

Abordagem Química e Atividade Citotóxica frente à *Artemia salina* de um Espécime de *Guapira pernambucensis*

Jéssica da Silva Xarifa

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Centro de Ciências e Tecnologias

Campos dos Goytacazes – RJ

Março de 2015

Abordagem Química e Atividade Citotóxica frente à *Artemia salina* de um Espécime de *Guapira pernambucensis*

Jéssica da Silva Xarifa

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a Leda Mathias

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Centro de Ciência e Tecnologia

Campos dos Goytacazes – RJ

Março de 2015

Abordagem Química e Atividade Citotóxica frente à *Artemia salina* de um Espécime de *Guapira pernambucensis*

Jéssica da Silva Xarifa

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Prof^a. Dr^a Lara Fonseca Barbosa (Doutora em Ciências Naturais) – IFF

Prof. Dr. Carlos Roberto Ribeiro Matos (Doutor em Química dos Produtos Naturais) - UENF

Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem sucedidos. (Provérbios 16:3)

Eis que Deus é o meu ajudador, o Senhor é quem sustenta a minha vida.
(Salmos 54.4)

Aos meus pais, Antônio e Eliane.

A minha irmã Jaqueline.

Ao meu marido Carlos Augusto.

AGRADECIMENTOS

Ao fim desta jornada que marca o fim de uma grande e importante fase da minha vida tenho muito a agradecer.

Agradeço aos meus pais, Antônio e Eliane, que me deixaram chegar a esse mundo, que me mostraram o poder e a importância do estudo, pelo amor, paciência e sacrifícios. A minha irmã Jaqueline e ao meu esposo Carlos Augusto, pela paciência, carinho, amizade e palavras de apoio e otimismo. Amo vocês.

Aos professores Leda e Carlos Roberto pela paciência, orientação, disponibilidade, apoio e por todos os ensinamentos.

Aos professores do curso de Licenciatura em Química pelos ensinamentos adquiridos.

Aos técnicos do LCQUI pelos espectros de massas, RMN, IV e UV.

Aos colegas de laboratório Laís, Laysa, Anaína, Lucas, Pollyana, Sthefanie, Fernanda e Tayná por toda ajuda, torcida, amizade e risadas. E de maneira geral, a todos os colegas do curso de Licenciatura em Química.

Aos meus irmãos em Cristo que me sustentaram em orações principalmente nos momentos mais difíceis.

Tudo isso não teria sido possível sem a ajuda do ser maior, Deus, ao qual sou grata pela vida, bênçãos, proteção e força que sempre me proporcionou.

SUMÁRIO

	pág.
1. Introdução.....	18
1.1. Aspectos gerais.....	19
1.2. A Família Nyctaginaceae.....	21
1.3. O Gênero <i>Guapira</i>	21
1.4. A espécie <i>Guapira pernambucensis</i>	22
1.5. Local de coleta da planta.....	23
1.6. Testes Biológicos.....	24
1.6.1. <i>Artemia salina</i>	24
1.7. Atividade Antioxidante.....	25
2. Objetivos.....	27
2.1. Objetivo geral.....	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
3. Materiais e Métodos	29
3.1. Equipamentos.....	30
3.1.1. Concentração dos extratos brutos e frações.....	30
3.1.2. Espectroscopia no Infravermelho.....	30
3.1.3. Espectroscopia na Região do Ultravioleta.....	31
3.1.4. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas.....	31
3.1.5. Ressonância Magnética Nuclear.....	31
3.2. Material vegetal.....	31
3.3. Preparação dos Extratos brutos.....	31
3.4. Teste químico para identificação de Metabólitos secundários.....	33
3.4.1. Testes Genéricos para Identificação de Triterpenos e esteróides.....	33

3.4.2. Teste químico para Fenólicos em Geral.....	34
3.4.3. Teste para Alcalóides.....	34
3.5. Determinação de Atividade Antioxidante pelo método do sequestro do radical livre 2,2'-difenil-1-picrihidrazil (DPPH).....	35
3.6. Flavonóides totais.....	36
3.7. Determinação do teor de Protocianidinas por análise colorimétrica pelo método da Butanolise.....	36
3.8. Ensaio Biológico.....	37
3.8.1. Letalidade frente às larvas do microcrustáceo <i>Artemia salina</i> leach.....	37
3.9. Fracionamento dos extratos brutos.....	38
3.9.1. Fracionamento da fração HDCM do extrato bruto em hexano do caule de <i>G. Pernambucensis</i>	38
3.9.2. Fracionamento do extrato metanólico das folhas de <i>G. pernambucensis</i>	39
4. Resultados e Discussão.....	41
4.1. Testes químicos para identificação de metabólitos secundários nos extratos brutos de <i>G. pernambucensis</i>	42
4.1.1. Triterpenos e Esteróides.....	42
4.1.2. Fenólicos em geral e Flavonóides.....	44
4.1.3. Teste para Alcalóides.....	45
4.2. Avaliação da Atividade Antioxidante (AA) pelo método do DPPH.....	46
4.3. Avaliação do teor de Flavonoides totais – Método do Cloreto de Alumínio.....	48
4.4. Análise de Protocianidinas pelo método da solvólise.....	49
4.5. Ensaio Biológico.....	53

4.5.1. Citotoxicidade frente às larvas de <i>Artemia salina</i>	53
4.6. Avaliação do perfil químico dos extratos brutos de <i>G. pernambucensis</i>	53
4.6.1. Identificação do perfil químico do extrato hexânico do caule de <i>G. pernambucensis</i>	53
4.6.1.1. Identificação da mistura GP-01.....	54
4.6.1.2. Identificação da mistura GP-02.	66
4.6.2. Identificação do perfil químico do extrato metanólico das folhas de <i>G. pernambucensis</i>	74
4.6.2.1. Identificação da mistura GP-03.....	74
5. Conclusões.....	77
6. Sugestões para futuras pesquisas.....	79
7. Bibliografia.....	81

LISTA DE TABELAS

	pág.
Tabela 1. Resultados do teste químico para identificação de triterpenos e esteróides.....	43
Tabela 2. Resultados do teste químico para identificação de flavonoides e fenólicos em geral.....	45
Tabela 3. Absorbâncias obtidas para o padrão Rutina no teste do Teor de Flavonóides Totais.....	47
Tabela 4. Resultado das absorbâncias encontradas para o extrato metanólico no teste do Teor de Flavonóides Totais.....	49
Tabela 5. Citotoxicidade do extrato em MeOH de <i>G. pernambucensis</i> frente as larvas de <i>A. salina</i>	53
Tabela 6. Tempos de retenção (t_R) e área(%) dos componentes de GP-01..	56
Tabela 7. Dados espectrais de RMN ¹³ C-APT (125 MHz, CDCl ₃) das substâncias majoritárias (estigmasterol e sitosterol) da mistura GP-01 e valores da literatura.....	65
Tabela 8. Tempos de retenção (t_R) e área(%) dos componentes de GP-02..	67
Tabela 9. Dados espectrais de RMN ¹³ C-APT (125 MHz, CDCl ₃) das substâncias majoritárias (β - e α -amirina) da mistura GP-02 e valores da literatura.....	73
Tabela 10. Substâncias identificadas na mistura GP-03 através de CG/EM..	74

LISTA DE ESQUEMAS

	pág.
Esquema 1. Fluxograma resumido da preparação dos extratos brutos do caule de <i>G. pernambucensis</i>	32
Esquema 2. Fluxograma resumido da preparação dos extratos brutos das folhas de <i>G. pernambucensis</i>	33
Esquema 3. Fluxograma resumido do fracionamento do extrato bruto em hexano do caule de <i>G. pernambucensis</i>	39
Esquema 4. Fluxograma resumido do fracionamento do extrato bruto em metanol das folhas de <i>G. pernambucensis</i>	40

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1: Estrutura do flavonóide rutina.....	20
Figura 2. Fotografia das folhas e frutos de <i>Guapira pernambucensis</i>	22
Figura 3. Fotografias do complexo lagunar Grussaí/Iquipari em São João da Barra/RJ.....	23
Figura 4. Estrutura da DPPH antes e após reação com o antioxidante (A-H).	26
Figura 5. Metodologia resumida do teste de determinação da atividade antioxidante.....	36
Figura 6. Metodologia resumida da solvólise (butanolise) de proantocianidinas no extrato em MeOH de <i>G. pernambucensis</i>	37
Figura 7. Metodologia resumida do teste de determinação do teor de toxicidade frente a larvas de <i>A. salina</i>	38
Figura 8. Mecanismo proposto para a reação de Liebermann-Buchard.....	43
Figura 9. 1-reação de Liebermann-Burchard e 2-Reação de Salkowiski.....	44
Figura 10. Complexo formado entre flavonóide e AlCl ₃	44
Figura 11. Foto ilustrativa da reação com FeCl ₃ (1) e da reação com NaOH (2).....	45
Figura 12. Solução da amostra antes da reação (1) e após reagir com o reagente de Dragendorf (2).....	46
Figura 13. Decomposição de uma proantocianidina catalisada por ácido.....	50
Figura 14. Estrutura da pelargonidina, cianidina e delphinidina.....	51
Figura 15. Espectro na região do ultravioleta do extrato em MeOH de <i>G. pernambucensis</i> diluído em MeOH antes da reação com BuOH/HCl/Δ.....	52
Figura 16. Espectro na região do ultravioleta do extrato em MeOH de <i>G. pernambucensis</i> depois da degradação com BuOH/HCl/Δ.....	52
Figura 17. Perfil químico dos componentes da mistura GP-01.....	54
Figura 18. Espectro no infravermelho da mistura de substâncias GP-01.....	55
Figura 19. Cromatograma da mistura de substância GP-01.....	56
Figura 20. Fragmentograma do pico no. 1 (Campesterol).....	57

Figura 21. Fragmentograma do pico no. 2 (Ergosterol).....	57
Figura 22. Fragmentograma do pico no. 3 (Estigmasterol).....	57
Figura 23. Fragmentograma do pico no. 4 (Não identificado).....	58
Figura 24. Fragmentograma do pico no. 5 (γ -Sitosterol).....	58
Figura 25. Fragmentograma do pico no. 6 (Estigmastenol).....	58
Figura 26. Fragmentograma do pico no. 7 (Estimast-8[14]-em-3- β -ol).....	59
Figura 27. Fragmentograma do pico no. 8 (Espinasterona).....	59
Figura 28. Fragmentograma do pico no. 9 (Estimast-4-em-3-ona).....	59
Figura 29. Proposta de fragmentação dos componentes majoritários de GP-01.....	60
Figura 30. Deslocamentos químicos.....	61
Figura 31. Espectro de RMN- ^1H da mistura de substâncias GP-01.....	62
Figura 32. Espectro de RMN- ^1H da mistura de substâncias GP-01(ampliação).....	62
Figura 33. Espectro de RMN- ^1H da mistura de substâncias GP-01(ampliação).....	62
Figura 34. Espectro de RMN- ^{13}C da mistura de substâncias GP-01.....	63
Figura 35. Espectro de RMN- ^{13}C da mistura de substâncias GP-01(ampliação).....	63
Figura 36. Espectro de RMN- ^{13}C da mistura de substâncias GP-01(ampliação).....	64
Figura 37. Estruturas dos componentes da mistura GP-02.....	66
Figura 38. Espectro na região do infravermelho de GP-02.....	66
Figura 39. Cromatograma da mistura de substância GP-02.....	67
Figura 40. Fragmentograma do pico no. 1 (β -Amirina).....	68
Figura 41. Fragmentograma do pico no. 2 (α -Amirina).....	68
Figura 42. Fragmentograma de massas da α - e β -amirina.....	68
Figura 43. Fragmentograma do pico no. 3 (Ciclolaudenol).....	69
Figura 44. Deslocamento químico.....	69
Figura 45. Espectro de RMN- ^1H da mistura de substâncias GP-02.....	70

Figura 46. Espectro de RMN- ¹ H da mistura de substâncias GP-02 (Ampliação).....	70
Figura 47. Espectro de RMN- ¹ H da mistura de substâncias GP-02 (Ampliação).....	71
Figura 48. Espectro de RMN- ¹³ C-APT da mistura de substâncias GP-02.....	71
Figura 49. Espectro de RMN- ¹³ C-APT da mistura de substâncias GP-02 (Ampliação).....	72
Figura 50. Espectro de massas da mistura de substâncias GP-03.....	74
Figura 51. Fragmentograma de massas do estigmasterol 1	75
Figura 51. Fragmentograma de massas do γ -sitosterol 2	75
Figura 52. Fragmentograma de massas do estigmastanol 3	75
Figura 52. Fragmentograma de massas da α -amirina 4	75
Figura 53. Fragmentograma de massas pico 5 (não identificado).....	76

LISTA DE GRÁFICOS

	pág.
Gráfico 1. Curva de calibração do DPPH.....	47
Gráfico 2. Atividade antioxidante obtida para o flavonoide Rutina.....	47
Gráfico 3. Atividade antioxidante obtida para o extrato metanólico das folhas de <i>G. pernambucensis</i>	47
Gráfico 4. Curva de calibração para o padrão de rutina no teste de teor de Flavonóides Totais.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

AA%	Porcentagem de Atividade Antioxidante
Abs	Absorbância
AcOH	Ácido acético
AcOEt	Acetato de etila
APT	Attached Proton Test
Ax	Axial
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
cm ⁻¹	Centímetro recíproco (unidade de número de onda)
DL ₅₀	Dose letal suficiente para matar 50% da população testada
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
EC ₅₀	Concentração efetiva máxima obtida em 50% do padrão
eV	Eletrovolt
Hz	Hertz
HDCM	Fração diclorometano
HMEOH	Fração metanólica
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento (medida em Hertz)
m	Multiplete
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
Ppm	Parte por milhão

RDA	Rearranjo do tipo Diels-Alder
R _f	Fator de retenção
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
s	Singleto
sl	Singleto largo
t	Tripleto
UV	Ultravioleta

RESUMO

XARIFA, Jéssica da Silva; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março, 2015; Abordagem Química e Atividade Citotóxica frente à *Artemia salina* de um Espécime de *Guapira pernambucensis*; Orientadora: Leda Mathias.

A presente monografia teve por objetivo principal a abordagem química e avaliação da atividade citotóxica frente às larvas de *Artemia salina* das folhas e caule de um espécime de *Guapira pernambucensis*.

Os testes químicos realizados com os extratos brutos indicaram principalmente a presença de triterpenos, esteróides, flavonóides, fenólicos gerais, catequinas e alcalóides.

A avaliação da toxicidade dos extratos brutos foi realizada utilizando-se o método proposto por Mac Laughlin para larvas de *A. salina*.

A avaliação da capacidade antioxidante foi realizada através do método que utiliza o 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil como radical livre

A avaliação de flavonóides totais foi feita utilizando o método do cloreto de alumínio.

O fracionamento do extrato bruto hexânico do caule e metanólico das folhas e isolamento dos metabólitos secundários foi feito utilizando métodos cromatográficos adequados.

Os metabólitos secundários isolados foram identificados através da interpretação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear, bem como através de informações obtidas no Cromatógrafo de gás acoplado ao Espectrômetro de Massa e comparação com a literatura, resultando na identificação de triterpenos e esteróides.

ABSTRACT

XARIFA, Jessica da Silva; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; March, 2015; Approach Chemistry and Cytotoxic Activity through brine shrimp test of a specimen of *Guapira pernambucensis*; Supervisor: Leda Mathias.

This monograph presents the chemistry approach and evaluation of the cytotoxic activity against *Artemia salina* larvae of the leaves and stem of a specimen of *Guapira pernambucensis*.

The tests chemical performed with crude extracts indicated mainly the presence of triterpenes, sterols, flavonoids, general phenolic, catechins and alkaloids.

Evaluation of the antioxidant capacity was performed by the method which uses 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl as free radical.

Evaluation of total flavonoids was performed using the method of aluminum chloride.

The evaluation of the toxicity of the crude extracts was performed using the method proposed by Mac Laughlin to *A. salina* larvae.

The fractionation of the crude hexane extract of the stem and methanolic of the leaves and isolation of secondary metabolites were made using appropriate chromatographic methods.

The secondary metabolites were identified by interpreting of Nuclear Magnetic Resonance spectra as well as through information obtained in the Gas Chromatography coupled with to Mass Spectrometer and comparison with literature, resulted in the identification of triterpenes and steroids



1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS

A utilização de ervas como base para remédios remonta às tribos primitivas onde as mulheres eram encarregadas de extrair das plantas os princípios ativos responsáveis pela cura de doenças. Com o passar do tempo os povos dessa época se tornaram mais habilitados em suprir as necessidades de sobrevivência, estabelecendo papéis sociais específicos como, por exemplo, o curandeiro. No século XIX o empirismo foi substituído pela química experimental que permitiu a síntese de novas substâncias orgânicas contribuindo para o aumento da sobrevivência humana (França, 2008).

Atualmente os estudos sobre a medicina popular vêm merecendo atenção cada vez maior devido ao contingente de informações e esclarecimentos que vem sendo oferecido à ciência. Na maioria dos países ocidentais, o uso de medicamentos de origem vegetal esta sendo retomado de maneira sistemática e crescente na profilaxia e tratamento de doenças, ao lado da terapêutica convencional (França, 2008).

A utilização das plantas medicinais vem atingindo um público cada vez maior, recebendo incentivo da própria Organização Mundial de Saúde. A avaliação do potencial terapêutico das plantas medicinais e de seus constituintes tem sido objeto de vários estudos, em que já foram comprovadas as ações farmacológicas e a eficácia terapêutica por meio de testes clínicos. Entre os medicamentos comercializados com princípios ativos de origem vegetal temos Vick Vaporub, Floratil, Buscopan, Tamarine e Morfina (França, 2008).

O Brasil, com sua grandeza de litoral, de sua flora e possuindo a maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais. A química dos Produtos Naturais é, dentro da Química brasileira, a área mais antiga. Em 1976, realizou-se a semana de estudos sobre “Produtos Naturais e a Proteção de Plantas”. O foco das discussões nesta reunião era o papel de determinados metabolitos secundários na defesa de plantas contra organismos predadores e situações diversas. Essas defesas são de natureza química e, normalmente, envolvem substâncias

do metabolismo secundário, as quais podem ser chamadas de fitotoxinas ou aleloquímicos. Esse fenômeno é conhecido como alelopatia (Pinto, 2002).

A característica mais importante da maioria dos metabolitos secundários é sua distribuição restrita na natureza, que se limita a uma espécie ou a espécies relacionadas, permitindo a ela se adequar às condições impostas pelo ambiente. Outro papel importante é a proteção do metabolismo vegetal contra a ação oxidante (Castro, 2001).

Muitas plantas possuem uso na medicina popular com fins terapêuticos pela ação de flavonóides e terpenóides que são importantes na obtenção de novos fármacos (Montanari, 2001; Braz-Filho, 1994).

Os flavonóides estão presentes em grande parte das plantas, incluindo folhas, raízes, cascas, pólen e sementes e por isso representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados dentre os produtos de origem natural. O emprego terapêutico de plantas contendo flavonóides é reconhecidamente importante. Muitas atividades biológicas são atribuídas a eles, como: antiviral, antiinflamatória, dentre outras (Severi, 2010).

Dentre os flavonóides isolados em espécies da família Nyctaginaceae temos a rutina, isolada de *G. opposita* (Figura 1) a qual se atribui a propriedade de inibição da formação de radicais livres (Severi, 2010; Rodrigues, 2003).

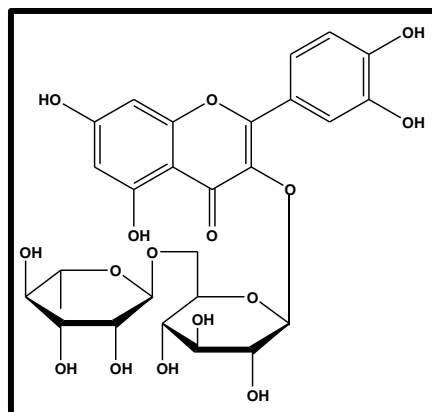


Figura 1: Estrutura do flavonóide rutina.

1.2. A FAMÍLIA NYCTAGINACEAE

A família Nyctaginaceae esta representada no Brasil por 11 gêneros e 48 espécies, sendo os gêneros *Andradea*, *Bolemia*, *Bougainvillea*, *Guapira*, *Leucaster*, *Mirabilis*, *Neea*, *Pisonia*, *Ramisia* e *Reichenbachia* nativos e o *Boerhavia* introduzido (Marchioretto *et al.*, 2011; Souza e Lorenzi, 2008).

Seus representantes apresentam-se na forma de árvores, arbustos, ervas ou lianas. Folhas alternas ou opostas, simples, sem estipulas. Inflorescências cimosas em geral; flores vistosas ou não, bissexuadas ou unissexuadas, monoclamídeas, geralmente actinomorfas, às vezes envolvidas por um conjunto de brácteas vistosas (*Bougainvillea*) ou semelhantes a um cálice (*Mirabilis*) (Souza e Lorenzi, 2008; Furlan *et al.*, 2008).

Algumas espécies são consideradas, economicamente, importantes tais como *Mirabilis* L. e *Bougainvillea* Choisy, cujas espécies são utilizadas como plantas ornamentais. A espécie *Boerhavia* L, vulgarmente conhecida como “erva-tostão”, é utilizada na medicina popular na cura de diversos males (Souza *et al.*, 2010).

Entre os gêneros nativos destaca-se a *Guapira*, em especial *Guapira opposita*, muito comum em diversas formações florestais. As espécies arbóreas de Nyctaginaceae recebem o nome vulgar de “Maria-mole”, referência a baixa qualidade de sua madeira. Estudos da morfologia floral comparada feito em 1996 possibilitou o reconhecimento de trinta espécies na família, dentre elas *G. opposita*, *G. pernambucensis*, *G. noxia*, *Neea duekei* e *Pisonia aculeata* (Furlan, 1996).

A família também apresenta vários gêneros com atividades biológicas importantes e dentre estas podemos destacar as atividades, antiúlcera, antimicrobiana, imunomodulatória e antioxidante, algumas vezes atribuída à presença de flavonóides (Mazzolin *et al.*, 2007).

1.3. O GÊNERO GUAPIRA

Guapira é um gênero neotropical com aproximadamente 70 espécies, ocorrendo do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina. No Brasil ocorre

em todas as regiões, porém apresenta baixa frequência na região amazônica (Souza e Lorenzi, 2008).

No gênero são conhecidas as seguintes espécies: *G. areolata*, *G. discolor*, *G. fragans*, *G. globosa*, *G. graciliflora*, *G. hirsuta*, *G. nítida*, *G. noxia*, *G. opposita* e *G. pernambucensis* (Bernacci, 2014).

1.4. A ESPÉCIE *Guapira pernambucensis*

A espécie *G. pernambucensis* (casar.) Lundell (Figura 2) é uma das muitas espécies do gênero *Guapira* que habitam principalmente as restingas, regiões arbustivas e campos. Esta espécie apresenta o basônimo de *Pisonia pernambucensis* Casar e sinonímia *Torrubia pernambucensis* Standl (Furlan, 1996; Schmidt, 1872).

G. pernambucensis, conhecida popularmente como “mangue-branco”, “pau-mole”, “ramallete-do-mato” e “João mole”, apresenta hábito arbustivo (cresce em moitas), é nativa das restingas do Brasil (RJ até PE), apresenta folhas opostas, flores paniculadas e frutos aquênicos (Bernacci, 2014). A espécie apresenta a seguinte linhagem filogenética: **Reino**→Plantae, **Filo**→Magnoliophyta, **Classe**→Magnoliopsida, **Ordem**→Caryophyllales, **Família**→Nyctaginaceae, **Gênero**→*Guapira*, **Espécie**→*G. pernambucensis*.



Figura 2. Fotografia das folhas e frutos de *Guapira pernambucensis**

***Fontes:** (Popovikin, 2013)

1.5. LOCAL DE COLETA DA PLANTA

A espécie *G. pernambucensis* foi coletada na região de restinga no complexo lagunar Grussaí-Iquipari no Município de São João da Barra – RJ (Figura 3). O solo da região foi identificado como areias quartzosas marinhas associadas aopodozolhidromórfico têm origem flúvio-marinha, formada sobre cordões litorâneos paralelos, com estratificação plano-paralela com 1 a 3 m de altura. Segundo Radambrasil o clima da região está caracterizado como tropical sub-úmido a semiárido, com precipitação pluviométrica média anual variando de 800 – 1200 mm. O vento predominante tem direção nordeste atingindo maiores velocidades nos meses de agosto a dezembro (Assunção, 2000).

No Brasil as restingas são encontradas ao longo do litoral desde a costa leste do Pará até a costa do Rio Grande do Sul, perfazendo um total de aproximadamente 9.000 Km de extensão (Silva, 2014).



Figura 3. Fotografias do complexo lagunar Grussaí/Iquipari em São João da Barra/RJ*

*Fontes: (UENF, 2013)

O conceito geográfico de restinga refere-se aos cordões arenosos que depositados pelas correntes marinhas, fecham ou tendem a fechar uma reentrância

na linha da costa, onde se estabelece comunidades vegetais e animais com características marcantes em função das condições físicas do meio (Silva, 2014).

As formas de vida diversificadas (arbusto, ervas, trepadeiras e epífitas) dão ao conjunto uma estrutura de mata baixa, rica e complexa. A região de restinga apresenta grande importância econômica, onde podemos destacar: ornamental e paisagística, industrial e alimentícia, arqueológica, ecológica e medicinal (Maraschin-Silva, 2004).

Na região de restinga o solo não é a principal fonte de nutrientes, mas é, sobretudo, a vegetação o suporte vital do ecossistema, onde os solos arenosos extremamente permeáveis e pobres em nutrientes, a constante ação do vento e a salinidade exigem uma especificação de certos órgãos das plantas para que possam sobreviver em um ambiente inóspito. Encontra-se um sistema radical profundo e ramificado, que garante a fixação da planta, além de fornecer mais água e nutrientes, pela maior área do solo que pode ser explorada. As folhas são em geral pequenas e coriáceas para diminuir a perda de água e como proteção contra dilaceração pelo vento. Existem caules rastejantes, flutuando sobre a areia e acompanhando as modificações da superfície. Existem também caules subterrâneos (rizomas) e folhas carnosas com a finalidade de retenção de água (Joly, 1998).

1.6. TESTES BIOLÓGICOS

1.6.1. *Artemia salina*

A. salina (larva de camarão de água salgada) é utilizado como alimento para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de piscicultura. O teste de toxicidade contra a *Artemia salina* é um ensaio biológico considerado como uma das ferramentas mais utilizadas para a avaliação preliminar de toxicidade (Amarante *et al.*, 2011). O bioensaio foi proposto por McLaughlin *et al.* (1995) e caracteriza-se como um ensaio simples para determinar a DL₅₀ (µg/mL) para substâncias puras e extratos. São considerados ativos valores de DL₅₀ ≤ 1000 µg/mL para extratos brutos e < 30 µg/mL para substâncias puras.

A praticidade e simplicidade que envolve o bioensaio favorecem sua utilização sistemática em laboratórios de pesquisa. A técnica tem a vantagem de apresentar baixo custo, rapidez e não exigir técnicas assépticas (Meyer *et al.*, 1982).

O único parâmetro envolvido no bioensaio é a morte ou vida dos microcrustáceos em contato com o material analisado e os dados obtidos são facilmente tratados estatisticamente (Calvacante *et al.*, 2000).

Diversos trabalhos tentam correlacionar à toxicidade frente a *A. salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasiticida e tripanossomicida (Siqueira *et al.*, 1998).

1.7. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O conhecimento sobre propriedades antioxidantes é relativamente recente, especialmente nas duas últimas décadas observou-se um enorme crescimento da investigação científica envolvendo o efeito de extratos brutos, frações e substâncias puras e/ou modificadas quimicamente (Yunes & Calixto, 2001).

Antioxidantes naturais constituem uma larga gama de substâncias incluindo as nitrogenadas, fenóis, carotenóides, terpenóides e saponinas, dentre outras. Dentre os antioxidantes naturais podemos destacar os flavonóides, pois possuem a capacidade de proteger os constituintes alimentares contra o dano oxidativo, o que contribui para prevenção de diversas patologias, como doenças cardiovasculares, envelhecimento precoce e câncer (Yunes & Calixto, 2001).

Existem vários métodos para determinação de atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas, um dos mais utilizados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). O DPPH em solução apresenta coloração violeta e absorve em 515 nm. Quando reage com um antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção. Quanto maior o potencial oxidante da amostra testada, mais rápida será a descoloração do DPPH. Como a mudança de coloração é um aspecto facilmente visualizado, o método é bastante simples e prático (Figura 4, p.26) (Roginsky e Lissi, 2005).

Para a obtenção de dados com maior precisão utilizamos um espectrofotômetro ou um colorímetro, devido à forte absorção 517 nm, à medida que o DPPH é consumido pela ação do oxidante permite traçar-se um gráfico de absorbância *versus* concentração do soluto (Mensor, 1999; 2001).

A partir dos valores de absorbância obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres. A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante e a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE_{50}) (Mensor, 1999; 2001).

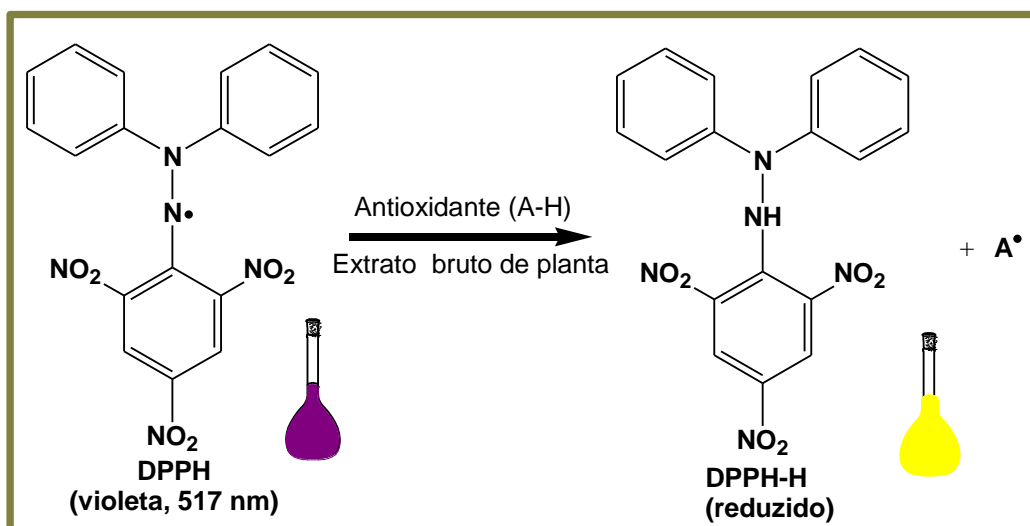


Figura 4. Estrutura da DPPH antes e após reação com o antioxidante (A-H)



2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O principal objetivo desta monografia é a prospecção fitoquímica/biológica de extratos vegetais do caule e folhas de um espécime de *Guapirapernambucensis*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aprendizado de pesquisa bibliográfica, técnicas e uso de equipamentos básicos de laboratório de química orgânica;
- Realizar testes químicos para identificação dos metabólitos secundários: triterpenos, esteroides, alcaloides, fenólicos, flavonoides e antocianidinas;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos brutos;
- Avaliação do teor de fenólicos e flavonóides totais;
- Avaliar o perfil químico dos extratos através de testes químicos específicos para identificação de metabólitos secundários e métodos espectrométricos (IV, CG/EM e RMN);
- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos brutos frente às larvas do microcrustáceo *Artemia salina* Leach.



3. MATERIAIS E METODOS

Os solventes empregados no desenvolvimento desse trabalho foram de grau p.a. e procedência Merck, Sigma-Aldrich, Synth e Vetec. Nas análises por RMN utilizou-se solventes deuterados de procedência Cil (Cambridge Isotope Laboratories, Inc).

Nas separações cromatográficas em coluna, foram utilizadas, sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) e sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) ambas de procedência Merck e Vetec e Sephadex LH-20 procedência Pharmacia.

Nas análises comparativas através de cromatograma em camada delgada analítica (CCDA) utilizou-se cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ e RP-18 F₂₅₄ ambas de procedência Merck.

A revelação das cromatoplasmas foram efetuadas através de irradiação com luz na região do ultravioleta em comprimento de onda 254 e 366 nm e/ou com reveladores cromogênicos (vanilina sulfúrica, sulfato cérico, solução alcoólica de cloreto férrico, orcinol sulfúrico).

Os critérios de pureza adotados foram a observação de uma única mancha em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA), variando-se a fase móvel e reveladores.

3.1. EQUIPAMENTOS

3.1.1. CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS EFRAÇÕES

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

3.1.2. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em pastilhas de KBr grau espectroscópico, com leituras na região de 4000 a 400 cm⁻¹ em um espectrômetro IRAffinity-1 Shimadzu.

3.1.3. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

Utilizou-se espectrofotômetro Bel Photonics 1105 com faixa espectral de 320 - 1000 nm e espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu, com varredura entre 200 e 1000 nm com amostras dissolvidas em MeOH ou BuOH ou EtOH em cubetas de 1,0 cm.

3.1.4. 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 CG-MS 5975C Inert XL EI/CI/MS Agilent Technologies.

3.1.5. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono-13 para as substâncias foram realizados em temperatura ambiente dissolvidas em metanol ou clorofórmio ou dimetil sulfóxido deuterados, empregando-se tetrametilsilano (TMS) como referência. Utilizou-se espectrômetro Bruker ascend 500 MHz em campo de 500 MHz (RMN ^1H) e 125 MHz (RMN ^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) foram indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

3.2. MATERIAL VEGETAL

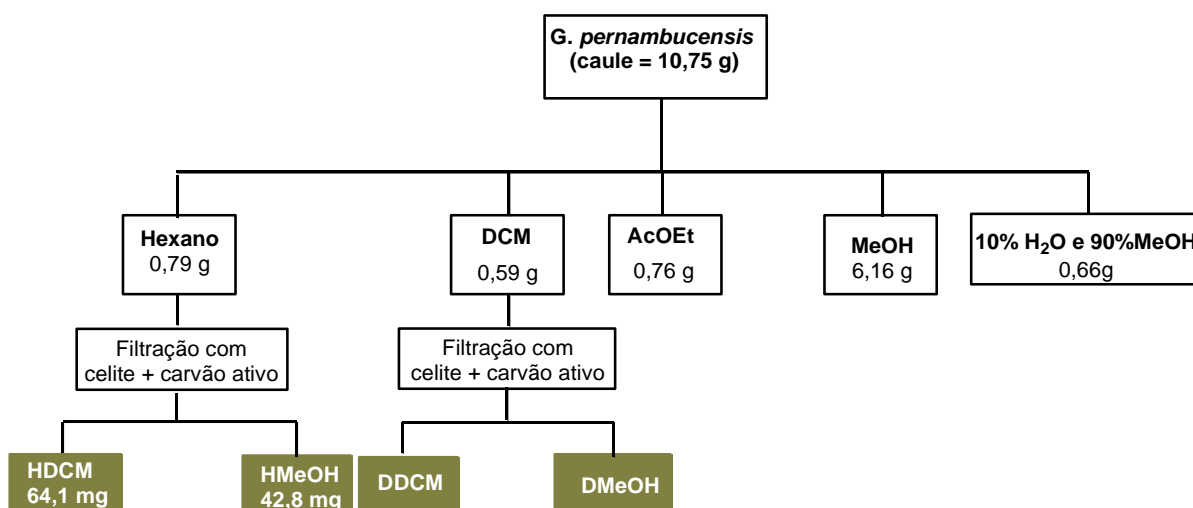
A espécie *G. pernambucensis* foi coletada na região de restinga no Complexo Lagunar Grussaí - Iquipari no Município de São João da Barra – RJ. Inicialmente foi realizada a triagem do material coletado, quando foi separados folhas e caule. O material vegetal (caule e folhas) foi diretamente submetidos à secagem a temperatura ambiente durante 7 dias. Em seguida procedeu-se a moagem do material vegetal em moinho de facas tipo Willey. O material pulverizado foi pesado e submetido à extração com solventes.

3.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

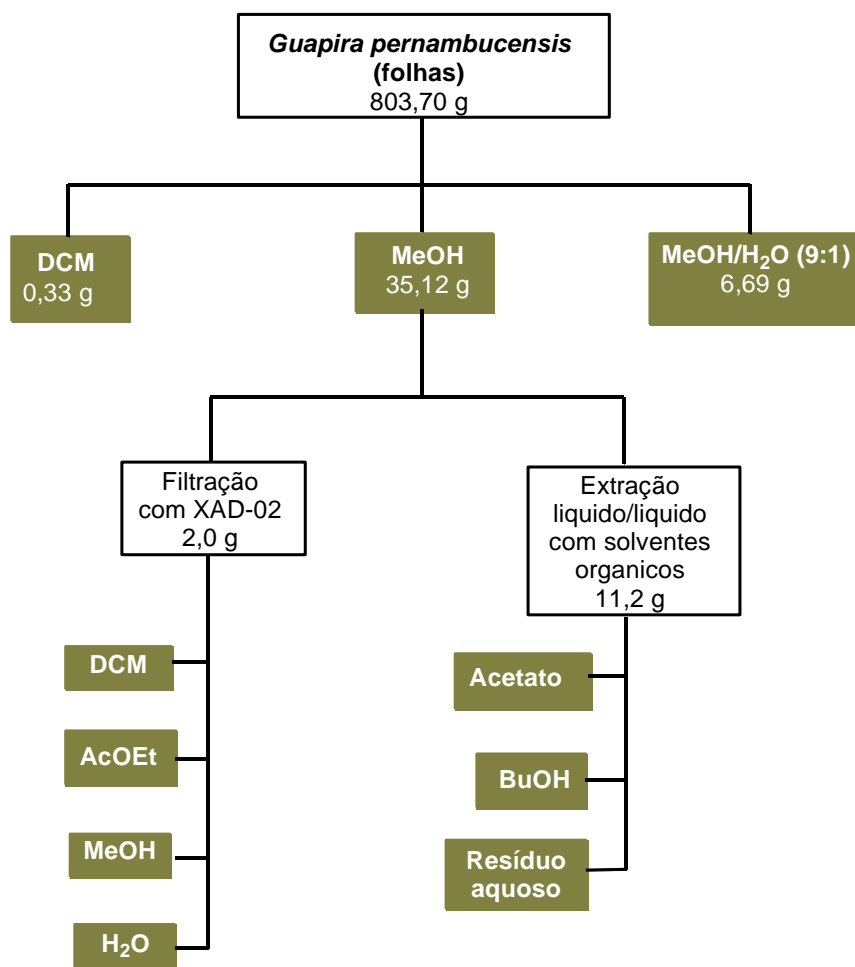
Folhas e caules de *G. pernambucensis* após secos, moídos e pesados foram submetido à extração a frio. Para as folhas as extrações foram feitas utilizando

CH₂Cl₂, MeOH e MeOH/H₂O (9:1). Para o caule foram utilizados Hexano, CH₂Cl₂, AcOEt, MeOH, e MeOH/H₂O (9:1).

Os extratos brutos foram concentrados em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, até obtenção de um resíduo. Os extratos brutos obtidos foram transferidos para frasco previamente tarados e mantido em capela de exaustão. Esse procedimento forneceu para o caule 0,79 g de extrato em hexano, 0,59 g em CH₂Cl₂, 0,76 g em AcOEt, 6,16 g de extrato em MeOH e 0,66 g de extrato hidroalcoólico. Para as folhas obteve-se 0,33 g de extrato em CH₂Cl₂, 35,12 g de extrato em MeOH e 6,69 g de extrato hidroalcoólico (Esquema 1 e 2, p. 32 e 33).



Esquema 1. Fluxograma resumido da preparação dos extratos brutos do caule de *G. pernambucensis*.



Esquema 2. Fluxograma resumido da preparação dos extratos brutos das folhas de *G. pernambucensis*

3.5. TESTE QUÍMICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

3.5.1. TESTES GENÉRICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE TRITERPENOS E ESTERÓIDES

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

✓ REAÇÃO DE LIEBERMANN-BURCHARD(Costa, 1994)

Misturou-se 10,0 mL de anidrido acético e 2,0 gotas de Ácido sulfúrico concentrado, em seguida, adicionou-se ao tubo de ensaio1.

✓ REAÇÃO DE SALKOWSKI (Joly, 1998)

Ao tubo de ensaio2 adicionou-se algumas gotas de ácido sulfúrico concentrado.

3.5.2. TESTE QUÍMICO PARA FENÓLICOS EM GERAL

Em todos os testes realizados para identificação de fenólicos, foi utilizado o extrato metanólico bruto das folhas de *G. pernambucensis*.

✓ REAÇÃO COM CLORETO DE ALUMÍNIO (Mouco &Cornélio, 2003)

Em um papel de filtro foram demarcadas duas áreas **A** e **B**, onde foram depositadas algumas gotas do extrato bruto metanólico (5 mg/mL). Em seguida foi adicionada a área **A** uma gota de solução de $AlCl_3$ 5% em etanol. As duas áreas foram analisadas.

✓ REAÇÃO COM CLORETO FÉRRICO (Shriner&Fuson, 1983)

Em um tubo de ensaio contendo 10,1 mg/mL do extrato bruto, foram adicionados 3,0 gotas de cloreto férrico 2% em etanol. Analisaram-se os resultados.

✓ REAÇÃO COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO (Mouco &Cornélio, 2003)

A um tubo de ensaio foram adicionados 5,2 mg do extrato bruto diluído em 5,0 mL de água destilada, e a este foram adicionadas duas gotas de hidróxido de sódio 5%. Os resultados foram analisados.

3.4.3. TESTE PARA ALCALÓIDES(Mouco &Cornélio, 2003)

Dissolveu-se, aproximadamente, 20,0 mg do extrato metanólico bruto das folhas de *G. pernambucensis* em 5,0mL de uma solução de MeOH/H₂O (7:3, v/v) com 1,0 gota de acido acético, em seguida foi realizada a adição do reagente Dragendorff gota a gota.

3.5. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE 2,2'-DIFENIL-1-PICRIHIDRAZIL (DPPH)

Neste ensaio foi analisado o extrato metanólico das folhas de *G. pernambucensis*, utilizando como controle positivo o flavonóide rutina e como controle negativo a solução de DPPH. O procedimento resumido esta ilustrado na Figura 6 (p.37).

✓ Metodologia: Primeiramente foram preparados 50,0 mL de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40,0 µg/mL. Em seguida foram feitas diluições de 35,0; 30,0; 20,0; 15,0; 10,0; 5,0 e 1,0 µg/mL a partir da solução estoque. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorbância, medidos em triplicatas, a 515 nm e tendo como branco o metanol.

Soluções com concentração de 500,0 µg/mL do extrato e do controle positivo em metanol foram diluídas nas concentrações de 250,0; 200,0; 150,0; 100,0; 50,0 e 25,0 µg/mL. Os valores das medidas de absorbâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH na concentração de 40,0 µg/mL) em todas as concentrações testadas, após 30 minutos reagindo, foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), através da equação:

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

Todas as análises foram realizadas em triplicata e a AA% foi calculada através de média aritmética. O valor da EC₅₀ foi calculado através da equação da reta do gráfico plotado, onde a abscissa representa às concentrações da amostra testada e a ordenada a %AA.

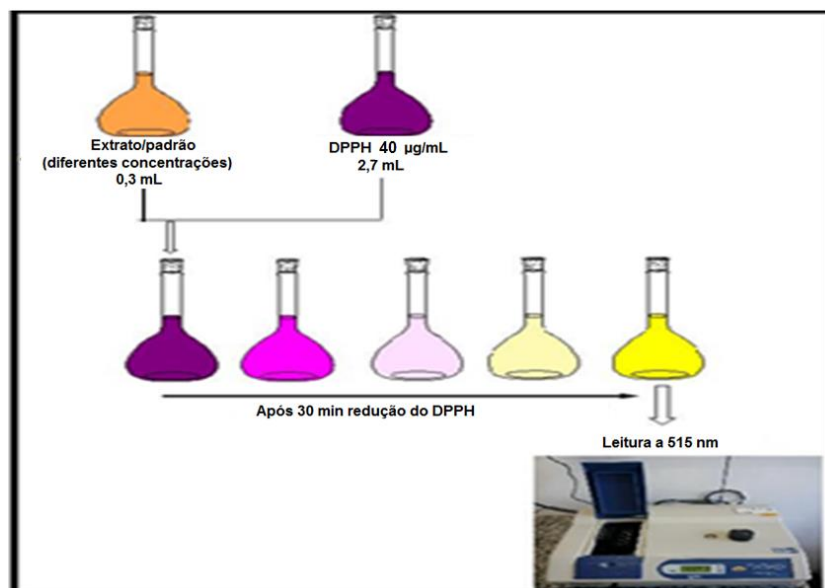


Figura 5. Metodologia resumida do teste de determinação da atividade antioxidante.

3.6. FLAVONÓIDES TOTAIS (Rio, 1996)

Inicialmente preparou-se uma curva de calibração com o padrão de rutina com uma faixa de concentração de 6,8 a 17,0 µg/mL. A cada concentração acrescentou-se 1,0 mL de solução de cloreto de alumínio (5,0 g de cloreto de alumínio em 100,0 mL de metanol). Completou-se o volume para 50,0 mL e 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.

A uma solução de 15,0 mL da solução do extrato (1,0mg/mL) adicionou-se 1,0 mL da solução de $AlCl_3$. Completou-se o volume com metanol até 50,0 mL em balão volumétrico. Após repouso por meia hora, fez-se a leitura em espectrofotômetro.

3.7. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROANTOCIANIDINAS POR ANÁLISE COLORIMÉTRICA PELO MÉTODO DA BUTANÓLISE

5,0mg do extrato em MeOH das folhas de *G. pernambucensis* foi solubilizado em 10,0 mL de MeOH (solução 0,5 mg/mL) em balão volumétrico. Com auxílio de

uma pipeta volumétrica 1,0 mL dessa solução foi colocado em um tubo de hidrólise contendo 4,0 mL de solução 5% de HCl em BuOH. O tubo foi fechado e a mistura reacional foi aquecida em banho Maria a 95°C por cerca de 2 h. Após esse período a mistura reacional foi resfriada e submetida à leitura em espectrofotômetro de ultravioleta a 540 nm, comparando-se os valores obtidos com os valores da solução inicial, isto é, o extrato metanólico bruto (Figura 5).

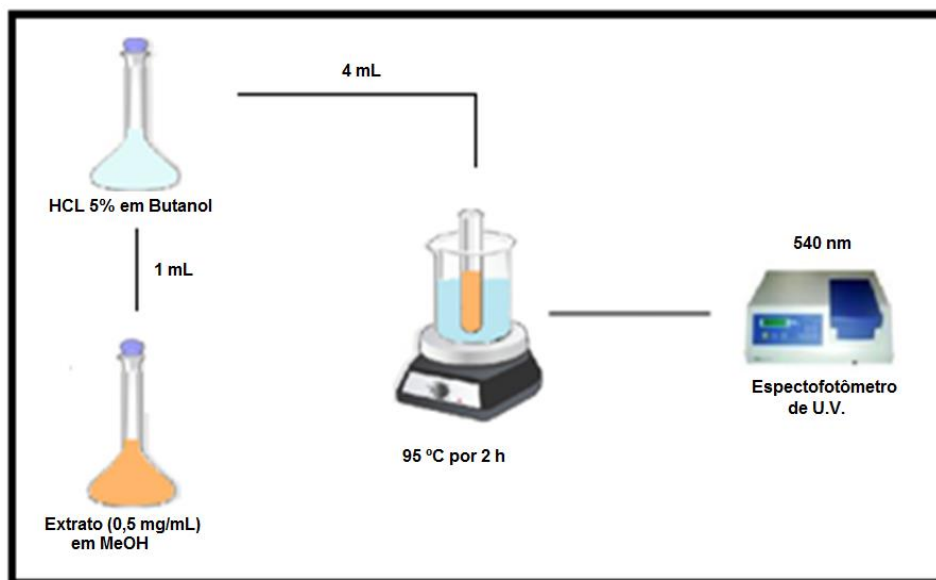


Figura 6. Metodologia resumida da solvólise (butanolise) de proantocianidinas no extrato em MeOH de *G. pernambucensis*.

3.8. ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.8.1. LETALIDADE FRENTE ÀS LARVAS DO MICROCRUSTÁCEO *Artemia salina* LEACH.

O ensaio da letalidade frente às larvas de *A. salina* foi feito segundo metodologia proposta por McLaughlin (McLaughlin *et al.*, 1982).

No bioensaio utilizou-se uma solução estoque (2,22 mg/mL) do extrato metanólico das folhas da *G. pernambucensis* solubilizado na mistura de água do mar/ DMSO 1% na proporção de 3:2 (v/v). a partir da solução estoque foram preparadas diluições nas concentrações 1,33; 0,89; 0,44; e 0,22 mg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicatas e estão ilustrados na Figura 7 (p. 38).

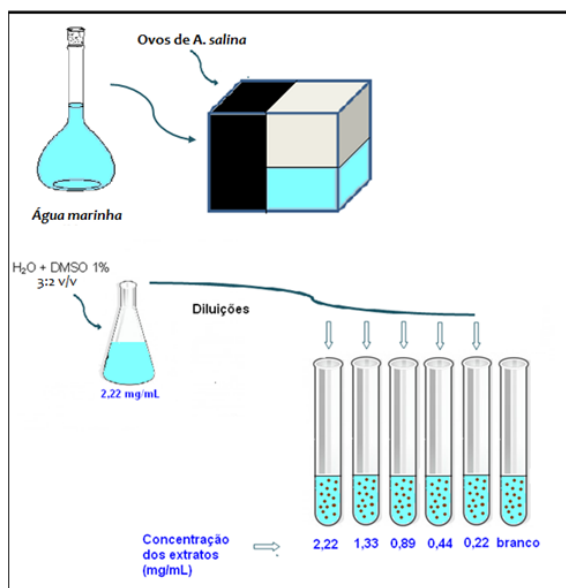


Figura 7. Metodologia resumida do teste de determinação do teor de toxicidade frente a larvas de *A. salina*.

3.9. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS

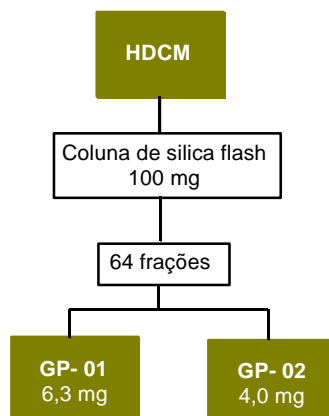
Todos os fracionamentos cromatográficos foram monitorados por cromatografia em camada delgada analítica de sílica gel (CCDA), utilizando-se diversos eluentes. Os cromatogramas foram observados sob luz visível e ultravioleta (254 e 365 nm) e então revelados com as soluções reveladoras citadas no item 3 (pág. 30).

3.9.1. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO HDCM DO EXTRATO BRUTO EM HEXANO DO CAULE DE *G. pernambucensis*.

O extrato em Hexano (0,794g) do caule de *G. pernambucensis* foi submetido a filtração a vácuo utilizando uma mistura de celite e carvão ativo. Os solventes utilizados foram o diclorometano e o metanol. Esse procedimento resultou em 323,9 mg **HDCM** (fração diclorometano) e 311,2 mg de **HMeOH** (fração metanólica).

Cerca de 100,0 mg da fração **HDCM** foi submetida a fracionamento em coluna aberta de sílica tipo *flash* utilizando como eluente CH₂Cl₂/MeOH (99,5: 0,5). Esse procedimento resultou em 67 frações. As frações foram reunidas de acordo com a semelhança de comportamento em CCDA originando 15 subfrações. As frações de números 15 - 18 foram reunidas e codificadas como GP-02 e as de números 30-43 como G.P-01 e posteriormente submetidas à análise através de cromatografia

gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM). O fracionamento encontra-se resumido no esquema 3.

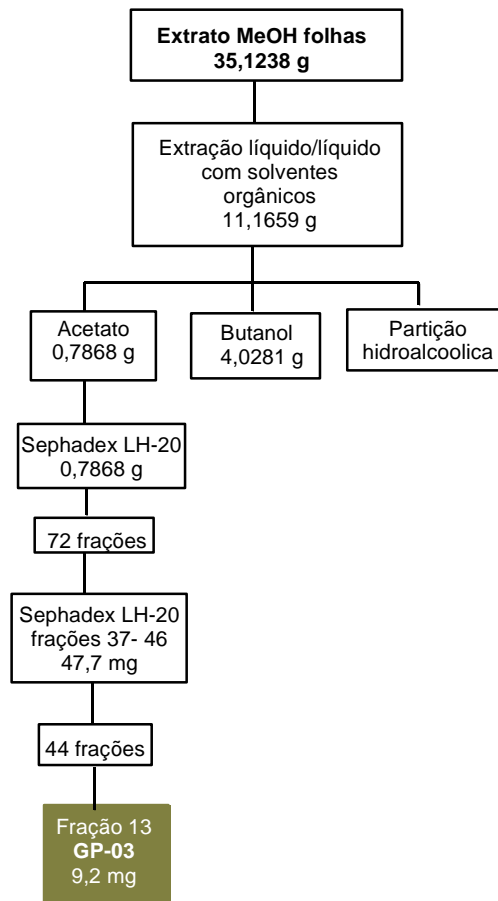


Esquema 3. Fluxograma resumido do fracionamento do extrato bruto em hexano do caule de *G. pernambucensis*

3.9.2. FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS de *G. pernambucensis*.

Aproximadamente 11,0 g do extrato em MeOH das folhas de *G. pernambucensis* foram submetidos a partição líquido/líquido entre os solventes orgânicos acetato de etila, *n*-butanol e H₂O. As frações orgânicas foram adicionadas de sulfato de sódio e filtradas em papel de filtro. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório e o resíduo foi deixado em capela de exaustão para eliminação do solvente remanescente. O resíduo de solvente orgânico da fração aquosa foi evaporado em evaporador rotatório e a água remanescente foi eliminada através de liofilização. Esse procedimento resultou em fração AcOEt (0,787g), fração em *n*-BuOH (4,03 g) e fração aquosa (5,81 g).

A fração em AcOEt, foi submetida a cromatografia de exclusão com Sephadex-LH-20, utilizando-se como eluente MeOH. Esse procedimento resultou em 72 frações que foram reunidas de acordo com a semelhança em CCDA. As frações de números 37 a 46 foram reunidas e submetidas ao mesmo procedimento citado anteriormente até o isolamento da mistura de substâncias codificada de GP-03 (9,2 mg). O Esquema 2 (p. 33) resume o fracionamento do extrato em MeOH das folhas de *G. pernambucensis*.



Esquema 4. Fluxograma resumido do fracionamento do extrato bruto em metanol das folhas de *G. pernambucensis*



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. TESTES QUÍMICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NOS EXTRATOS BRUTOS DE *G. pernambucensis*

4.1.1. TRITERPENOS E ESTERÓIDES

Os isoprenóides são característicos por sua acessibilidade, abundancia facilidade com que são isolados e composição relativamente simples motivando pesquisas desde o final do século XIX.

São classificados de acordo com o numero de unidades de isopreno (u.i.) que os constitui. Os esteróides são uma subclasse dos triterpenoides (C₃₀, seis u.i.). Os triterpenoides são os constituintes mais importantes dos óleos essenciais e também possuem atividades biológicas como: fortalecimento do sistema imunológico e reparação de tecidos (Castro *etal.* 2001).

Os testes químicos mais comuns para a identificação de triterpenos e esteróides são as reações de Libermann-Buchard e de Salkowski.

A reação de Liebermann-Buchard, ilustrada na figura 8, permite a identificação do esqueleto esteroidal, através do mecanismo proposto na reação mostrada na Figura 8 (p.43). Quando os reagentes são adicionados à amostra contendo esteróides ocorre uma mudança de coloração do meio reacional. O desenvolvimento de coloração esverdeada se dá devido à formação de um derivado sulfônico que absorve em torno de 416 nm.

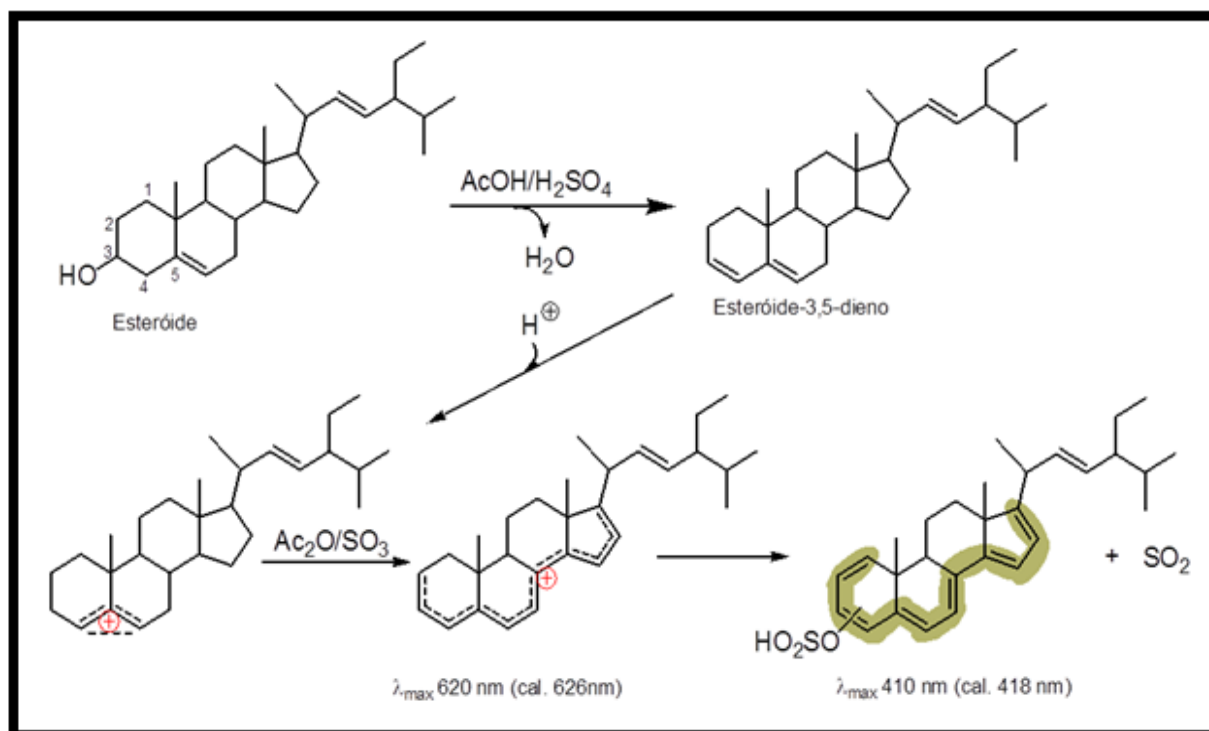


Figura 8. Mecanismo proposto para a reação de Liebermann-Buchard

Os testes químicos para identificação de triterpenóides e esteróides feito com o extrato em hexano do caule de *G. pernambucensis* mostrou resultado positivo para a duasreações (ocorreu intensificação da cor da mistura reacional). Os resultados estão apresentados na Tabela 1 e Figura 9 (p.44).

Tabela 1. Resultados do teste químico para identificação de triterpenos e esteroides

Testes Químicos	Resultados	Observações
Reação de Liebermann-Burchard	+	Intensificação da cor
Reação de Salkowski	+	Intensificação da cor

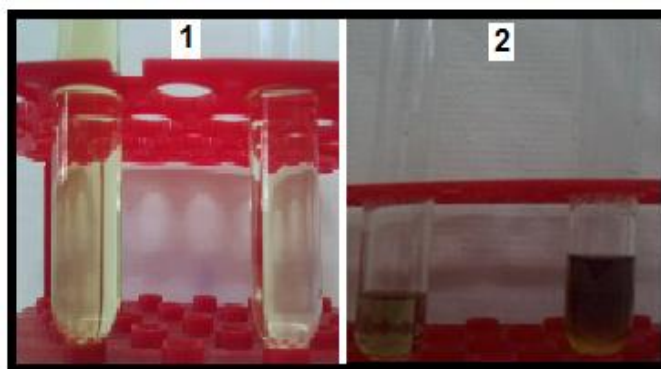


Figura 9. 1-reação de Liebermann-Burchard e 2-Reação de Salkowski.

4.1.2. FENÓLICOS EM GERAL E FLAVONÓIDES

Na identificação da presença de flavonoides em um extrato, sem que ocorra a interferência de outras substâncias fenólicas, comumente emprega-se o método colorimétrico com AlCl_3 onde o cátion Al^{3+} forma complexos estáveis com os flavonóides, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda (desvio batocrômico) e uma intensificação da cor (efeito hiperacrômico) (Marcucci, 1998; Marques, 2012) (Figura 10).

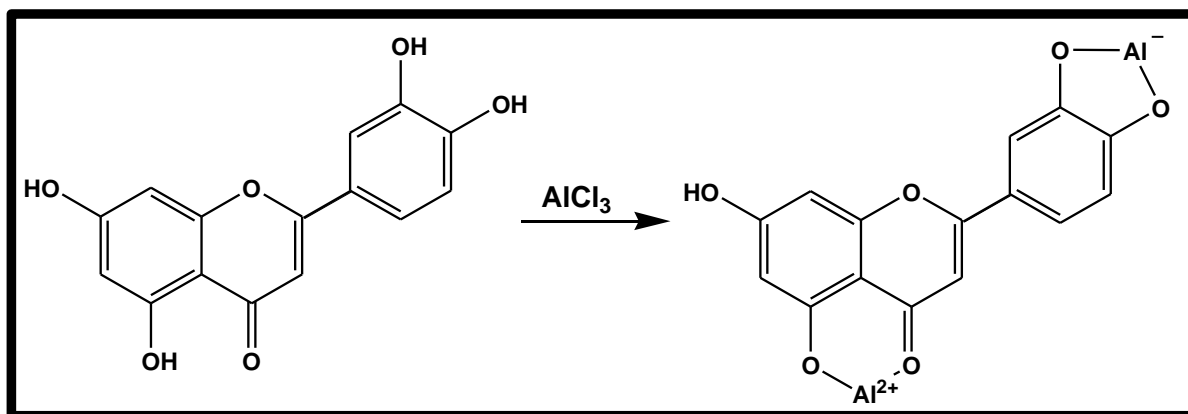


Figura 10. Complexo formado entre flavonóide e AlCl_3

Na reação com AlCl_3 , feita com extrato metanólico das folhas de *G. pernambucensis*, a área com reagente apresentou intensificação da cor (amarelo claro → amarelo escuro) quando visualizado na luz UV/VIS, caracterizando resultado positivo. Nas reações com FeCl_3 e NaOH as soluções quando em contato com o reagente, sofreram mudança de coloração (amarelo claro → verde escuro; amarelo

claro→amarelo escuro respectivamente) (Figura 11). Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados do teste químico para identificação de flavonoides e fenólicos em geral.

Teste	Metabólito	Resultado
Reação com Cloreto de Alumínio	Flavonóides	+
Reação com Cloreto Férrico	Fenólicos em geral	+
Reação com Hidróxido de Sódio	Flavonóides	+

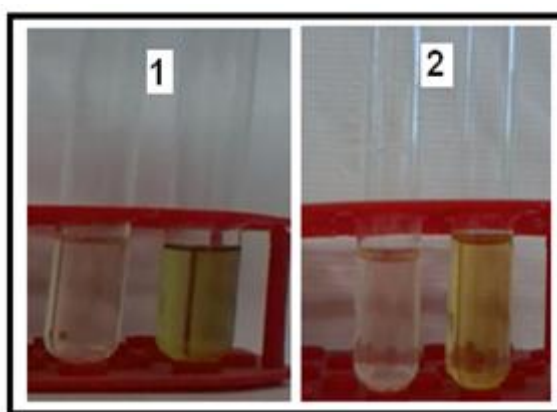


Figura 11. Foto ilustrativa da reação com FeCl_3 (1) e da reação com NaOH (2).

4.1.3. TESTE PARA ALCALÓIDES

Alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas principalmente em plantas e com menos frequência, em micro-organismos e animais (Barbosa *et al.* 2003).

Exemplos de alcalóides muito conhecidos incluem a nicotina, presente em variedades de fumo (*Nicotianatabacum*); a cocaína, presente em folhas de *Erythroxylon coca*; e a cafeína, de sementes de café e folhas de chá. Estudos revelam atividades biológicas como: atividade antitumoral (vincristina e vimblastina), tratamento da malária (quinina), regulação das funções do miocárdio (quinidina), dentre outras (Castro *et al.* 2001).

A presença de um ou mais átomos de nitrogênio na molécula confere a maioria dos alcaloides um caráter básico, possibilitando a formação de sais quando presentes em meio ácido (Gama, 2012).

No teste realizado com extrato metanólico das folhas de *G. pernambucensis* observou-se a formação de um precipitado indicando a presença de alcalóides no extrato. O resultado obtido está ilustrado na Figura 12.

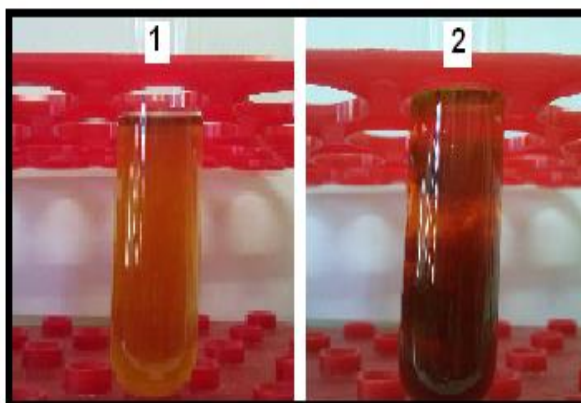


Figura 12. Solução da amostra antes da reação (1) e após reagir com o reagente de Dragendorff (2)

4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) PELO MÉTODO DO DPPH

Após o trabalho de Pincemail & Deby (1986) que relata a utilização do extrato padronizado da espécie *Ginkgobiloba* na terapêutica antioxidante, a procura de novas substâncias ou extratos brutos com atividade antioxidante (AA) vem aumentando consideravelmente. Dentre as metodologias utilizadas podemos destacar o método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), um radical livre estável à temperatura ambiente, com coloração violeta característica em solução etanólica (Mensor, 1999; 2001).

Para medida da AA do extrato metanólico das folhas de *G. pernambucensis*, inicialmente construiu-se uma curva de calibração de diferentes concentrações do padrão de DPPH *versus* absorvância e em seguida calculou-se a equação da reta ($y = 0,027x - 0,005$; $R = 0,998$). Em seguida foram preparadas conhecidas do padrão rotina e fez-se reagir com DPPH. Mediram-se as absorvâncias e calculou-se a equação da reta ($y = 0,117x + 15,46$; $R = 0,997$). O mesmo procedimento descrito

anteriormente foi realizado com a amostra. A partir daí calculou-se a EC_{50} para a rutina ($EC_{50} = 292,9 \mu\text{g/mL}$) e para a amostra ($EC_{50} = 287,9 \mu\text{g/mL}$). Os resultados obtidos estão apresentados nos Gráfico 1 a 3 apresentados abaixo.

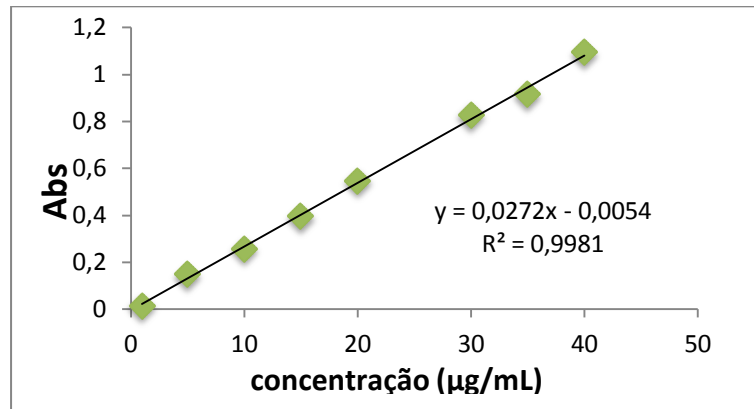


Gráfico 1. Curva de calibração do DPPH.

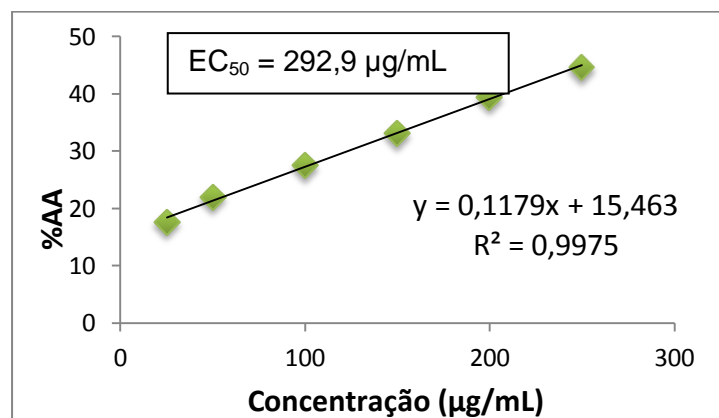


Gráfico 2. Atividade antioxidante obtida para o flavonoide Rutina

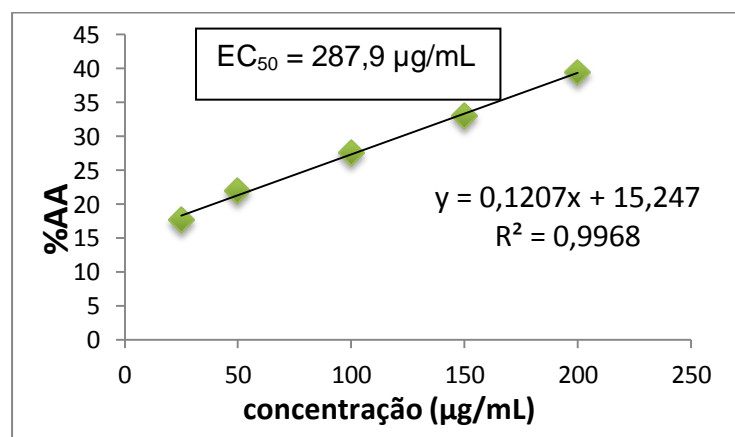


Gráfico 3. Atividade antioxidante obtida para o extrato metanólico das folhas de *G. pernambucensis*.

4.3. AVALIAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS – MÉTODO DO CLORETO DE ALUMÍNIO

Inicialmente prepararam-se diferentes concentrações do padrão rutina e mediu-se a absorbância a 425 nm conforme mostrado na Tabela 3. Com os resultados obtidos construiu-se uma curva de calibração de concentração *versus* absorbância. Através do gráfico foi possível obter a equação da reta (Gráfico 4).

Tabela 3. Absorbâncias obtidas para o padrão Rutina no teste do Teor de Flavonóides Totais

Rutina	
Concentração	Absorbância
6,8 µg/mL	0,020
8,5 µg/mL	0,029
10,2 µg/mL	0,038
11,9 µg/mL	0,044
13,6 µg/mL	0,050
15,3 µg/mL	0,063
17,0 µg/mL	0,078

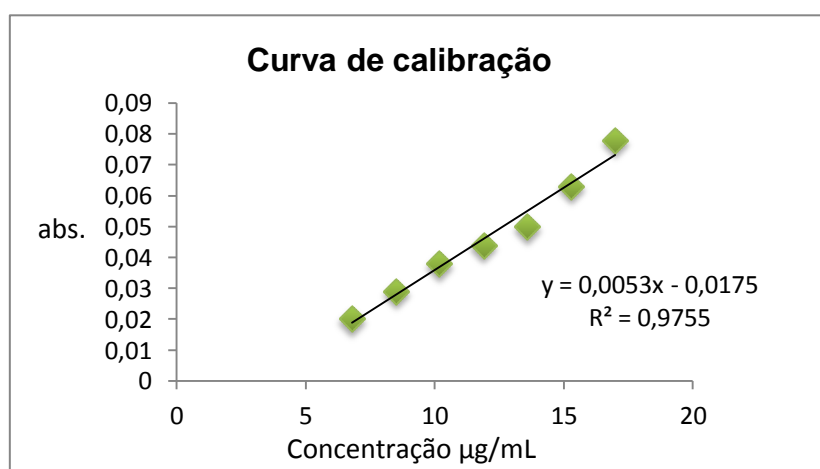


Gráfico 4. Curva de calibração para o padrão de rutina no teste de teor de Flavonóides Totais.

Após obtenção da equação da reta, realizou-se a medida da absorbância da amostra em triplicata (Tabela 4, pag. 49) e a partir daí com base na equação da reta foi possível determinar um teor de 6,13 µg de flavonóides totais presentes em 1 mL de extrato bruto.

Tabela 4. Resultado das absorvâncias encontradas para o extrato metanólico no teste do Teor de Flavonóides Totais.

Extrato em MeOH	Absorvância
Frasco 1	0,013
Frasco 2	0,014
Frasco 3	0,018
Média	0,015

4.4. ANÁLISE DE PROANTOCIANIDINAS PELO MÉTODO DA SOLVÓLISE

O método fundamenta-se na reação colorimétrica com intensa absorção na região de 550 nm, após tratamento com ácido. A clivagem oxidativa dos taninos condensados formam antocianidinas evidenciando a labilidade da ligação C₄-C₈ (Figura 13, p. 50).

Na reação é possível verificar que a decomposição da proantocianidinas catalisada por ácido produz cianidinas da parte superior do dímero e um flavan-3-ol da unidade terminal ocasionada pela protonação do anel D da unidade terminal do dímero. A ressonância estabiliza o cátion formado.

Em seguida ocorre a quebra da ligação entre o anel C e D para estabilizar o íon. O dímero fragmentado dá origem a um monômero (unidade terminal) e a cianidina (unidade superior). A unidade superior em forma de carbocátion perde próton gerando flavan-3-eno, que por sua vez sofre oxidação fornecendo antocianidina de coloração vermelha.

Em meio ácido, alcoólico e a quente, as proantocianidinas caracterizam-se pela liberação de antocianidinas, devido à quebra das ligações estabelecidas entre as unidades monoméricas. As antocianidinas liberadas para o meio, conforme for o grau de hidroxilação do anel **B**, podem ser a pelargonidina, a cianidina ou a delphinidina (Figura 14, p. 51).

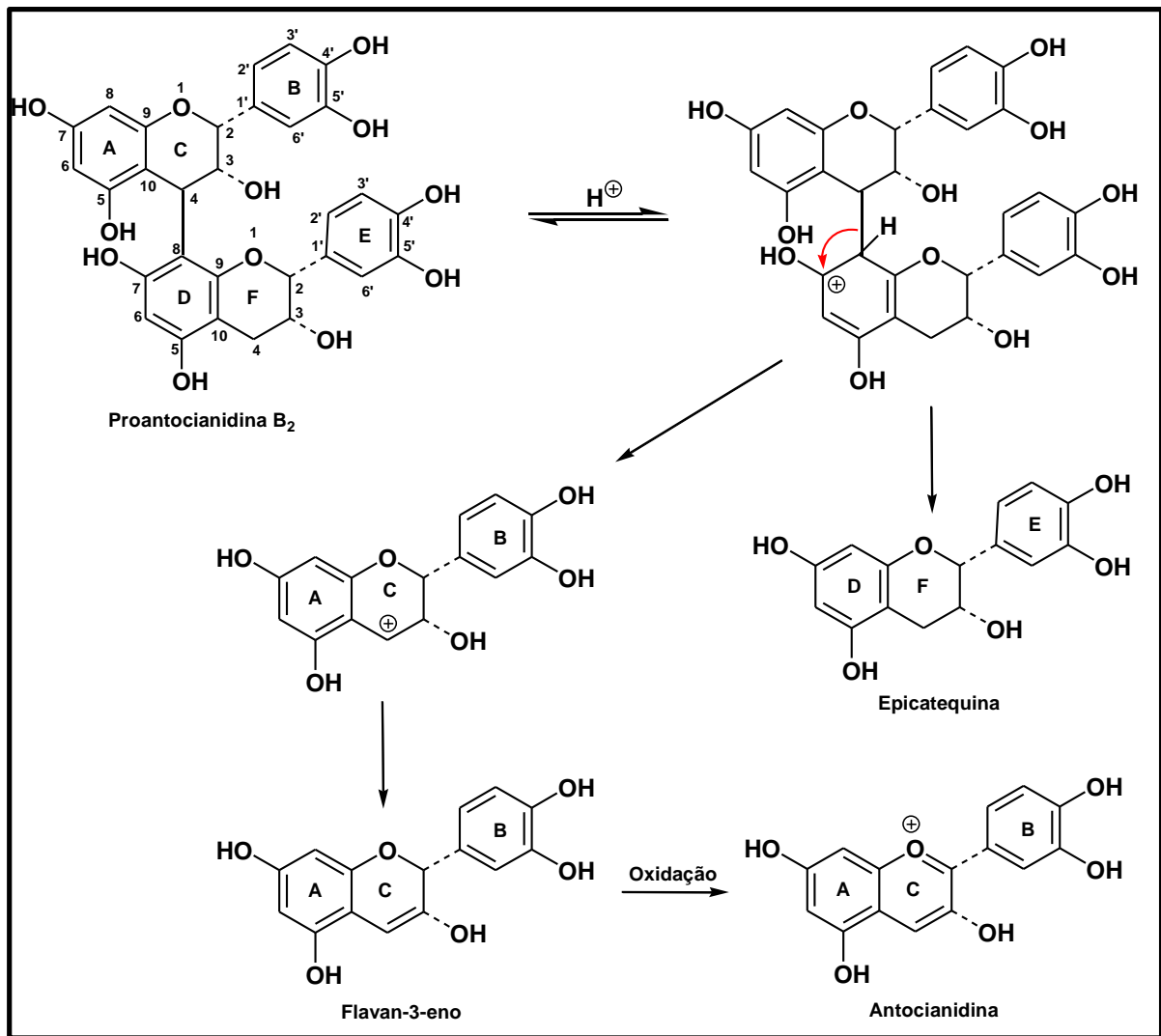


Figura 13. Decomposição de uma proantocianidina catalisada por ácido

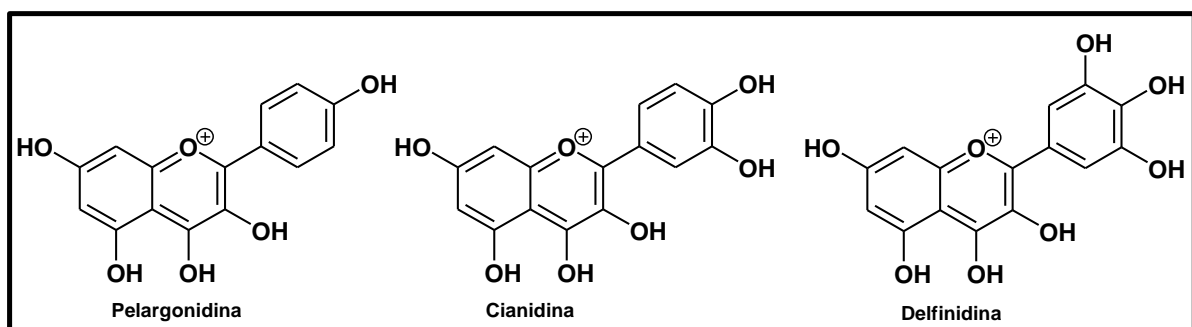


Figura 14. Estrutura da pelargonidina, cianidina e delfinidina

O produto da reação é a formação quantitativa de antocianidinas, resultado da quebra das ligações entre as flavonas pelo ácido [ligações C-C (4 → 6) e (4 → 8)], sendo a primeira mais resistente. Essas substâncias possuem coloração vermelha

cuja densidade ótica é proporcional a quantidade de proantocianidinas nas amostras, obedecendo a Lei de Lambert-Beer.

A leitura das absorvâncias do extrato do extrato em MeOH das folhas de *G. pernambucensis* antes e após a butanolíse é mostrada nas Figuras 15 e 16 (p. 52), onde podemos notar que após a reação apareceu uma absorção 548 nm característico da presença de catequinas.

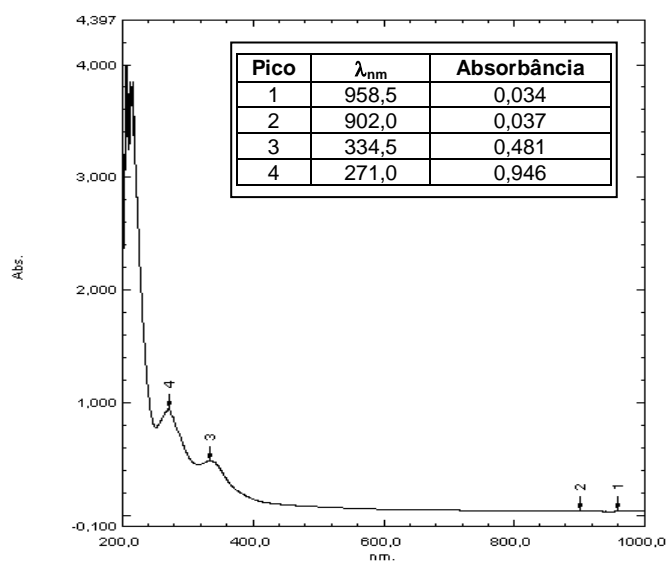


Figura 15. Espectro na região do ultravioleta do extrato em MeOH de *G. pernambucensis* diluído em MeOH antes da reação com BuOH/HCl/ Δ

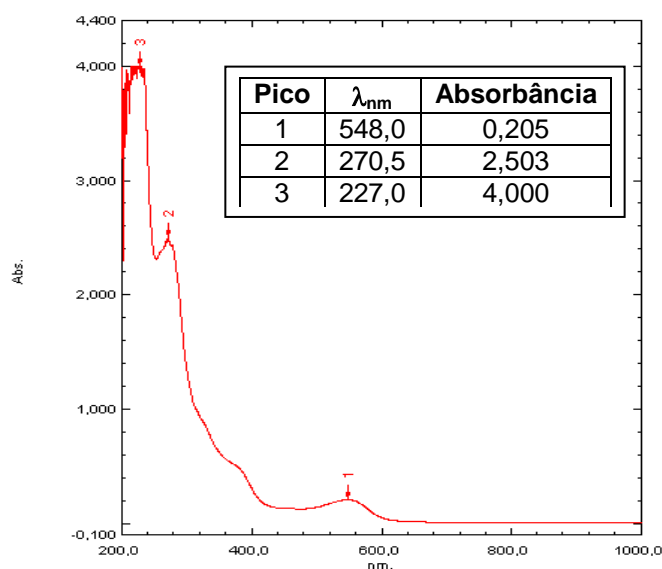


Figura 16. Espectro na região do ultravioleta do extrato em MeOH de *G. pernambucensis* depois da degradação com BuOH/HCl/ Δ

4.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.5.1. CITOTOXICIDADE FRENTE ÀS LARVAS DE *Artemia salina*

Os resultados apresentados pelo extrato bruto metanólico das folhas de *G. pernambucensis* no ensaio da letalidade frente a larvas de *Artemia salina* estão ilustrado na Tabela 5. Os dados obtidos foram tratados estatisticamente pelo método log-Probit determinando os valores de DL₅₀.

O extrato metanólico apresentou uma DL₅₀ = 171 µg/mL. Segundo McLaughlin, os valores de DL₅₀ ≤ 10³ µg/mL são considerados ativos para extratos brutos.

Tabela 5. Citotoxicidade do extrato em MeOH de *G. pernambucensis* frente as larvas de *A. salina*.

Porcentagem de Naúplios Mortos após 24 h	
Concentração (mg/mL)	% de naúplios mortos
2,22	62
1,33	57,8
0,89	55,6
0,44	51,1
0,22	51,1
Branco	0
DL₅₀	171 µg/MI

4.6. AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS BRUTOS DE *G. pernambucensis*

4.6.1. IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO HEXÂNICO DO CAULE DE *G. pernambucensis*

O extrato hexânico do caule de *G. pernambucensis* depois de submetido à filtração (Item 3.7.1., p. 38) forneceu duas frações. A fração em diclorometano forneceu as subfrações GP-01 e GP-02 que após revelação com vanilina sulfúrica sugeriu tratar-se de esteróides.

4.6.1.1. IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA GP-01

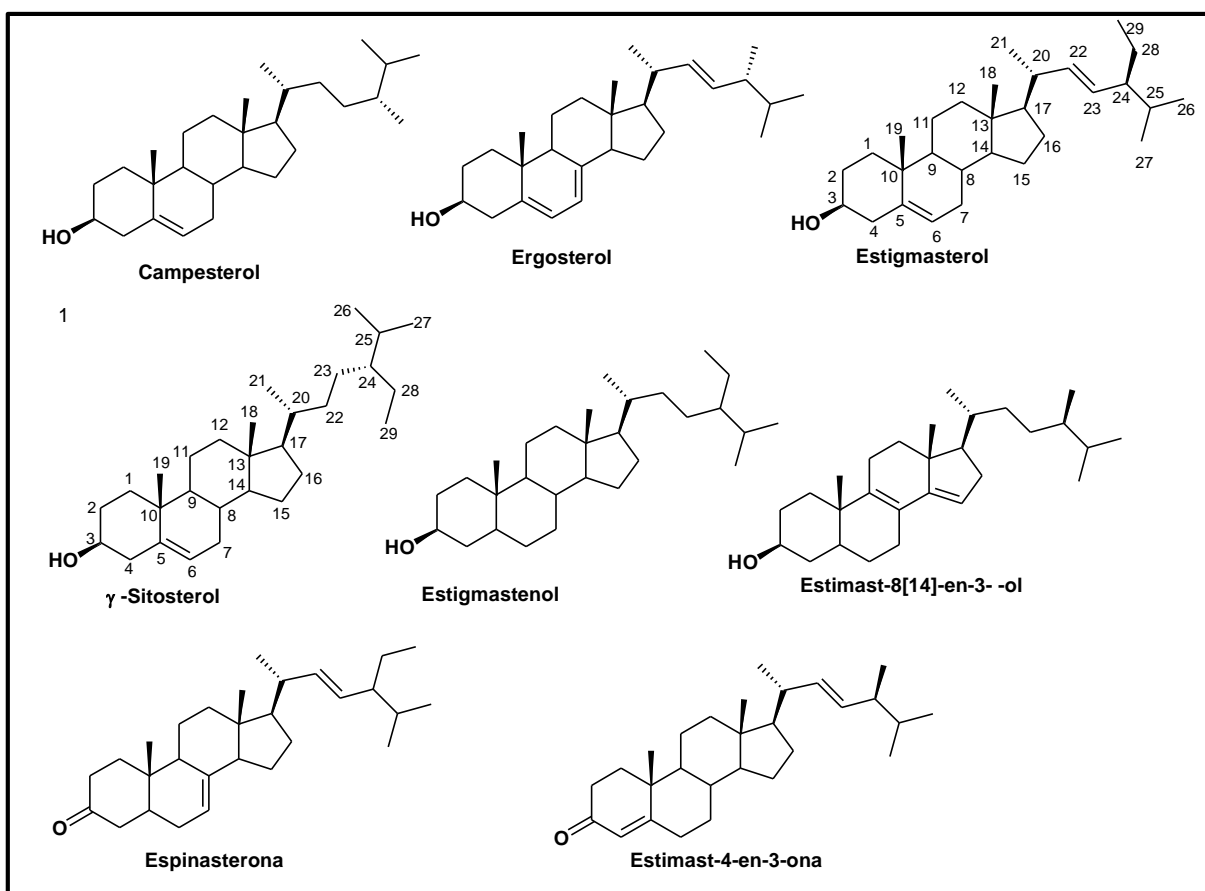


Figura 17. Perfil químico dos componentes da mistura GP-01

A mistura de substâncias GP-01 mostrou-se como sólido branco amorfo e apresentou os seguintes dados espectroscópicos: o espectro na região do infravermelho, obtido em KBr, revelou a presença de bandas de absorção condizentes com a presença de grupo hidroxila em $3441,16\text{ cm}^{-1}$ e de grupos metílicos, metilênicos e metínicos respectivamente em $2933,85$; $2866,34$ e $2850,91\text{ cm}^{-1}$ conforme mostra a Figura 18 (p.55).

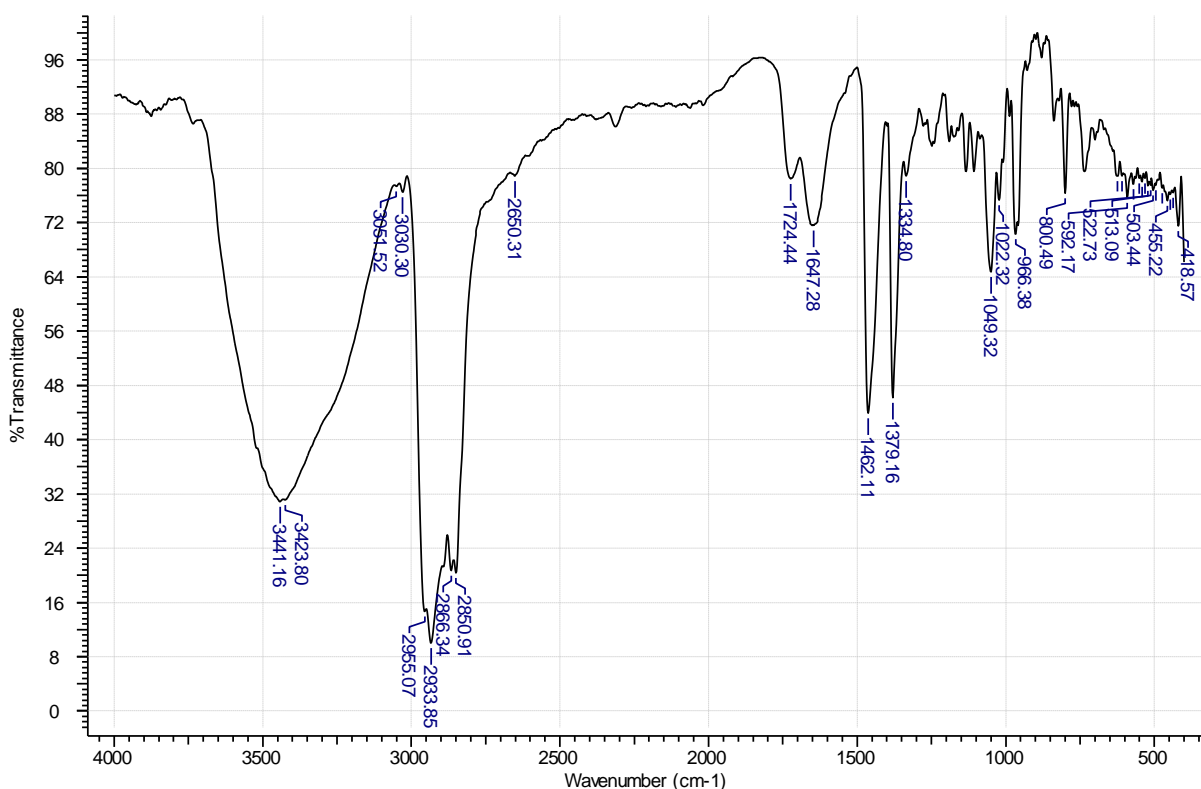
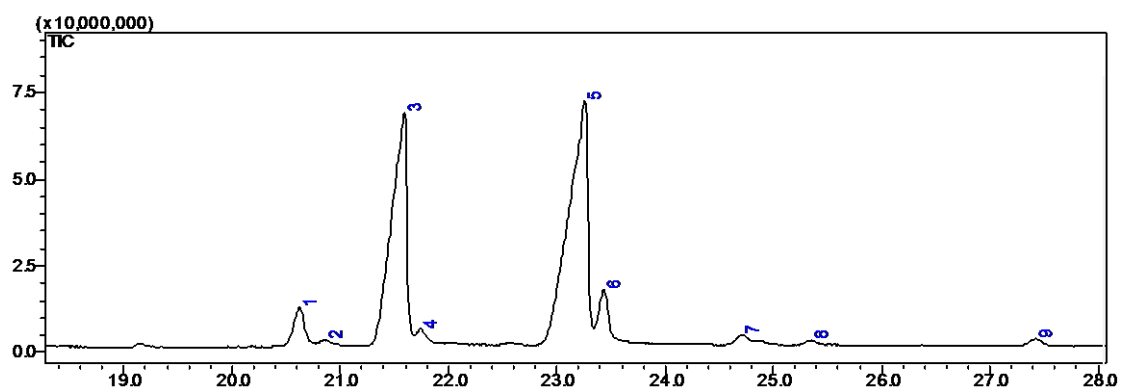


Figura 18. Espectro no infravermelho da mistura de substancias GP-01.

A análise da amostra GP-01 através de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas mostrou-se como uma mistura de nove substâncias, sendo os componentes majoritários o estigmasterol e o γ -sitosterol (Figuras 19 a 28, p. 56 a 59) cujas proporções encontram-se indicadas na Tabela 6 (p. 56). Os componentes majoritários da mistura foram identificados especialmente pela análise dos espectros de CG/EM.

Tabela 6. Tempos de retenção (t_R) e área (%) dos componentes de GP-01.

Pico	Substância	t_R	%
1	Campesterol	20.6	6,2
2	Ergosterol	20.9	0,8
3	Estigmasterol	21.6	38,2
4	Não identificado	21.7	2,5
5	γ-Sitosterol	23.2	40,2
6	Estigmastenol	23.4	8,8
7	Estigmast-8[14]-en-3- β -ol	24.7	1,3
8	Espinasterona	25.3	0,8
9	Estimast-4-en-3-ona	27.4	1,2

**Figura 19.** Cromatograma da mistura de substância GP-01

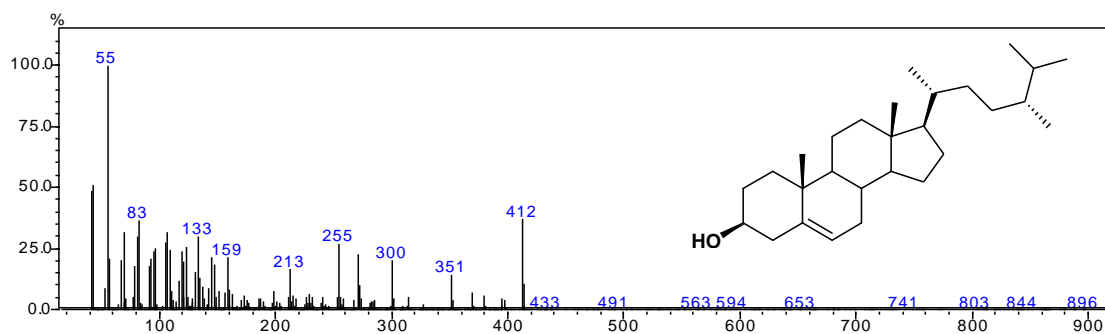


Figura 20. Fragmentograma do pico no. 1 (Campesterol)

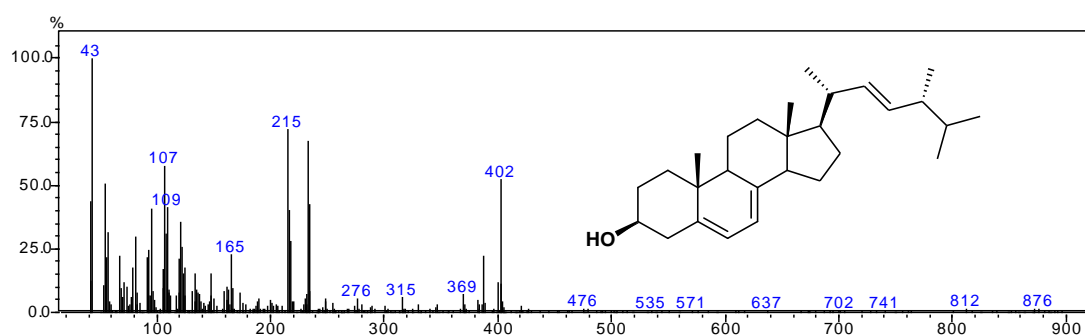


Figura 21. Fragmentograma do pico no. 2 (Ergosterol)

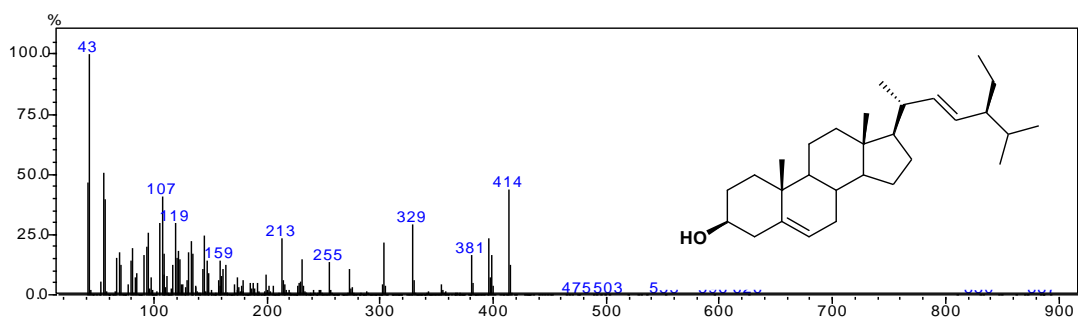


Figura 22. Fragmentograma do pico no. 3 (Estigmasterol)

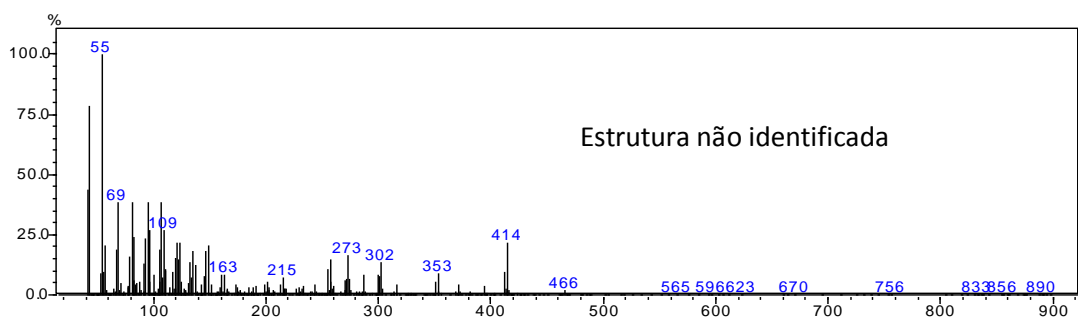


Figura 23. Fragmentograma do pico no. 4

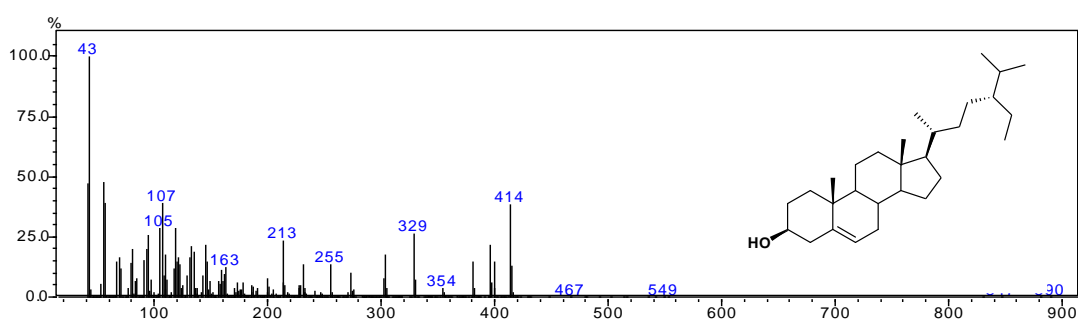


Figura 24. Fragmentograma do pico no. 5 (γ -Sitosterol)

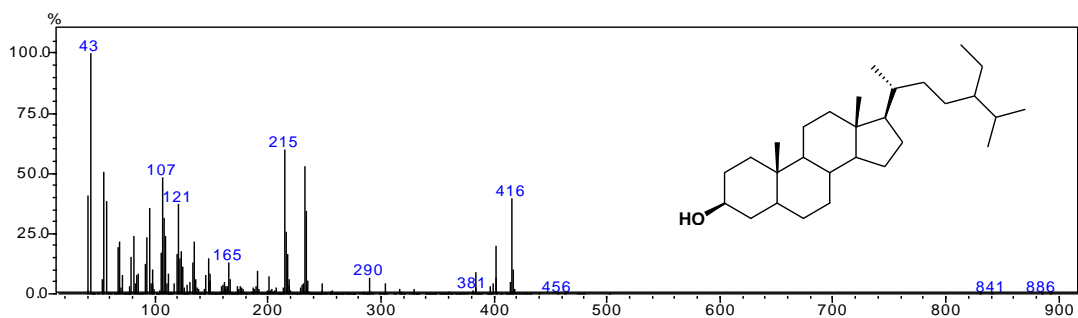


Figura 25. Fragmentograma do pico no. 6 (Estigmastenol)

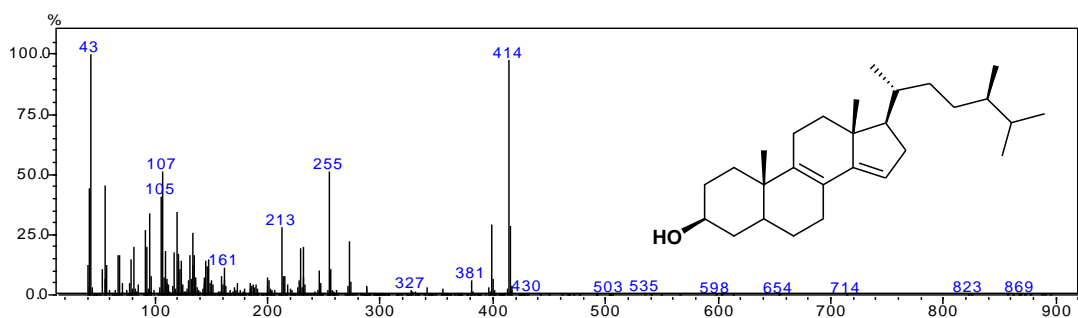


Figura 26. Fragmentograma do pico no. 7 (Estimast-8[14]-en-3-β-ol)

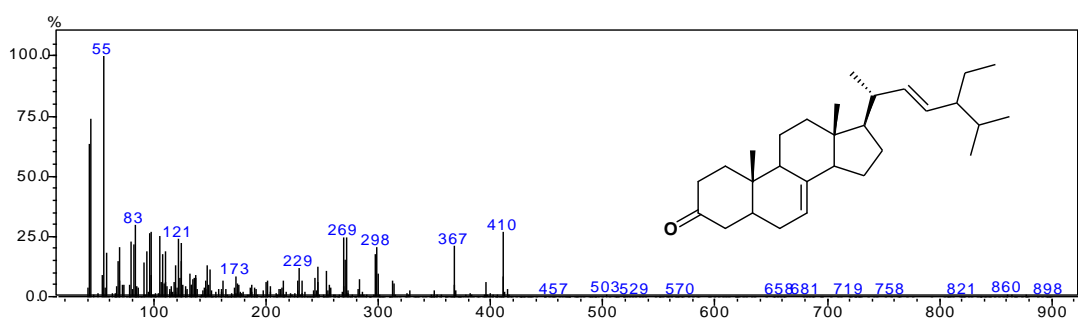


Figura 27. Fragmentograma do pico no. 8 (Espinasterona)

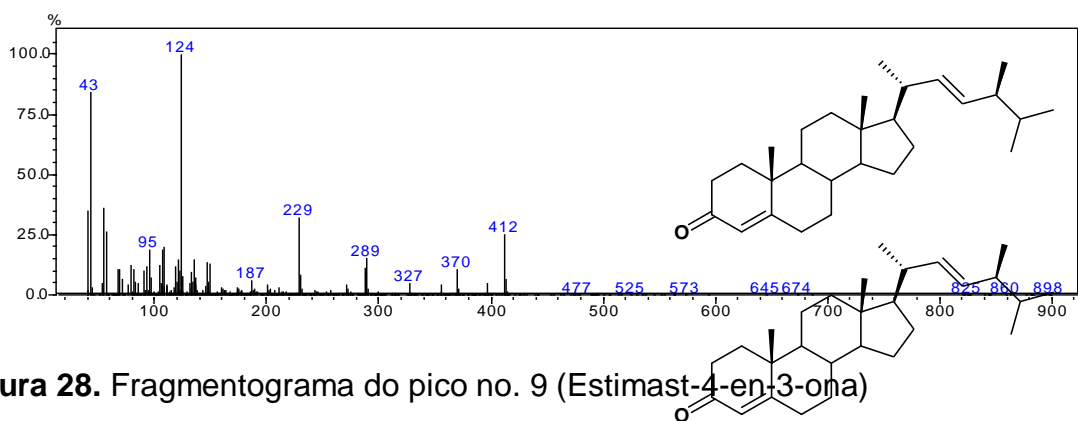


Figura 28. Fragmentograma do pico no. 9 (Estimast-4-en-3-ona)

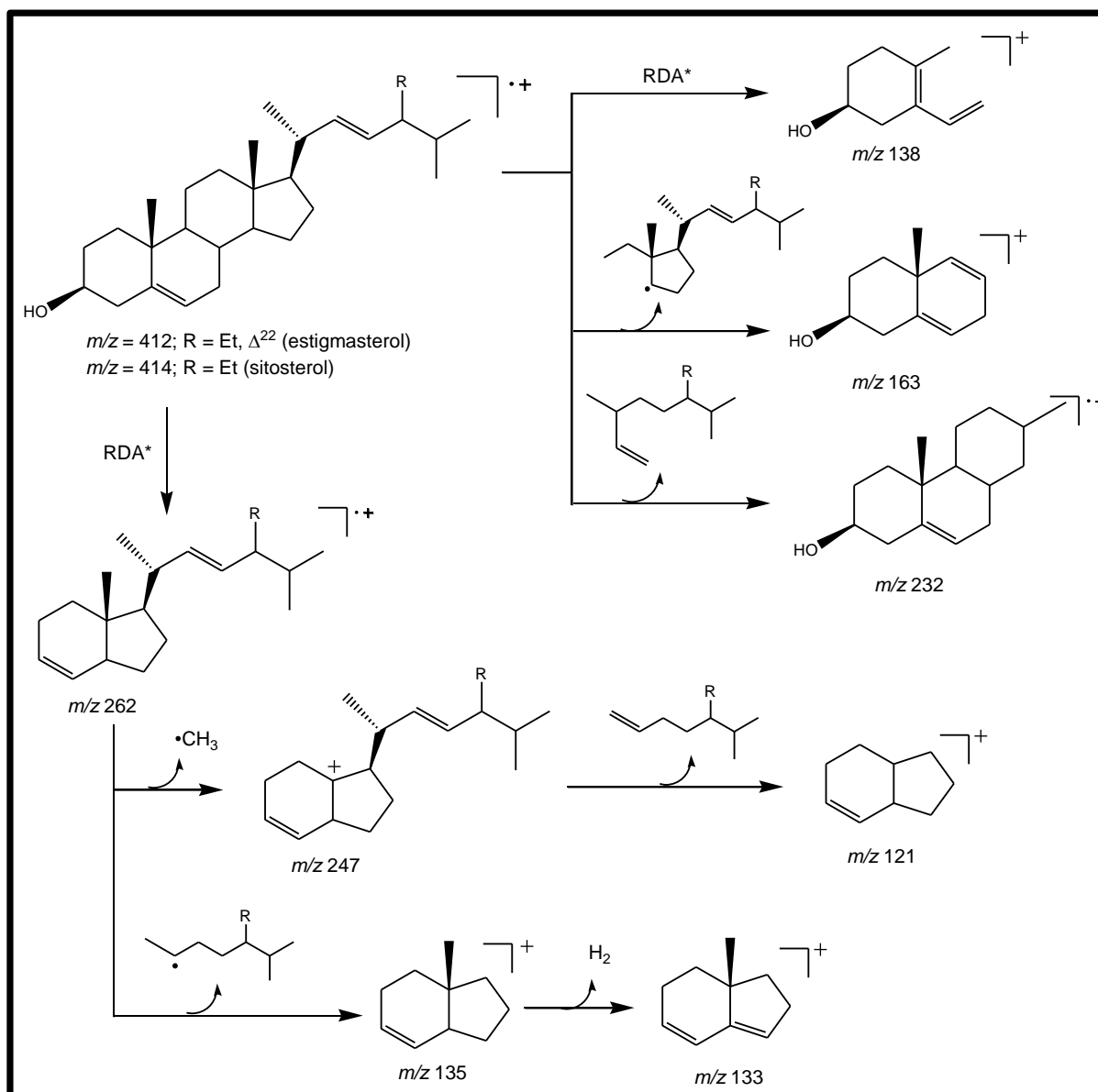


Figura 29. Proposta de fragmentação dos componentes majoritários de GP-01

Os espectros de RMN ^1H (500 MHz) de GP-01 (Figuras 30 a 32, p. 61 e 62) apresentou-se dois sinais largos a 3,53 ppm, atribuído ao hidrogênio do carbono carbinólico e 5,37 ppm referente ao hidrogênio olefínico H-6. Foram observados também um grande numero de sinais na região entre 0,6 e 1,3 ppm relativos aos hidrogênios dos grupos metílicos do esqueleto estereoidal.

Os espectros de RMN ^1H apresentou ainda sinais referentes aos hidrogênios vinílicos (H-22 e H-23) que aparecem como dois duplos dupletos entre 5,00 e 5,18 ppm.

Os espectros de RMN ^{13}C -APT da mistura GP-01 (Figuras 33 a 35, p. 63 e 64) apresentou sinais atribuídos aos carbonos C-5 (140,7 ppm) e C-6 (121,7 ppm) do sitosterol e do estigmasterol e também sinais atribuídos ao CH-23 (129,3 ppm) e CH-22 (138,3 ppm) do estigmasterol (SEO *et al.*, 1988).

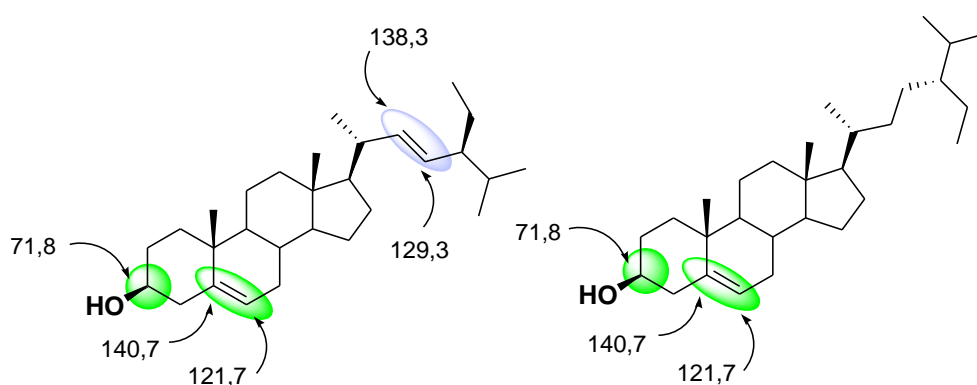


Figura 30. Deslocamentos químicos.

As substâncias minoritárias da mistura foram identificadas especialmente pela análise dos espectros de CG/EM.

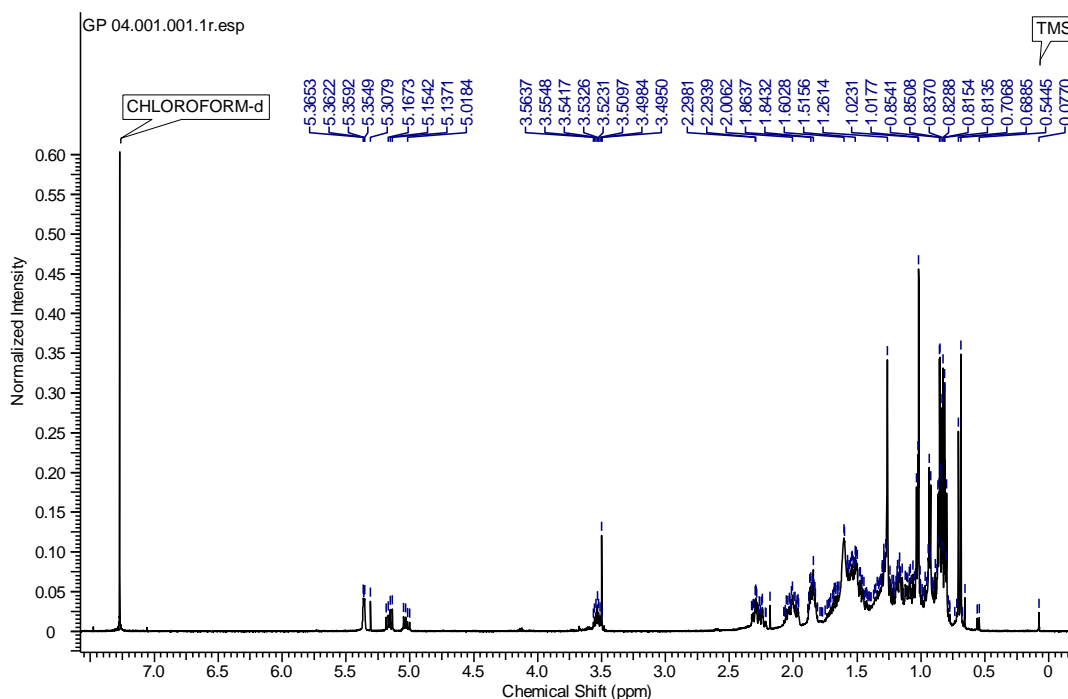


Figura 31. Espectro de RMN- ^1H da mistura de substâncias GP-01

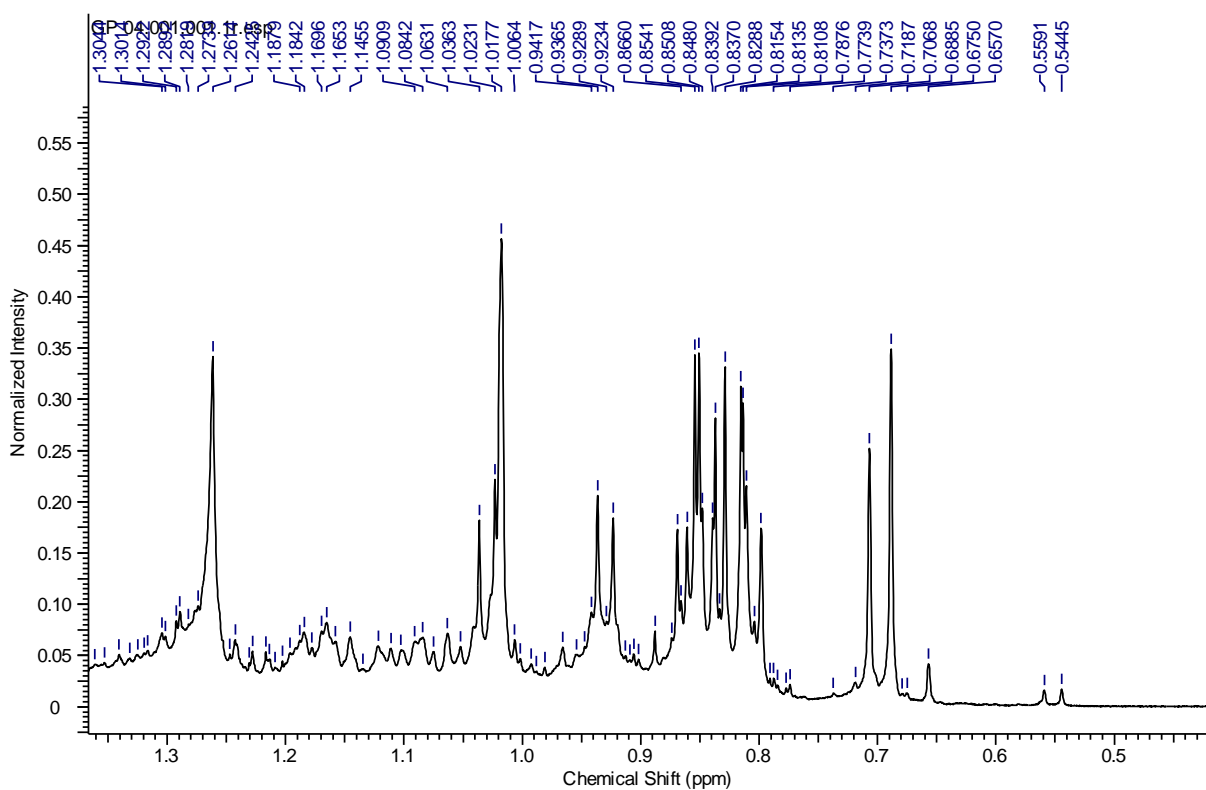


Figura 32. Espectro de RMN-¹H da mistura de substâncias GP-01(ampliação)

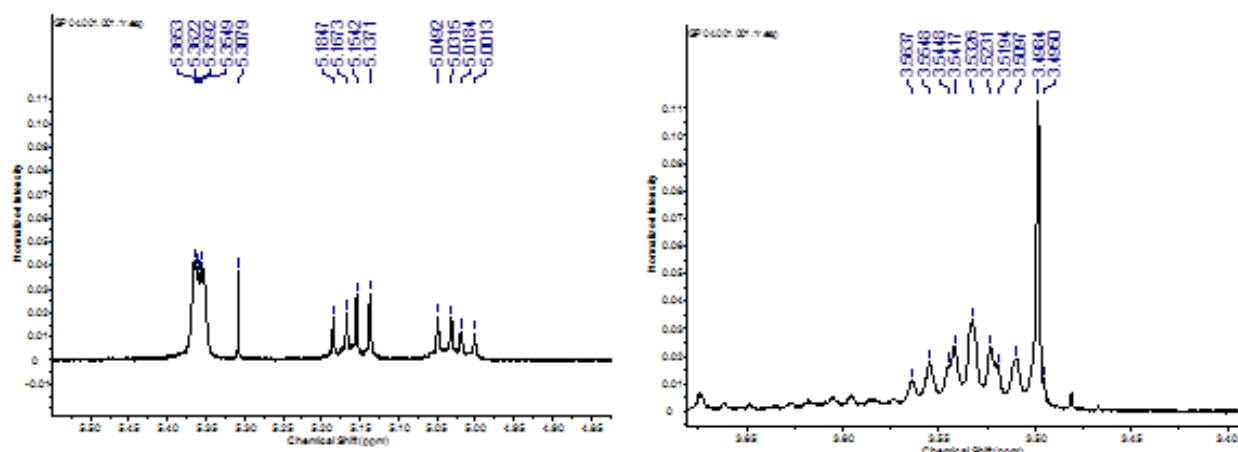


Figura 33. Espectro de RMN-¹H da mistura de substâncias GP-01(ampliação)

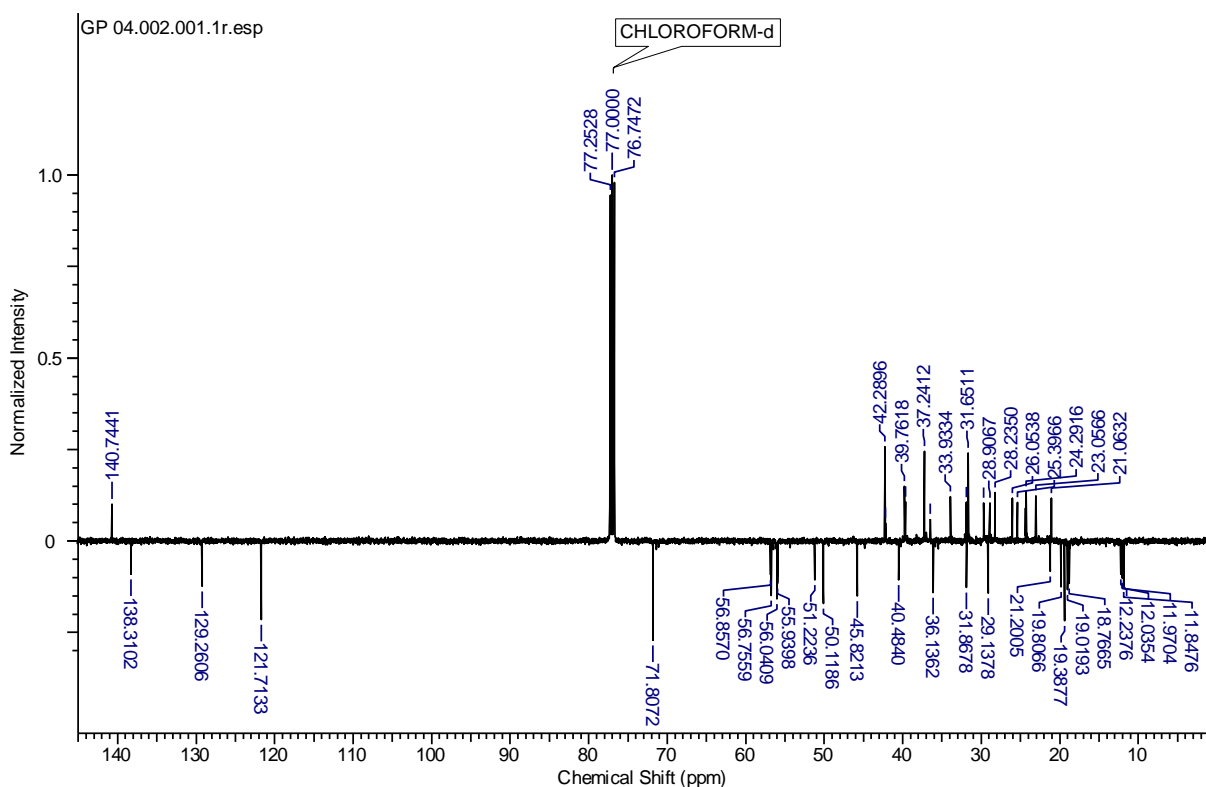


Figura 34. Espectro de RMN-¹³C da mistura de substâncias GP-01

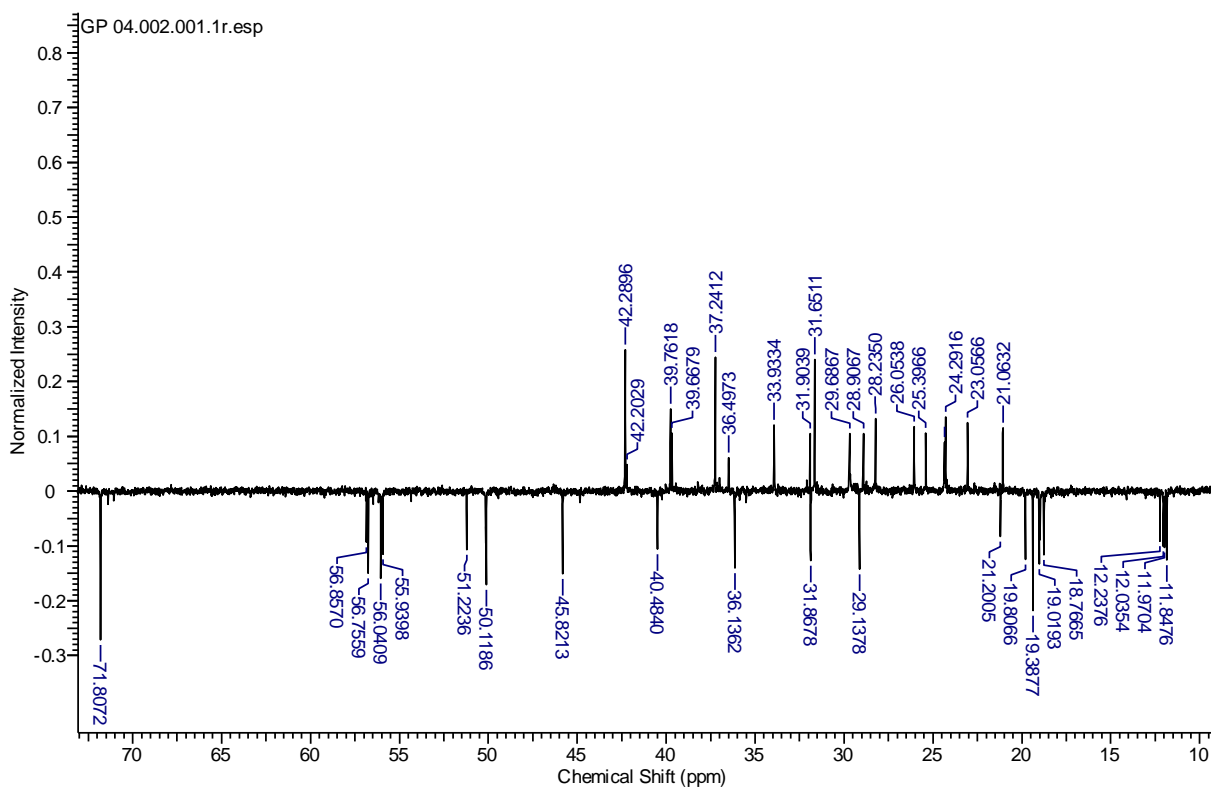


Figura 35. Espectro de RMN-¹³C da mistura de substâncias GP-01(ampliação)

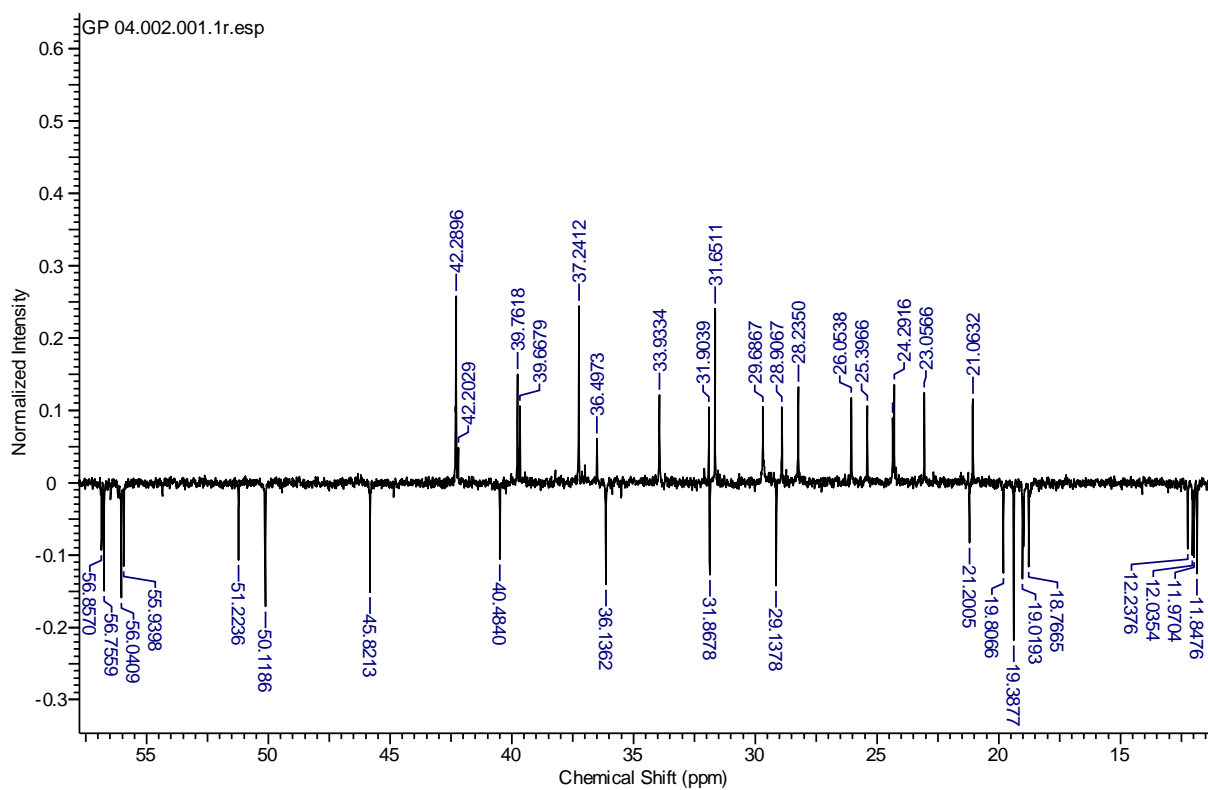


Figura 36. Espectro de RMN-¹³C da mistura de substâncias GP-01 (ampliação)

Tabela 7. Dados espectrais de RMN¹³C-APT (125 MHz, CDCl₃) das substâncias majoritárias (estigmasterol e sitosterol) da mistura GP-01 e valores da literatura.

Carbono	Estigmasterol (GP-01) δ_c	*Ref.	Sitosterol (GP-01) δ_c	*Ref.
1	37,2	37,3	37,2	37,3
2	31,9	31,9	31,6	31,7
3	71,8	71,8	71,8	71,9
4	42,2	42,2	42,3	42,4
5	140,7	140,7	140,7	140,8
6	121,7	121,7	121,7	121,8
7	33,9	33,9	33,9	34,0
8	31,9	31,9	31,9	31,9
9	50,1	50,1	50,1	50,1
10	36,5	36,1	36,5	36,1
11	21,1	21,1	21,1	21,1
12	39,8	39,8	39,7	39,8
13	42,3	42,3	42,3	42,3
14	56,8	56,8	56,7	56,8
15	24,3	24,3	24,2	24,3
16	28,9	28,9	28,9	28,9
17	56,0	56,0	56,0	56,0
18	12,2	12,3	12,2	12,3
19	19,4	19,4	19,3	19,4
20	40,5	39,8	40,4	39,8
21	21,2	20,5	18,7	18,8
22	138,3	138,3	31,9	32,0
23	129,3	129,3	26,0	26,0
24	51,2	51,2	45,8	45,8
25	31,9	31,9	29,1	29,0
26	21,2	21,2	19,8	19,8
27	19,8	19,8	19,8	19,8
28	25,4	25,4	23,1	23,0
29	11,9	11,9	11,8	11,8

*Seoet al., 1988

4.6.1.2. IDENTIFICAÇÃO DA MISTURA GP-02.

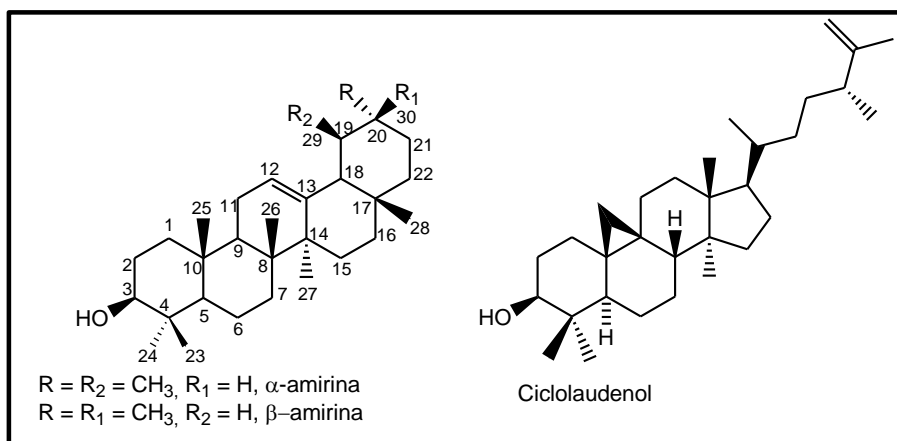


Figura 37. Estruturas dos componentes da mistura GP-02

O espectro na região do infravermelho de GP-02 apresentou banda de absorção em 3300 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação OH; 2918 e 2848 cm^{-1} referente à deformação da ligação CH; 1462 e 1379 cm^{-1} referente à deformação angular de grupos metilenos (Paiva *et al.*, 2001; Silverstein *et al.*, 2005).

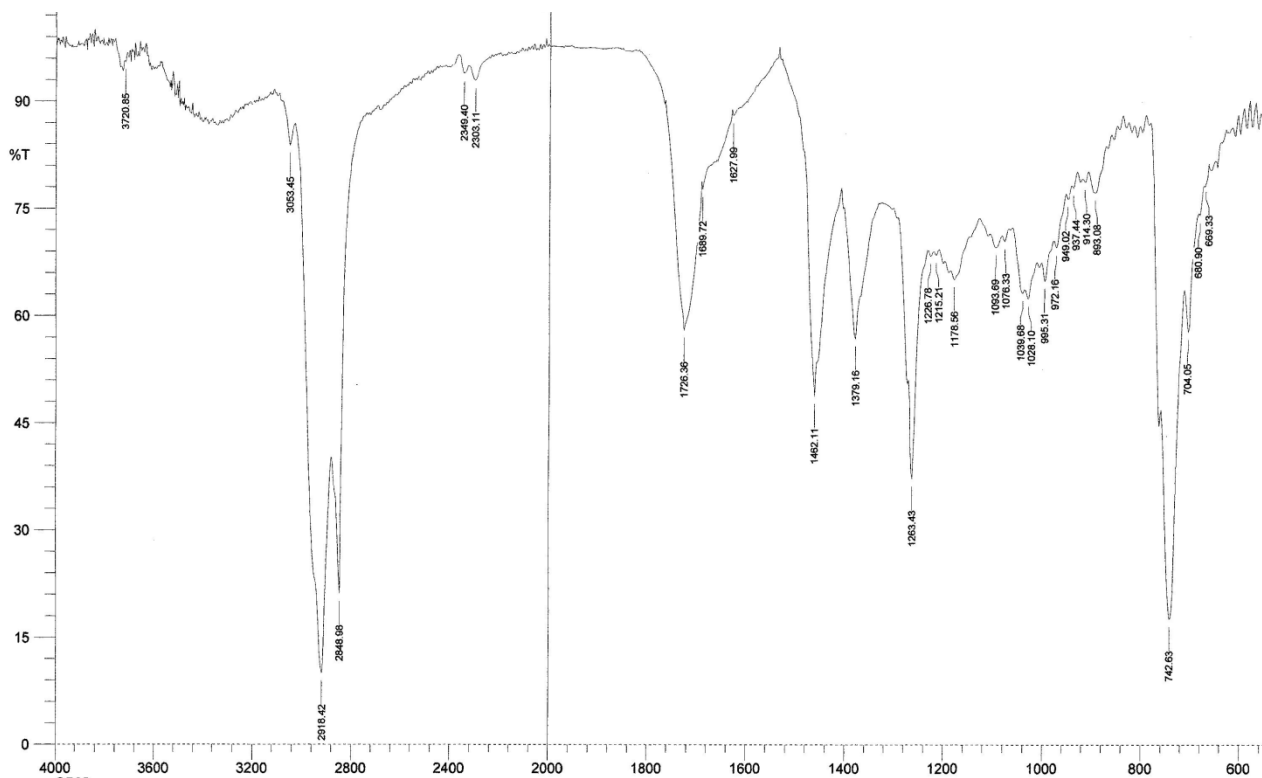


Figura38. Espectro na região do infravermelho de GP-02.

Quando analisada através de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas GP-02 mostrou-se como uma mistura de três substâncias, sendo o componente majoritário a α -amirina (Figuras 38). As cujas proporções de cada componente encontram-se indicadas na Tabela 8.

Tabela 8. Tempos de retenção (t_R) e área (%) dos componentes de GP-02.

Pico	Substância	t_R	%
1	β -Amirina	24,1	19,6
2	α -Amirina	25,6	74,6
3	Ciclolaudenol	27,4	5,8

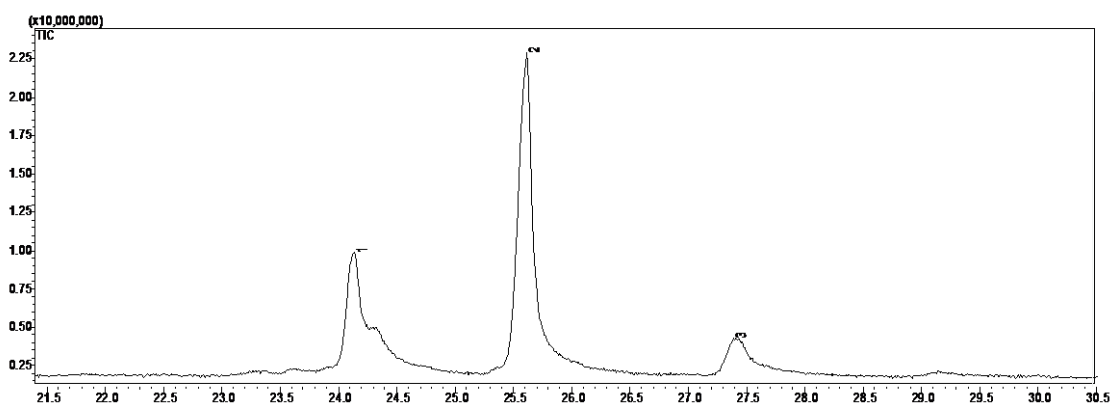


Figura 39. Cromatograma da mistura de substância GP-02.

Os fragmentogramas da α - e β -amirina apresentaram o pico do íon molecular em m/z 426 e mais três picos em m/z 218, 203 e 189 (Figura 39 e 42, p. 68-69) característicos de fragmentação tipo retro Diels-Alder de triterpenos com esqueleto ursano ou oleano com insaturação no carbono 12 (Ogunkoya, 1981).

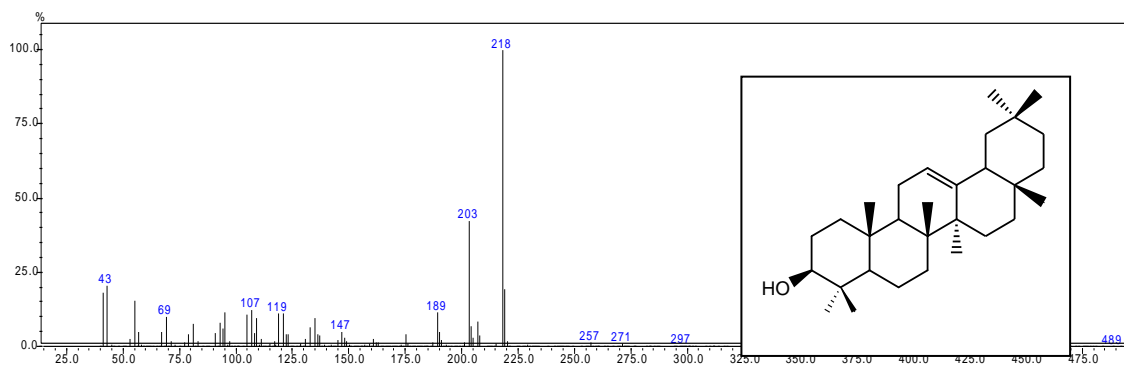


Figura 40. Fragmentograma do pico no. 1 (β -Amirina).

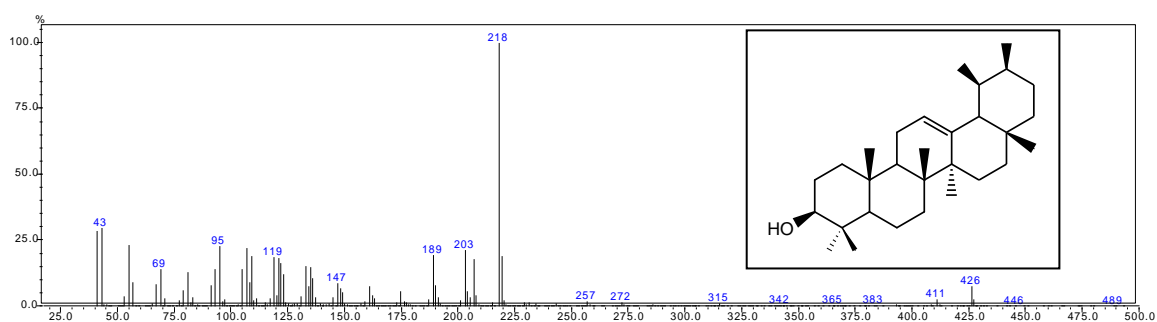


Figura 41. Fragmentograma do pico no. 2 (α -Amirina).

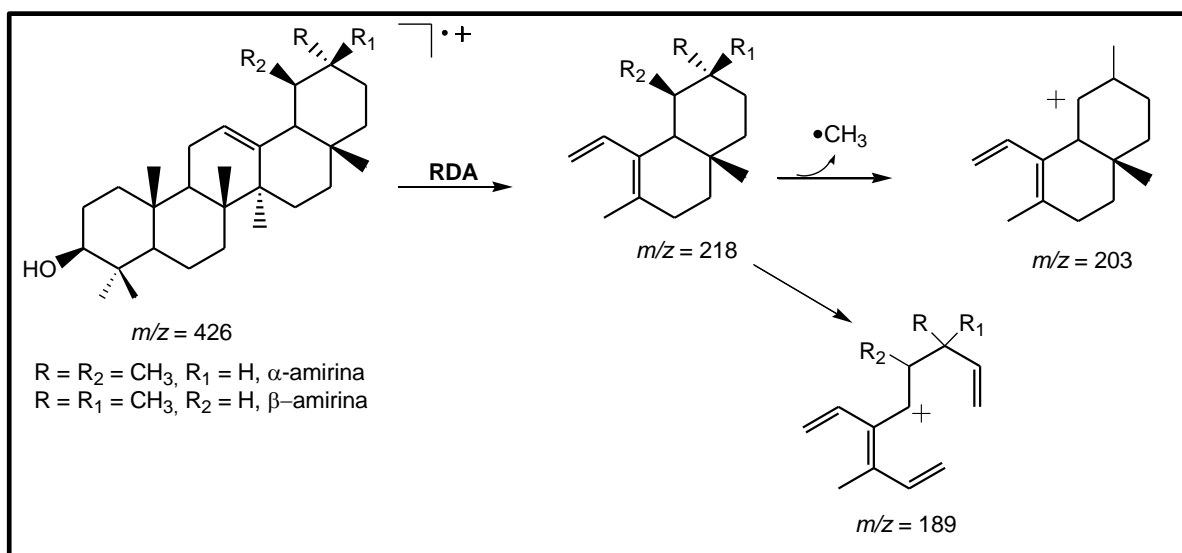


Figura 42. Fragmentograma de massas da α - e β -amirina.

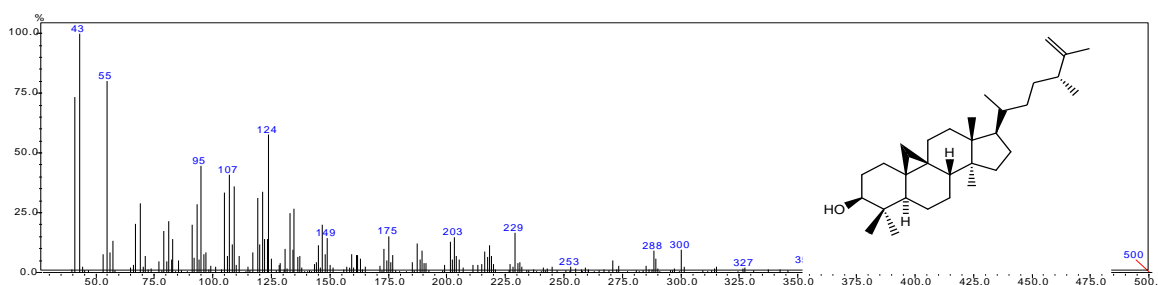


Figura 43. Fragmentograma do pico no. 3 (Ciclolaudenol)

O espectro de RMN- ^1H apresentou entre outros, oito sinais entre 0,7 e 1,1 ppm referente a oito grupo metilas; um duplo sinal duplo centrado em 3,2 ppm ($J = 4,8$ e $11,4$ Hz) característico de hidrogênio H-3 em triterpenóides do tipo $3\beta\text{-OH}$; dois sinais triplos centrados em 5,0 e 5,2 ppm ($J = 3,6$ e $7,2$ Hz), característicos de hidrogênio olefínico de triterpenos da série ursano e oleano com insaturação no carbono C-12.

O espectro de RMN- ^{13}C da mistura apresentou, entre outros, sinais entre 14,1 e 39,6 ppm relativo aos grupos metilas; sinal em 79,0 ppm atribuído ao deslocamento químico do carbono carbinólico C-3; dois sinais em 121,0 e 124,0 ppm relativos aos carbonos metínicos C-12 de triterpenos das séries oleano e ursano. Os carbonos sinais dos carbonos não hidrogenados C-13 de ambas as substâncias não foram observados. Os dados obtidos comparados com os deslocamentos químicos registrados na literatura (Mahato&Kundu, 1994) permitiu identificar esses triterpenos como sendo o urs-12-eno (α -amirina) e olean-12-eno (β -amirina). A distinção entre α - e β -amirina foi feito através do deslocamento do ^{13}C do carbono C-20 da α -amirina que aparece em 39,6 ppm (carbono metínico) e o da β -amirina (carbono não hidrogenado) aparece em frequência mais alta (32,9 ppm). Os deslocamentos químicos de ^{13}C encontram-se resumidos na Tabela 9 (p. 73).

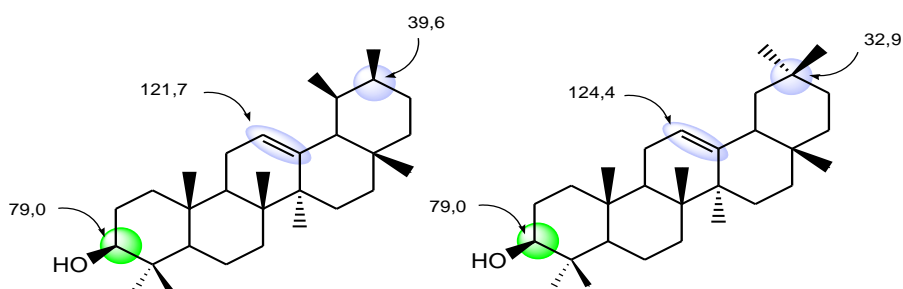


Figura 44. Deslocamento químico

O ciclolaudenol foi identificado somente através da comparação com o banco de dados da biblioteca NIST do cromatógrafo de gás acoplado ao massas.

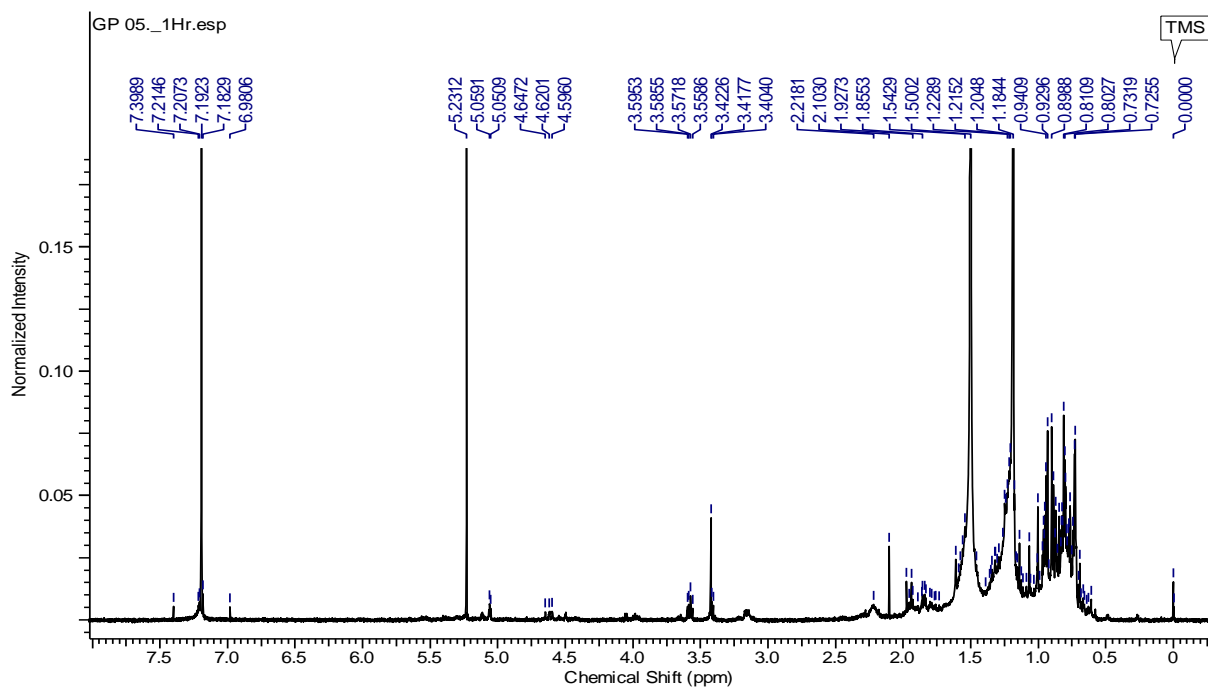


Figura 45. Espectro de RMN-¹H da mistura de substâncias GP-02

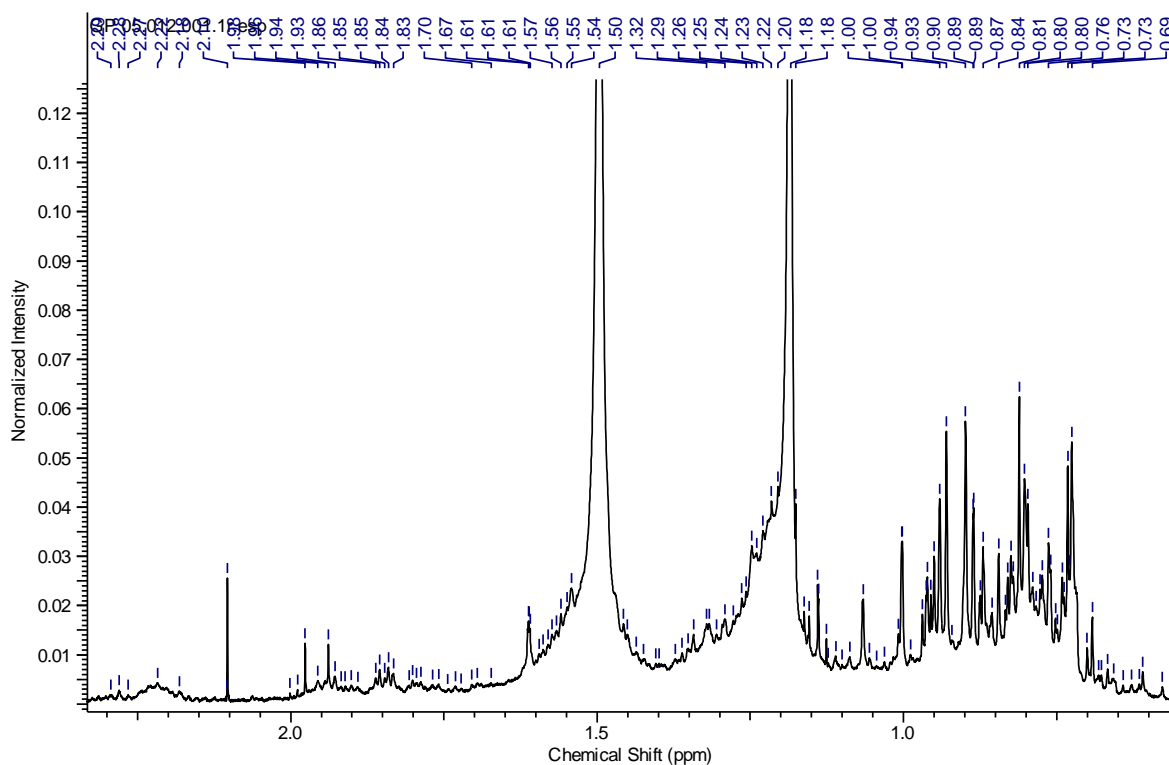


Figura 46. Espectro de RMN-¹H da mistura de substâncias GP-02 (Ampliação)

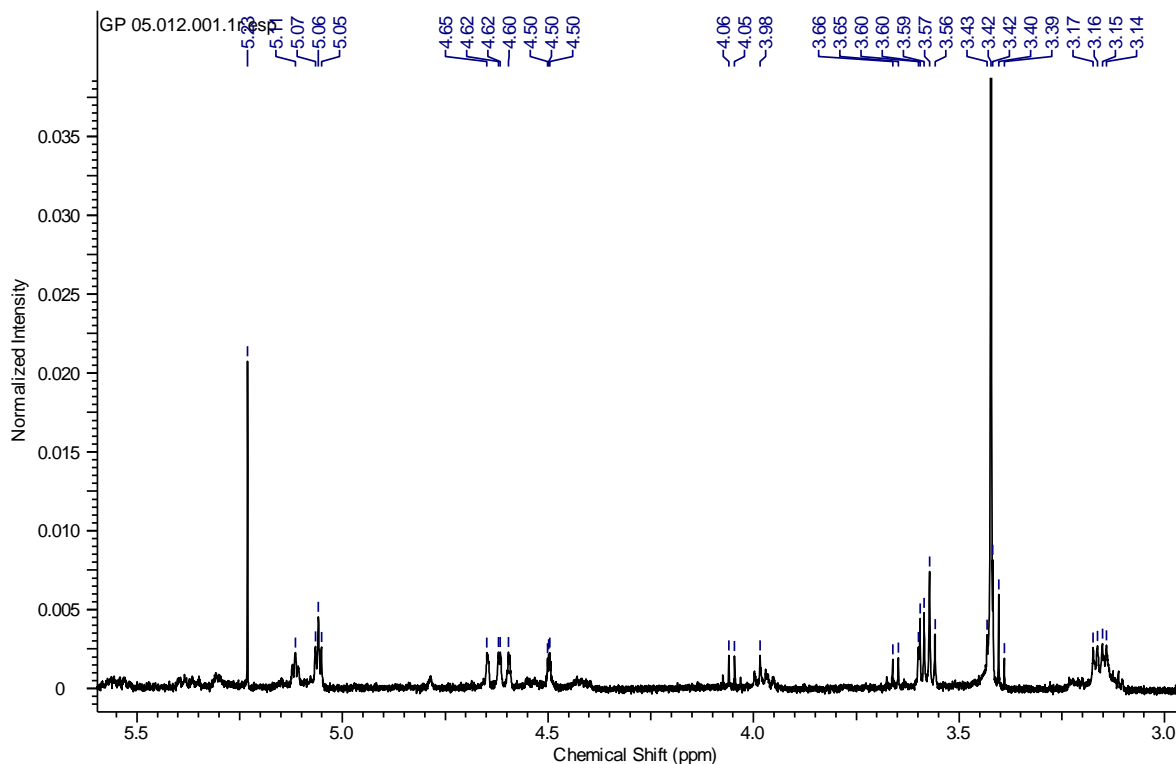


Figura 47. Espectro de RMN-¹H da mistura de substâncias GP-02 (Ampliação)

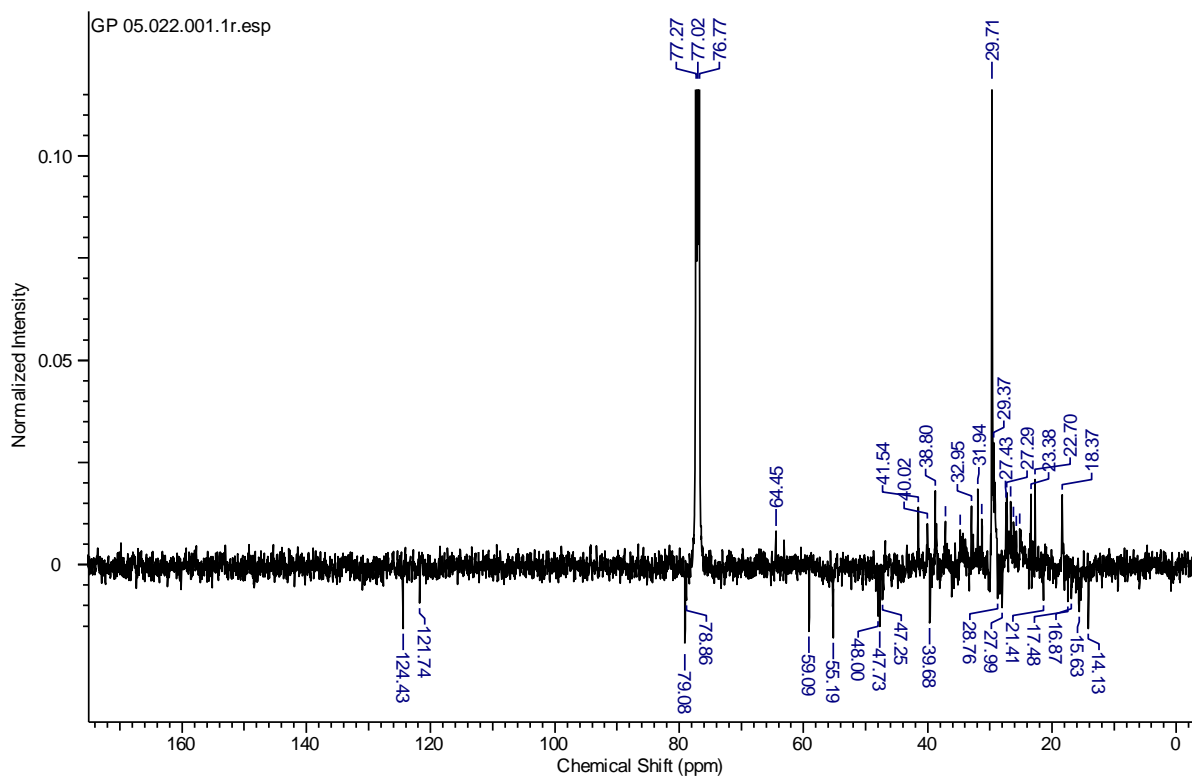


Figura 48. Espectro de RMN-¹³C-APT da mistura de substâncias GP-02

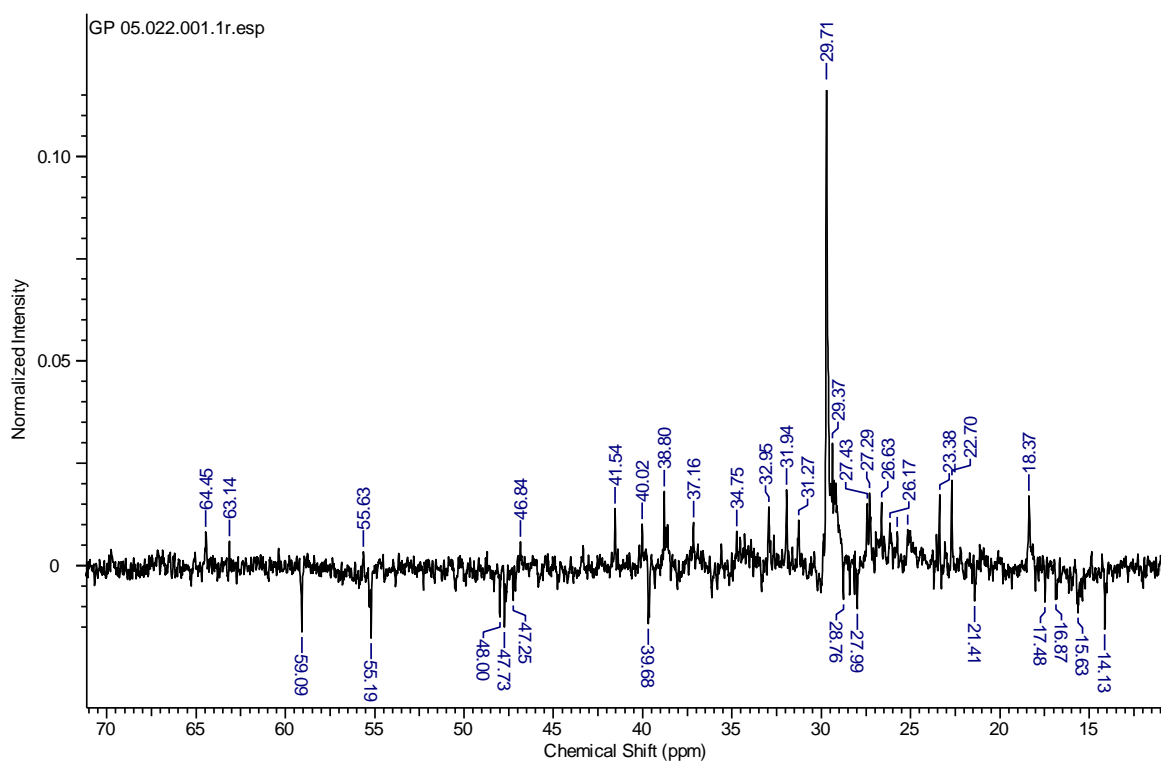


Figura 49. Espectro de RMN-¹³C-APT da mistura de substâncias GP-02 (Ampliação)

Tabela 9. Dados espectrais de RMN¹³C-APT (125 MHz, CDCl₃) das substâncias majoritárias (β - e α -amirina) da mistura GP-02 e valores da literatura.

Carbono	β -amirina δ_c	*Ref. δ_c	α -amirina δ_c	*Ref. δ_c
1	38,8	38,7	38,8	38,7
2	27,3	27,3	27,3	27,2
3	79,1	79,0	78,3	78,3
4	38,8	38,8	38,8	38,7
5	55,2	55,3	55,2	55,2
6	18,4	18,5	18,4	18,3
7	32,9	32,8	32,9	32,9
8	38,8	38,8	40,0	40,0
9	47,73	47,7	47,7	47,7
10	-	37,6	-	36,9
11	23,4	23,6	23,4	23,3
12	121,7	121,8	124,4	124,3
13	-	145,1	-	139,3
14	41,5	41,8	41,5	42,0
15	26,2	26,2	29,4	28,7
16	27,3	27,0	26,6	26,6
17	32,9	32,5	-	33,7
18	47,3	47,4	59,1	58,9
19	47,2	46,9	39,7	39,6
20	31,3	31,1	39,6	39,6
21	34,8	34,8	31,3	31,2
22	37,2	37,2	41,5	41,5
23	28,8	28,2	28,8	28,1
24	15,6	15,5	15,6	15,6
25	15,6	15,6	15,6	15,6
26	16,9	16,9	16,9	16,8
27	27,9	26,0	21,4	23,3
28	28,8	28,4	28,8	28,1
29	32,9	33,1	17,5	17,4
30	-	23,6	21,4	21,3

*Mendes, 1999

4.6.2. IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO METANOLICO DAS FOLHAS DE *G. pernambucensis*

O extrato metanólico das folhas de *G. pernambucensis* depois de submetido à extração líquido/líquido (Item 3.7.2., p. 39) forneceu três frações. A fração em AcOEt forneceu a mistura GP-03.

4.6.2.1. IDENTIFICAÇÃO DA MISTURA GP-03

A análise através de cromatografia de gás acoplada ao espectrômetro de massas da fração correspondente a partição em acetato de etila do extrato em metanol permitiu identificar uma mistura de substâncias codificada de GP-03. A análise do fragmentograma seguido da comparação com a biblioteca NIST permitiu identificar como componentes principais: estigmasterol¹, γ -sitosterol², estigmastanol³ e α -amirina⁴ (Tabela 10 e Figuras 49 – 53, p.75 e 76).

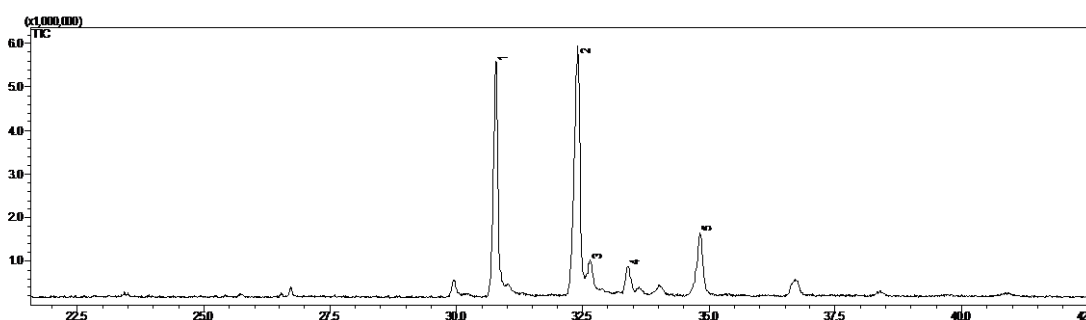


Figura 50. Espectro de massas da mistura de substâncias GP-03

Tabela 10. Substâncias identificadas na mistura GP-03 através de CG/EM

Pico	Substância	t _R	%
1	3,6,11-trimetildodecano	4,7	0,2
2	heneicosano	6,1	0,9
3	3 β -ergost-5-en-3-ol	20,1	1,4
4	estigmasterol	20,8	35,2
5	γ - sitosterol	22,2	55,1
6	estigmastanol	22,5	5,7

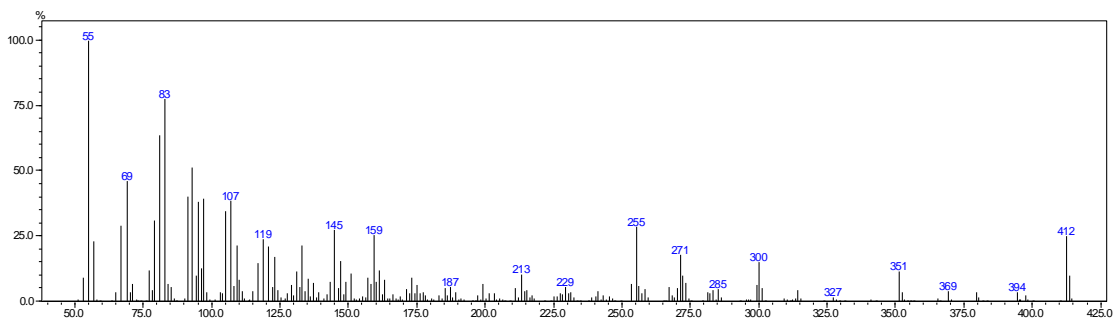


Figura 51. Fragmentograma de massas do stigmasterol1

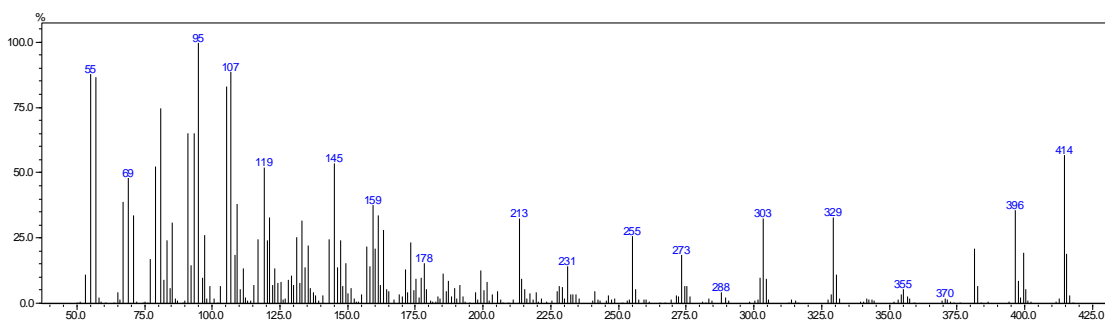


Figura 52. Fragmentograma de massas do γ -sitosterol 2

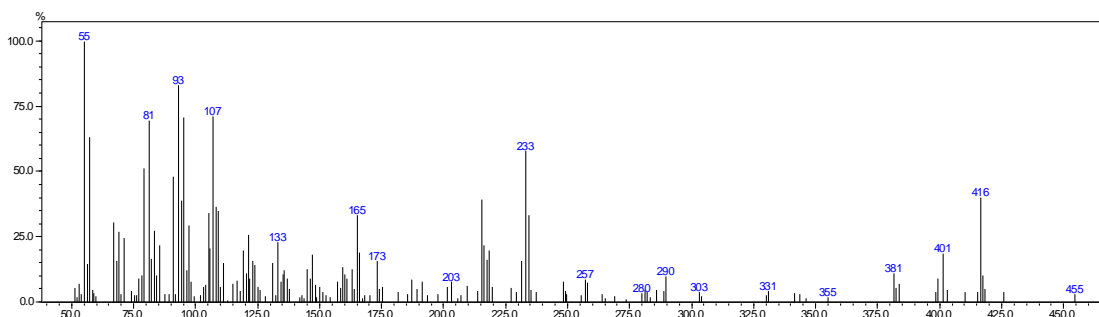


Figura 53. Fragmentograma de massas do stigmasterol3

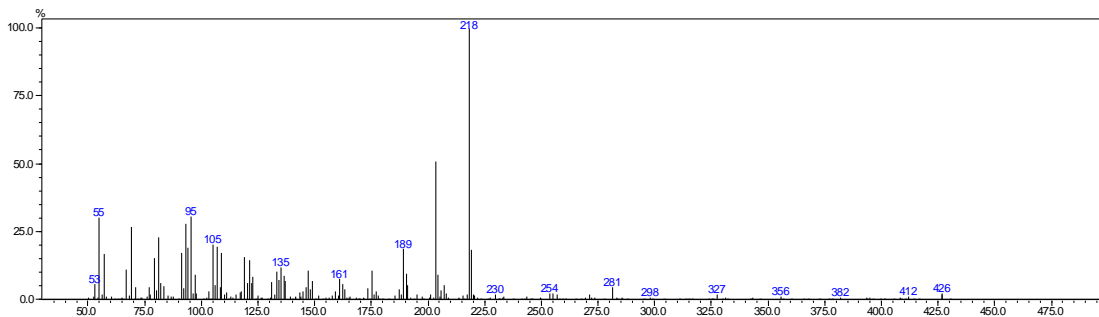


Figura 54. Fragmentograma de massas da α -amirina 4

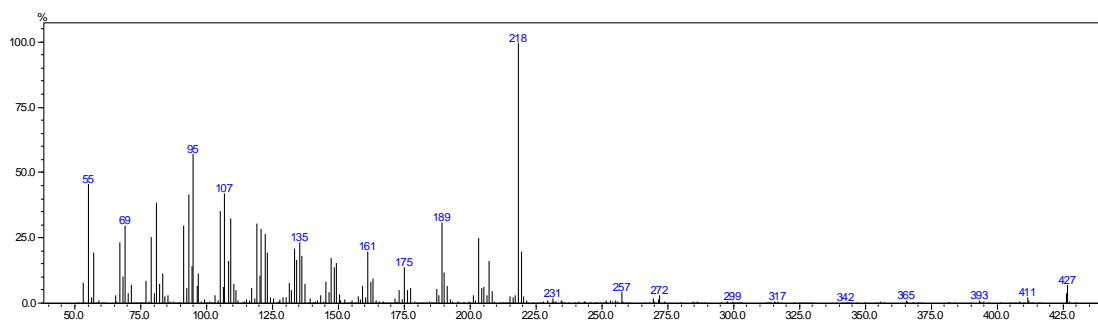


Figura 55. Fragmentograma de massas pico 5 (não identificado)

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos componentes majoritários da mistura já foram discutidos nas seções 4.6.1.1.e 4.6.1.2 (p. 53 a 72).



A avaliação preliminar do perfil químico realizada com as casca da espécie *Guapira pernambucensis* indicou a presença dos seguintes grupos fitoquímicos: esteróides e triterpenos no extrato hexânico, flavonóides, fenólicos em geral e alcalóides no extrato metanólico.

Do fracionamento preliminar do extrato hexânico do caule e metanólico das folhas, utilizando-se de técnicas espectrométricas (IV, CG/EM e RMN ^1H e ^{13}C) foram identificados principalmente triterpenos e esteróides: campesterol, estigmasterol, β - e γ -sitosterol, estigmastenol, α - e β -amirina, cicloclaudenol, 3β -acetato olean-12-eno, estigmast-4-en-3-ona e 3β -ergost-5-em-3-ol..

Para o ensaio de toxicidade sobre as larvas de *Artemia salina*, a espécie apresentou $\text{DL}_{50} = 171,0 \mu\text{g/mL}$, sendo considerada, portanto bioativa de acordo com McLaughlin *et al.*, (1995).

Foi observada atividade antioxidante no extrato bruto metanólico, $\text{EC}_{50} = 287,9 \mu\text{g/mL}$ superior ao padrão rutina, $\text{EC}_{50} = 292,9 \mu\text{g/mL}$, podendo ser considerada a planta com alto potencial antioxidante.

A avaliação do teor de flavonóides totais mostrou um resultado bastante significativo igual a $6,13 \mu\text{g/mL}$ de extrato metanólico bruto.

A análise de proantocianidinas pelo método da butanolise apresentou resultado positivo indicando a presença de catequinas.

Os resultados obtidos com a espécie mostraram-se promissores estimulando a continuidade do estudo fitoquímico da espécie *G. pernambucensis*.



6. SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS

Do ponto de vista químico, apenas o estudo preliminar do extrato em hexano do caule e metanólico das folhas foi feito nesta monografia, sendo interessante a continuidade do estudo químico mais específico, uma vez que foi constatada em estudos preliminares a presença de outros grupos de substâncias não isoladas nesta monografia, principalmente do extrato em metanol, o qual apresentou alta atividade antioxidante, teor de flavonóides totais considerável e bioatividade frente às larvas de *A. salina*. Também será interessante a realização de estudos farmacológicos com a espécie, visto que a mesma apresenta uso popular e poucos estudos realizados.



7. BIBLIOGRAFIA

Amarante, C. B. do; Müller, A. H.; Póvoa, M. M.; Dolabela, M. F. **Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de *aninga (Montrichardialinifera)***. *Acta Amaz.* [online], vol. 41, 2011.

Assunção, J.; Nascimento, M. T. **Estrutura e composição florística de Quatro formações vegetais de restinga no complexo lagunar Grussai/Iquipari, São João da Barra, RJ, Brasil**. *Acta bot.* vol. 14, 2000.

Bernacci, L. C. **Guapira**. Disponível em: <www.herbario.iac.sp.gov.br/Relatorios/listagens/genero.asp?Tarefa=Guapira>. Acesso em 21 de janeiro de 2014.

Braz-Filho, R. 1. **Química de Produtos Naturais: Importância, Interdisciplinaridade, Dificuldades e Perspectivas**. 2. **A Peregrinação de um Pacatubano**. *Química Nova*. vol. 17, 1994.

Castro, H. G. de; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H. & MOSQUIM, P.R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais – Metabólitos secundários**. Viçosa-MG, 2001.

Cavalcante, M.F. **Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach**. *Química Nova*. vol. 23, 2000.

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

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.

Furlan, A. **A tribo *pisonieae* Meisner (Nyctaginaceae) no Brasil**. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, São Paulo. 1996.

Furlan, A.; Udulutsch, R. G.; Dias, P. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**. vol. 26, 2008.

Gama, A. P. **Alcaloides**. Disponível em <<http://adamogama.blogspot.com.br/2012/01/alcaloides.html>> Acesso em 04 de março de 2015.

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

Lopes, W. A.; Fascio, M. **Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na Região do Infravermelho**. Química Nova. vol. 27, 2004.

Maraschin-Silva, E. A. **Extração aquosa de aleloquímicos e bioensaios laboratoriais de alelopatia**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. 2004.

Marchioretto, M. S.; Lippert, A. P. U.; Silva, V. L. da. **Pesquisas Botânicas do Instituto Anchietao de Pesquisas**. Nº 62, 2011.

Marcucci, M. C. **Mensagem Doce 1998**. Disponível em <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm> > Acesso em 04 de março de 2015.

Marques, G. S.; Monteiro, R. P. M.; Leão, W. F.; Lyra, M. A. M.; Peixoto, M. S.; Rolim-Neto, P. J.; Xavier, H. S. **Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata***. Quím. Nova. vol. 35, 2012.

Mazzolin, L. P.; Severi, J. A.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C. **Avaliação da atividade secretória gástrica sistemática e local e da atividade antioxidante do extrato metanólico de *Guapira noxia* (Nyctaginaceae)**. XVI Congresso Ítalo-latino americano de Etnomedicina – SILAE. 2007.

McLaughlin, J.L. Colman-Saizarbitoria, T.; Anderso J.E. **Tres bioensayos Simples para Químicos de Productos Naturales**. Revista de la Sociedad Venezolana de Química, 1995.

Mendes, Carla C. **Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla***. Quím. Nova. vol.22, 1999.

Mensor, L L. **Atividade antioxidante de plantas brasileiras**. Tese de Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.1999.

Mensor, L. L.; Menezes, F. S.; Leitão, G. G.; Reis, A. S.; dos Santos, T. C.; Coube, C. S.; Leitão, S. G. **Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method.** Química Nova. vol.15, 2001.

Meyer, B.N., Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L. **Brine Shrimp a Convenient Genera Bioassay for Active Plant Constituents.** Planta Medica.vol. 45, 1982.

Montanari, C. A.; Bolzani, V. S. **Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais.** Química Nova. vol. 24, 2001.

Moreira, D. de L. **Antioxidant and Antiviral properties of *Pseudopiptadenia contorta* (leguminosae) and of quebracho (*Schinopsissp.*) extracts.** Química Nova, Vol. 28, 2005.

Mouco, G.; Bernardino, M. J.; Cornélio, M. L. **Controle de Qualidade de Ervas Mediciniais.** Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.vol.31, 2003.

Ogunkoya, L. **Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes.** *Phytochemistry*.vol. 20, 1981.

Pincemail J, Deby C. **Propriétés antiradicalaires de l'extrait de *Ginkgo biloba*.** Presse Méd. vol. 15, 1986.

Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. da S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. de A. **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas.** Química Nova. vol. 25, 2002.

Popovkin, A. V. ***Guapira pernambucensis* (Casar.) Lundell.** Disponível em:<

www.flickr.com/photos/plants_of_russian_in_brazil/5436105921/> Acesso em 10 de Agosto de 2013.

Rio, R. G. W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis.** Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, São Paulo. 1996

Rodrigues, H. G.; DINIZ, Y. S.; FAINE, L. A.; ALMEIDA, J. A.; FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI, E. L. B. **Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL**. Revista de Nutrição. vol. 16, 2003.

Schmidt, J. A. **Nyctaginaceae**. In Martius, C. F. P. Flora Brasileira. vol. 14, 1872.

Seo, S. **Biosyntheses of sitosterol, cycloartenol, na 24-methylenecycloartenol in tissue cultures of higher and of ergosterol in yeast from [1,2-¹³CH₂] and [2-¹³CH₃]acetate and [5-¹³CH₂]**. Journal Chemistry Society. Perkin. Trans. 1988.

Severi, J. A. **Prospecção Químico-Farmacológica em plantas superiores: *Guapira spp.*** Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista. São Paulo. 2010.

Severi, J. A. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira – Prospecção químico-farmacológico de plantas superiores: *Guapiranoxia* (Nyctaginaceae)**. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista. São Paulo. 2007.

Shriner, R.L.; FUSON, R.C.; CURTIN, D. Y.; MORRILL, T. C. **Identificação sistemática dos compostos orgânicos**. Rio de Janeiro. 1983.

Silva, S. M. **Diagnóstico das restingas no Brasil**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/brasilrounds/round7/round7/guias_r7/PERFURACAO_R7/refer/Restingas.pdf>. Acesso em 03 de Dez. de 2014.

Siqueira, M.J. Boaventura, D.A.M. **Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii- Annonaceae*, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach**. Química Nova. Vol. 21, 1998.

Souza, M. A. de; Mendonça, C. B. F.; Esteves, V. G. **Palinologia de espécies de *Nyctaginaceae* Juss. Ocorrentes nas restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil**. Acta bot. bras. vol. 24, 2010.

Souza, V. C.; Lorenzi, H. **Botânica sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2008.

UENF-Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. **Restinga Iquipari**. Disponível em: <www.uenf.br/Uenf/Pages/CBB/Herbario/?&modelo=1&cod_pag=3365&tabela=&np=Restinga&nc=Ecosistemas&buscaEdicao=&grupo=herbario&p=1004>. Acesso em 10 de Agosto de 2013.

Yunes, R. S., Calixto, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. UNOESC, SC.chapecó. 2001.