



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DO RESÍDUO MADEIREIRO DE *Sextonia rubra* (Mez)
van der Werff (LAURACEAE) E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE**

SARAH LARISSA GOMES FLORES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Manaus/AM

Julho de 2022

SARAH LARISSA GOMES FLORES

**ESTUDO FITOQUÍMICO DO RESÍDUO MADEIREIRO DE *Sextonia rubra* (Mez)
van der Werff (LAURACEAE) E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, exigido para o título de Mestre em Química, com ênfase na Linha de Pesquisa: Produtos Naturais e Biomoléculas.

Dr. ANDERSON CAVALCANTE GUIMARÃES

Orientador

Dr. EMMANOEL VILAÇA DA COSTA

Coorientador

Manaus/ AM

Julho de 2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F634e Flores, Sarah Larissa Gomes
Estudo fitoquímico do resíduo madeireiro de
Sextonia rubra (Mez) van der Werff (Iauraceae) e investigação do
potencial antioxidante / Sarah Larissa
Gomes Flores . 2022
175 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Anderson Cavalcante Guimarães
Coorientador: Emmanoel Vilaça Costa
Dissertação (Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Resíduos madeireiros. 2. *Sextonia rubra*. 3. Cromatografia
contracorrente. 4. antioxidante. I. Guimarães, Anderson Cavalcante.
II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

SARAH LARISSA GOMES FLORES

**ESTUDO FITOQUÍMICO DO RESÍDUO MADEIREIRO DE *Sextonia rubra* (Mez)
van der Werff (LAURACEAE) E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, exigido para o título de Mestre em Química, com ênfase na Linha de Pesquisa: Produtos Naturais e Biomoléculas.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães
Universidade Federal do Amazonas



Profa. Dra. Renata Takeara Hattori
Universidade Federal do Amazonas



Profa. Dra. Gilda Guimarães Leitão
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dedico essa pesquisa, à minha mãe Maria do Livramento Flores, ao meu pai Francisco Flores, ao meu orientador Prof. Anderson Guimarães, ao meu irmão, Lucas Flores e à minha tia (segunda mãe), Maria da Conceição Flores, os pilares desse mestrado. Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Amazonas e ao Departamento de Química.

Ao programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) pelo suporte para a realização dessa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À empresa Mil Madeiras Preciosas Ltda., pelo fornecimento do material vegetal alvo dos estudos químicos.

Às equipes do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) e o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLab), pelos espectros obtidos para elucidação estrutural.

Ao Prof. Dr. Emerson Silva Lima e sua equipe do laboratório Biophar Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UFAM pelo apoio nas análises de atividade antioxidante.

Aos professores Dra. Gilda Guimarães Leitão e Dr. Valdir Florêncio Veiga Júnior, pela participação na banca do exame de qualificação, onde tive o privilégio de receber as valiosas sugestões que engrandeceram esse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Anderson Guimarães, por ter dado uma chance a uma estranha para trabalhar no seu grupo, para orientá-la no pibic, atualmente no mestrado e futuramente no doutorado. Muito obrigada por todo conhecimento e experiência, tenho certeza de que ainda há muito o que aprender. Obrigada por todos os dias e noites/madrugadas no laboratório ou remoto, eu nunca vou esquecer. Por me inspirar e se importar a ponto de ligar para me acalmar em momentos de crises, nervosismo ou frustração. Acredite, fez toda diferença na minha vida como orientanda, incentivando-me com palavras e ações a continuação da nossa pesquisa.

Ao meu Coorientador, o Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa.

Ao meu grupo de pesquisa pela amizade e companheirismo. Obrigada Msc. Thaís Alves, por ter me ensinado tanta coisa com todo cuidado, capricho e paciência, eu levarei comigo com muito orgulho. Obrigada Jheiffison Clemente, por ser parceiro e desculpa por eu ter invadido a tua bancada inúmeras vezes. Obrigada Msc. Isadora

de Araújo, pela parceria que firmamos, por toda troca de conhecimentos e experiências de laboratório que você me proporciona. Obrigada Midiã Rodrigues (PPGCTRA) por toda troca de conhecimentos, apoio e ajuda.

Agradeço às mestrandas do PPG-Biotec Diana França, Cristiana Nunes e Márcia Pinheiro, pela ajuda na realização dos testes de atividade antioxidante das substâncias isoladas, pelo companheirismo e docinhos (rsrsrs).

Aos meus pais Maria do Livramento e Francisco, meu irmão Lucas e à segunda mãe Maria da Conceição, por me proporcionarem toda estrutura para eu estudar, por serem exemplo de força, determinação, independência e foco. Vocês me orgulham muito. Obrigada Guilherme (sobrinho) e Luísa (irmãzinha), por cuidarem de mim e me ajudarem tanto, vocês são adolescentes incríveis.

Ao Msc. Earle Júnior, por ter encontrado o meu orientador que até então, estava idealizado na minha mente. Também agradeço o suporte completo oferecido nesse mestrado.

Aos meus amigos de turma Claudia Rosa e Msc. Eldrinei Peres. Vocês foram essenciais no decorrer do cumprimento das disciplinas, choramos muito juntos, mas que bom que rimos muito mais. Desejo todo sucesso do mundo para vocês.

Aos meus amigos Glendanay, Priscila, Serena, meu namorado Bruno, André, Ana Carolina, Janara e Mateus por sempre ouvirem com atenção sobre a minha pesquisa, terem vibrado com cada resultado, me ajudado com as crises de ansiedade e oferecendo companheirismo, vocês são os melhores amigos que alguém pode ter.

Agradeço a Deus por ter colocado todas essas pessoas e outras mais na minha vida, pois eu nunca estive sozinha. Tudo que vivi durante o mestrado foi necessário, ou eu não teria me tornado a pesquisadora que sou hoje.

À mim, pela força, persistência e dedicação.

*Não vale a pena mergulhar nos sonhos e se esquecer de viver.
(Dumbledore)*

...espero ter forças para continuar a transmitir o que aprendi.
Tive a oportunidade de mostrar a enorme riqueza química das plantas brasileiras e de chamar a atenção para o estudo da química integrada à biologia, que possibilitou a descoberta de produtos naturais importantes...

– Professor Otto Gottlieb

RESUMO

A *Sextonia rubra* (Mez.) van der Werff (LAURACEAE), é a única representante do seu gênero na Amazônia brasileira, é conhecida por louro gamela e explorada pelo setor madeireiro. O objetivo deste trabalho foi estudar o perfil químico das cascas de *S. rubra* e a atividade antioxidante dos extratos e das substâncias isoladas. As cascas foram extraídas com etanol 70 % v/v. O extrato obtido foi particionado com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol, nesta ordem. Após, o extrato bruto e frações foram analisados por ensaios fitoquímicos em tubos de ensaio e por cromatografia em camada delgada (CCD); determinados os teores de fenóis totais e atividade antioxidante frente ao radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}. As substâncias ativas foram isoladas por cromatografia contracorrente de alta eficiência (HPCCC), utilizando os modos normal e reverso. As eluições das fases móveis ocorreram em modo gradiente não linear, variando as proporções dos solventes hexano, acetato de etila, metanol, n-butanol e água. O extrato **LLG03** (acetato de etila) (11,64 g) apresentou a maior quantidade de manchas com potencial antioxidante nas CCDs reveladas com DPPH e foi eleito para o fracionamento. A análise de perfil químico em tubos indicou as classes alcaloides, taninos condensados, fenólicos, terpenos, saponinas e esteróides. Os extratos polares apresentaram as seguintes concentrações eficientes (CE₅₀, µg/mL) para captura dos radicais livres DPPH e ABTS: LLG (bruto): 10,67 e 17,67; **LLG03** (acetato de etila): 19,27 e 8,99; LL04 (n-butanol): 17,77 e 8,25 e LLG05 (resíduo hidroalcoólico): 18,37 e 8,00. O fracionamento de **LLG03** por HPCCC isolou seis substâncias: **epicatequina** (SF13-26, **21,7 mg**), **ácido vanílico** (SF14-11, **10,0 mg, AVA**), **ácido protocatecúico** (SF14-16, **18,4 mg, APR**), **proantocianidina A2** (SF14-24, **3,2 mg, POA A2**), **rubrenolida** (SF16-26, **22,8 mg**) e a **rubrinolida** (SF16-28, **34,5 mg**). Os valores de CE₅₀ (µg/mL) contra o ABTS foram: **epicatequina** (1,93); **AVA** (2,16); **POA A2** (7,22); **APR** (9,96) e **rubrinolida** (18,46). A CE₅₀ contra o radical o DPPH[•] foi de: **epicatequina** (13,91); **AVA** (39,27) e **POA A2** (58,17). Dentre a atividades observadas, destacam-se o potencial antioxidante da **epicatequina** (mais ativa); de **AVA**, de **APR**, de **POA A2** e a atividade antioxidante inédita da **rubrinolida** contra o ABTS. Essa pesquisa foi inédita para *S. rubra*, apresentando outra opção de aproveitamento desse resíduos, para a descoberta de novos produtos naturais com potenciais biológicos.

Palavras-chave: Resíduos madeireiros, *Sextonia rubra*, cromatografia contracorrente, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Sextonia rubra (Mez.) van der Werff (LAURACEAE), is the only representative its genus in Brazilian Amazon, known for Louro Gamela and exploited by the timber industry. The aim of this research was to study the chemical profile of *S. rubra*'s barks and antioxidant activity of extracts and isolated compounds. The barks were extracted with 70% of ethanol v/v. The extract obtained was partitioned by hexane, chloroform, ethyl acetate and butanol solvents, in this order. Afterwards, the crude extract and fractions were analyzed by phytochemical assays by tubes test and thin layer chromatography (TLC); certain levels of total phenols and antioxidant activity against DPPH^{*} and ABTS^{**} radicals. The isolation of active compounds was made by high performance countercurrent chromatography (HPLCCC), using the normal and reversal phases, step gradient with different proportions of hexane, ethyl acetate, methanol, n- butanol and water. **LLG03** extract (ethyl acetate) (11,64 g) showed the highest amount of stains with antioxidant potential on CCDs developed with DPPH^{*}, so it was chosen for fractionation. The chemical profile of the extracts indicated condensed tannins, phenolics, terpenes, saponins and alkaloids. The extracts showed the following efficient concentrations (EC₅₀, µg/mL) to scavenging DPPH and ABTS free radicals: **LLG** (crude): 10,67 and 17,67; **LLG03** (ethyl acetate): 19,27 and 8,99; **LLG04** (n-butanol): 17,77 and 8,25 and **LLG05** (hydroalcoholic residue): 18,37 and 8,00. The fractionation of **LLG03** by CCC provid the substances: **Epicatechin** (SF13-26, **21,7 mg**), **Vanillic Acid** (SF14-11, **10,0 mg, AVA**), **Protocatechuic Acid** (SF14-16, **18,4 mg, APR**), **Proanthocyanidin A2** (SF14-24, **3,2 mg, POA A2**), **Rubrenolide** (SF16-26, **22,8 mg**) and **Rubrinolide** (SF16-28, **34,5 mg**). EC₅₀ values (µg/mL) against ABTS were: **epicatechin** (1,93); **AVA** (2,16); **POA A2** (7,22); **APR** (9,96) and **rubrenolide** (18,46). The EC₅₀ against DPPH radical were: **epicatechin** (13,91); **AVA** (39,27) and **POA A2** (58,17). Among the activities observed, the antioxidant potential of **epicatechin** (more active) stands out: **AVA**, **APR**, **POA A2** and the unprecedented antioxidant anticity of **rubrinolide** against ABTS. This research was unprecedented for *S. rubra*, presenting another option for using this residue, for the discovery of new natural products with biological potential.

Keywords: Wood waste, *Sextonia rubra*, Countercurrent Chromatograph, antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Exemplos de espécies brasileiras exploradas no sul do Amazonas. <https://www.wwf.org.br/informacoes/noticias_meio_ambiente_e_natureza/?42822#> Acesso em: 23/04/21..... 4
- FIGURA 2.** Montanha de resíduos madeireiros de uma empresa localizada no Amazonas. (GUIMARÃES, A. C., 2013). 5
- FIGURA 3.** Reação do radical DPPH com um antioxidante. <<http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>> Acesso em: 23/05/2021). 8
- FIGURA 4.** Ilustração do radical ABTS com um antioxidante. (BECKER *et al.*, 2019). 8
- FIGURA 5.** Esquema do suporte que sustenta a bobina multicamada.. Adaptado de (ITO, 2005). 10
- FIGURA 6.** Mecanismo de cromatografia contracorrente de alta velocidade. Adaptado de (ITO, 2014). 11
- FIGURA 7.** Movimento hidrodinâmico de duas fases dentro de uma coluna espiralada em um suporte de movimento planetário do tipo J. Adaptado de (ITO, 2014). 12
- FIGURA 8.** Distribuição geográfica da família Lauraceae. <<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/orders/lauralesweb.htm>> Acesso em 25/04/21. 14
- FIGURA 9.** Distribuição geográfica da espécie *Sextonia rubra*. <<https://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Sextonia+rubra>>. Acesso em: 27/04/2021. 17
- FIGURA 10.** *Sextonia Rubra*. A: Árvore; B: Casca; C: Seção transversal; D: Corte tangencial; E: Tora. <https://lpf.florestal.gov.br/ptr/?option=com_madeirasbrasileiras&view=especieestudada&especieestudadaid=167>. Acesso em: 29/04/2021). 17
- FIGURA 11.** Lactonas isoladas dos extratos dos galhos de *S. rubra*. 19
- FIGURA 12.** Lactonas caracterizadas por espectrometria de massas de alta resolução dos extratos polares de *S. rubra*. 19

FIGURA 13. Principais substâncias terpênicas encontradas nos óleos essenciais de <i>S. rubra</i> indicadas por CG-EM.	20
FIGURA 14. Estruturas das substâncias encontradas em quatro espécies do gênero <i>Nectandra</i> que responsáveis pela atividade biológica de seus extratos.	23
FIGURA 15. Bioautografia dos extratos LLG, LLG03, LLG04 e LLG05.	33
FIGURA 16. . Realização dos testes de sistemas por CCD. Equilíbrio do soluto entre as duas fases dos sistemas 2, 4, 14 e 16.	34
FIGURA 17. CCD realizada para os testes dos sistemas com o extrato LLG03 das cascas de <i>S. rubra</i> . Eluente: B; Revelador: vanilina sulfúrica.	35
FIGURA 18. Cromatógrafo de contracorrente de alta performance “ <i>High Performance Countercurrent Chromatography</i> (HPCCC), localizado Laboratório de Química de Produtos Naturais (ICE-UFAM).....	36
FIGURA 19. Frações geradas pelo HPCCC a partir do extrato LLG03	38
FIGURA 20. CCD do teste de eluentes das frações de LLG03 . Sistema de eluentes: H, revelador: vanilina sulfúrica.	40
FIGURA 21. Testes de sistemas de solventes para o isolamento por CCC das frações de LLG03.	41
FIGURA 22 . Extratos das cascas de <i>S. rubra</i> . A: extrato etanólico 70 %; B partições líquido-líquido com clorofórmio (esquerda) e com acetato de etila (direita).	47
FIGURA 23. Prospecção fitoquímica em tubos confirmando presença de terpenos em LLG 03(A) e presença de alcaloides nos três extratos avaliados, LLG, LLG04 e LLG05 (B).	48
FIGURA 24. Caracterização dos constituintes fenólicos para o extrato de <i>S. rubra</i> ..	49
FIGURA 25. Prospecção fitoquímica para a saponinas de <i>Sextonia rubra</i> LLG. (A) : Teste preliminar para saponinas. (B) Teste confirmatório observado pela reação de precipitação.	50
FIGURA 26. Perfil dos extratos LLG, LLG03, LLG04 e LLG05 de <i>S. rubra</i>	53

FIGURA 27. Fração SF13-26 (A) seca. Placa cromatográfica da SF13-26, eluída com sistema B e revelada com vanilina, cloreto férrico e DPPH• - da esquerda para a direita (B)	55
FIGURA 28. Espectro de massas (varredura-modo negativo) do perfil da SF13-26 (A) . Espectro de fragmentação do íon m/z 289 (B) . Fonte de ionização: ESI.	56
FIGURA 29. Espectro de RMN ^1H da subfração SF13-26	59
FIGURA 30. Ampliação do espectro de RMN ^1H da subfração SF13-26 , região dos sinais dos hidrogênios ligados ao anel B.	60
FIGURA 31. Ampliação do espectro de RMN ^1H da subfração SF13-26 , região dos sinais de hidrogênios ligados ao anel aromático A.	60
FIGURA 32. Ampliação do espectro de RMN ^1H da subfração SF13-26 , região dos sinais dos hidrogênios ligados ao anel C da Epicatequina.	61
FIGURA 33. Estrutura proposta de SF13-26 , com os sinais de RMN ^1H	62
FIGURA 34. Espectro de RMN ^{13}C da subfração SF13-26	63
FIGURA 35. Ampliações do espectro de RMN Carbono-13 da SF13-26 . (A) Ampliação na entre δ 160 e δ 130; (B) Ampliação entre δ 122 e δ 93; (C) Ampliação na faixa de δ 82- δ 28.	64
FIGURA 36. Espectro de RMN DEPT-135 comparado com o de Carbono-13 da subfração SF13-26	65
FIGURA 37. Estrutura proposta de SF13-26 com os sinais de RMN ^{13}C	65
FIGURA 38. Mapa de correlações HSQC da subfração SF13-26	66
FIGURA 39. Ampliação do mapa de correlações HSQC na região dos sinais de ^1H e ^{13}C presentes os anéis aromáticos A e B da subfração SF13-26	67
FIGURA 40. Ampliação do mapa de correlações HSQC na região dos sinais do anel C da estrutura molecular presente na subfração SF13-26	68
FIGURA 41. Assinalamento para os carbonos e hidrogênios de acordo com o mapa de correlações HSQC da subfração SF13-26	69
FIGURA 42. Mapa de correlações HMBC da subfração SF13-26	70

FIGURA 43. Ampliação do mapa de correlações HMBC, na região dos aromáticos oriundos do anel B da epicatequina presente a subfração SF13-26	70
FIGURA 44. Correlações C→H longas distâncias dos núcleos presentes no anel aromático B da estrutura indicada na subfração SF13-26	71
FIGURA 45. Ampliação do mapa de correlações HMBC, na região dos aromáticos oriundos do anel A da epicatequina presente a subfração SF13-26	71
FIGURA 46. Ampliação do mapa de correlações HMBC, dos sinais do H-2-C da epicatequina da SF13-26	72
FIGURA 47. Correlações C→H longas distâncias do H-2-C interagindo com os carbonos dos anéis A, B e C da estrutura.	72
FIGURA 48. Ampliações do mapa de correlações HMBC da SF13-26 , na região dos sinais dos grupos metínico e metilênico do anel C da epicatequina.	73
FIGURA 49. Correlações HMBC C→H dos sinais de H-3, H-4 α e H-4 β interagindo com os carbonos dos anéis A e C da estrutura.	74
FIGURA 50. Ampliação do mapa de correlações COSY na região dos sinais dos hidrogênios do anel C da epicatequina.	75
FIGURA 51. Correlações observadas no mapa COSY dos hidrogênios do anel C da epicatequina.	75
FIGURA 52. Estrutura da Epicatequina, encontrada em SF13-26	76
FIGURA 53. Fração SF14-11 (A). Placas de CCD da amostra reveladas com NP/PEG, vanilina sulfúrica e sulfato cérico, respectivamente (B).	77
FIGURA 54. Espectro de massas (Fullscan) de SF14-11 (A). Espectro de fragmentação do íon m/z 167(B).	78
FIGURA 55. Espectro de RMN ^1H da subfração SF14-11.	79
FIGURA 56. Ampliações do espectro de RMN ^1H da subfração SF14-11 . Sinais aromáticos (A), região de hidrogênios de metoxila (B).	80
FIGURA 57. Espectro de RMN ^{13}C da subfração SF14-11 (A). Espectro de DEPT-135 (B).	81
FIGURA 58. Proposta dos sinais de ^{13}C da estrutura de SF14-11	82

FIGURA 59. Mapa geral de correlações HSQC (A). Ampliações na região dos aromáticos (B); Ampliação na região dos carbonos carbinólicos (C).	83
FIGURA 60. Proposta de assinalamentos baseados no mapa HSQC de SF14-11 . .	84
FIGURA 61. Ampliações do mapa de correlações HMBC de SF14-11	85
FIGURA 62. Correlações HMBC do Ácido Vanílico presente na amostra SF14-11 . .	86
FIGURA 63. Ampliação do mapa COSY da fração SF14-11	86
FIGURA 64. Estrutura do Ácido Vanílico, encontrado em SF14-11	87
FIGURA 65. Fração SF14-16 (A) seca. CCDs da SF14-16, eluídas com o sistema H e reveladas NP/PEG, sulfato cérico, DPPH• e cloreto férrico, nessa ordem (B).	88
FIGURA 66. Espectro de massas (Fullscan) de SF14-16 (A). Espectro de fragmentação do íon <i>m/z</i> 153(B).	89
FIGURA 67. Espectro de RMN ¹ H da subfração SF14-16	90
FIGURA 68. Ampliação da área dos sinais aromáticos do espectro de próton da fração SF14-16	91
FIGURA 69. Ampliações do espectro de RMN ¹ H da subfração SF14-16 . Sinais aromáticos (A), região de hidrogênios de metoxila (B).	92
FIGURA 70. Proposta dos sinais de ¹³ C da estrutura de SF14-16	93
FIGURA 71. Ampliação do mapa HSQC na região dos hidrogênios e carbonos aromáticos de SF14-16	94
FIGURA 72. Proposta de assinalamentos baseados no mapa HSQC de SF14-16 . .	94
FIGURA 73. Ampliações do mapa de correlações HMBC de SF14-16 . Correlações de H-2 e H-6 (A). Correlações de H-5 (B).	95
FIGURA 74. Correlações HMBC do Ácido Protocatecúico na fração SF14-16	96
FIGURA 75. Ampliação do mapa COSY da fração SF14-16	96
FIGURA 76. Estrutura do Ácido Protocatecúico, encontrado em SF14-16	97
FIGURA 77. Fração SF14-24 (A). Placas cromatográficas da SF14-24 , eluída com sistema B e revelada com vanilina e DPPH• (B).	98

FIGURA 78. Espectro de massas (varredura-modo negativo) do perfil da SF14-24 (A) . Espectro de fragmentação do íon m/z 575 (B) . Fonte de ionização: ESI.	99
FIGURA 79. Espectro de RMN ^1H da subfração SF14-24	102
FIGURA 80. Ampliação do espectro de RMN ^1H da subfração SF14-24 , região dos sinais dos hidrogênios ligados aos anéis B e E.	103
FIGURA 81. Proposta de assinalamento dos sinais dos hidrogênios ligados aos anéis B e E da POA A2.	103
FIGURA 82. Ampliação do espectro de RMN ^1H da subfração SF14-24 , região dos sinais dos hidrogênios ligados aos anéis A e D.	104
FIGURA 83. Proposta de assinalamento dos sinais dos hidrogênios ligados aos anéis A e D da POA A2.	104
FIGURA 84. Ampliação do espectro de RMN ^1H da subfração SF14-24 , região dos sinais dos hidrogênios ligados aos anéis C e F.	105
FIGURA 85. Proposta de assinalamento dos sinais dos hidrogênios ligados aos anéis C e F da POA2.	106
FIGURA 86. Mapa de correlações HSQC da subfração SF14-24	107
FIGURA 87. Ampliação do mapa de correlações HSQC na região dos sinais de ^1H e ^{13}C presentes os anéis aromáticos B e E (A) e A e D (B) da subfração SF14-24 . .	108
FIGURA 88. Ampliação do mapa na faixa dos sinais dos anéis C e F POA A2 proposta na subfração SF14-24	109
FIGURA 89. Assinalamento para os carbonos e hidrogênio de acordo com o mapa de correlações HSQC da subfração SF14-24	111
FIGURA 90. Ampliação do mapa de correlações HMBC, na região dos sinais aromáticos dos anéis B, E e D da POA A2 presente a subfração SF14-24	112
FIGURA 91. Ampliação do mapa de correlações HMBC, na região dos sinais dos hidrogênios metínicos do anel C da POA A2 proposta na subfração SF14-24	113
FIGURA 92. Ampliação do mapa de correlações HMBC, na faixa dos sinais dos hidrogênios 2 (A) e 4 β (B) do anel F.	114

FIGURA 93. Correlações HMBC ocorrentes da Proantocianidina A2 encontrada na subfração SF14-24	115
FIGURA 94. Ampliação do mapa de correlações COSY evidenciando os acoplamentos H-H dos anéis B e E da POA A2.	116
FIGURA 95. Ampliação do mapa de correlações COSY evidenciando o acoplamento H-H metínico do anel C da POA A2.	116
FIGURA 96. Ampliação do mapa COSY evidenciando os acoplamentos H-H apontados no anel F da POA A2.	117
FIGURA 97. Ampliação do mapa COSY evidenciando os acoplamentos H-H apontados no anel F da POA A2.	118
FIGURA 98. Estrutura da Proantocianidina A2, encontrada na SF14-24	120
FIGURA 99. Fração SF16-26 (A) seca. Placa de CCD, eluída com sistema H e revelada com vanilina (B)	121
FIGURA 100. Espectro de massas (varredura-modo positivo) do perfil da SF16-26 (A) . Espectro de fragmentação do íon <i>m/z</i> 299 (B) . Fonte de ionização: ESI.	122
FIGURA 101. Estrutura da Rubrenolida, constituinte majoritário em SF16-26	123
FIGURA 102. Espectro de massas (varredura-modo positivo) do perfil da SF16-28 (A) . Espectro de fragmentação do íon <i>m/z</i> 297 (B) . Fonte de ionização: ESI.	124
FIGURA 103. Espectro de massas (varredura-modo positivo) do perfil da SF16-28 (A) . Espectro de fragmentação do íon <i>m/z</i> 297 (B) . Fonte de ionização: ESI.	125
FIGURA 104. Estrutura da Rubrinolida, constituinte majoritário em SF16-28	126
FIGURA 105. Estruturas básicas das classes de ácido fenólico (1) , procianidina (2) e Proantocianidina (3)	130
FIGURA 106. Estruturas básicas das classes de ácido fenólico (1) , procianidina (2) e Proantocianidina (3)	130

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Espécies madeireiras exploradas nas regiões próximas a Manaus (SALES-CAMPOS; LI; VIANEZ, 2000).	6
TABELA 2. Resultados dos testes químicos de capacidade antioxidante de galhos de espécies de Lauraceae (YAMAGUCHI; ALCÂNTARA; DA VEIGA, 2012).	15
TABELA 3. Substâncias encontradas nos extratos alcoólicos de espécies de <i>Nectandra</i> , cujas estruturas estão demonstradas na fig. 6.	24
TABELA 4. Sistemas de eluentes testados nos extratos LLG, LLG03, LLG04 e LLG05 de <i>S. rubra</i>	31
TABELA 5. Reveladores testados para verificação do perfil químico dos extratos polares de <i>S. rubra</i> . (GUIMARÃES, 2005).	32
TABELA 6. Sistemas de partição testados em CCD do extrato LLG03	35
TABELA 7. Sistemas utilizados na CCC de fase reversa do extrato LLG03 de <i>S. rubra</i> (SUMNER, 2011).	37
TABELA 8. Solventes combinados para eluição das placas de CCD das frações de LLG03.	40
TABELA 9. Sistemas de partição testados para as frações de LLG03 (SUMNER, 2011).	41
TABELA 10. Sistemas utilizados na CCC das frações F13 e F14 oriundas do extrato LLG03.	42
TABELA 11. Sistemas utilizados para o fracionamento da F16 , gerada do extrato LLG03 (SUMNER, 2011).	45
TABELA 12. Rendimento da extração e partição.	48
TABELA 13. Classes químicas indicadas no extrato e nas frações de <i>S. rubra</i>	51
TABELA 14. Resultados das análises de capacidade antioxidante dos extratos de <i>S. rubra</i>	54
TABELA 15. Padrão de fragmentação de SF13-26 comparados com a literatura. ...	58

TABELA 16. Sinais de ^1H observados no espectro de SF13-26 e comparados com a literatura (esquerda).	62
TABELA 17. Sinais observados nos espectros de ^{13}C e determinação da natureza do carbono por DEPT-135, com parados aos dados da literatura.	66
TABELA 18. Sinais observados no mapa de correlações HSQC gerado as subfração SF13-26.	69
TABELA 19. Sinais observados no mapa de correlações HMBC gerado as subfração SF13-26	74
TABELA 20. Comparações entre os sinais observados nos espectros de RMN e mapas bidimensionais com os resultados encontrados na literatura.	76
TABELA 21. Sinais observados nos espectros de RMN comprados com os resultados encontrados na literatura.	80
TABELA 22. Sinais observados nos espectros de ^{13}C e DEPT-135, comprados com HAYUN, <i>et al.</i> , 2020.	82
TABELA 23. Correlações observadas no mapa HSQC comprados com os resultados encontrados na literatura.	84
TABELA 24. Correlações HMBC, do ácido Vanílico presente na SF14-11	86
TABELA 25. Comparações dos sinais de RMN analisados de SF14-11 e comparados com a literatura.	87
TABELA 26. Comparações dos sinais de RMN analisados de SF14-11 e comparados com a literatura.	91
TABELA 27. Sinais observados nos espectros de ^{13}C e DEPT-135 de SF14-16 comprados com OKBA <i>et al.</i> , 2018.	93
TABELA 28. Sinais observados nos espectros de RMN comprados com os resultados encontrados na literatura.	94
TABELA 29. Correlações HMBC, do ácido Protocatecúico presente na SF14-16 . ..	96
TABELA 30. Comparações dos sinais de RMN analisados de SF14-11 e comparados com a literatura.	97

TABELA 31. Íons percussores observados no espectro de massas EM ² de SF14-24 , comparados com a literatura.	100
TABELA 32. Sinais de ¹ H observados no espectro de SF14-24 e comparados com a literatura (esquerda).	106
TABELA 33. Sinais observados no mapa de correlações HSQC da subfração SF14-24	110
TABELA 34. Sinais observados no mapa de correlações HMBC gerado da subfração SF14-24	115
TABELA 35. Sinais observados no mapa de correlações HMBC gerado da subfração SF14-24	118
TABELA 36. Comparações entre os sinais observados nos espectros de RMN e mapas bidimensionais com os resultados encontrados na literatura.	119
TABELA 37. Padrão de fragmentação de SF16-26 comparados com a literatura. .	123
TABELA 38. Padrão de fragmentação de SF16-28 comparados com a literatura. ...	126
TABELA 39. Resultados das análises de capacidade antioxidante das substâncias isoladas de <i>S. rubra</i>	128

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1. Fluxograma das etapas realizadas para o fracionamento por CCC e frações obtidas.	39
ESQUEMA 2. Fluxograma dos processos seguidos para o isolamento das subfrações de F13 e F14	44
ESQUEMA 3. Fluxograma dos processos de isolamento das subfrações de F16	46
ESQUEMA 4. Proposta de fragmentações da substância presente em SF13-26 . Adaptado de (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2018).	58
ESQUEMA 5. Proposta de fragmentações da substância presente em SF14-11 . Adaptado de (FIGUEROA <i>et al.</i> , 2018).	78
ESQUEMA 6. Proposta de fragmentações da substância presente em SF14-16	90
ESQUEMA 7. Proposta de fragmentações da estrutura presente em SF14-24 . Adaptado de (DE TAEYE <i>et al.</i> , 2017; HSU <i>et al.</i> , 2018).	101

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Geral	3
2.2. Específicos.....	3
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	4
3.1. A exploração madeireira e seus resíduos	4
3.2. Radicais livres e antioxidantes.....	6
3.3. Métodos de análise de capacidade antioxidante.....	7
3.4. Cromatografia contracorrente (CCC).....	9
3.4.1. Movimento planetário de bobina do tipo J	9
3.4.2. Equilíbrio Hidrodinâmico	10
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
4.1. A família Lauraceae.....	14
4.2. O gênero Sextonia.....	16
4.3. A espécie Sextonia rubra (Mez.) van der Werff.....	16
4.3.1. Exploração madeireira	17
4.3.2. Propriedades biológicas e substâncias isoladas.....	18
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
5.1. Reagentes, materiais e equipamentos utilizados.....	25
5.1.1. Materiais	25
5.1.2. Equipamentos	25
5.2. Reveladores químicos.....	25
5.3. Coleta e tratamento do material vegetal e obtenção dos extratos.....	26
5.4. Espectrometria de Massas.....	27
5.5. Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	28

5.6. Testes indicativos de classes químicas nos extratos	28
5.6.1. Caracterização de fenólicos	28
5.6.2. Caracterização de saponinas	29
5.6.3. Caracterização de terpenos	30
5.6.4. Caracterização de alcaloides	30
5.7. Prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada	31
5.7.1. Teste de sistemas de eluentes	31
5.7.2. Teste de reveladores para indicação das classes químicas dos extratos	
31	
5.8. Análises quantitativas de capacidade Antioxidante dos extratos	32
5.9. Teste de atividade antioxidante por bioautografia dos extratos	33
5.10. Cromatografia Contracorrente (CCC)	34
5.10.1. Testes de sistemas de partição com solventes orgânicos.....	34
5.10.2. Condições para operação do equipamento..... Erro! Indicador não definido.	
5.10.3. Fracionamento do extrato LLG03 no HPCCC	37
5.10.4. Testes de eluentes: Frações F12, F13, F14, F16 e F17.....	40
5.10.5. Testes de sistemas para F12, F13, F14, F16 e F17.....	41
5.11. Cromatografia contracorrente → Isolamento	42
5.11.1. Fracionamento de F13	42
5.11.3. Fracionamento de F16	45
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
6.1. Rendimento dos extratos brutos	47
6.2. Classes indicadas nos testes de prospecção em tubos	48
6.3. Prospecção fitoquímica por CCD	52
6.4. Análise de atividade antioxidante dos extratos	53
6.5. Elucidação estrutural das substâncias isoladas dos resíduos de S. rubra.	
55	
6.5.1. Elucidação estrutural de SF13-26	55
6.5.1.1. Análise de prospecção em placas.....	55

6.5.1.2. Espectrometria de massas.....	56
6.5.1.3. Ressonância Magnética nuclear (1D e 2D).....	59
6.5.2. Elucidação estrutural de SF14-11	77
6.5.2.1. Análise de prospecção em placas.....	77
6.5.2.2. Espectrometria de massas.....	77
6.5.2.3. Ressonância Magnética nuclear (1D e 2D).....	79
6.5.3. Elucidação estrutural de SF14-16	88
6.5.3.1. Análise de prospecção em placas.....	88
6.5.3.2. Espectrometria de massas.....	88
6.5.3.3. Ressonância Magnética nuclear (1D e 2D).....	90
6.5.4. Elucidação estrutural de SF14-24	98
6.5.4.1. Análise de prospecção em placas.....	98
6.5.4.2. Espectrometria de massas.....	98
6.5.4.3. Ressonância Magnética nuclear (1D e 2D).....	102
6.5.5. Determinação estrutural de SF16-26.....	121
6.5.5.1. Análise de prospecção em placas.....	121
6.5.5.2. Espectrometria de massas.....	121
6.5.6. Determinação estrutural de SF16-28.....	124
6.5.6.1. Análise de prospecção em placas.....	124
6.5.6.2. Espectrometria de massas.....	124
6.6. Análise de atividade antioxidante das substâncias ativas	127
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	132
8. CONCLUSÕES	135
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136
10. ANEXO.....	152

1. INTRODUÇÃO

Devido ao tamanho e a diversidade da floresta Amazônica, o Brasil passou a ser o terceiro maior produtor e consumidor de madeiras em tora do mundo, ficando atrás dos países Índia e Indonésia. Essa atividade está concentrada nos estados do Amazonas, Mato Grosso e Pará (ITTO, 2017).

Tal potencial madeireiro chama a atenção para a quantidade de resíduos gerada, desde o setor primário até o produto acabado. Os resíduos são destinados à processos alternativos de reaproveitamento, porém, nem tudo consegue destino adequado e acaba gerando montanhas de restos de material vegetal, que posteriormente são abandonadas.

Esse material pode ser analisado aos olhos da química de produtos naturais com finalidade de aplicação nas áreas tecnológicas como química fina, biotecnologia e farmacêutica. Portanto, os resíduos madeireiros podem ser fonte de pesquisa para descoberta de substâncias com atividades biológicas, agregando valor a esses remanescentes da atividade madeireira e trazendo benefício para a sociedade.

Estudos químicos dos resíduos madeireiros do Amazonas e do Pará encontraram substâncias ativas como flavonoides, compostos fenólicos, terpenos, naftoquinonas e lignanas. Cujas propriedades farmacológicas foram positivas para atividade antioxidante e antifúngicas contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Candida albicans*, *Candida gattii*, *Candida neoformans* em seus extratos alcoólicos (ALVES, 2020; MELO, 2016; SANTIAGO, 2020; SOUSA *et al.*, 2020).

Os metabólitos secundários não são necessariamente produzidos em todas as condições e, na maioria dos casos, as funções dessas substâncias no organismo ainda não são conhecidas. Entretanto, por sua imobilidade, os vegetais desenvolveram meios para se defender de alguns herbívoros, competir com outras plantas, contra patógenos, para lidar com mudanças climáticas, intensidade de luz solar e deficiência de nutrientes. Elas também

produzem metabólitos para atrair insetos polinizadores e dispersores de sementes, desempenhando algum papel vital para o bem-estar do produtor (DEWICK, 2002; PERES, 2019).

Atualmente, diversas fontes de antioxidantes naturais são conhecidas e algumas são amplamente encontradas no reino vegetal. De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autoxidação, por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio radical (HALLIWELL, 2001) .

Considerando a ausência de dados químicos dos resíduos de *S. rubra*, que apontem substâncias responsáveis pela capacidade inibitória de radicais. É viável que sejam feitos estudos aprofundados para descobertas das substâncias ativas, para apoiar o aproveitamento desses materiais descartados pelas indústrias, pois elas podem apresentar importância comercial que agregue valor à matéria prima. Assim, resultando na diminuição do volume descartado no meio ambiente.

O principal foco desta pesquisa é avaliar, isolar e caracterizar os compostos presentes na casca de *Sextonia rubra*, baseados na atividade antioxidante apresentada.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Isolar e Identificar as principais substâncias bioativas responsáveis pelo potencial antioxidante dos resíduos madeireiros (cascas) da espécie *Sextonia rubra* (Mez) van der Werff.

2.2. Específicos

- Analisar o perfil químico dos extratos das cascas por meio de reações em tubos de ensaio e por cromatografia em camada delgada;
- Determinar as concentrações eficientes de inibição dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} dos extratos e das substâncias isoladas;
- Desenvolver uma metodologia para fracionamento dos extratos e isolamento das substâncias ativas utilizando a técnica cromatografia contracorrente de alta eficiência (HPCCC);
- Monitorar o isolamento das substâncias ou misturas por bioautografia utilizando a capacidade de sequestro de DPPH[•] (2,2-Difenil-1-picrilhidrazila) por CCD;
- Avaliar os perfis das frações por CCD e Espectrometria de Massas (EM);
- Elucidar os produtos naturais isolados, utilizando EM e RMN uni e bidimensionais (¹H, ¹³C, DEPT-135, HSQC, HMBC e COSY).

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. A exploração madeireira e seus resíduos

Juntamente com a mineração e a agropecuária, a exploração madeireira é uma das atividades mais importantes para a economia na Amazônia brasileira, refletindo diretamente no desenvolvimento de dezenas de municípios da região (VERÍSSIMO *et al.*, 2006). Na **figura 1**, estão exemplares de toras exploradas no sul do Amazonas, dentre elas estão Copaíba Preta, Angelim Pedra, Sucupiras, Jatobá do Serrado e Louros.



FIGURA 1. Exemplares de espécies brasileiras exploradas no sul do Amazonas. (https://www.wwf.org.br/informacoes/noticias_meio_ambiente_e_natureza/?42822#) Acesso em: 23/04/21.

Os estados do Pará, Rondônia e Amazonas foram os que mais produziram madeira em tora na região norte nos últimos anos. Cerca de 30 milhões de metros cúbicos foram produzidos até 2017. Dos 14,2 milhões de m³ de madeira que foram exploradas até 2010, cerca de 5,8 milhões de m³ foram empregados no processo de fabricação em tora, entretanto, apenas 15 % do material processado possui alto valor comercial e os 85 % restantes vão para fabricação de materiais de baixo valor agregado.

O que não é aproveitado das árvores, correspondendo a 8,4 milhões de metros cúbicos (59 %), foi considerado como resíduo do processamento. Cerca de 75 % de desse resíduo foi usado na geração de energia e 25 % foi

descartado, gerando montanhas de resíduos madeireiros (D'ARACE *et al.*, 2019; HUMMEL *et al.*, 2010). É importante destacar que esses dados se referem apenas ao tronco da árvore, não estão inclusos dados das demais partes da planta como galhos, folhas e raízes que normalmente ficam no local de coleta das árvores.

A **figura 2** mostra a imagem de resíduos descartados na cidade de Envira, município do estado do Amazonas.



FIGURA 2. Montanha de resíduos madeireiros de uma empresa localizada no Amazonas. (GUIMARÃES, A. C., 2013).

Muitas dessas indústrias de base florestal apresentam maquinário obsoleto, gerando grande quantidade de resíduos que na maioria das vezes não são aproveitados, causando problemas operacionais na própria indústria. Essa problemática não está restrita à atividade extrativista, pois os resíduos madeireiros são gerados em toda cadeia produtiva, entretanto, o processo primário gera a maior parte deles (MINILLO, 2017).

De acordo com empresas participantes de um estudo, as espécies beneficiadas pelas indústrias de compensado são, principalmente, virola, copaíba, muiratinga, sumaúma e caucho, nas serrarias e movelarias geralmente são: cerejeira, cedro, mogno, angelim-pedra, louro-gamela, louro-inhamuí, louro-preto, louro-puchuri e sucupira. Na **tabela 1** estão

listadas as espécies exploradas nas regiões entorno de Manaus (SALES-CAMPOS; LI; VIANEZ, 2000).

TABELA 1. Espécies madeireiras exploradas nas regiões próximas a Manaus (SALES-CAMPOS; LI; VIANEZ, 2000).

Nome popular	Nome Científico	Família
Açaru	<i>Hura crepitans</i> L.	Euphobiaceae
Andiroba	<i>Carapa guianensis</i> Aubl.	Meliaceae
Angelim-Pedra	<i>Hymenolobio pulcherrimum</i> Ducke	Fabaceae
Angelim	<i>Hymenolobio</i> ssp.	Fabaceae
Angelim-rajado	<i>Marmaraxylon racemosum</i> (Ducke) Kilip	Mimisaceae
Caucho	<i>Castilloa ulei</i> Warb.	Moraceae
Cedro	<i>Cedrella odorata</i> L.	Meliaceae
Copaíba	<i>Copaifera multijuga</i> Hayne	Caesalpinaceae
Cerejeira	<i>Torresea acreana</i> Ducke	Fabaceae
Jacareúva	<i>Calophyllum brasiliensis</i> Camb	Clusiaceae
Louro-inhamui	<i>Ocotea cymbarum</i> H. B. K.	Lauraceae
Louro-Gamela	<i>Nectandra rubra</i> (Mez) C. K. Allen	Lauraceae
Louro	<i>Ocotea</i> spp.	Lauraceae
Macacarecuia	<i>Couroupita guianensis</i> Aubl.	Lecythidaceae
Maçaranduba	<i>Manikara</i> spp.	Sapotaceae
Mogno	<i>Swetenia macrophylla</i> King.	Meliaceae
Muiratinga	<i>Maquira coriacea</i> (Karsten) C. C. Berg.	Moraceae
Sucupira	<i>Bowdichia nitida</i> Sprue ex Benth	Fabaceae
Sumaúma	<i>Ceiba pentandra</i> Gaertn	Bombacaceae
Ucuúba branca	<i>Virola surinamensis</i> Warb	Myristicaceae

Legenda: Em negrito, a espécie *Nectandra rubra* atualmente é identificada por *Sextonia rubra* (WERFF, 1997).

Muitas espécies vegetais que são exploradas e altamente valorizadas no setor madeireiro, possuem pouco ou nenhum estudo sobre seu perfil químico e atividade biológica. Informações poderiam levar a um entendimento abrangente da ação de seus metabólitos secundários e consequentemente à identificação e aplicação de produtos naturais conhecidos ou inéditos (GRANATO *et al.*, 2005).

3.2. Radicais livres e antioxidantes

Um antioxidante é aquela substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas com as de um substrato oxidável, retarda ou

previne significativamente a oxidação desse substrato. Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos e agentes quelantes (HALLIWELL, 2001; MESSIAS, 2009).

O termo antioxidante é bem abrangente, visto que em cada área de aplicação tem seu próprio antioxidante para função específica. Na ciência de alimentos, são indicados alimentos para inibição da peroxidação lipídica, nos museus os curadores usam antioxidantes para preservar os artefatos orgânicos, na indústria de polímeros são usados produtos para controlar a polimerização na fabricação da borracha, plásticos e tintas, além disso, usam os inibidores de oxidação para proteger as superfícies da luz ultravioleta (HALLIWELL, 2001).

3.3. Métodos de análise de capacidade antioxidante

Os principais ensaios de capacidade antioxidantes são classificados em duas categorias: Ensaio baseado em reações de transferências de próton (H^+) e em reações de transferência de um elétron, os quais destinam-se a medir a capacidade de eliminação de radicais (oxidantes). Os procedimentos descritos a seguir são baseados em reações químicas *in vitro*, não apresentando nenhuma similaridade com o sistema biológico, como biodisponibilidade, estabilidade *in vivo*, retenção do antioxidante pelos tecidos e reatividade (ARAÚJO, 2008; HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005).

Um dos métodos mais populares atualmente é baseado no uso do radical livre **difenilpicril-hidrazila (DPPH \cdot)** que possui o parâmetro concentração equivalente (CE_{50}) usado para interpretação dos dados do método experimental.

A deslocalização do elétron dá origem à estabilidade da molécula e origina a cor violeta, caracterizada por uma banda de absorção no comprimento de onda 520 nm (MOLYNEUX, 2004).

Quando a solução do radical DPPH reage com uma solução doadora de hidrogênio, ocorre um processo de redução e a cor violeta muda para o tom amarelo pálido residual do grupo picril, como ilustrado na **figura 3**.

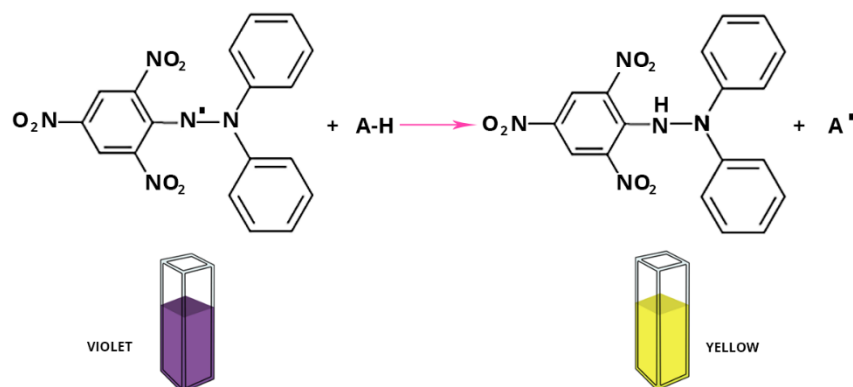


FIGURA 3. Reação do radical DPPH com um antioxidante. (<<http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>> Acesso em: 23/05/2021).

Outro método usual para indicação de capacidade antioxidante é o de sequestro do cátion radical (ABTS^{•+}) [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)]. É um método de rastreamento de atividade antioxidante, apresentando descoloração aplicável a antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos incluindo flavonoides, hidroxicinamatos, carotenoides e antioxidantes plasmáticos em substâncias puras e extratos (MILLER *et al.*, 1993; MILLER; RICE-EVANS, 1996; RE *et al.*, 1999; RICE-EVANS; MILLER, 1994).

O contato de antioxidantes ao cátion radical pré-formado reduz a ABTS, em uma extensão e escala de tempo, dependentes da capacidade e da concentração do antioxidante. Assim, a inibição é determinada em função da concentração e do tempo, e calculada em relação à atividade do reagente Trolox (padrão), nas mesmas condições, absorvendo nas bandas 415 nm, 645 nm e 734 nm (MILLER *et al.*, 1993; MILLER; RICE-EVANS, 1996; RE *et al.*, 1999; RICE-EVANS; MILLER, 1994).

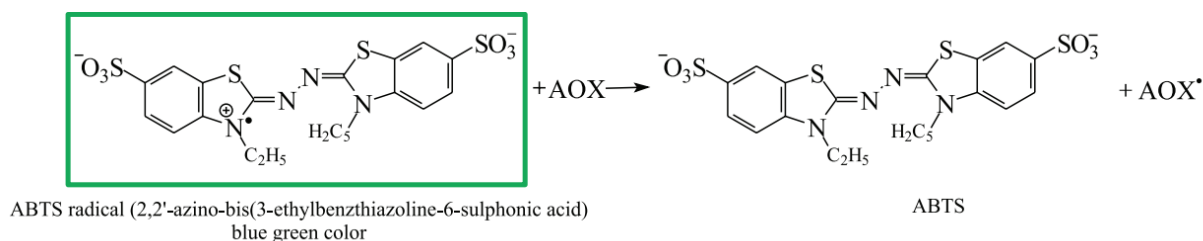


FIGURA 4. Ilustração do radical ABTS com um antioxidante. (BECKER *et al.*, 2019)

3.4. Cromatografia contracorrente (CCC)

É uma técnica cromatográfica líquida sem qualquer suporte sólido. A partição do soluto ocorre entre dois líquidos imiscíveis compostos por misturas de solventes. A proporção relativa dos solutos da amostra em cada uma das fases, está relacionada aos seus respectivos coeficientes de partição. Essa técnica tem ampla aplicação, podendo separar desde íons até macromoléculas (BERTHOD *et al.*, 2009; ITO, 1981; MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

A constante de distribuição (K) pode ser expressa como a concentração de um soluto na fase superior dividida pela concentração do composto na fase inferior. Em um sistema de solventes, onde o valor de K de uma amostra é particularmente 1, é considerado o sistema ideal para o fracionamento. A decisão de qual fase (superior ou inferior) será a fase móvel é menos importante quando $K=1$, pois o volume de retenção será muito semelhante em ambos os modos. Define-se como ponto ideal na CCC o intervalo entre os valores 0,4 e 2,5 (FRIESEN; PAULI, 2005).

A maior parte dos sistemas de solventes são misturas de três ou quatro solventes, sendo um deles a água e o restante solventes orgânicos, que após estabilização, formam duas fases que são chamadas de fase inferior e superior. Para a separação eficaz de substâncias em uma ampla faixa de polaridade, são normalmente usados os solventes hexano, acetato de etila, butanol, metanol e água em variadas proporções (BÜTTENBENDER; SIMON; VOLPATO, 2018; FRIESEN; PAULI, 2007).

3.4.1. Movimento planetário de bobina do tipo J

A **figura 5** ilustra o eixo de apoio da coluna rotacionando em movimento planetário do tipo J. O arranjo de engrenagens 1:1 é quem possibilita o giro planetário ocorrendo na mesma velocidade. O suporte com a coluna gira em torno do seu próprio eixo, enquanto gira entorno do eixo da centrífuga na mesma velocidade angular e na mesma direção. As duas fases

líquidas passam por movimento em contracorrente para separar completamente as fases superior (saindo pelo lado da cabeça) e inferior que sai pela cauda. (ITO, 2005, 2014).

Este movimento planetário oferece as duas principais funções para HPCCC:

- É um sistema de eluição sem selo mecânico, de modo que a fase móvel tem eluição contínua pela coluna de separação rotativa;
- Produz movimento hidrodinâmico único de duas fases de solventes dentro da coluna em espiral de múltiplas camadas, devido ao efeito do parafuso de Arquimedes (ITO, 2005).

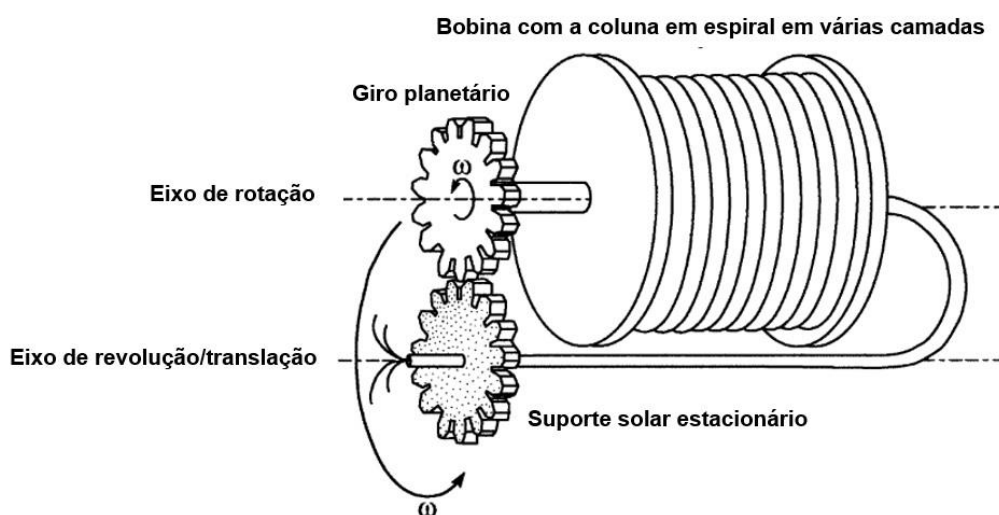


FIGURA 5. Esquema do suporte que sustenta a bobina multicamada. Adaptado de (ITO, 2005).

Legenda: São observados os eixos de rotação e de revolução onde ocorre o movimento planetário, o qual evita a torção do feixe de tubos de fluxo, permitindo a eluição contínua das fases por meio de uma coluna giratória.

3.4.2. Equilíbrio Hidrodinâmico

Quando duas fases de solventes imiscíveis são introduzidas em uma coluna enrolada com as extremidades fechadas, a rotação separa as fases completamente ao longo do comprimento do tubo, onde a fase menos densa ocupa a cabeça e a fase mais densa ocupa a cauda (ITO, 2014).

Observa-se na **figura 6A** o equilíbrio hidrodinâmico bilateral das duas fases, eficientemente utilizado para realizar CCC de alta velocidade

representado em colunas retas. Nessa condição, indica que se a fase branca for introduzida pela cauda, ela se moverá até a cabeça e no contrário, a fase preta se moverá da cabeça à cauda. Na ilustração da coluna em **(B)** há um sistema bifásico de CCC, o qual mostra as duas fases se movendo na mesma direção e sentidos contrários (movimento contracorrente). Na representação **C** está o sistema de separação CCC padrão, entretanto com os tubos de alimentação de cada fase e de alimentação da amostra de modo que uma das fases seja forçada a permanecer na coluna, no caso, a fase estacionária (ITO, 2014).

Mecanismo CCC de alta velocidade

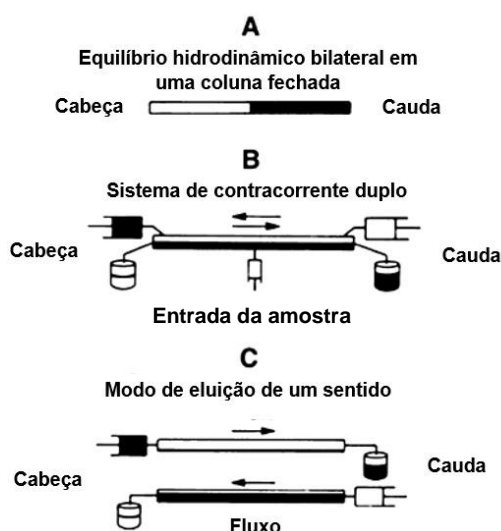


FIGURA 6. Mecanismo de cromatografia contracorrente de alta velocidade. Adaptado de (ITO, 2014).

Legenda: **A:** Demonstração da parte interna de uma coluna reta em equilíbrio hidrodinâmico; **B:** Sistema bifásico em movimento contracorrente; **C:** Modo de eluição em sentido único com as fases separadas mantendo a fase estacionária retida na coluna enquanto a fase móvel elui.

A **figura 7 A** mostra um esquema do movimento de distribuição das duas fases submetidas ao movimento planetário do tipo J por iluminação estroboscópica, a qual permite que um dispositivo óptico registre o movimento contínuo e em alta velocidade fazendo com que o objeto analisado pareça estar parado. É observada a zona de mistura próxima ao

eixo central de rotação e a zona de separação . (ITO, 2014; LABURÚ; SILVA, 1999) .

Na **figura 7 B** está ilustrada o processo em um único loop espiral. As duas fases são misturadas no tubo quando passa pelo eixo de revolução e são separadas ao se distanciar do mesmo. Observando as setas curvas apontadas para cima está o sentido em que a fase inferior está indo e as setas para baixo indicam o sentido da fase superior, sob um forte campo de força centrífuga. Neste momento ambas estão em migração, isso indica que, embora a fase estacionária esteja confinada na coluna, ela não está estática, uma vez que repete ativamente o movimento em contracorrente com a fase móvel (ITO, 2014).

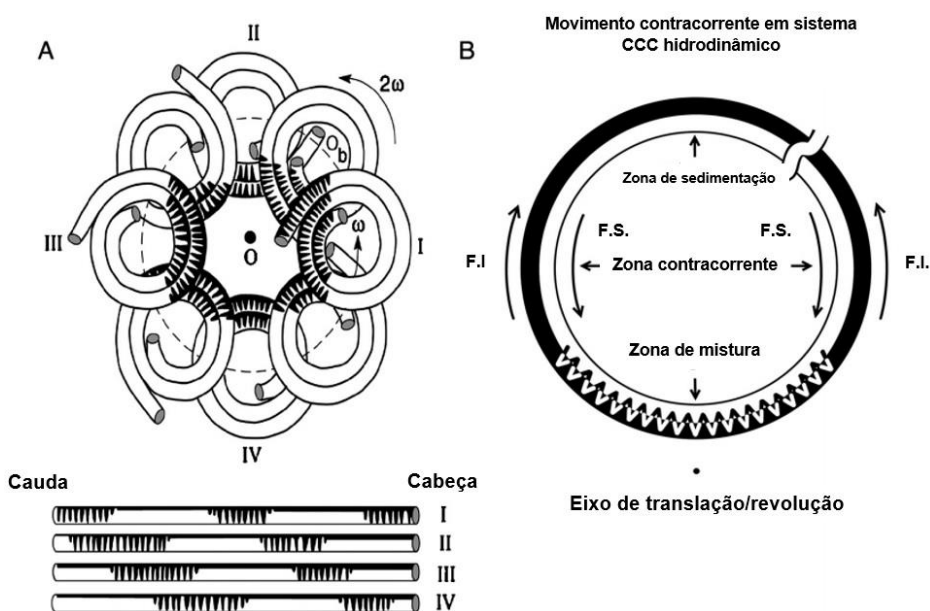


FIGURA 7. Movimento hidrodinâmico de duas fases dentro de uma coluna espiralada em um suporte de movimento planetário do tipo J. Adaptado de (ITO, 2014).

Legenda: (A) Observação do interior do tubo; (B) Movimento contracorrente de duas fases em uma parte da coluna em espiral.

A eluição por gradiente pode ser feita de várias maneiras, alguns exemplos são eluição linear, eluição não linear e de pH. O principal uso do gradiente é encurtar a duração do fracionamento e melhorar a resolução da análise, principalmente quando a faixa de retenção da amostra a ser

purificada está se ampliando e os compostos não podem ser purificados no modo isocrático. Em equipamentos hidrodinâmicos, a FE é mantida no interior da coluna devido ao campo de força centrífuga gerado no equipamento quando realiza o movimento planetário (BÜTTENBENDER; SIMON; VOLPATO, 2018; LEITÃO; COSTA, 2015).

A cromatografia contracorrente está ganhando espaço como uma técnica de separação viável na química de produtos naturais, bom como em outras áreas. Considerando a ampla variedade de sistemas de solventes que podem ser usados, com um amplo espectro de polaridades. Podem ser separados dos extratos brutos à frações, em escala analítica ou preparativa, desenvolvendo uma metodologia para cada matriz real e complexa em análise (FRIESEN; PAULI, 2007; HUANG *et al.*, 2016; LEITÃO; COSTA; FIGUEIREDO, 2009).

No laboratório de Química de Produtos Naturais (Departamento de Química-ICE), existe um equipamento HPCCC do modelo Spectrum da Marca Dinâmica Extraction. Este é único no Amazonas e apoia o isolamento das substâncias ativas oriundas de resíduos madeireiros, mostrando o potencial tecnológico deste material na área da química.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. A família Lauraceae

A família Lauraceae pertence à ordem das Laurales na subdivisão das angiospermas. Geralmente são árvores e arbustos, exceto a *Cassytha* L. (uma herbácea parasita), sua ocorrência tem distribuição predominante tropical e é especialmente diversificada na região sudeste da Ásia, norte da América do Sul, Oceania e no sul da África. Podendo existir também representantes nas regiões temperadas conforme mostrado na **figura 8**. É constituída por cerca de 50 gêneros e um número estimado entre 2500 e 3000 de espécies (ALVES *et al.*, 2018; CHASE *et al.*, 2016; ROHWER, 1993; VAN DER WERFF, H., RICHTER, 1996).



FIGURA 8. Distribuição geográfica da família Lauraceae. <<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/orders/lauralesweb.htm>> Acesso em 25/04/21.

É apreciada pelo seu potencial econômico, sendo uma das famílias botânicas com maior número de espécies madeireiras comerciais, distribuída amplamente em toda Amazônia com destaque para as espécies pertencentes aos gêneros *Ocotea*, *Nectandra* e *Mezilaurus*, popularmente conhecidas por canelas, loureiros e embuias, ou no ramo alimentício e fabricação de cosméticos, como exemplo o abacateiro (*Persea americana*

Mill.), cujo fruto é comercializado pela maior parte da América e o óleo extraído do mesocarpo e de sua semente é matéria prima de cosméticos (CYSNEIROS *et al.*, 2018; QUINET, 2006).

Estudos de espécies da família apresentaram substâncias bioativas nas classes dos alcaloides, compostos fenólicos, terpenos, lactonas, entre outros metabólitos secundários que possuem propriedades antioxidantes, antitumorais, larvicidas, acaricidas e fungicidas (GARCEZ *et al.*, 2016).

De acordo com (YAMAGUCHI; ALCÂNTARA; DA VEIGA, 2012), foram relatados resultados positivos para testes de atividade antioxidante nos galhos de quatorze espécies de Lauraceae, dentre os quais, *Licaria martiniana*, *Ocotea minor* e *Sextonia rubra* apresentaram resultados aproximados aos do padrão Quercetina ($CE_{50} = 4,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (**Tabela 2**) tornando-as aptas a futuros ensaios bioguiados visando análises quantitativas, isolamentos e elucidações estruturais das substâncias ativas.

TABELA 2. Resultados dos testes químicos de capacidade antioxidante de galhos de espécies de Lauraceae (YAMAGUCHI; ALCÂNTARA; DA VEIGA, 2012).

Espécie botânica	$CE_{50} \pm DP (\mu\text{g.mL}^{-1})$
<i>Aniba panurensis</i>	27,586 ± 2,199
<i>Aniba roseodora</i>	25,209 ± 0,186
<i>Dicypellium manauense</i>	16,814 ± 0,486
<i>Endlicheria citriodora</i>	42,78 ± 0,53
<i>Endlicheria sericea</i>	50,92 ± 0,96
<i>Licaria cannella angustata</i>	29,349 ± 0,245
<i>Licaria martiniana</i>	6,956 ± 0,131
<i>Mezilaurus dukei</i>	13,494 ± 0,484
<i>Ocotea ceanothifolia</i>	15,64 ± 0,72
<i>Ocotea leucoxydon</i>	50,68 ± 0,64
<i>Ocotea minor</i>	9,08 ± 0,51
<i>Rhodostemonodaphne crenaticupula</i>	67,01 ± 2,70
<i>Rhodostemonodaphne recurva</i>	128,26 ± 1,07
<i>Sextonia rubra</i>	8,105 ± 1,152

Legenda: CE_{50} = concentração eficiente para reagir com 50% dos radicais na solução.

4.2. O gênero *Sextonia*

O gênero *Sextonia* é composto atualmente por duas espécies arbóreas: *S. pubescens* (van der Werff) e *S. rubra* (Mez) van der Werff. São árvores de grande porte encontradas apenas na região norte da América do Sul. A espécie *S. pubescens* tem ocorrência conhecida apenas na Amazônia peruana na região de floresta primária não inundada, podendo crescer até 25 m de altura (WERFF, 1997). Não foram encontrados estudos químicos nem farmacológicos sobre a espécie peruana até o momento da realização deste trabalho.

Este gênero foi criado quando não houve mais a possibilidade de classificar *S. rubra* nos gêneros *Ocotea* ou *Nectandra*. Este fato ocorreu devido uma série de observações incomuns em relação à sua anatomia (tépalas, flores, ovário, estames e fruto) que diferia de todas as outras espécies de *Ocotea* e dos demais gêneros da família, pois não havia outra espécie com tépalas desiguais e a maioria das características anatômicas da *Ocotea rubra*, como era na época chamada, eram consideradas como raras (ROHWEN, J. G., RICHTER, H. G., VAN DER WERFF, 1991).

Também foram consideradas as diferenças morfológicas entre *Ocotea* e o *Sextonia* (VAN DER WERFF, H., RICHTER, 1996). Portanto, a proposta de um novo gênero fora apoiada pelas diferenças de anatomia da madeira e das cascas, embriologia, e tipos de inflorescência, tornando a descrição de um novo gênero muito bem justificada (VAN DER WERFF, 1997).

4.3. A espécie *Sextonia rubra* (Mez.) van der Werff

A *Sextonia rubra* é uma espécie arbórea de grande porte (os indivíduos chegam a 45 m) restrita ao norte da América do Sul conforme ilustrado na **figura 9**, existindo apenas nas Guianas, Venezuela e Amazônia brasileira até o estado do Amapá. (RODRIGUES, 2010; WERFF, 1997). Pode ser pesquisada também pelos nomes *Ocotea Rubra* e *Nectandra Rubra* devido ao seu percurso histórico de reorganização de gênero

botânico, entretanto, existem poucos registros de estudos químicos e das atividades biológicas apenas com a sinonímia *Nectandra rubra*.



FIGURA 9. Distribuição geográfica da espécie *Sextonia rubra*. <<https://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Sextonia+rubra>>. Acesso em: 27/04/2021).

4.3.1. Exploração madeireira

A *S. rubra* popularmente conhecida por Louro-gamela e Louro-vermelho é uma espécie muito apreciada no setor madeireiro, sua madeira não possui odor ou gosto característicos e apresenta o albúneo e cerne em tons de marrom-amarelado claro (**Figura 10**). Suas principais aplicações são na fabricação de móveis, construção civil, caixilhos e quadros de portas (FLORESTAL, 2020).

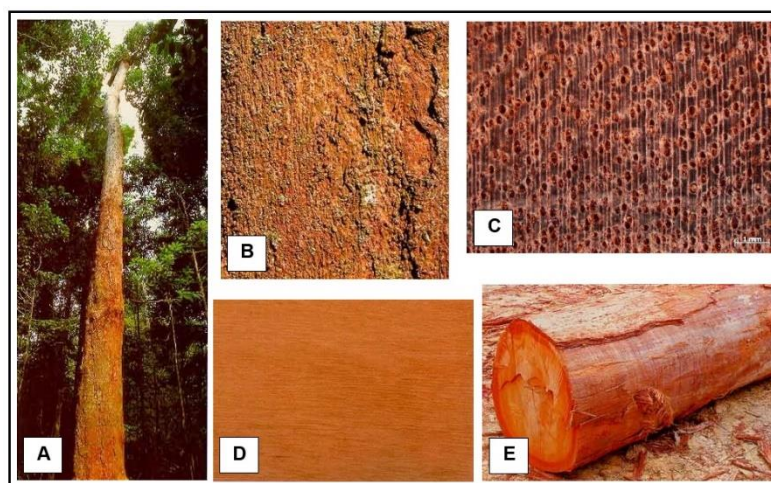


FIGURA 10. *Sextonia Rubra*. A: Árvore; B: Casca; C: Seção transversal; D: Corte tangencial; E: Tora. https://lpf.florestal.gov.br/pt-r/?option=com_madeirasbrasileiras&view=especieestudada&especieestudadaid=167. Acesso em: 29/04/2021).

Embora seja uma das espécies mais valorizadas e exploradas na atividade madeireira, a *S. rubra* possui poucos estudos em relação ao seu perfil químico e propriedades medicinais. As suas cascas tornam-se um problema ambiental, pois a exploração da espécie não é focada nas mesmas e sim nas toras. Portanto, estudos que agreguem valor a esses resíduos são viáveis para que sejam atribuídas utilidades a essa matéria prima, pois apresenta substâncias ativas com potencial antioxidante no seu extrato bruto. Após extração das substâncias de interesse tecnológico, o resíduo poderia ser destinado a outra finalidade, por exemplo, para obtenção de energia.

4.3.2. Propriedades biológicas e substâncias isoladas

Estudos realizados em *S. rubra* apresentaram capacidade antioxidante (**tabela 2**) e ausência de potencial anticolinesterásico nos extratos alcoólicos das folhas e galhos (YAMAGUCHI; ALCÂNTARA; DA VEIGA, 2012). Também foi positivo para atividade inseticida contra a larva do *Aedes aegypti* a partir dos extratos acetato de etila das serragens e das cascas. Os estudos do produto do extrato responsável pelas propriedades larvicidas gerou patente em 2017 (FALKOWSKI *et al.*, 2016, 2017, 2020).

Segundo (RODRIGUES *et al.*, 2011, 2010), o extrato da madeira de *S. rubra* apresentou interessante capacidade termiticida, uma vez que foi observada sua resistência natural a cupins, e extratos do alborno e do cerne apresentaram alta capacidade contra fungos dermatófitos e baixa atividade citotóxica em células fibroblastos de mamíferos NHI-3T3.

Os estudos acima citados comprovaram que as substâncias ativas responsáveis pelas atividades biológicas, foram as lactonas rubrenolida (**1**) e rubrinolida (**2**) (**figura 11**). Sendo os produtos naturais isolados e caracterizados dos extratos de *S. Rubra* pela primeira vez em 1977, quando ainda era conhecida por *Nectandra rubra* (FRANCA; GOTTLIEB; COXON, 1977). Vale ressaltar que naquele artigo não foram mencionados o local de coleta, o órgão da planta utilizado, nem país da planta estudada.

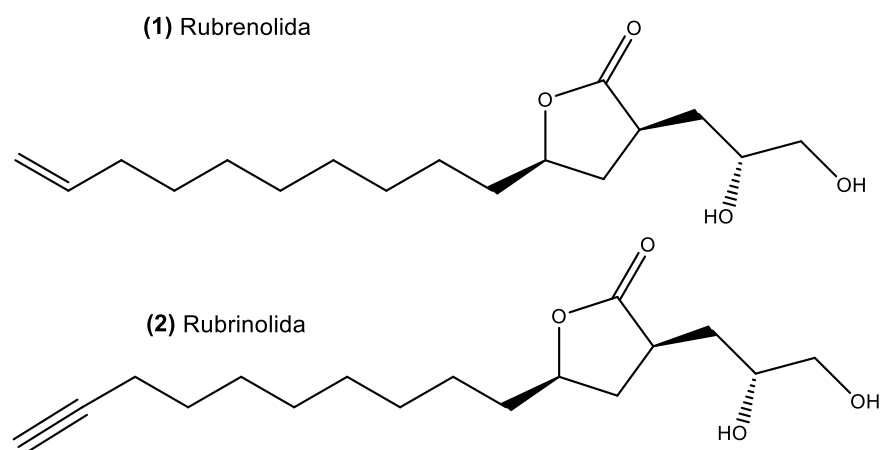


FIGURA 11. Lactonas isoladas dos extratos dos galhos de *S. rubra*.

Em estudos com análises de fragmentação de massas no modo positivo, foram encontradas mais três lactonas dos extratos do alburno e das cascas de *S. rubra*, além das lactonas já mencionadas rubrenolida (m/z 299) e rubrinolida (m/z 297). Foram identificadas como Isozuihoenalida (m/z 279), γ - Lactona 2 (m/z 381) e γ - Lactona 3 (m/z 383) mostradas na **figura 12** (FU *et al.*, 2019).

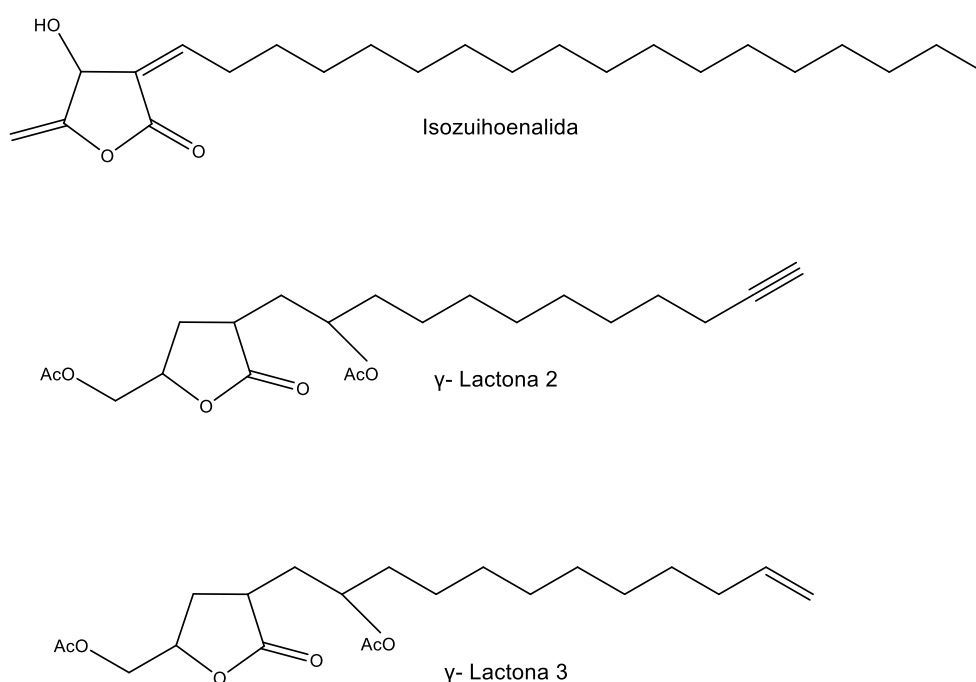


FIGURA 12. Lactonas caracterizadas por espectrometria de massas de alta resolução dos extratos polares de *S. rubra*.

Nas análises de óleos essenciais, foram encontradas cerca de quarenta e duas substâncias extraídas das folhas frescas e galhos do louro-gamela, entre as majoritárias estão monoterpenos e sesquiterpenos (**figura 13**) (ALCÂNTARA; YAMAGUCHI; DA VEIGA JUNIOR, 2013).

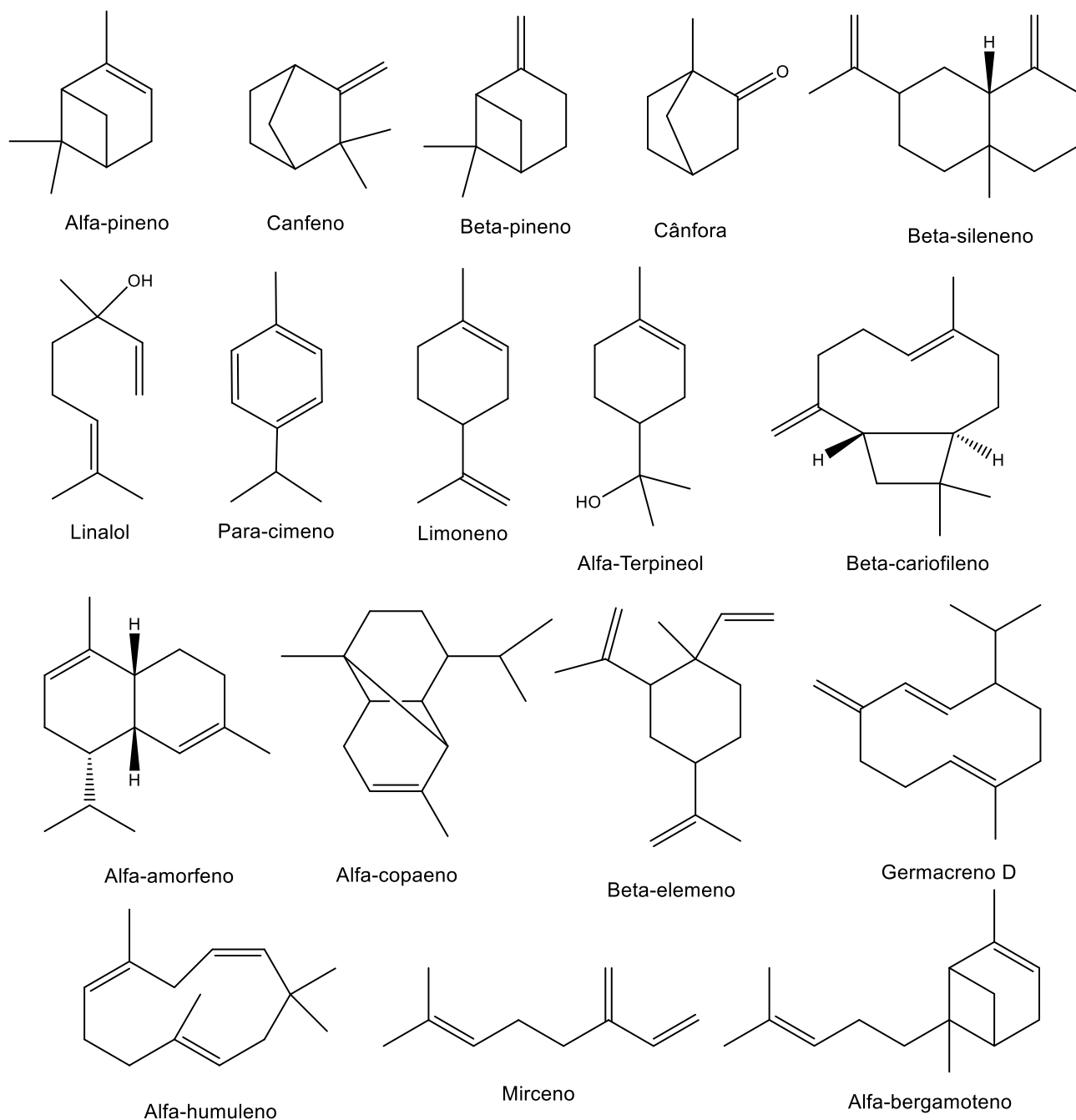
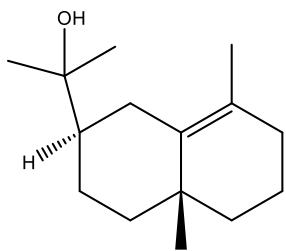
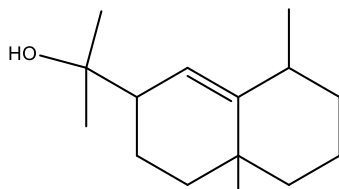


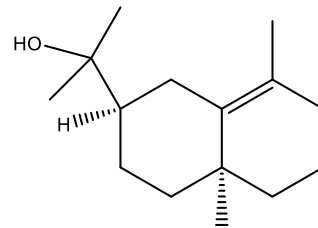
FIGURA 13. Principais substâncias terpênicas encontradas nos óleos essenciais de *S. rubra* indicadas por CG-EM.



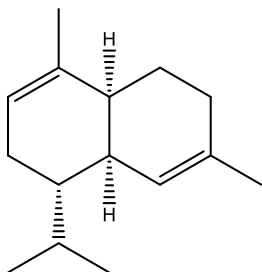
Gama-eudesmol



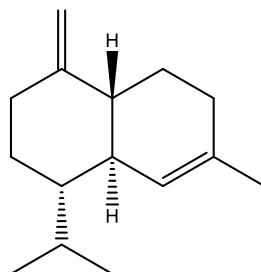
Rosfoliol



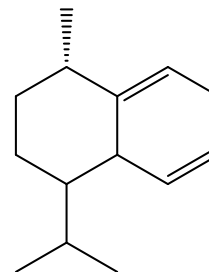
10-epi-gama-eudesmol



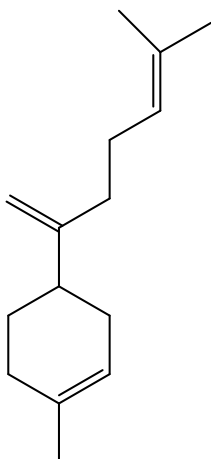
Alfa-muuroleno



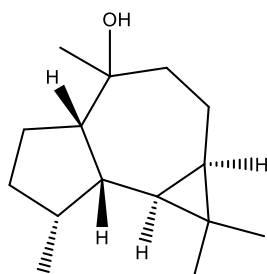
Gamma-cardineno



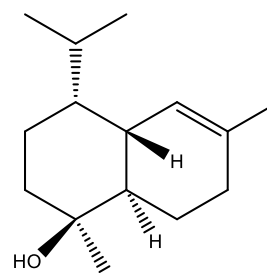
Cadina-1,4-dieno



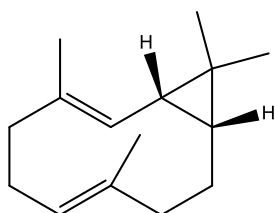
Beta-bisaboleno



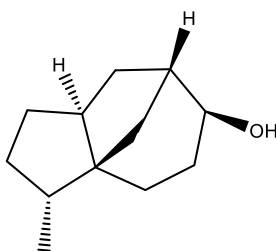
Viridiflorol



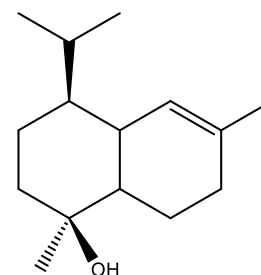
Epi-alfa-cadinol



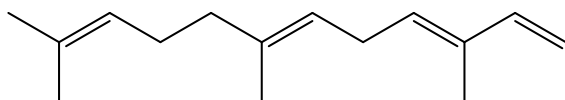
Biciclogermacreno



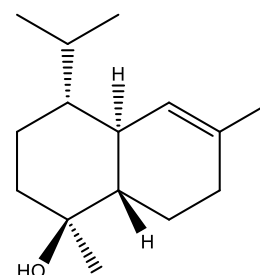
Epi-cedrol



Epi-alfa-muurolol



(E,E)-alfa-farneseno



Epi-alfa-muurolol

FIGURA 13. Continuação.

Devido à escassez de estudos fitoquímicos do gênero *Sextonia*, por não haver dados da espécie *S. pubescens*, foram pesquisados perfis químicos e atividades biológicas dos extratos polares de quatro espécies de *Nectandra* spp. para o embasamento deste trabalho.

Pesquisas de atividade biológica com as espécies *Nectandra cissiflora*, *N. cuspidata*, *N. gardineti* e *N. megapotamica*, identificaram substâncias com propriedades antioxidantes, antitumorais, larvicidas, acaricidas e fungicidas. Pertencentes às classes de flavonoides, flavonoides glicosilados, lactonas, cumarinas, sesquiterpenos, ácidos sesquiterpênicos, fenilpropanoides e derivados do ácido gálico (**figura 14**) (GARCEZ *et al.*, 1999, 2009, 2010, 2016).

Na **tabela 3** estão listados os nomes das estruturas apresentadas na **figura 14** Essas substâncias foram extraídas de extratos alcoólicos de frutos, folhas e cascas do caule. Nota-se presença predominante de ácidos terpênicos e fenilpropanoides. Também é observado na estrutura **1** um esqueleto de lactona muito semelhante às identificadas nos extratos de *S. rubra*, apresentando semelhança entre as espécies de ambos os gêneros.

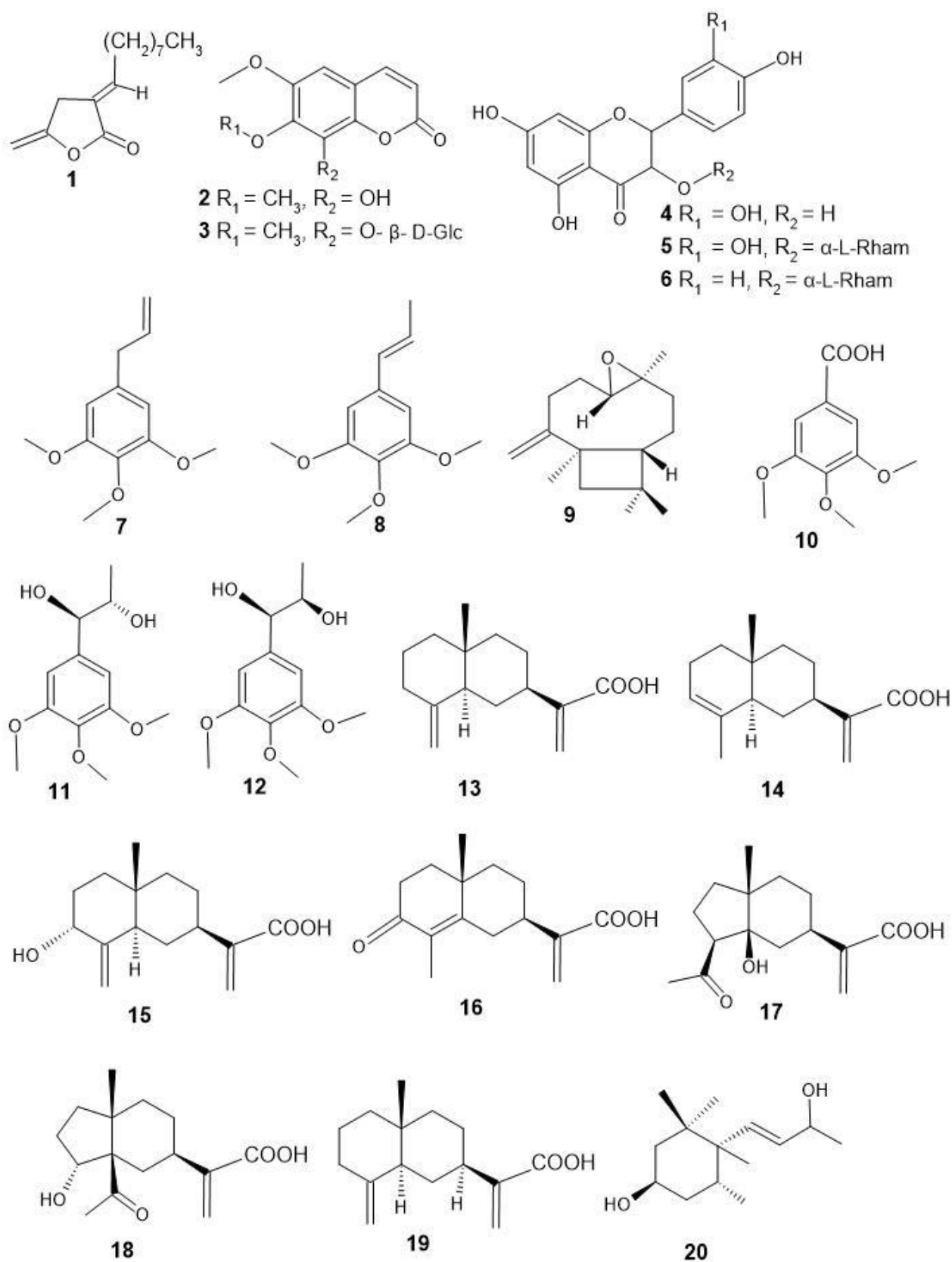


Figura 14. Estruturas das substâncias encontradas em quatro espécies do gênero *Nectandra* que responsáveis pela atividade biológica de seus extratos.

Tabela 3. Substâncias encontradas nos extratos alcoólicos de espécies de *Nectandra*, cujas estruturas estão demonstradas na fig. 6.

Espécie	Nº	Substância	Classe	Órgão	Referência
<i>N. gardneri</i>	1	Isolancifolídeo	Lactona	Fruto	(GARCEZ <i>et al.</i> , 1999)
	2	Fraxidina	Cumarina	Folhas	
	3	Fraxidina-8-O-β-D-glicopiranosídeo	Cumarina	Folhas	
	4	Quercetina	Flavonoide	Folhas	
	5	Quercitrina	Flavonoide	Folhas	
	6	Canferol-3-O-α-L-ramnopiranosídeo	Flavonoide	Folhas	
<i>N. megapotamica</i>	7	Elemicina	Fenilpropanoide	Cascas do caule	(GARCEZ <i>et al.</i> , 2009)
	8	Isoelemicina	Fenilpropanoide		
	9	Trans-1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno	Sesquiterpeno		
	10	Ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico	Ácido		
	11	(±)-eritro-1-(3,4,5- trimetoxifenil)-1,2-propanodiol	Fenilpropanoide		
	12	(±)- treo-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2-propanodiol	Fenilpropanoide		
<i>N. cissiflora</i>	13	Ácido cóstico	Ácidos terpênicos	Cascas do caule	(GARCEZ <i>et al.</i> , 2010, 2016)
	14	12-carboxieudesmano-3,11(13)-dieno			
	15	Ácido viscico			
	16	Ácido 3-oxo-g-cóstico			
	17	Ácido 3alfa-hidroxiisoiphion-11(13)-en-12-oico			
	18	Ácido 5-beta-hidroxi-4-oxo-11(13)-desidroiphionan-12-oico			
<i>N. cuspidata</i>	19	Ácido cóstico	Sesquiterpeno	Folhas	
	20	7- Megastigmen-3β,6β,9ξ-triol	Megastigmano		

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Reagentes, materiais e equipamentos utilizados

5.1.1. Materiais

Placas cromatográficas de sílica Gel 60 F254 (Sigma-Aldrich); fitas para medição de pH (Macherey-Nagel) e microcapilares graduados (Sigma-Aldrich).

5.1.2. Equipamentos

Balança analítica (Marte); balança analítica (Shimadzu); chapa aquecedora (Corning PC-4200); manta aquecedora 12000 mL (Fisaton); evaporador rotativo (Fisaton); banho ultrassônico (Quimis); capela (Quimis); bomba de vácuo – sl 061 (Solab); banho maria sl 150 (Solab); moinho de Facas (Solab); estufa de circulação forçada de ar (Nova Ética), TLC visualizer (Camag), HPLC (Dinâmica), Espectrômetro de massas (Termo Scientific) e Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (Bruker Avancer 500 MHz).

5.2. Reveladores químicos

Alguns reveladores foram produzidos para as cromatografias em camada delgada utilizadas nos processos de prospecção química em cromatoplas e ensaios de bioautografia, a seguir estão os procedimentos abordados em cada revelador.

- **Vanilina sulfúrica:**

Foram adicionados 5 mL de ácido sulfúrico concentrado cautelosamente em 100 mL de etanol para formar a solução A. A solução B foi preparada dissolvendo 1 g de vanilina em etanol. Em seguida, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com o solvente. As soluções A e B foram misturadas em igual volume para revelar as placas cromatográficas. Observação: Revelar com aquecimento a 100 °C (WAGNER; BLADT, 1996).

- **DPPH:**

Foram dissolvidos 2,4 mg de DPPH^{*} em álcool metílico completou o balão volumétrico até 100 mL, depois de pronta, a solução transferida para um frasco âmbar (RUFINO *et al.*, 2007).

- **NP/PEG:**

Preparo da solução do NP: Foi dissolvido 1 g do difenilboriloxietilamina em 100 mL de metanol.

Preparação da solução de PEG: foram dissolvidos 5 g de polietilenoglicol em 100 mL de etanol.

Para revelação da CCD, foi aplicada primeiramente a solução de NP na placa que foi deixada secando por 5 minutos. Após seca, a solução de PEG foi aplicada (WAGNER; BLADT, 1996).

- **Anisaldeído:**

Foram misturados 5 mL de anisaldeído, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, 1 mL de ácido acético glacial e 90 mL de etanol. A revelação da CCD foi realizada com a aplicação da solução sobre a placa, que em seguida, foi aquecida a 100 °C (ARAÚJO, 2019).

- **Sulfato cérico:**

Foram dissolvidos 2 g de sulfato cérico em 55 mL de ácido sulfúrico concentrado imerso em um banho de gelo, em seguida completou com 1000 mL de água destilada em um balão volumétrico de 1 L (GUIMARÃES, 2005).

5.3. Coleta e tratamento do material vegetal e obtenção dos extratos

A coleta das cascas de *Sextonia rubra* foi realizada na empresa Mil Madeiras Preciosas Ltda. A sede da empresa Mil Madeiras localiza-se no município de Itacoatiara-AM, km 01 da rodovia AM-363 (Silves-Itapiranga), a qual se tem acesso a partir do km 227 da rodovia AM-010 (Manaus-Itacoatiara). A empresa atualmente conta com uma área total de 506.698,60 hectares e as fazendas onde se concentram as atividades em regime de Manejo Florestal certificado pelo FSC, somam uma área de 202.104,76 hectares entre os municípios de Itacoatiara, Silves e Itapiranga (FREITAS, 2017).

Foi realizada uma raspagem na superfície das cascas com lâmina de corte para a retirada de impurezas, em seguida, utilizou a estufa a 40°C para a secagem do material, após três dias ocorreu a trituração das cascas no moinho de facas (Solab). Foram pesados 1578 g do material vegetal em pó e submetidos a extração sob refluxo por cinco dias seguidos com solução de etanol 70 %, aquecido por manta aquecedora (Quims) a 60 °C e o solvente foi condensado com circulador de água gelada (Huber) a 10 °C.

Após a extração, a solução hidroetanólica foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo (Fisatom). O volume do extrato concentrado foi dividido igualmente e armazenado em frascos âmbar com 820 mL cada. Um dos volumes dividido do extrato foi seco em cápsulas de porcelana no banho-maria (Solab) e o outro fora fracionado em funil de partição. Na porção fracionada, foram usados os solventes: hexano (C₆H₁₄), clorofórmio (HCCl₃), acetato de etila (C₄H₈O₂) e n-butanol (C₄H₁₀O), respectivamente, na ordem crescente de polaridade. Após a secagem, os extratos foram transferidos para seus respectivos frascos, seus rendimentos foram determinados. Eles foram identificados como LLG (extrato bruto), LLG01 (hexano) LLG02 (clorofórmio), LLG03 (acetato de etila), LLG04 (n-butanol) e LLG05 (resíduo hidroalcoólico).

5.4. Espectrometria de Massas

As análises dos extratos, frações e substâncias isoladas foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) na Central Analítica-UFAM. Utilizou o espectrômetro de massas LQC Fleet (*Thermo Scientific*®), com a fonte de ionização ESI (Eletronspray Ionization), programada nos modos de ionização positivo e negativo.

As amostras foram diluídas até a concentração de 10 ppm em metanol grau HPLC, e foram injetadas diretamente no *looping* do aparelho com uma seringa. Os espectros foram processados no programa Xcalibur 2.0.7 para observação dos perfis das frações e das fragmentações dos íons.

5.5. Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais (RMN 1D/2D) das substâncias isoladas foram registradas pelo aparelho Bruker Avance III 500 operando a 11,75 Tesla (500 MHz para RMN de ^1H e 125 MHz para RMN de ^{13}C). As amostras foram solubilizadas em metanol deuterado (CD_3OD). Os espectros foram interpretados e extraídos pelo software Topspin.

5.6. Testes indicativos de classes químicas nos extratos

Os extratos foram avaliados por ensaios em tubos, verificando as mudanças de cores causadas por reações químicas nas soluções das amostras seguindo a metodologia de MATOS (2009).

5.6.1. Caracterização de fenólicos

Testes realizados com as amostras de LLG, LLG03, LLG04 e LLG05, seguindo quatro etapas:

- Preparo da solução estoque:

Foram pesados 300 mg do extrato bruto e extraídos com clorofórmio para retirar as graxas. O que ficou na amostra foi extraído com solução de metanol 70 % e depois o extrato hidrometanólico foi filtrado para um balão volumétrico de 100 mL e avolumado com metanol. O pH da solução foi ajustado para pH 4 com ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol/L.

Para o preparo das soluções estoque dos extratos LLG03, LLG04 e LLG05 foram pesados 30 mg e seguidos os mesmos procedimentos, exceto a extração com HCCl_3 . Todos os ensaios de caracterização de fenólicos foram realizados a partir destas soluções padrão e feitos em triplicata resultando em reações em 60 tubos de ensaios.

- Teste para fenóis e taninos

Foram adicionados 3 mL das soluções nos seus tubos 1 correspondentes, neles adicionou três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl_3). A alteração da cor após reação foi comparada com o controle de cada amostra.

- Teste para antocianidinas, antocianinas e flavonoides

Aos tubos 2, 3 e 4 de cada amostra foram adicionados 3 mL da solução estoque. Ajustou-se o pH do tubo 2 para pH 3 com HCl e nos tubos 3 e 4 foi adicionado NaOH 0,1 mol/L para basificar as soluções até pH 8 e pH 11, respectivamente. Após uns minutos houve alteração de cores nas soluções e comparação com seus controles.

- Teste para leucocianidinas, catequinas e flavanonas

Nos tubos 5 e 6 das amostras mais 3 mL foram pipetados e o pH de cada solução ajustado, o tubo nº 5 foi acidificado com HCl para pH 3 e o de nº 6 basificado com NaOH até chegar ao pH 11. Os tubos foram aquecidos com bico de Bunsen por 2 min, depois as colorações foram observadas e comparadas com as do controle.

5.6.2. Caracterização de saponinas

Pesou 300 mg de LLG e 30 mg de LLG03, LLG04 e LLG05, sendo diluídas em água destilada e posteriormente filtradas. Os tubos foram agitados separadamente por três minutos e foram observados quanto à formação de espuma.

- Teste Confirmatório para saponinas

Adicionou HCl 0,1 mol/L ao conteúdo dos tubos preparados no teste anterior e deixou imersos por 1 h em banho-maria. Após a retirada dos tubos, esperou o resfriamento, e neutralizou com NaOH 0,1 mol/L depois agitou por

3 min, posteriormente foi observado a ausência ou presença de espuma e precipitados.

5.6.3. Caracterização de terpenos

Foram pesados 300 mg de LLG e 30 mg de LLG01, LLG02, LLG03, LLG04 e LLG05 e solubilizadas com clorofórmio, que foram filtradas e transferidas para tubos de ensaio. Em seguida, foram adicionadas em cada tubo gotas de anidrido acético, solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,1 mol/L, em seguida, os tubos foram de agitados. Foram observadas as mudanças de cor e precipitação.

5.6.4. Caracterização de alcaloides

Foram pesados 500 mg de extrato bruto e 300 mg dos extratos butanólica e hidroalcolica, em seguida foram realizadas extrações com $HCCl_3$ e filtradas. A porção insolúvel no solvente clorado foi homogeneizada com água acidificada e filtrada.

As soluções filtradas foram basificadas com NH_4OH a 0,1 mol/L até atingir o pH 11. Em seguida, realizou uma extração com $HCCl_3$, coletando a fase orgânica e transferindo para outro tubo de ensaio. Novamente acidificou a solução para pH 4 com HCl e em seguida basificou o meio para pH 11 com adição de NH_4OH .

Realizou uma segunda extração com clorofórmio coletando a fase orgânica e transferindo para o tubo de ensaio contendo a solução da primeira extração, com o término das extrações acrescentou gotas de HCl, formando duas fases, sendo retirada a fase aquosa (superior) e transferindo-a para outro tubo de ensaio, posteriormente adicionou gotas do reagente de Dragendorff e foram observados quanto a formação de precipitados, segundo metodologia de (SIMÕES, 2017).

5.7. Prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada

5.7.1. Teste de sistemas de eluentes

Foram preparadas soluções de 2 mg/mL dos extratos LLG, LLG03, LLG04 e LLG05. As placas foram lavadas com metanol e ativadas na estufa a 80°C. Aplicou em spot 5 µL de cada solução nas placas. As eluições foram feitas em cubas de vidro com a fase orgânica dos cinco sistemas de eluentes testados, os quais variaram as proporções dos solventes: Acetato de etila (AcOEt), ácido acético (Ác. Acético), ácido fórmico (Ác. fórmico), metanol (MeOH) e água (H₂O) listados na **tabela 5**. O revelador usado para esse teste foi a vanilina sulfúrica.

TABELA 4. Sistemas de eluentes testados nos extratos LLG, LLG03, LLG04 e LLG05 de *S. rubra*.

Sistema	Solventes	Proporção
A	(AcetoEt: Ác. Acético: Ác. Fórmico: Água)	(100:11:11:26)
B	(Clorofórmio: Ác. Acético: MeOH: Água)	(60:32:12:8)
C	(AcetoEt: Ác. Acético: MeOH: Água)	(70:10:20:10)
D	(AcetoEt: Ác. Acético: MeOH: Água)	(6:1:3:1)
E	(AcetoEt: Ác. Acético: MeOH: Água)	(5:1:4:1)

5.7.2. Teste de reveladores para indicação das classes químicas dos extratos

Foram separadas quatro cromatoplacas, as quais foram eluídas com metanol e ativadas numa estufa a 65°C por 30 min. Com a placas ativadas, tomou-se as soluções de 2 mg/mL de LLG, LLG03, LLG04 e LLG05 para análise de reação com os reveladores químicos. A aplicação das amostras foi em spot e o sistema de eluentes utilizado foi o B (Clorofórmio: Ác. Acético: MeOH: Água) (60:32:12:8). Na **tabela 5** estão os reveladores testados e as classes químicas indicadas (GUIMARÃES, 2005). As observações das cromatoplacas foram feitas na luz branca.

TABELA 5. Reveladores testados para verificação do perfil químico dos extratos polares de *S. rubra*. (GUIMARÃES, 2005).

Revelador	Indicação
Vanilina sulfúrica	Terpenos, derivados fenilpropanoides, fenóis
Sulfato Cérico	Terpenos e Flavonoides
Cloreto Férrico	Compostos Fenólicos
Follin	Compostos Fenólicos

5.8. Análises quantitativas de capacidade Antioxidante dos extratos

Os testes foram realizados no Laboratório Biophar situado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCA-UFAM) sob coordenação do professor Dr. Emerson Lima.

- **Teor de fenóis totais**

A quantificação de fenóis totais foi avaliada pelo método de (KIM; PARK; KIM, 2013), foram observadas as mudanças de cor das soluções e registradas suas absorvâncias para cálculos de percentagem de fenóis totais.

- **Atividade sequestrante do radical DPPH[•]**

Foi realizada segundo metodologia utilizada por (BURITS; BUCAR, 2000). Foram feitas observações de mudança da cor púrpura para o amarelo, e registradas as absorvâncias para os cálculos de percentagem de inibição.

- **Atividade de inibição do cátion radical ABTS^{•+}**

Este procedimento foi realizado baseado na metodologia de (SHANTY; MOHANAN, 2018). As reações químicas de descoloração foram observadas e as absorvâncias registradas para cálculo de percentagem de inibição de radicais ABTS^{•+}.

5.9. Teste de atividade antioxidante por bioautografia dos extratos

A bioautografia por cromatografia em camada delgada, foi o método escolhido para ser utilizado no monitoramento do perfil antioxidante do extrato e frações, pois comparado a outros métodos pode rapidamente detectar na placa as manchas com os compostos ativos das amostras. É um método simples de executar e não necessita de equipamentos especializados (GU; WU; WANG, 2009).

Foram aplicadas três quantidades diferentes dos extratos LLG, LLG03, LLG04 e LLG05: 50µg, 25µg e 12,5µg, respectivamente. As placas foram eluídas com o sistema B, os reveladores utilizados foram vanilina sulfúrica e solução de DPPH[•] observadas na luz branca e NP/PEG observado na luz UV $\lambda = 366$ nm.

A **figura 15** apresenta uma demonstração dos testes de bioautografia em placas de CCD, onde é possível observar manchas ou rastros amarelos revelados com DPPH[•] com os mesmos fatores de retenção das manchas reveladas com os demais reveladores, indicando capacidade inibidora desses radicais.

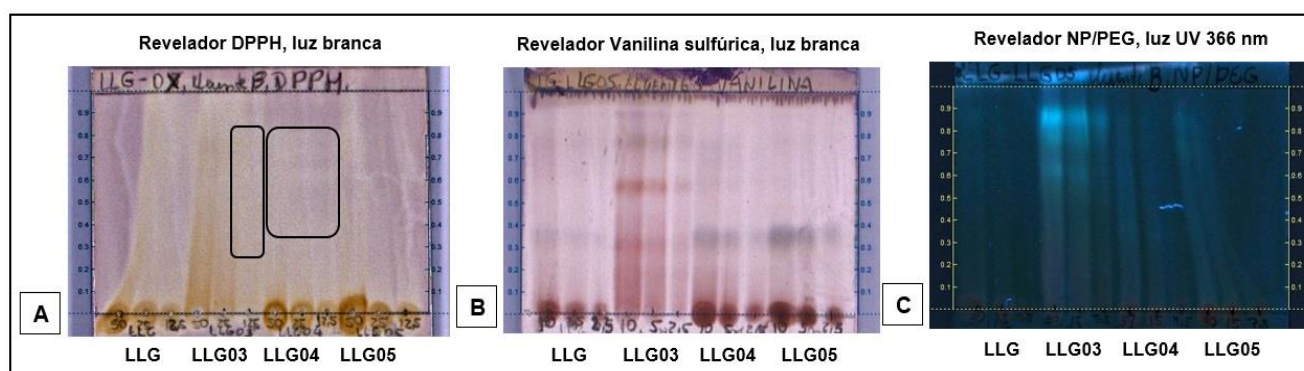


FIGURA 15. Bioautografia dos extratos LLG, LLG03, LLG04 e LLG05. Aplicações de 50 µL, 25 µL e 12,5 µL de cada extrato. Eluição com $\text{HCCl}_3 : \text{H}_3\text{CCOOH} : \text{H}_3\text{COH} : \text{H}_2\text{O}$ (60:32:12:8) (sistema B) e revelações com DPPH (A), Vanilina (B) e NP/PEG (C).

5.10. Cromatografia Contracorrente (CCC)

5.10.1. Testes de sistemas de partição com solventes orgânicos

O extrato LLG03 foi eleito para testes de sistemas de solventes, por apresentar melhor separação nas placas de CCD na análise de bioautografia e melhor potencial antioxidante.

Foram pesados 2 mg da amostra LLG03 em frascos de 10 mL. Em seguida, as amostras foram diluídas com 2 mL de misturas de solventes, contendo as fases superior e inferior. Após, as soluções foram agitadas permitindo o equilíbrio entre os sistemas, formando duas fases (**figura 16**).

As fases superiores (FS) e inferiores (FI) dos sistemas foram separadas com uma pipeta automática de 1000 μ L e transferidas para novos frascos. Aplicou-se o volume de 10 μ L de cada fase nas placas cromatográficas. Em seguida, as placas foram eluídas em cubas cromatográficas com o sistema B (Clorofórmio: Ác. Acético: MeOH: H₂O - 60:32:12:8). Foi permitida a fase móvel percorrer a altura de quatro centímetros. Após a eluição, foram retiradas, secas e reveladas com solução de vanilina sulfúrica.



FIGURA 16. Realização dos testes de sistemas de solventes em frascos. Equilíbrio do soluto entre as duas fases dos sistemas 2, 4, 14 e 16.

A **tabela 6** apresenta os sistemas de solventes avaliados para o extrato LLG03. Os sistemas que apresentaram melhor distribuição das manchas entre as fases, foram os eleitos para o fracionamento e isolamento. A **figura**

17 representa os testes de sistemas de solventes realizados com o extrato LLG03.

TABELA 6. Sistemas de partição testados em CCD do extrato LLG03.

Número	Hexano	EtOAc	Metanol	Butanol	Água
4	0	3	0	2	5
6	0	1	0	0	1
8	1	9	1	0	9
10	1	5	1	0	5
12	1	3	1	0	3
14	1	2	1	0	2
16	5	6	5	0	1
24	5	1	5	0	1

Legenda: Combinações dos solventes testados para simulação do comportamento da amostra dentro do cromatógrafo, sendo o sistema 2 o mais polar e o 25 o menos polar (SUMNER, 2011).

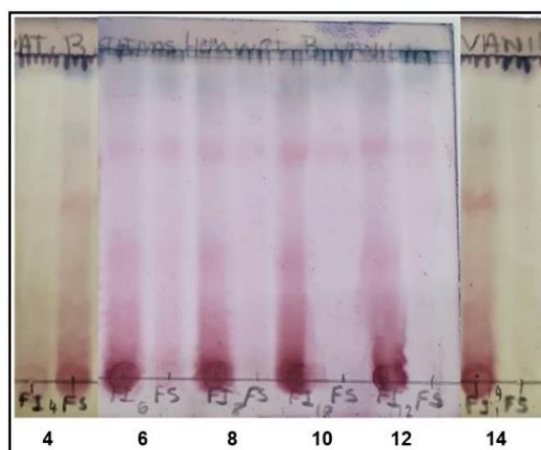


FIGURA 17. CCD realizada para os testes dos sistemas com o extrato LLG03 das cascas de *S. rubra*. Eluente: B; Revelador: vanilina sulfúrica.

5.10.2. Cromatógrafo HPCCC

O equipamento é constituído por duas bobinas com duas colunas: uma analítica com capacidade de 24 mL e outra coluna preparativa de 136 mL de volume. O HPCCC foi conectado a um shiller da marca Lab Tec modelo Smart H150-1500 mantendo a temperatura da água em 8 °C, e a uma bomba de alta pressão da marca Alpha. O fluxo pode variar de 0-10 mL/min para impulsionar as fases estacionária e móveis para dentro da coluna. A temperatura do aparelho foi controlada entre 20 °C e 25 °C. A rotação do equipamento foi ajustada para 1600 rpm. O fluxo da bomba foi de 6 mL/min para bombear as fases móveis. Para realizar o processo de extrusão da fase estacionária, a rotação foi interrompida e o fluxo alterado para 10 mL/min.



Figura 18. Cromatógrafo de contracorrente de alta performance “*High Performance Countercurrent Chromatography* (HPCCC), localizado Laboratório de Química de Produtos Naturais (ICE-UFAM). **Fonte:** Sarah Flores, 2020.

5.10.3. Fracionamento do extrato LLG03 no HPCCC

A **tabela 7** lista os sistemas e as fases escolhidos para o fracionamento no HPCCC. A fase orgânica do sistema 6 atuou como fase estacionária e as fases aquosas dos sistemas 6 e 8 como fases móveis.

TABELA 7. Sistemas utilizados na CCC de fase reversa do extrato LLG03 de *S. rubra* (SUMNER, 2011).

Sistemas	Hexano	EtoAc	MetOH	ButOH	Água
6 F.S.	0	1	0	0	1
6 F.I.	0	1	0	0	1
8 F.I.	1	9	1	0	9

Legenda: Sistemas listados de acordo com a ordem de entrada no equipamento para fracionamento. F.I.= Fase inferior (aquosa) e F.S.= Fase Superior (orgânica). **Coluna preparativa; Eluição gradiente; Modo reverso.**

- **Preparo do equipamento para CCC**

Foi realizado o preenchimento da coluna com a fase estacionária (FE) antes de cada fracionamento, com fluxo ajustado para 10 mL/min.. Anterior a cada bombeamento das fases móveis e fase estacionária, executou-se a purga da bomba com 35 mL. Em seguida, o “looping” do injetor foi lavado com 6 mL da mistura das FM (3 ml) e FE (3 mL).

- **Preparo da amostra e injeção o equipamento**

Em cada processo de partição, foram pesados 300 mg do extrato LLG03 e diluídos em 6 mL da mistura das fases FE e FM 1. A mistura foi filtrada no algodão, e somente o filtrado foi injetado no HPCCC. O resíduo insolúvel foi recuperado e codificado com AR (amostra residual) para determinar o rendimento do foi injetado na coluna.

As fases foram bombeadas no sentido cauda → cabeça da coluna (modo reverso). O tempo de retenção (T_R) estimado foi de 17 min e a percentagem retenção de fase estacionária (RFE) foi 73 %.

Durante cada processo cromatográfico, foram coletados 12 mL/tubo das frações (fluxo da bomba 6 mL/min). Durante a extrusão da FE, foram coletados 15 mL/tubo, com fluxo da bomba em 10 mL/min e sem rotação. Foram coletadas 24 frações, em seguida, as frações secas foram transferidas para determinação dos rendimentos (**Fig. 19**).

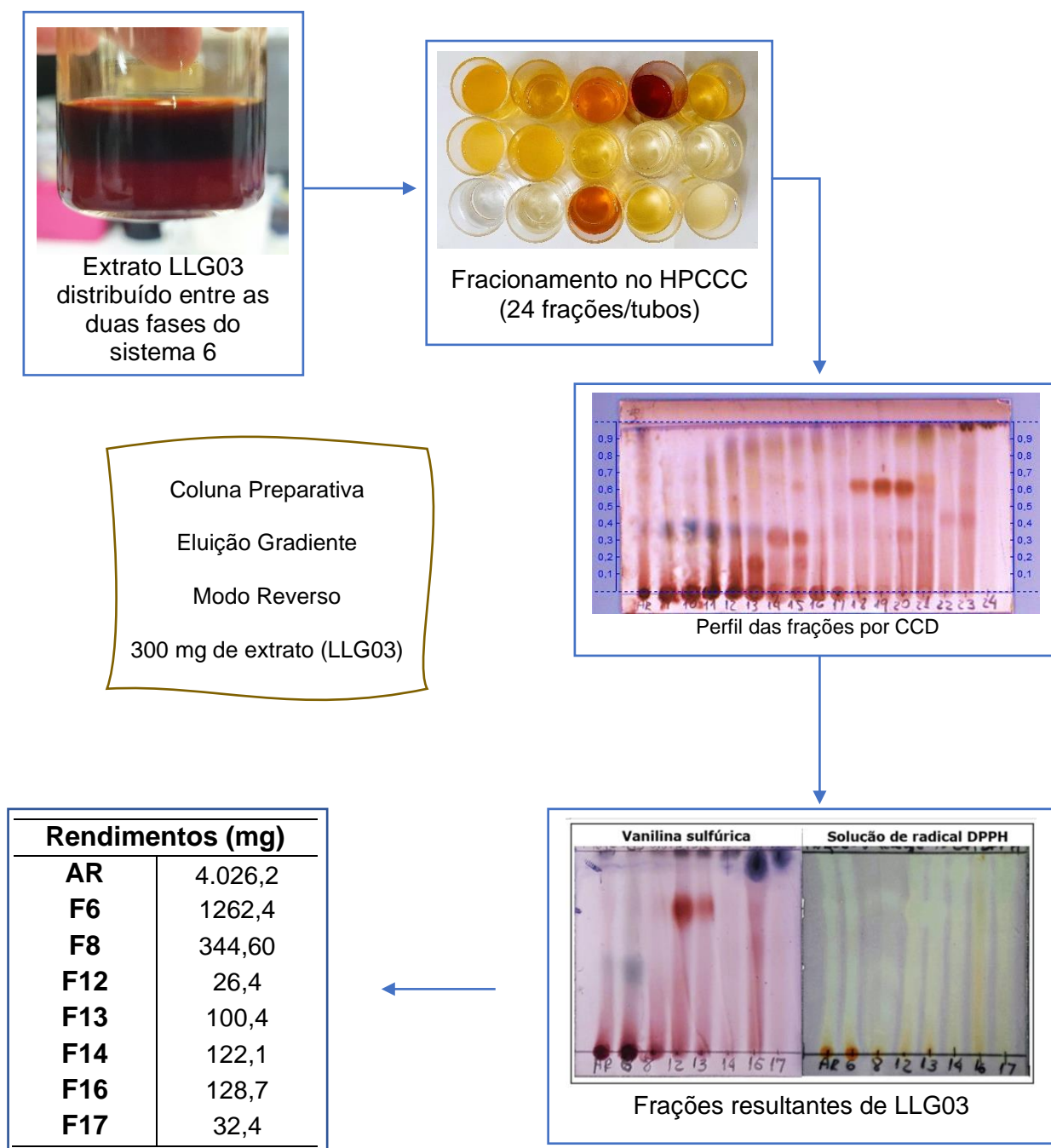


Figura 19. Frações geradas pelo HPCCCC a partir do extrato LLG03

- **Avaliação do perfil das frações e uniões**

As frações foram diluídas em metanol e aplicadas em spot nas placas cromatográficas. Todas foram eluídas com o sistema B e reveladas com solução de vanilina sulfúrica. Em seguida, as frações foram unidas de acordo com os perfis das manchas observadas. Foram realizadas vinte e duas injeções, que geraram cerca de quatrocentas frações, que foram resumidas em sete, frações. A avaliação das frações com capacidade inibitória do radical DPPH, foram eluídas duas placas na cuba cromatográficas, simultaneamente. Uma foi revelada com reveladas com vanilina sulfúrica e a segunda com solução de radical DPPH•.

O **esquema 1** apresenta um fluxograma dos processos do fracionamento do extrato LLG03 por HPCCC, bem como as avaliações dos perfis das frações e suas capacidades antioxidante qualitativas por CCD.



ESQUEMA 1. Fluxograma das etapas realizadas para os vinte e dois fracionamentos por HPCCC e rendimento das frações obtidas.

5.10.4. Testes de eluentes: Frações F12, F13, F14, F16 e F17

Foram escolhidas cinco frações para continuação da pesquisa: F12, F13, F14, F16 e F17, porque apresentaram uma ou duas manchas reveladas das placas de CCD. Para isso, foi necessário encontrar sistemas de eluentes menos polares para avaliar aquelas manchas que correram na frente da placa. Pesou 1 mg de cada fração e diluiu em 0,5 mL de MeOH. A solução de vanilina sulfúrica foi utilizada para a revelação. Os sistemas de eluentes estão descritos na **tabela 8**. A **figura 20** representa a placa cromatográfica de um dos testes de eluentes para observação da separação das manchas.

TABELA 8. Solventes combinados para eluição das placas de CCD das frações de LLG03.

Sistema	Solventes	Proporção
G1	(Hexano: Acetato de etila: Metanol: Água)	(6:4:2:2)
H	(Clorofórmio: MeOH: Água)	(8:2:0,2)
H1	(Clorofórmio: MeOH: Água)	(9:1:0,2)

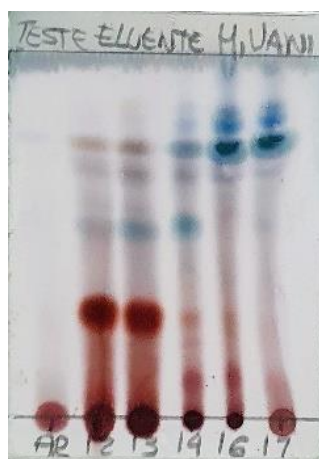


Figura 20. CCD do teste de eluentes das frações de LLG03. Sistema de eluentes: H, revelador: vanilina sulfúrica.

5.10.5. Testes de sistemas para F12, F13, F14, F16 e F17

As frações foram testadas com os sistemas de partição conforme o item **5.10.1** (página 34). Os sistemas utilizados variaram entre 2 e 20, de acordo com a **tabela 9**. A separação das manchas foi observada por CCD. As amostras foram eluídas com o sistema H e reveladas com vanilina sulfúrica. A **figura 21** apresenta as frações distribuídas nos sistemas bifásicos (**A**), e a distribuição das manchas com os sistemas 2 e 20 nas cromatoplacas.

TABELA 9. Sistemas de partição testados para as frações de LLG03 (SUMNER, 2011).

Número	Hexano	EtOAc	Metanol	Butanol	Água
2	0	1	0	4	5
4	0	3	0	2	5
6	0	1	0	0	1
8	1	9	1	0	9
10	1	5	1	0	5
12	1	3	1	0	3
14	1	2	1	0	2
16	5	6	5	0	6
18	6	5	6	0	5
20	2	1	2	0	1

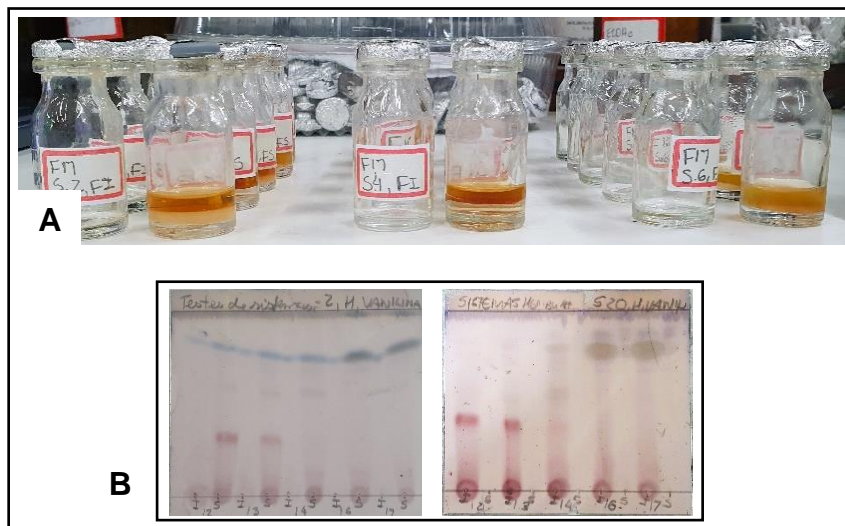


Figura 21. Testes de sistemas de solventes para o isolamento por CCC das frações de LLG03.

Após os testes de sistemas, foram unidas as frações 12 e 13, 16 e 17, resultando em três frações codificadas: F13(129,3 mg), F14 (127,2 mg) e F16 (190,5 mg).

5.11. Cromatografia contracorrente → Isolamento

O isolamento das frações 13, 14 e 16 foi realizado utilizando a coluna preparativa, eluição gradiente, bombeando as fases estacionária e móveis no modo normal (sentido cabeça → cauda).

5.11.1. Fracionamento de **F13**

Utilizou sete sistemas começando pelo sistema 14 (menos polar) e finalizando com o sistema 2 (mais polar). A fase estacionária usada foi a fase aquosa do sistema 14. Já as fases móveis foram as partes orgânicas dos sistemas 14, 12, 10, 8, 6, 4 e 2, nessa ordem. A **tabela 10** mostra as proporções dos solventes utilizados em cada sistema. O tempo de retenção calculado foi 18,59 min e a retenção de fase estacionária resultou em 82 %.

TABELA 10. Sistemas utilizados na CCC das frações 13 e 14 oriundas do extrato LLG03.

Número	Hexano	EtOAc	Metanol	Butanol	Água,
14 FI e FS	1	2	1	0	2
12 FS	1	3	1	0	3
10 FS	1	5	1	0	5
8 FS	1	9	1	0	9
6 FS	0	1	0	0	1
4 FS	0	3	0	2	5
2 FS	0	1	0	4	5

Legenda: Sistemas listados de acordo com a ordem de entrada no equipamento para fracionamento. F.I.= Fase inferior e F.S.= Fase Superior.

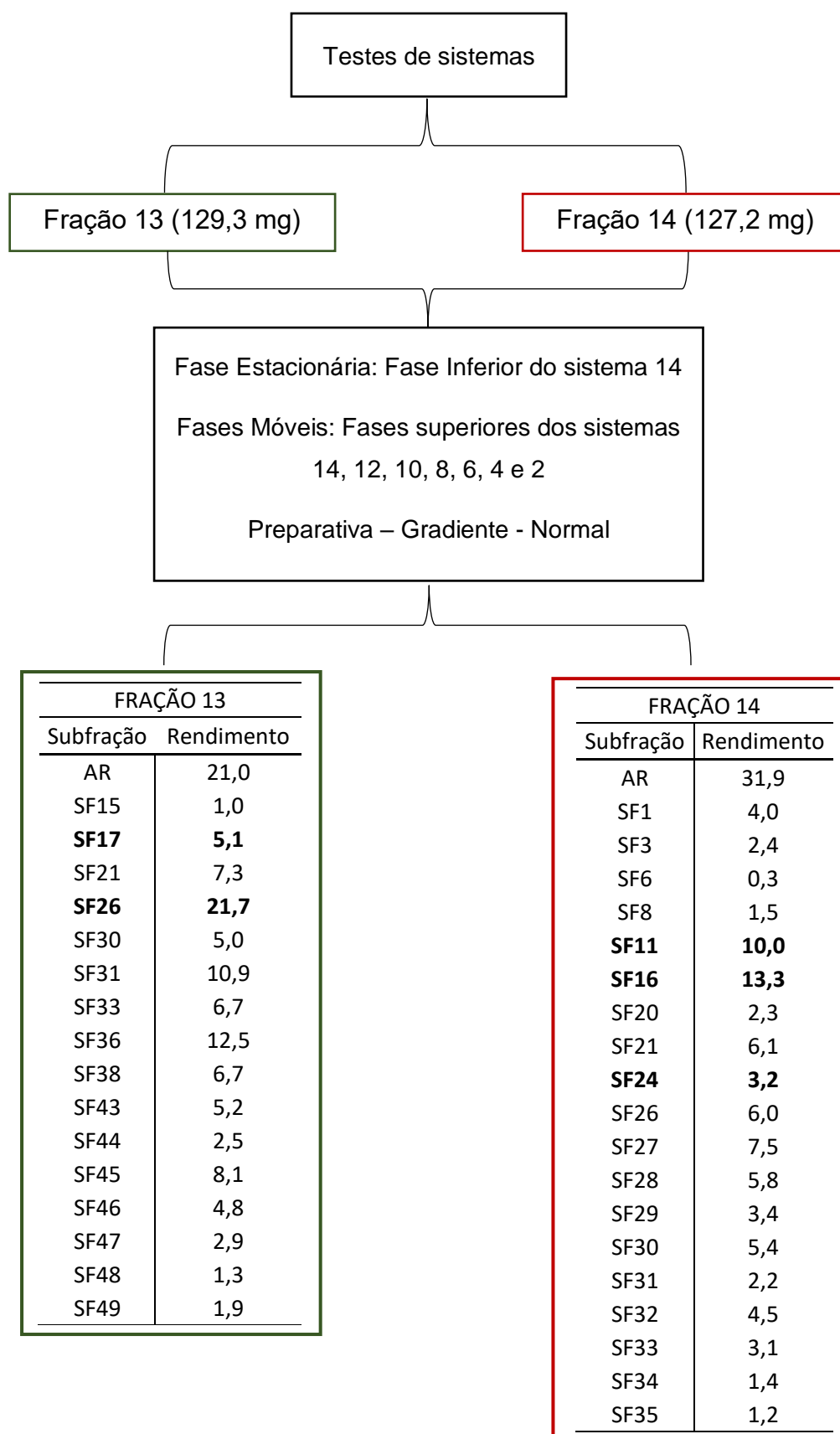
Em um frasco, diluiu 129,3 mg da amostra em 6 mL do sistema bifásico 14. A mistura foi filtrada no algodão e injetada no HPCCC. As fases móveis foram adicionadas na coluna na ordem indicada na **tabela 10**. As subfrações foram coletadas nos tubos de ensaio (12 mL/tubo) sob um fluxo de 6 mL/min. Após passagem das sete fases móveis, realizou a extrusão (fluxo: 10 mL/min) com a fase estacionária para arrastar as substâncias compatíveis com a fase aquosa, coletando 15 mL de subfração em cada tubo.

5.11.2. Fracionamento de F14

Utilizou sete sistemas começando pelo sistema 14 e finalizando com o sistema 2. A fase estacionária usada foi a fase aquosa do sistema 14. Já as fases móveis foram as partes orgânicas dos sistemas 14, 12, 10, 8, 6, 4 e 2, nessa ordem (**tabela 10**). O tempo de retenção calculado foi 18,59 min e a retenção de fase estacionária resultou em 82 %.

Diluiu 127,2 mg da amostra em 6 mL do sistema bifásico 14. A mistura foi filtrada e injetada no HPCCC. As fases móveis foram adicionadas na coluna na ordem indicada na **tabela 10**. As subfrações foram coletadas nos tubos de ensaio (12 mL/tubo) sob um fluxo de 6 mL/min. Após passagem das fases móveis, realizou a extrusão (fluxo: 10 mL/min) com a fase estacionária, coletando 15 mL de subfração em cada tubo.

O **esquema 2** apresenta um fluxograma das atividades desempenhadas para obtenção das frações de interesse, visando isolar as manchas que revelaram amarelas com a solução de radicais DPPH•. As subfrações **SF13-17** e **SF14-16** foram unidas por apresentaram o mesmo perfil na CCD. Portanto, as subfrações escolhidas foram **SF13-26**, **SF14-11**, **SF14-16** e **SF14-24** foram escolhidas para a investigação estrutural e análise de atividade antioxidante.



ESQUEMA 2. Fluxograma dos processos seguidos para o isolamento das subfrações de **F13** e **F14**.

5.11.3. Fracionamento de F16

Foram utilizados dez sistemas para a CCC. A fase estacionária foi a fase aquosa do sistema 20, e as móveis foram as fases orgânicas dos sistemas 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4 e 2, respectivamente. A **tabela 11** lista os solventes presentes em cada sistema. O tempo de retenção calculado foi 18,59 min e a retenção de fase estacionária resultou em 82 %.

TABELA 11. Sistemas utilizados para o fracionamento da F16, gerada do extrato LLG03 (SUMNER, 2011).

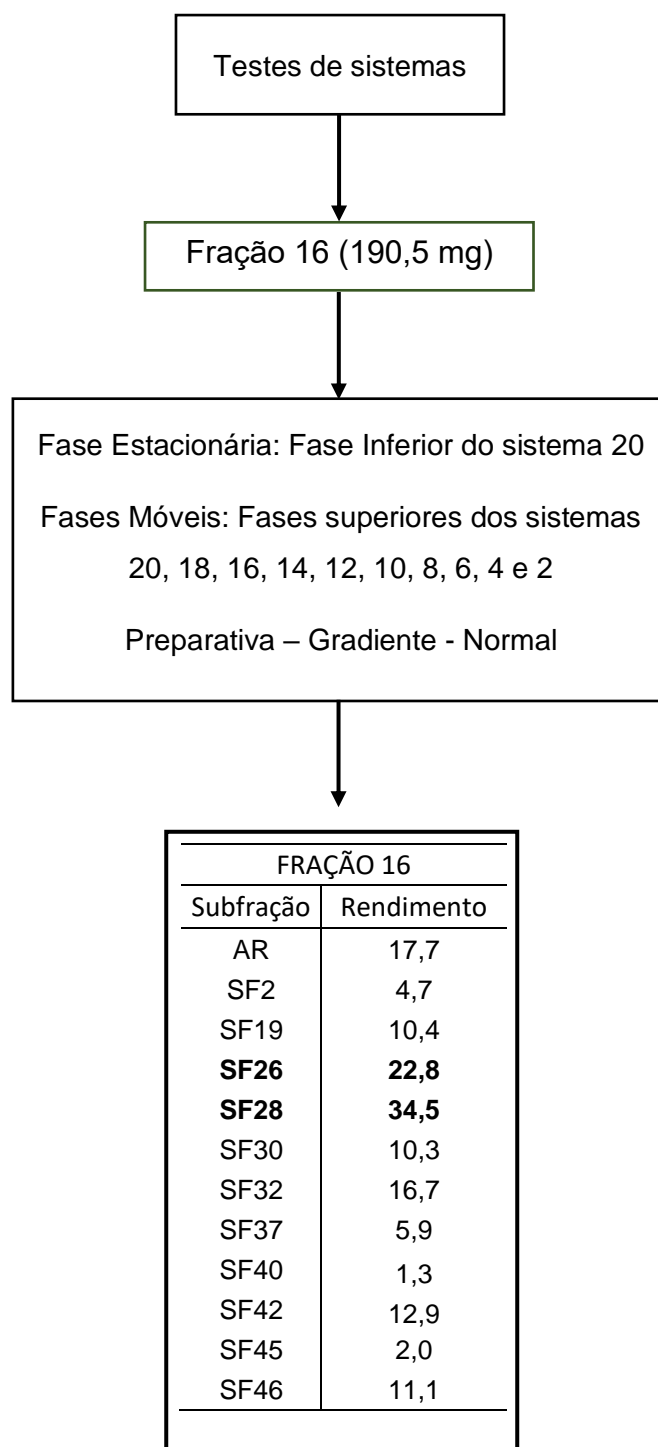
Número	Hexano	EtOAc	Metanol	Butanol	Água,
20 FI e FS	2	1	2	0	1
18 FS	6	5	6	0	5
16 FS	5	6	5	0	1
14 FS	1	2	1	0	2
12 FS	1	3	1	0	3
10 FS	1	5	1	0	5
8 FS	1	9	1	0	9
6 FS	0	1	0	0	1
4 FS	0	3	0	2	5
2 FS	0	1	0	4	5

Legenda: Sistemas listados de acordo com a ordem de entrada no equipamento para fracionamento. F.I.= Fase inferior e F.S.= Fase Superior.

Foram preparados 190,5 mg da amostra em 3 mL da FE (Sist. 20-FI) e 3 mL da FM 1 (Sist. 20-FS). Filtrou a mistura e injetou no HPCCC. As fases móveis foram bombeadas para a coluna conforme listadas na **tabela 11**. Foram coletados 12 mL de subfração em cada tubo e ao passarem as dez fases móveis pela coluna, realizou a extrusão (15mL/tubo, fluxo 10 mL/ min) com a fase estacionária. Ao finalizar, preencheu a coluna com solução de MeOH: H₂O (1:1).

As subfrações obtidas foram avaliadas por CCD e unidas de acordo com seu perfil. As manchas de interesse foram separadas para futuras

análises. O **esquema 3** apresenta as etapas realizadas para obtenção das subfrações da F16. Foram escolhidas as amostras **SF16-26** e **SF16-28** para continuação dos estudos.



ESQUEMA 3. Fluxograma dos processos de isolamento das subfrações de **F16**.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Rendimento dos extratos brutos

Foram obtidos os extratos LLG (bruto), LLG01 (hexano), LLG02 (clorofórmio), LLG (acetato de etila), LLG04 (n-butanol) e LLG05 (resíduo hidroalcoólico). O extrato apresentou-se vermelho escuro **figura 22 (A)**, as frações de hexano e clorofórmio amarelo pálido, a LLG03 vermelho intenso e as mais polares, LLG04 e LLG05 marrom escuro. Na **figura 22 (B)** estão a representação das partições com clorofórmio (esquerda, fase inferior) e com AcOEt (direita, fase superior).

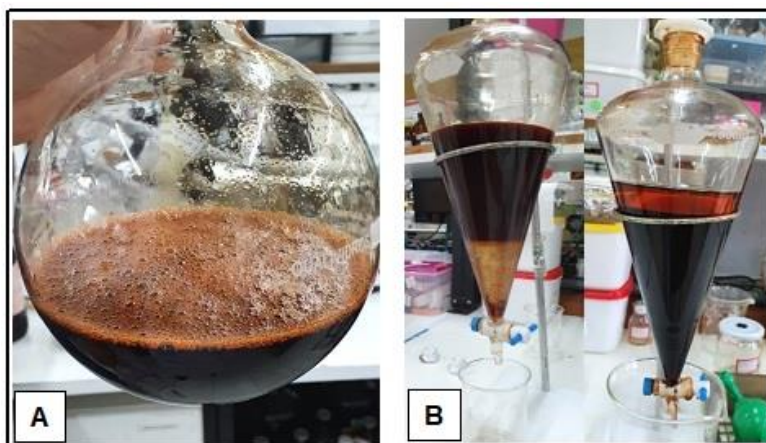


FIGURA 22. Extratos das cascas de *S. rubra*. A: extrato etanólico 70 %; B partições líquido-líquido com clorofórmio (esquerda) e com acetato de etila (direita).

Na **tabela 12** estão os resultados dos rendimentos obtidos da extração das cascas de *S. rubra*. Foram obtidos um total de 176,6 g de toda a extração, partindo de massa inicial de 1578 g de material vegetal, com rendimento de 11,19%. As frações mais polares **LLG03** (6,59%), **LLG04** (20,24%) e **LLG05** (24,13%), respectivamente, apresentaram maiores rendimentos indicando que esta espécie produz nas suas cascas metabólitos secundários polares majoritariamente.

TABELA 12. Rendimento da extração e partição.

Rendimento dos extratos		
Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)
LLG	81,9825	46,43
LLG01	0,9185	0,52
LLG02	3,6633	2,07
LLG03	11,6457	6,59
LLG04	35,7428	20,24
LLG05	42,6058	24,13
Total	176,5586	99,98

6.2. Classes indicadas nos testes de prospecção em tubos

Os testes qualitativos indicaram presença de taninos condensados, chalconas e auronas, flavanonois, triterpenoides, saponinas e alcaloides no extrato bruto. Nas frações apolares (LLG01 e LLG02) o resultado foi sugestivo para esteroides livres e negativo para triterpenoides. Já as frações de média e alta polaridade (LLG03, LLG04 e LLG05) os testes indicaram para taninos condensados, flavanonois e saponinas. Apenas a fração de acetato de etila indicou triterpenoides (**fig. 23 A**). Os alcaloides foram indicados nas frações n-butanol e resíduo hidroalcoólico (**fig. 23 B**).

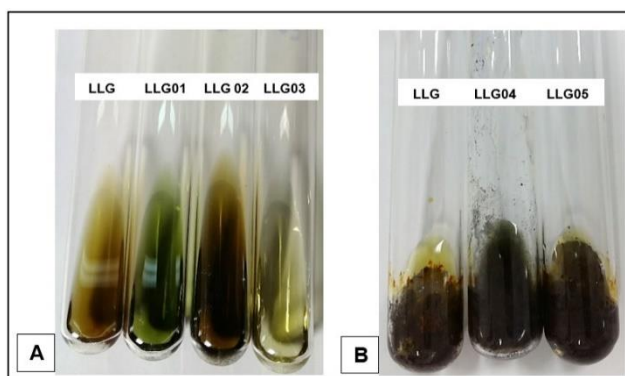


FIGURA 23. Prospecção fitoquímica em tubos confirmando presença de terpenos em LLG 03(A) e presença de alcaloides nos três extratos avaliados, LLG, LLG04 e LLG05 (B).

O extrato LLG apresentou resultado positivo para a presença de chalconas e auronas, e negativo para antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonois e xantonas, flavanonois, leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas. Já LLG03, LLG04 e LLG05 desenvolveram coloração característica para flavanonois e negativa para chalconas e auronas, antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonois e xantonas, leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas, esses resultados podem ser observados na **figura 24**.

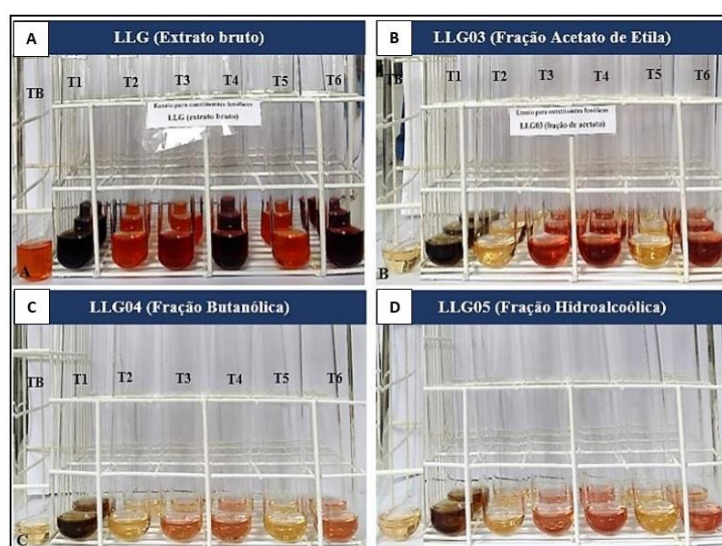


FIGURA 24. Caracterização dos constituintes fenólicos para o extrato de *S. rubra*. Os tubos foram organizados nas estantes por extrato.

Legenda: **A:** LLG, **B:** LLG03, **C:** LLG04 e **D:** LLG05. A sequência dos tubos corresponde a: **TB:** Tubo com o referencial (branco); **T1:** pH 4, **T2:** pH 3, **T3:** pH 8,5, **T4:** pH 11, **T5:** pH 3^Δ e **T6:** pH11^Δ. Δ = a amostra sofreu aquecimento.

A presença de saponinas foi observada no extrato bruto (LLG) e frações LLG03, LLG04 e LLG05 (**figura 25**), através do desenvolvimento de espuma persistente após agitação (**figura 25 A**). Após a hidrólise ácida, as saponinas presentes foram confirmadas nas amostras pela formação de precipitados e ausência de espuma ao agitar os tubos (**figura 25 B**).

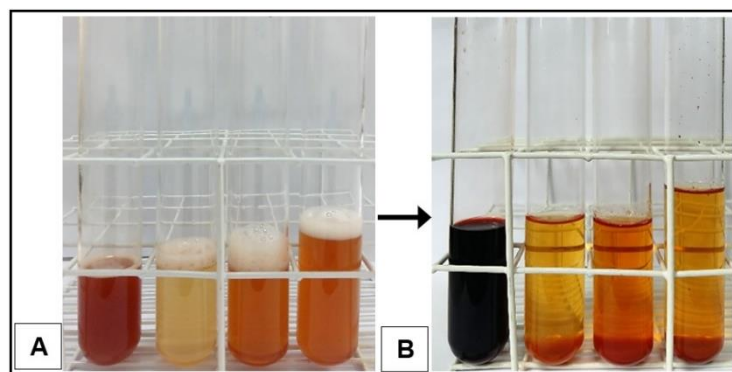


FIGURA 25. Prospecção fitoquímica para a saponinas de *Sextonia rubra* LLG. **(A):** Teste preliminar para saponinas. **(B)** Teste confirmatório observado pela reação de precipitação.

Esses resultados discordantes podem estar relacionados a cor do extrato (vermelho-pardo) que pode ter dificultado a observação. GARCEZ et al., (2016), isolou das folhas de *O. lancifolia* (Lauraceae) cumarinas, taxifolina, quercetina, eriodictiol, narigenina. Da madeira o autor descreveu o isolamento de (1,4-dihidroxipentil) -5-metoxifenol, a lignana lionireinol, 5-propilresorcinol, alfa-asarona, 3b-glicopiranosil-estigmasterol, estigmasta-4,22-dien-3-onas. Da casca do caule foi obtido o sesquiterpeno ácido lanceólico. Esses dados reforçam a possibilidade de encontrar as classes de fenólicos, flavonoides, cumarinas e lignanas.

A seguir está a **tabela 13** listando de forma resumida os resultados da prospecção em tubos do extrato e frações das cascas de *S. rubra*.

TABELA 13. Classes químicas indicadas no extrato e nas frações de *S. rubra*.

Metabólitos Secundários	LLG	LLG01	LLG02	LLG03	LLG04	LLG05
Fenois	-	ND	ND	-	-	-
Taninos condensados	+	ND	ND	+	+	+
Taninos hidrolisáveis	-	ND	ND	-	-	-
Antocianinas e antocianidinas	-	ND	ND	-	-	-
Flavonas, flavonois e xantonas	-	ND	ND	-	-	-
Chalconas e auronas	+	ND	ND	-	-	-
Flavanonois	-	ND	ND	+	+	+
Leucoantocianidinas	-	ND	ND	-	-	-
Catequinas	-	ND	ND	-	-	-
Flavanonas	-	ND	ND	-	-	-
Esteroides livres	-	+	+	-	-	-
Triterpenoides	+	-	-	+	-	-
Saponinas	+	ND	ND	+	+	+
Alcaloides	+	ND	ND	ND	+	+

Legenda: ND: não determinado.

6.3. Prospecção fitoquímica por CCD

As frações foram avaliadas por cromatografia em camada delgada (CCD) com eluentes de diferentes polaridades. Os reveladores utilizados foram importantes para evidenciarem os melhores sistemas, a partir da observação das cores, separação e definição das manchas.

O sistema de eluente que melhor separou as manchas nas placas de CCD foi o **sistema B** composto por clorofórmio (HCCl_3): Ác. acético (H_3CCOOH): Metanol (H_3COH): Água (H_2O) nas proporções (60:32:12:8) conforme tabela 3. A fração LLG03 foi a melhor fracionada apresentando cinco manchas majoritárias com o revelador vanilina sulfúrica (**figura 26 A**), sendo três vermelhas com os fatores de retenção (R_f do inglês retention factor) de 0,12, 0,35 e 0,6 e duas manchas escuras uma com $R_f = 0,8$ e outra mais acima, no limite superior. Observando a compatibilidade da amostra com a polaridade do eluente.

Conforme observado na **figura 26**, foi sugerida a presença das classes químicas terpenos e compostos fenólicos nos extratos LLG, LLG03, LLG04 e LLG05. A vanilina é um reagente utilizado para detectar os terpenos, fenóis e derivados fenilpropanoides através de manchas de matiz roxa. Indica lactonas apresentando manchas vermelhas (FIGUEIREDO *et al.*, 2007; WAGNER; BLADT, 1996),

Já o revelador sulfato cérico apresentou manchas marrons na cromatoplaça B (**figura 26 B**), as quais sugerem presença de substâncias flavonoídicas nas amostras. O sulfato cérico é empregado para investigação de substâncias de natureza terpenoídicas e flavonoídicas. A placas reveladas com cloreto férrico e Follin indicaram presença de substâncias fenólicas A **figura 26 C** apresenta uma mancha em R_f : 0,72 na fração LLG03 e **figura 26 D** mostra revelações em LLG03 (R_f s: 0,12, 0,72, 0,8 e 0,9) e LLG04 com os R_f s: 0,72, 0,8 e 0,9 com manchas claras (CHAVES, 1997; GUIMARÃES, 2005).

Comparando as placas da **figura 26** são observadas semelhança entre os fatores de retenção das manchas observadas. Sendo possível indicar a presença de compostos das classes dos terpenoides e compostos fenólicos.

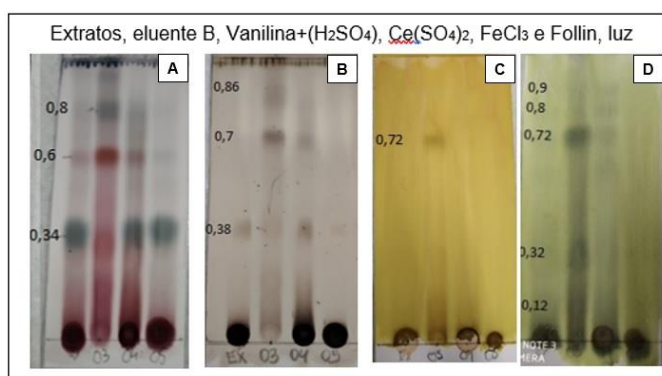


FIGURA 26. Perfil dos extratos LLG, LLG03, LLG04 e LLG05 de *S. rubra*.

Legenda: Eluídos com o sistema B HCCl_3 : H_3CCOOH : H_3COH : H_2O (60:32:12:8) e revelados com vanilina (**A**), sulfato cérico (**B**), Cloreto férrico (**C**) e Follin (**D**).

6.4. Análise de atividade antioxidante dos extratos

Na **tabela 14** estão os teores de fenóis totais e os resultados dos ensaios antioxidantes do extrato bruto e frações contra os radicais DPPH e ABTS. Os teores de fenóis totais obtidos foram maiores para os extratos LLG01 (10,37%), LLG02 (11,72 %) e LLG05 (18,82%) e os extratos LLG03 (5,31 %), LLG04 (6,32 %) e LLG (6,90%) apresentaram os menores percentuais em fenóis totais.

Em relação aos ensaios de capacidade de inibição do radical DPPH, o extrato bruto LLG (CE_{50} 10,67 $\mu\text{g/mL}$) maior capacidade antioxidante, seguido das frações LLG04 (CE_{50} 17,77 $\mu\text{g/mL}$) e LLG05 (CE_{50} 18,37 $\mu\text{g/mL}$), LLG02 (CE_{50} 19,20 $\mu\text{g/mL}$) e LL03 (CE_{50} 19,27 $\mu\text{g/mL}$) apresentando concentrações inibitórias menores que os padrões ácido gálico (CE_{50} 24,27 $\mu\text{g/mL}$) e rutina (CE_{50} 27,80 $\mu\text{g/mL}$) (SOUSA *et al.*, 2007). A fração LLG01

(CE₅₀ 97,10 µg/mL) também apresentou atividade antioxidante relevante (**Tabela 14**).

A capacidade antioxidante dos extratos contra o cátion radical ABTS está descrita na **tabela 14**. A fração mais ativa foi LLG05 com CE₅₀ de 8,00 µg/mL seguindo de LLG04 (CE₅₀ 8,25 µg/mL), LLG03 (CE₅₀ 8,90 µg/mL) e LLG (CE₅₀ 17,67 µg/mL), LLG02 (CE₅₀ 52,00 µg/mL). Os resultados das frações polares obtiveram valores próximos aos padrões ácido ascórbico com CE₅₀ 1,6 µg/mL e hidróxitolueno t-butilado (BHT) com o CE₅₀ 6,42 µg/mL (RODRIGUES *et al.*, 2019). A fração menos ativa LLG01 com CE₅₀ de 90,1 µg/mL, que também é um resultado promissor.

Comparando os dados obtidos com os teores de fenóis totais, pode-se inferir que LLG05 apresentou o maior teor de fenóis totais e que apresentou a maior capacidade de sequestrar os radicais DPPH• e ABTS•+. Relacionando a atividade antioxidante com os compostos fenólicos. No caso da fração LLG03 que apresentou o menor teor de fenóis totais, entretanto a maior capacidade de redução dos radicais, é possível relacionar sua atividade com outras classes químicas, como os terpenoides, lactonas ou flavanonois indicados nos testes de prospecção química em tubos e placas.

TABELA 14. Resultados das análises de capacidade antioxidante dos extratos de *S. rubra*.

Amostras 100µg/mL	Fenois totais		Radical DPPH		Radical ABTS	
	% fenois	µg eq Ác Gálico	% DPPH	CE ₅₀ µg/mL	%ABTS	CE ₅₀ µg/mL
LLG	6.90±0.85	41.08±5.55	67.22±1.31	10.67±0.55	99.21±0.04	17.67±2.01
LLG01	10.37±1.00	67.50±1.09	50.6±0.75	97.10±2.57	56.38±2.90	90.10±4.81
LLG02	11.72±0.5	72.53±3.27	73.78±0.98	19.20±0.36	99.37±0.39	52,00±1.47
LLG03	5.31±0.68	30.76±4.43	78.21±3.05	19.27±0.68	99.25±0.18	8.99±1.13
LLG04	6.32±0.83	37.32±5.38	72.48±2.48	17.77±0.50	99.17±0.45	8.25±0.78
LLG05	18.82±1.4	118.86±9.13	67.47±3.07	18.37±0.67	99.22±0.11	8,00±0.46

Legenda: CE₅₀= concentração eficiente para reagir com 50% dos radicais na solução

6.5. Elucidação estrutural das substâncias isoladas dos resíduos de *S. rubra*.

6.5.1. Elucidação estrutural de SF13-26

6.5.1.1. Análise de prospecção em placas

A subfração **SF13-26** apresentou característica de um sólido amorfo de cor vermelha (**Figura 27 A**), e rendeu cerca de 21,7 mg de amostra. As análises por CCD apresentaram uma mancha com fator de retenção (F_R) próximo de 0,55. A placa revelada com vanilina sulfúrica, desenvolveu uma mancha de cor vermelha. Quando revelada com cloreto férrico, apresentou mancha de cor verde-acinzentada. Segundo (DEVKOTA *et al.*, 2021; SILVA; CONCEIÇÃO, 2010), as catequinas mostram a cor vermelha quando reveladas com vanilina sulfúrica e as cores verde ou azul quando revelada com cloreto férrico. Esses resultados indicaram que a amostra **SF13-26** apresentava uma estrutura fenólica compatível com as catequinas. Após revelado com solução de DPPH•, foi observada uma mancha amarela, indicativa de capacidade inibidora de radicais DPPH• (**Figura 27 B**).

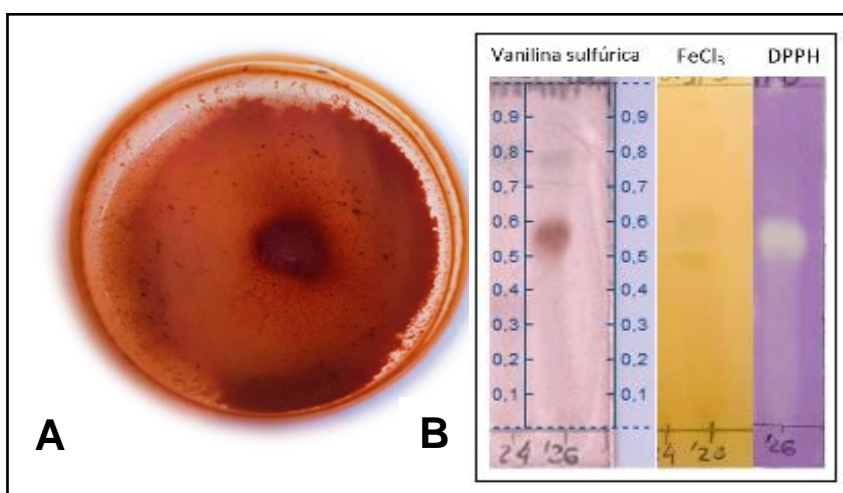


FIGURA 27. Fração SF13-26 (A) seca. Placa cromatográfica da SF13-26, eluída com sistema B e revelada com vanilina, cloreto férrico e DPPH• - da esquerda para a direita (B).

6.5.1.2. Espectrometria de massas

O espectro de massas $[M-H]^-$, indicou o íon molecular m/z 289 como pico majoritário (**figura 28 A**). Esse resultado, apontou para molécula com peso molecular de 290 Da e fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_6$. A fragmentação gerou os picos: m/z 245 ($C_{13}H_9O_5$) com abundância relativa 100 % (pico base) indicando a perda de 44 u ($-CH_2CHOH$). O fragmento m/z 205 ($C_{11}H_9O_4$; 58 %) apontou perda de 84 u ($-2CHCOH$). O pico m/z 179 ($C_9H_7O_4$; 20 %) indicou a perda de 110 u ($-C_6H_6O_2$) (**figura 28 B**).

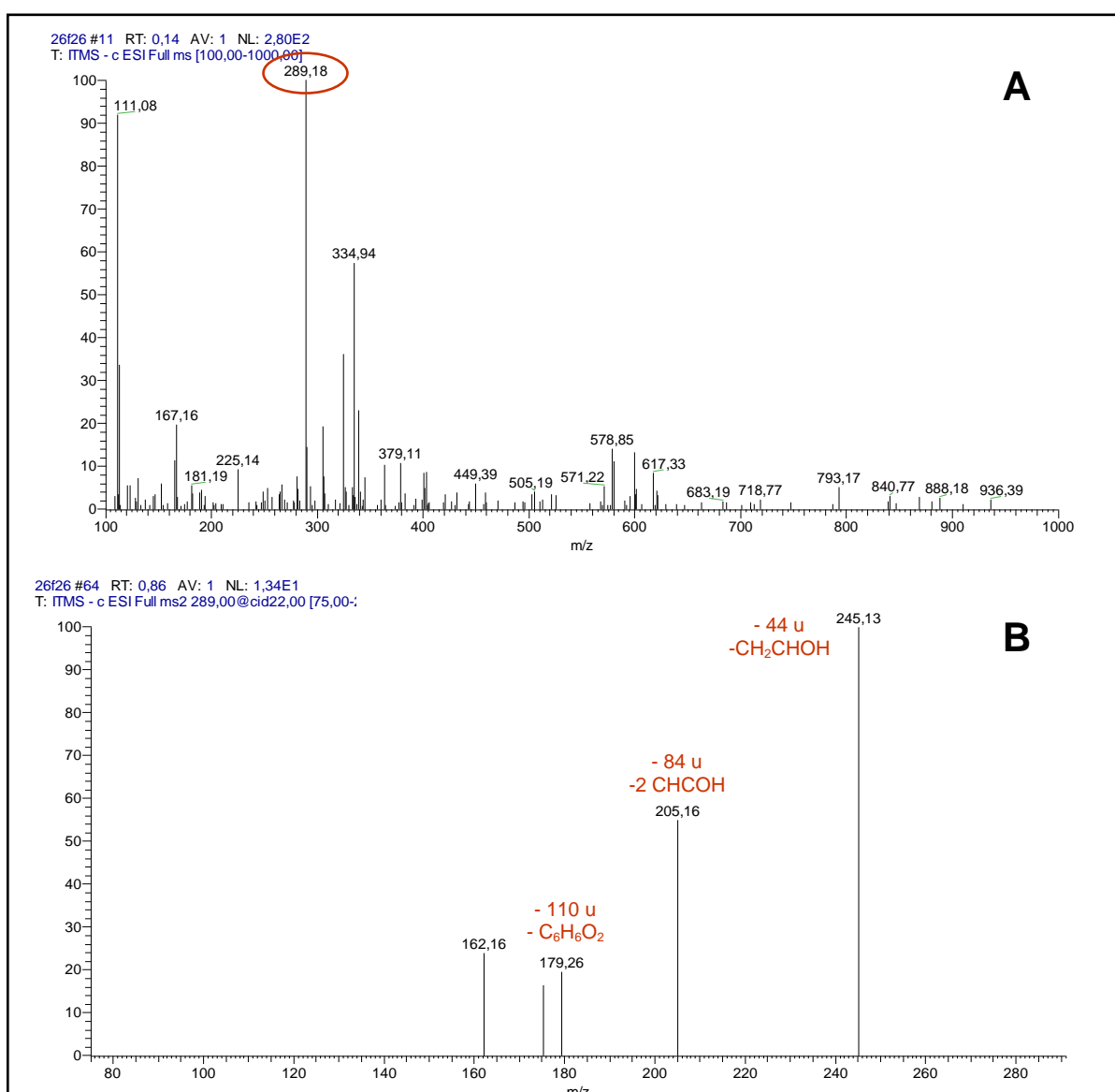


FIGURA 28. Espectro de massas (varredura-modo negativo) do perfil da SF13-26 (**A**). Espectro de fragmentação massa/massa do íon m/z 289 (**B**). Fonte utilizada: ESI.

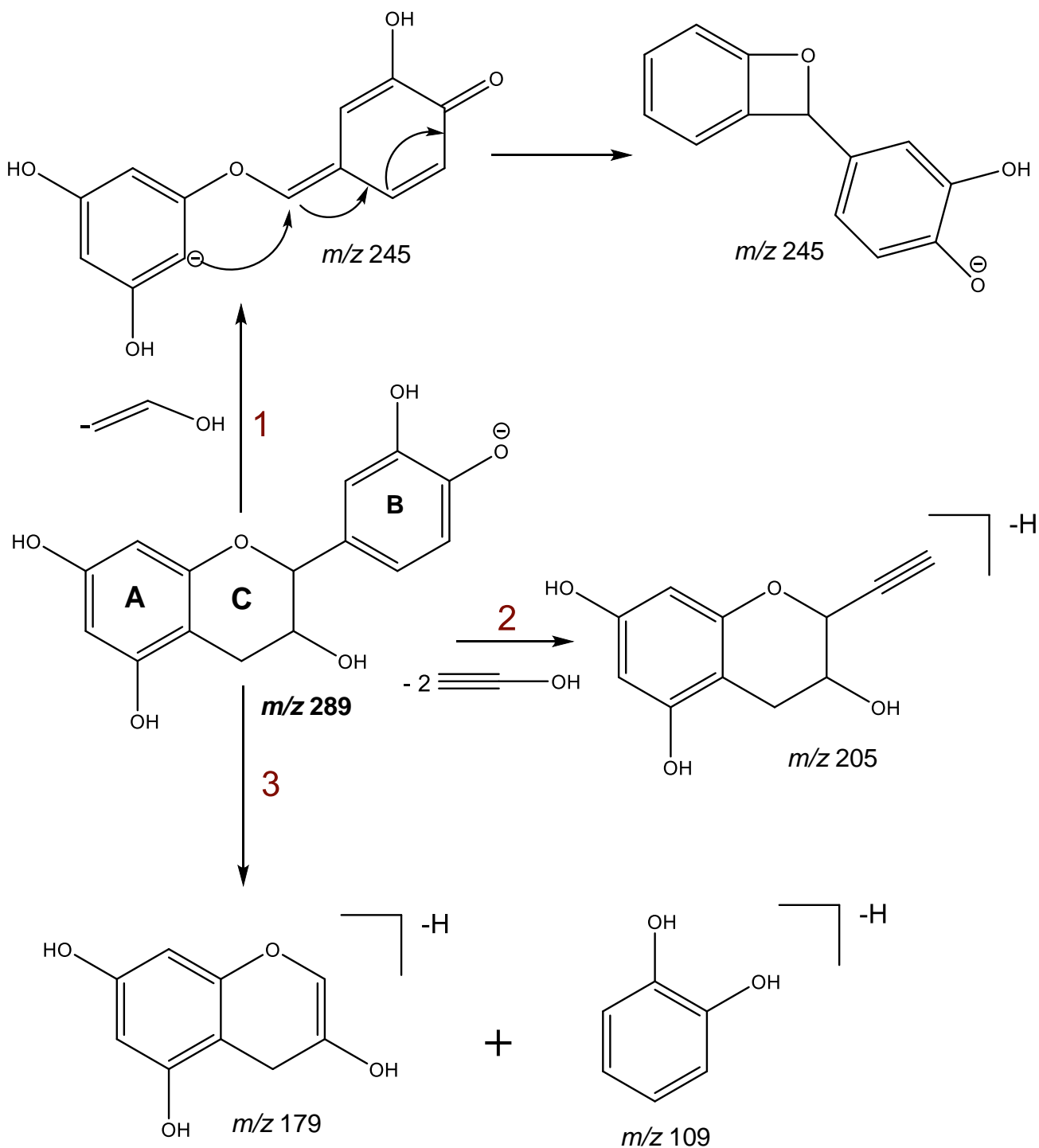
A **tabela 15** mostra a comparação entre os padrões de fragmentação observados no espectro da **SF13-26** com os dados da literatura. Foi observado um padrão de fragmentação compatível com os dados propostos por LLORENT-MARTÍNEZ *et al.*, (2017), que identificou catequinas nos gêneros *Ocotea* e *Laurus*. Esse estudo reforçou que **SF13-26** se tratava de um esqueleto de catequina.

TABELA 15. Padrão de fragmentação de **SF13-26** comparados com a literatura.

Espectrometria de massas- fragmentação (EM ²)			
LLORENT-MARTÍNEZ <i>et al.</i> , 2017		Subfração 13-26	
[M-H] ⁻ (m/z)	EM ²	[M-H] ⁻ (m/z)	EM ²
289	245 (100)	289	245 (100)
	205 (31)		205 (58)
	179 (11)		179 (20)

O **Esquema 1** demonstra a fragmentação da catequina proposta por Oliveira et al. 2018. A rota **1** simula quebra da estrutura de *m/z* 289 no anel pirona liberando CH₂CHOH, havendo um rearranjo de elétron formando um intermediário (*m/z* 245), que por sua vez sofre uma reação Diels-Alder formando um heterociclo de quatro membros.

A rota de **2** sugere a estrutura de *m/z* 205, pela perda de duas moléculas de etinol (CHCOH) ao quebrar o anel aromático B. A rota **3** propõe a formação o íon de *m/z* 179 originado da fragmentação entre os anéis C e B.



ESQUEMA 4. Proposta de fragmentações da substância presente em **SF13-26**. Adaptado de (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

6.5.1.3. Ressonância Magnética nuclear (1D e 2D)

O espectro de RMN de ^1H (**figura 29**) de **SF13-26** apresentou sinais de hidrogênios aromáticos entre δ 6,97 e δ 5,91, de hidrogênios metínicos e metilênicos próximos a carbonos carbinólicos com deslocamento químico na faixa δ 2,71- 4,81 . Os sinais observados foram compatíveis com a estrutura base do flavonoide, correspondente às características de catequina, conforme apontado nos experimentos de derivatização, e no espectro de massas.

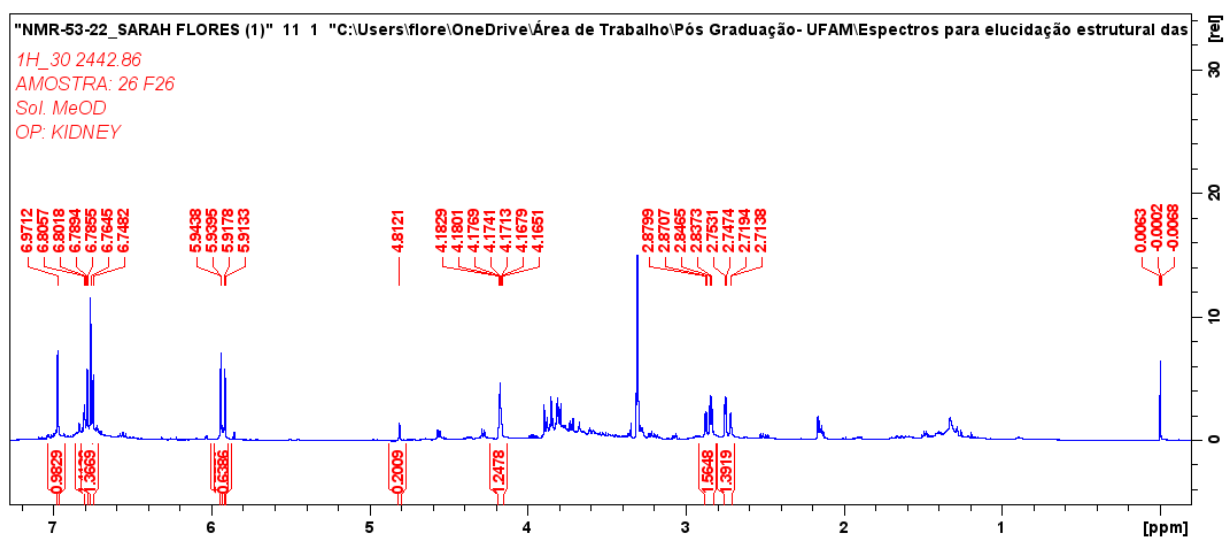


Figura 29. Espectro de RMN ^1H da subfração **SF13-26**.

A **figura 30** mostra ampliação do espectro de próton na região dos hidrogênios aromáticos presentes no anel B. Foram observados os sinais δ 6,97 (H-2', d, 1H), δ 6,79 (H-6', dd, 1H) e δ 6,75 (H-5', d, 1H) (**figura 33**) . As constantes de acoplamento, indicaram interações entre os núcleos dos hidrogênios 2' e 6' acoplando em *meta* $J = 1,9$ Hz. Também foi observado o acoplamento em *orto* entre os H-5' e H-6' com $J = 8,1$ Hz (PAVIA *et al.*, 2015).

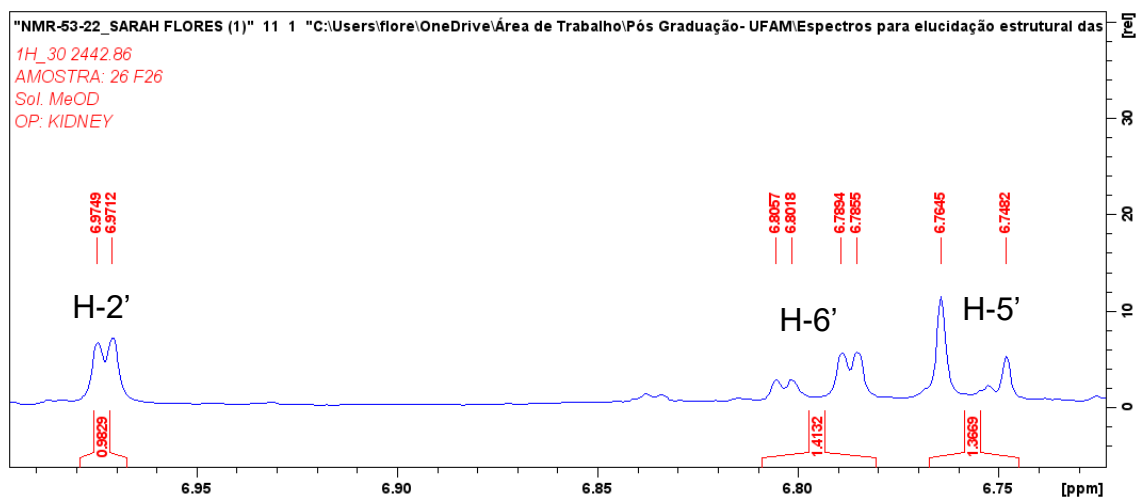


Figura 30. Ampliação do espectro de RMN ^1H da subfração SF13-26, região dos sinais dos hidrogênios ligados ao anel B .

A **figura 31** apresenta os sinais dos hidrogênios do anel A, cujos deslocamentos foram δ 5,94 (H-8, d, 1H) e δ 5,91 (H-6, d, 1H), demonstrados na **figura 33**. Ambos os sinais apresentaram $J = 2,2$ Hz, característicos de acoplamento em posição *meta* (PAVIA *et al.*, 2015).

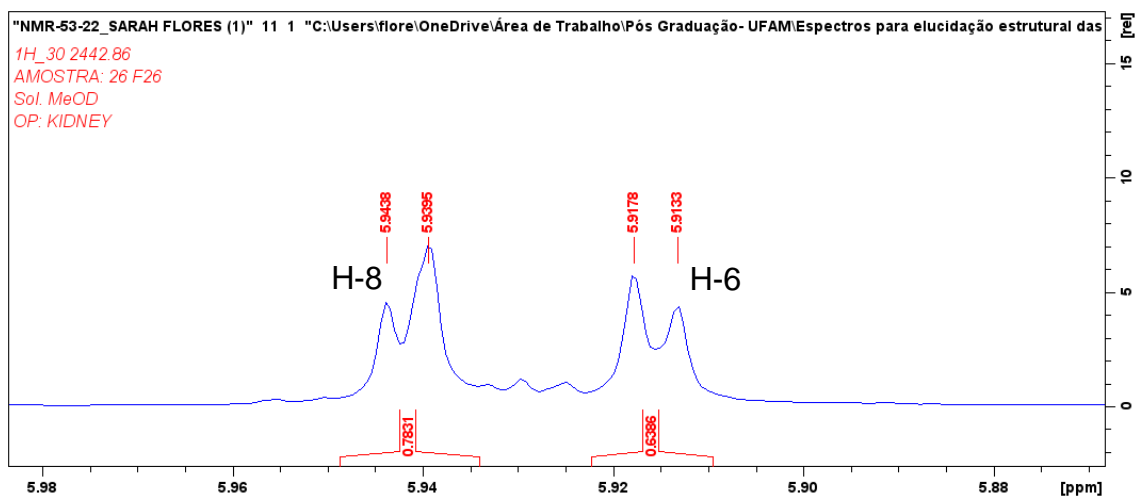


Figura 31. Ampliação do espectro de RMN ^1H da subfração SF13-26, região dos sinais de hidrogênios ligados ao anel aromático A.

A **figura 32** mostra a ampliação do espectro nas regiões dos hidrogênios metínicos e metilênicos do anel pirona (anel C, **figura 33**). Observou um simpleto em δ 4,81 (H-2, d, 1H), e um multipletto em δ 4,18 (H-3, m, 1H) (**figura 32 A**). Foram observados dois duplodupletos, referentes aos hidrogênios diasterotópicos na posição 4, sendo o alfa com δ 2,85 (H-4 α , dd, 1H) e o beta δ 2,73 (H-4 β , dd, 1H) (**Figura 32 B**).

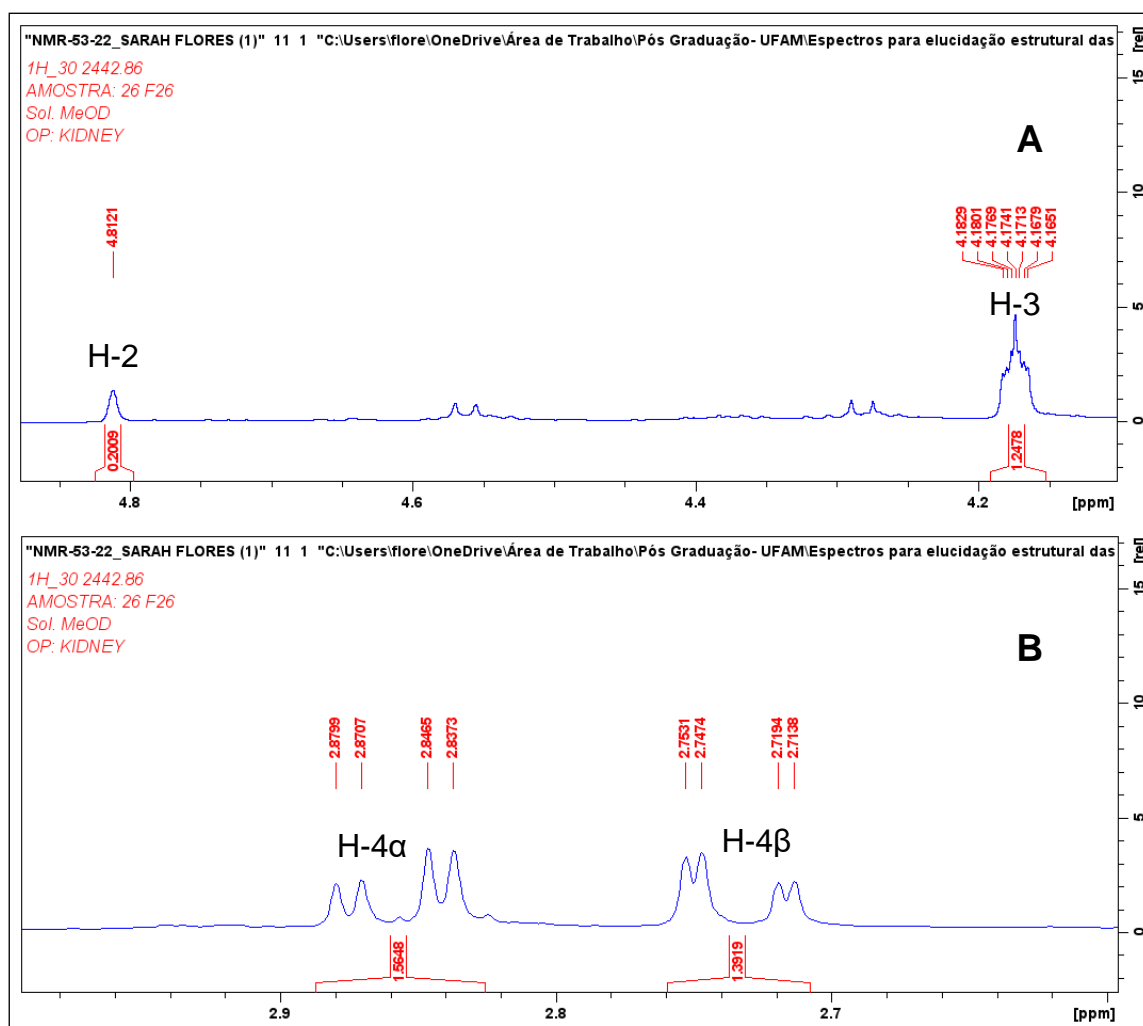


Figura 32. Ampliação do espectro de RMN ¹H da subfração SF13-26, região dos sinais dos hidrogênios ligados ao anel C da Epicatequina.

A **tabela 16** apresenta os dados analisados do espectro de RMN ^1H de **SF13-26** comparados com os dados de DEVIKOTA *et al.* (2021).

TABELA 16. Sinais de ^1H observados no espectro de **SF13-26** e comparados com a literatura (esquerda).

DEVKOTA <i>et al.</i> , 2021 ^a			SF13-26^b		
^1H (ppm)	J (Hz)	m	^1H (ppm)	J (Hz)	m
6,99	1,8	d	6,97 (H-2')	1,9	d, 1H
6,82	1,8 e 8,2	dd	6,79 (H-6')	1,9 e 8,1	dd, 1H
6,80	8,2	d	6,75 (H-5')	8,1	d, 1H
5,98		sl	5,94 (H-8)	2,2	d, 1H
5,98		sl	5,91 (H-6)	2,2	d, 1H
4,84		sl	4,81 (H-2)		s, 1H
4,21		sl	4,18 (H-3)		m, 1H
α 2,88	16,7 e 6	dd	2,85 (H-4 α)	16,6 e 4,6	dd, 1H
β 2,79	16,7 e 2,8	dd	2,73 (H-4 β)	16,6 e 2,8	dd, 1H

a: ^1H (MeOD- d_4) 600 MHz; ^{13}C (MeOD- d_4) 150 MHz; b: ^1H (MeOD- d_4) 500 MHz; ^{13}C (MeOD- d_4) 125 MHz.

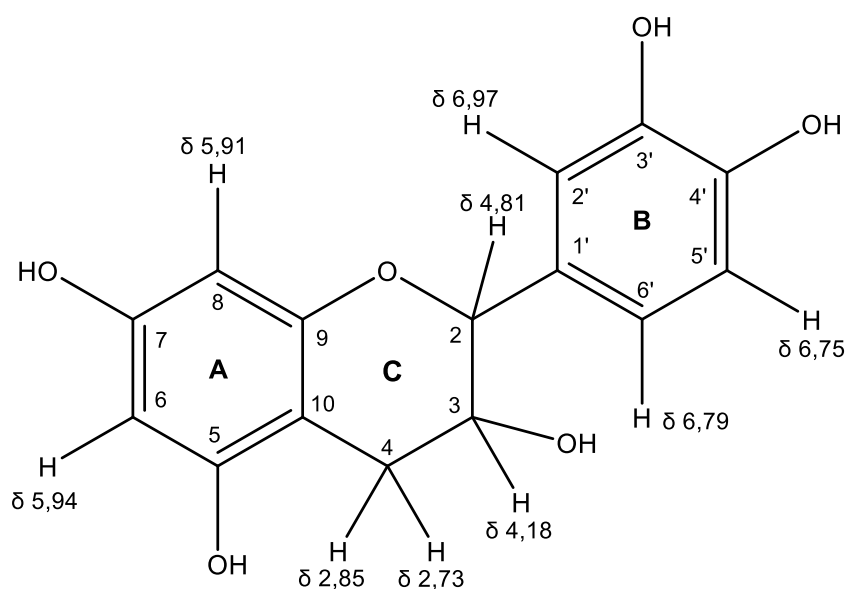


Figura 33. Estrutura proposta de **SF13-26** com os sinais de RMN ^1H .

O espectro de RMN de ^{13}C (**figura 34**) apresentou quinze sinais distribuídos entre a região dos aromáticos e dos metilênicos (δ 158,0 a δ 29,2).

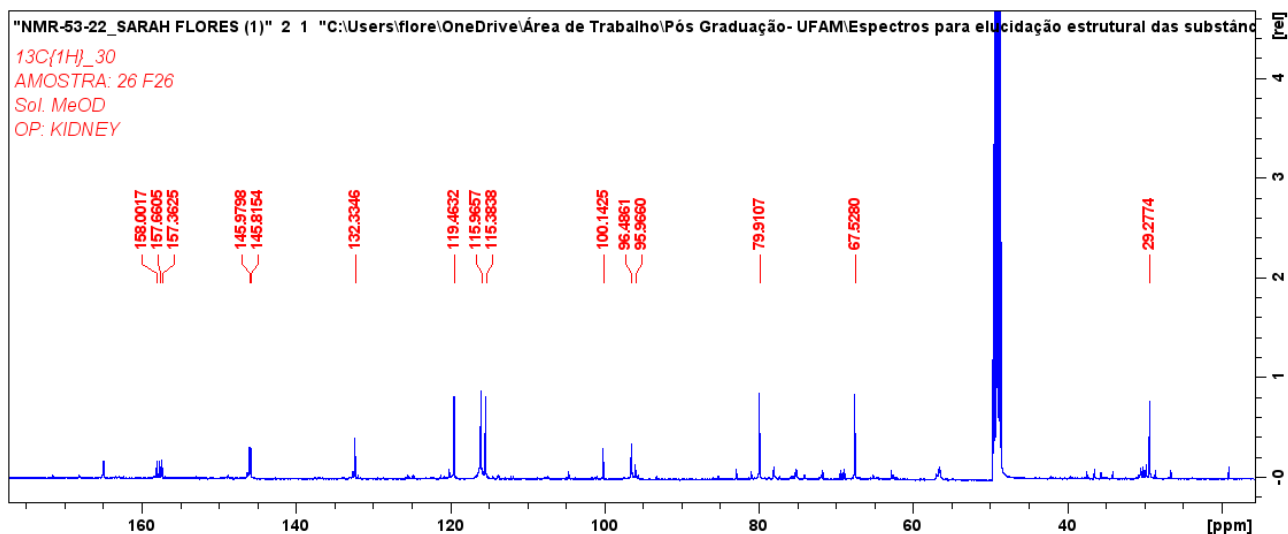


Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C da subfração SF13-26.

A **figura 35** mostra as ampliações do espectro de RMN ^{13}C da fração **SF13-26**. A **figura 35 A** mostra os sinais de carbonos quaternários C-9 (δ 157,3) e C-1' (δ 132,2) e quaternários ligados a hidroxilas: C-5 (δ 158,0), C-7 (δ 157,6), C-4' (δ 145,9) e C-3' (δ 145,8). A **figura 35 B** encontra-se um sinal de C quaternário: C-10 (δ 100,1) e sinais de grupos CH com os seguintes deslocamentos: δ 119,4 (C-6'), δ 115,9 (C-5'), δ 115,3 (C-2'), δ 96,4 (C-6) e δ 95,9 (C-8). Já na **figura 35 C**, estão os sinais dos carbonos do anel pirano: δ 79,9 (C-2), δ 67,5 (C-3) e δ 29,7 (C-4), apresentando sinais característicos de carbonos sp^3 (PAVIA *et al.*, 2015).

A análise de RMN DEPT-135 (**vermelho**) de **SF13-26** gerou oito sinais de carbono-13 (**figura 36**) e reforçou a proposta dos sinais atribuídos para os carbonos. Os sinais voltados para cima indicaram os carbonos metínicos mais desblindados da molécula, presentes nos anéis aromáticos A e B, sendo δ 119,4 (C-6'), δ 115,9 (C-5') e δ 115,3 (C-2'), δ 96,4 (C-6) e δ 95,9 (C-8). Na região central do espectro estão os grupos CH presentes no anel pirano com os deslocamentos δ 79,8 (C-2) e δ 67,5 (C-3). O sinal voltado

para baixo corresponde ao carbono metilênico δ 29,2 (C-4) (figura 37) (PAVIA *et al.*, 2015).

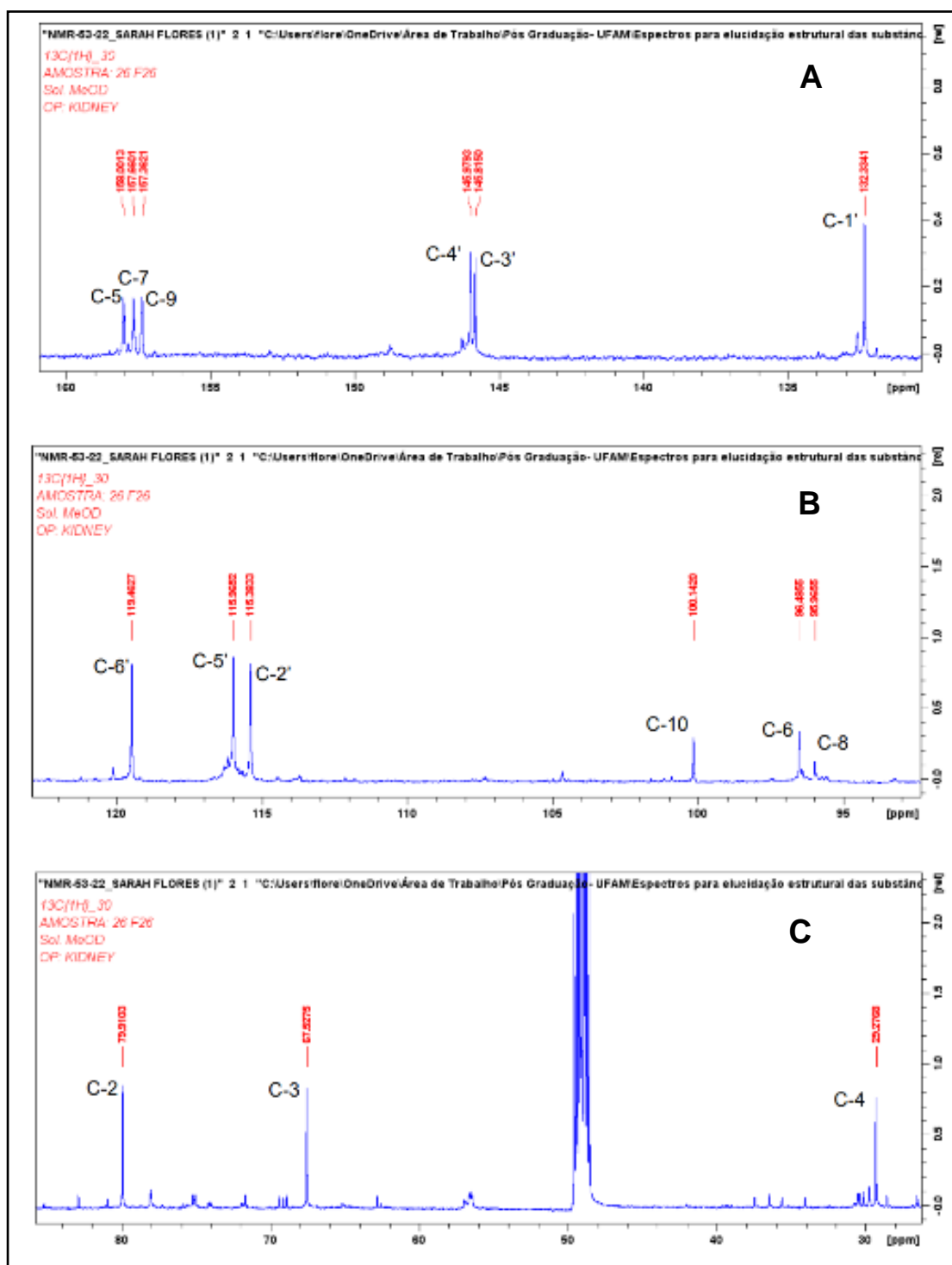


Figura 35. Ampliações do espectro de RMN **Carbono-13** da SF13-26. **(A)** Ampliação na entre δ 160 e δ 130; **(B)** Ampliação entre δ 122 e δ 93; **(C)** Ampliação na faixa de δ 82- δ 28.

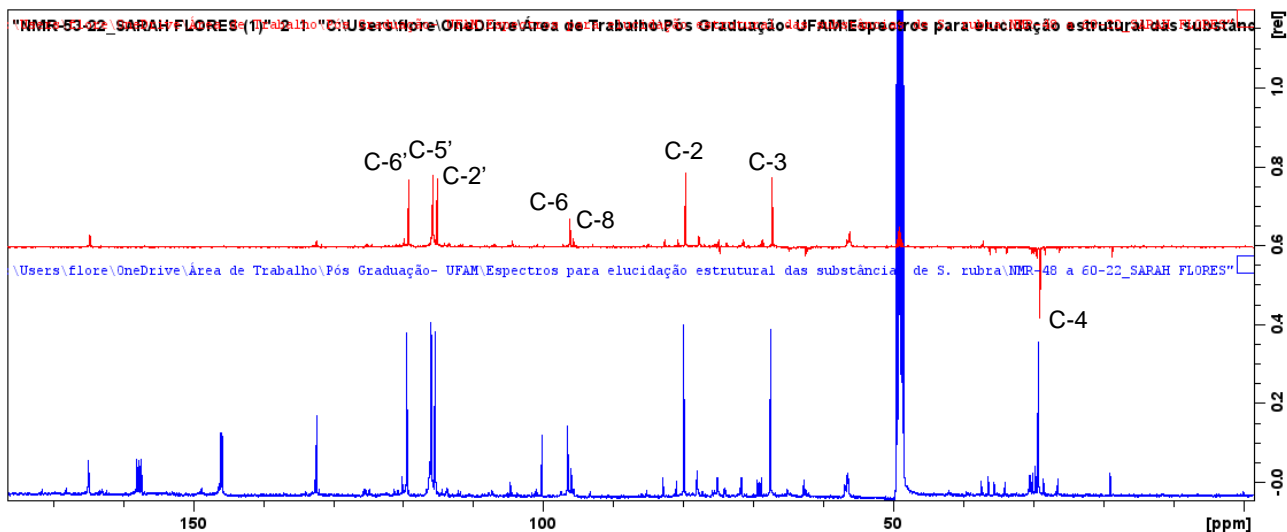


Figura 36. Espectro de RMN DEPT-135 comparado com o de Carbono-13 da subfração SF13-26.

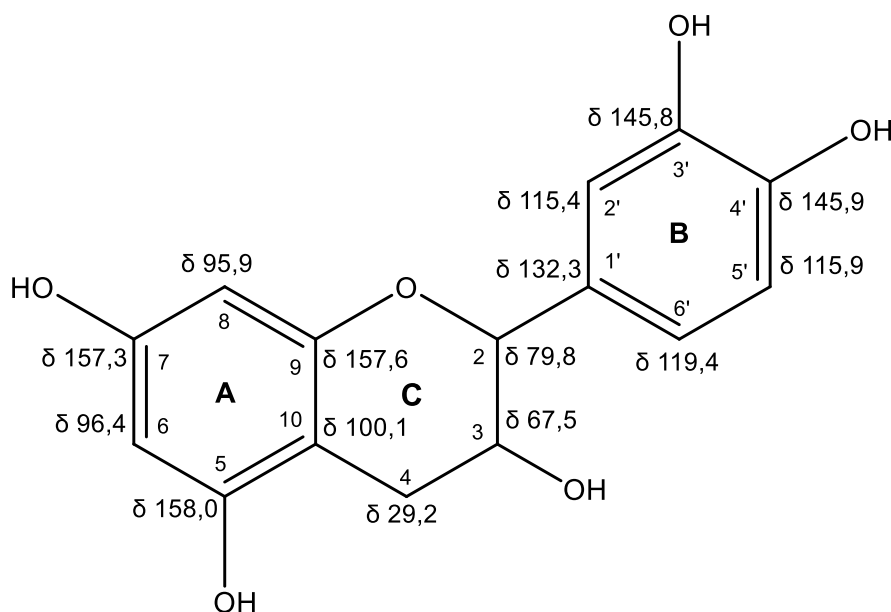


Figura 37. Estrutura proposta de SF13-26 com os sinais de RMN ^{13}C .

A tabela 17 reúne os sinais de ^{13}C observados para a estrutura molecular unidos com as informações fornecidas pela análise de DEPT-135. Tais dados foram comparados com os de (DEVKOTA *et al.*, 2021), auxiliando na atribuição dos sinais carbonos da molécula.

TABELA 17. Sinais observados nos espectros de ^{13}C e determinação da natureza do carbono por DEPT-135, com parados aos dados da literatura.

DEVKOTA et al., 2021		SF13-26	
Posição	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)	DEPT-135
C-5	158,0	158,0	C
C-7	157,6	157,6	C
C-9	157,3	157,3	C
C-4'	145,9	145,9	C
C-3'	145,7	145,8	C
C-1'	132,3	132,2	C
C-6'	119,4	119,4	CH
C-5'	115,9	115,9	CH
C-2'	115,3	115,3	CH
C-10	100,0	100,1	C
C-6	96,3	96,4	CH
C-8	95,9	95,9	CH
C-2	79,8	79,8	CH
C-3	67,5	67,5	CH
C-4	29,3	29,2	CH ₂

a: ^1H (MeOD- d_4) 600 MHz; ^{13}C (MeOD- d_4) 150 MHz; b: ^1H (MeOD- d_4) 500 MHz; ^{13}C (MeOD- d_4) 125 MHz.

A **figura 38** mostra o mapa de correlações HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) da amostra **SF13-26**. Foi possível assinalar todos os carbonos hidrogenados da molécula.

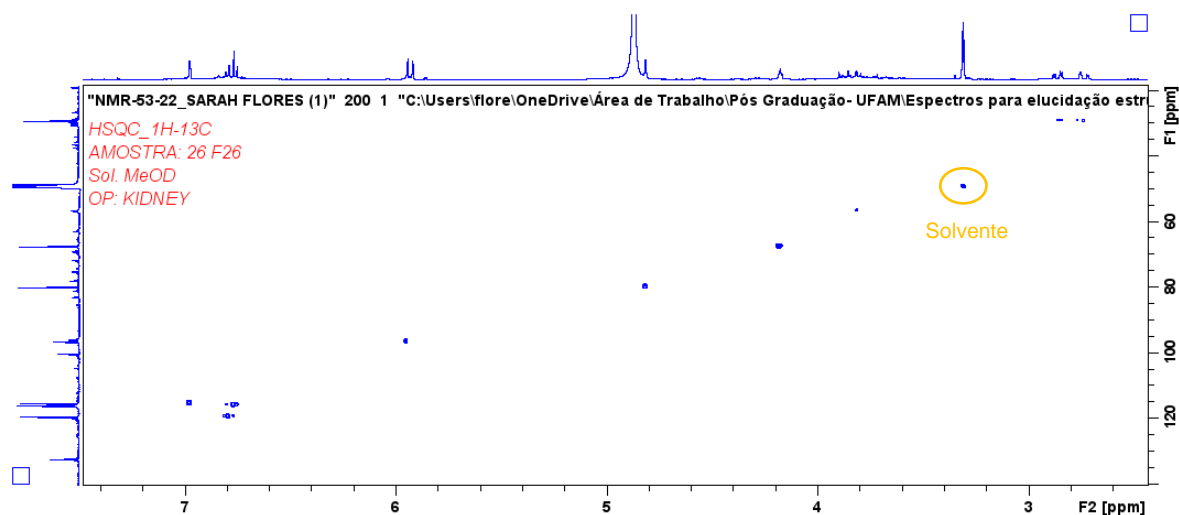


Figura 38. Mapa de correlações HSQC da subfração SF13-26.

A **figura 39** apresenta as ampliações do mapa HSQC e as correlações entre os carbonos e hidrogênios de **SF13-23**. A ampliação **(39 A)** indicou os sinais pertencentes ao anel B: δ 6,97 (H-2') ligado ao carbono C-2' (δ 115,4); δ 6,79 (H-6') ligado ao C-6' (δ 119,4), e do H-5' (δ 6,75) com o C-5' (δ 115,9). Já na ampliação **(39 B)** foram observados os sinais do anel A: δ 5,94 (H-6) correlacionado com δ 96,4 (C-8) e δ 5,91 (H-8) ligado ao δ 95,9 (C-8).

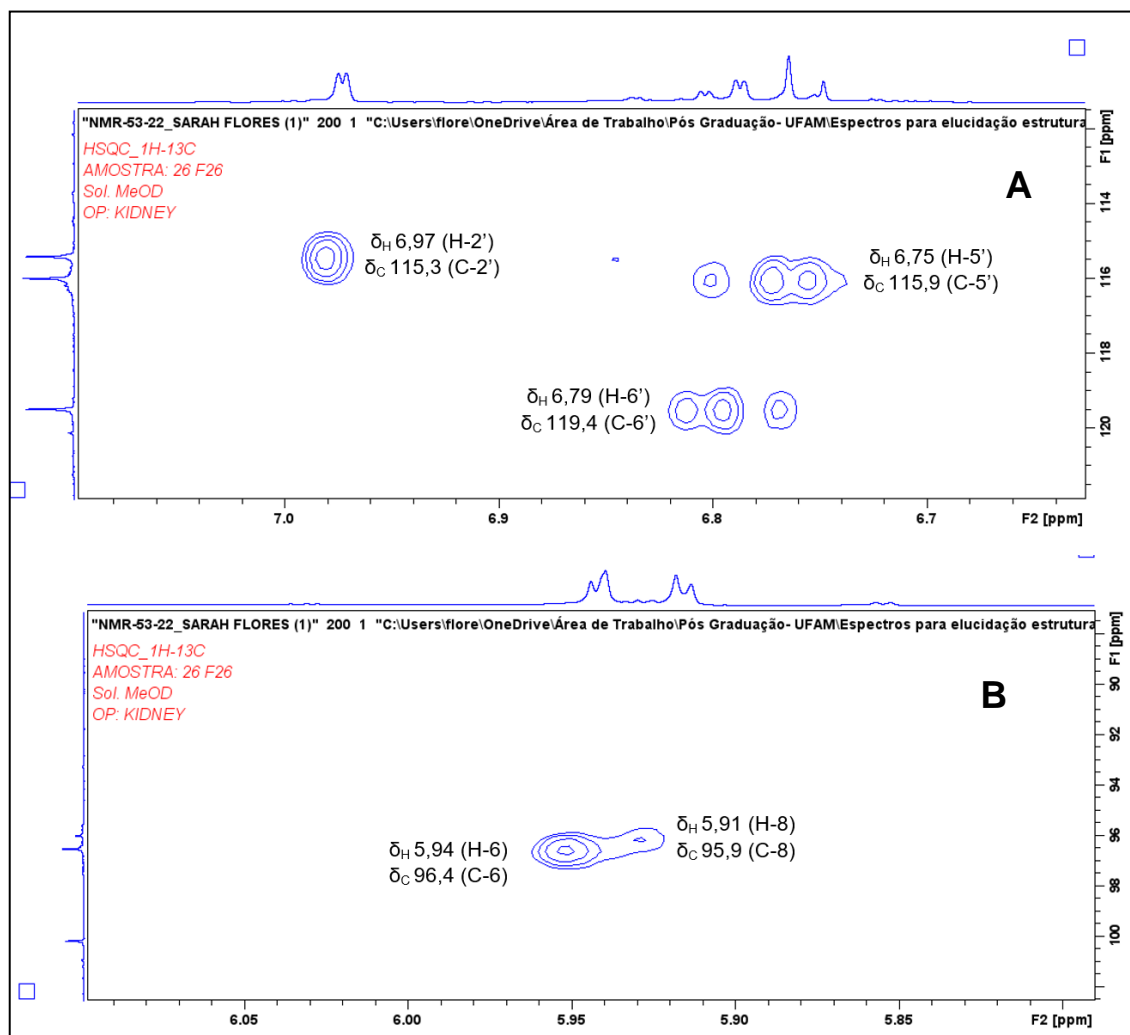


Figura 39. Ampliação do mapa de correlações HSQC na região dos sinais de ^1H e ^{13}C presentes nos anéis aromáticos A e B da subfração SF13-26.

A **figura 40** mostra as ampliações do mapa HSQC da região dos hidrogênios ligados a carbonos sp^3 do anel C da estrutura. Na **figura 40 A** estão os carbonos metínicos C-2 (δ 79,8) e C-3 (δ 67,5), ligados diretamente aos hidrogênios δ 4,81 (H-2) e δ 4,18 (H-3), respectivamente. Observando a

figura 40 B, tem-se as correlações do grupo metileno, tendo o carbono com o sinal δ 29,3 (H-4) correlacionando com os núcleos dos hidrogênios diastereotópicos δ 2,85 (H-4 α) e δ 2,73 (C-4 β).

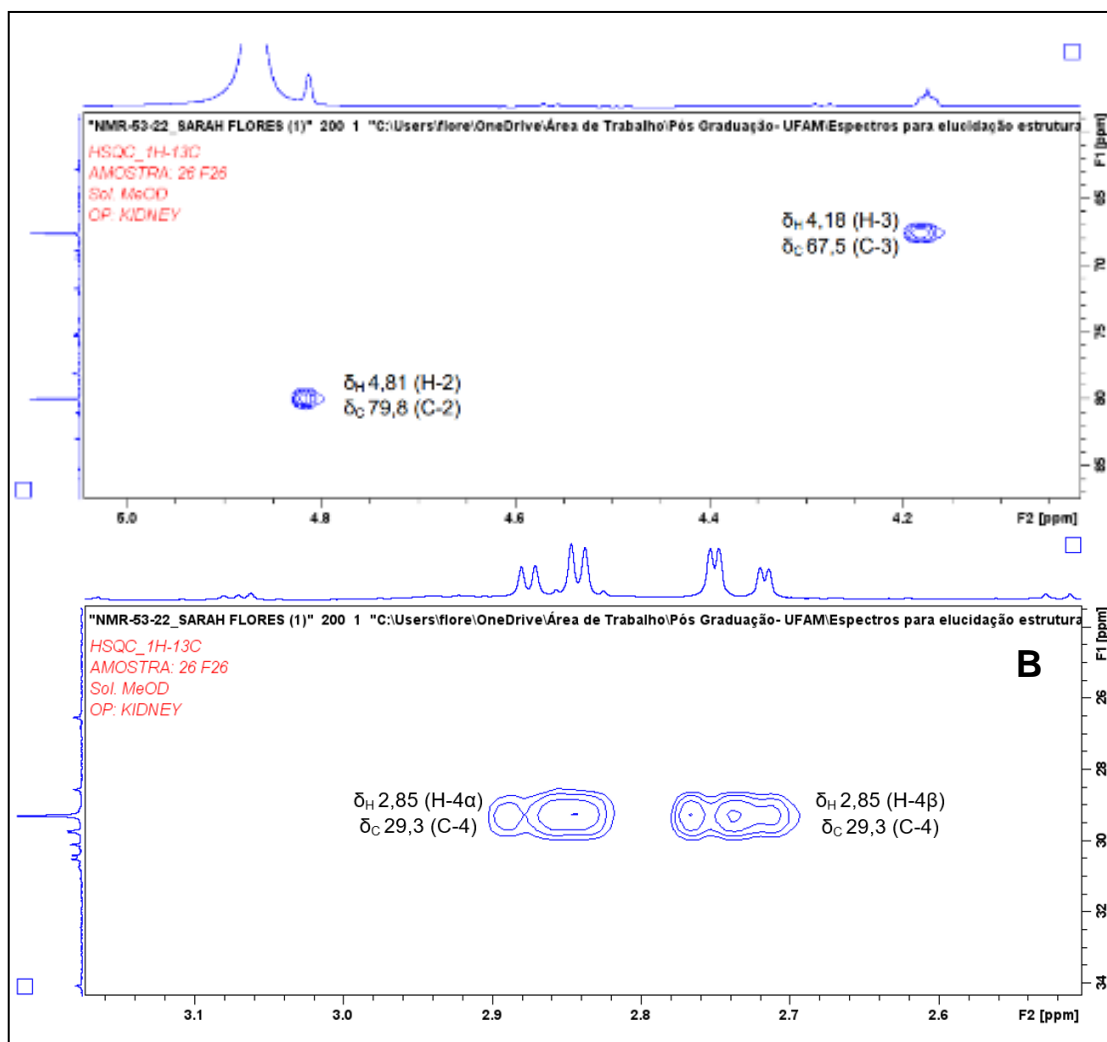


Figura 40. Ampliação do mapa de correlações HSQC na região dos sinais do anel C da estrutura molecular presente na subfração SF13-26.

A **Tabela 18** demonstra as correlações observadas no mapa HSQC de **SF13-26**. Os sinais foram comparados com o estudo de DEVKOTA et al., (2021). Foi possível comparar com os dados da literatura e distinguir os dois isômeros catequina e epicatequina. Assim, as informações obtidas para **SF13-26** foram compatíveis com os dados da epicatequina (**Figura 41**).

TABELA 18. Sinais observados no mapa de correlações HSQC gerado as subfração SF13-26.

DEVIKOTA <i>et al.</i> , 2021					SF-13-26			
Posição	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	J (Hz)	m	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	J (Hz)	m
2	79,8	4,84		sl	79,8	4,81		s, 1H
3	67,5	4,21		sl	67,5	4,18		m, 1H
4	29,3	α 2,88	16,7 e 6	dd	29,2	α 2,85	16,6 e 4,6	dd, 1H
		β 2,79	16,7 e 2,8	dd		b 2,73	16,6 e 2,8	dd, 1H
6	96,3	5,98		sl	96,4	5,91	2,2	d, 1H
8	95,9	5,98		sl	95,9	5,94	2,2	d, 1H
2'	115,3	6,99	1,8	d	115,4	6,97	1,9	d, 1H
5'	115,9	6,80	8,2	d	115,9	6,75	8,1	d, 1H
6'	119,4	6,82	1,8 e 8,2	dd	119,4	6,79	1,9 e 8,1	dd, 1H

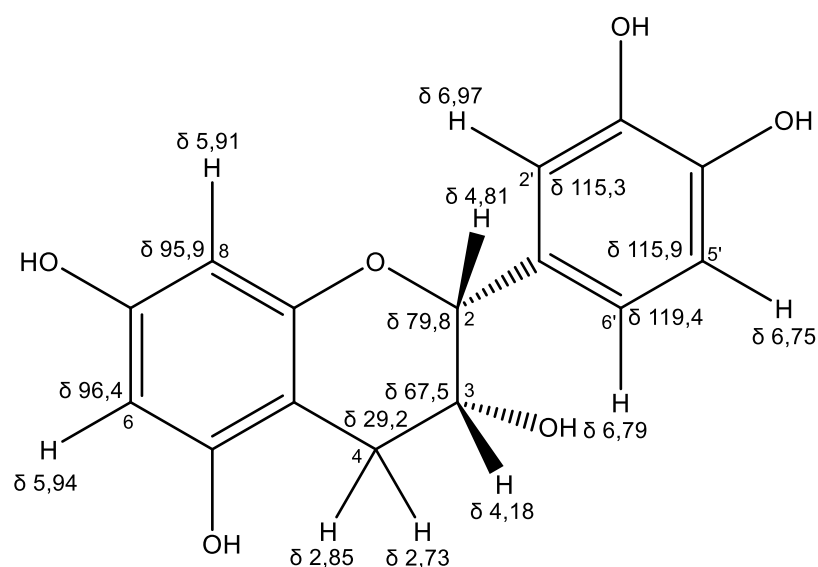


Figura 41. Assinalamento para os carbonos e hidrogênios de acordo com o mapa de correlações HSQC da subfração SF13-26.

A análise bidimensional HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), forneceu as informações sobre os acoplamentos dos hidrogênios com os carbonos vizinhos a partir de duas ligações de distância (**Figura 42**).

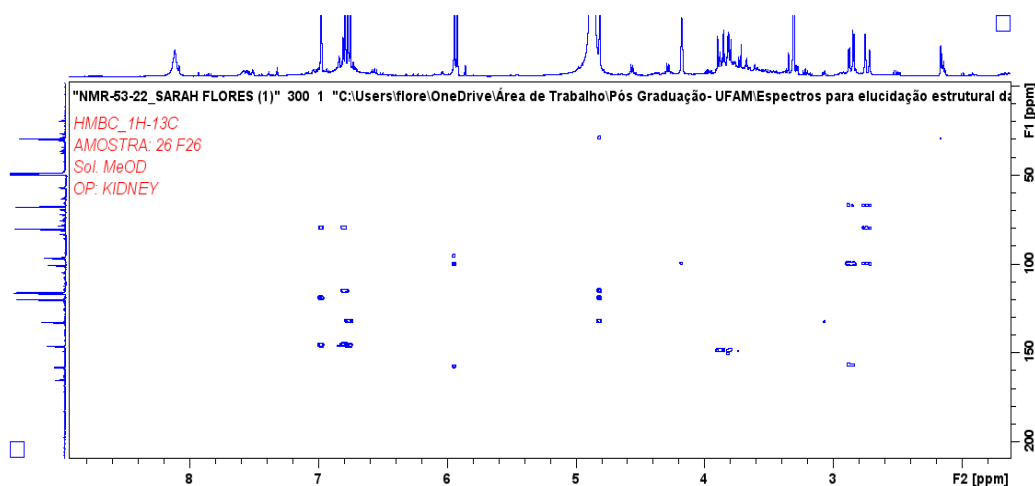


Figura 42. Mapa de correlações HMBC da subfração SF13-26.

A ampliação **figura 43** indicou as correlações C→H presentes no anel B. Foi possível observar as interações entre H-2' e os carbonos C-2 (3J), C-6' (3J) e C-3' (2J). Além disso, foi possível observar as correlações entre H-6'- e C-2 (3J) e C-2' (3J), e ao lado estão as correlações de H-5': C-1' (3J) e C-4' (2J). A análise dessa região do mapa permitiu confirmar os deslocamentos químicos dos carbonos terciários do anel aromático: C-3', C-1' e C-4'. As correlações estão demonstradas na **figura 44**.

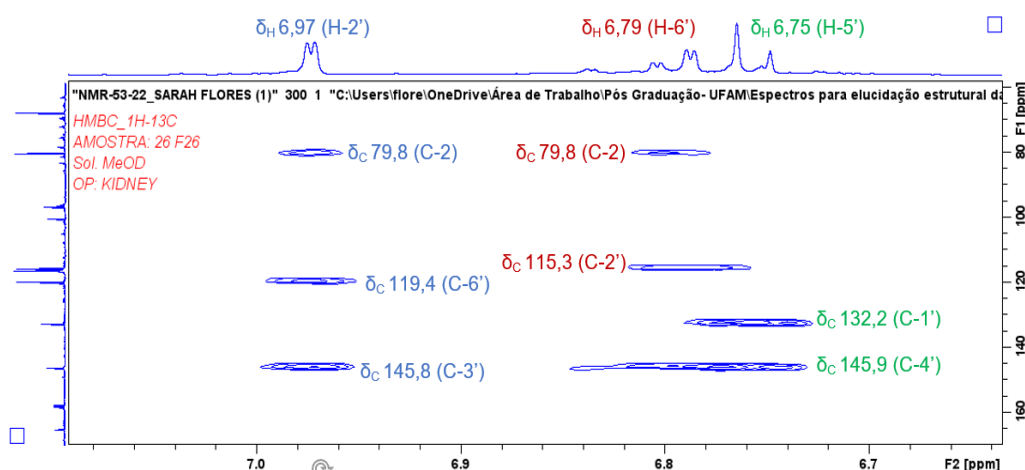


Figura 43. Ampliação do mapa de correlações HMBC, na região dos aromáticos oriundos do anel B da epicatequina presente a subfração SF13-26.

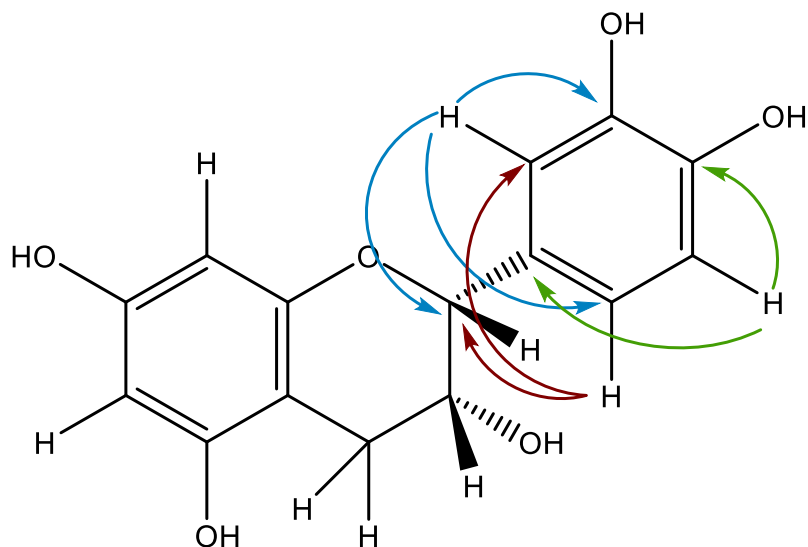


Figura 44. Correlações C→H longas distâncias dos núcleos presentes no anel aromático B da estrutura indicada na subfração SF13-26.

A ampliação (**Figura 45**) na região dos hidrogênios do anel A, apresentou correlações entre o H-6 e os carbonos C-8 (3J), C-10 (3J) e C-7 (2J). A demonstração dessas interações está ilustrada na estrutura disposta dentro do mapa. Nessa análise, foi possível confirmar mais dois sinais, cuja determinação foi dada aos: C-7 e C-10.

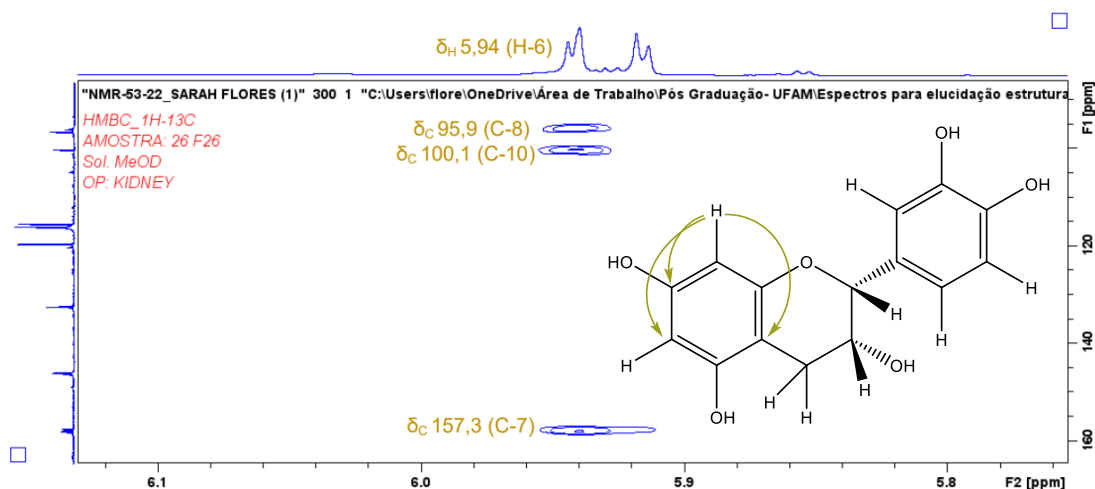


Figura 45. Ampliação do mapa de correlações HMBC, na região dos aromáticos oriundos do anel A da epicatequina presente a subfração SF13-26.

A **figura 46** mostra as interações entre o H-4 e os carbonos dos três anéis da epicatequina. O mapa mostrou seis correlações com os carbonos C-4 (3J), C-3 (2J), C-2' (3J), C-6 (3J) e C-9 (3J). Atribuindo mais um sinal à estrutura no carbono C-9. A **figura 47** exemplifica as interações entre o hidrogênio e os carbonos dos três anéis da epicatequina.

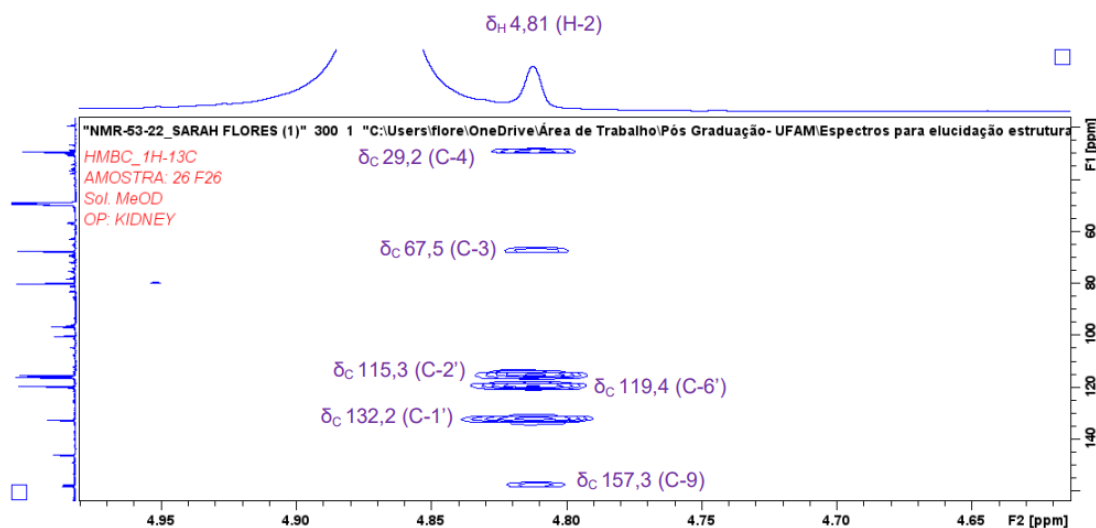


Figura 46. Ampliação do mapa de correlações HMBC, dos sinais do H-2-C da epicatequina da SF13-26.

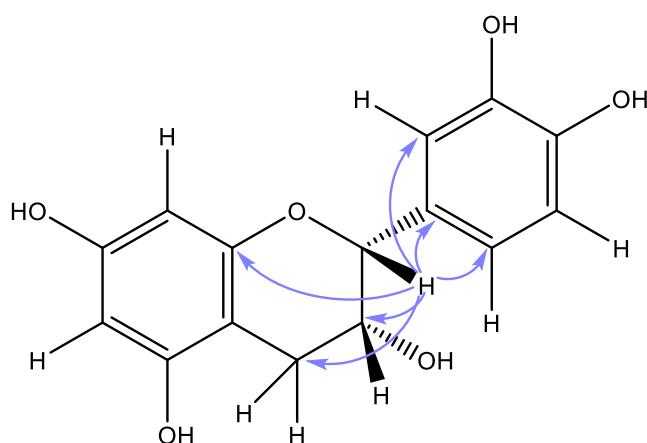


Figura 47. Correlações C→H longas distâncias do H-2-C interagindo com os carbonos dos anéis A, B e C da estrutura.

A **figura 48 (A)** mostra as interações entre H-3 e C-10 (3J). Já a ampliação **(B)** indica as interações entre os hidrogênios diasterotópicos (H-4 α e H-4 β) do metileno com os núcleos de C-5 (3J), C-2 (3J), C-10 (2J) e C-9 (3J). Assim, confirmando a posição dos sinais dos carbonos não hidrogenados do anel A. A **fig. 49** demonstra as interações entre os núcleos dos elementos supracitados.

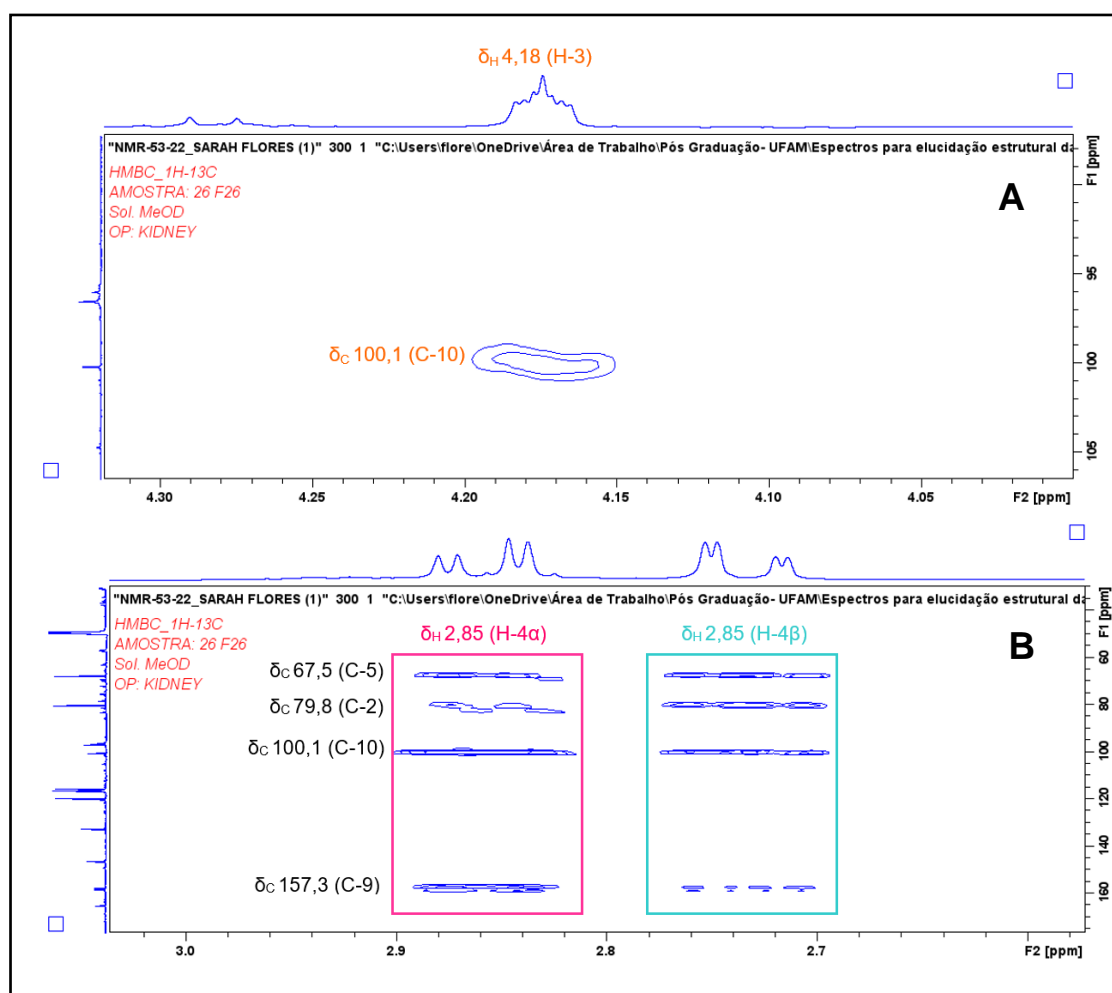


Figura 48. Ampliações do mapa de correlações HMBC da SF13-26, na região dos sinais dos grupos metínico e metilênico do anel C da epicatequina.

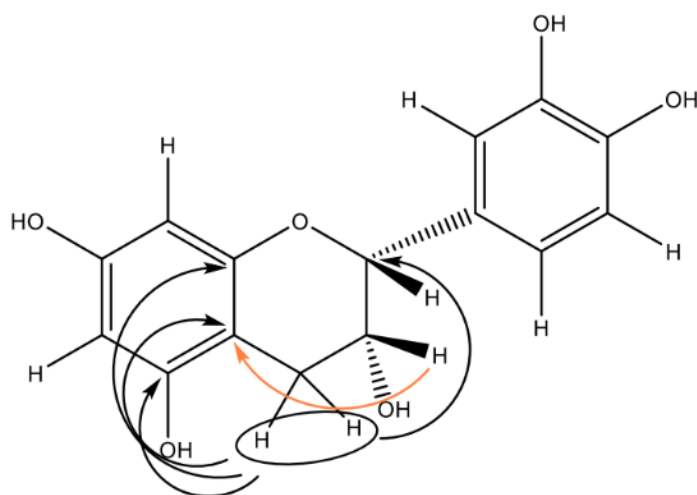


Figura 49. Correlações HMBC C→H dos sinais de H-3, H-4 α e H-4 β interagindo com os carbonos dos anéis A e C da estrutura.

A **Tabela 19** apresenta os sinais observados no mapa HMBC de **SF13-26**. Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários concordaram com os dados de DEVKOTA et al., (2021).

TABELA 19. Sinais observados no mapa de correlações HMBC gerado as subfração **SF13-26**.

Correlações HMBC – SF13-26	
6,97 (H-2')	79,8 (C-2); 119,4 (C-6'); 145,8 (C-3')
6,79 (H-6')	79,8 (C-2); 115,3 (C-2')
6,75 (H-5')	132,2 (C-1'); 145,9 (C-4')
5,94 (H-6)	95,9 (C-8); 100,1 (C-10); 157,3 (C-7)
4,81 (H-2)	29,2 (C-4); 67,5 (C-3); 115,3 (C-2'); 119,4 (C-6'); 132,2 (C-1'); 157,6 (C-9)
4,18 (H-3)	100,1 (C-10)
2,85 (H-4 α)	67,5 (C-3); 79,8 (C-2); 100,1 (C-10); 157,3 (C-9)
2,73 (H-4 β)	67,5 (C-3); 79,8 (C-2); 100,1 (C-10); 157,3 (C-9)

O mapa de correlações COSY (Correlated Spectroscopy) apresentou os acoplamentos entre os núcleos dos hidrogênios do anel C (**Figura 50**). Destacado em azul está o acoplamento entre o H-3 e o H-4 α a uma distância de três ligações (3J). Destacados com o retângulo verde, estão as correlações entre os hidrogênios H-4 α e H-4 β com acoplamento 2J . A **figura**

51 mostra a molécula da epicatequina com as correlações que foram observadas no mapa.

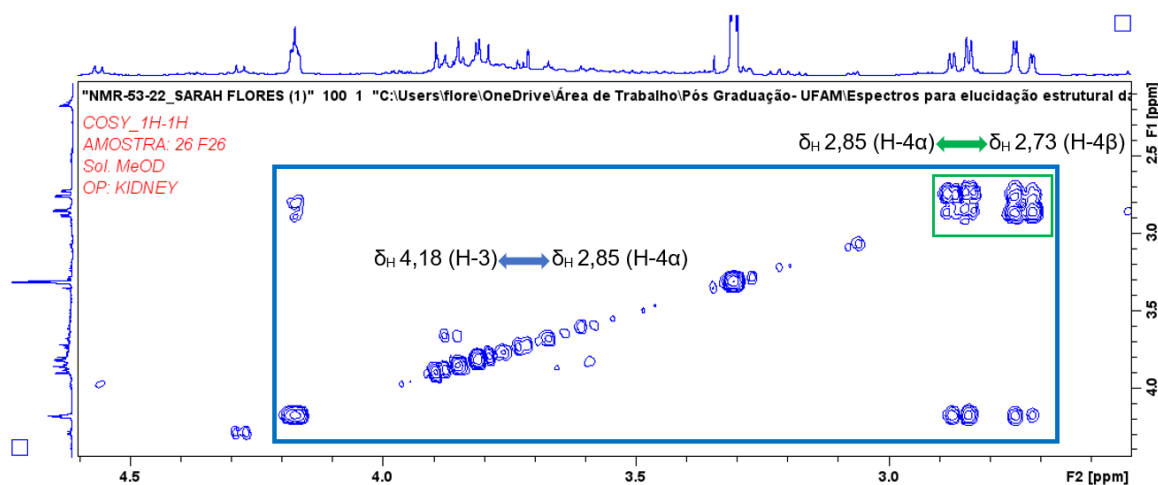


Figura 50. Ampliação do mapa de correlações COSY na região dos sinais dos hidrogênios do anel C da epicatequina

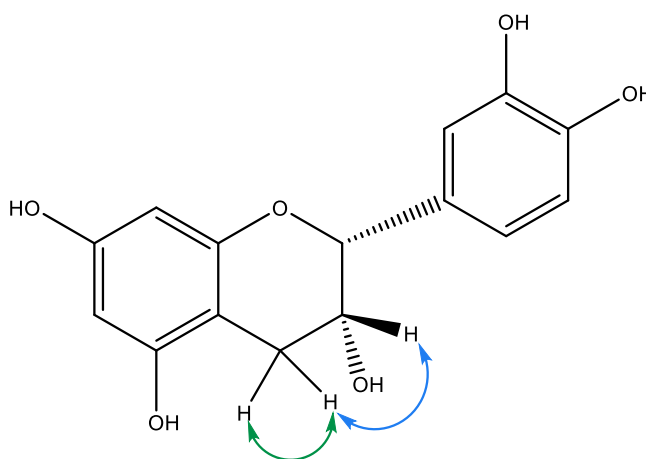


Figura 51. Correlações observadas no mapa COSY dos hidrogênios do anel C da epicatequina

A **tabela 20** resume os dados observados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C de **SP13-26**. Apoiados pelas técnicas bidimensionais e comparados com os dados da literatura, foi possível confirmar de maneira inequívoca a estrutura da **epicatequina** (**Figura 52**).

TABELA 20. Comparações entre os sinais observados nos espectros de RMN e mapas bidimensionais com os resultados encontrados na literatura.

DEVIKOTA <i>et al.</i> , 2021 (CD ₃ OD)					SUBSTÂNCIA SF13-26 (CD ₃ OD)			
POSIÇÃO	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	J (Hz)	m	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	J (Hz)	m
2	79,8	4,84		sl	79,8	4,81		s, 1H
3	67,5	4,21		sl	67,5	4,18		m, 1H
4	29,3	α 2,88	16,7 e 4,6	dd	29,2	α 2,85	16,6 e 4,6	dd, 1H
		β 2,79	16,7 e 2,8	dd		β 2,73	16,6 e 2,8	dd, 1H
5	158,0				158,0			
6	96,3	5,98		sl	96,4	5,91	2,2	d, 1H
7	157,3				157,3			
8	95,9	5,98		sl	95,9	5,94	2,2	d, 1H
9	157,6				157,6			
10	100,0				100,1			
1'	132,3				132,2			
2'	115,3	6,99	1,8	d	115,4	6,97	1,9	d, 1H
3'	145,7				145,8			
4'	145,9				145,9			
5'	115,9	6,80	8,2	d	115,9	6,75	8,1	d, 1H
6'	119,4	6,82	1,8 e 8,2	dd	119,4	6,79	1,9 e 8,1	dd, 1H

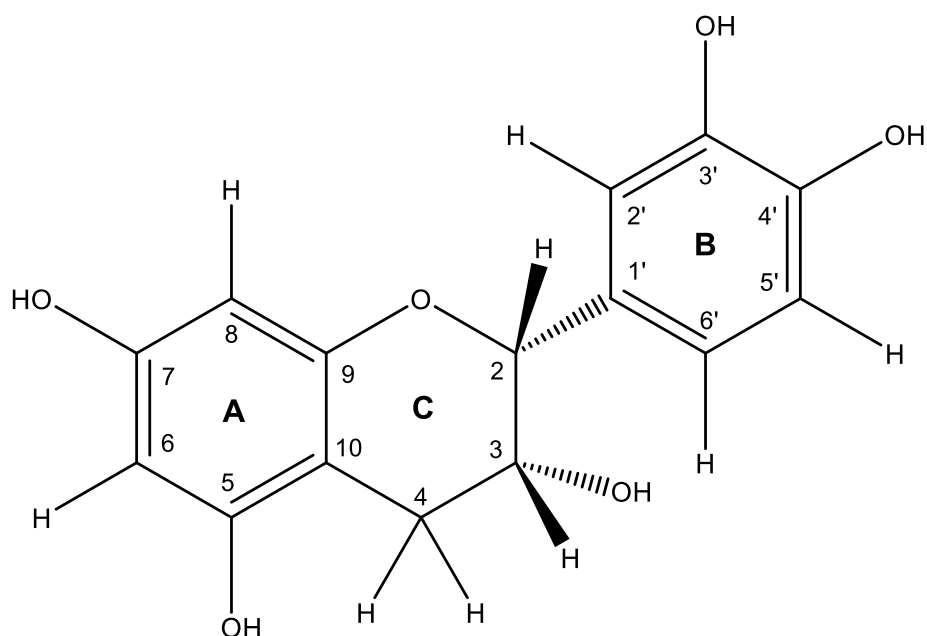


Figura 52. Estrutura da Epicatequina, encontrada em SF13-26.

6.5.2. Elucidação estrutural de SF14-11

6.5.2.1. Análise de prospecção em placas

A Subfração **SF14-11** (10 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de cor vermelha cintilante (**Figura 53 A**). As análises por CCD, apresentaram uma fluorescência azul, quando revelada com NP/PEG ($\lambda = 366 \text{ nm}$), com $F_R = 0,75$. Foram reveladas manchas cinza ($F_R 0,75$) quando reveladas com vanilina sulfúrica e sulfato cérico, indicando presença substância fenólica (**Figura 53 B**) (PASCUAL *et al.*, 2008).

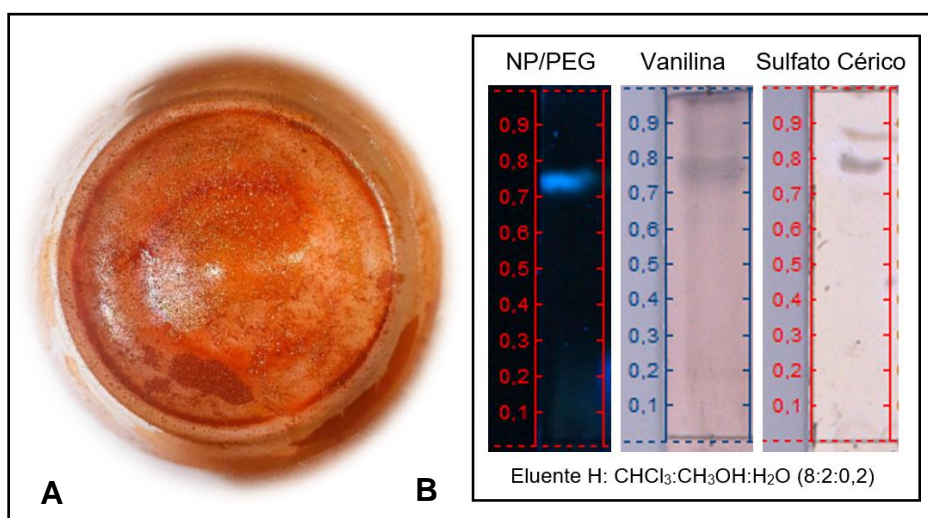


Figura 53. Fração SF14-11 (A). Placas de CCD da amostra reveladas com NP/PEG, vanilina sulfúrica e sulfato cérico, respectivamente (B).

6.5.2.2. Espectrometria de massas

O espectro de massas $[M-H]^-$, indicou o íon molecular m/z 167 (168 Da) como substância majoritária (**figura 54 A**), propondo fórmula molecular: **C₈H₈O₄**. A fragmentação gerou o pico m/z 123 (C₇H₇O₂; 100 %) indicando a perda de 44 u (-COO⁻) (**figura 54 B**). FIGUEROA *et al.*, (2018), propõe que a estrutura responsável por essa característica de fragmentação, é o Ácido Vanílico, apresentando a perda do íon carboxilato, gerando o íon m/z 123 (100) (**esquema 2**).

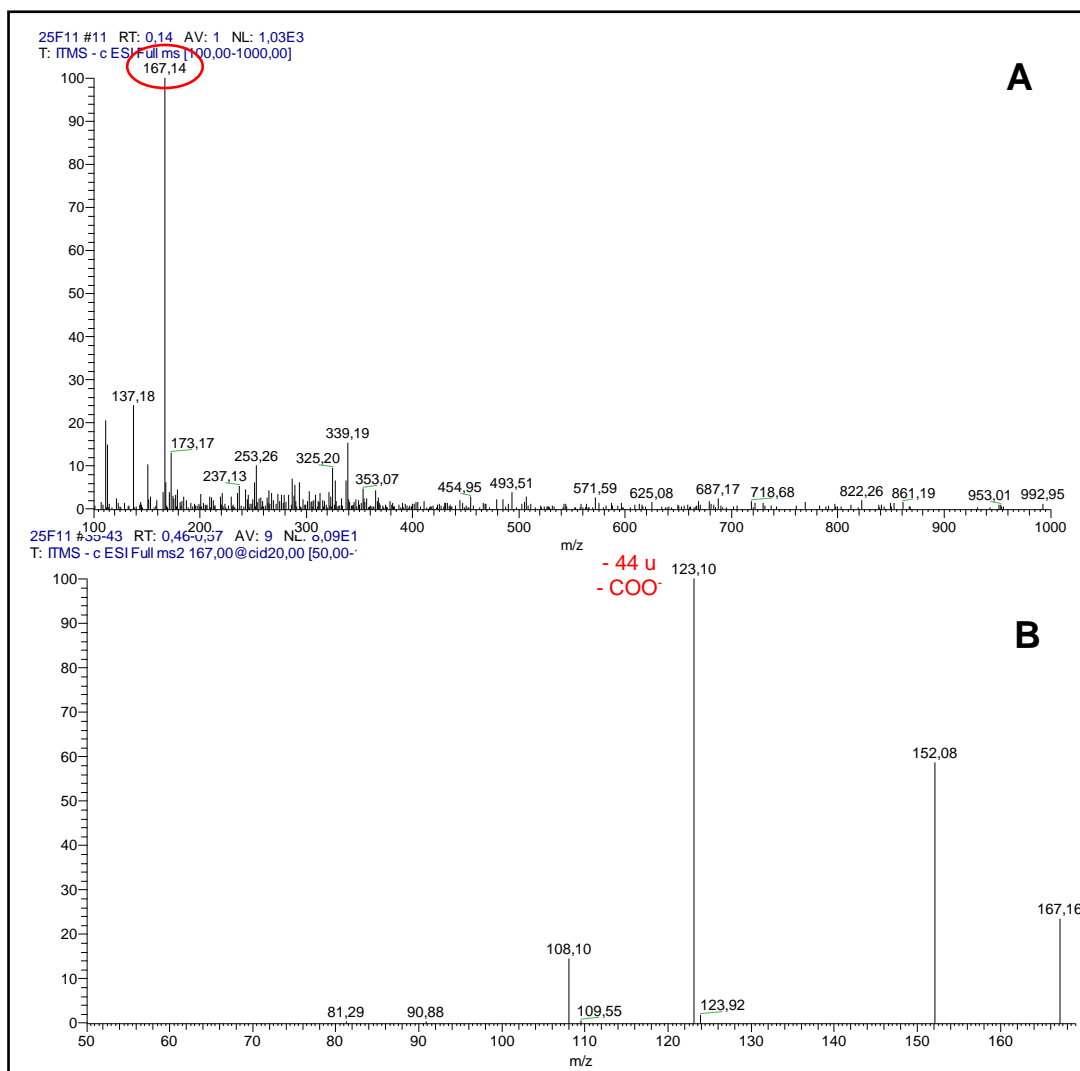
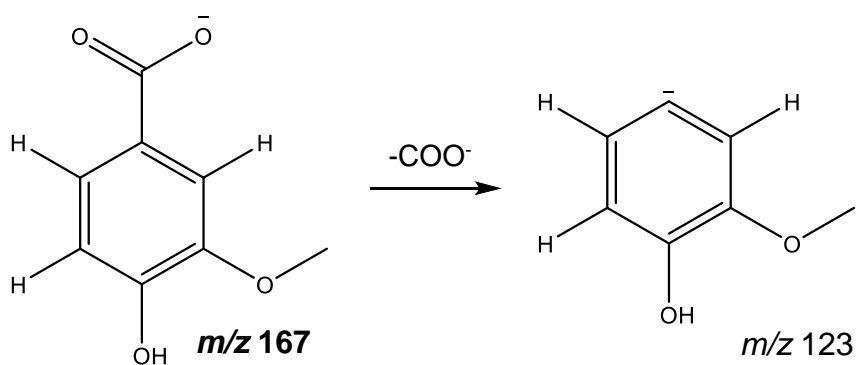


Figura 54. Espectro de massas (Fullscan) de **SF14-11** (A). Espectro de fragmentação do íon m/z 167 (B).



ESQUEMA 5. Proposta de fragmentações da substância presente em **SF14-11**. Adaptado de (FIGUEROA *et al.*, 2018)

6.5.2.3. Ressonância Magnética nuclear (1D e 2D)

O espectro de RMN de ^1H de **SF14-11** (figura 55) gerou três sinais de hidrogênios ligados a anel aromático e um sinal indicativo de H desblindado, sugestivo para metoxila. Sinais compatíveis esqueleto de ácido fenólico metoxilado, de acordo as sugestões da espectrometria de massas.

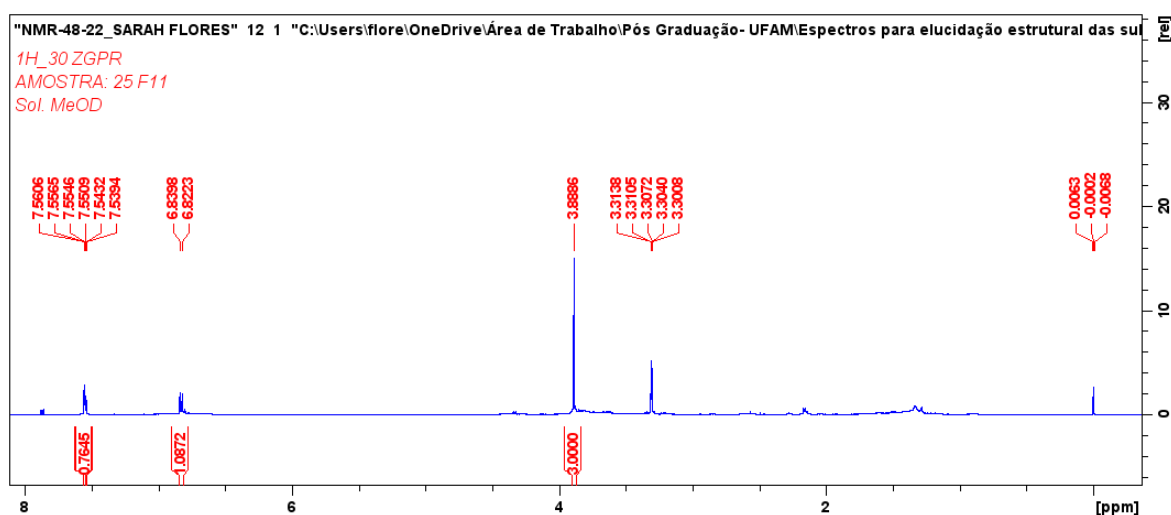


Figura 55. Espectro de RMN ^1H da subfração **SF14-11**.

A figura 56 A mostra a ampliação do espectro nas regiões dos hidrogênios aromáticos. Observou um multipeto integrando para dois hidrogênios. Tal sinal, ao ser observado no mapa de correlações HSQC pôde ser definido como um duplete (δ 7,55; $J=1,9$), referente ao H-2 e um duploduplete correspondente ao H-6 (δ 7,54; $J= 2,0$ e 8,7). Na mesma região, observou o sinal em 6,83 ppm (d, $J= 8,7$) fechando os sinais do anel aromático. As constantes de acoplamento indicaram acoplamento em *orto* entre H-2 e H-6 ($J= 1,9$) e em *meta* entre H-5 e H-6 ($J=8,7$). No espectro (B) foi observado um simpleto em 3,89 ppm, integrando para três hidrogênios, característico de metoxila ligada a anel aromático (H-8) (PAVIA *et al.*, 2015). A tabela 21 compara os dados do espectro de RMN ^1H de **SF14-11** com os dados de HAYUN *et al.*, (2020).

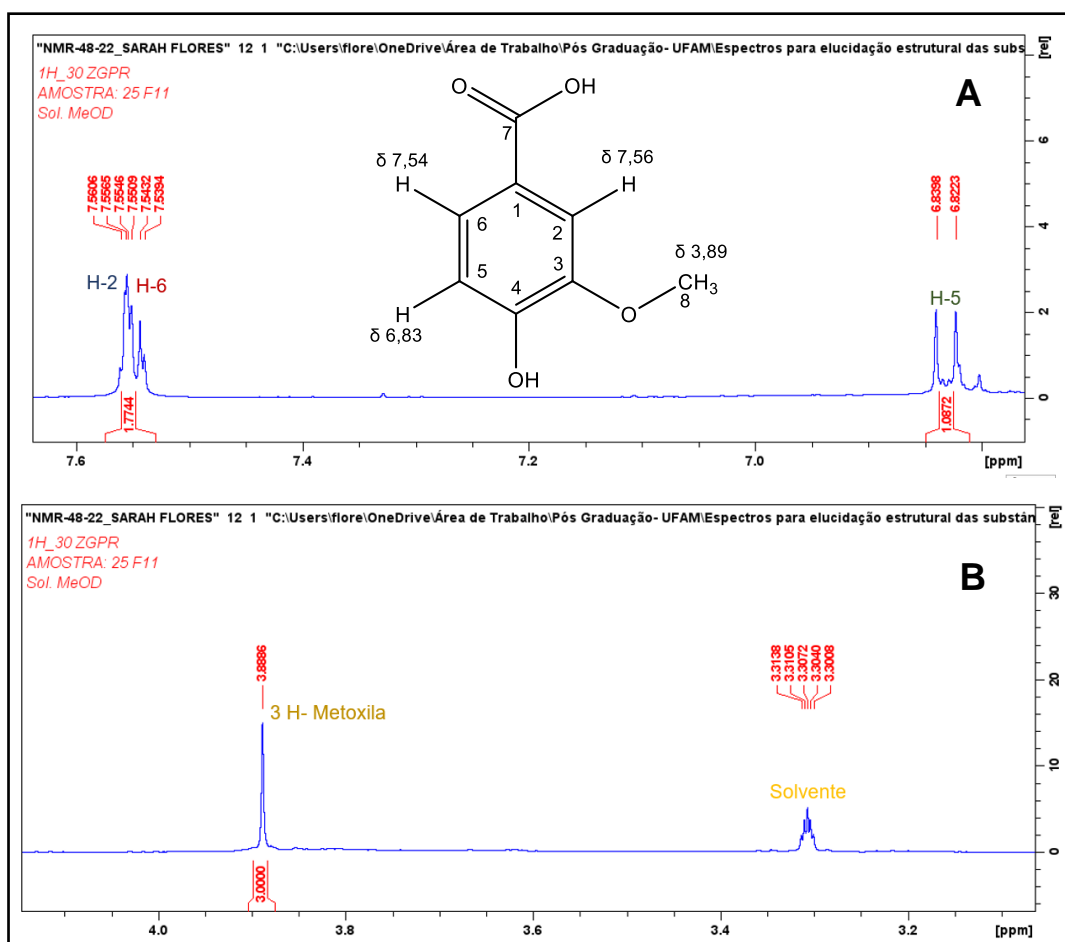


Figura 56. Ampliações do espectro de RMN ^1H da subfração **SF14-11**. Sinais aromáticos **(A)**, região de hidrogênios de metoxila **(B)**.

TABELA 21. Sinais observados nos espectros de RMN comparados com os resultados encontrados na literatura.

HAYUN <i>et al.</i> , 2020*				SF14-11*		
Posição	^1H (ppm)	J (Hz)	m	^1H (ppm)	J (Hz)	m
2	7,56		s, 1H	7,55	1,9	d, 2H
6	7,54		d, 1H	7,54	2,0; 8,7	dd, 2H
5	6,83		d, 1H	6,83	8,7	d, 1H
8	3,87		s, 3H	3,89		s, 3H

* ^1H (MeOD- d_4) 500 MHz; ^{13}C (MeOD- d_4) 125 MHz.

O espectro ^{13}C (**figura 57 A**) apresentou oito sinais distribuídos entre a região do ácido carboxílico e da metoxila. Observou o sinal em δ 170,2 (C-7) do ácido carboxílico. Os sinais dos carbonos carbinólicos apresentaram deslocamentos químicos em δ 152,6 (C-4) e δ 148,6 (C-3). O carbono ligado ao grupo carboxila (C-1) deslocou para δ 123,3. O hidrogenados aromáticos apresentaram os sinais de δ 125,2 (C-6), δ 115,8 (C-5) e δ 113,8 (C-2). No campo baixo, observou o sinal δ 56,4 (C-8). A análise de RMN DEPT-135 (**figura 57 B-vermelho**) gerou quatro sinais, confirmando os carbonos metínicos no anel aromático: δ 125,2 (C-6), δ 115,8 (C-5) e δ 113,8 (C-2), e a metoxila δ 56,4 (C-8).

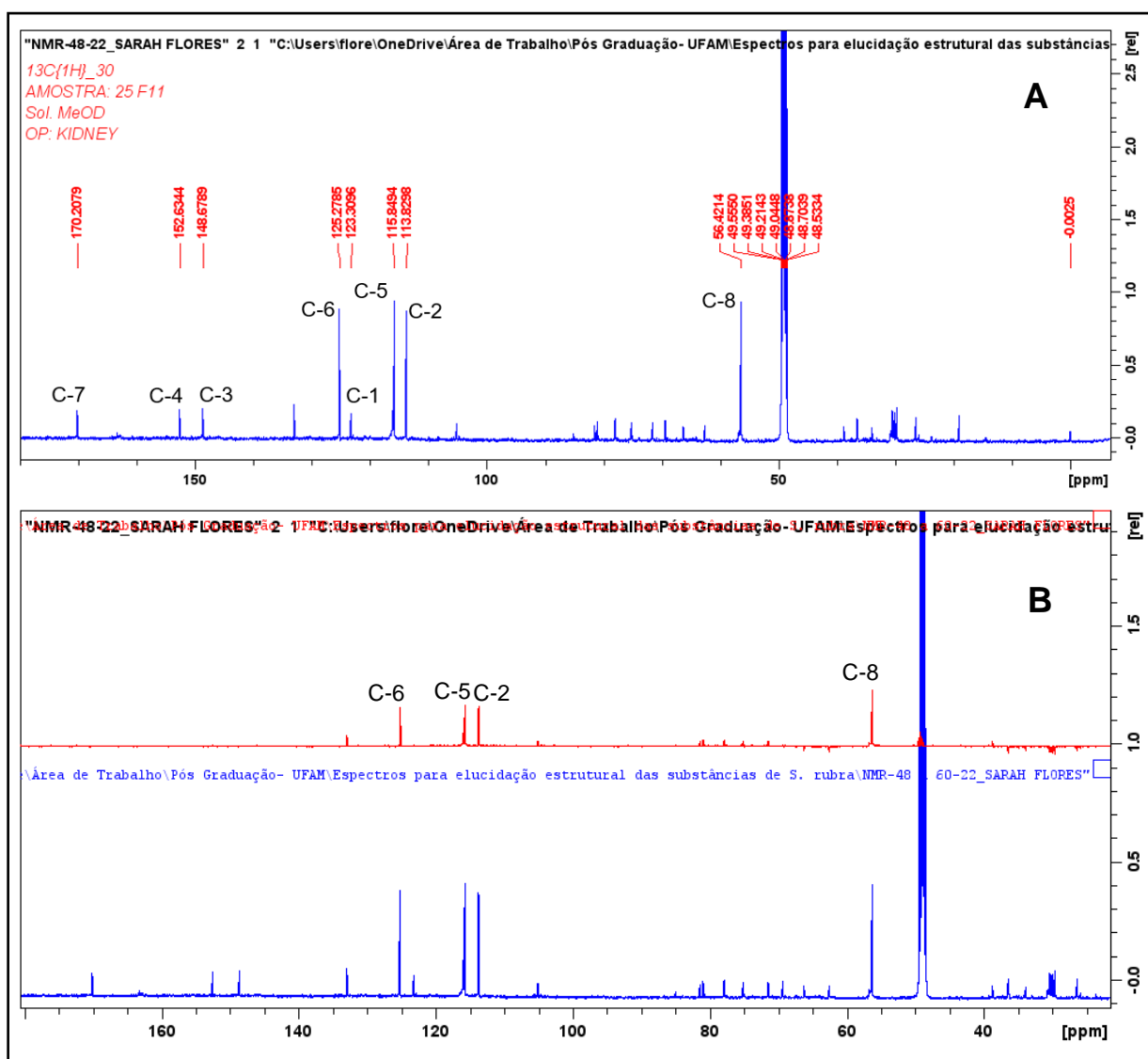


Figura 57. Espectro de RMN ^{13}C da subfração SF14-11 (A). Espectro de DEPT-135 (B).

A **tabela 22** une os sinais de ^{13}C , as informações fornecidas pelo DEPT-135 com os dados da literatura. Auxiliando na atribuição dos sinais dos carbonos na molécula (**figura 58**).

TABELA 22. Sinais observados nos espectros de ^{13}C e DEPT-135, comprados com HAYUN, *et al.*, 2020

HAYUN <i>et al.</i> , 2020		SF14-11	
Posição	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)	DEPT-135
7	170,0	170,2	C
4	152,5	152,7	C
3	148,5	148,7	C
6	125,2	125,3	CH
1	122,9	123,4	C
5	115,7	115,9	CH
2	113,6	113,4	CH
8	56,3	56,5	CH ₃

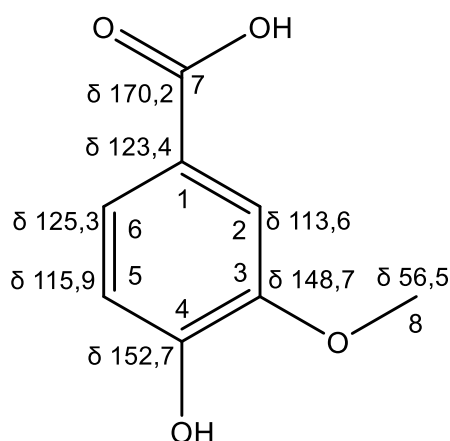


Figura 58. Proposta dos sinais de ^{13}C da estrutura de SF14-11.

A **figura 59 A** apresenta a ampliação do mapa HSQC na região aromática, com acoplamentos entre os hidrogênios H-2 (δ_{H} 7,55) e C-2 (δ_{C} 113,4), H-6 (δ_{H} 7,54) e C-6 (δ_{C} 125,3). Tornando possível definir o multipletto como sinais de dupletto e duplodupletto no espectro de RMN ^1H . Também foi possível observar a ligação entre o H-5 (δ_{H} 6,83) e C-5 (δ_{C} 115,9), assim

finalizando os assinalamentos dos sinais dos aromáticos. A ampliação (B) corresponde ao acoplamento de C-8 (δ_C 56,5) com os hidrogênios da metoxila: H-8 (δ_H 3,89).

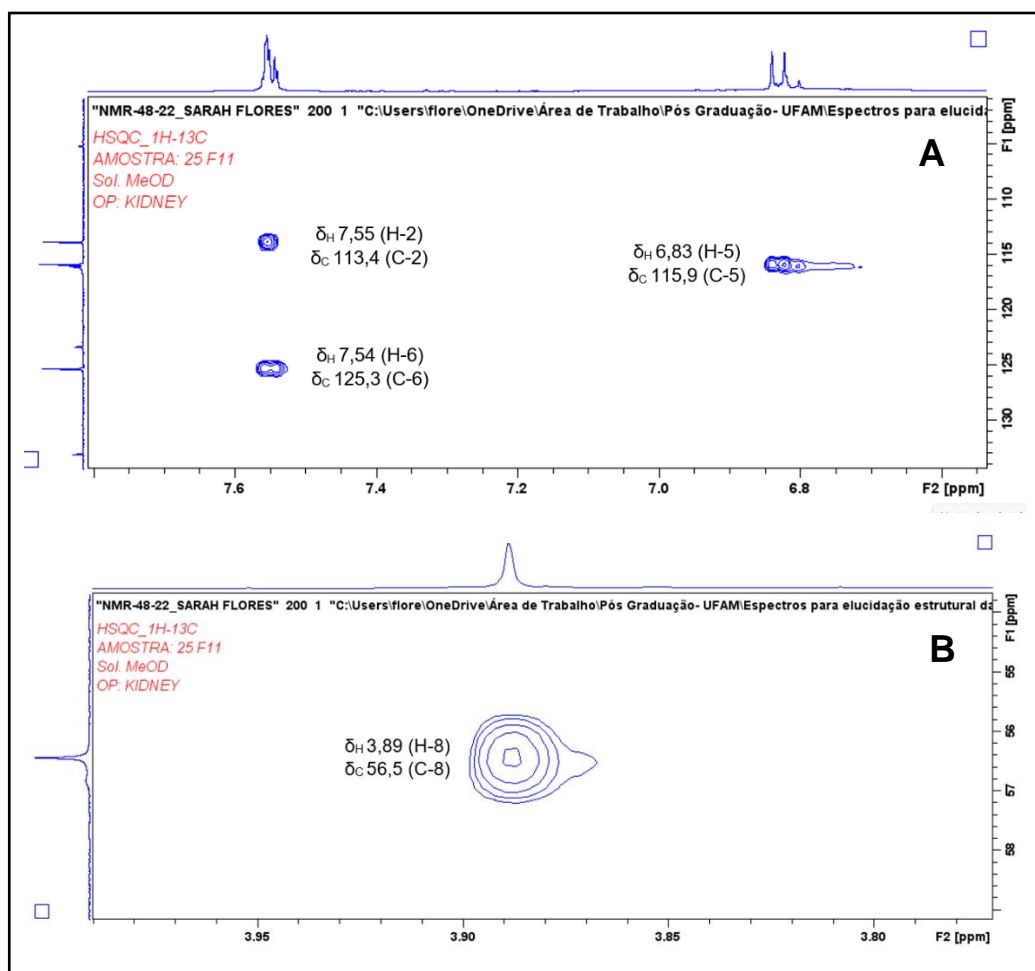


Figura 59. Mapa geral de correlações HSQC (A). Ampliações na região dos aromáticos (B); Ampliação na região dos carbonos carbinólicos (C).

A **tabela 23** lista os sinais observados no mapa HSQC de **SF14-11**. As correlações corroboraram (HAYUN *et al.*, 2020). A **figura 60** apresenta a estrutura proposta para a fração **SF14-1**.

TABELA 23. Correlações observadas no mapa HSQC comparados com os resultados encontrados na literatura.

HAYUN <i>et al.</i> , 2020					SF14-11			
Posição	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	J (Hz)	m	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	J (Hz)	m
6	125,2	7,54		s, 1H	125,3	7,54	2,0 e 8,7	dd, 2H
5	115,7	6,83		d, 1H	115,9	6,83	8,7	d, 1H
2	113,6	7,56		d, 1H	113,4	7,55	1,9	d, 2H
8	56,3	3,87		s, 3H	56,5	3,89		s, 3H

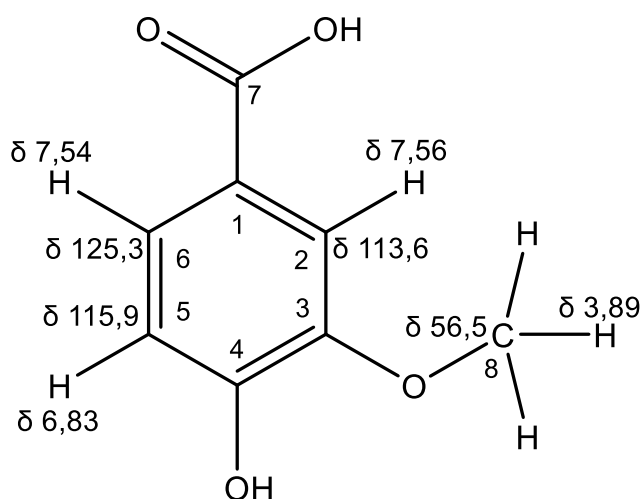


Figura 60. Proposta de assinalamentos baseados no mapa HSQC de SF14-11.

A **figura 61** mostra as ampliações do mapa de correlações HMBC da **SF14-11**. A **figura 61 A** mostra as correlações entre H-2→C-3 (3J) e C-7 (3J), e H-6 com C-4 (3J). A ampliação **(B)** apresenta as correlações de H-5 com os carbonos: C-1 (3J), C-3 (3J) e C-4 (2J). Já na ampliação **(C)** foi observada a correlação H-8 com C-3 (3J). A contribuição dessa análise permitiu o assinalamento correto dos carbonos quaternários C-1, C-3 e C-4 (**Tabela 24**). A **figura 62** demonstra as correlações H→C propostas pelo mapa HMBC.

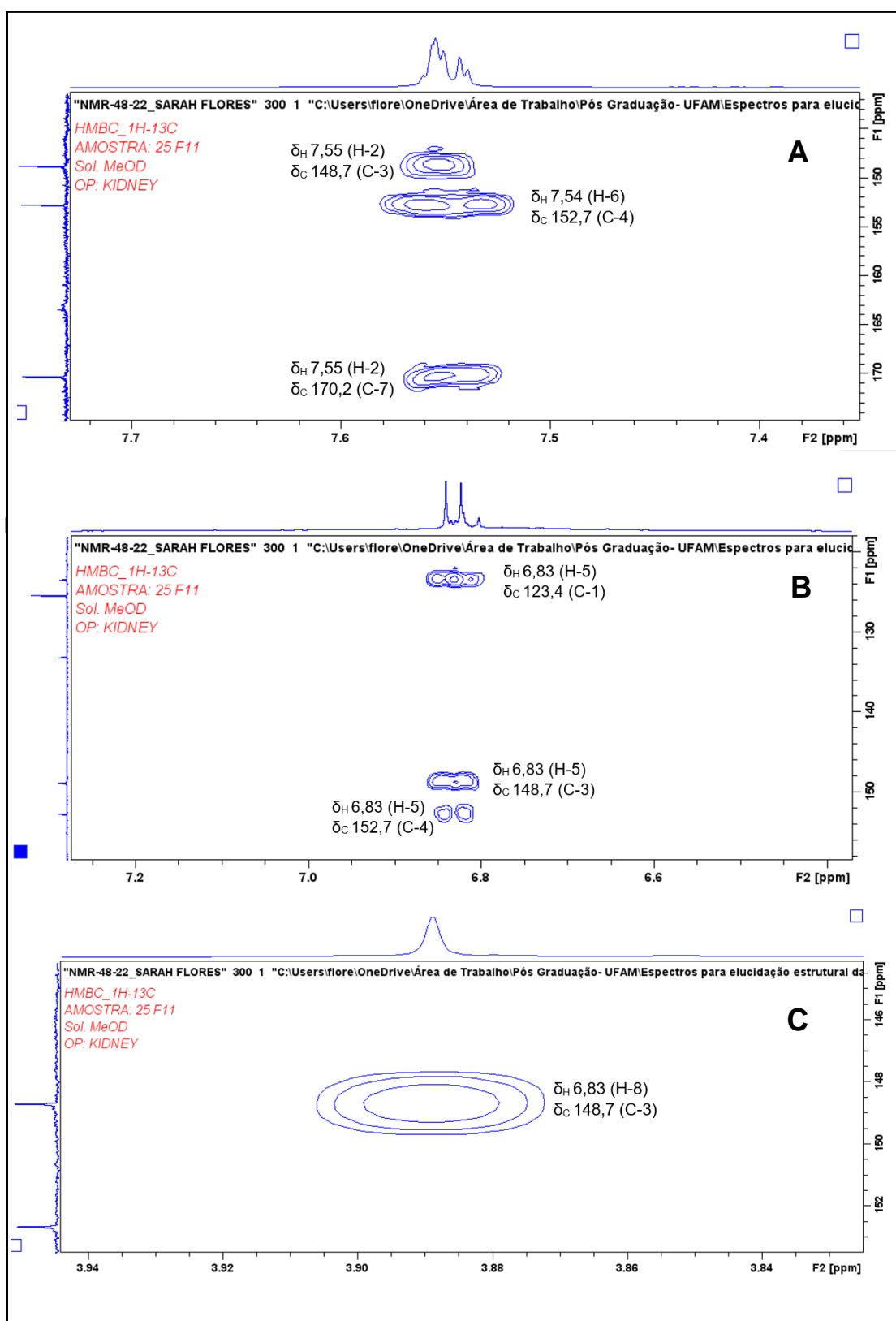


Figura 61. Ampliações do mapa de correlações HMBC de SF14-11.

TABELA 24. Correlações HMBC, do ácido Vanílico presente na **SF14-11**.

Correlações HMBC - SF14-11	
7.55 (H-2)	148,7 (C-3); 170,2 (C-7)
7.54 (H-6)	152,7 (C-4)
6.83 (H-5)	123,4 (C-1); 148,7 (C-3); 152,7 (C-4)
3.89 (H-8)	148,7 (C-3)

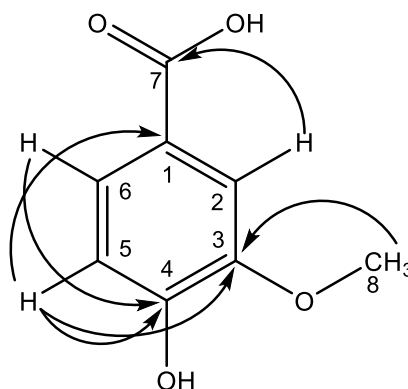


Figura 62. Correlações HMBC do Ácido Vanílico presente na amostra de **SF14-11**.

A **figura 63** apresenta a ampliação do mapa COSY na região dos aromáticos, onde foi possível observar uma correlação no mapa entre os núcleos de H-6 e H-5.

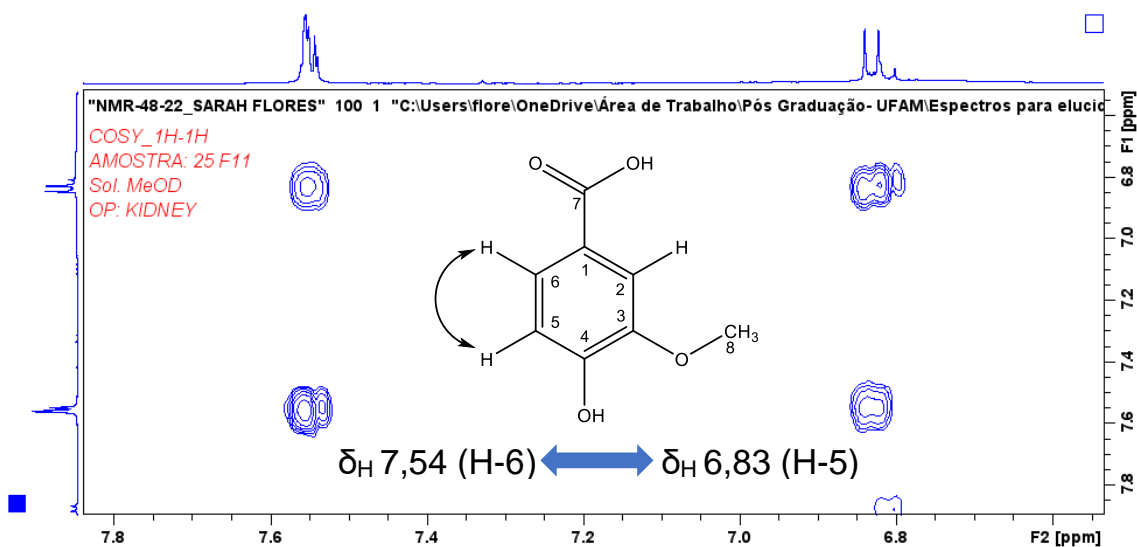


Figura 63. Ampliação do mapa COSY da fração **SF14-11**.

A **tabela 25** apresenta os dados observados nos espectros de RMN auxiliados pelos mapas de correlações bidimensionais. Comparando os resultados obtidos com os estudos de HAYUN *et al.*, (2020), confirmou a presença do Ácido Vanílico (**figura 64**) na fração **SF14-11**.

TABELA 25. Comparações dos sinais de RMN analisados de **SF14-11** e comparados com a literatura.

Posição	HAYUN <i>et al.</i> , 2020				SF14-11			
	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	J (Hz)	m	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	J (Hz)	m
7	170,0				170,2			
4	152,5				152,7			
3	148,5				148,7			
1	122,9				123,4			
6	125,2	7,54		s, 1H	125,3	7,54	2,0; 8,7	dd, 1H
5	115,7	6,83		d, 1H	115,9	6,83	8,7	d, 1H
2	113,6	7,56		d, 1H	113,4	7,55	1,9	d, 1H
8	56,3	3,87		s, 3H	56,5	3,89		s, 3H

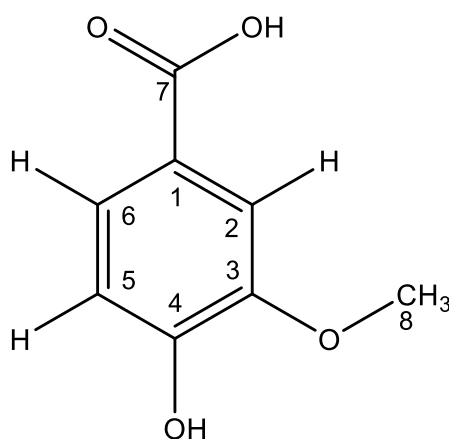


Figura 64. Estrutura do Ácido Vanílico, encontrado em **SF14-11**.

6.5.3. Elucidação estrutural de SF14-16

6.5.3.1. Análise de prospecção em placas

A Subfração **SF14-16** (18,9 mg) foi caracterizado como sólido amorfo de tom marrom avermelhado (**Figura 65 A**). A **figura 65 B** apresenta os testes de prospecção por CCD. Foi observada uma fluorescência azul na placa revelada com NP/PEG ($\lambda = 366 \text{ nm}$) com $F_R = 0,65$, e com o mesmo fator de retenção, revelou uma mancha marrom com sulfato cérico ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$), e uma mancha amarela com solução de radical DPPH. Observou outra mancha amarela ($F_R 0,35$) revelada com DPPH, correspondente à mancha verde escura na placa revelada com cloreto férrico. Os testes de bioautografia em CCD indicaram presença de estrutura fenólica com capacidade inibitória do DPPH• (**Figura 54 B**) (DOURADO; LADEIRA, 2008; SILVA; CONCEIÇÃO, 2010).

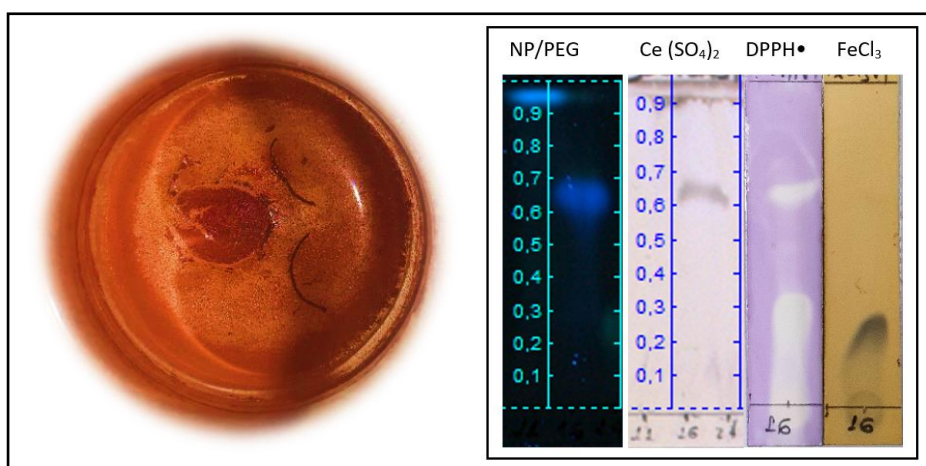


FIGURA 65. Fração **SF14-16** (A) seca. CCDs da SF14-16, eluídas com o sistema H e reveladas NP/PEG, sulfato cérico, DPPH• e cloreto férrico, nessa ordem (B).

6.5.3.2. Espectrometria de massas

O espectro de massas $[\text{M}-\text{H}]^-$, indicou o pico majoritário m/z 153 (154 Da) (**figura 66 A**), propondo fórmula molecular: $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$. A fragmentação EM^2 gerou o pico m/z 109 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2$; 25 %), ao perder 44 u ($-\text{COO}^-$) (**figura 66 B**). De acordo com o padrão de fragmentação, é possível propor a

presença do Ácido Protocatecúico, que apresenta a perda do íon carboxilato, gerando o íon m/z 109 (**esquema 3**) (ERTAS; YILMAZ; FIRAT, 2015).

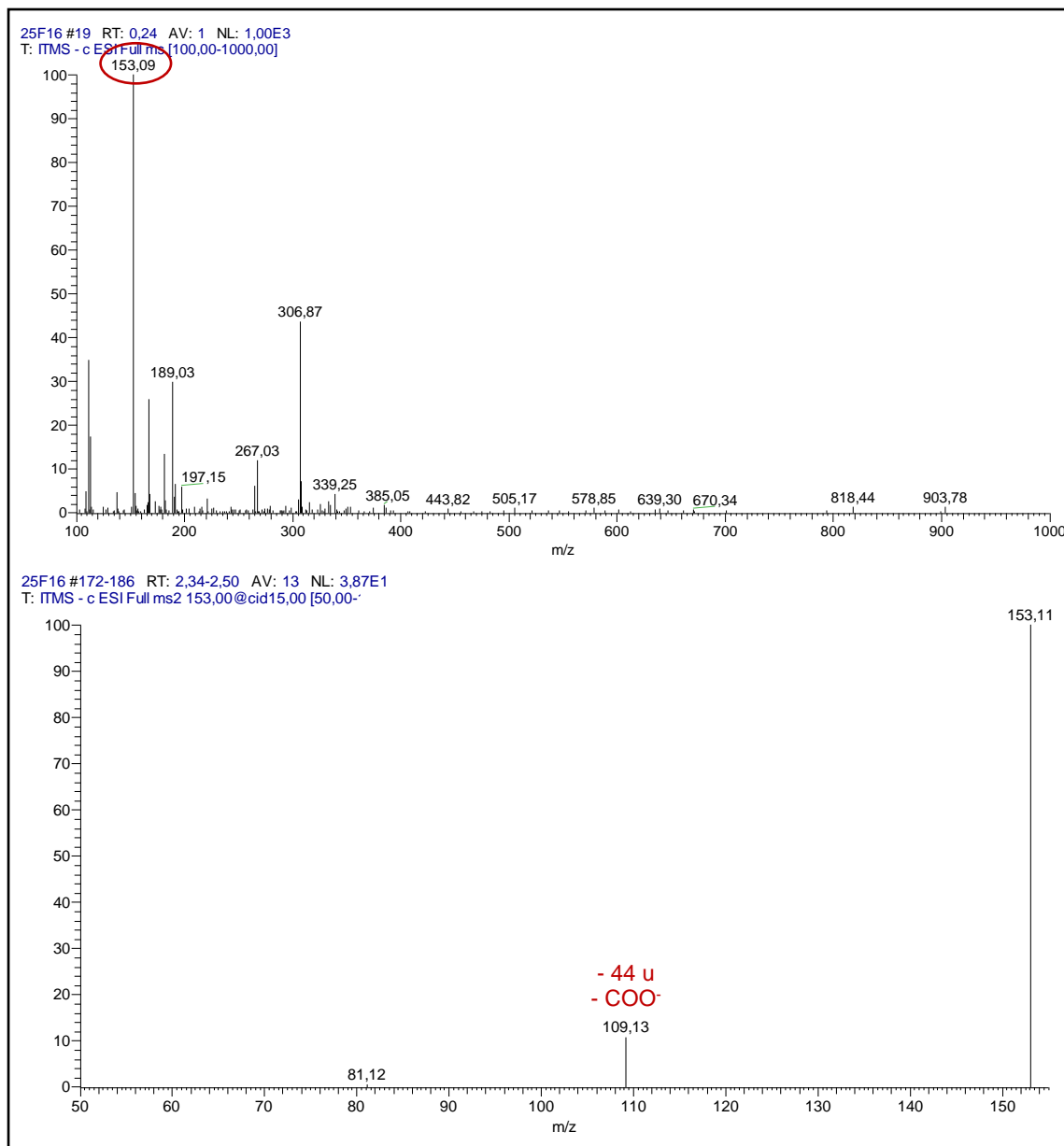
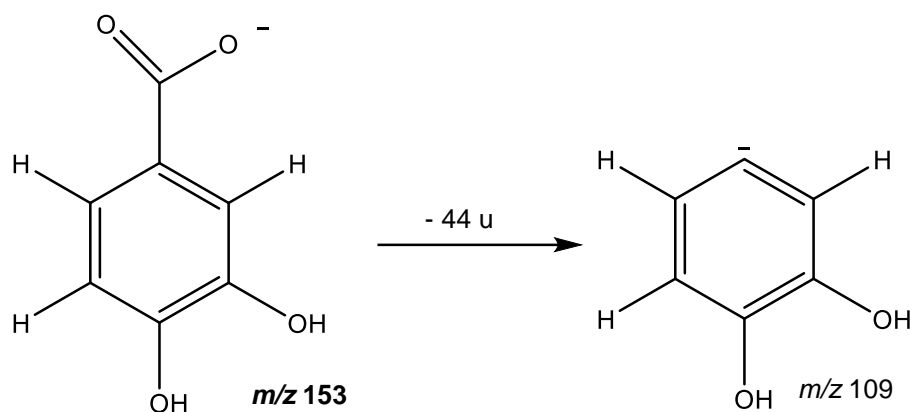


Figura 66. Espectro de massas (Fullscan) de **SF14-16** (A). Espectro de fragmentação do íon m/z 153(B).



ESQUEMA 6. Proposta de fragmentações da substância presente em **SF14-16**.

6.5.3.3. Ressonância Magnética nuclear (1D e 2D)

O espectro de RMN de ^1H de **SF14-16** (**figura 67**) gerou dois sinais de hidrogênios ligados ao anel aromático, compatíveis com sinais de ácido fenólico, conforme proposto anteriormente, do Ácido Protocatecúico (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

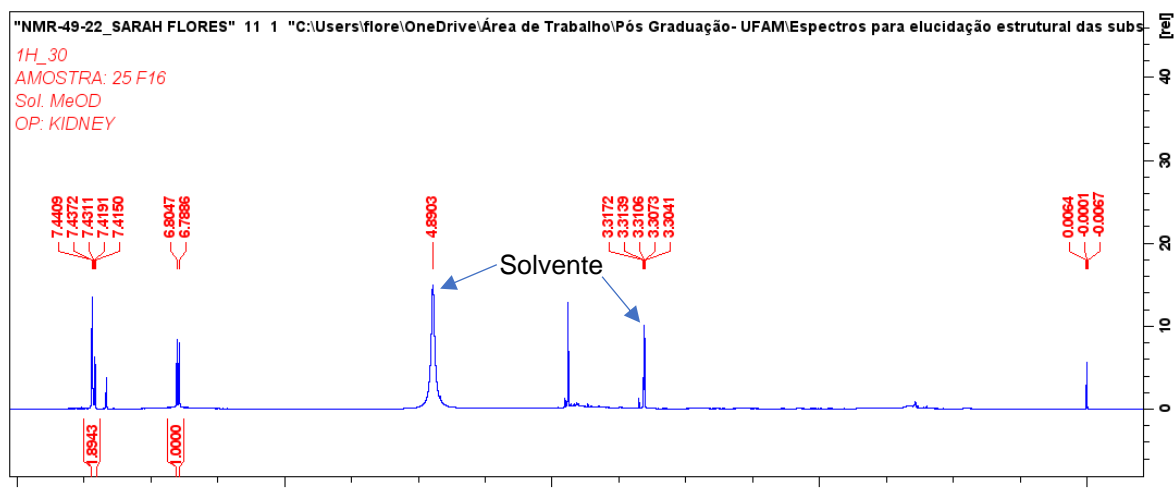


Figura 67. Espectro de RMN ^1H da subfração **SF14-16**.

A ampliação do espectro da região aromática (**figura 68**) apresentou um multiplete integrando para dois hidrogênios. O sinal pode ser observado no mapa de correlações HSQC, portanto, é possível definir duplete com δ

7,44; $J=2,0$ Hz para H-2 e duploduplete com δ 7,54; $J= 2,0$ Hz e 8,7 Hz para H-6. Também observou o sinal em δ 6,79 (d, $J= 8,7$ Hz) gerado do H-5. Foram observados os acoplamentos em *orto* entre H-2 e H-6 ($J= 2,0$ Hz) e em *meta* entre H-5 e H-6 ($J= 8,7$ Hz). (PAVIA *et al.*, 2015; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). A **tabela 26** compara os dados do espectro de RMN ^1H de **SF14-16** com os dados de (OKBA *et al.*, 2018).

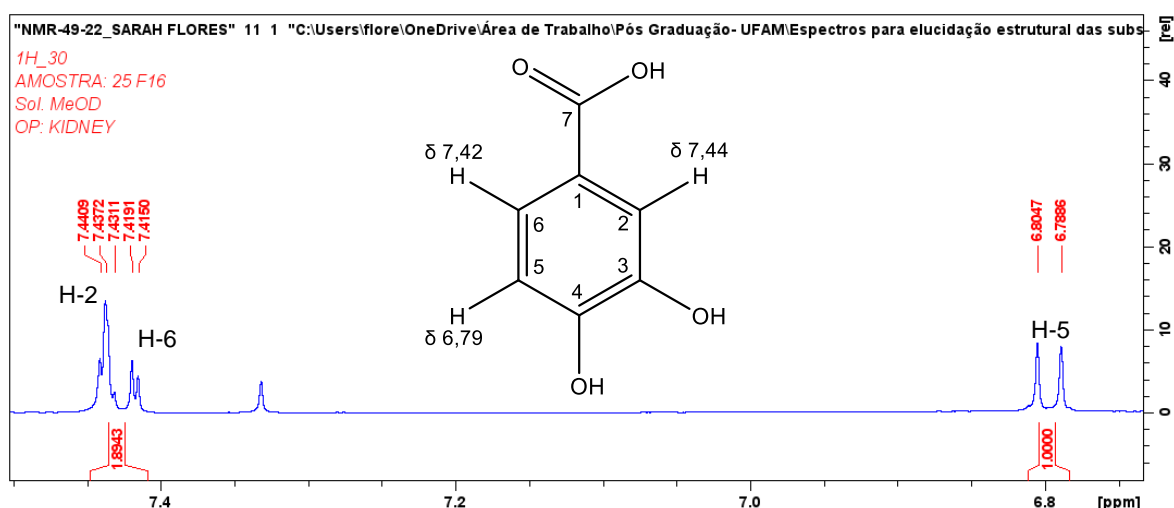


Figura 68. Ampliação da área dos sinais aromáticos do espectro de próton da fração **SF14-16**.

TABELA 26. Comparações dos sinais de RMN analisados de **SF14-11** e comparados com a literatura.

OKBA <i>et al.</i> , 2018 ^a				SF14-16 ^b		
Posição	^1H (ppm)	J (Hz)	m	^1H (ppm)	J (Hz)	m
2	7,5		s, 1H	7,44	2,0	d, 1H
6	7,45	8,1	d, 1H	7,42	2,0; 8,0	dd, 1H
5	6,8	8,1	d, 1H	6,79	8,0	d, 1H

a: ^1H (MeOD- d_4) 600 MHz; ^{13}C (MeOD- d_4) 150 MHz; b: ^1H (MeOD- d_4) 500 MHz; ^{13}C (MeOD- d_4) 125 MHz.

O espectro ^{13}C (**figura 69 A**) apresentou sete sinais concentrados na região mais desblindada do espectro. Observou o sinal em δ 170,3 (C-7) do ácido carboxílico, os sinais dos carbinólicos em δ 151,5 (C-4) e δ 146,0 (C-3). O hidrogenados apresentaram os sinais de δ 123,9 (C-6), δ 115,8 (C-5)

e δ 113,8 (C-2). A análise de RMN DEPT-135 (figura 69 B-vermelho) gerou os sinais dos três ^{13}C : δ 125,2 (C-6), δ 117,8 (C-2) e δ 115,9 (C-5).

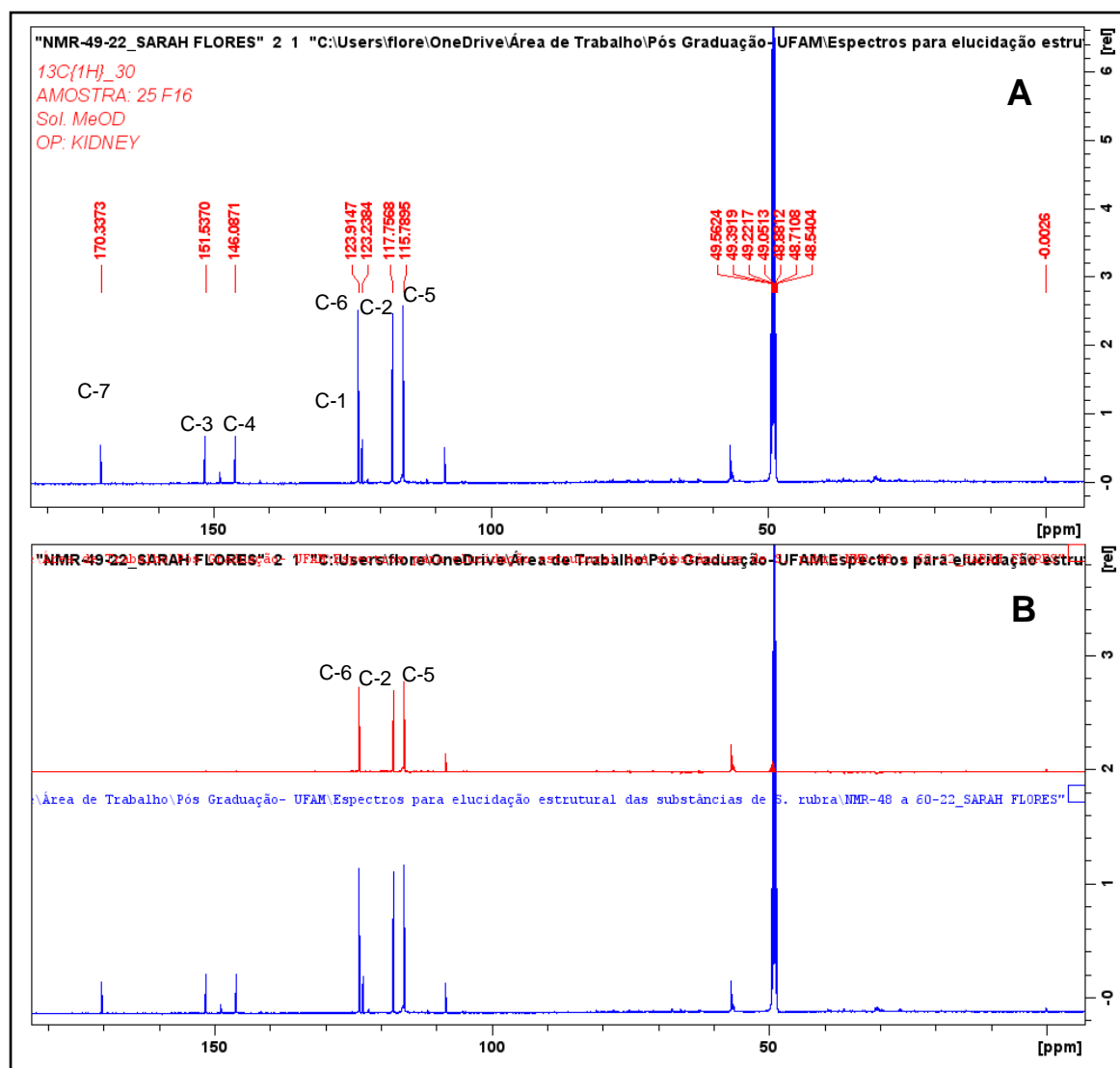


Figura 69. Ampliações do espectro de RMN ^{13}C da subfração SF14-11. Sinais aromáticos (A), região de hidrogênios de metoxila (B).

A **tabela 27** lista os sinais de ^{13}C e DEPT-135 e compara com os resultados de (OKBA *et al.*, 2018), orientando para as atribuições dos sinais dos carbonos na molécula (figura 70).

TABELA 27. Sinais observados nos espectros de ^{13}C e DEPT-135 de SF14-16, comprados com OKBA *et al.*, 2018.

OKBA <i>et al.</i> , 2018		SF14-16	
Posição	^{13}C (ppm)	^{13}C (ppm)	DEPT-135
7	170,9	170,3	C
3	151,1	151,5	C
4	145,4	146,0	C
1	124,1	123,1	C
6	122,7	123,9	CH
2	117,6	117,7	CH
5	115,7	115,9	CH

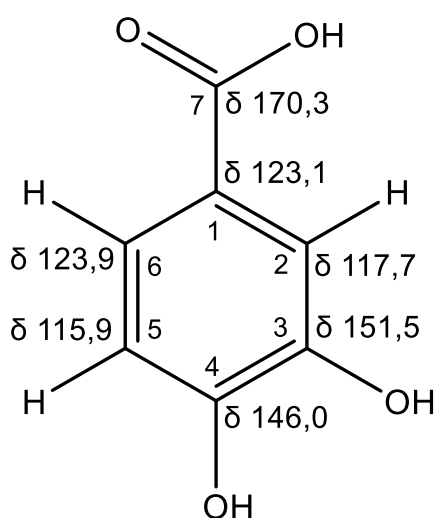


Figura 70. Proposta dos sinais de ^{13}C da estrutura de SF14-16.

A **figura 71** mostra a ampliação do mapa HSQC na região aromática. Foram observados os acoplamentos entre os hidrogênios H-2 (δ_{H} 7,44) e C-2 (δ_{C} 117,7), H-6 (δ_{H} 7,42) e C-6 (δ_{C} 123,9). Também foi possível observar a ligação entre H-5 (δ_{H} 6,79) e C-5 (δ_{C} 115,7), confirmando os assinalamentos dos carbonos metínicos. A **tabela 28** apresenta os sinais observados no mapa HSQC de SF14-16. As correlações corroboraram com os dados relacionados aos da estrutura do Ácido Protocatecúico (**figura 72**) (OKBA *et al.*, 2018).

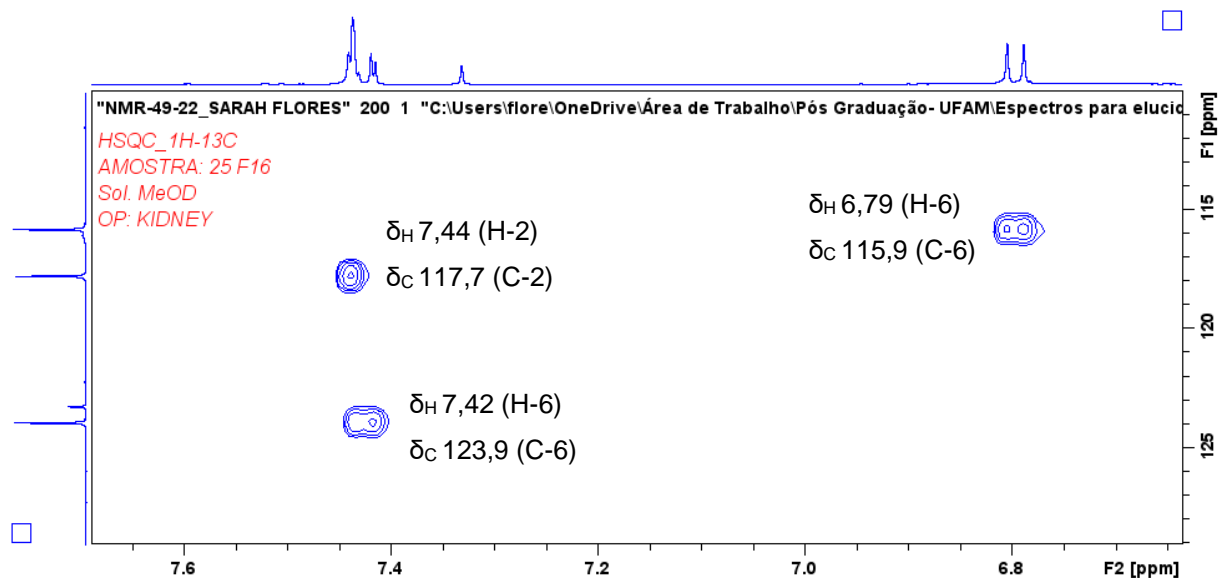


Figura 71. Ampliação do mapa HSQC na região dos hidrogênios e carbonos aromáticos de SF14-16.

TABELA 28. Sinais observados nos espectros de RMN comprados com os resultados encontrados na literatura.

Posição	OKBA <i>et al.</i> , 2018				SF14-16			
	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	J (Hz)	m	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	J (Hz)	m
6	122,7	7,45	8,1	d, 1H	123,9	7,42	2,0 e 8,0	dd, 1H
2	117,6	7,5		s, 1H	117,7	7,44	2,0	d, 1H
5	115,7	6,8	8,1	d, 1H	115,7	6,79	8,0	d, 1H

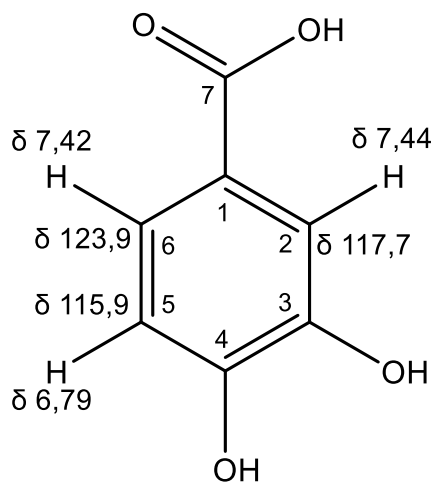


Figura 72. Proposta de assinalamentos baseados no mapa HSQC de SF14-16.

A **figura 73** mostra as ampliações do mapa HMBC da **SF14-16**. A **figura 73 A** mostra as correlações entre H-2 \rightarrow C-3 (3J) e C-7 (3J), também H-6 com C-4 (3J). A ampliação **(B)** apresenta as correlações de H-5 com os carbonos: C-1 (3J), C-3 (3J) e C-4 (2J). Essa análise bidimensional permitiu confirmar a posição dos carbonos quaternários C-1, C-3 e C-4 (**Tabela 29**). A **figura 74** demonstra as correlações H \rightarrow C propostas pelo mapa HMBC.

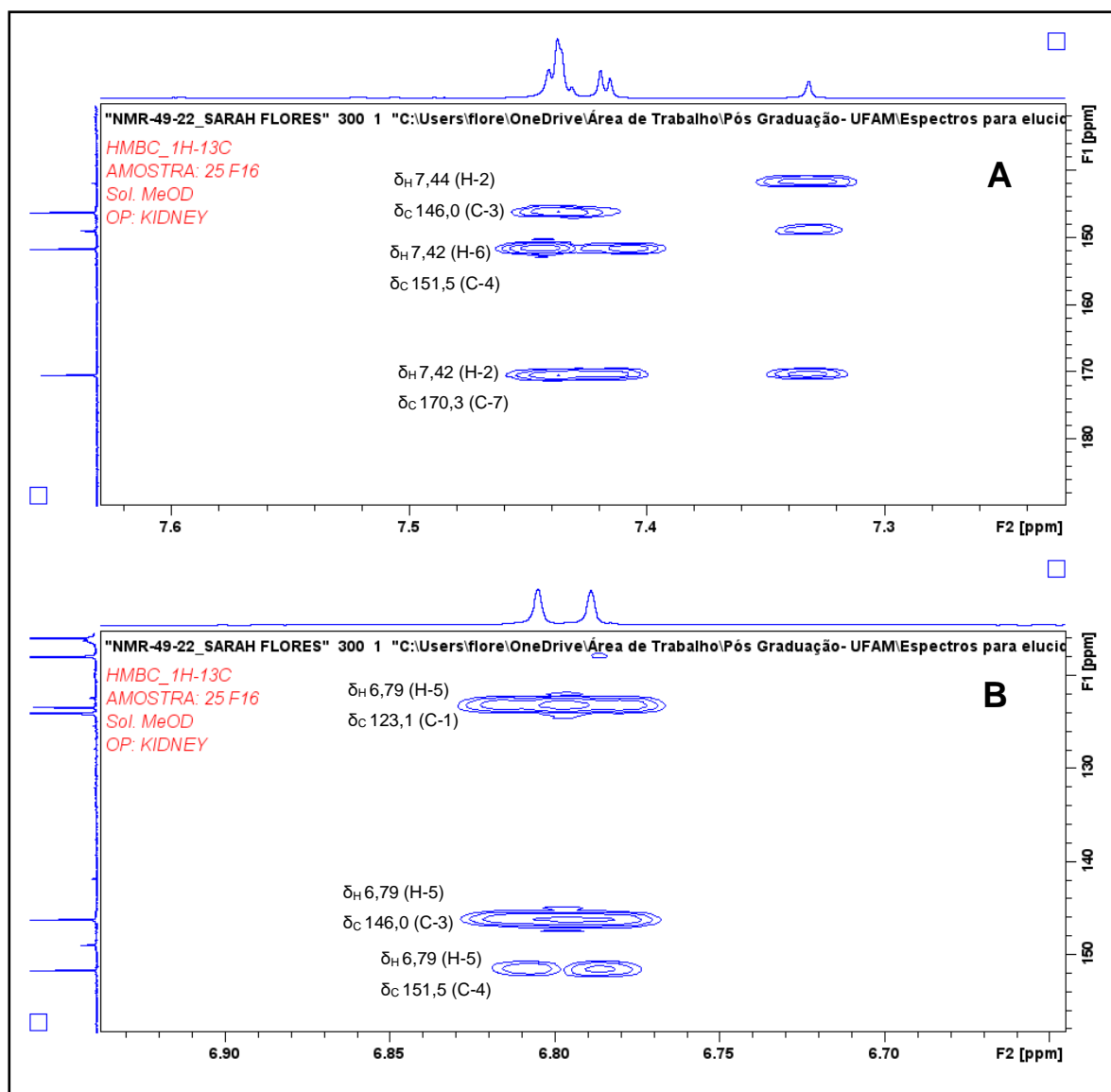


Figura 73. Ampliações do mapa de correlações HMBC de **SF14-16**. Correlações de H-2 e H-6 **(A)**. Correlações de H-5 **(B)**.

TABELA 29. Correlações HMBC, do ácido Protocatecúico presente na **SF14-16**.

HMBC – SF14-16	
7.44 (H-2)	146,0 (C-3);
7.42 (H-6)	151,5 (C-4); 170,3 (C-7)
6.79 (H-5)	123,1 (C-1); 146,0 (C-3); 151,5 (C-4)

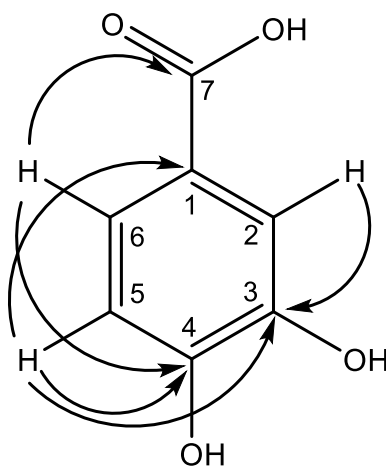


Figura 74. Correlações HMBC do Ácido Protocatecúico na fração **SF14-16**.

A **figura 75** mostra a ampliação do mapa COSY, destacando a correlação entre H-6 e H-5.

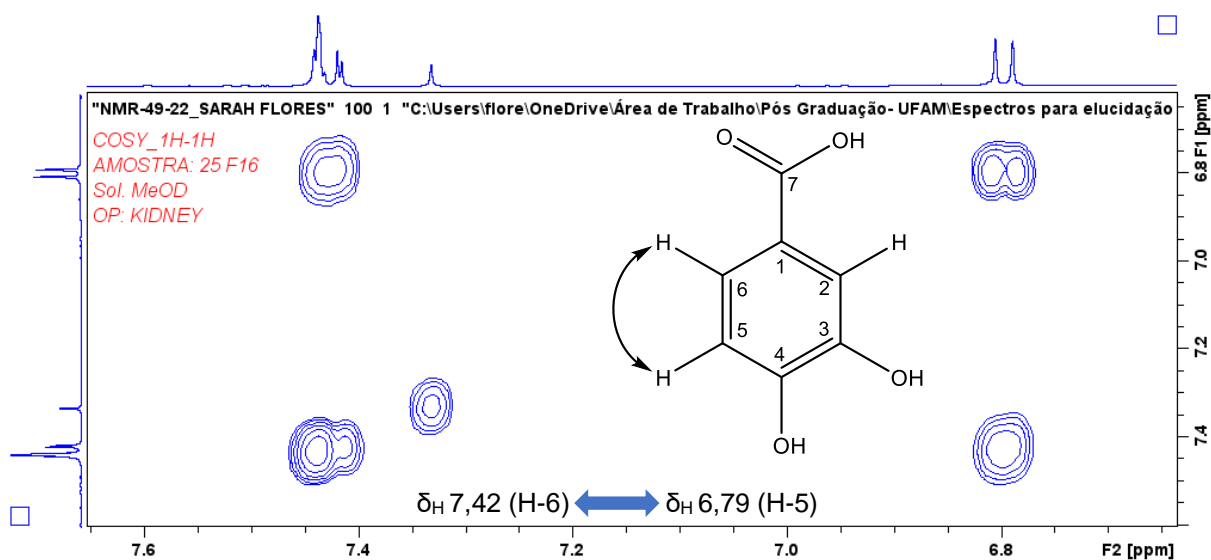


Figura 75. Ampliação do mapa COSY da fração **SF14-16**.

A **tabela 30** resume os dados observados nos espectros unidimensionais e nos mapas de correlações bidimensionais. Comparou os resultados com o artigo de OKBA et al., (2018) e confirmou a presença do Ácido Protocatecúico (**figura 76**), constituinte majoritário da fração **SF14-16**.

TABELA 30. Comparações dos sinais de RMN analisados de **SF14-11** e comparados com a literatura.

Posição	OKBA ET AL., 2018				SF14-16			
	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	J (Hz)	m	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	J (Hz)	m
7	170,9				170,3			
4	145,4				146,0			
3	151,1				151,5			
1	124,1				123,2			
6	122,7	7,45	8,1	d, 1H	123,9	7,42	2,0 e 8,0	dd, 1H
5	115,7	6,8	8,1	d, 1H	115,7	6,79	8,0	d, 1H
2	117,6	7,5		s, 1H	117,7	7,44	2,0	d, 1H

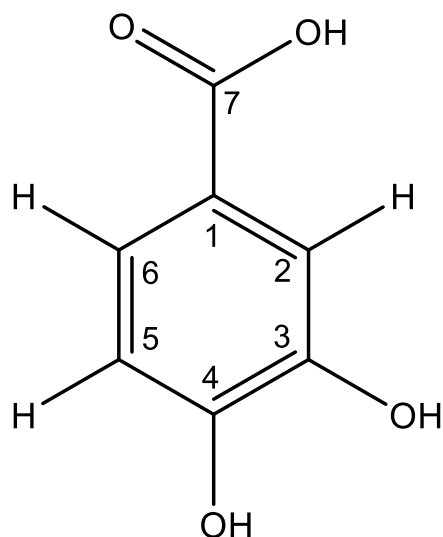


Figura 76. Estrutura do Ácido Protocatecúico, encontrado em **SF14-16**.

6.5.4. Elucidação estrutural de SF14-24

6.5.4.1. Análise de prospecção em placas

A subfração **SF14-24** (3,2 mg) aparentou um sólido amorfo marrom (**Figura 77 A**). As análises por CCD, apresentaram uma mancha com fator de retenção (F_R) próximo de 0,35. A placa revelada com vanilina sulfúrica, desenvolveu uma mancha vermelha. De acordo com (NAM *et al.*, 2015), as proantocianidinas revelam nesse tom quando reagem com vanilina sulfúrica. Já a CCD revelada com solução de DPPH• mostrou uma mancha amarela, indicando a inibição de radicais da **SF14-24**. (**Figura 77 B**).

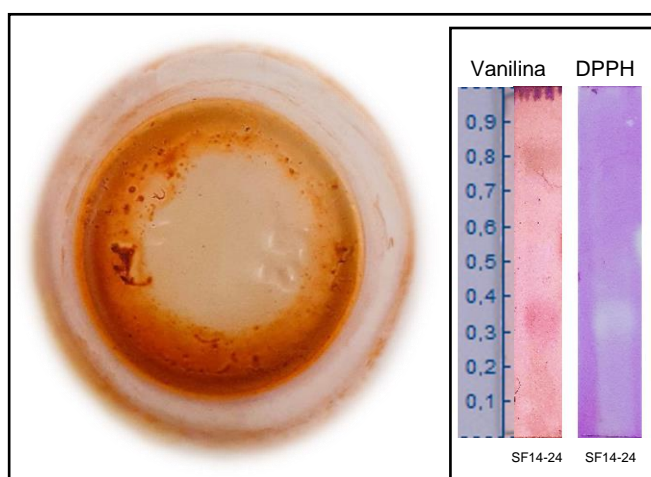


FIGURA 77. Fração SF14-24 (**A**). Placas cromatográficas da SF14-24, eluída com sistema B e revelada com vanilina e DPPH• (**B**).

6.5.4.2. Espectrometria de massas

O espectro de massas $[M-H]^-$, indicou o íon molecular ($C_{30}H_{23}O_{12}^-$) como pico alvo do estudo (**figura 78A**), que indicou um peso molecular de 576 Da, a fórmula molecular proposta foi **$C_{30}H_{24}O_{12}$** . A fragmentação gerou: m/z 449 ($C_{24}H_{17}O_9^-$), m/z 289 ($C_{15}H_{13}O_6^-$), m/z 539 ($C_{30}H_{19}O_{10}^-$), m/z 423 ($C_{22}H_{15}O_9$) e m/z 285 ($C_{15}H_9O_6^-$) (**figura 78 B**). O padrão de fragmentações norteou as sugestões para um dímero de epicatequina, especificamente, uma proantocianidina do tipo A (DE TAEYE *et al.*, 2017) (**tabela 31**).

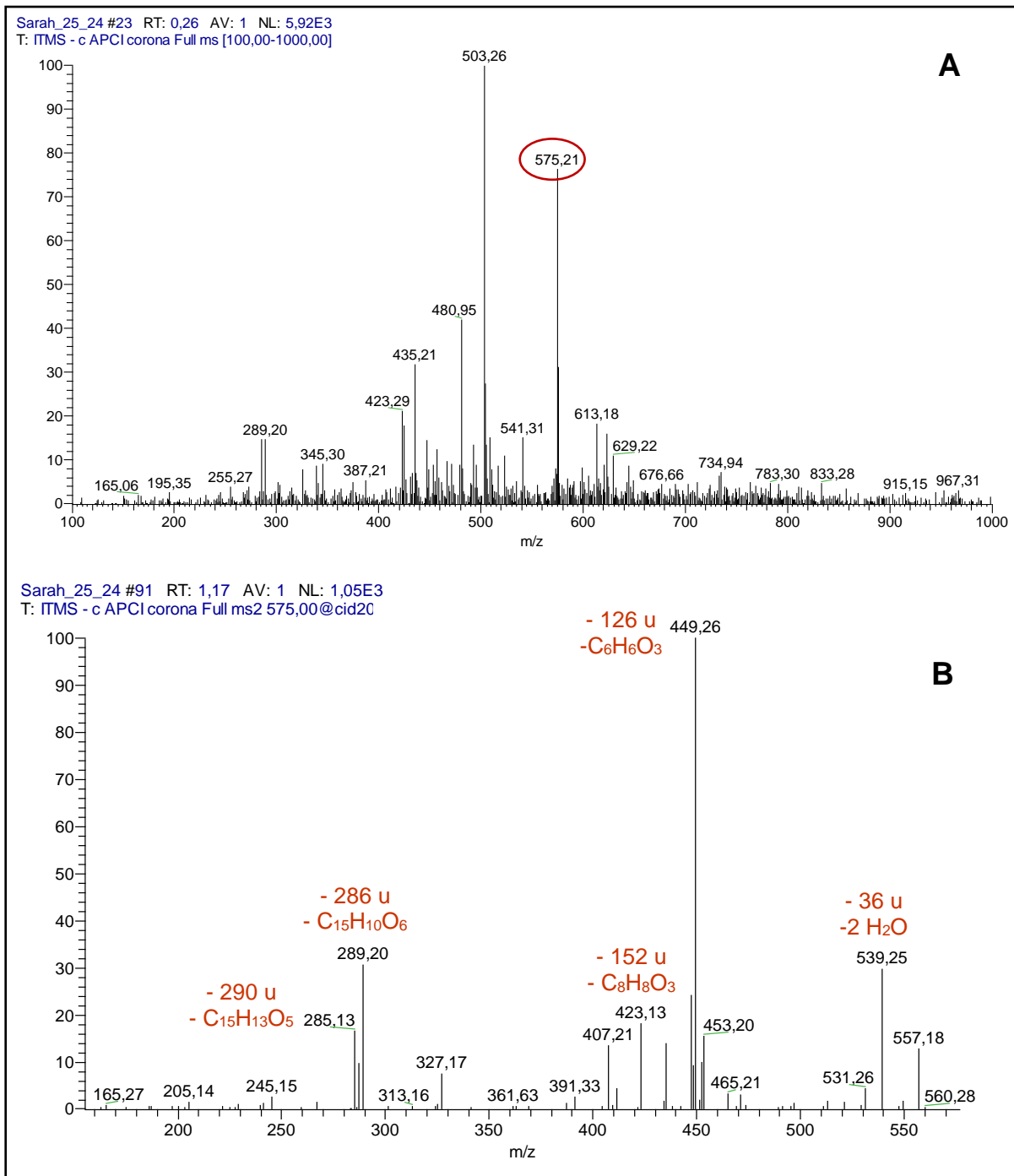
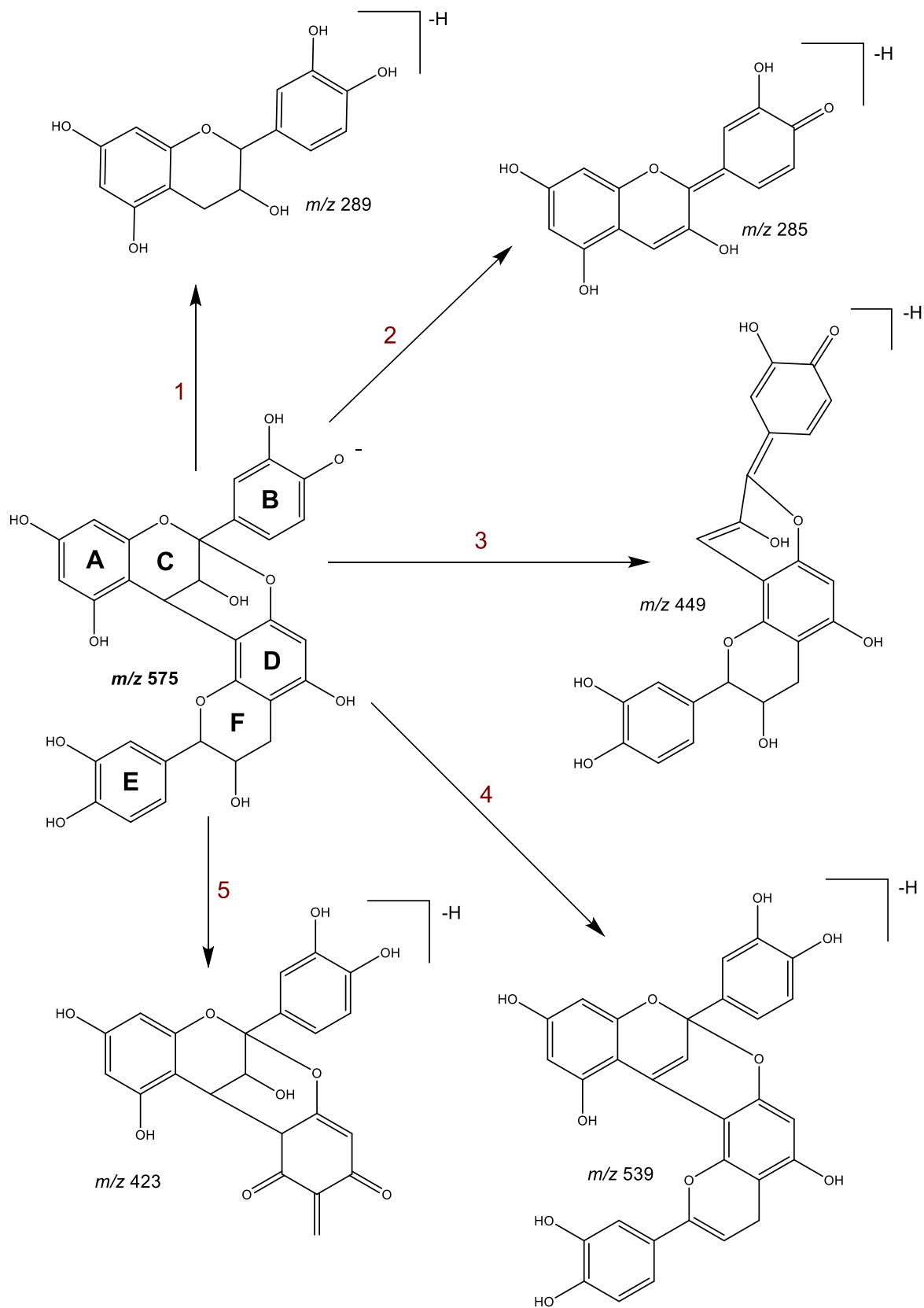


FIGURA 78. Espectro de massas (varredura-modo negativo) do perfil da **SF14-24** (A). Espectro de fragmentação do íon m/z 575 (B). Fonte de ionização: ESI.

TABELA 31. Íons percussores observados no espectro de massas EM² de SF14-24, comparados com a literatura.

DE TAEYE <i>et al.</i> , 2017		SF14-24	
[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	EM ²	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	EM ²
	575 449 (100)		575 449 (100)
	539 (47)		539 (32)
	423 (42)		423 (18)
	289 (30)		289 (32)
	407 (15)		285 (16)
	557 (14)		

O **Esquema 4** apresenta as propostas de fragmentações da proantocianidina A. As rotas **1** e **2** propuseram quebras entre as ligações 2β→7 e 4β→8, em determinado momento gerando o monômero (catequina) ***m/z* 289** e em outra ocasião formando o íon ***m/z* 285** com um anel quinona metida no lugar do anel **B**. A proposta da rota **3** foi baseada em uma fissão do anel heterocíclico (**C**) gerando o pico ***m/z* 449**. O íon ***m/z* 539** (rota **4**) é o resultado de duas clivagens de duas moléculas de H₂O. A rota **5** indicou uma reação Retro Diels-Alder formando o íon ***m/z* 423**.



ESQUEMA 7. Proposta de fragmentações da estrutura presente em **SF14-24**. Adaptado de (DE TAEYE *et al.*, 2017; HSU *et al.*, 2018).

6.5.4.3. Ressonância Magnética nuclear (1D e 2D)

O espectro de RMN de ^1H (**figura 79**) de **SF14-24** indicou presença de hidrogênios aromáticos, metilênicos e metínicos ligados a carbonos carbinólicos. Os sinais variaram entre δ 7,15 e δ 2,73. Tais sinais observados compatibilidade com a estrutura molecular de um dímero de catequinas do tipo A, sendo conhecida como a **Proantocianidina A2 (POA A2)**, apoiando as propostas das análises anteriores (NAM *et al.*, 2015; PAVIA *et al.*, 2015; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

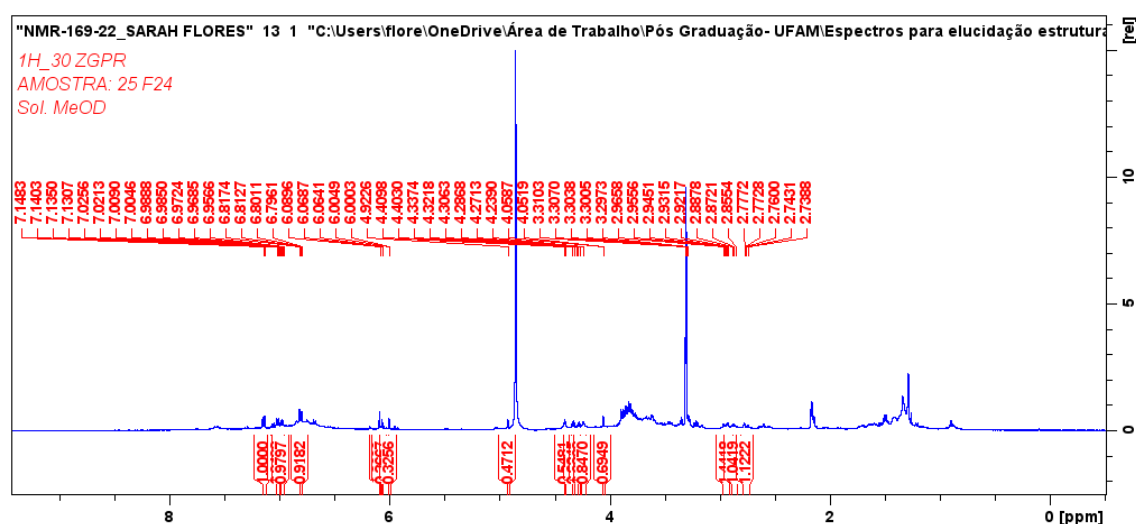


Figura 79. Espectro de RMN ^1H da subfração **SF14-24**.

A **figura 80** mostra ampliação do espectro RMN ^1H da região dos hidrogênios aromáticos presentes nos anéis B e E. Observou os sinais δ 7,13 (H-2', d, 1H), δ 7,01 (H-6', dd, 1H) e δ 6,804 (H-5', d, 1H) pertencentes ao anel B. Os sinais δ 7,15 (H-2', d, 1H), δ 6,97 (H-6', dd, 1H) e δ 6,809 (H-5', d, 1H) para o anel E. As constantes de acoplamento apresentadas, indicaram interações entre os hidrogênios 2' e 6' acoplando em *meta* $J \approx 2,0$ Hz, e o acoplamento em *orto* entre o H-5' e H-6' com $J \approx 8,0$ Hz (PAVIA *et al.*, 2015). A estrutura com as propostas de assinalamento dos hidrogênios dos anéis B e E está representada na **figura 81**.

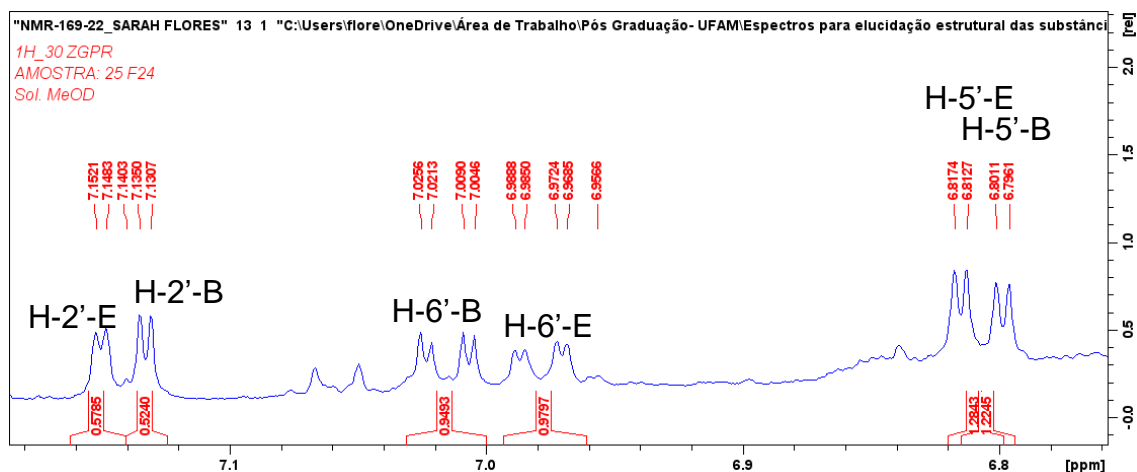


Figura 80. Ampliação do espectro de RMN ^1H da subfração **SF14-24**, região dos sinais dos hidrogênios ligados aos anéis B e E.

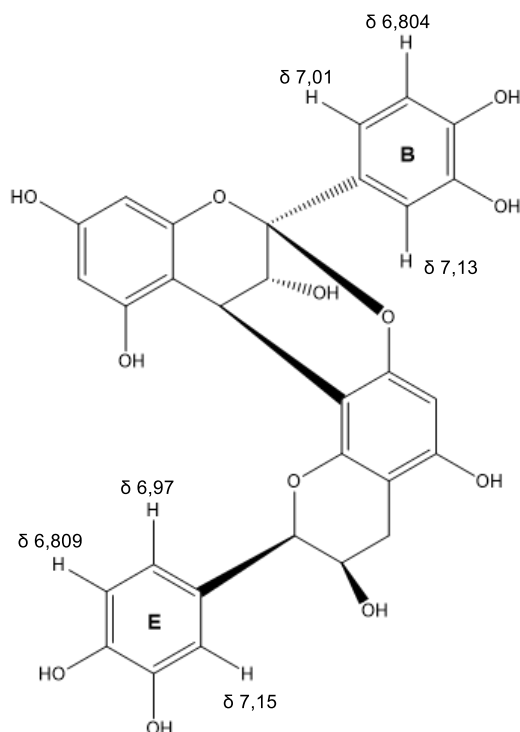


Figura 81. Proposta de assinalamento dos sinais dos hidrogênios ligados aos anéis B e E da POA A2.

A **figura 82** apresenta a ampliação do espectro de RMN na faixa quem se encontram os sinais dos hidrogênios dos anéis A e D, com os deslocamentos δ 6,06 (H-8, d, 1H) e δ 6,00 (H-6, d, 1H) no anel A e δ 6,08 (H-6, d, 1H) no anel D. Os sinais do anel A apresentaram $J = 2,2$ Hz,

caracterizando acoplamento *meta* (PAVIA *et al.*, 2015). A **figura 83** demonstra a localização dos hidrogênios na estrutura.

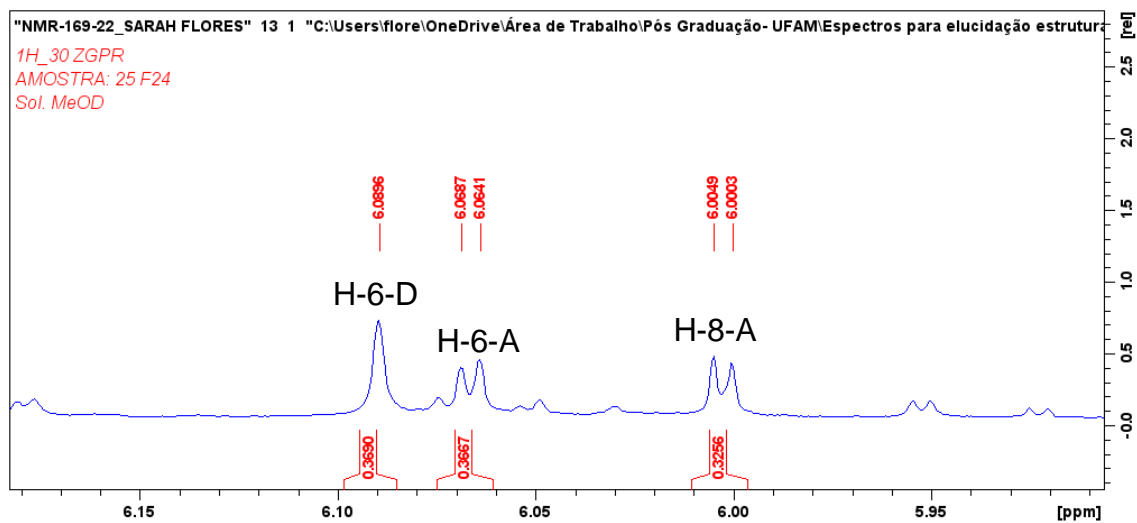


Figura 82. Ampliação do espectro de RMN ^1H da subfração SF14-24, região dos sinais dos hidrogênios ligados aos anéis A e D.

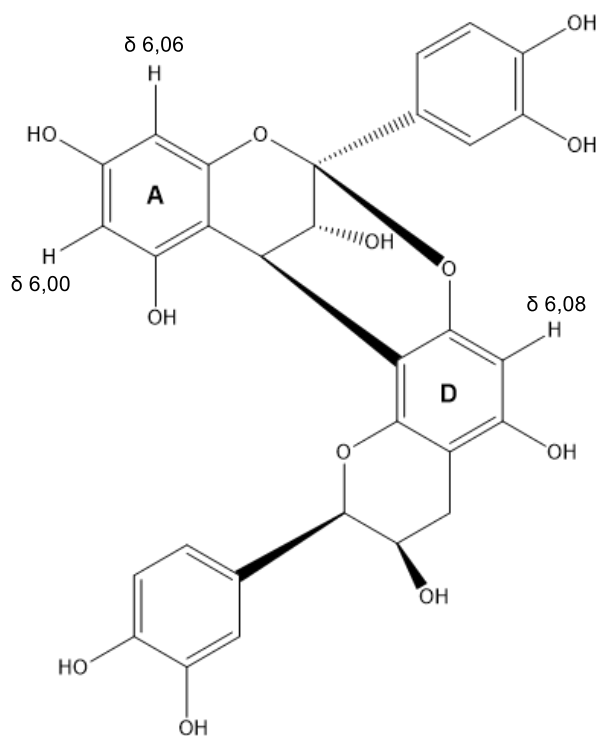


Figura 83. Proposta de assinalamento dos sinais dos hidrogênios ligados aos anéis A e D da POA2.

A **figura 84** mostra a ampliação do espectro nas regiões dos hidrogênios metínicos e metilênicos dos anéis C e F. No anel C (**figura 84 A**), foram identificados dois dupletos caindo em δ 4,40 (H-4, d, 1H) e δ 4,05 (H-3, d, 1H), apresentando $J = 3,4$ Hz propondo acoplamento entre os hidrogênios equatoriais do anel. Já para o anel F, observam-se os sinais em δ 4,92 (H-2, s, 1H), δ 4,23 (H-3, m, 1H) na **figura 84 A** e dois duplodupletos referentes aos hidrogênios diasterotópicos no carbono 4, sendo o alfa com δ 2,75 (H-4 α , dd, 1H) e o beta δ 2,94 (H-4 β , dd, 1H) na **figura 84 B**. As propostas dos hidrogênios assinalados estão na **figura 85**.

A **tabela 32** apresenta os dados analisados do espectro de RMN ^1H de **SF14-24** comparados com os dados de (NAM *et al.*, 2015)

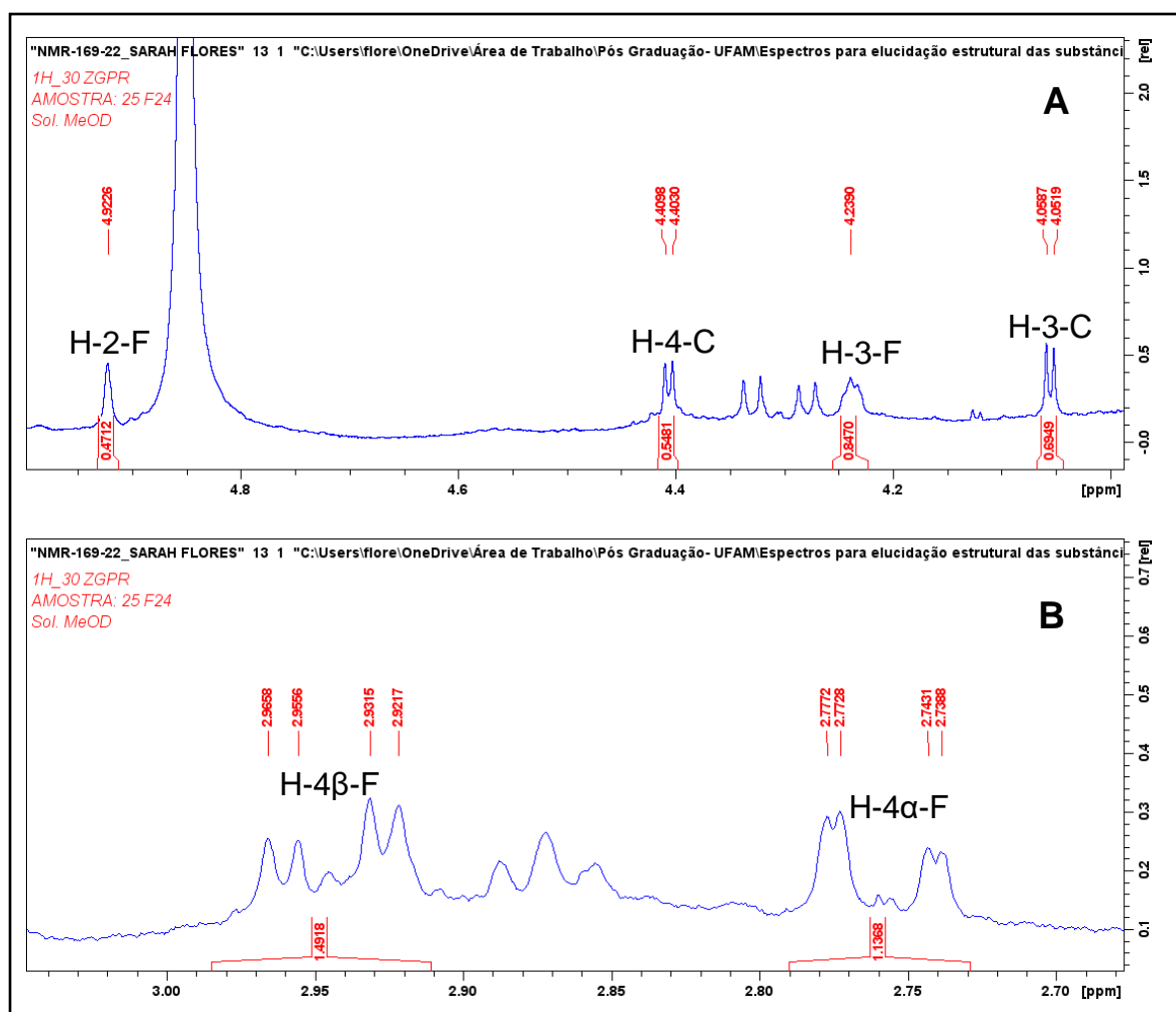


Figura 84. Ampliação do espectro de RMN ^1H da subfração SF14-24, região dos sinais dos hidrogênios ligados aos anéis C e F.

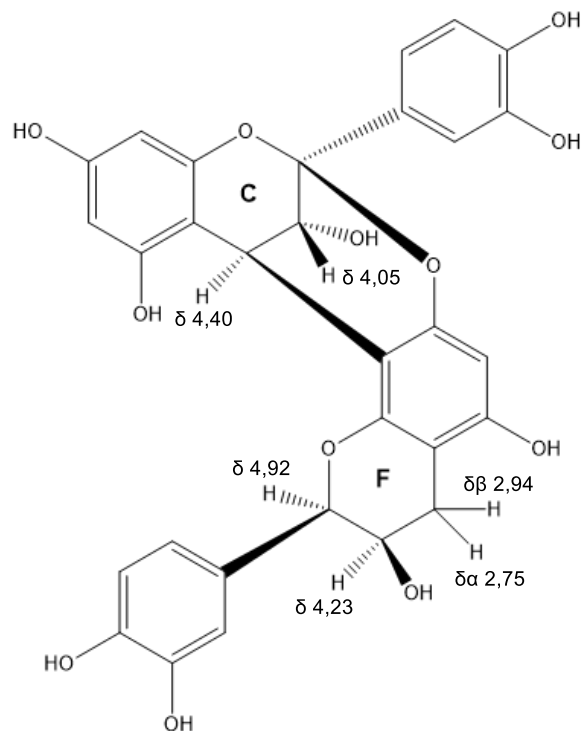


Figura 85. Proposta de assinalamento dos sinais dos hidrogênios ligados aos anéis C e F da POA2.

TABELA 32. Sinais de ^1H observados no espectro de SF13-26 e comparados com a literatura (esquerda).

NAM, <i>et al</i> , 2015				SF-14-24		
Posição	^1H (ppm)	J (Hz)	m	^1H (ppm)	J (Hz)	m
3-C	4,05	3,3	d	4,05	3,4	d,1H
4-C	4,41	3,3	d	4,40	3,4	d, 1H
6-A	6,00	2,3	d	6,00	2,3	d, 1H
8-A	6,06	2,3	d	6,06	2,3	d, 1H
2'-B	7,13	2,1 e <0,1	dd	7,13	1,9	d, 1H
5'-B	6,80	8,2 e <0,1	dd	6,80431	8,2	d, 1H
6'-B	7,01	8,2 e 2,14	dd	7,01	1,9 e 8,2	dd, 1H
2-F	4,93	1,3 e -0,33	dd	4,92		s, 1H
3-F	4,24	4,85; 4,76 e 1,38	ddd	4,23		m,1H
4 α -F	2,76	16,9 e 2,76	dd	2,75	17,1 e 2,2	dd, 1H
4 β -F	2,95	16,9 e 4,85	dd	2,94	17,1 e 5,1	dd, 1H
6-D	6,09		s	6,08		s, 1H
2'-E	7,15	2,0; -0,33 e <0,1	ddd	7,15	2,1	d, 1H
5'-E	6,81	8,1 e <0,1	dd	6,80962	8,3	d, 1H
6'-E	6,98	8,1 e 2,0	dd	6,97	2,1 e 8,3	dd, 1H

A **figura 86** mostra o mapa de correlações HSQC da amostra **SF14-24**. A partir dessas análises bidimensionais, será possível identificar os sinais dos carbonos-13, uma vez que, não foi possível extrair informações dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT-135 dessa subfração

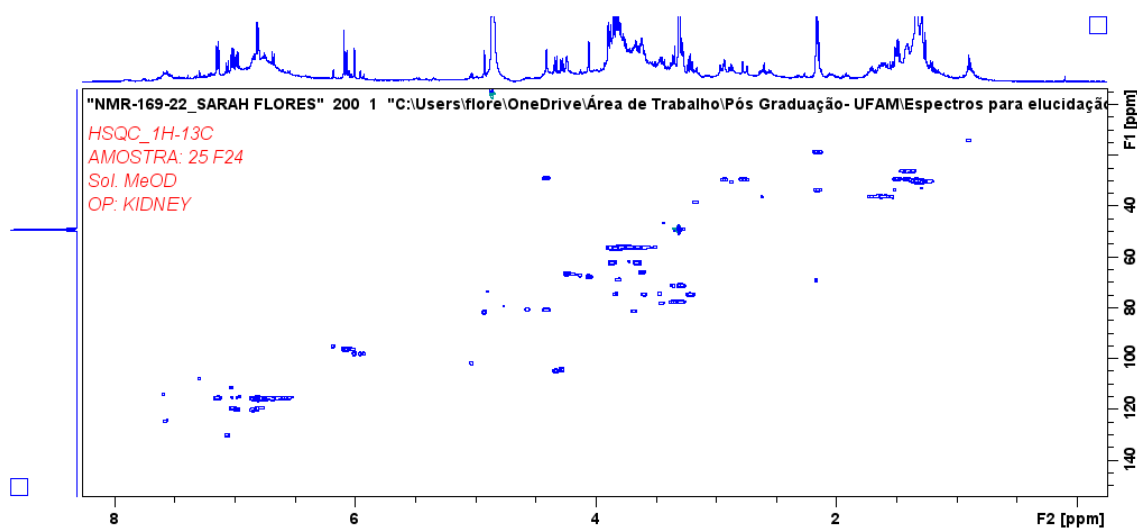


Figura 86. Mapa de correlações HSQC da subfração SF14-24.

A **figura 87** apresenta as ampliações do mapa os átomos presentes nos anéis aromáticos B, E, A e D. A ampliação **(87 A)** indicou os sinais pertencentes ao anel E: δ 7,15 (H-2') ligado ao carbono C-2' (δ 115,7); δ 6,97 (H-6') com C-6' (δ 120,1), e do H-5' (δ 6,804) com o C-5' (δ 115,6). Para o anel B houveram correlações: δ 7,13 (H-2') ligado ao carbono C-2' (δ 115,4); δ 7,01 (H-6') com C-6' (δ 119,6), e do H-5' (δ 6,809) com o C-5' (δ 115,6). Já na ampliação **(87 B)** foram observados os sinais do anel D: δ 6,08 (H-6) correlacionado com δ 96,3 (C-8) e para o anel A foram δ 6,06 (H-8) ligado ao δ 96,4 (C-8) e δ 6,00 (H-6) ligado ao δ 98,1 (C-6).

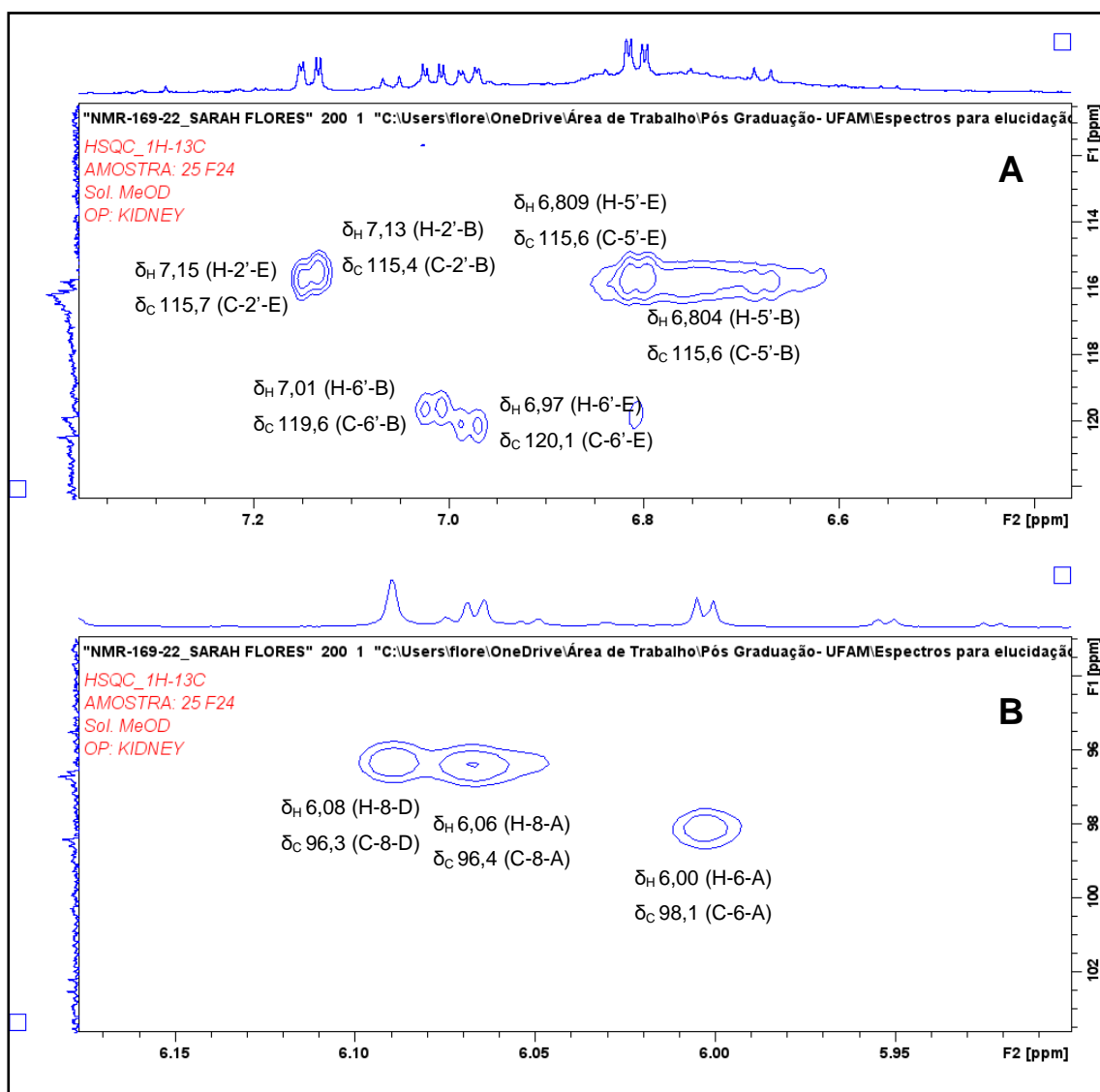


Figura 87. Ampliação do mapa de correlações HSQC na região dos sinais de ^1H e ^{13}C presentes os anéis aromáticos B e E **(A)** e A e D **(B)** da subfração SF14-24.

A **figura 88** mostra as ampliações do mapa da região dos hidrogênios ligados aos carbonos dos anéis C e F da estrutura. Na ampliação **(A)** está o sinal δ 4,92 (H-2) ligado ao δ 79,8 (C-2) do anel F. A ampliação **(B)** mostra as correlações de δ 4,23 (H-3) ligado ao δ 66,8 (C-3) (anel F) e os sinais δ 4,40 (H-4) e δ 4,05 (H-3) do anel C. Por fim, em **(C)** mostra as correlações do grupo metileno, δ 2,85 (H-4 α) e δ 2,73 (H-4 β) ligados carbono com sinal δ 29,3 (C-4).

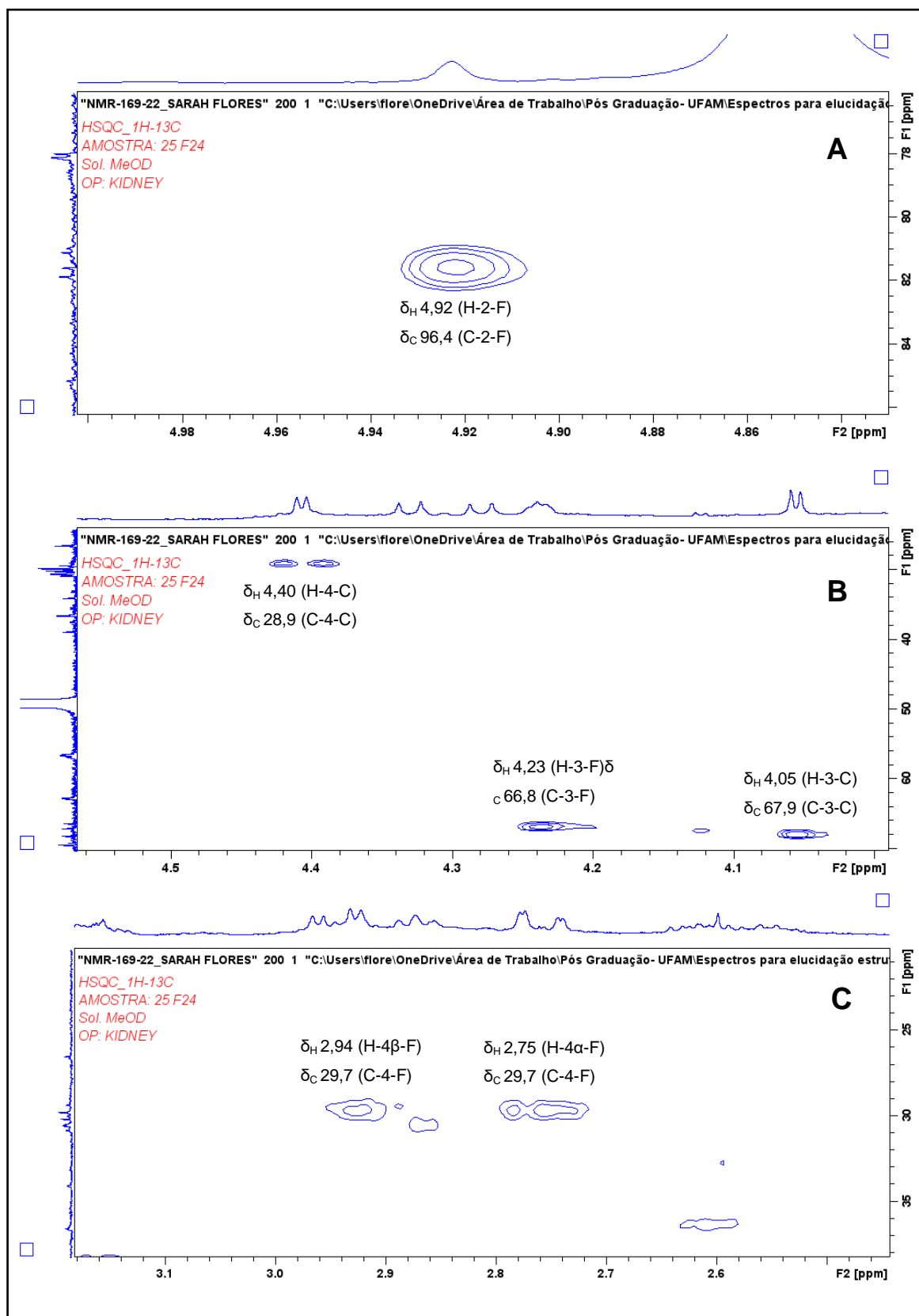


Figura 88. Ampliação do mapa na faixa dos sinais dos anéis C e F POA2 proposta na subfração SF14-24.

A **Tabela 33** apresenta as correlações observadas no mapa HSQC de **SF14-24**. Os sinais foram comparados com o estudo de NAM e colaboradores (2015), assim concordando com a proposta voltada para POA2 (**figura 89**), bem como foi essencial para a atribuição dos sinais corretos para os carbonos hidrogenados.

TABELA 33. Sinais observados no mapa de correlações HSQC da subfração SF14-24.

Posição	NAM, <i>et al</i> , 2015		SF14-24	
	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)
3-C	68,1	4,05	67,9	4,05
4-C	29,2	4,41	28,9	4,40
6-A	98,2	6,00	98,1	6,00
8-A	96,6	6,06	96,4	6,06
2'-B	115,6	7,13	115,4	7,13
5'-B	115,9	6,80	115,6	6,80
6'-B	119,7	7,01	119,6	7,01
2-F	81,8	4,93	81,5	4,92
3-F	67,0	4,24	66,8	4,23
4α-F	29,9	2,76	29,7	2,75
4β-F		2,95		2,94
6-D	96,4	6,09	96,3	6,08
2'-E	116,0	7,15	115,7	7,15
5'-E	115,6	6,81	115,6	6,81
6'-E	120,3	6,98	120,1	6,97

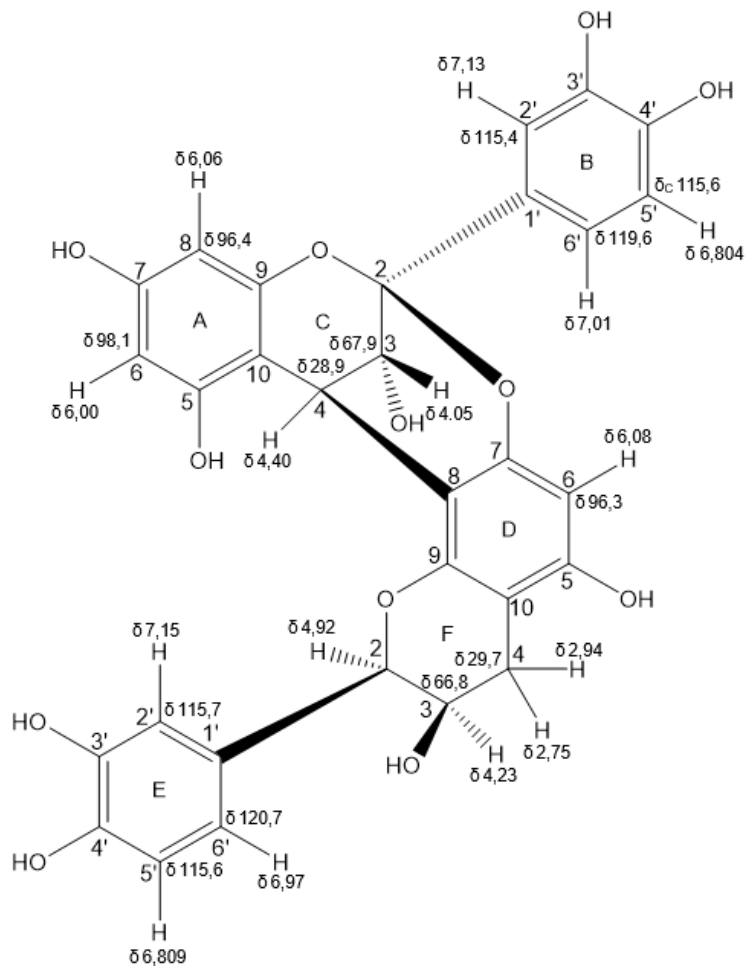


Figura 89. Assinalamento para os carbonos e hidrogênio de acordo com o mapa de correlações HSQC da subfração SF14-24.

A análise bidimensional HMBC auxiliou na busca pelos sinais dos carbonos quaternários presentes na estrutura, indicando os acoplamentos entre hidrogênios e carbonos a partir de duas ligações de distância. A **figura 90 A** apresenta a ampliação do mapa na faixa dos sinais dos hidrogênios localizados nos anéis B e E. Foram observadas as correlações: H-2' → C-6' (3J) e C-4' (3J), entre H-6' e C-2' (3J) e C-3' (3J), para o anel E. Com sinais muito próximos, o anel B apresentou as seguintes correlações: H-2' com C-6' (3J) e C-3' (2J) e H-6' com C-2' (3J) e C-3' (4J). Na **figura 90 B** estão as correlações dos hidrogênios 5 dos anéis B e E. Ocorreram entre: H-5': C-1' (3J) e C-3' (3J)- anel E e H-5': C-1' (3J) e C-3' (2J). Já a **figura 90 C** mostrou as correlações do anel D: H-6 e C-10 (3J), C-8 (3J), C-7 (2J) e C-5 (2J).

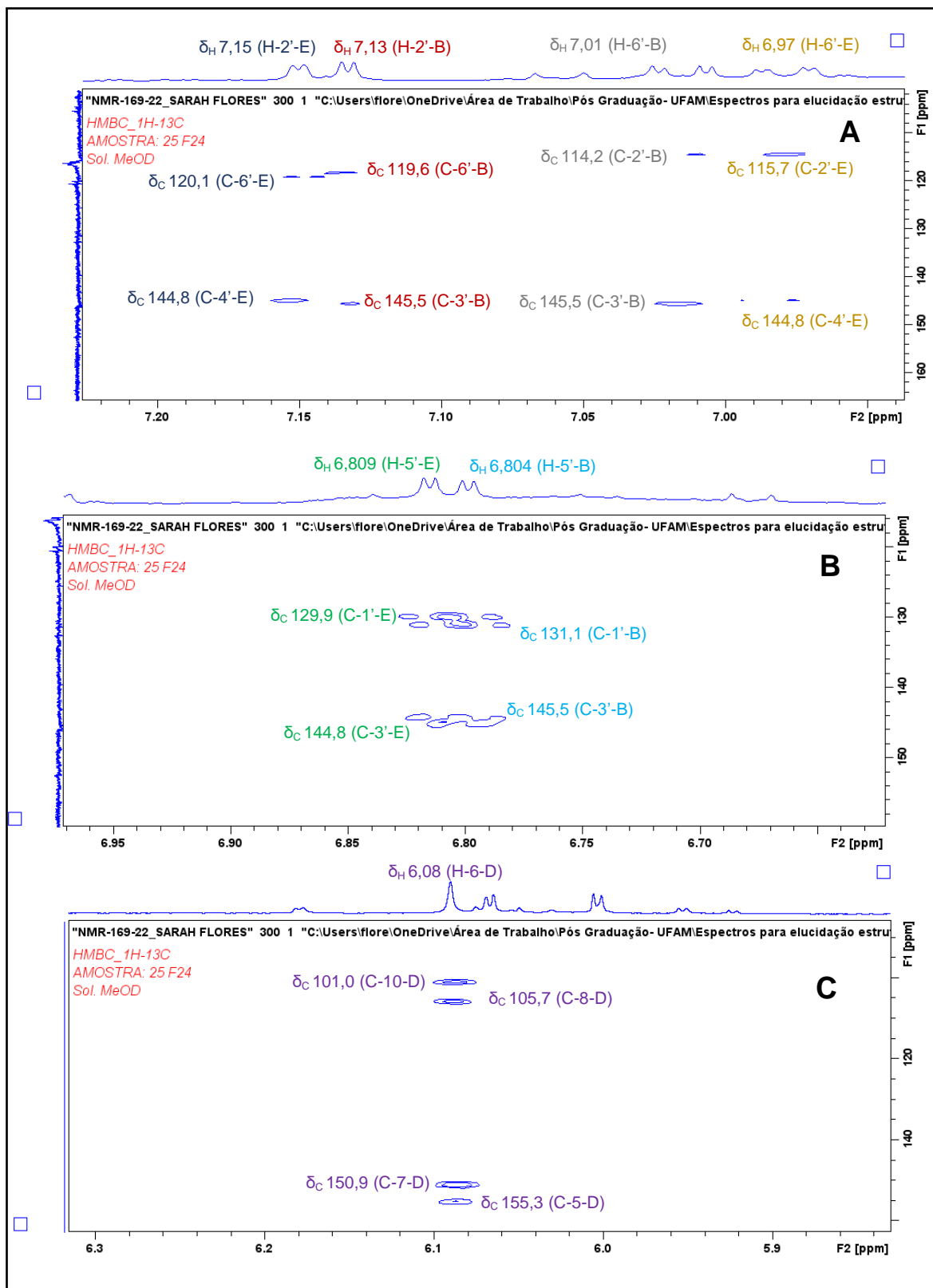


Figura 90. Ampliação do mapa de correlações HMBC, na região dos sinais aromáticos dos anéis B, E e D da POA2 presente a subfração SF14-24.

A **figura 91** apontou as interações entre o H-4 do anel C e os carbonos dos anéis A, C e D: O mapa mostrou seis correlações com os carbonos C-3-C (2J), C-6-D (4J), C-10-A (2J), C-8-D (2J), C-7-D (3J), C-9-A (3J) e C-6-A (4J). As correlações analisadas do H-4-C foram essenciais para a determinação estruturas da molécula por indicar as ligações entre os dois monômeros catequina e epicatequina, formando o dímero Proantocianidina A2. Também foi observada a correlação entre H-3-C e C-10-A.

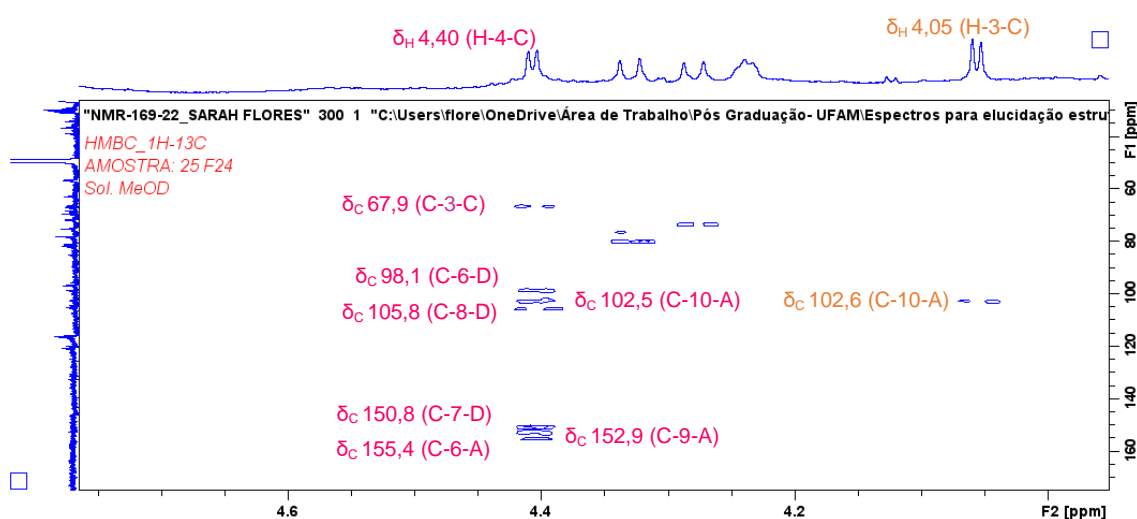


Figura 91. Ampliação do mapa de correlações HMBC, na região dos sinais dos hidrogênios metínicos do anel C da POA2 proposta na subfração SF14-24.

A **figura 92 (A)** mostra as interações entre H-2-F e os carbonos: C-2' (3J), C-6' (3J) e C-1' (2J) do anel aromático E. Já a ampliação **(B)** indica as interações entre hidrogênio beta (H-4 β) do metileno (anel F) com os núcleos de C-10 (2J), C-7 (5J) e C-5 (3J) do anel D. A **tabela 34** apresenta o resumo das correlações observadas no mapa HMBC e a **figura 93** demonstra as correlações na estrutura da POA2.

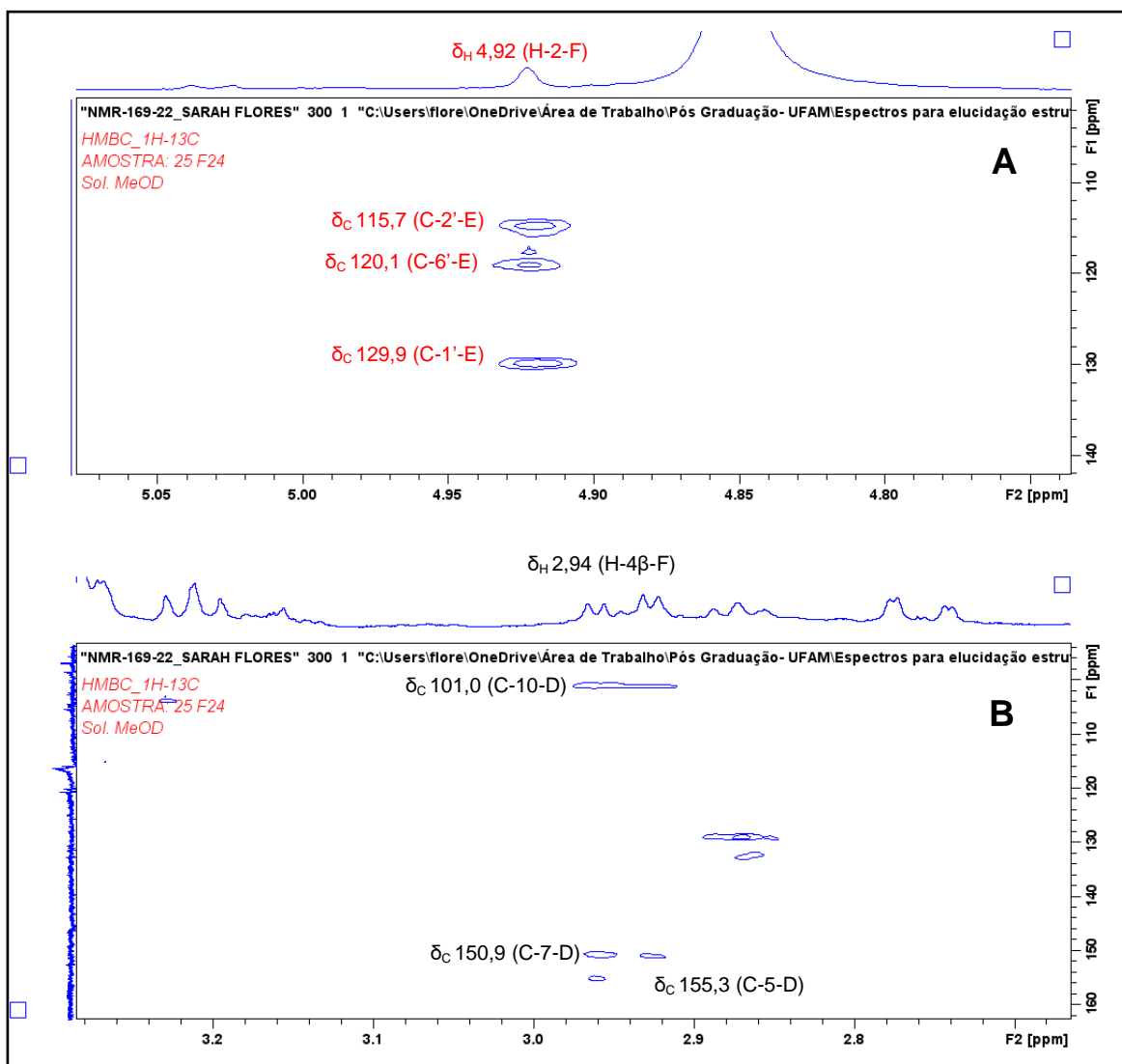


Figura 92. Ampliação do mapa de correlações HMBC, na faixa dos sinais dos hidrogênios 2 (A) e 4β (B) do anel F.

TABELA 34. Sinais observados no mapa de correlações HMBC gerado da subfração SF14-24.

Correlações HMBC - SF14-24	
7,15 (H-2'-E)	120,1 (C-6'-E) ; 144,8 (C-4'-E)
7,13 (H-2'-B)	119,6 (C-6'-B) ; 145,5 (C-3'-B)
7,01 (H-6'-B)	114,2 (C-2'-B) ; 145,5 (C-3'-B)
6,97 (H-6'-E)	115,7 (C-2'-E) ; 144,8 (C-4'-E)
6,809 (H-5'-E)	129,9 (C-1'-E) ; 144,8 (C-4'-E)
6,804 (H-5'-B)	131,1 (C-1'-B) ; 145,5 (C-3'-B)
6,08 (H-6-D)	101,0 (C-10-D) ; 105,7 (C-8-D) ; 150,9 (C-7-D) ; 155,3 (C-5-D)
4,92 (H-2-F)	115,7 (C-2'-E) ; 120,1 (C-6'-E) ; 129,9 (C-1'-E)
4,40 (H-4-C)	67,9 (C-3-C) ; 98,1 (C-6-D) ; 102,5 (C-10-A) ; 105,8 (C-8-D) ; 150,8 (C-7-D) ; 152,9 (C-9-A) ; 155,4 (C-6-A)
4,05 (H-3-C)	102,6 (C-10-A)
2,94 (H-4 α)	101,0 (C-10-D) ; 150,9 (C-7-D) ; 155,3 (C-5-D)

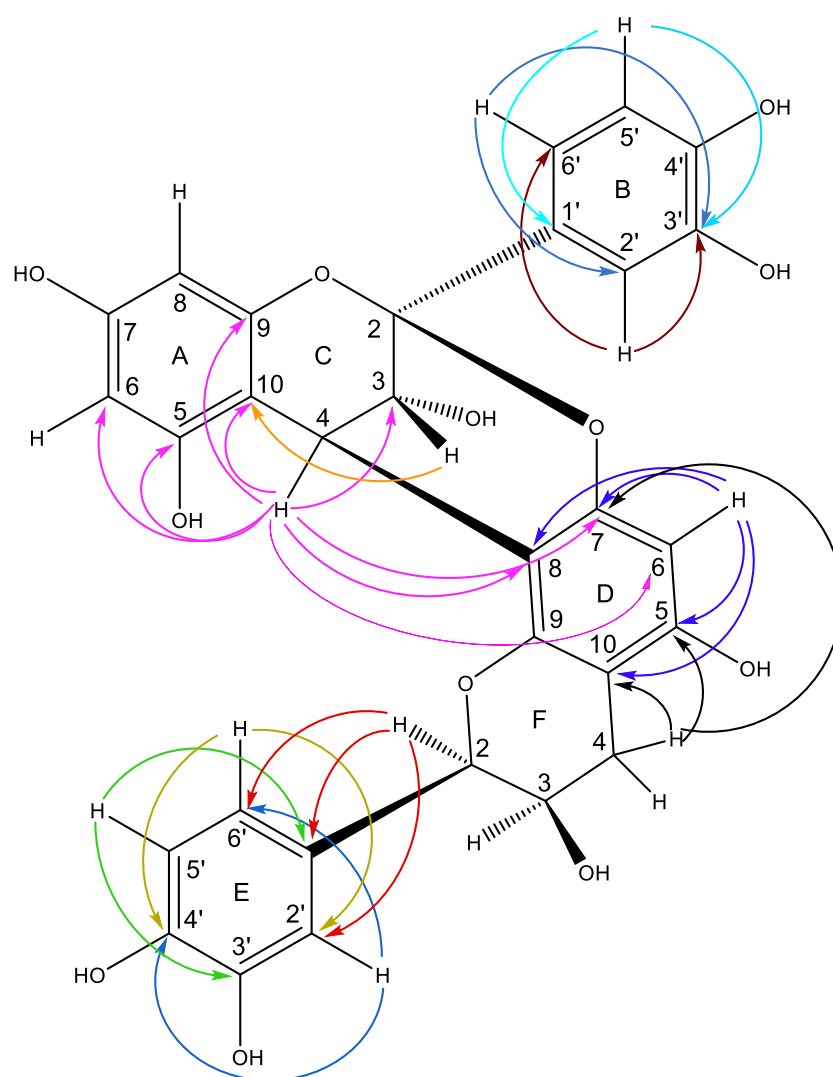


Figura 93. Correlações HMBC ocorrentes da Proantocianidina A2 encontradas na subfração SF14-24.

O mapa de correlações COSY apresentou acoplamentos entre os hidrogênios dos anéis B, E, C e F. A **figura 94** mostrou as correlações entre H-2'↔H-6' (retângulo vermelho) com acoplamento em 4J , a quatro ligações de distância (4J) e H-5'↔H-6' (retângulo verde escuro) acoplado em 3J do anel E. As interações entre os núcleos H-2'↔H-6' (retângulo azul escuro) e H-5'↔H-6' (retângulo amarelo), ocorreram também em 4J e 3J , nessa ordem.

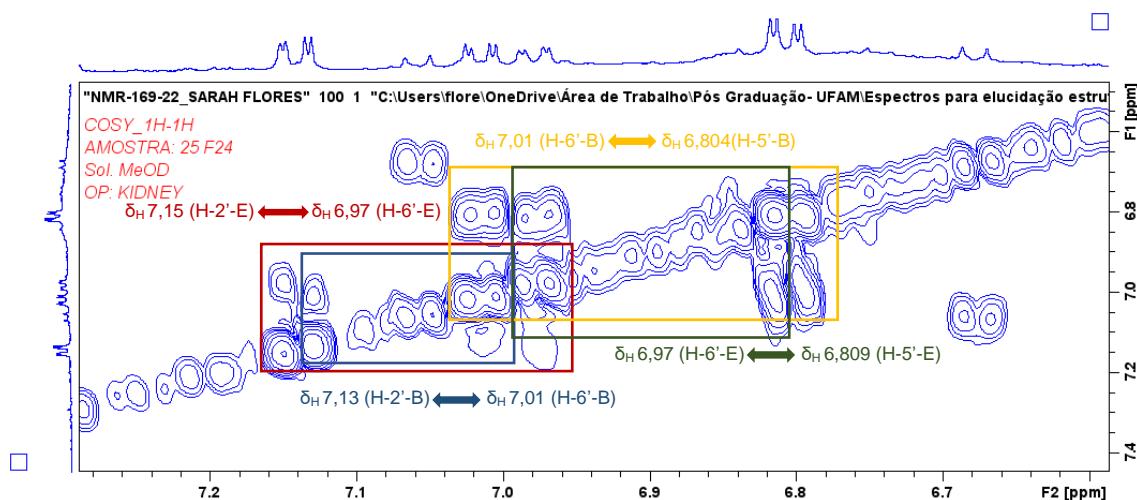


Figura 94. Ampliação do mapa de correlações COSY evidenciando os acoplamentos H-H dos anéis B e E da POA A2.

A **figura 95** apresentou a ampliação do mapa onde ocorreu a correlação entre H-4'↔H-3' (retângulo lilás) com acoplamento em 3J .

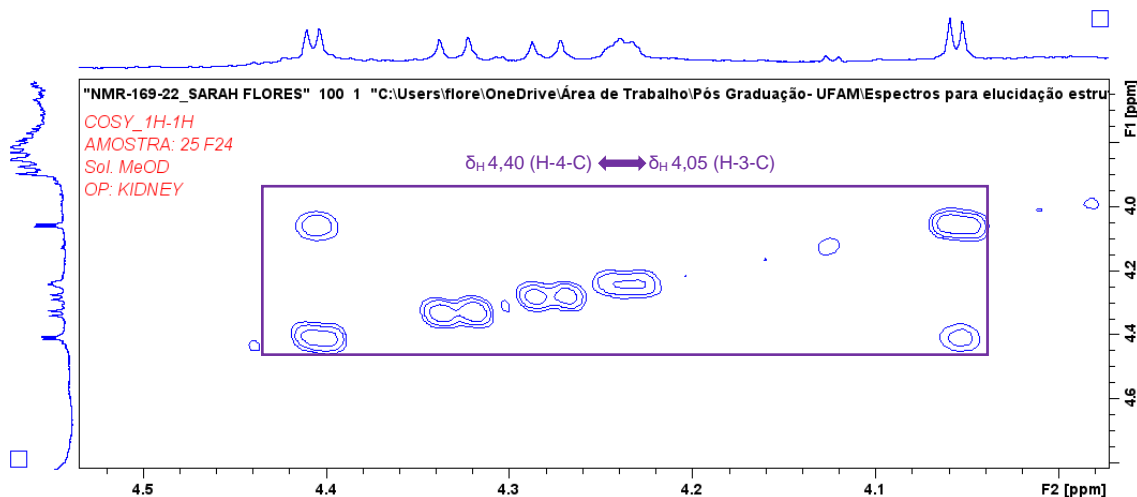


Figura 95. Ampliação do mapa de correlações COSY evidenciando o acoplamento H-H metínico do anel C da POA A2.

Também foram observados acoplamento entre os hidrogênios do anel pirona F. A **figura 96 A** mostrou as correlações entre H-2↔H-3 em 3J (linha verde claro), H-3↔H-4 β (retângulo roxo) acoplado em 3J e H-3↔H-4 α em 3J (retângulo vermelho claro). A **figura 96 B** mostra o acoplamento dos hidrogênios vicinais H-4 α ↔H-4 β (2J) destacado com o retângulo preto.

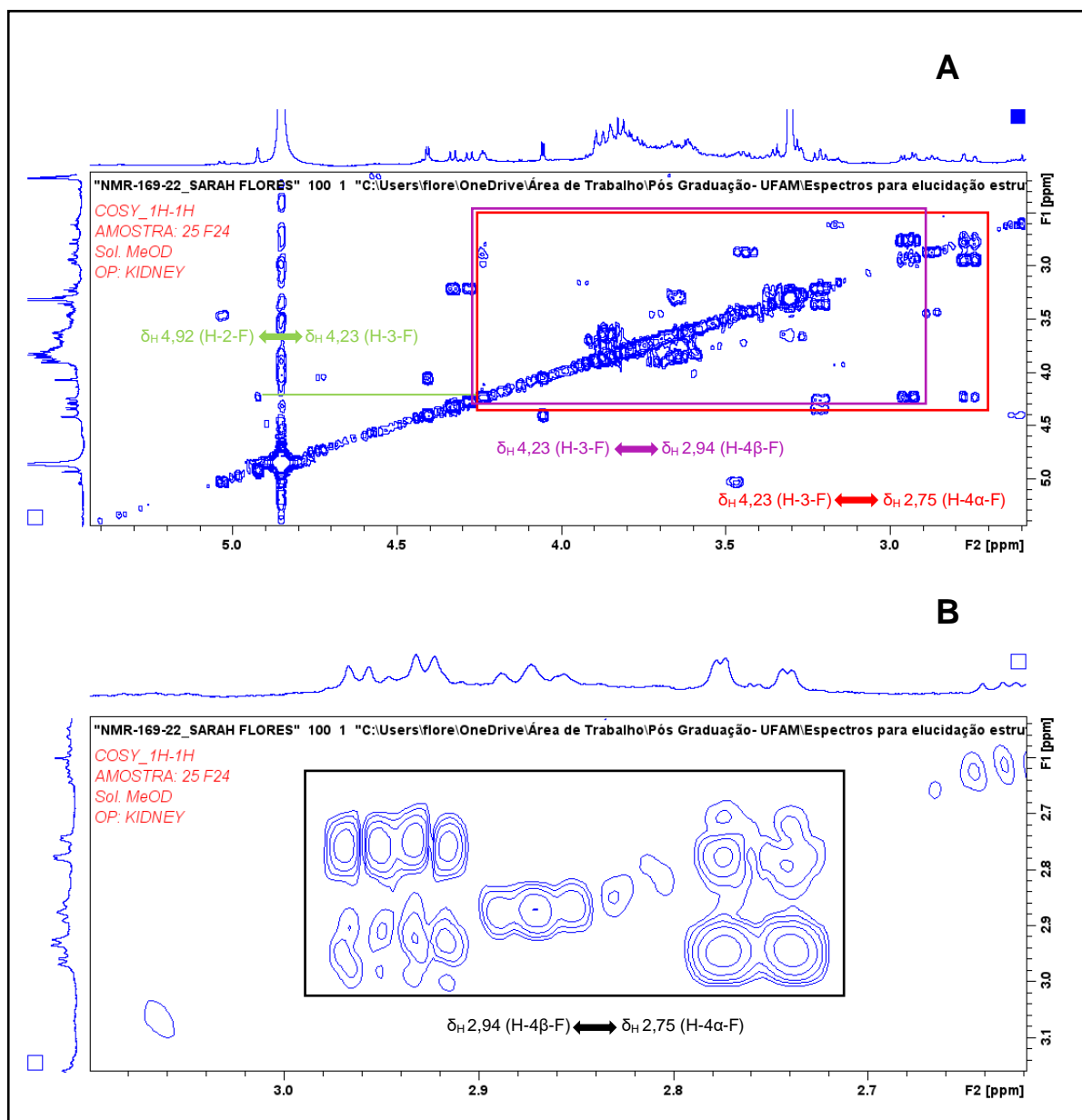


Figura 96. Ampliação do mapa COSY evidenciando os acoplamentos H-H apontados no anel F da POA2.

A **tabela 35** lista as correlações observadas no mapa COSY, as quais foram demonstradas na **figura 97**.

TABELA 35. Sinais observados no mapa de correlações HMBC gerado da subfração SF14-24.

Correlações COSY- SF14-24	
7,13 (H-2'-B)	7,01 (H-6'-B)
7,01 (H-6'-B)	6,80 (H-5'-B)
4,40 (H-4-C)	4,05 (H-3-C)
7,15 (H-2'-E)	6,97 (H-6'-E)
6,97 (H-6'-E)	6,81 (H-5'-E)
4,92 (H-2-F)	4,23 (H-3-F)
4,23 (H-3-F)	2,94 (H-4 α -F); 2,75 (H-4 β -F)
2,94 (H-4 α -F)	2,75 (H-4 β -F)

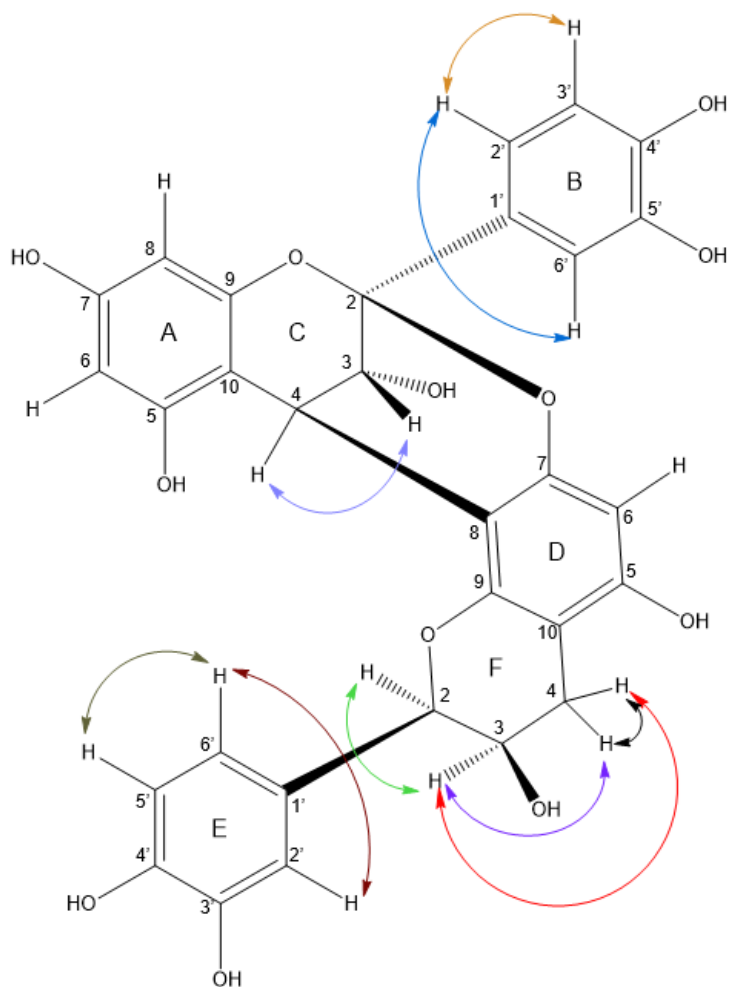


Figura 97. Ampliação do mapa COSY evidenciando os acoplamentos H-H apontados no anel F da POA A2.

A **tabela 36** resume os dados analisados dos espectros de RMN ^1H apoiados pelas técnicas bidimensionais de **SP14-24**. Após comparação com a literatura, foi possível confirmar coerentemente a presença da **Proantocianidina A2 (Figura 98)**.

TABELA 36. Comparações entre os sinais observados nos espectros de RMN e mapas bidimensionais com os resultados encontrados na literatura.

NAM, et al, 2015 (CD ₃ OD)					SF14-24 (CD ₃ OD)			
Posição	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	J (Hz)	m	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	J (Hz)	m
2-C	100,1				98,8			
3-C	68,1	4,05	3,3	d	67,9	4,05	3,4	d,1H
4-C	29,2	4,41	3,3	d	28,9	4,40	3,4	d, 1H
10-A	104,2				102,5			
5-A	157,0				155,4			
6-A	98,2	6,00	2,3	d	98,1	6,00	2,3	d, 1H
7-A	158,1				156,5			
8-A	96,6	6,06	2,3	d	96,4	6,06	2,3	d, 1H
9-A	154,2				152,9			
1'-B	132,4				131,1			
2'-B	115,6	7,13	2,1 e <0,1	dd	115,4	7,13	1,9	d, 1H
3'-B	145,6				145,5			
4'-B	146,7							
5'-B	115,9	6,80	8,2 e <0,1	dd	115,6	6,80	8,2	d, 1H
6'-B	119,7	7,01	8,2 e 2,14	dd	119,6	7,01	1,9 e 8,2	dd, 1H
2-F	81,8	4,93	1,3 e -0,33	dd	81,5	4,92		s, 1H
3-F	67,0	4,24	4,85; 4,76 e 1,38	ddd	66,8	4,23		m,1H
4 α -F		2,76	16,9 e 2,76	dd		2,75	17,1 e 2,2	dd, 1H
4 β -F	29,9	2,95	16,9 e 4,85	dd	29,7	2,94	17,1 e 5,1	dd, 1H
10-D	102,4				101,0			
5-D	156,6				155,3			
8-D	107,2				105,7			
7-D	152,3				150,9			
6-D	96,4	6,09		s	96,3	6,08		s, 1H
9-D	152,1							
1'-E	131,2				129,9			
2'-E	116,0	7,15	2,0; -0,33 e <0,1	ddd	115,7	7,15	2,1	d, 1H
3'-E	146,0							
4'-E	146,3				144,8			
5'-E	115,6	6,81	8,1 e <0,1	dd	115,6	6,81	8,3	d, 1H
6'-E	120,3	6,98	8,1 e 2,0	dd	120,1	6,97	2,1 e 8,3	dd, 1H

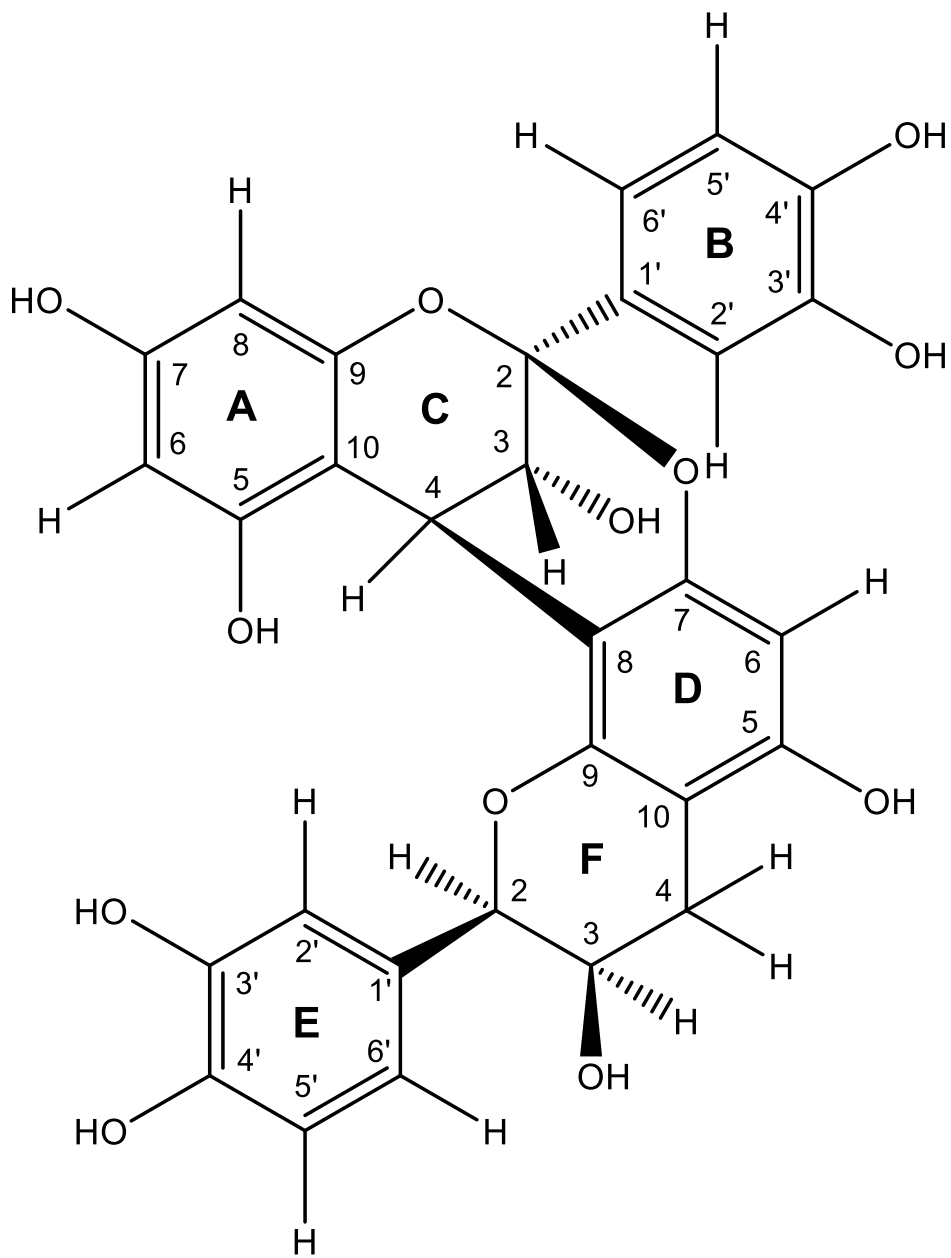


Figura 98. Estrutura da Proantocianidina A2, encontrada na **SF14-24**.

6.5.5. Determinação estrutural de SF16-26

6.5.5.1. Análise de prospecção em placas

A subfração **SF16-26** (22,8 mg) apresentou-se como sólido amorfo amarelo escuro (**figura 99 A**). A análise por CCD apresentou três manchas com $F_R = 0,8$; $0,7$ e $0,5$ de cor cinza escura (**figura 99 B**), sugestivo para presença de lactonas ou terpenos (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

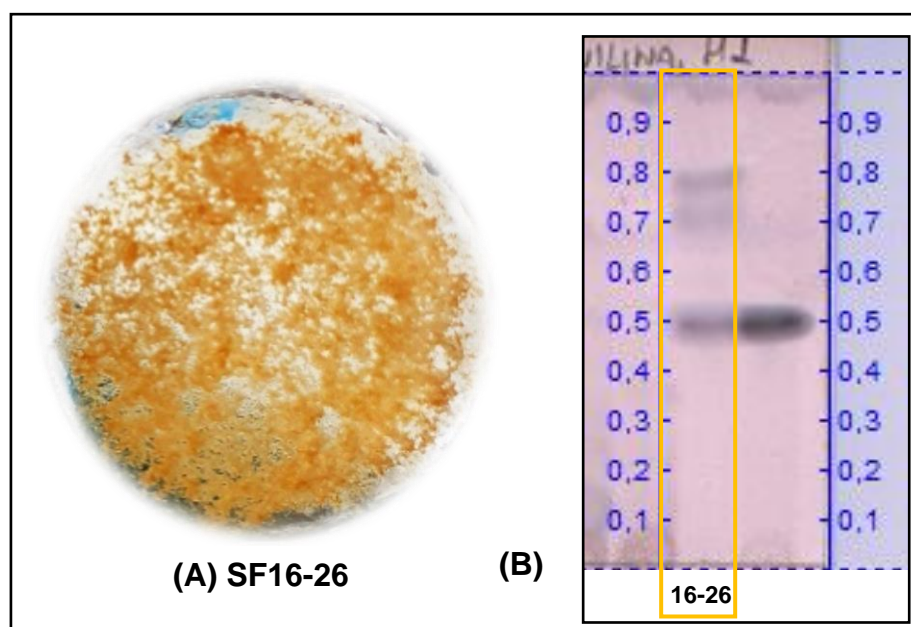


FIGURA 99. Fração SF16-26 (A) seca. Placa de CCD, eluída com sistema H e revelada com vanilina (B).

6.5.5.2. Espectrometria de massas

O espectro de massas $[M+H]^+$, indicou o íon molecular **m/z 299** (pico majoritário) (**figura 100 A**), apresentando peso molecular de 298 Da, com fórmula molecular: **$C_{17}H_{30}O_4$** . A análise de fragmentação gerou os picos: m/z 281 (20 %), m/z 263 (100 %), m/z 245 (12 %) e m/z 227 (10 %). Todos os fragmentos foram gerados por perdas consecutivas de moléculas de água (-18 u; $-H_2O$) (**figura 100 B**).

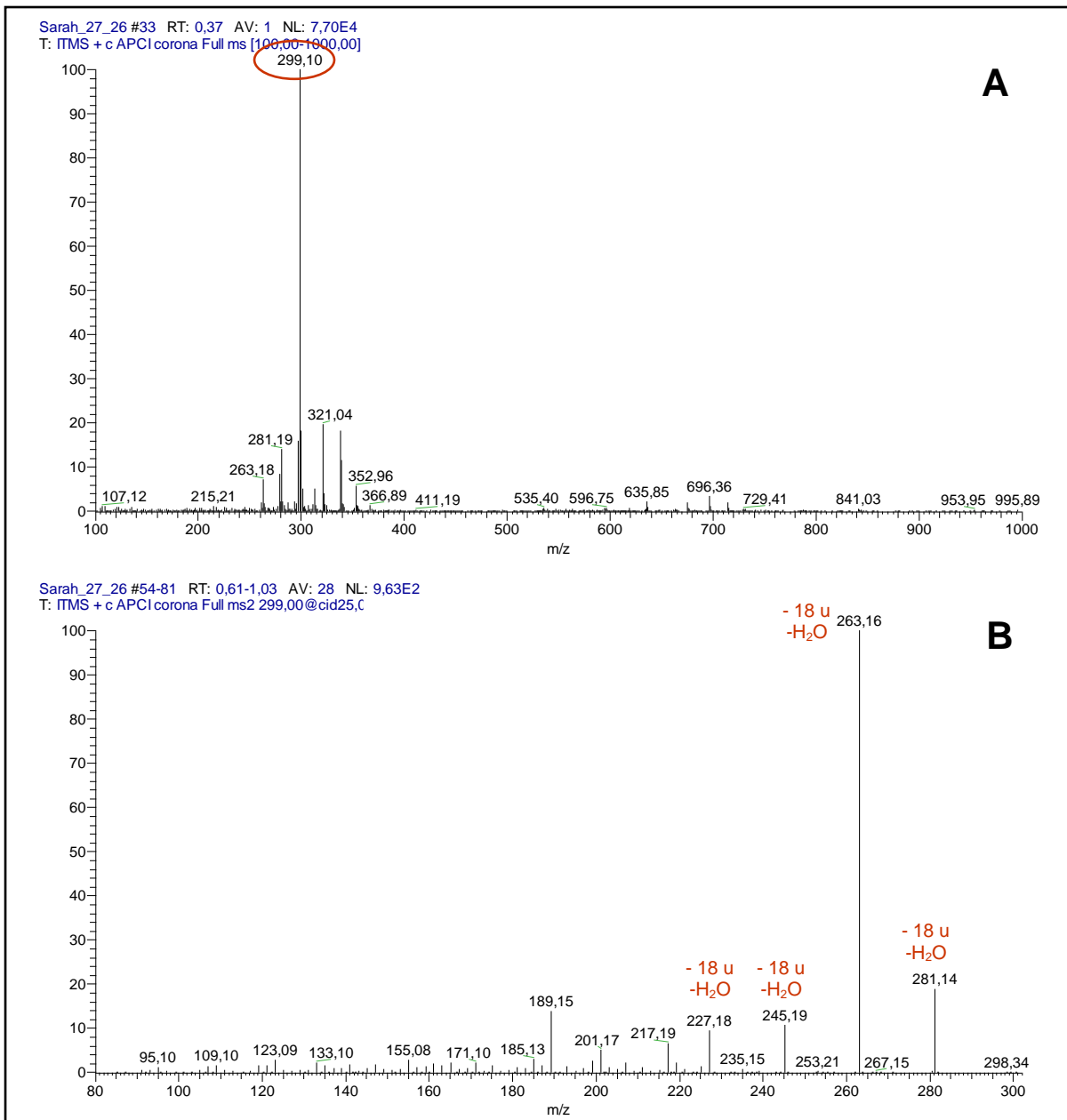


FIGURA 100. Espectro de massas (varredura-modo positivo) do perfil da SF16-26 (**A**). Espectro de fragmentação do íon m/z 299 (**B**). Fonte de ionização: ESI.

A **tabela 37** lista os picos apresentados no espectro de massa-massa de **SF16-26** com os dados da literatura. Foi observada compatibilidade com os dados apresentados por (FU *et al.*, 2018), identificando a Rubrenolida (**figura 101**), estrutura já relatada nessa espécie (FRANCA; GOTTLIEB; COXON, 1977; GOTTLIEB, 1972).

TABELA 37. Padrão de fragmentação de SF16-26 comparados com a literatura.

EM- EM ²			
FU <i>et al.</i> , 2019		SF16-26	
[M-H] ⁻ (m/z)	EM ²	[M-H] ⁻ (m/z)	EM ²
299	281 (66)	299	281(20)
	263 (26)		263 (100)
	245 (8)		245 (12)
	227 (6)		227 (10)

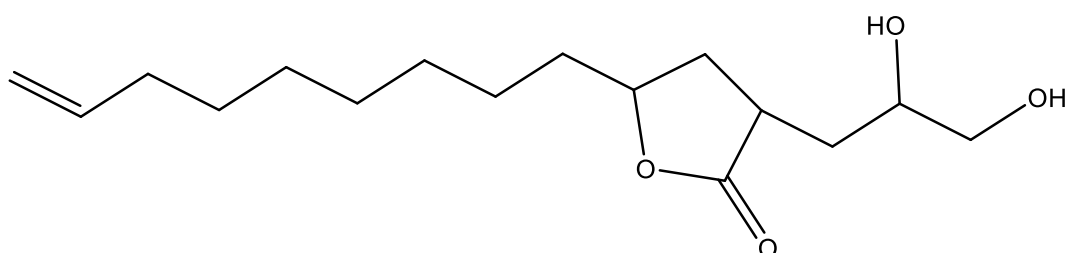


Figura 101. Estrutura da Rubrenolida, constituinte majoritário em **SF16-26**.

6.5.6. Determinação estrutural de SF16-28

6.5.6.1. Análise de prospecção em placas

A subfração **SF16-28** (34,5 mg), adquiriu aparência sólido amorfo vermelho (**figura 102 A**). A análise por CCD apresentou uma mancha com $F_R = 0,5$ de cor cinza escura (**figura 102 B**), indicando presença de lactonas ou terpenos (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

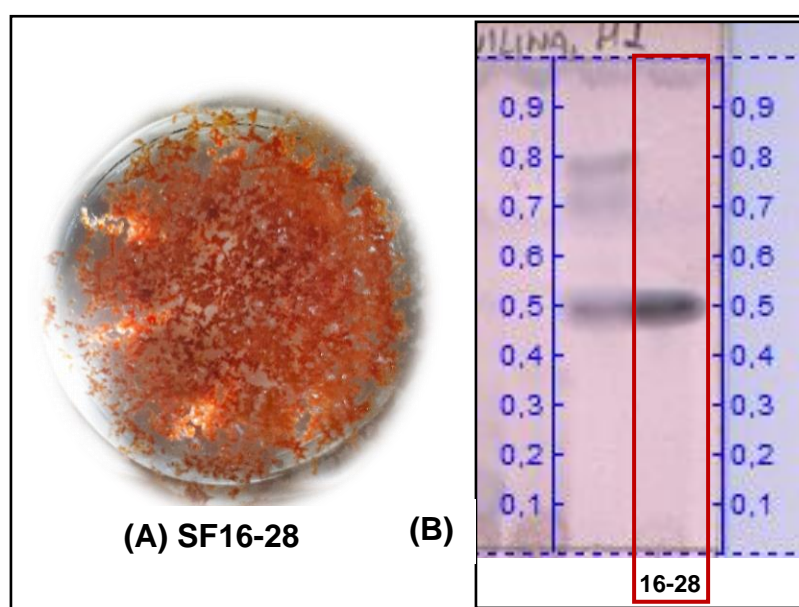


FIGURA 102. Espectro de massas (varredura-modo positivo) do perfil da SF16-28 (A). Espectro de fragmentação massa/massa do íon m/z 297 (B). Fonte utilizada: ESI.

6.5.6.2. Espectrometria de massas

O espectro de massas $[M+H]^+$, indicou o íon molecular m/z 297 (**figura 103 A**), apresentando peso molecular de 296 Da, com fórmula molecular: $C_{17}H_{28}O_4$. A análise de fragmentação gerou os picos: m/z 279 (88 %), m/z 261 (100 %), m/z 243 (14 %) e m/z 225 (16 %). Todos os fragmentos também foram gerados por perdas consecutivas de moléculas de água (-18 u; $-H_2O$) (**figura 103 B**).

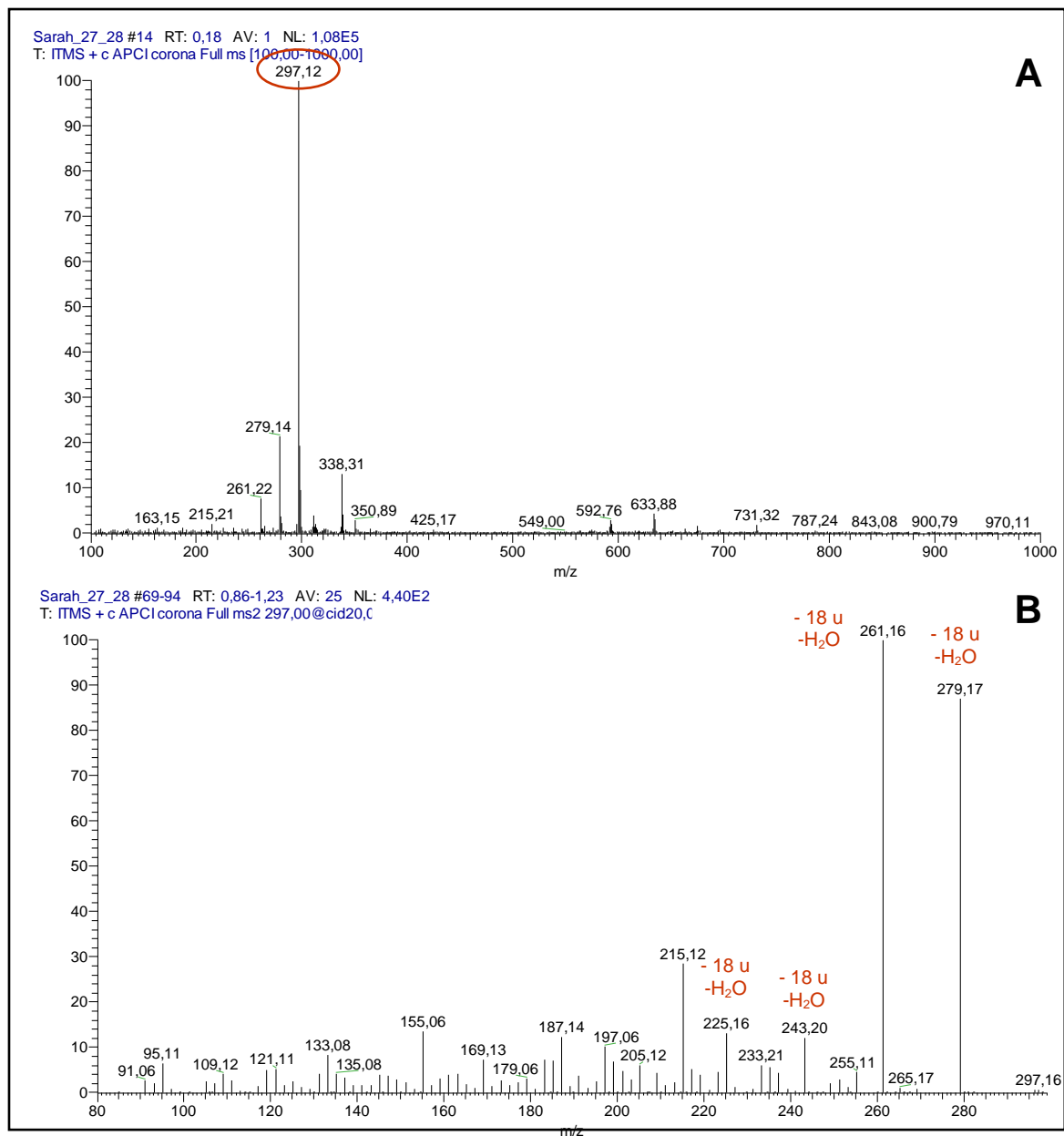


FIGURA 103 . Espectro de massas (varredura-modo positivo) do perfil da SF16-28 (A). Espectro de fragmentação do íon m/z 297 (B). Fonte de ionização: ESI.

A **tabela 38** lista os picos apresentados no espectro de massa-massa de **SF16-28** com os dados da literatura. Foi observada compatibilidade com os dados apresentados por (FU *et al.*, 2018), identificando a Rubrinolida (**figura 104**), estrutura já reportada nessa espécie (FRANCA; GOTTLIEB; COXON, 1977; GOTTLIEB, 1972).

TABELA 38. Padrão de fragmentação de SF16-28 comparados com a literatura.

EM- EM ²			
FU <i>et al.</i> , 2019		SF16-26	
[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	EM ²	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	EM ²
297	279 (90)	297	279 (88)
	261 (24)		261 (100)
	243 (10)		243 (14)
	225 (8)		225 (16)

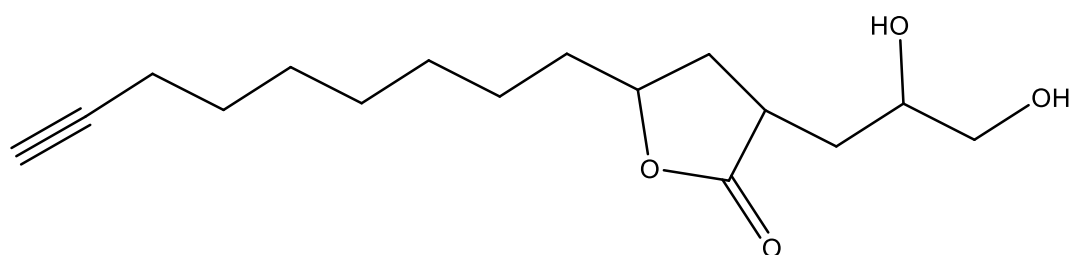


Figura 104. Estrutura da Rubrinolida, constituinte majoritário em **SF16-28**.

6.6. Análise de atividade antioxidante das substâncias ativas

A **tabela 39** apresenta os resultados dos ensaios antioxidantes das substâncias isoladas das cascas de *S. rubra* contra os radicais ABTS⁺ e DPPH:

Na inibição dos radicais ABTS, as frações que apresentaram os melhores desempenhos foram a **SF13-26 (epicatequina)** (1,93 µg/mL), **SF14-11 (ácido vanílico)** (2,16 µg/mL), **SF14-24 (proantocianidina A2)** (7,22 µg/mL) e **SF14-16 (ácido protocatecúico)** (9,96 µg/mL). Além das substâncias fenólicas, a lactona **rubrinolida (SF16-28)** apresentou CE₅₀ = 18,46 µg/mL. A fração **SF16-26 (rubrenolida)** inibiu abaixo de 50 % do radical livre, portanto, não foi determinada a sua CE₅₀ (**tabela 39**).

Comparando com relatos bibliográficos que estudaram a atividade antioxidante dessas substâncias, GEETA e colaboradores (2019), apresentou a epicatequina isolada de *Glycine max* (soja) com CE₅₀ = 14,39 µg/mL. Segundo CHOU et al., (2010), o ácido vanílico extraído de *Origanum vulgare* (Orégano) apresentou CE₅₀=7,3 µg/mL. Shin et al (2020), sintetizou o ácido protocatecúico, que demonstrou CE₅₀ de 7,63 µg/mL. Apesar dos resultados discrepantes com a literatura, este estudo também demonstra a capacidade de inibição das moléculas isoladas frente ao radical ABTS.

Não foram encontradas em literatura, informações a respeito de atividade antioxidante contra o radical ABTS para a proantocianidina A2 (POA A2) purificada. Foram encontrados, apenas relatos nas literaturas da presença da proantocianidina A2 e outros compostos presentes em extratos ativos (CHAI *et al.*, 2018; PLUMB *et al.*, 1998). Também não existem relatos com esse método testado com a rubrinolida. Portanto, este é primeiro trabalho mostrando a concentração eficiente da POA A2 isolada e da rubrinolida.

As frações isoladas apresentaram valores de concentrações inibitórias (para ABTS) comparáveis aos de substâncias padrão relatadas na literatura, como o ácido ascórbico (1,16 µg/mL), hidróxitolueno t-butilado

(BHT) (6,42 µg/mL) e Trolox (4,18 µg/mL) (GEETA; *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2019; TINE *et al.*, 2020).

TABELA 39. Resultados das análises de capacidade antioxidante das substâncias isoladas de *S. rubra*.

Amostras 100 µg/mL	Radical ABTS		Radical DPPH	
	% ABTS	CE ₅₀ µg/mL	% DPPH	CE ₅₀ µg/mL
SF13-26	95,65±0,09	1,927±0,27	63,93±1,03	13,91±8,96
SF14-11	95,44±0,07	2,161±0,60	64,73±0,88	39,27±13,73
SF14-16	82,91±0,17	9,962±3,00	44,38±3,32	-
SF14-24	94,07±0,20	7,215±3,00	66,95±0,22	58,17±14,32
SF16-26	41,60±0,20	-	15,15±0,29	-
SF16-28	95,30±0,74	18,46±5,73	35,65±3,58	-

Legenda: CE₅₀= concentração eficiente para reagir com 50% dos radicais em solução.

As substâncias que demonstraram capacidade de captura dos radicais DPPH foram: **SF14-24 (proantocianidina A2)** (58,17 µg/mL), **SF14-11 (ácido vanílico)** (39,27 µg/mL) e **SF13-26 (epicatequina)** (13,91 µg/mL) (tabela 39).

Nessas análises, o ácido protocatecúico e as lactonas rubrenolida e rubrinolida apresentaram capacidade inibitória do radical DPPH abaixo de 50 % e não foram selecionadas para calcular as suas respectivas CE₅₀.

Para fins de comparação, foram consultados nas literaturas os resultados de testes feitos com o DPPH dos compostos isolados. A POA A2 isolada de *Arachis hypogaea* (amendoim) apresentou CE₅₀ = 31,10 µg/mL (OLDONI *et al.*, 2016). O ácido vanílico encontrado em *O. vulgare* mostrou CE₅₀ = 3,6 µg/mL (CHOU *et al.*, 2010). A epicatequina extraída de *Cynomorium songaricum* apresentou CE₅₀ = 11,15 µg/mL. Foram observados valores bem discordantes entre os ensaios com a POA A2 e o Ác. Vanílico. Contudo, os testes com a Epicatequina demonstraram valores bem próximos. Embora haja diferenças entre os valores de CE₅₀ com os dados encontrados na literatura, esse estudo também reforça a atividade dos fenólicos isolados frente ao DPPH.

Segundo GAO et al. (2022), o ácido protocatecúico apresentou CE₅₀ de 4,06 µg/mL contra o DPPH. Neste trabalho, o ácido protocatecúico apresentou atividade antioxidante abaixo de 50 %, porém, não foi selecionado para realizar a determinação do CE₅₀. Também, as lactonas rubrinolida e rubrenolida não apresentaram atividade antioxidante acima de 50 % suficiente para determinar as suas CE₅₀. Este é o primeiro relato avaliando a capacidade antioxidante dessas lactonas frente o radical DPPH.

As substâncias ativas contra o radical DPPH apresentaram valores de CE₅₀ muito semelhantes aos dos padrões Rutina (21,49 µg/mL), Beta-hidroxiácidos (BHA) (25,00 µg/mL), Tirosol (16,87 µg/mL) e BHT (30,27 µg/mL), que apresentam estruturas fenólicas (OLDONI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016; YUAN *et al.*, 2018).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é justificada pelas propriedades de redução-oxidação, que os permitem reduzir as espécies de oxigênio singleto (O•), ao liberarem prótons (H⁺) no meio reacional, mantendo sua estabilização por ressonância, apresentando as hidroxilas na posição *para* (C-4) como as mais ativas (**figura 105 1**). Já os flavonoides dependem da quantidade de hidroxilas presentes na estrutura, outras substituições e conjugações. Em estruturas de procianidinas, proantocianidinas e seus derivados, as hidroxilas mais ativas estão nas posições 3' e 4' do anel B e no carbono 3 do anel C da procianidina (**figura 105 2**), e nas posições 3' e 4' dos anéis B e E nos carbonos 3 dos anéis C e F (**figura 96 3**) (CAI *et al.*, 2006; COUTINHO *et al.*, 2008; DI MAJO *et al.*, 2005).

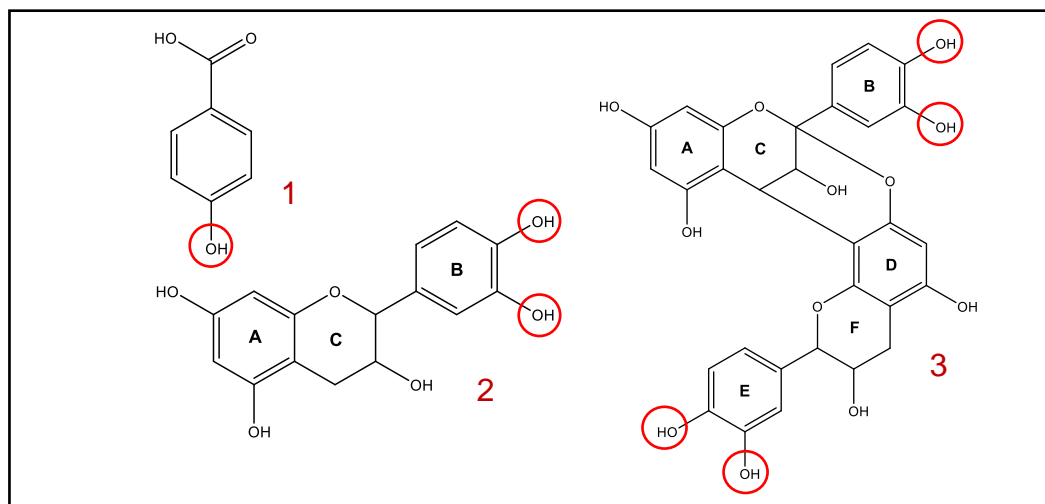


Figura 105. Estruturas básicas das classes de ácido fenólico (1), procianidina (2) e Proantocianidina (3)

A presença de uma ligação tripla em uma estrutura pode variar seu potencial antioxidante em relação à dupla ligação, pelo grau de insaturação e facilidade de quebra das ligações π . Substâncias que contêm ligações triplas são quimicamente e biologicamente ativas. (KONOVALOV, 2014; MPFAHLELE *et al.*, 2020).

Esse fato foi observado ao comparar os resultados as duas lactonas. Ambas as estruturas apresentam ligações π terminais, entretanto, só a rubrinolida apresentou atividade antioxidante devido ao seu H ácido da ligação tripla terminal. Já a rubrenolida não apresentou atividade superior a 50%, possivelmente por não possuir H livre nem ligações duplas conjugadas (figura 106).

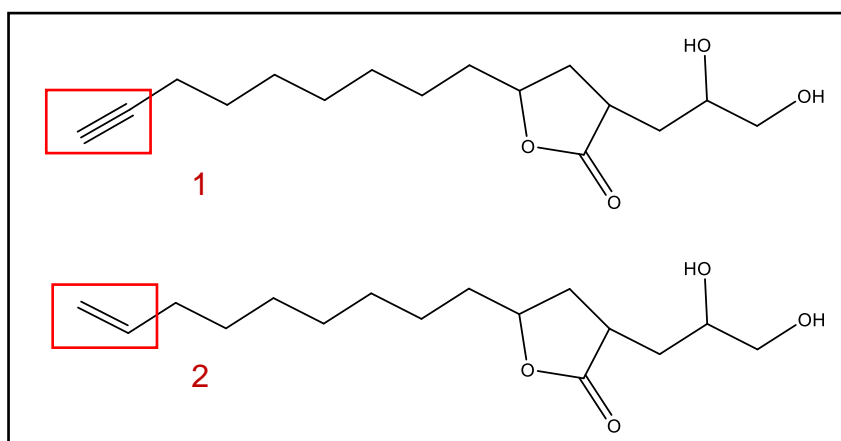


Figura 106. Estruturas básicas das classes de ácido fenólico (1), procianidina (2) e Proantocianidina (3)

Esses resultados são promissores e motivam para a continuação dos estudos de capacidade antioxidante das substâncias frente ao ABTS, DPPH para fins de determinação da concentração efetiva, também avaliação em outros modelos de atividade antioxidante como FRAP (Poder antioxidante de redução de ferro), Potencial Redutor (Phosphate Buffer Saline-PBS e $K_3Fe(CN)_6$), Medição de peroxidação de Lipossomas, Inibição de peroxidação usando o modelo com Linoleato de β -caroteno (BARROS; BAPTISTA; FERREIRA, 2007; BENZIE; STRAIN, 1996; CHAI *et al.*, 2018; CHOU *et al.*, 2010).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Amazônia Brasileira contribui com cerca de 195 espécies madeireiras para manejo florestal sustentável. Dentre as trinta famílias botânica catalogadas, as principais são Fabaceae, **Lauraceae**, Lecythydaceae e Sapotaceae. O estado do Amazonas é um dos principais estados com 58 indústrias de produção de madeira em tora, tendo o município de Itacoatiara como um dos principais fornecedores de madeira comercial atendendo desde a comunidade local até o exterior

A produção de resíduos madeireiros produzidos chegou a atingir o volume de 8,3 milhões de m³, entretanto, cerca de 59 % foram considerados “resíduos”. Esses números mostram o baixo aproveitamento durante a fabricação da madeira em tora. Além disso, a produção de resíduos madeireiros gera problemas para o desenvolvimento sustentável, uma vez que a destinação incorreta acaba causando poluição ambiental. Este fato, pode trazer problemas de saúde pública e do trabalhador local, além do desperdício de matéria prima. (CYSNEIROS *et al.*, 2018; HUMMEL *et al.*, 2010).

Algumas espécies madeireiras também são conhecidas por sua aplicação na medicina popular e nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Os exemplos são: Andiroba, Breu, Cumaru, Ipê, Castanheira, Copaíba e Jatobá, muito conhecidos por seus óleos essenciais com atividades biológicas. Estudos com os extratos dessas espécies encontraram compostos fenólicos com atividades antimicrobianas, antioxidantes e antidiabéticas (MAR; WIN; NYO, 2020; MENEZES FILHO, 2022; SILVA; ALMEIDA, 2014; SOUSA *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019).

Neste estudo, os extratos das cascas dos resíduos madeireiros de *S. rubra* mostrou o potencial tecnológico, apresentando quatro substâncias fenólicas e a lactona rubrinolida com potencial antioxidante, além do isolamento da rubrenolida.

A Epicatequina é um fitocomposto encontrado principalmente no chá verde, vegetais e bebidas comumente consumidos na dieta humana. Essa

procianidina apresenta as atividades antioxidante, vasorelaxante, antidiabética, hepatoprotetora, anti-inflamatória, anti-hipertensivo e antimicrobiano. (BERNATOVA, 2018; DEVKOTA *et al.*, 2021; GAO *et al.*, 2022; PRAKASH; BASAVARAJ; MURTHY, 2019). De acordo com o fornecedor MedChemExpress® 100 mg de epicatequina custa cerca de USD 158,.

O ácido vanílico é um agente aromatizante que possui atividades antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antibiofilme, inibitória das enzimas α -amilase e tirosinase, e efeito neuroprotetor (contra lipopolissacarídeos, neuroinflamação, disfunção sináptica e neurodegeneração) (IBRAHIM *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2018; QIAN *et al.*, 2020; ULLAH *et al.*, 2021; YALCIN *et al.*, 2020). O valor de mercado por 100 mg dessa substância pode chegar a USD 50,00 (MedChemExpress®).

O ácido protocatecúico é um polifenol amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado em vegetais e em fungos. KAKKAR & BAIS (2014), listaram as atividades biológicas apresentadas por esse ácido em seu artigo de revisão. Foram encontradas as atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, citotóxica, antiúlcera, antidiabética, antiviral, analgésica, hepatoprotetora, neuro protetora, antifibrótica, antiaterosclerótica e nefro protetora. O preço de mercado desse produto natural custa entorno de USD 72,00 por 1 grama (MedChemExpress®).

A Proantocianidina A2 é comumente encontrada em chás de cascas de árvores do gênero *Cinnamomum* (Canela). Estudos teóricos propuseram capacidade inibitória contra o vírus SARS CoV-2. Testes *in vitro* apresentaram potencial antiviral frente aos vírus da Síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV), Síndrome do coronavírus respiratória aguda grave (SARS CoV), pseudovírus HIV/SARS CoV, HIV- 1 (inibindo a enzima (HIV-1 integrase), *Herpes Simplex* vírus tipo 1 (HSV-1). Também apresentou capacidade inibitória de α -glicosidase e potente atividade biomodificadora de dentina (GRENIER *et al.*, 2021; NAM *et al.*, 2015; PRASANTH *et al.*, 2021; SUEDEE; TEWTRAKUL; PANICHAYUPAKARANANT, 2013; TRAN *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2018; ZHUANG *et al.*, 2009).

Segundo a MedChemExpress®, o preço pago por 10 mg de POA A2 pode chegar a USD 450,00.

As substâncias isoladas nessa pesquisa podem justificar a atividade antioxidante encontrada no extrato das cascas de *S. rubra*. Ainda existe uma infinidade de substâncias a serem isoladas e seus potenciais antioxidantes e biológicos determinados. Uma vez que existam outros extratos e frações ativos ainda não estudados. Vale ressaltar sobre a necessidade de explorar outros ensaios biológicos a serem realizados com os extratos e substâncias isoladas, visto que, esse trabalho direcionou apenas para atividade antioxidante.

Esse trabalho leva ao conhecimento e valorização dos resíduos de *S. rubra*. Esse material pode ser consumido como matéria prima para extração das substâncias ativas, já conhecidas e com seus potenciais químicos e biológicos determinados. Empregando-os principalmente nas indústrias químicas e farmacêuticas, ocasionando na diminuindo da poluição ambiental causada pela atividade madeireira.

Também merece destaque a contribuição desse trabalho para a quimiotaxonomia da família. Por haver pouca informação química sobre as duas únicas espécies do gênero *Sextonia*.

8. CONCLUSÕES

O estudo químico do extrato acetato de etila (LLG03) dos resíduos de *Sextonia rubra* resultou no isolamento e identificação de seis substâncias (quatro fenólicas e duas lactonas), dentre as quais, cinco apresentaram atividade antioxidante.

Os compostos fenólicos foram caracterizados pela primeira vez na espécie: **ácido vanílico** (10,0 mg), **ácido protocatecúico** (18,4 mg), **epicatequina** (21, mg) e **proantocianidina A2** (3,2 mg). Foram isoladas e caracterizadas as duas lactonas marcadoras da espécie já relatadas na literatura: **rubrinolida** (34,4 mg) que apresentou atividade e a **rubrenolida** (22,8 mg) apresentou reação com os radicais, porém, não inibiu quantidade acima de 50 %.

A técnica Cromatografia Contracorrente levou ao isolamento das substâncias ativas, utilizando modo de eluição gradiente não linear. Foi possível realizar o isolamento de acordo com a mudança das fases móveis no sistema de partição, observado o tempo de retenção das substâncias de acordo com a ordem de eluição das frações nos tubos. A reprodutibilidade da técnica foi acompanhada por cromatografia em camada delgada. Todas as injeções no HPLC foram reprodutíveis, mostrando a eficácia do modo de eluição desenvolvido.

Os resultados da avaliação da atividade antioxidante *in vitro* contra o ABTS^{•+} mostraram a atividade dos fenólicos isolados, com destaque para a POA A2 e rubrinolida (dado inédito). A ordem de potencial antioxidante foi **epicatequina** > **ácido vanílico** > **proantocianidina A2** > **ácido protocatecúico** > **rubrinolida**. Já comparando os valores frente ao DPPH[•], a ordem seguiu da seguinte maneira: **epicatequina** > **ácido vanílico** > **proantocianidina A2**. Todos os valores de CE₅₀ dos isolados foram comparáveis com os das substâncias padrão.

Essa pesquisa foi pioneira na caracterização química de compostos fenólicos nos resíduos madeireiros de *S. rubra*. Esses resultados demonstraram uma possibilidade para o aproveitamento desse material vegetal, apontando o resíduo madeireiro dessa espécie como fonte alternativa de matéria-prima para extração e isolamento de substâncias de interesse econômico para fins de aplicação tecnológica.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K.; DA VEIGA JUNIOR, V. F. Óleos essenciais de *sextonia rubra* (Mez) van der werff (Lauraceae). **Acta Amazonica**, v. 43, n. 1, p. 113–116, 2013.

ALVES, F. M.; DOMINGOS, D. Q.; VAZ, P. P.; ARRUDA, R. do C. de O.; SOUZA, V. C. Checklist of the Lauraceae Juss. from Mato Grosso do sul, Brazil. **Iheringia - Serie Botanica**, v. 73, p. 231–238, 2018.

ALVES, T. S. **Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante de *Diplotropis racemosa* (hoehne), resíduo madeireiro do médio Amazonas**. 2020. UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101607>%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.ij su.2020.02.034%0Ahttps://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cjag.12228%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.ssci.2020.104773%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.011%0Ahttps://doi.o>.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos, teoria e prática**. 4. ed. [s.l.: s.n.]571 p.

ARAÚJO, M. de S. **Constituintes químicos e investigação do potencial citotóxico das cascas e folhas de *Guatteria olivacea* (ANNONACEAE)**. 2019. Universidade Federal do Amazonas, 2019.

BARROS, L.; BAPTISTA, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1731–1737, 2007.

BECKER, M. M.; NUNES, G. S.; RIBEIRO, D. B.; SILVA, F. E. P. S.; CATANANTE, G.; MARTY, J. L. Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 5, p. 1108–1114, 2019.

BENZIE, I. F. F. .; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical**

BIOCHEMISTRY, v. 70, n. 239, p. 70–76, 1996.

BERNATOVA, I. foods: Focus on cardiovascular and neuropsychological health. **Biotechnology Advances**, n. January, p. 0–1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.009>>.

BERTHOD, A.; MARYUTINA, T.; SPIVAKOV, B.; SHIPIGUN, O.; SUTHERLAND, I. A. Countercurrent chromatography in analytical chemistry (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 355–387, 2009.

BURITS, M.; BUCAR, F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 5, p. 323–328, 2000.

BÜTTENBENDER, S. L.; SIMON, E. D. S.; VOLPATO, N. M. Cromatografia Contracorrente: Princípios e Aplicações. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 15, n. e, p. 1–11, 2018.

CAI, Y. Z.; MEI SUN; JIE XING; LUO, Q.; CORKE, H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 25, p. 2872–2888, 2006.

CHAI, W. M.; OU-YANG, C.; HUANG, Q.; LIN, M. Z.; WANG, Y. X.; XU, K. L.; HUANG, W. Y.; PANG, D. D. Antityrosinase and antioxidant properties of mung bean seed proanthocyanidins: Novel insights into the inhibitory mechanism. **Food Chemistry**, v. 260, n. March, p. 27–36, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.001>>.

CHASE, M. W.; CHRISTENHUSZ, M. J. M.; FAY, M. F.; BYNG, J. W.; JUDD, W. S.; SOLTIS, D. E.; MABBERLEY, D. J.; SENNIKOV, A. N.; SOLTIS, P. S.; STEVENS, P. F.; BRIGGS, B.; BROCKINGTON, S.; CHAUTEMS, A.; CLARK, J. C.; CONRAN, J.; HASTON, E.; MÖLLER, M.; MOORE, M.; OLMSTEAD, R.; PERRET, M.; SKOG, L.; SMITH, J.; TANK, D.; VORONTSOVA, M.; WEBER, A. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1–20, 2016.

CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: Uma

metodologia aplicada à disciplina de Química Orgânica. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 560–562, 1997.

CHOU, T. H.; DING, H. Y.; HUNG, W. J.; LIANG, C. H. Antioxidative characteristics and inhibition of α -melanocyte-stimulating hormone-stimulated melanogenesis of vanillin and vanillic acid from *Origanum vulgare*. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 8, p. 742–750, 2010.

COUTINHO, I. D.; COELHO, R. G.; KATAOKA, V. M. F.; HONDA, N. K.; SILVA, J. R. M.; VILEGAS, W.; CARDOSO, C. A. L. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. **Eletica Quimica**, v. 33, n. 4, p. 53–60, 2008.

CYSNEIROS, V. C.; MENDONÇA JÚNIOR, J. O.; LANZA, T. R.; MORAES, J. C. R.; SAMOR, O. J. M. Espécies madeireiras da Amazônia: riqueza, nomes populares e suas peculiaridades. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 38, p. 1–14, 2018.

D'ARACE, L. M. B.; OLIVEIRA, B. L.; NUNES, B. A.; ROCHA, E. S.; CHAVES, R. de S. S.; COSTA, R. R. Produção de madeira em tora e lenha no norte do Brasil e no estado do Pará. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 9, p. 16885–16896, 2019.

DE TAEYE, C.; CAULLET, G.; EYAMO EVINA, V. J.; COLLIN, S. Procyanidin A2 and Its Degradation Products in Raw, Fermented, and Roasted Cocoa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 8, p. 1715–1723, 2017.

DEVKOTA, H. P.; KURIZAKI, A.; TSUSHIRO, K.; ADHIKARI-DEVKOTA, A.; HORI, K.; WADA, M.; WATANABE, T. Flavonoids from the leaves and twigs of *Lindera sericea* (Seibold et Zucc.) Blume var. *sericea* (Lauraceae) from Japan and their bioactivities. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 34, 2021.

DEWICK, P. M. **MEDICINAL NATURAL PRODUCTS. A biosynthetic approach**. 2. ed. [s.l.: s.n.]v. 5

DI MAJO, D.; GIAMMANCO, M.; LA GUARDIA, M.; TRIPOLI, E.; GIAMMANCO, S.; FINOTTI, E. Flavanones in Citrus fruit: Structure-antioxidant activity relationships. **Food Research International**, v. 38, n. 10, p. 1161–1166, 2005.

DOURADO, R. S.; LADEIRA, Â. M. identificação de flavonóides em *Hypericum cordatum* (Vell.) N. Robson (Clusiaceae). v. 3, n. 2005, p. 611–620, 2008.

ERTAS, A.; YILMAZ, M. A.; FIRAT, M. Chemical profile by LC-MS/MS, GC/MS and antioxidant activities of the essential oils and crude extracts of two *Euphorbia* species. **Natural Product Research**, v. 29, n. 6, p. 529–534, 2015.

FALKOWSKI, M.; JAHN-OYAC, A.; FERRERO, E.; ISSALY, J.; EPARVIER, V.; GIROD, R.; RODRIGUES, A. M. S.; STIEN, D.; HOUËL, E.; DUSFOUR, I. Assessment of A Simple Compound-Saving Method to Study Insecticidal Activity of Natural Extracts and Pure Compounds Against Mosquito Larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 32, n. 4, p. 337–340, 2016.

FALKOWSKI, M.; JAHN-OYAC, A.; ODONNE, G.; FLORA, C.; ESTEVEZ, Y.; TOURÉ, S.; BOULOGNE, I.; ROBINSON, J. C.; BÉREAU, D.; PETIT, P.; AZAM, D.; COKE, M.; ISSALY, J.; GABORIT, P.; STIEN, D.; EPARVIER, V.; DUSFOUR, I.; HOUËL, E. Towards the optimization of botanical insecticides research: *Aedes aegypti* larvicidal natural products in French Guiana. **Acta Tropica**, v. 201, n. August 2019, p. 105179, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105179>>.

FALKOWSKI, M.; RODRIGUES, A. de S.; ÉPARVIER, V.; DUSFOUR, I.; HOUËL, E.; STIEN, D. **Patent Application Publication**. 2017.

FIGUEIREDO, A. C. D. S.; BARROSO, J. M. G.; PEDRO, L. M. G.; ASCENÇÃO, L. **Histoquímica e citoquímica em plantas: princípios e protocolos**. 1. ed. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade De Lisboa, 2007. 68p. p.

FIGUEROA, J. G.; BORRÁS-LINARES, I.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; SEGURA-CARRETERO, A. Comprehensive identification of bioactive compounds of avocado peel by liquid chromatography coupled to ultra-high-definition accurate-mass Q-TOF. **Food Chemistry**, v. 245, n. December 2017, p. 707–716, 2018.

FLORESTAL, S. **Louro Vermelho, Sextonia rubra (Mez) var der WerffEspécies manejadas** Faro- Pará. 2020. Disponível em: <<http://samise.com.br/index.php/louro-vermelho>>.

FRANCA, N. C.; GOTTLIEB, O. R.; COXON, D. T. Rubrenolide and rubrynlolide: An alkene-alkyne pair from *Nectandra rubra*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 2, p. 257–262, 1977.

FRIESEN, J. B.; PAULI, G. F. G.U.E.S.S. - A generally useful estimate of solvent systems in CCC. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 28, n. 17, p. 2777–2806, 2005.

FRIESEN, J. B.; PAULI, G. F. Rational development of solvent system families in counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1151, n. 1–2, p. 51–59, 2007.

FU, T.; HOUËL, E.; AMUSANT, N.; TOUBOUL, D.; GENTA-JOUVE, G.; DELLA-NEGRA, S.; FISHER, G. L.; BRUNELLE, A.; DUPLAIS, C. Biosynthetic investigation of γ -lactones in *Sextonia rubra* wood using in situ TOF-SIMS MS/MS imaging to localize and characterize biosynthetic intermediates. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

FU, T.; TOUBOUL, D.; DELLA-NEGRA, S.; HOUËL, E.; AMUSANT, N.; DUPLAIS, C.; FISHER, G. L.; BRUNELLE, A. Tandem Mass Spectrometry Imaging and in Situ Characterization of Bioactive Wood Metabolites in Amazonian Tree Species *Sextonia rubra*. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 12, p. 7535–7543, 2018.

GAO, Q.; LI, Y.; LI, Y.; ZHANG, Z.; LIANG, Y. Antioxidant and prooxidant activities of phenolic acids commonly existed in vegetables and their relationship with structures. v. 2061, 2022.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; HAMERSKI, L.; MIGUITA, C. H. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Quimica Nova**, v. 32, n. 2, p. 407–411, 2009.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; HAMERSKI, L.; MIRANDA, A. C. de M. Eudesmane and rearranged eudesmane sesquiterpenes from *Nectandra cissiflora*. **Quimica Nova**, v. 33, n. 8, p. 1739–1742, 2010.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MARTINS, M.; CRUZ, A. C. A Bioactive Lactone from *Nectandra gardner*. **Planta Medica**, v. 5, p. 775, 1999.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; YOSHIDA, N. C.; FIGUEIREDO, P. O. The chemical diversity from the vegetation of Mato Grosso do Sul and its relevance as a source of bioactive molecules. **Revista Virtual de Quimica**, v. 8, n. 1, p. 97–129, 2016.

GEETA; WIDODO, W. S.; WIDOWATI, W.; GINTING, C. N.; LISTER, I. N. E.; ARMANSYAH, A.; GIRSANG, E. Comparison of Antioxidant and Anti-collagenase Activity of Genistein and Epicatechin. **Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 2, p. 111–117, 2019.

GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the lauraceae. **Phytochemistry**, v. 11, n. 5, p. 1537–1570, 1972.

GRANATO, D.; NUNES, D. S.; DE MATTOS, P. P.; DE MOURA RIOS, E.; GLINSKI, A.; RODRIGUES, L. C.; ZANUSSO, G. Chemical and biological evaluation of rejects from the wood industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. SPEC. ISS., p. 237–241, 2005.

GRENIER, A.; LEGAULT, J.; PICHETTE, A.; JEAN, L.; BÉLANGER, A.; POULIOT, R. Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-aging potential of a *kalmia angustifolia* extract and identification of some major compounds. **Antioxidants**, v. 10, n. 9, 2021.

GU, L.; WU, T.; WANG, Z. TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. *acuta*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 131–136, 2009. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.04.006>>.

GUIMARÃES, A. C. **Estudo Químico e Biológico de Cladocolea micrantha (Loranthaceae), uma planta medicinal da região Amazônica.** 2005. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

HALLIWELL, B. Free Radicals and other reactive species in Disease. **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES**, p. 1–7, 2001.

HAYUN, H.; GAVRILA, I.; SILVIANA, S.; SIAHAAN, A. E. K.; VONNA, R. F.; LATIFAH, M. I. Synthesis and antioxidant activity study of new mannich bases derived from vanillic acid. **Rasayan Journal of Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 131–138, 2020.

HSU, C. Y.; LIN, G. M.; LIN, H. Y.; CHANG, S. T. Characteristics of proanthocyanidins in leaves of *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* as strong α -glucosidase inhibitors. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 10, p. 3806–3814, 2018.

https://www.medchemexpress.com/_-_-Epicatechin.html, data de acesso 19/06/2022

<https://www.medchemexpress.com/Protocatechuic-acid.html>, data de acesso: 21/06/2022

<https://www.medchemexpress.com/procyanidin-a1.html>, data de acesso: 23/06/2022

https://www.medchemexpress.com/Vanillic_acid.html, data de acesso: 19.06.2022

HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

HUANG, X. Y.; IGNATOVA, S.; HEWITSON, P.; DI, D. L. An overview of recent progress in elution mode of counter current chromatography. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 214–225, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.006>>.

HUMMEL, A. C.; ALVES, M. V. da S.; PEREIRA, D.; VERÍSSIMO, A.; SANTOS, D. A atividade madeireira na Amazônia brasileira: produção, receita e mercados. **Sfb**, p. 32, 2010. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:A+atividade+madeireira+na+Amazônia+brasileira+:+produção+,+receita+e+mercado+s#0>>.

IBRAHIM, H. A.; SOLIMAN, H. S. M.; HAMED, F. M.; MARREZ, D. A.; OTHMAN, S. M. Antibacterial activity of vanillic acid and catechol produced by microbial biotransformation of caffeic acid. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 12, n. 6, p. 740–743, 2020.

ITO, Y. Countercurrent Chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 5, p. 105–129, 1981.

ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, n. 2, p. 145–168, 2005.

ITO, Y. Counter-current motion in counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1372, p. 128–132, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.033>>.

ITTO, O. I. de las M. T. **Reseña bienal y evaluación de la situación mundial de las maderas 2015-2016**. [s.l: s.n.]1–230 p.

KAKKAR, S.; BAIS, S. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. **ISRN Pharmacology**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

KIM, H. J.; PARK, G. M.; KIM, J. K. Anti-inflammatory effect of pristimerin on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 4, p. 495–500, 2013.

KONOVALOV, D. A. Medicinal plants: Polyacetylene compounds of plants of the Asteraceae family (review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 48, n. 9, p. 615–633, 2014.

LABURÚ, C. E.; SILVA, O. H. M. da. Medindo a frequência da rede

elétrica por efeito estroboscópico: com um equipamento mecânico simples. **Cad. Cat. Ens. Fís**, v. 16, n. 3, p. 332–339, 1999.

LEE, J.-K.; LEE, S.; SHIN, T.-Y.; KHANG, D.; KIM, S.-H. Anti-Inflammatory Effect of *o*-Vanillic Acid on Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages and Inflammation Models. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 6, n. 4, p. 227–233, 2018.

LEITÃO, G. G.; COSTA, F. D. N. Gradient Elution in Countercurrent Chromatography. **Planta Medica**, v. 81, n. 17, p. 1592–1596, 2015.

LEITÃO, G. G.; COSTA, F. D. N.; FIGUEIREDO, F. de S. Strategies of Solvent the Isolation of Natural Products by Countercurrent Chromatography. *In: Strategies of Solvent System Selection for the Isolation of Natural Products*. [s.l: s.n.]p. 641–668.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; SPÍNOLA, V.; CASTILHO, P. C. Phenolic profiles of Lauraceae plant species endemic to Laurisilva forest: A chemotaxonomic survey. **Industrial Crops and Products**, v. 107, n. January, p. 1–12, 2017.

MAR, T. Y.; WIN, A.; NYO, A. M. T. ACUTE TOXICITY OF THE ETHANOLIC PLANT EXTRACT AND STRUCTURE ELUCIDATION OF ISOLATED BIOACTIVE COMPOUND FROM THE STEM BARK OF PROTIUM SERRATUM. **J. Myanmar Acad. Arts Sci.**, v. XVIII, n. 1, p. 117–126, 2020.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1–2, p. 181–194, 2006.

MATOS, F. J. de A. **Introdução à fitoquímica Experimental**. 3. ed. [s.l: s.n.]150 p.

MELO, L. E. S. de. **Estudo químico de resíduos madeiros de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) G. Nicholson, *Acacia mangium* Willd. E *Dipteryx polyphylla* Huber**. 2016. UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, 2016.

MENEZES FILHO, A. C. P. de. Avaliação fitoquímica e atividades biológicas do extrato do exocarpo do fruto de *Protium spruceanum*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 10, n. 1, p. 034–043, 2022.

MESSIAS, K. L. D. S. Dossiê Antioxidantes. **Food Ingredients Brasil**, v. 6, p. 16–31, 2009.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. **Redox Report**, v. 2, n. 3, p. 161–171, 1996.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, n. 4, p. 407–412, 1993.

MINILLO, L. Q. **Aproveitamento de resíduos madeireiros das indústrias de celulose e sucroalcoleira para produção de painés aglomerados**. 2017. Universidade Estadual Paulista, 2017.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, v. 2, n. 26, p. 212–219, 2004.

MPHAHLELE, M. J.; MAGWAZA, N. M.; GILDENHUYS, S.; SETSHEDI, I. B. Synthesis, α -glucosidase inhibition and antioxidant activity of the 7-carbo³substituted 5-bromo-3-methylindazoles. **Bioorganic Chemistry**, p. 103702, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103702>>.

NAM, J. W.; PHANSALKAR, R. S.; LANKIN, D. C.; BISSON, J.; MCALPINE, J. B.; LEME, A. A.; VIDAL, C. M. P.; RAMIREZ, B.; NIEMITZ, M.; BEDRAN-RUSSO, A.; CHEN, S. N.; PAULI, G. F. Subtle Chemical Shifts Explain the NMR Fingerprints of Oligomeric Proanthocyanidins with High Dentin Biomodification Potency. **Journal of Organic Chemistry**, v. 80, n. 15, p. 7495–7507, 2015.

OKBA, M. M.; EL AWDAN, S. A. W.; YOUSIF, M. F.; EL DEEB, K. S.; SOLIMAN, F. M. Entada rheedii seeds thioamides, phenolics, and saponins

and its antiulcerogenic and antimicrobial activities. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 5, p. 101–108, 2018.

OLDONI, T. L. C.; MELO, P. S.; MASSARIOLI, A. P.; MORENO, I. A. M.; BEZERRA, R. M. N.; ROSALEN, P. L.; DA SILVA, G. V. J.; NASCIMENTO, A. M.; ALENCAR, S. M. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chemistry**, v. 192, p. 306–312, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.004>>.

OLIVEIRA, D. M.; SILVA, T. F. R.; MARTINS, M. M.; DE MORAIS, S. A. L.; CHANG, R.; DE AQUINO, F. J. T.; DA SILVA, C. V.; TEIXEIRA, T. L.; MARTINS, C. H. G.; MORAES, T. S.; CUNHA, L. C. S.; PIVATTO, M.; DE OLIVEIRA, A. Antifungal and cytotoxicity activities of *Banisteriopsis argyrophylla* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 11, p. 1541–1552, 2018.

PASCUAL, M. E.; CARRETERO, M. E.; SLOWING, K. V.; VILLAR, A. Simplified Screening by TLC of Plant Drugs Simplified Screening by TLC of Plant Drugs. v. 0209, n. 2002, 2008.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 5. ed. [s.l.: s.n.]

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário das plantas**. Disponível em: <<https://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>>. Acesso em: 17 maio. 2021.

PLUMB, G. W.; DE PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; CHEYNIER, V.; WILLIAMSON, G. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. **Free Radical Research**, v. 29, n. 4, p. 351–358, 1998.

PRAKASH, M.; BASAVARAJ, B. V.; MURTHY, K. N. C. Biological functions of epicatechin: Plant cell to human cell health. **Journal of Functional Foods**, v. 52, n. August 2018, p. 14–24, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.021>>.

PRASANTH, D. S. N. B. K.; MURAHARI, M.; CHANDRAMOHAN, V.; PANDA, S. P.; ATMAKURI, L. R.; GUNTUPALLI, C. In silico identification of potential inhibitors from Cinnamon against main protease and spike glycoprotein of SARS CoV-2. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 13, p. 4618–4632, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1779129>>.

QIAN, W.; FU, Y.; LIU, M.; WANG, T.; ZHANG, J.; YANG, M.; SUN, Z.; LI, X.; LI, Y. In Vitro Antibacterial Activity and Mechanism of Vanillic Acid against Carbapenem-Resistant Enterobacter cloacae. **Antibiotics**, v. 8, n. June, 2020.

QUINET, A. Lauraceae Na Reserva Biológica De Poço Das Antas, Silva Jardim, Rio De Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 3, n. 57, p. 543–568, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J. [241 Total antioxidant status in plasma and body fluids. **Methods in Enzymology**, v. 234, n. C, p. 279–293, 1994.

RODRIGUES, A. B.; DE ALMEIDA-APOLONIO, A. A.; ALFREDO, T. M.; DA SILVA DANTAS, F. G.; CAMPOS, J. F.; CARDOSO, C. A. L.; DE PICOLI SOUZA, K.; DE OLIVEIRA, K. M. P. Chemical composition, antimicrobial activity, and antioxidant activity of ocotea minarum (Nees & Mart.) mez. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

RODRIGUES, A. M.; AMUSANT, N.; BEAUCHÊNE, J.; EPARVIER, V.; LEMÉNAGER, N.; BAUDASSÉ, C.; ESPINDOLA, L. S.; STIEN, D. The termiticidal activity of Sextonia rubra (Mez) van der Werff (Lauraceae) extract and its active constituent rubrynolide. **Pest Management Science**, v. 67, n.

11, p. 1420–1423, 2011.

RODRIGUES, A. M. de S. **Análise e valorização bioinspirada dos metabólitos secundários responsáveis pela durabilidade natural de madeiras exploradas na Guiana Francesa**. 2010. Universidade Federal do Amazonas, 2010.

RODRIGUES, A. M. S.; THEODORO, P. N. E. T.; EPARVIER, V.; BASSET, C.; SILVA, M. R. R.; BEAUCHÊNE, J.; ESPÍNDOLA, L. S.; STIEN, D. Search for antifungal compounds from the wood of durable tropical trees. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 10, p. 1706–1707, 2010.

ROHWEN, J. G., RICHTER, H. G., VAN DER WERFF, H. Two New Genera of Neotropical Lauraceae and Critical Remarks on the Generic Delimitation Author (s): Jens G . Rohwer , Hans Georg Richter and Henk van der Werff Source : Annals of the Missouri Botanical Garden , Vol . 78 , No . 2 (1991), pp . 388-400. **Missouri Botanical Garden**, v. 78, n. 2, p. 388–400, 1991.

ROHWER, J. G. J.g.rohwer. *In*: HEIDELBERG, S.-V. B. **Flowering Plants. Dicotyledons**. [s.l: s.n.]p. 366–367.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa**, p. 0–3, 2007.

SALES-CAMPOS, C.; LI, R.; VIANEZ, F. Indústrias madeireiras de manaus, a m a z o n a s , brasil. **Acta Amazonica**, v. 2, n. 30, p. 319–331, 2000.

SANTIAGO, J. de O. L. **Estudo dos metabólitos secundários e atividade antifúngica em resíduos madeireiros de *Hymenaea courbaril* L.** 2020. Universidade Federal do Amazonas, 2020.

SHANTY, A. A.; MOHANAN, P. V. Heterocyclic Schiff bases as non toxic antioxidants: Solvent effect, structure activity relationship and mechanism of action. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and**

Biomolecular Spectroscopy, v. 192, p. 181–187, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.11.019>>.

SILVA, F. R. P.; ALMEIDA, S. S. M. S. Análise Fitoquímica e Microbiológica da Atividade do Extrato Bruto Etanólico da Andiroba, *Carapa guianensis* Aubl. **Biota Amazônia**, v. 4, n. 4, p. 10–14, 2014.

SILVA, N. L. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. v. 6, p. 1–17, 2010.

SILVERSTEIN, R. M. .; WEBSTER, F. X. .; KIEMLE, D. J. **SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF ORGANIC COMPOUNDS** *Revista Mexicana de Física* Hoboken. 2005.

SIMÕES, C. M. O. . et al. **FARMACOGNOSIA, DO PRODUTO NATURAL AO MEDICAMENTO**. 2. ed. [s.l: s.n.]502 p.

SOUSA, C. M. D. M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. D. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SOUSA, S. F. de; KASPER, A. A. M.; SOUSA JÚNIOR, J. J. V. de; COSTA, I. C. G.; SARTORATTO, A.; MOUTINHO, V. H. P.; SILVA, S. K. R. da; BARATA, L. E. S. Análise fitoquímica e atividade antimicrobiana do extrato etanólico do resíduo madeireiro de *Hymenaea courbaril* L. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 4, p. 72–80, 2020.

SUEDEE, A.; TEWTRAKUL, S.; PANICHAYUPAKARANANT, P. Anti-HIV-1 integrase compound from *Pometia pinnata* leaves. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 10, p. 1256–1261, 2013.

SUMNER, N. Developing counter current chromatography to meet the needs of pharmaceutical discovery. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 36, p. 6107–6113, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.001>>.

TINE, Y.; DIALLO, A.; NDOYE, I.; YANG, Y.; RENUCCI, F.; GUËYE, R. S.; BALDÉ, M.; DIÉDHIU, A.; FALL, D.; SECK, M.; DESJOBERT, J.-M.; COSTA, J.; WÉLÉ, A.; PAOLINI, J. Flavonoid compounds from *Zanthoxylum leprieurii* Guill. Perr (Rutaceae) Extracts and their Antioxidant Activity against ABTS. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, v. 9, n. 3, p. 661–668, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v9i3.2678>>.

TRAN, T. H.; LE HUYEN, T.; TRAN, T. M.; NGUYEN, T. A.; PHAM, T. B.; NGUYEN TIEN, D. A new megastigmane sulphoglycoside and polyphenolic constituents from pericarps of *Garcinia mangostana*. **Natural Product Research**, v. 30, n. 14, p. 1598–1604, 2016.

ULLAH, R.; IKRAM, M.; PARK, T. J.; AHMAD, R.; SAEED, K.; ALAM, S. I.; REHMAN, I. U.; KHAN, A.; KHAN, I.; JO, M. G.; KIM, M. O. Vanillic acid, a bioactive phenolic compound, counteracts Ips-induced neurotoxicity by regulating c-jun n-terminal kinase in mouse brain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1–21, 2021.

VAN DER WERFF, H., RICHTER, H. G. Toward an Improved Classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden Press**, v. 83, n. 3, p. 409–418, 1996.

VAN DER WERFF, H. *Sextonia*, a new genus of Lauraceae from South America. **Novon**, v. 7, n. 4, p. 436–439, 1997.

VERÍSSIMO, A.; JUNIOR, C. S.; CELETANO, D.; SALOMÃO, R. **Áreas para produção florestal manejada: detalhamento do macrozoneamento ecológico econômico do estado do Pará**. [s.l: s.n.]81 p.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**. 2. ed. [s.l: s.n.]384 p.

WANG, G.; HUANG, X.; PEI, D.; DUAN, W.; QUAN, K.; LI, X.; DI, D. DPPH-HPLC-DAD analysis combined HSCCC for screening and identification of radical scavengers in *Cynomorium songaricum* Rupr. **New Journal of Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 3885–3891, 2016.

WERFF, van der. *Sextonia*, a New Genus of Lauraceae from South

America. **Missouri Botanical Garden**, v. 7, n. 4, p. 436–439, 1997.

XU, X.; XIE, H.; WANG, Y.; WEI, X. A-type proanthocyanidins from lychee seeds and their antioxidant and antiviral activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 22, p. 11667–11672, 2010.

YALCIN, O. U.; SARIKURKCU, C.; CENGIZ, M.; GUNGOR, H.; ĆAVAR ZELJKOVIĆ, S. Ganoderma carnosum and Ganoderma pfeifferi: Metal concentration, phenolic content, and biological activity. **Mycologia**, v. 112, n. 1, p. 1–8, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1689748>>.

YAMAGUCHI, K. K. de L.; ALCÂNTARA, J. M.; DA VEIGA, V. F. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 4, p. 541–546, 2012.

YUAN, J.; LI, B.; QIN, F. G. F.; TU, J. Analysis of Ethyl Acetate Extract of Enzymatic Hydrolysate from High Purity Oleuropein and DPPH Radical Scavenging Capacity. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 301, n. 1, 2018.

ZHANG, M.; WU, Q.; CHEN, Y.; DUAN, M.; TIAN, G.; DENG, X.; SUN, Y.; ZHOU, T.; ZHANG, G.; CHEN, W.; CHEN, J. Inhibition of proanthocyanidin A2 on porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in vitro. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–18, 2018.

ZHANG, X.; SU, M.; DU, J.; ZHOU, H.; LI, X.; LI, X. Comparison of Phytochemical Differences of the Pulp Cultivars with Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity. **Molecules**, v. 24, n. 1968, p. 1–15, 2019.

ZHUANG, M.; JIANG, H.; SUZUKI, Y.; LI, X.; XIAO, P.; TANAKA, T.; LING, H.; YANG, B.; SAITOH, H.; ZHANG, L.; QIN, C.; SUGAMURA, K.; HATTORI, T. Procyanidins and butanol extract of Cinnamomi Cortex inhibit SARS-CoV infection. **Antiviral Research**, v. 82, n. 1, p. 73–81, 2009.

10. ANEXO

Cronograma de atividades no laboratório de produtos naturais – DQ-ICE-UFAM.

X: Já realizado; **P: Pararam as análises devido a pandemia**; R: A realizar.

Atividades	2019					2020							2021									2022															
	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	
Disciplinas para obtenção de créditos	X	X	X	X	X			P	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X															
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X										X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Coleta do material vegetal e preparo dos extratos	X	X																																			
Prospecção fitoquímica em tubos (extratos)			X	X				P																													
Prospecção fitoquímica em placas: Acompanhamento por CCD					X			P																													
Análise de Capacidade antioxidante quantitativa e Ensaio bioguiados dos extratos (antes CCC) e frações de LLG03 (após CCC)					X	X	X	P																					X	X				X			
Cromatografia em Contracorrente do extrato (LLG03) das frações (isolamento)					X	X		P																			X	X	X								
Análises de espectrometria de massas							X	P																		X							X	X	X		
Análises dos espectros de massas							X	P																		X	X	X			X	X	X	X	X	X	
Organização e análise de dados em geral												X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Exame de Qualificação																									X												
Isolamento das substâncias de interesse								P																				X	X								
Ensaio de atividades antioxidantes das substâncias isoladas																															X	X					
Análises de elucidação estrutural								P																			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Escrita da Dissertação	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Defesa de Mestrado																																					R