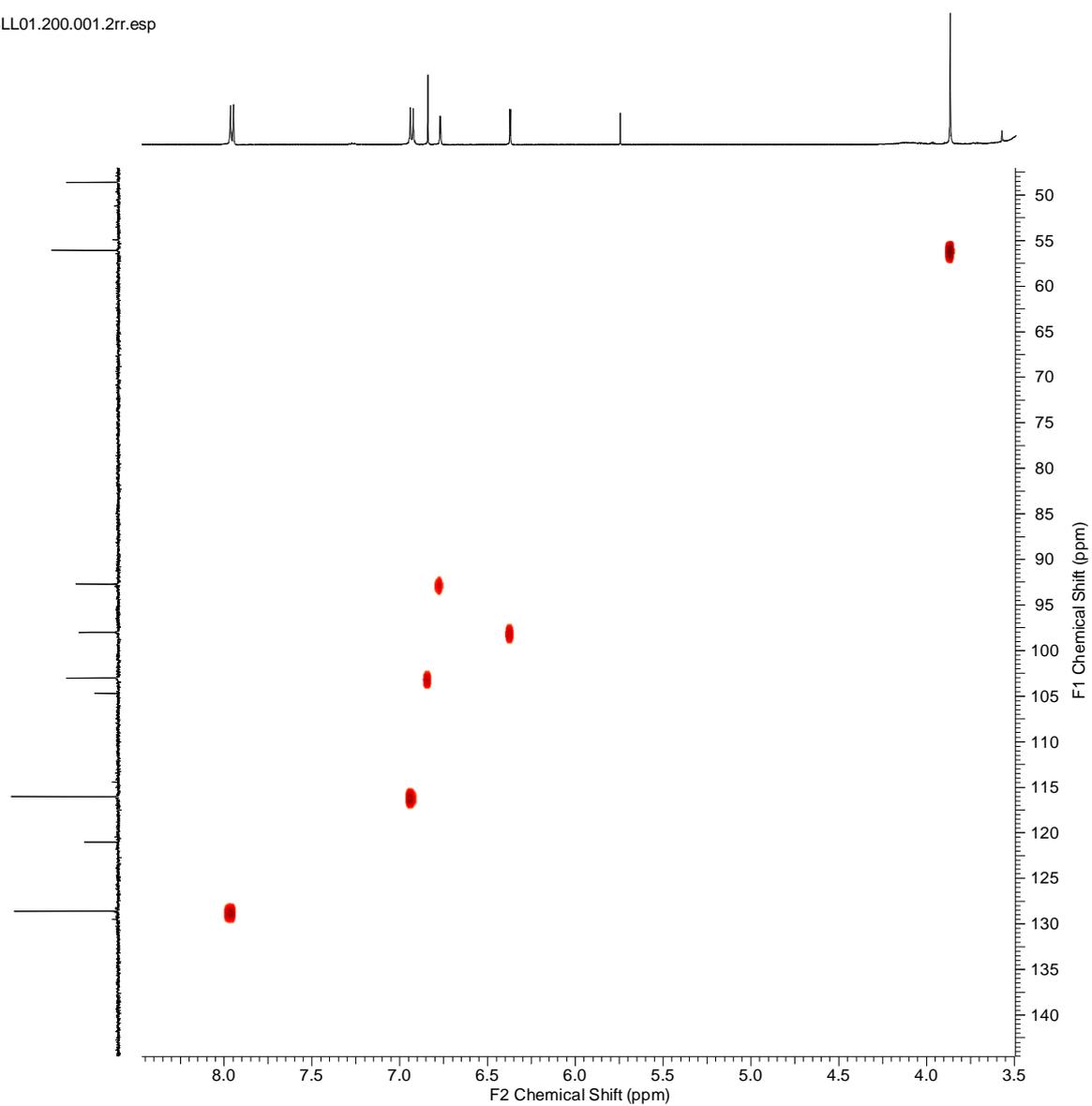
**Figura 31.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (DEPTQ) da substância SLMAD-02

SLL01.100.001.2rr.esp



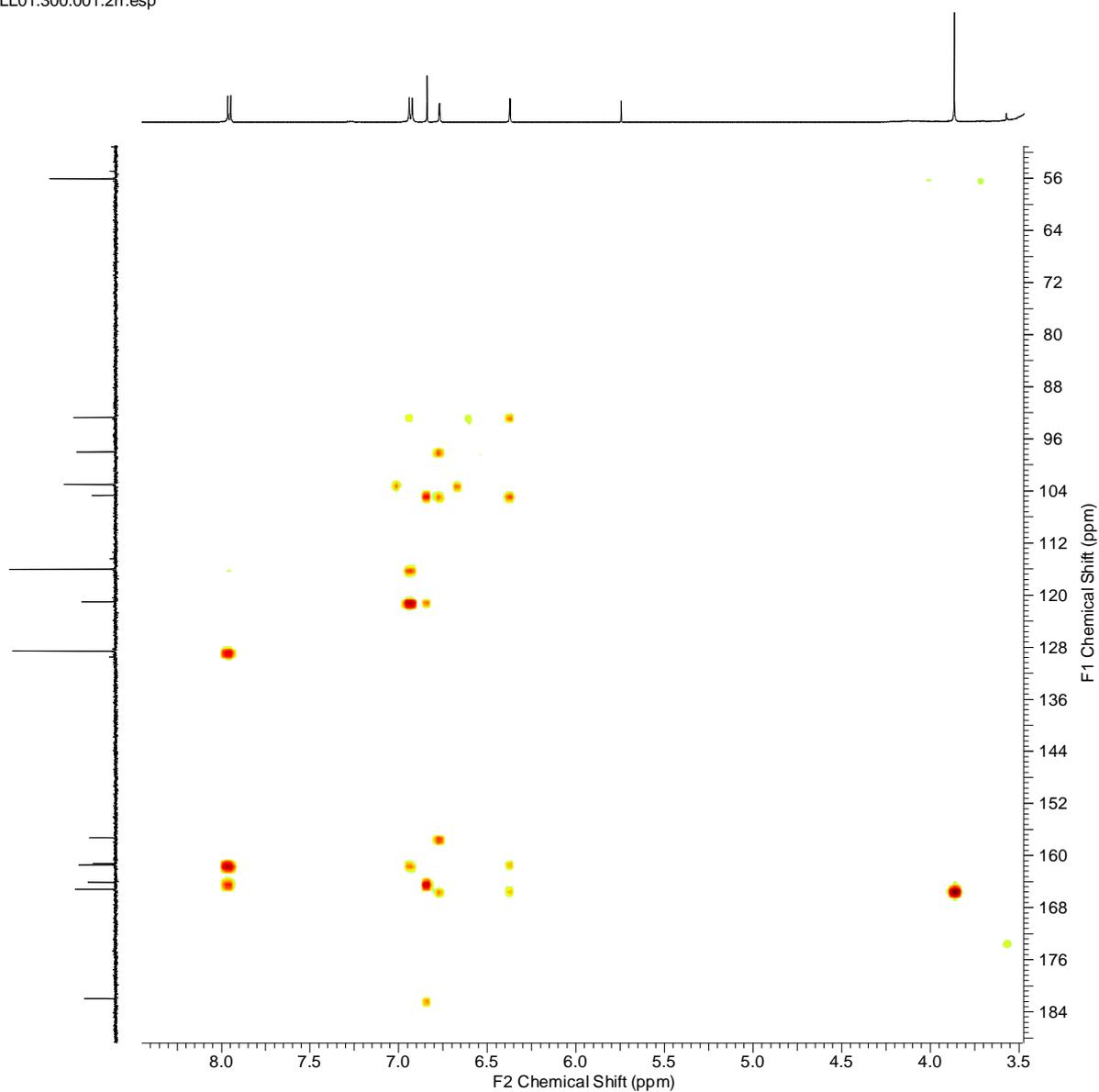
**Figura 32.** Espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (RMN-COSY) da substância SLMAD-02

SLL01.200.001.2rr.esp



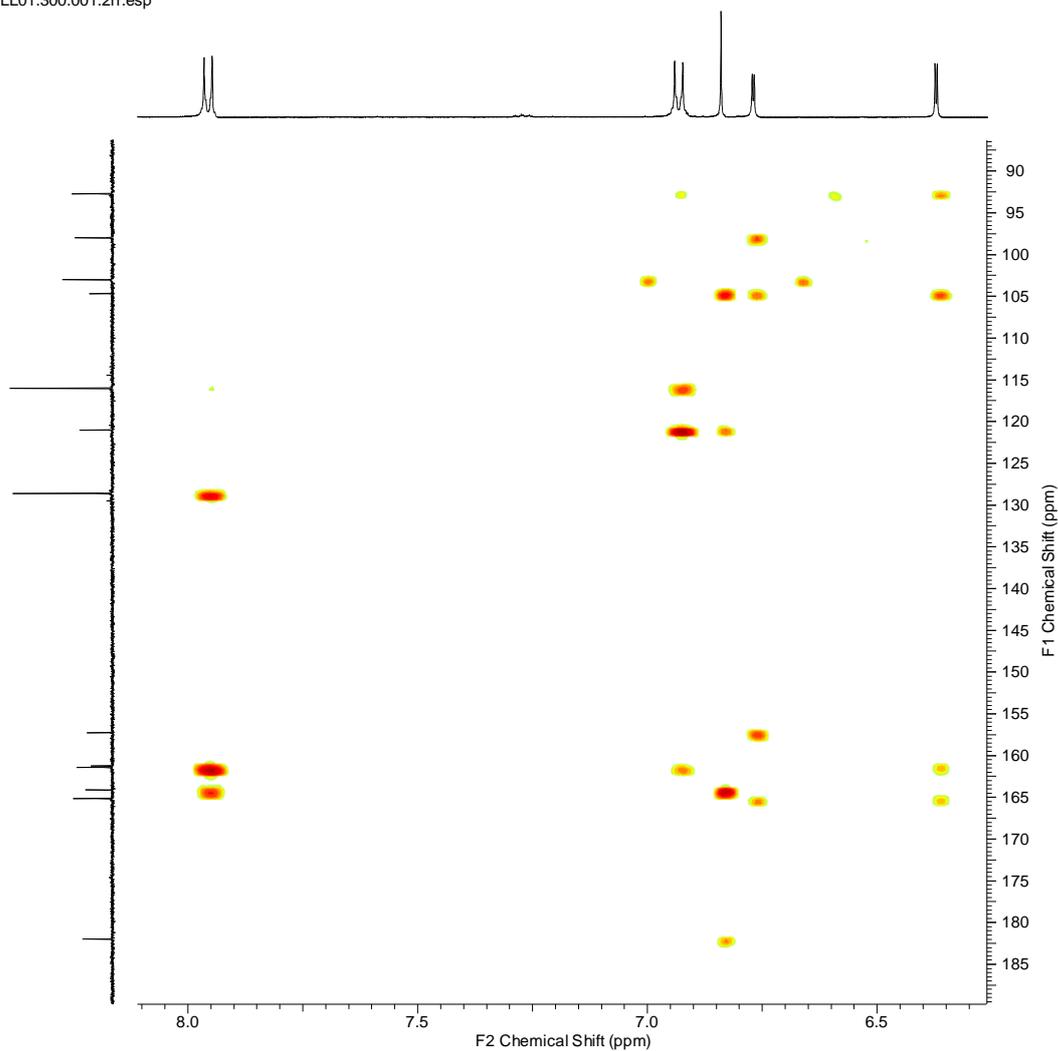
**Figura 33.** Espectro de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (RMN-HSQC) da substância SLMAD-02

SLL01.300.001.2rr.esp



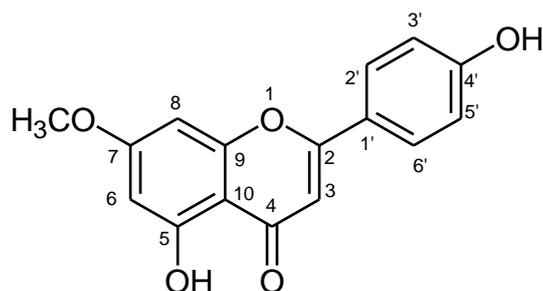
**Figura 34.** Espectro de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (RMN-HMBC) da substância SLMAD-02

SLL01.300.001.2rr.esp



**Figura 35.** Espectro de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (RMN-HMBC) da substância SLMAD-02 (expansão)

A substância consiste no flavonóide 5,4'-diidroxi-7-metoxiflavona (Figura 36), que pelo melhor do nosso conhecimento está sendo relatado pela primeira vez para o gênero *Sparattosperma*.



**Figura 36.** Estrutura da substância SLMAD-02 - 5,4'-diidroxi-7-metoxiflavona

**Tabela 8.** Dados espectrométricos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a substância SLMAD-02

Dados da Amostra			Literatura	
C	$\delta_c$	$\delta_H$	$\delta_c$	$\delta_H$
2	164,13	-	164,07	-
3	128,60	6,83 (s)	130,03	6,82 (s)
4	181,97	-	181,95	-
5	161,42	-	161,30	-
6	98,00	6,37 (s)	97,96	6,32 (s/)
7	157,27	-	156,13	-
8	92,72	6,77 (s)	92,67	6,71 (s/)
9	157,27	-	157,24	-
10	104,70	-	104,68	-
1'	121,02	-	121,09	-
2'	128,60	7,96 (d, $J=9$ Hz)	128,57	7,94 (s/)
3'	116,04	6,93 (d, $J=8,8$ Hz)	115,99	6,92 (d)
4'	161,23	-	161,22	-
5'	116,04	6,93 (d, $J=8,8$ Hz)	115,99	6,92 (d)
6'	128,60	7,96 (d, $J=9$ Hz)	128,52	7,94 (d)
OCH <sub>3</sub>	56,09	3,56 (s)	56,03	3,84 (s)
OH	-	12,96 (s)	-	12,94 (s)

(Silva *et al.*, 2009)

## 6. Conclusões

A avaliação preliminar dos aspectos fitoquímicos realizada com o caule da espécie *Sparattoesperma leucanthum* indicou a presença de triterpenos e esteroides no extrato hexânico e diclorometânico, e fenólicos em geral e flavonóides no extrato metanólico.

No ensaio de toxicidade frente as larvas de *Artemia salina*, o extrato em diclorometano apresentou uma  $DL_{50} = 289,4 \mu\text{g/mL}$ , indicando possuir atividades biológicas de interesse.

Na reação com o DPPH foi observada para o extrato metanólico uma  $EC_{50} = 19,04 \mu\text{g/mL}$  enquanto o padrão de rutina apresentou uma  $EC_{50} = 9,55 \mu\text{g/mL}$ . Conclui-se, portanto, que o extrato apresenta um alto potencial antioxidante, o que pôde ser confirmado com o isolamento de flavonóides no extrato.

Na avaliação do teor de flavonóides totais, a concentração encontrada para o extrato metanólico foi  $5,3 \mu\text{g/mL}$ , o que constitui um resultado bastante promissor para a espécie.

O estudo fitoquímico do caule da espécie *S.leucanthum* permitiu o isolamento e/ou identificação de 7 substâncias, pertencentes as seguintes classes: esteróides, ácidos graxos e flavonóides (flavonas). No extrato hexânico as substâncias isoladas foram sitosterol, campesterol, estigmasterol, ácido hexadecanóico e ácido octadecanóico. Os flavonóides 5,7,4'-triidroxiflavona e 5,4'-diidroxí-7-metoxiflavona encontrados para o extrato metanólico são inéditos no gênero.

Através dos isolamentos e identificação de substâncias da espécie, o trabalho contribui para a classificação quimiotaxonômica da mesma.

Numa avaliação geral dos resultados obtidos no trabalho, nota-se que a continuidade do estudo fitoquímico da espécie é promissora. Baseando-se nos resultados obtidos para os testes iniciais, a espécie tem um alto potencial farmacológico que deve ser mais profundamente estudado visando sua possível aplicação na confecção de novos medicamentos.

## 7. Referências Bibliográficas

ANDRADE-CETTO, A.; HEINRICH, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 99, n. 3, p. 325-348, 2005.

BARBOSA, M. M. *Obtenção de Carotenóides e Flavonóides a Partir do Bagaço do Pedúnculo do Caju por Maceração Enzimática*. 2010. 110 f. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Ceará. 2010.

BARROS, F. M. C. DE; ZAMBARDA, E. DE O.; HEINZMANN, B. M. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Química Nova*. vol. 32, n. 4. p. 861-867, 2009.

BESSA, T.; TERRONES, M.G.H.; SANTOS, D.Q. Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de *Cenchrus echinatus*. *Revista Horizonte Científico*. vol.1, n. 7, Uberlândia/MG, 2007.

BITTENCOURT, N. S. JÚNIOR. *Auto-Incompatibilidade de Ação Tardia e Outros Sistemas Reprodutivos em Bignoniaceae*. 2003. 286 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2003.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using DPPH free radical method. *Food Science and Technology*, vol. 30, p. 609 – 615, 1997.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRUNETON, J. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. 1<sup>a</sup> ed. Paris. *Lavoisier Publishing*. 915 p, 1995.

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. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol. *Clinical Chemistry*. vol. 20, n. 7, p. 794-801, 1974.

CARVALHO, C. A. DE; MATTA, S. L. P.; MELO, F. C. S. A.; ANDRADES, D. C. F.; CARVALHO, L. M. DE; NASCIMENTO, P. C. DO; SILVA, M. B. DA; ROSA, M. B. DA. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* MIERS – Bignoniaceae): estudo Fitoquímico e Toxicológico Envolvendo *Artemia Salina*. *Revista Eletrônica de farmácia*. vol. 1, p. 51-57, 2009.

CARVALHO, G.A.; PAULA-JUNIOR, T.J.; ALZATE-MARIN, A.L.; NIETSCHE, S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. 1998. Herança da resistência da linhagem AND 277 de feijoeiro comum à raça 63.23 de *Phaeoisariopsis griseola* e identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência. *Fitopatologia Brasileira*. vol. 23, p. 82-485, 1998.

CASTRO, H. G., FERREIRA, F.A., SILVA, D.J.H., MOSQUIM, P.R. Contribuição ao Estudo das Plantas Mediciniais: Metabólitos Secundários. *Viçosa-MG*: Editora UFV. p.1, 2001.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C. DE; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,2,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach. *Química Nova*. vol. 23, 2000.

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*, v. 21, n. 1, p. 99, 1998.

CIPRIANI, F. A.; FIGUEIREDO, M. R.; SOARES, G. L. G.; KAPLAN, M. A. C. Implicações Químicas na Sistemática e Filogenia de *Bignoniaceae*. *Química Nova*, v. 35, n. 11, p. 2125-2131, 2012

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

DALL'STELLA, D. S. G. *Estudo fitoquímico de Dorstenia multiformis Miquel (Moraceae) e de suas ações antibacteriana, antifúngica, alelopática, antioxidante e toxicológica*. Curitiba. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2008.

DEWICK, M. P. *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons, 2 ed., 507p, 2006.

DÔRES, R. G. R. das. *Análise Morfológica e Fitquímica da Fava D'anta (Dimorphandra Mollis Benth.)*. 21 f. Tese (Pós-graduação em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2007.

FERN, K. *Sparattoesperma leucanthum imagens*. Disponível em: <<http://tropical.theferns.info/image.php?id=Sparattosperma+leucanthum>> Acesso em 21 de abril de 2015.

FERREIRA, D. T.; ALVARES, P. S. M.; HOUGHTON, P. J.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia Venustae* considerações sobre a sua importância medicinal. *Química Nova*. vol. 23, n. 1, 2000.

FOLLI, M. DA S.; MATHEUS, M. T.; LOPES, J. C. *Armazenamento de Sementes de Sparattosperma leucanthum Vell (Schum)*. IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-graduação. 2005.

FONSECA, S. G. C.; BRAGA, R. M. C. E SANTANA, D. P. Lapachol – química, farmacologia e métodos de dosagem. *Revista Brasileira de Farmácia*, vol. 84, n. 1, p. 9-16, 2003.

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.

GAFNER S., WOLFENDER J. L., NIANGA M., STOECKLI-EVANS H., HOSTETTMANN K. Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. *Phytochemistry*. vol. 42, p. 1315-1320, 1996

GROSE, S. O.; OLMSTEAD R. G. Evolution of a Charismatic Neotropical Clade: Molecular Phylogeny of *Tabebuia* s. l., *Crescentieae*, and Allied Genera (*Bignoniaceae*). *Systematic Botany*. vol. 32. n. 3. p. 650-659, 2007.

HARADA, T. N. *Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em Artemia salina leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais*. Campo Grande, 2009. Dissertação (Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

HOCAYEN, P. DE A. S.; CAMPOS, L. A.; POCHAPSKI, M. T.; MALFATTI, C. R. M. Avaliação da Toxicidade do extrato bruto metanólico de *Baccharis dracunculifolia* por meio do bioensaio com *Artemia salina*. *INSULA Revista de Botânica*. n. 41, p. 23-31, 2012.

HUSSAIN H., KROHN K., AHMAD V. U., MIANA G. A., GREEN I. R. Lapachol: an overview. *Reviews and Accounts ARKIVOC*. vol. 2, p. 145-171, 2007.

JAKIEMIU, E. A. R. *Uma Contribuição ao Estudo do Óleo essencial e do extrato de Tomilho (Thymus vulgaris L.)*. 2008. 90 f. Dissertação (Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos) – universidade Federal do Paraná, Paraná. 2008.

JOLY, A.B. *Botânica: Introdução a taxonomia vegetal*. São Paulo: Nacional, 1998.

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

KALEGARI, M. *Composição Fitoquímica e Atividades Biológicas de Rourea induta Planch, Connaraceae*. Curitiba. Dissertação (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2009.

KARAM, T. K.; DALPOSSO, L. M.; CASA, D. M.; DE FREITAS, G. B. L. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. vol. 15. n. 2. p. 208-286, 2013.

LACERDA, G. A.; DELÚ FILHO, N. *Metabolismo de Terpenos em Plantas Superiores*. In: III Encontro de Pós-graduação, 2004, Três Corações. 3º Encontro de Pós-graduação da Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações - MG, 2004.

LEÃO, R.B.A.; FERREIRA, M.R.C.; JARDIM, M.A.G. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 88, n. 1, p. 21-25, 2007.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. vol. 16, n. 2, p. 158-163, 2006.

LIMA, O. G. DE; DÍALBUQUERQUE, I. L.; LIMA, C. G. DE; MAIA, M. H. D. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XX. Atividade antimicrobiana de alguns derivados do Lapachol em comparação com a xiloidona, nova ortonaftoquinona natural isolada de extratos do cerne do “Pau d’arco” rôxo, *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Griseb. *Revista do Instituto de Antibióticos*. Vol. 4, n. 1/2, p. 3-17, 1962.

LOHMANN, L.G. *Bignoniaceae* in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:  
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB114212>>. Acesso em: 21 Abr. 2015

LOPES, R.C.; SILVA, F. DA; CASALI, V.W.D.; ARMOND, C.; ALMASSY JÚNIOR, A.A. Folhas de chá. *Viçosa: UFV*, 2005.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Vol. 1, 3ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 430 p., 2000.

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 flavonóides totais em folhas de *Bauhinia forficata*. *Química Nova*. vol. 35, n. 3, 2012.

MCLAUGHLIN, J. L.; COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; ANSERSO, J. E. Tres bioensayos Simples para Químicos de Productos Naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de química*, 1995.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C. DOS; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. *Phytotherapy Resarch*. n. 15, p. 127-130, 2001.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, v.45, p.31-34, 1982.

MOUCO, G.; BERNARDINO, M. J.; CORNÉLIO, M. L. (2003). Controle de Qualidade de Ervas Mediciniais. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 31, 68-73.

MOUCO, G.; BERNARDINO, M. J.; CORNÉLIO, M. L. Controle de Qualidade de Ervas Mediciniais. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. n. 31, 2003.

NASCIMENTO, J. C.; LAGE, L. F. O.; CAMARGOS, C. R. D.; AMARAL, J. C.; COSTA, L. M.; SOUZA, A. N. DE; OLIVEIRA, F. Q. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. *Revista Brasileira de Farmácia*. vol, 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

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, Mina Gerais. 2008.

OLIVEIRA, A. B., RASLAN, D. S., MIRAGLIA, M. C. M., MESQUITA, A. A. L., ZANI, C. L., FERREIRA, D. T.; MAIA, J. G. S. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniáceas brasileiras. *Química Nova*. vol. 13, p. 302–307, 1990.

OLMSTEAD, R.G.; ZJHRA, M.L.; LOHMANN L.G.; GROSE, S.O. & ECKERT, A.J. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. *American Journal of Botany*. Vol. 96. n. 9. p. 1731-1743.

PARK, Y. K.; PARK, E.; KIM, J. S.; KANG, M. H. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutation Research*, vol. 529, p. 77-86, 2003.

PEREIRA, P. H.; MANSANO, V. DE F. Estudos taxinômicos da Tripo Tecomeae (Bignoniaceae) no Parque Nacional do Itatiaia, Brasil. *Rodriguésia*, 2008.

PINTO, A. C., REZENDE, C. M., GARCEZ, F. R., EPIFANIO, R. A. Um olhar holístico sobre a química de produtos naturais brasileira. *Química Nova*, v. 26, n. 6, 2003.

POLATTO, L. P., ALVES, V. V. JÚNIOR. Utilização dos Recursos Florais pelos Visitantes em *Sparattosperma leucanthum* (Vell.) K. Schum. (Bignoniaceae). *Neotropical Entomology*. vol. 37. n. 4. p. 389-398, 2008.

QUEIROZ, G. S.; BRIGHENTE, I. M. C. *Análise de esteroides em extratos vegetais e estudo fitoquímico e biológico preliminar de Brunfelsia uniflora*. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009.

REZENDE, G. A. A.; TERRONES, M. G. H.; REZENDE, D. M. L. C. Estudo Do Potencial Alelopatico Do Extrato Metanolico De Raiz E Caule De Caryocar Brasiliense Camb. (Pequi). *Bioscience Journal*. vol. 27, n. 3, p. 460-472, 2011.

RIO, R. G. W. *Métodos de controle químico de amostras de própolis*. São Paulo, 1996. Dissertação (Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos) – Universidade de São Paulo.

ROBBERS, J.E., SPEEDIE, M.K., TYLER, V.E. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. p. 89, 1988.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, Barking, vol. 92, p. 235-254, 2005.

SCHUMANN, K. M. *Sparattosperma leucanthum* (Vell.) K. Schum. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. vol. 4, p. 235, 1894.

SEVERI, J. A. Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Guapira* spp. Araraquara. Tese (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2010.

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

SIQUEIRA, M. J.; BOAVENTURA, D. A. M; GARCEZ, W. S.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii*-Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia Salina* Leach. *Química Nova*. vol. 21, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TOMEI, R.R., SALVADOR, M.J. Estresse oxidativo: metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante. *Revista UNIVAP*, vol. 14, p. 26-31, 2007.

VEDANA, M. I. S. *Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva*. Curitiba. Dissertação (Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos do Setor de Tecnologia) - Universidade Federal do Paraná, 2008.

VIANA, F. C.; SANTANA, A. C. M. Identificação Fitoquímica De Flavonóides E Taninos Em Folhas De Pitanga (*Eugenia Uniflora* L.) Utilizadas Tradicionalmente Na Região Sul Da Bahia. *Revista Interphacis*. Vol. 1, 2012.

WELTER, L.; SOARES, M.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas niágara e isabel. *Revista Brasileira de Fruticultura*. vol. 30, n. 1, p. 059-064, 2008.

XIONG, Q.; WILSON, W. K.; PANG, J. The Liebermann–Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangment of Cholesterol in Acid. *Lipids*. vol. 42, n.1, p. 87–96, 2007.