

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM
BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM PRODUTOS NATURAIS - CPPN

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE
***Casearia javitensis* Kunth**

CLAUDIA DANTAS COMANDOLLI WYREPKOWSKI

MANAUS

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM
BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM PRODUTOS NATURAIS - CPPN

CLAUDIA DANTAS COMANDOLLI WYREPKOWSKI

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE
***Casearia javitensis* Kunth**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração em Biotecnologias para Saúde.

Orientadora: Cecilia Veronica Nunez, Doutora

Co-Orientador: Pierre Alexandre dos Santos, Doutor

MANAUS

2010

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cecilia Veronica Nunez (Orientadora) - INPA

Dr. Pierre Alexandre dos Santos (Co-Orientador) - UFAM

Dr. Sérgio Massayoshi Nunomura - INPA

Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro - UFAM

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, pela bênção que guiou-me a transpor os abismos de dúvidas e receios...

Aos meus pais, João Batista e Margareth, pelo amor e apoio incondicionais, por sempre incentivar os meus estudos, e por suportarem tanto tempo a enorme distância física que foi necessária para a realização deste trabalho.

Ao Júlio César Wyrepkowski, meu querido esposo, pela paciência durante mais esta etapa, e pelo incentivo de continuar este trabalho.

Às minhas irmãs Patricia e Nathalia, pelo entendimento e apoio durante as decisões profissionais.

Aos meus Avós, pelos exemplos de vida...

AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora Cecilia Veronica Nunez, a quem agradeço muito pela oportunidade da realização deste trabalho. Agradeço também pelos conhecimentos adquiridos, pela credibilidade na escolha dos caminhos seguidos e por todo o apoio durante o trabalho.

Agradeço muito ao professor e co-orientador Pierre Alexandre dos Santos pela sua preciosa ajuda, os seus ensinamentos, pelo companheirismo e pelo incentivo da busca do conhecimento em todos os momentos, que contribuíram muito para o meu amadurecimento.

Ao professor Takeshi Matsuura, pelo conhecimento e todo o apoio para a realização dos ensaios microbiológicos.

Ao professor Norberto Peporine Lopes (“Betão”), pela oportunidade do estágio em seu grupo de pesquisa, pela obtenção dos espectros, e pela paciência e conhecimento durante o breve convívio.

Aos professores da Pós-Graduação em Biotecnologia pelos ensinamentos, em especial à professora Leonor A. Oliveira Silva, pela oportunidade do estágio docente em Química Orgânica.

Aos pesquisadores do INPA, em especial à Maria da Paz Lima, pelos ensinamentos e ajuda.

À professora Kátia Naomi Kuroshima, ao professor Roberto Torres, e ao professor Marco Antônio Barreiros, pelos ensinamentos durante a iniciação científica.

Aos amigos do Laboratório de Bioprospecção, em especial à Jaqueline Alves Andrade, por todo o companheirismo e pela ajuda, principalmente nos momentos mais difíceis. Agradeço também aos queridos colegas de bancada: Vanessa, Sebastian, Taciane, Manoel, Nerilson, Lorena, David, Orleyson, Jaciara, Scarlet, Joyce, Júlio Nino e Maria Izabel. Agradeço à Francislani pela disposição para a realização dos testes antioxidantes e à Virgínia e à Karen pelos ensaios citotóxicos.

Aos amigos da Pós-Graduação em Biotecnologia, pelas discussões enriquecedoras: Gabriela Zanette, Jaqueline Bezerra, Renilto, Francimeire, Romilson, Rafael, Kemilla, Priscila, Nayane e Renata – os “extremófilos”. À fiel amiga, mesmo distante, Liã Barbara Arruda, pela amizade perseverante e pelas discussões filosóficas.

Aos técnicos da USP/Ribeirão Preto: Izabel Cristina, Thomaz e Vinícius, pelos ensinamentos durante a obtenção dos espectros.

Ao Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia, por todo apoio oferecido durante o curso e pela oportunidade de realização do Mestrado.

Às Instituições Universidade Federal do Amazonas e Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pela infraestrutura e materiais oferecidos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao PPBio/INPA/MCT, CT-Agro/CNPq, UNISOL e FAPEAM, pelo apoio financeiro à realização do projeto.

À todos que diretamente ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo isolar e identificar os metabólitos secundários presentes nos extratos de *Casearia javitensis*, assim como avaliar o potencial antimicrobiano, citotóxico e antioxidante destes extratos. Para o trabalho, foram realizadas quatro coletas na Reserva Adolpho Ducke, Manaus-AM. Os materiais coletados foram secos, moídos e extraídos em ultrassom com diclorometano (DCM), metanol (MeOH) e H₂O. Para os testes antimicrobianos, utilizou-se o método de difusão em ágar, pela técnica de poço, contra *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) foram determinadas para os extratos mais ativos. O ensaio citotóxico utilizou *Artemia salina* como organismo-teste e o ensaio de atividade antioxidante empregou o método quantitativo utilizando o radical DPPH e equivalência com o ácido ascórbico. O extrato DCM dos galhos foi fracionado por coluna cromatográfica (CC) e uma fração foi purificada através de recristalização. Frações analisadas por Cromatógrafo à Gas acoplado à Espectrometria de Massas (CG-EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) mostraram presença de esteroides, possuindo o β -sitosterol como majoritário nas frações. Os demais extratos DCM foram analisados por CG-EM em uma condição para análise de esteroides e triterpenos, e o triterpeno friedelina foi detectado nos extratos dos galhos. O extrato metanólico dos galhos da primeira coleta e o extrato metanólico das folhas da terceira coleta apresentaram halos de inibição superiores a 10 mm no teste contra *Aeromonas hydrophila*, CIM abaixo de 2 mg/mL e ausência de atividade citotóxica em *Artemia salina*. Estes extratos foram submetido à partição com diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (*n*-BuOH), e as fases obtidas foram avaliadas para atividade antimicrobiana. As fases AcOEt destes extratos mostraram-se como as mais ativas, concentrando a atividade antimicrobiana. A fase DCM do extrato MeOH dos galhos foi fracionada por sucessivas CCs e uma fração mostrou a presença de β -friedelanol por análise em CG-EM. A fase AcOEt foi fracionada por CC e algumas frações foram purificadas por CLAE, fornecendo cinco fenólicos glicosilados, os quais a determinação estrutural ainda não está concluída, pois espectros de RMN mono e bidimensionais são necessários para a conclusão desta etapa. A fase *n*-BuOH foi fracionada em CC utilizando Sephadex LH-20 e CC de Poliamida-6, e o espectro de RMN de uma fração semipurificada sugere a presença também de fenólicos glicosilados.

Palavras-Chave: Salicaceae, atividade antimicrobiana, cromatografia, fenólicos glicosilados.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity potentials of extracts of leaves and branches of *Casearia javitensis*, and to purify and identify their secondary metabolites. Leaves and branches were collected in Reserva Adolpho Ducke, Manaus, AM. The plant material was dried, grinded and the extracts were prepared with DCM, MeOH and water using ultrasound for 20 minutes each. The extracts were concentrated and tested for antibacterial, cytotoxicity and antioxidant activity. Antibacterial activity assays were done using the agar diffusion method by well technique, against *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were measured for the most active extracts. The cytotoxicity assay employed brine shrimp *Artemia salina* and the evaluation of antioxidant activity used a method with DPPH and ascorbic acid. DCM branches extract was fractioned in chromatographic column (CC), and recrystallization. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analyses afforded steroids, as β -sitosterol. DCM extracts of leaves and branches were analyzed by GC-MS in appropriated conditions to steroids and triterpenes analyses, and triterpene friedelin was detected in branches extracts. Antimicrobial assay showed high activity for branches MeOH extract and leaves MeOH extract against *A. hydrophila*, MIC value < 2 mg/mL and showed no cytotoxicity in *Artemia salina*. These MeOH extracts were dissolved in water and partitioned between dichloromethane (DCM), ethyl acetate (AcOEt) and *n*-butanol (*n*-BuOH), and these phases were tested for antibacterial activity. The AcOEt phases were the most active, and showed high antimicrobial activity. The DCM phase from branches MeOH extract was fractioned by CC and afforded β -friedelanol. The AcOEt fraction of branches MeOH extract was fractioned by CC and some fractions were purified by HPLC, and afforded five phenolic glycosides, which structures are not yet determined. 1D and 2D-NMR and mass spectrometry analyses are still on progress. The *n* – BuOH phase from branches MeOH extract was fractioned by exclusion chromatography (Sephadex LH-20) and subjected to CC over a Poliamide-6 column, and NMR analyses of one fraction suggest the presence of a phenolic glycoside.

Key-words: Salicaceae, antimicrobial activity, chromatography, phenolic glycoside.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via de biossíntese das principais classes de metabólitos secundários. Adaptado de: SANTOS, 2004; DEWICK, 2002.	5
Figura 2 - Principais fatores que influenciam a produção e acúmulo de metabólitos secundários nas plantas. Fonte: GOBBO-NETO & LOPES, 2007.	6
Figura 3 – Exemplos de metabólitos identificados em espécies de Salicaceae.	15
Figura 4 - Imagens de <i>Casearia javitensis</i> Kunth	27
Figura 5 - Esquema geral para a preparação de extratos de <i>Casearia javitensis</i>	34
Figura 6 - Esquema do fracionamento cromatográfico do extrato Cj.2.Galhos-DCM	37
Figura 7 - Esquema do fracionamento cromatográfico da Fase DCM do extrato Cj.1 Galhos-MeOH.	40
Figura 8 - Esquema do fracionamento cromatográfico da Fase AcOEt do extrato Cj.1-Galhos-MeOH.....	42
Figura 9 - Esquema do fracionamento cromatográfico da Fase n-BuOH do extrato Cj.1-Galhos-MeOH.....	44
Figura 10 - Análise por CCDC dos extratos DCM. Eluição em Hex/AcOEt (8:2).....	50

Figura 11 - Análise por CCDC dos extratos MeOH.Eluídas em AcOEt/MeOH (8:2)I – Luz visível ; II- UV 254 nm ; III – UV 365 nm; IV – Sulfato cérico; V – Cloreto férrico ; VI - anisaldeído sulfúrico. G – GalhoF – Folha.....	58
Figura 12 - Análise por CCDC das frações obtidas da coluna cromatográfica da partição DCM, eluídas com Hexano/Acetona (1:1) e reveladas com sulfato cérico. .	59
Figura 13 - Análise por CCDC das frações obtidas da coluna cromatográfica da partição AcOEt. Eluição com AcOEt/MeOH/H ₂ O (8,5:1:0,5) reveladas com A – Anisaldeído; B – Cloreto férrico; C – sulfato cérico.	61
Figura 14 – Expansões da região de 6,8 a 7,5 ppm, espectro de ¹ H de 4.4-9.3, 500 MHz, CD ₃ OD.....	63
Figura 15 - Expansões da região de 0,8 a 5,4 ppm, espectro de ¹ H de 4.4-9.3, 500 MHz, CD ₃ OD.....	63
Figura 16 - Expansões da região de 6,8 a 7,9 ppm, espectro de ¹ H de 4.4-9.5, 500 MHz, CD ₃ OD.....	64
Figura 17 - Expansões da região de 5,3 a 7,5 ppm, espectro de ¹ H de 4.10.3, 300 MHz, CD ₃ OD.....	66
Figura 18 - Expansões da região de 1,0 a 4,5 ppm, espectro de ¹ H de 4.10.3, 300 MHz, CD ₃ OD.....	67
Figura 19 - Expansões da região de 5,3 a 7,5 ppm, espectro de ¹ H de 4.10.4, 300 MHz, CD ₃ OD.....	68

Figura 20 - Expansões da região de 5,3 a 7,5 ppm, espectro de ^1H de 4.11-13.2, 500 MHz, CD_3OD	71
Figura 21 - Expansões da região de 0,6 a 1,4 ppm, espectro de ^1H de 4.11-13.2, 500 MHz, CD_3OD	71
Figura 22 - Cromatogramas da análise por CLAE das frações obtidas do fracionamento da fase <i>n</i> -BuOH.....	74
Figura 23 - Cromatogramas da análise por CLAE das frações obtidas do fracionamento da Fração [12-15]. Monitorados por absorção em UV (230, 254, 282 3 365 nm).....	76
Figura 24 - Expansões da região de 5,2 a 8,0 ppm, espectro de ^1H de 5.[12-15].95-129, 300 MHz, CD_3OD	77
Figura 25 - Expansões da região de 0,9 a 4,3 ppm, espectro de ^1H de 5.[12-15].95-129, 300 MHz, CD_3OD	78
Figura 26 - Atividade antibacteriana contra <i>A. hydrophila</i> dos extratos de galhos e folhas de <i>Casearia javitensis</i> . Metodologia cavidade-placa. A – Cj.1; B – Cj.2; C- Cj. 3; D – Cj.4.; C.N – controle negativo; C. P. – oxitetraciclina.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coletas realizadas e características do material coletado.	33
Tabela 2 – Rendimento das extrações de galhos e de folhas de <i>Casearia javitensis</i>	35
Tabela 3 - Massas das fases obtidas das partições dos extratos.....	39
Tabela 4 - Retenções relativas e Pico base de esteróides e triterpenos das amostras-padrão.....	52
Tabela 5 - Metabólitos presentes nos extratos DCM e identificados por CG-EM	53
Tabela 6 - Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ¹ H das frações 4.4-9.3 e 4.4-9.5, em CD ₃ OD, 500 MHz.	65
Tabela 7 - Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ¹ H e ¹³ C e correlação em HMQC das frações 4.10.3 e 4.10.4, em CD ₃ OD, TMS, 300 MHz. ..	69
Tabela 8 - Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ¹ H da fração 4.11-13.2, em CD ₃ OD, 500 MHz.....	72
Tabela 9 - Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ¹ H da fração 5.[12-15].95-129, em CD ₃ OD, TMS, 300MHz.....	78
Tabela 10 - Tabela de convenção para classificar a atividade antibacteriana.....	79
Tabela 11 - Halos de inibição apresentados pelos extratos de <i>Casearia javitensis</i> para os diferentes micro-organismos-teste.	80
Tabela 12 - Valores CIM e CMB contra <i>Aeromonas hydrophila</i> apresentados pelos extratos MeOH avaliados.	84

Tabela 13 - Halos de inibição apresentados pelas fases das partições dos extratos MeOH de galhos e de folhas de <i>Casearia javitensis</i> para diferentes microorganismos-teste.	85
Tabela 14 - Taxas de mortalidade de larvas de <i>Artemia salina</i> observadas na presença dos extratos de <i>Casearia javitensis</i>	87
Tabela 15 - Resultados dos testes de atividade antioxidante dos extratos brutos de <i>Casearia javitensis</i>	89

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1 - Cromatograma Cj.2.Folhas-DCM.....	105
Apêndice 2 - Cromatograma Cj.3.Folhas-DCM.....	105
Apêndice 3 - Cromatograma Cj.3.Galhos-DCM	106
Apêndice 4 - Cromatograma Cj.4.Folhas-DCM.....	106
Apêndice 5 - Cromatograma Cj.4.Galhos-DCM	107
Apêndice 6 - Cromatograma da fração Cj.2.GD.1.10.Cristais.....	107
Apêndice 7 - Espectro de Massas da fração Cj.2.GD.1.10.Cristais	107
Apêndice 8 - Espectro de RMN de ^1H , 300 MHz de Cj.2.GD.1.10.cristais	108
Apêndice 9 - Cromatograma da fração Cj.2.GD.1.10.agua-mãe.....	108
Apêndice 10 - Espectro de RMN de ^1H , 60 MHz, de Cj.2.GD.1.10.agua-mãe	109
Apêndice 11 - Cromatograma da fração Cj.2.GD.1.8-9	109
Apêndice 12 - Cromatograma da fração Cj.2.GD.1.27-29	Erro! Indicador não definido.
Apêndice 13 - Cromatograma da fração Cj.2.GD.1.30-32	110
Apêndice 14 - Espectro de RMN de ^1H , 60 MHz, da fração Cj.2.GD.1.30-32	110
Apêndice 15 - Cromatograma da fração Cj.2.GD.1.33-37	111
Apêndice 16 - Espectro de RMN de ^1H , 60 MHz, da fração Cj.2.GD.1.33-37	111
Apêndice 17 - Cromatograma da fração Cj.2.GD.1.50-53	112
Apêndice 18 - Espectro de RMN de ^1H , 60 MHz, da fração Cj.2.GD.1.50-53.....	112

Apêndice 19 - Cromatograma da fração Cj.2.GD.1.62-65	113
Apêndice 20 - Espectro de RMN de ^1H , 500 MHz, de 4.4-9.3.....	113
Apêndice 21 - Espectro de RMN de ^1H , 500 MHz, de 4.4-9.5.....	114
Apêndice 22 - Espectro de RMN de ^1H , 300 MHz, de 4.10.3.....	114
Apêndice 23 - Espectro de RMN de ^{13}C , 300 MHz, de 4.10.3	115
Apêndice 24 - Espectro de HMQC, 300 MHz, de 4.10.3.....	115
Apêndice 25 - Espectro de Massas, IES modo neg., de 4.10.3	116
Apêndice 26 - Espectro de Massas, IES modo pos., de 4.10.3	116
Apêndice 27 - Espectro de RMN de ^1H , 300 MHz, de 4.10.4.....	117
Apêndice 28 - Espectro de RMN de ^{13}C , 300 MHz, de 4.10.4	117
Apêndice 29 - Espectro de HMQC, 300 MHz, de 4.10.4.....	118
Apêndice 30 - Espectro de Massas, IES modo neg., de 4.10.4	118
Apêndice 31 - Espectro de RMN de ^1H , 500MHz de 4.11-13.2	119
Apêndice 32 - Espectro de RMN de ^1H , 500 MHz, de 4.11-13.2	120
Apêndice 33 - Espectro de RMN de ^1H , 500 MHz, de 4.11-13.2	120
Apêndice 34 - Espectro de Massas, IES modo neg., de 4.11-13.2.....	121
Apêndice 35 - Espectro de RMN de ^1H , 60 MHz, da fração Cj.1GM.5.3.....	121
Apêndice 36 - Espectro de RMN de ^1H , 60 MHz, da fração Cj.1GM.5.4-5.....	122
Apêndice 37 - Espectro de RMN de ^1H , 60 MHz, da fração Cj.1.GM.5.8-11.....	122
Apêndice 38 - Espectro de RMN de ^1H , 60 MHz, da fração Cj.1.GM.5.12-15.....	123
Apêndice 39 - Espectro de RMN de ^1H , 60 MHz, da fração Cj.1.GM.5.16.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt – Acetato de etila

n-BuOH – Butanol

CC – Coluna Cromatográfica

CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CD₃OD – Metanol deuterado

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

CG-EM – Cromatografia à Gás acoplada à Espectrometria de Massas

CIM – Concentração Mínima Inibitória

CL₅₀ – Concentração Letal para 50% dos indivíduos

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CMB – Concentração Mínima Bactericida

DCM – Diclorometano

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-difenil-2-picril-hidrazila

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

IES-EM-TOF – Espectrometria de Massas com Ionização Eletrospray e análise por Tempo de Voo (Time of Fly).

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

MeOH – Metanol

R_f – Fator de retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

TMS - Tetrametilsilano

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE APÊNDICES	xiii
SUMÁRIO	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2. 1. Prospecção de substâncias bioativas de vegetais	3
2. 2. Prospecção de substâncias com atividade antioxidante	6
2. 3. A busca por substâncias antimicrobianas	8
2. 4. Avaliação da atividade citotóxica	11
2. 5. Família Salicaceae	12
2.5.1. Gênero <i>Casearia</i>	25
2.5.2. <i>Casearia javitensis</i> Kunth	26
3. OBJETIVOS	28
3. 1. Objetivo geral	28
3. 2. Objetivos específicos	28

4.	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1.	Equipamentos e materiais utilizados	29
4.2.	Metodologia – Parte experimental	32
4.2.1	Coleta e Preparação de Extratos	32
4.2.2	Análises cromatográficas, fracionamento e identificação dos metabólitos presentes nos extratos	35
4.2.3	Ensaio Biológico	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	Análises cromatográficas e identificação dos constituintes dos extratos DCM	49
5.1.1	Análise dos extratos DCM por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)	49
5.1.2	Análise dos extratos DCM por CG-EM	51
5.1.3	Isolamento e identificação de Esteroides do extrato Cj.2-Galhos-DCM	54
5.2	Análises cromatográficas e identificação dos constituintes dos extratos MeOH	57
5.2.1	Análise dos extratos MeOH por CCDC	57
5.2.2.	Fracionamento do Extrato Cj.1-Galhos-MeOH	59
5.3	Ensaio Biológico	79
5.3.1	Ensaio antimicrobiano de extratos de <i>Casearia javitensis</i>	79
5.3.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)	83

5.3.3	Ensaio antimicrobianos das fases da partição de extratos MeOH de <i>Casearia javitensis</i>	84
5.3.4	Atividade citotóxica em <i>Artemia salina</i>	86
5.3.3	Ensaio quantitativo de Atividade Antioxidante	88
6	CONCLUSÕES	91
7.	REFERÊNCIAS	93
8.	APÊNDICE	105

1. INTRODUÇÃO

As plantas, além de seu uso na medicina popular como chás, infusões, com finalidades terapêuticas, têm contribuído também para a obtenção de vários fármacos, os quais podem ser isolados diretamente de fontes vegetais, ou então fornecendo substâncias que servem como protótipos de fármacos (MACIEL *et al.*, 2002; BARREIRO, 2001). Segundo Lima (2001), pesquisas com produtos naturais de plantas consistem, em sua maioria, na busca da obtenção de princípios ativos contidos nas espécies vegetais, pelo fato de possuírem alto percentual de diversidade molecular, fato este essencial para a descoberta e produção de novos fármacos.

Cechinel-Filho & Yunes (2001) demonstram que o panorama da fitoquímica é decisivo para o Brasil devido a sua grande riqueza vegetal ainda sem estudo. Entre os biomas brasileiros, a Floresta Amazônica destaca-se no fator biodiversidade. A grande diversidade de plantas constitui uma fonte muito rica para a bioprospecção de produtos naturais biologicamente ativos.

Os chamados princípios ativos são os metabólitos secundários, substâncias produzidas pelos organismos que têm funções adaptativas, e são originadas de vias derivadas do metabolismo primário (SANTOS, 2004). Diversos metabólitos isolados de vegetais da flora amazônica já demonstraram uma gama de aplicações, como produção de fármacos, fragrâncias, e até mesmo inseticidas.

Entre as diversas famílias vegetais encontradas na região Amazônica, a família Salicaceae destaca-se por possuir espécies conhecidas pelo uso medicinal, como espécies do gênero *Salix* (CECHINEL-FILHO & YUNES, 2001) conhecidas por serem produtoras de salicilatos (FERNANDES *et al.*, 2009). Algumas espécies

podem possuir ação tóxica, como é o caso de *Rhyania speciosa* da qual foi obtida a rianodina, que apresenta atividades inseticidas (ROEL *et al.*,2000).

A família Salicaceae engloba também espécies com propriedades medicinais, como *Casearia sylvestris* (PRINCE, 2008). Esta espécie é uma planta medicinal utilizada por índios, caboclos e pela população em geral, no Brasil e em toda América do Sul, sendo que suas folhas, cascas e raízes são utilizadas como antitérmico, anestésico local, antidiarréico, antiofídico, antireumático, antisséptico e cicatrizante (JUNGES *et al.*, 1985; DA SILVA *et al.*, 2008).

Estudos de bioprospecção realizados por este grupo de pesquisa, coordenado pela pesquisadora Dra. Cecilia Veronica Nunez, avaliaram o potencial bioativo de cerca de 30 espécies da região Amazônica. Entre os extratos testados até o mês de julho de 2008, dois extratos de *Casearia javitensis* destacaram-se por mostrarem-se como os mais ativos em testes de atividade antimicrobiana *in vitro* e também por apresentar alta atividade antioxidante. Na literatura, porém, não há relatos de estudos químicos e/ou farmacológicos desta espécie, embora esta seja frequentemente encontrada na região Amazônica.

Assim, os resultados promissores observados, somado com a falta de estudos com a espécie *Casearia javitensis*, estimularam a realização da presente pesquisa, a qual objetiva realizar o estudo químico de extratos da espécie *C. javitensis* Kunth, assim como avaliar as atividades antimicrobiana, antioxidante e citotóxica de extratos obtidos a partir de extratos de diferentes épocas do ano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. 1. Prospecção de substâncias bioativas de vegetais

No Brasil, pesquisas voltadas para a descoberta de protótipos de fármacos, e/ou fitoterápicos, além de propiciarem o avanço da pesquisa básica multidisciplinar, podem contribuir também para o desenvolvimento tecnológico nacional, se levarmos em conta que a diversidade de metabólitos produzidos nos biomas brasileiros é ainda muito pouco explorada do ponto de vista farmacológico (BARREIRO & BOLZANI, 2009).

Os vegetais são excelentes fontes de matéria-prima na prospecção de novos fármacos, tendo-se em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química (NOBRE, 2008; BARREIRO, 2001). Como a diversidade estrutural é um ponto crucial em pesquisas que visam atingir diferentes alvos biológicos, o estudo de produtos naturais pode ser promissor nesse objetivo, pois durante os milhões de anos da evolução biológica a seleção natural realizou um processo de química combinatória inigualável (CECHINEL-FILHO& YUNES, 2001).

Organismos necessitam transformar e interconverter uma gama de substâncias orgânicas para o seu crescimento e reprodução, possuindo uma rede integrada de enzimas para a produção e degradação de metabólitos primários e metabólitos secundários (DEWICK, 2002). Os metabólitos primários são as biomoléculas essenciais e universais em todos os seres vivos, como proteínas, ácidos nucleicos, sacarídeos e lipídeos. Os metabólitos secundários, também chamados de produtos naturais, não são distribuídos universalmente em todos os

seres vivos, sendo muitas vezes relatados como substâncias adaptativas (SANTOS, 2004; DEWICK, 2002).

Os produtos naturais são divididos em classes de metabólitos secundários, sendo os principais grupos os terpenos, entre eles os esteroides, as substâncias fenólicas e os alcaloides. Os terpenos representam o maior grupo, com cerca de 33 mil substâncias relatadas (VERPOORTE & MARASHIN, 2001).

A origem destes metabólitos, em geral, pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, sendo a via acetato-mevalonato e a desoxixilulose fosfato para a formação de terpenos; a rota do acetato e do chiquimato para a formação de substâncias fenólicas, juntamente com o triptofano para a formação de alcaloides (SANTOS, 2004). A rota de biossíntese básica dos produtos naturais está esquematizada na figura 1.

A variedade e complexidade de metabólitos produzidos pelas plantas sofrem influência dos estímulos ambientais, bastante variáveis, de natureza química, física e biológica sobre sua composição química (ALVES, 2001; GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Entre os fatores abióticos, Gobbo-Neto e Lopes (2007), afirmam que a quantidade e a natureza dos metabólitos varia durante o ano, e até mesmo durante o dia (figura 2), como por exemplo, as concentrações de hipericinana erva de São João (*Hypericum perforatum*) aumentam de cerca de 100 ppm no inverno para mais de 3000 ppm no verão. Porém, outros fatores também estão ligados à produção de metabólitos (figura 2), tais como temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, poluição atmosférica, altitude, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007), competição, estágio de desenvolvimento, entre outros (SANTOS, 2004).

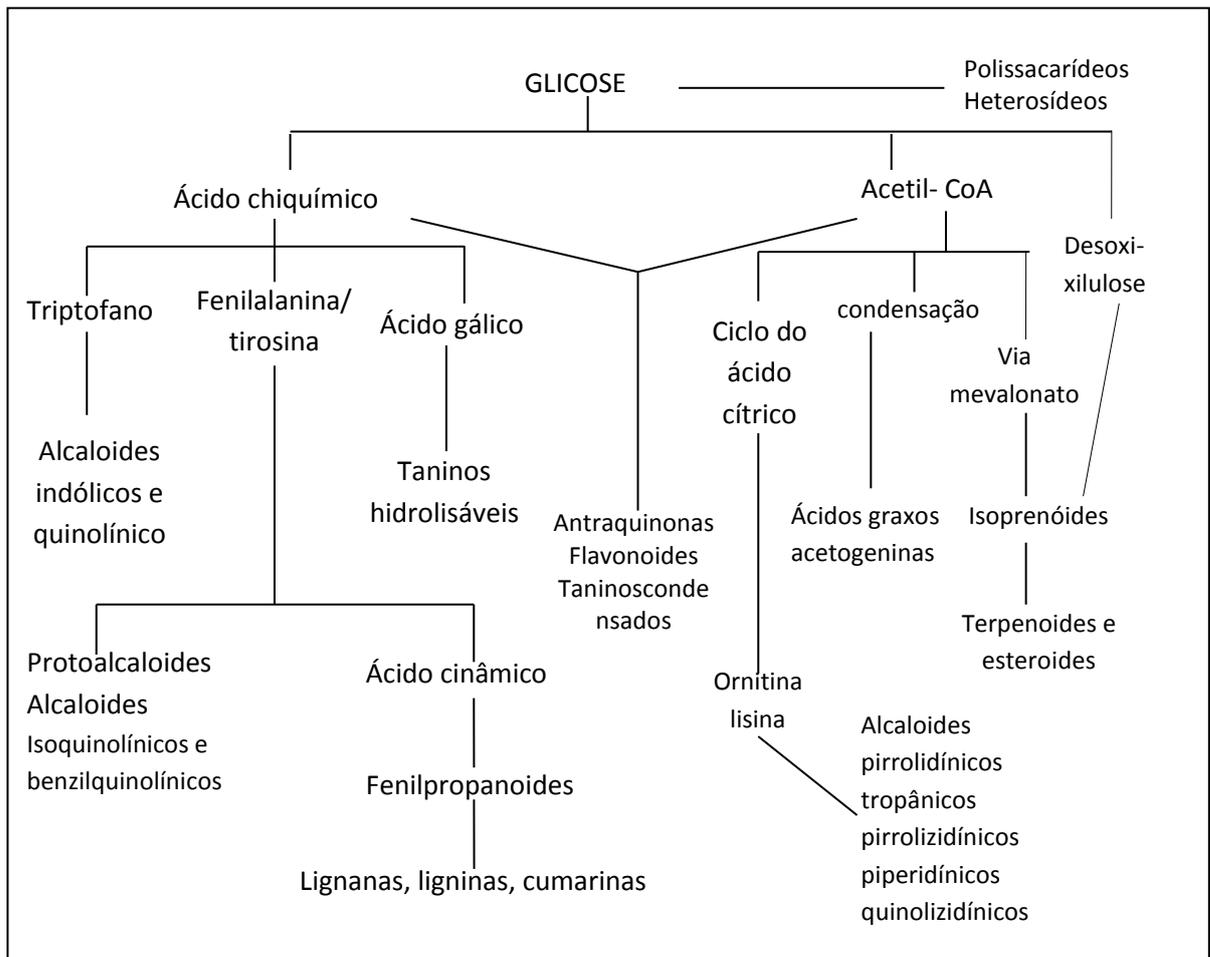


Figura 1 - Via de biossíntese das principais classes de metabólitos secundários. Adaptado de: SANTOS, 2004; DEWICK, 2002.

Assim, um estudo que visa encontrar substâncias bioativas de vegetais, ou padronização de extratos com utilização terapêutica, deve considerar todos os fatores que possam influenciar a produção ou o acúmulo da(s) substância(s) de interesse, tendo cuidado especial com relação a época e local da coleta, secagem, transporte, etc. (CALIXTO, 2001).

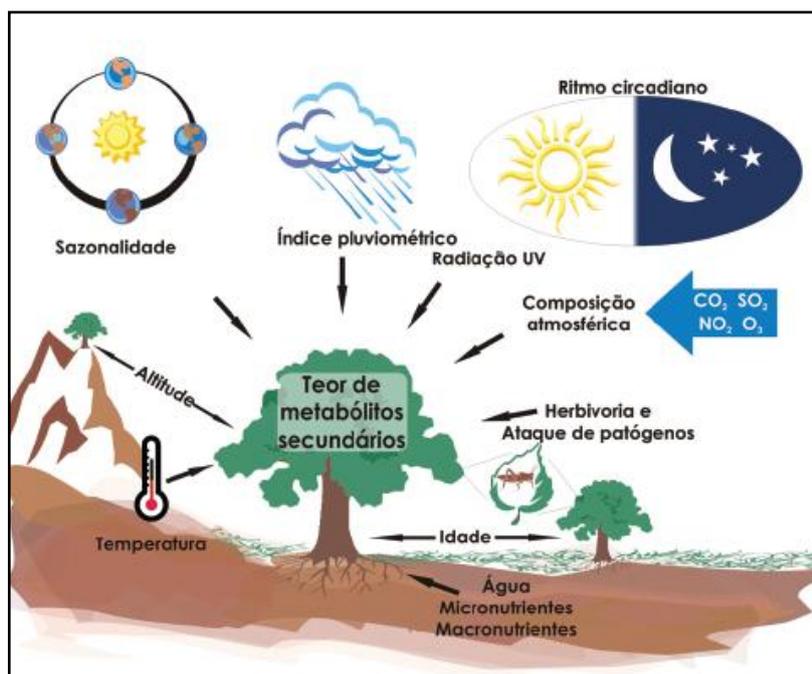


Figura 2 - Principais fatores que influenciam a produção e acúmulo de metabólitos secundários nas plantas. Fonte: GOBBO-NETO & LOPES, 2007.

2. 2. Prospecção de substâncias com atividade antioxidante

Entre as diversas atividades biológicas dos metabólitos secundários produzidos por vegetais, inclui-se a atividade antioxidante, a qual vem sendo amplamente explorada na área de cosmetologia e produção de alimentos.

Extratos que possuem atividade antioxidante usualmente contêm substâncias fenólicas, por exemplo, cumarinas, flavonoides, e catequinas (DAPKEVICIUS *et al.*, 1998). Ácidos orgânicos, carotenoides, proteínas, taninos podem estar presentes e terem atividade como antioxidantes ou ter um efeito sinérgico com substâncias fenólicas (MOSADDIK *et al.*, 2004). Estudos recentes vêm demonstrando que a atividade antioxidante está relacionada com o número de grupos hidroxilas livres dos

flavonoides (MOSADDIK *et al.*, 2004). Pode estar também relacionada com o tamanho da cadeia carbônica que contenha ligações duplas conjugadas.

Substâncias antioxidantes de origem vegetal pertencem a diferentes classes de metabólitos, mas, indubitavelmente, os flavonoides constituem o grupo mais representativo, sendo encontrado com elevada diversidade de estruturas químicas (WILHELM-FILHO *et al.*, 2001).

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e os mecanismos de defesa do organismo. EROs em excesso podem originar no organismo, por meio de falha na respiração mitocondrial, ativação de polimorfismo nuclear, ácido araquidônico, ativação-inibição de sistemas enzimáticos, e catálise da ligação de ferro ou cobre (fatores endógenos) (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005).

O aumento de radicais livres, assim, está relacionado com o processo de envelhecimento do corpo humano, como o aparecimento de tumores e o dano tecidual (WILHELM-FILHO *et al.*, 2001). Desta forma, já se conhece bastante sobre o papel dos radicais livres nos processos de geração de doenças, buscando-se agora tentativas de intervenção que possam minimizar os danos causados. Tais intervenções precisam ser feitas por substâncias que neutralizem os radicais livres, o que é conseguido com o uso de substâncias com atividade antioxidante (BALESTRIN, 2006).

Os melhores produtos antioxidantes são os que impedem o excesso de EROs, através da estimulação do mecanismo de reparo antioxidante, ou através da doação ou captura de elétrons para a estabilização do radical livre (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005).

2. 3. A busca por substâncias antimicrobianas

A descoberta de novas substâncias com atividade antimicrobiana constitui uma necessidade urgente devido a fatores como o aumento da incidência de novas e re-emergentes enfermidades infecciosas, juntamente com a resistência desenvolvida pelos micro-organismos aos antibióticos usados clinicamente (MALLAVAPURU, 2001).

Uma série de substâncias de origem vegetal, inclusive de espécies brasileiras, já apresentaram atividade antibacteriana, antifúngica e antiprotozoária (LIMA, 2001). Entre os produtos naturais isolados com atividade, pode-se citar os alcaloides com atividade antibacteriana condalina A e escutiamina E, isolados do extrato metanólico das cascas de *Scutia buxifolia* (MOREL *et al.*, 2005) e a anonaína e isoboldina, isolados de *Anona salzmanii* (PAULO *et al.*, 1992); antraquinonas e naftoquinonas isoladas de *Tabebuia impetiginosa* com atividade contra *Helicobacter pylori* (PARK *et al.*, 2006) e o ácido hidroxibenzóico, isolado de *Piper aduncum* que também apresentou atividades antimicrobianas (ORJALA *et al.*, 1993).

Atividade leishmanicida foi detectada em benzofenonas preniladas isoladas de *Garcinia brasiliensis* (PEREIRA *et al.*, 2010) e também em óleo de copaíba extraído de diferentes espécies do gênero *Copaifera* (SANTOS *et al.*, 2008).

Os agentes antimicrobianos podem manifestar sua atividade através de vários mecanismos: lesão da parede celular, alterações da permeabilidade celular, alterações das moléculas de proteínas e ácidos nucléicos e inibição da síntese de ácidos nucléicos (LIMA, 2001). As drogas antimicrobianas podem ser classificadas como bactericidas, quando matam o microrganismo, ou bacteriostáticas, quando impedem o crescimento do mesmo. No caso das drogas bacteriostáticas, o hospedeiro se defende por si, utilizando mecanismos como a fagocitose e a

produção de anticorpos, normalmente destruindo o microrganismo (TORTORA *et al.*, 2005).

Em relação às bactérias Gram-positivas de interesse clínico, *Staphylococcus aureus* destaca-se pela sua resistência a muitos fármacos (BROWN & NGENO, 2007), sendo que são as maiores causas de desordens cutâneas, respiratórias, ósseas e endovasculares (LOWY, 2003).

Entre as bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentam-se como importantes micro-organismos de interesse clínico. Segundo Nobre (2008), embora cepas de *E. coli* ocorram naturalmente na microbiota intestinal, certas linhagens podem apresentar alta capacidade de causar uma variedade de doenças, passando, neste caso, a ser consideradas como um patógeno de humanos e animais, estando relacionado a infecções do trato urinário (SANTO *et al.*, 2006), gastrintestinais e infecções nosocomiais, incluindo septicemia e meningites (NOBRE, 2008).

A importância dos estudos de novas substâncias contra *Pseudomonas aeruginosa* deve-se ao fato de que este microrganismo apresenta comportamento oportunista, estando relacionado a várias manifestações clínicas no homem e em animais (TANAKA *et al.*, 2002). No homem, a ocorrência de *P. aeruginosa* está relacionada principalmente a distúrbios entéricos e dermatites pós-queimaduras (TANAKA *et al.*, 2002), sendo considerado como um dos principais agentes de infecções hospitalares, apresentando multirresistência aos antimicrobianos convencionais (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

Quando se fala em patógenos que acometem doenças em aquicultura, as bacterioses são as doenças mais significantes em cultivo intensivo (ANDRADE, 2009). Bactérias do gênero *Aeromonas* possuem uma ampla distribuição em vários

tipos de ambientes hídricos (ROCHA, 2004), sendo frequentemente encontrada no pescado. Entre as espécies de *Aeromonas*, a que provoca maior mortalidade em aquicultura é a espécie *Aeromonas hydrophila*, prejudicando a piscicultura, ranicultura, miticultura etc., como também outras criações, tal como a avicultura (COSTA *et al.*, 2004; MOURIÑO *et al.*, 2006; ANDRADE, 2009).

Além do problema de mortalidade de peixes e outros animais, bactérias do gênero *Aeromonas* possuem vários fatores de virulência que justificam sua ameaça como patógeno humano, pois são causadoras de diarreia, infecções intestinais, e em indivíduos imuno comprometidos são causadoras de septicemia, meningite e até óbito (YAMADA *et al.*, 1997).

As patologias causadas por *Aeromonas*, em humanos e em animais em geral, somadas com a resistência destas bactérias aos antibióticos utilizados atualmente, justifica a busca por novos agentes que visem o seu controle, principalmente na aquicultura (KUBITZA, 2004).

Buscando utilizar produtos naturais para combater bactérias patogênicas na aquicultura, Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn (2007), verificaram que flavonoides isolados da folha de *Psidium guajava*, possuíam efeito bacteriostático sobre *Aeromonas hydrophila* e outras bactérias patogênicas de peixes. Outro trabalho nesta linha de pesquisa avaliou o extrato aquoso da folha de *Eclipta alba*, que quando acrescentado à dieta de *Oreochromis mossambicus* (tilápia) aumentava a resposta imune não-específica e a resistência a *Aeromonas hydrophila* (CHRISTYBAPITA *et al.*, 2007).

2. 4. Avaliação da atividade citotóxica

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade de extratos, frações e substâncias através de um bioensaio com um sistema de *screening* rápido e sensível, novas metodologias foram desenvolvidas (MEYER *et al.*, 1982), entre elas o ensaio empregando larvas *Artemia salina*.

Artemia salina é um organismo sensível a um amplo espectro de substâncias com atividades biológicas, sendo que o bioensaio utilizando este organismo foi inicialmente proposto por Michael e colaboradores (1956), onde se avaliou a citotoxicidade de inseticidas. O teste permite a avaliação de metabolitos e extratos tóxicos e também para a determinação da concentração em que a porcentagem de mortalidade seja de 50 % dos indivíduos (CL₅₀) (GONZÁLES *et al.*, 2007).

Artemia salina é um microcrustáceo da ordem Anostraca que vive em lagos de água salgada e salinas de todo o mundo, e como é utilizado como alimento para peixes, cistos de *A. salina* são facilmente encontrados em lojas de aquaristas. Além disso, os ovos não eclodidos são metabolicamente inativos, e podem ser conservados por longos períodos se mantidos desidratados e a baixas temperaturas (MICHAEL *et al.*, 1956). Quando reidratados, os cistos de *Artemia salina* eclodem em cerca de 24 horas, sendo que o ciclo de vida relativamente curto favorece seu uso em testes de citotoxicidade (McLAUGHLIN *et al.*, 1998).

Embora seja um teste preliminar, o teste utilizando *Artemia salina* é útil para triagens iniciais de extratos, pois apresenta muitos requisitos exigidos para um organismo-teste (KOUTSAFTIS & AOYAMA, 2007), tais como o curto tempo de ciclo de vida e a sensibilidade a diferentes substâncias.

2. 5. Família Salicaceae

A família Salicaceae foi reorganizada na revisão do APG II, no ano de 2003, sendo incluídos nesta família vários gêneros que pertenciam à extinta família Flacourtiaceae (SOUZA & LORENZI, 2005). Entre as características morfológicas de Salicaceae, estão as folhas simples, alternas, quase sempre dísticas, com a margem do limbo serrilhado (SOUZA & LORENZI, 2005). Há presença de pontuações translúcidas em muitas espécies, e as estípulas são geralmente inconspícuas, pequenas ou caducas. As flores caracterizam-se por serem geralmente pequenas, actinomorfas, bi ou unissexuais e as espécies frequentemente dioicas; e o fruto é uma baga carnosa ou uma cápsula deiscente por válvulas (VASQUEZ, 2005). As flores geralmente possuem estames coniventes e um gineceu tricarpelar; o fruto é geralmente uma cápsula (SOUZA & LORENZI, 2005).

Estudos de filogenia molecular, baseados na sequência genética do plastídio *rbcL*, mostraram que a família Flacourtiaceae não era monofilética, e assim foi reclassificada em outros dois clados; alguns gêneros foram classificados em Salicaceae e outros em Achariaceae (MOSADDIK, 2007a). Entre as tribos que pertenciam à Flacourtiaceae e passaram a pertencer à Salicaceae, estão: Abatieae, Scolopiae, Banarea, Homalieae, Flacourtieae e Casearieae (SOUZA & LORENZI, 2005). O gênero *Oncoba* foi o único da tribo Oncobeae a ser reclassificado em Salicaceae (SOUZA & LORENZI, 2005).

Estudos com espécies de Salicaceae e de Flacourtiaceae observaram que estas famílias eram muito próximas, tanto por características morfológicas, quanto por características químicas. Substâncias fenólicas como salicina e outros salicilatos são encontrados exclusivamente em algumas espécies destas duas famílias (MOBOT, 2010). Entretanto, espécies do gênero *Banara*, que também pertencia à

Flacourtiaceae e agora foi reclassificado em Salicaceae, são as únicas que produzem glicosídeos cianogênico entre as espécies de Salicaceae (SPENCER & SEIGLER, 1985).

A família Salicaceae tem uma distribuição espacial em diversos biomas do mundo (FERNANDES *et al.*, 2009), e representantes da família são encontrados em todos os continentes, com exceção da Antártida. Os gêneros que pertenciam anteriormente à Flacourtiaceae ocorrem predominantemente nas regiões tropicais com poucos representantes nas regiões temperadas (VASQUEZ, 2005). São encontrados principalmente em florestas primárias e secundárias em regiões baixas e montanhosas e compreendem árvores de dossel, sub-bosque, arvoretas monocaules ou arbustos (VASQUEZ, 2005).

Espécies da família Salicaceae são produtoras de um largo espectro de substâncias bioativas (MOSADDIK *et al.*, 2004). Espécies do gênero *Ryania* possuem substâncias tóxicas em todas as partes vegetais (JEFFERIES *et al.*, 1992). A substância rianodina foi isolada da espécie *Ryania speciosa*, sendo que esta substância foi um dos primeiros produtos naturais utilizados como inseticidas (ROEL *et al.*, 2000).

Alguns gêneros, tais como *Laetia*, *Casearia*, e *Zuelania*, contêm ésteres de diterpenos clerodânicos (figura 3), os quais apresentam atividade citotóxica e fagoinibitória (BEUTLER *et al.*, 2000).

Lignanas do tipo podofilotoxina foram obtidas como constituintes majoritários de folhas de dos troncos de *Casearia clarkei*, e metabólitos como 6-C-prenil, 8-C-prenil e 7-metoxicumarinas foram obtidos de *Casearia graveolens* coletadas no continente Asiático (SHAARI & WATERMAN, 1994). Em espécies neotropicais,

como *Casearia sylvestris*, foram encontradas novas neolignanas, denominadas de casearialignanas A-F (WANG *et al.*, 2010).

Triterpenos, como o β -amirina, foram encontrados nos troncos de *Casearia thwaitesii* e *Scolopia schreberi*, sendo encontrada nesta última espécie os triterpenos epifriedelinol e friedelina (GUNASEKERA; SULTANBAWA; BALASUBRAMANIAM, 1977).

Espécies do gênero *Salix*, por sua vez, são conhecidas pela produção de salicina, salicortina, salicilol e fenólicos glicosilados (POHJAMO *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2009). Flavonoides isolados de *Salix caprea*, por exemplo, foram relatados com propriedades antifúngicas (POHJAMO *et al.*, 2003). O gênero *Populus* também apresenta uma diversidade de glicosídeos fenólicos, como os cinamrutinoses (JOSSANG; JOSSANG; BODO, 1994; REHILL *et al.*, 2005).

O uso na medicina popular de *Flacourtia indica*, principalmente por nativos da Índia, onde os frutos são usados para o tratamento de icterícia e as raízes para problemas estomacais, estimulou uma pesquisa com as partes aéreas para atividades antimaláricas (KAOU *et al.*, 2010). Kaou e colaboradores (2010) observaram que um dos constituintes majoritários do extrato AcOEt, o poliotrisosídeo, apresentou forte atividade antiplasmodial.

Alguns metabólitos secundários isolados de membros da família Salicaceae são apresentados na figura 3, páginas 15-24.

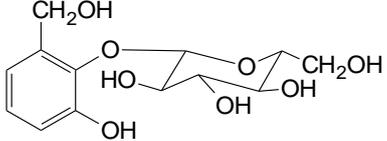
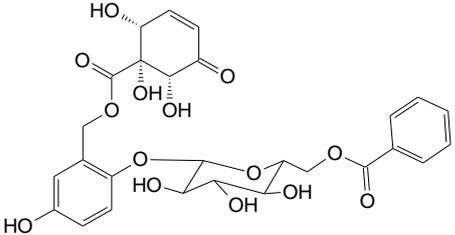
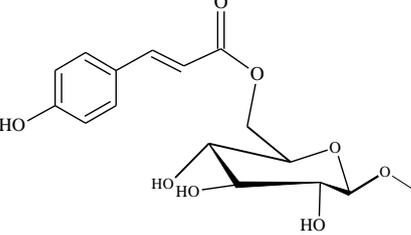
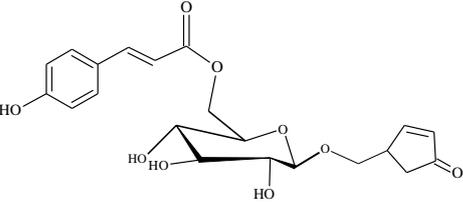
Estrutura	Espécie	Atividades Biológicas	Referência
 <p data-bbox="427 506 520 539">Idesina</p>	<p data-bbox="767 338 903 405"><i>Idesia polycarpa</i></p> <p data-bbox="767 450 903 517"><i>Casearia costulata</i></p>	<p data-bbox="983 338 1166 439">Inibição da produção de óxido nítrico</p>	<p data-bbox="1222 360 1398 439">Chou <i>et al.</i>, 1997</p> <p data-bbox="1222 472 1406 551">Mosaddik <i>et al.</i>, 2007a</p>
 <p data-bbox="252 913 703 992">Álcool 2-O-(benzóico-glucopiranosil)-7-O-(1,2,6-triidroxi-5-oxo-ciclohex-3-enoil)-4-hidroxibenzila</p>	<p data-bbox="775 656 903 723"><i>Scolopia braunii</i></p> <p data-bbox="759 801 919 869"><i>Homalium longifolium</i></p>	<p data-bbox="1050 667 1098 689">---</p>	<p data-bbox="1222 734 1406 813">Mosaddik <i>et al.</i>, 2007a</p>
 <p data-bbox="244 1305 655 1328">Metil-6-O-p-cumaroil glucopiranosídeo</p>	<p data-bbox="767 1149 903 1216"><i>Flacourtia indica</i></p>	<p data-bbox="1050 1126 1098 1149">---</p>	<p data-bbox="1222 1149 1398 1216">Amarashing <i>et al.</i>, 2007</p>
 <p data-bbox="395 1630 555 1653">Flacoursídeo</p>	<p data-bbox="767 1485 903 1552"><i>Flacourtia indica</i></p>	<p data-bbox="1050 1417 1098 1440">---</p>	<p data-bbox="1222 1507 1398 1574">Amarashing <i>et al.</i>, 2007</p>

Figura 3 – Exemplos de metabólitos identificados em espécies de Salicaceae.

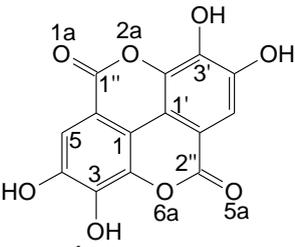
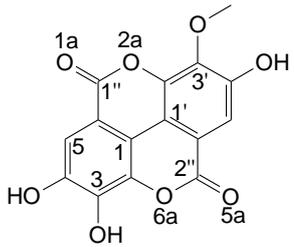
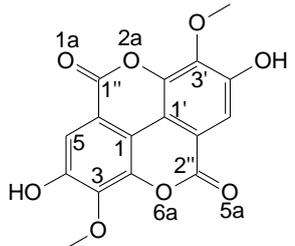
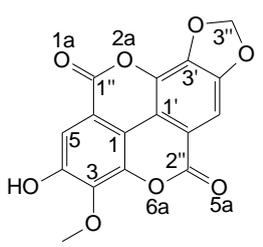
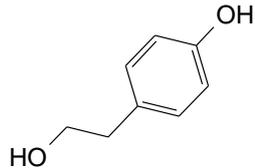
 <p>Ácido elágico</p>	<p><i>Casearia sylvestris</i></p>	<p>Anti-inflamatório, antialérgico, citotóxico</p>	<p>Da Silva <i>et al.</i>, 2008</p>
 <p>Ácido 3-O-metilelágico</p>	<p><i>Casearia sylvestris</i></p>	<p>Anti-inflamatório, antialérgico, citotóxico</p>	<p>Da Silva <i>et al.</i>, 2008</p>
 <p>Ácido 3,3'-di-O-metilelágico</p>	<p><i>Casearia sylvestris</i></p>	<p>Anti-inflamatório, antialérgico, citotóxico</p>	<p>Da Silva <i>et al.</i>, 2008</p>
 <p>Ácido 3-O-metil-3',4'-metilenoelágico</p>	<p><i>Casearia sylvestris</i></p>	<p>Anti-inflamatório, antialérgico, citotóxico</p>	<p>Da Silva <i>et al.</i>, 2008</p>
 <p>Tirosol</p>	<p><i>Casearia sylvestris</i></p>	<p>---</p>	<p>Wang <i>et al.</i>, 2009</p>

Figura 3 – Exemplos de metabólitos identificados em espécies de Salicaceae.

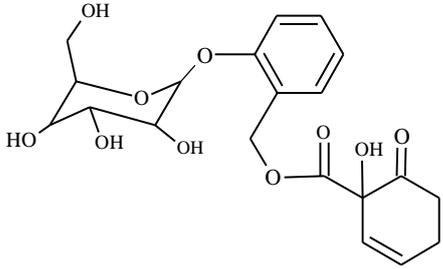
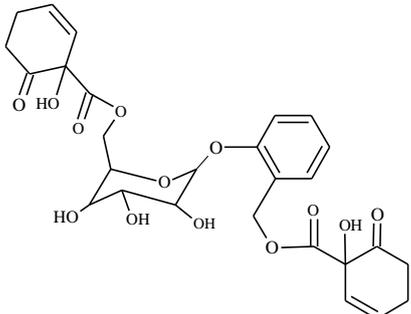
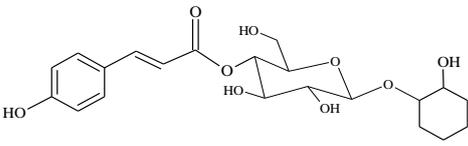
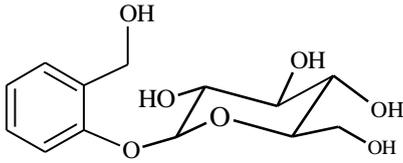
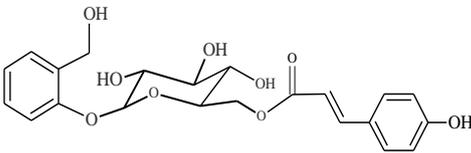
 <p>Salicortina</p>	<i>Populus fremontii</i> <i>Populus angustifolia</i> <i>Salix sericea</i> <i>Hasseltia floribunda</i>	analgésica	Rehill <i>et al.</i> , 2005 Orians <i>et al.</i> , 2000
 <p>HCH-Salicortina</p>	<i>Populus fremontii</i>	---	Rehill <i>et al.</i> , 2005
 <p>Isograndidentatina</p>	<i>Populus davidiana</i>	Antioxidante	Si <i>et al.</i> , 2009
 <p>Salicina</p>	<i>Salix martiana</i> <i>Hasseltia floribunda</i>	Analgésica, antiinflamatória	Fernandes <i>et al.</i> , 2009 Dagvadorj <i>et al.</i> , 2010
 <p>Trichocarposídeo</p>	<i>Salix martiana</i>	---	Fernandes <i>et al.</i> , 2009

Figura 3 – Exemplos de metabólitos identificados em espécies de Salicaceae.

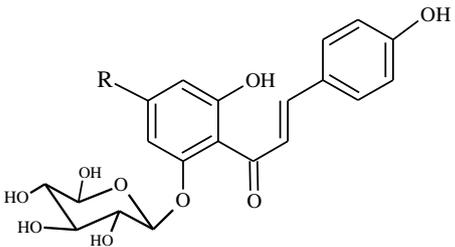
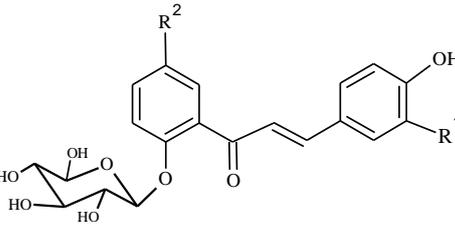
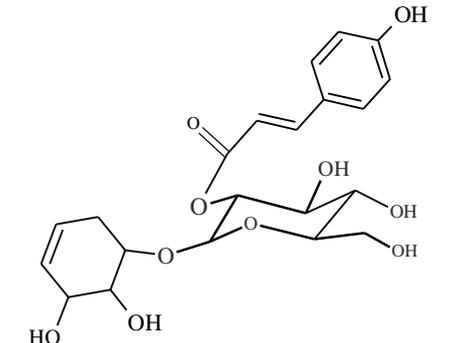
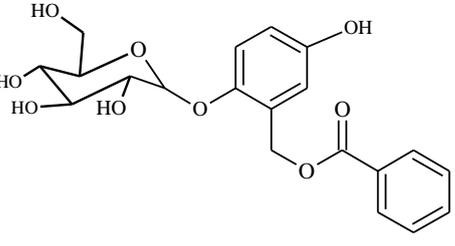
 <p>Isosalipurposideo – R=OH Neosakuranima – R= OMe</p>	<p><i>Populus davidiana</i></p> <p><i>Populus alba x glandulosa</i></p>	<p>---</p>	<p>Si <i>et al.</i>, 2009</p> <p>Kwon & Bae, 2009</p>
 <p>Suwonpopulosideo – R₁=H; R₂=OH Populosideo - R₁= OH; R₂ = H</p>	<p><i>Populus davidiana</i></p> <p><i>Populus alba x glandulosa</i></p>	<p>Antioxidante</p>	<p>Si <i>et al.</i>, 2009</p> <p>Kwon & Bae, 2009</p>
 <p>(2,3-diidroxiciclohex-4-enil-1-oxi)-2-O-[coumaroil]-glicopiranosideo</p>	<p><i>Hasseltia floribunda</i></p>	<p>---</p>	<p>Dagvadorj <i>et al.</i>, 2010</p>
 <p>Saliresposideo</p>	<p><i>Populus alba x glandulosa</i></p>	<p>---</p>	<p>Kwon & Bae, 2009</p>

Figura 3 – Exemplos de metabólitos identificados em espécies de Salicaceae.

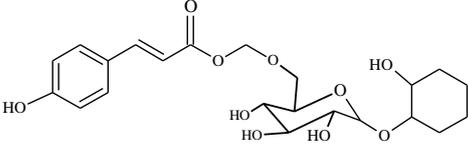
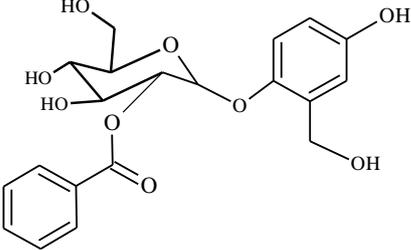
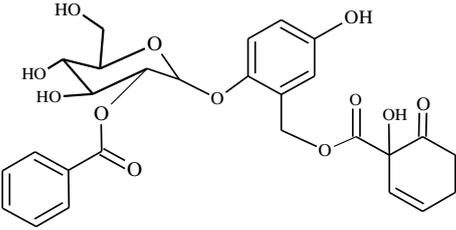
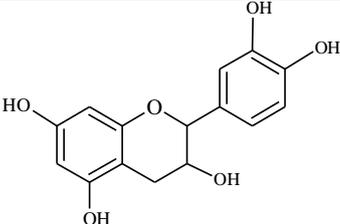
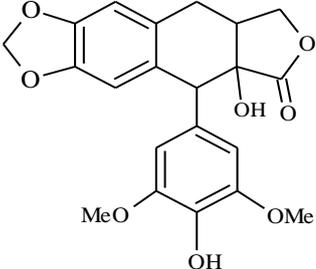
 <p>Grandidentatina A</p>	<p><i>Populus alba x glandulosa</i></p>	<p>---</p>	<p>Kwon & Bae, 2009</p>
 <p>Itosídeo</p>	<p><i>Dovyalis caffra</i> <i>Dovyalis abyssinica</i> <i>Itoa orientalis</i></p>	<p>Analgésica, antiinflama- tória</p>	<p>Stanstrup <i>et al.</i>, 2010</p>
 <p>4-hidroxitremulacina</p>	<p><i>Dovyalis caffra</i> <i>Dovyalis abyssinica</i> <i>Itoa orientalis</i></p>	<p>Anti- microbiana</p>	<p>Stanstrup <i>et al.</i>, 2010</p>
 <p>Catequina</p>	<p><i>Salix caprea</i></p>	<p>Antioxidante, antiinflama- tória</p>	<p>Pohjamo <i>et al.</i>, 2003</p>
 <p>2-Hidroxi-4-dimetil-desoxi- podofilotoxina</p>	<p><i>Casearia clarkei</i></p>	<p>---</p>	<p>Shaari & Waterman, 1994</p>

Figura 3 – Exemplos de metabólitos identificados em espécies de Salicaceae.

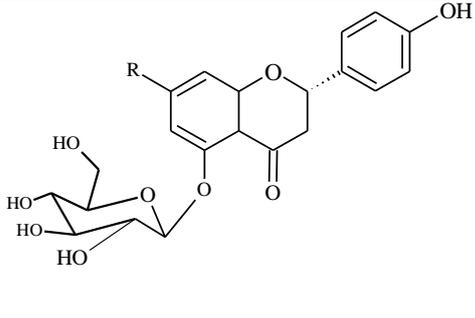
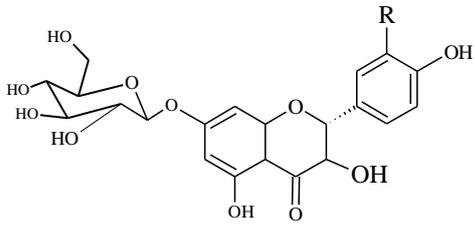
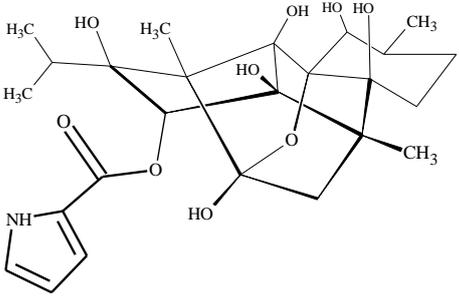
 <p>Salipuporsídeo – R = OH Sakuranina – R = OMe</p>	<p><i>Populus davidiana</i></p> <p><i>Populus alba x glandulosa</i></p>	<p>---</p>	<p>Si <i>et al.</i>, 2009</p> <p>Kwon & Bae, 2009</p>
 <p>Aromandedrin-7-O-glucosídeo – R=H Taxifolin-7-O-glucosídeo – R = OH</p>	<p><i>Populus davidiana</i></p>	<p>---</p>	<p>Si <i>et al.</i>, 2009</p>
 <p>Ryanodina</p>	<p><i>Ryania speciosa</i></p>	<p>Inseticida</p>	<p>Ruest <i>et al.</i>, 1985</p>

Figura 3 – Exemplos de metabólitos identificados em espécies de Salicaceae.

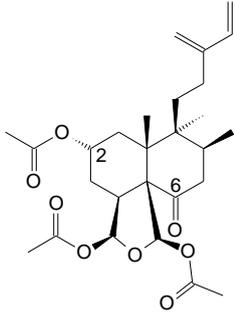
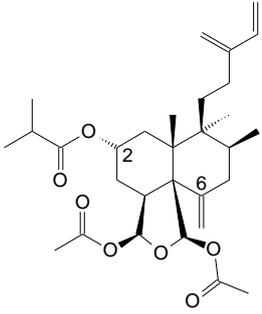
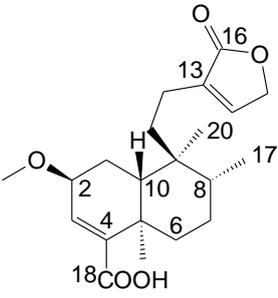
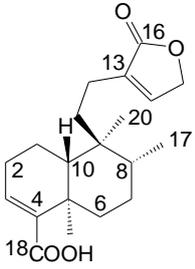
 <p>Triacetoxi-epoxi-clerodanona</p>	<p><i>Casearia grewiifolia</i> var. <i>gelonioides</i></p>	<p>citotóxica e fagoínibitória</p>	<p>Mosaddik <i>et al.</i>, 2007b</p>
 <p>Diacetoxi-epoxi-isobutanoil-clerodandieno</p>	<p><i>Casearia grewiifolia</i> var. <i>gelonioides</i></p>	<p>citotóxica e fagoínibitória</p>	<p>Mosaddik <i>et al.</i>, 2007b</p>
 <p>2β-methoxi-clerodadieno-carboxiolide</p>	<p><i>Casearia sylvestris</i></p>	<p>citotóxica e fagoínibitória</p>	<p>Wang <i>et al.</i>, 2009</p>
 <p>Ácido patagônico</p>	<p><i>Casearia sylvestris</i></p>	<p>citotóxica e fagoínibitória</p>	<p>Wang <i>et al.</i>, 2009</p>

Figura 3 – Exemplos de metabólitos identificados em espécies de Salicaceae.

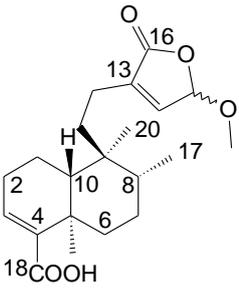
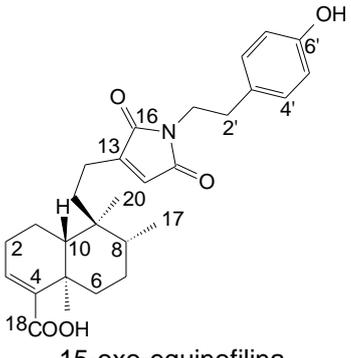
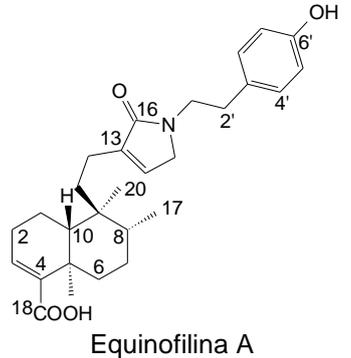
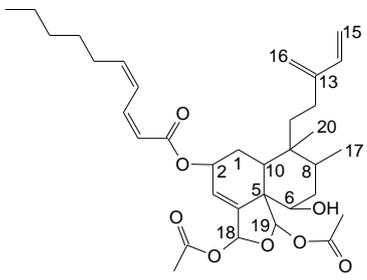
 <p>15ξ-methoxy-clerodadienocarboxilide</p>	<p><i>Casearia sylvestris</i></p>	<p>citotóxica e fagoinibitória</p>	<p>Wang <i>et al.</i>, 2009</p>
 <p>15-oxo-equinofilina</p>	<p><i>Casearia sylvestris</i></p>	<p>citotóxica e fagoinibitória</p>	<p>Wang <i>et al.</i>, 2009</p>
 <p>Equinofilina A</p>	<p><i>Casearia sylvestris</i></p>	<p>citotóxica e fagoinibitória</p>	<p>Wang <i>et al.</i>, 2009</p>
 <p>Corimbulsina</p>	<p><i>Laetia corymbulosa</i></p>	<p>Citotóxica e fagoinibitória Antimalárica</p>	<p>Beutler <i>et al.</i>, 2000</p>

Figura 3 – Exemplos de metabólitos identificados em espécies de Salicaceae.

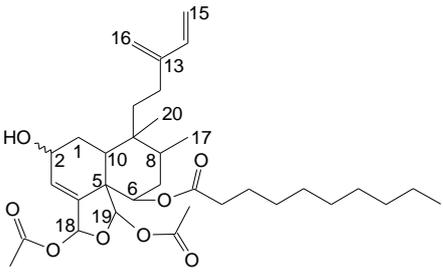
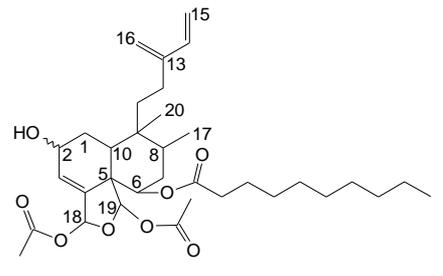
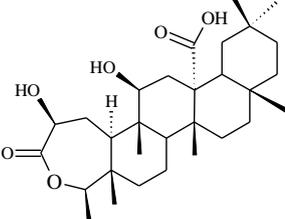
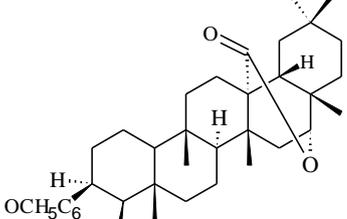
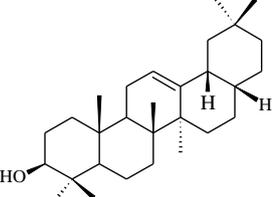
 <p>Corimbulosina B</p>	<p><i>Laetia corymbulosa</i></p>	<p>Citotóxica e fagoínibitória Antimalárica</p>	<p>Beutler <i>et al.</i>, 2000</p>
 <p>Corimbulosina C</p>	<p><i>Laetia corymbulosa</i></p>	<p>citotóxica e fagoínibitória Antimalárica</p>	<p>Beutler <i>et al.</i>, 2000</p>
 <p>Ácido itoáico</p>	<p><i>Itoa orientalis</i></p>	<p>---</p>	<p>Chai <i>et al.</i>, 2009</p>
 <p>3-β-benzoil-friedo-oleanan-16α-lactona</p>	<p><i>Homalium longifolium</i></p>	<p>---</p>	<p>Shaari & Waterman, 1994</p>
 <p>β-amirina</p>	<p><i>Casearia thwaitesii</i></p>	<p>---</p>	<p>Gunasekera <i>et al.</i>, 1976</p>

Figura 3 – Exemplos de metabólitos identificados em espécies de Salicaceae.

2.5.1. Gênero *Casearia*

O gênero *Casearia* é representado por cerca de 180 espécies arbóreas distribuídas pela região neotropical, África, Malásia, Austrália e ilhas do Pacífico (THADEO *et al.*, 2009). Nas regiões tropical e subtropical das Américas encontram-se a maior diversidade do gênero, com aproximadamente 75 espécies (ZMARZTY, 2007).

Nas descrições taxonômicas do gênero *Casearia* é comum a utilização de termos como pontos translúcidos, pontuações transparentes, traços transparentes ou glândulas nas folhas (THADEO *et al.*, 2009). As folhas são alternas, dísticas, penínervas, as inflorescências são axilares ou supra-axilares, e as flores são pequenas e o fruto é geralmente uma cápsula (ZMARZTY, 2007).

Estudos realizados por Mosaddik e colaboradores (2004), avaliaram extratos de *Casearia costulata*, *C. grewiifolia*, *C. grayi*, *C. multinervosa*, *Casearia* sp., *Homalium brachybotrys*, *H. circumpinnatum*, *Scolopia braunii*, *Xylosma terraereginae* and *Xylosma* sp. quanto a suas atividades antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, citotóxica e antioxidante. Os resultados mostraram que espécies do gênero *Casearia* destacaram-se por possuir uma elevada atividade em todos os ensaios realizados, o que indica que espécies deste gênero podem possuir substâncias de interesse farmacológico (MOSADDIK *et al.*, 2004).

O óleo essencial das folhas de *Casearia sylvestris* apresentou atividade anti-inflamatória e contra úlcera gástrica (ESTEVES *et al.*, 2005), sendo que esta atividade está atribuída principalmente aos terpenos, como o biciclogermacreno, substância majoritária no óleo essencial. Outra atividade de *Casearia sylvestris* que

vêm sendo amplamente estudada é a neutralização de venenos de vários gêneros de serpentes (BORGES *et al.*, 2001).

Em função de seu uso popular, o extrato etanólico de *C. sylvestris* foi avaliado quanto ao seu potencial genotóxico por Maistro e colaboradores (2003), e não apresentou danos ao DNA de células HTC e V79. Os extratos hexânicos das folhas e cascas de *C. sylvestris* apresentaram atividade citotóxica nas linhagens de células tumorais: carcinoma de colón humano (HCT-8), de melanoma (MDA-MB-435), e de cérebro (SF-295) (MESQUITA *et al.*, 2009).

2.5.2. Casearia javitensis Kunth

A espécie *Casearia javitensis* (figura 5) é conhecida popularmente por caneleira ou mata-calado. Possui porte arbóreo, folhas oblongas, com a base obtusa e borda do limbo serrilhada (FLORA BRASILIENSIS, 1871), e estas características estão ilustradas na figura 5A. As inflorescências de *Casearia javitensis* são em fascículos axilares e sésseis (figura 5C), e as flores são monoclamídias e dialissépalas (VASQUEZ, 2005). O fruto é uma cápsula ovóide e subglobosa (VASQUEZ, 2005).

Casearia javitensis Kunth é uma espécie encontrada com grande frequência na região Amazônica, sendo também relatada sua ocorrência na floresta Atlântica, na restinga e no cerrado da região Nordeste (CORRÊA, 2007; COSTA *et al.*, 2004).

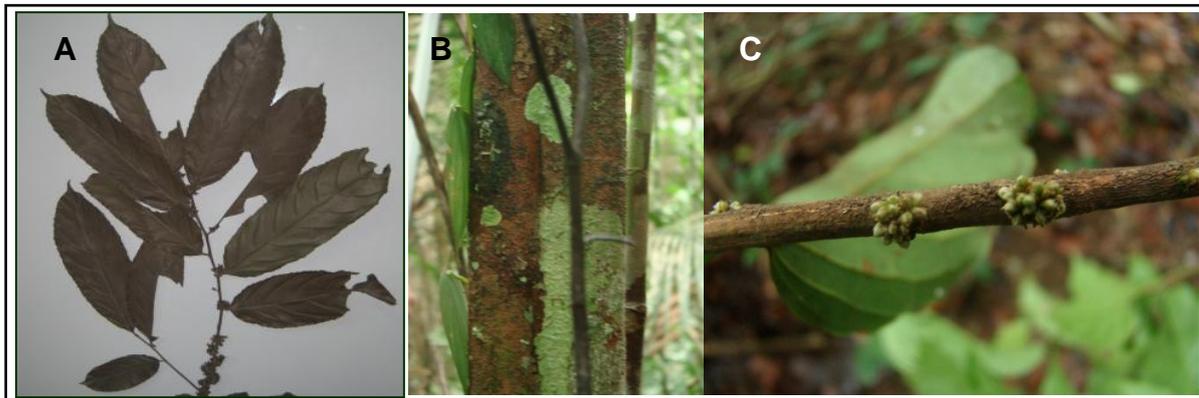


Foto: WYREPKOWSKI-COMANDOLLI, 2008

Foto: SANTOS, 2008

Figura 4 - Imagens de *Casearia javitensis* Kunth

A – Exsicata; B – Detalhe do caule; C – Detalhe das inflorescências.

Buscando estudar a defesa foliar de espécies de restinga à herbivoria, Corrêa (2007) verificou, por meio de análises por cromatografia em camada delgada e reagentes reveladores para as classes de metabólitos, a presença de quercetina, proantocianidinas, saponosídeos, triterpenos e esteroides.

Porém, não há relatos de estudos que visaram uma caracterização química de *C. javitensis* mais aprofundada, sendo que este fato motivou o presente trabalho.

3. OBJETIVOS

3. 1. Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo principal a caracterização química e a avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica dos extratos de galhos e de folhas de *Casearia javitensis* Kunth.

3. 2. Objetivos específicos

- 1.** Isolar e purificar os metabólitos secundários presentes nos extratos de *Casearia javitensis*;
- 2.** Identificar ou elucidar a estrutura química dos metabólitos encontrados nos extratos;
- 3.** Avaliar os extratos de galhos e de folhas de *Casearia javitensis* Kunth quanto ao seu potencial antimicrobiano, citotóxico e antioxidante;
- 4.** Avaliar a atividade antimicrobiana das fases obtidas dos extratos que mostraram maior potencial contra as bactérias testadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Equipamentos e materiais utilizados

4.1.1 Preparo de extratos, análises e fracionamento cromatográfico

O material vegetal foi moído em moinho de facas Tecnal, modelo Willye TE-650. Para a evaporação dos solventes, utilizou-se evaporador rotativo a vácuo (FISATOM).

Os solventes utilizados para as extrações, partições, cromatografias em coluna aberta e cromatografias em camada delgada possuíam grau comercial de pureza, sendo previamente destilados no Laboratório de Bioprospecção, Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Fases estacionárias (FE) utilizadas para a cromatografia em coluna (CC) empregadas: Florisil (MERK); Silica Gel 60, 230 – 400 mesh (MERK); Sephadex LH – 20; Poliamida 6 (Fluka).

Para a Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), foram utilizadas Cromatoplasmas de sílica gel 60, com indicador de fluorescência UV₂₅₄, com 0,20mm de espessura (MACHEREY – NAGEL -MN). Reagentes utilizados para as revelações das cromatoplasmas: vapores de iodo ressublimado P.A. (CRQ), solução de Sulfato Cérico IV (VETEC), solução de anisaldeído sulfúrico (4-metoxibenzaldeído) (VETEC), solução de Cloreto Férrico (VETEC), e solução de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (SIGMA ALDRICH) e luz UV (254 e 365 nm).

4.1.2 Análises e Purificação em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os solventes utilizados são degaseificados e ultrafiltrados, com grau espectroscópico (TEDIA). O equipamento utilizado (Shimadzu) possui Degaseificador DGU-14A, Injetor automático modelo SIL-10AF; duas Bombas do modelo LC 6AD, um Coletor FRC 10A, e Interface modelo SCL 10AVP. O Detector possui arranjo de diodos (DAD), modelo SPD-M20A. Foram utilizadas colunas analíticas (250 x 4,5 mm), semi- preparativas (250 x 10 mm) e pré-colunas, todas da marca Phenomenex, com partículas de 5 μ . As fases estacionárias utilizadas foram C18 (base sílica derivatizada com octadecilsilano) e Ciano (amino-propil-ciano).

4.1.3 Identificação por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram registrados em espectrômetros: Varian Inova – 500 MHz para o núcleo de ^1H ; Bruker AC – 300 MHz para o núcleo de ^1H e 75 MHz para o núcleo de ^{13}C ; Anasazi EFT – 60 MHz para o núcleo de ^1H . Os deslocamento químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente. Os solventes utilizados foram CDCl_3 e CD_3OD .

4.1.4 Espectrometria de Massas

Análises em CG-EM foram obtidas em cromatógrafo à Gás (Shimadzu) modelo QP-2010, com coluna DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) acoplado à

espectrômetro de massas. Método de ionização por Impacto Eletrônico (70 eV), e analisador quadrupolo. A biblioteca consultada para comparação dos espectros foi a Wiley 7®. Espectros de massas também foram obtidos em espectrômetro de massas UltrOTOF (Bruker Daltonics®) com ionização por electrospray (ESI) e analisador do tipo QqTOF (quadrupolo e tempo de voo em sequência)

4.1.5 Ensaio Antioxidante

Para o ensaio da atividade antioxidante, utilizam-se os reagentes: ácido Ascórbico P.A. (VETEC) e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (SIGMA ALDRICH). Utilizou-se para as leituras espectrofotômetro UV-VIS (AquaMate).

4.1.6 Ensaio microbiológicos

Cepas de *Aeromonas hydrophila* (B32) foram cedidas pela Professora Dra. Alicia Estévez-Toranzo do grupo de Ictiopatologia da Universidade de Santiago de Compostela (Galícia, Espanha) e transportadas, via aérea, para Manaus, AM, onde se encontram preservadas a -20 °C na Coleção de Culturas Bacterianas do Laboratório de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

Cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600 T), *Escherichia coli* (ATCC 11775 T) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145 T) foram adquiridas da Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello – Campinas, SP. As cepas foram reativadas em meio caldo nutriente e preservadas à -80 °C no Laboratório de

Bioprospecção, Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

4.2. Metodologia – Parte experimental

4.2.1 Coleta e Preparação de Extratos

4.2.1.1 Coleta

O material vegetal foi coletado na Reserva Florestal Adolpho Ducke/INPA, localizada no Km 26, rodovia AM 010, município de Manaus, AM. Exsiccatas do material coletado foram enviadas para identificação taxonômica no Herbário da Coordenação de Pesquisas em Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

O material identificado foi depositado no Herbário do INPA sob o número de registro 230759.

O material vegetal (galhos e folhas) de indivíduos de *Casearia javitensis* foi obtido em quatro coletas distintas. O material de cada coleta recebeu uma numeração diferenciada e, conseqüentemente, resultaram em extratos diferentes.

A primeira coleta de *Casearia javitensis* foi realizada pela Dra. Cecilia Veronica Nunez e colaboradores, em abril de 2005 (tabela 1). Com a necessidade de coletar novamente o material vegetal para prosseguir os estudos, outras coletas foram realizadas. As informações de cada coleta estão descritas na tabela 1.

Tabela 1- Coletas realizadas e características do material coletado.

Data da coleta	Número do material	Partes coletadas	Idade*	Obs.
27/04/2005	1	Galhos e Folhas	Adulto	--
16/07/2008	2	Galhos e Folhas	Jovem	--
05/12/2008	3	Galhos e Folhas	Jovem	--
15/12/2008	4	Galhos e Folhas	Adulto	Florida

* Para estimar a idade, considerou-se como “adulto” os indivíduos com o diâmetro do caule > 12 cm e altura > 3 m.

4.2.1.2. Preparo dos extratos

As plantas coletadas foram secas em temperatura ambiente ou em estufa de circulação forçada em temperaturas inferiores a 42 °C. As partes vegetais foram separadas em galhos e em folhas e posteriormente moídas e pulverizadas em moinho de facas. Após a pulverização, os materiais foram extraídos com diclorometano (DCM), metanol (MeOH) e água (H₂O). O esquema geral para a preparação de todos os extratos está ilustrado na figura 6. Foram realizadas três extrações com cada solvente utilizando banho em ultrassom por 20 minutos em cada extração. O volume de cada solvente utilizado variou conforme a quantidade de material vegetal. Após o banho em ultrassom, o material foi filtrado, e o resíduo vegetal após as três extrações com o solvente foi seco a temperatura ambiente. Esse mesmo material vegetal foi extraído com os próximos solventes, em ordem crescente de polaridade (figura 5). Os extratos foram concentrados em rotaevaporador (extratos diclorometânico e metanólico) e liofilizador (extratos aquosos).

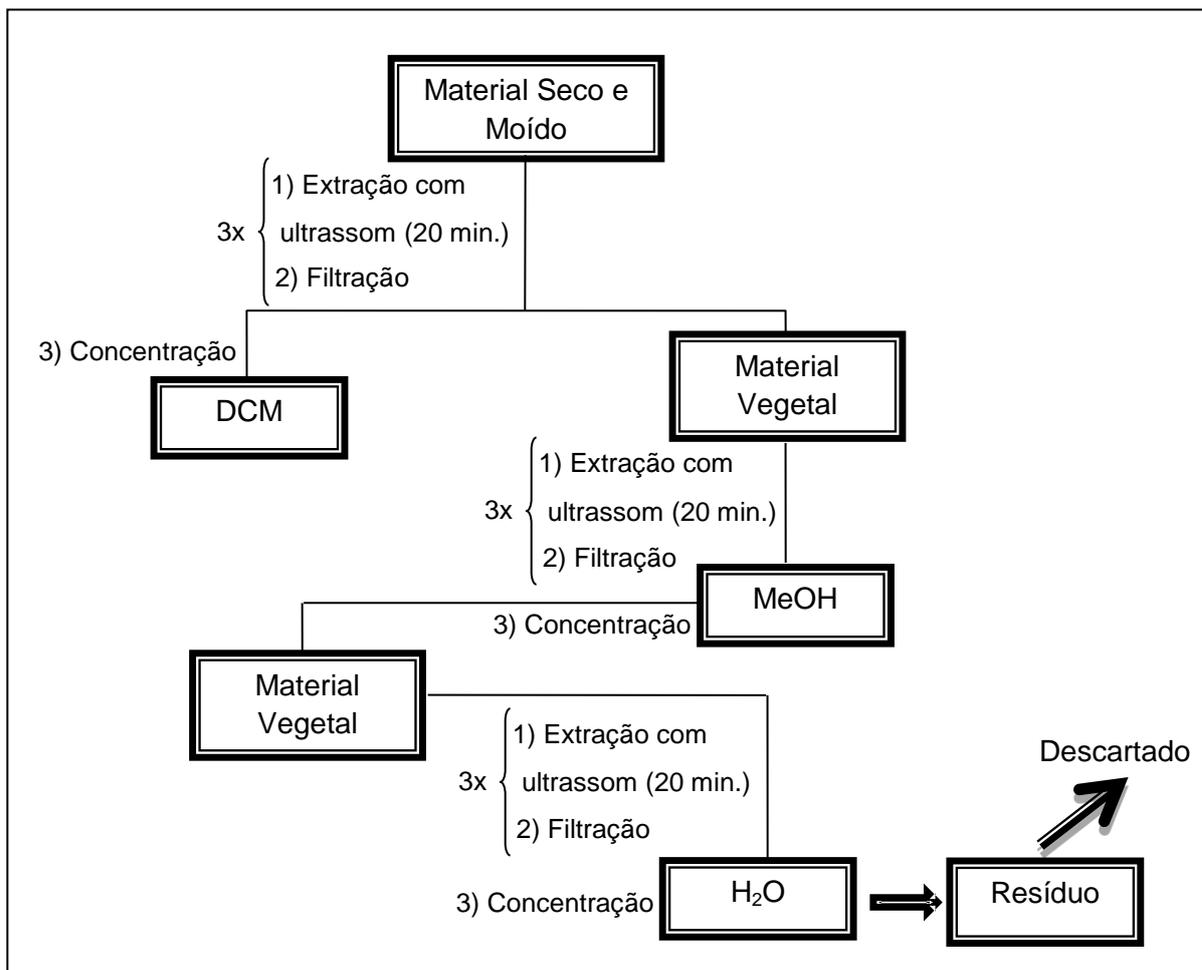


Figura 5 - Esquema geral para a preparação de extratos de *Casearia javitensis*.

4.2.1.3 Rendimento das extrações

A coleta número 1, realizada em abril de 2005, originou os extratos de *Casearia javitensis* que foram primeiramente avaliados em um estudo de bioprospecção realizados por este grupo de pesquisa. Os registros do laboratório de Bioprospecção relatam que folhas e galhos obtidos da coleta 1 foram extraídos conforme o padrão adotado no laboratório (figura 5), mas não descrevem a quantidade de material utilizado, nem o rendimento destas extrações, e apenas os

extratos MeOH dos galhos e H₂O das Folhas estavam presentes no Freezer de Armazenamento do Laboratório Bioprospecção do INPA. As outras três coletas e as extrações foram realizadas pela autora desta dissertação e os dados das massas e dos rendimentos dos extratos estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Rendimento das extrações de galhos e de folhas de *Casearia javitensis*

Coleta/ Parte veg.	Material seco (g)	Extrato DCM (g)	Rendim. DCM (%)	Extrato MeOH (g)	Rendim. MeOH (%)	Extrato Aqu. (g)
Cj. 2 Galhos	146	0,80	0,55	14,5	9,93	C*
Cj.2 Folhas	330	3,60	1,90	42,4	12,84	12,3
Cj. 3 Galhos	40	0,16	0,40	3,6	9,00	D*
Cj. 3 Folhas	147	4,20	2,85	11,9	8,09	D*
Cj.4 Galhos	350	4,80	1,37	19,4	5,54	D*
Cj. 4 Folhas	400	12,6	3,15	31,9	7,9	D*

C* - Extrato contaminado por fungos; D* - Extrato ainda não concentrado totalmente.

4.2.2 Análises cromatográficas, fracionamento e identificação dos metabólitos presentes nos extratos

4.2.2.1 Análise cromatográfica dos extratos DCM

Análise por CCDC de Extratos DCM: foram aplicados 0,125 mg de cada extrato nas cromatoplas, utilizando um capilar de vidro, que foram eluídas com Hexano/AcOEt (8:2 v/v). A revelação das cromatoplas empregou a luz ultravioleta

(254 nm e 365nm), iodo ressublimado, sulfato cérico, cloreto férrico, cloreto de alumínio, anisaldeído sulfúrico e Dragendorff.

Análise por CG-EM de Extratos DCM: A análise cromatográfica por CG-EM foi feita no Laboratório de Química Orgânica, Departamento de Física e Química, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP/Ribeirão Preto. As especificações do equipamento estão na seção 4.1.3. A temperatura da coluna variou de 100 a 290°C, a 6,3°C min⁻¹. As temperaturas do injetor e detector foram de 250°C e 280°C, respectivamente e o fluxo da coluna foi de 1,2 mL/min. O índice de retenção relativa foi obtido aplicando 5- α -colestano nas amostras analisadas, como padrão de referência.

Os esteroides utilizados na amostra-padrão foram o campesterol, o estigmaesterol e o sitosterol. Para a análise de triterpenos, foram utilizadas três amostras-padrão distintas. A primeira consistia em uma mistura de taraxerona, epitaraxerol, taraxerol, β -amirina, α -amirina, lupeol, β -friedelanol e friedelina. A segunda amostra-padrão possuía os triterpenos β -amirina, α -amirina, lupeol, psedotaraxasterol e taraxasterol. Uma amostra-padrão de triterpenos acetilados também foi utilizada, possuindo o acetato de taraxerol, de β -amirina, de α -amirina, de lupeol, de baurenila, de psedotaraxasterol, e de β -friedelanol.

4.2.2.2 Fracionamento cromatográfico do extrato Cj.2-Galhos-DCM e identificação dos constituintes

Em vista da pequena quantidade deste extrato, não foi realizada a partição deste material. O extrato bruto (0,72 g) foi submetido à coluna cromatográfica

aberta, altura de 72 x 2 cm, utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e fase móvel um gradiente de Hex/DCM, DCM/AcOET e AcOET/MeOH (figura 6). Foram recolhidas 86 frações, que após a análise por CCDC foram reunidas e resultaram em 44 frações finais.

A fração de número 10 foi submetida à recristalização com acetona à quente, e os cristais (6,4mg) e a água-mãe (13,5 mg) foram analisados por RMN para o núcleo de ^1H (cristais em 300 MHz, e água-mãe em 60 MHz) e por CG-EM (mesmas condições da seção 4.2.2.1). O esquema do fracionamento está ilustrado na figura 7.

Após análise por CCDC, as frações 8-9 (35,5 mg), 27-29 (48,2 mg), 30-32 (28,3 mg), 33-37 (33,7 mg), 50-53 (13,3 mg), e 62-65 (32,4 mg) foram analisadas por CG-EM, nas mesmas condições da seção 4.2.2.1, e por RMN de ^1H (60 MHz).

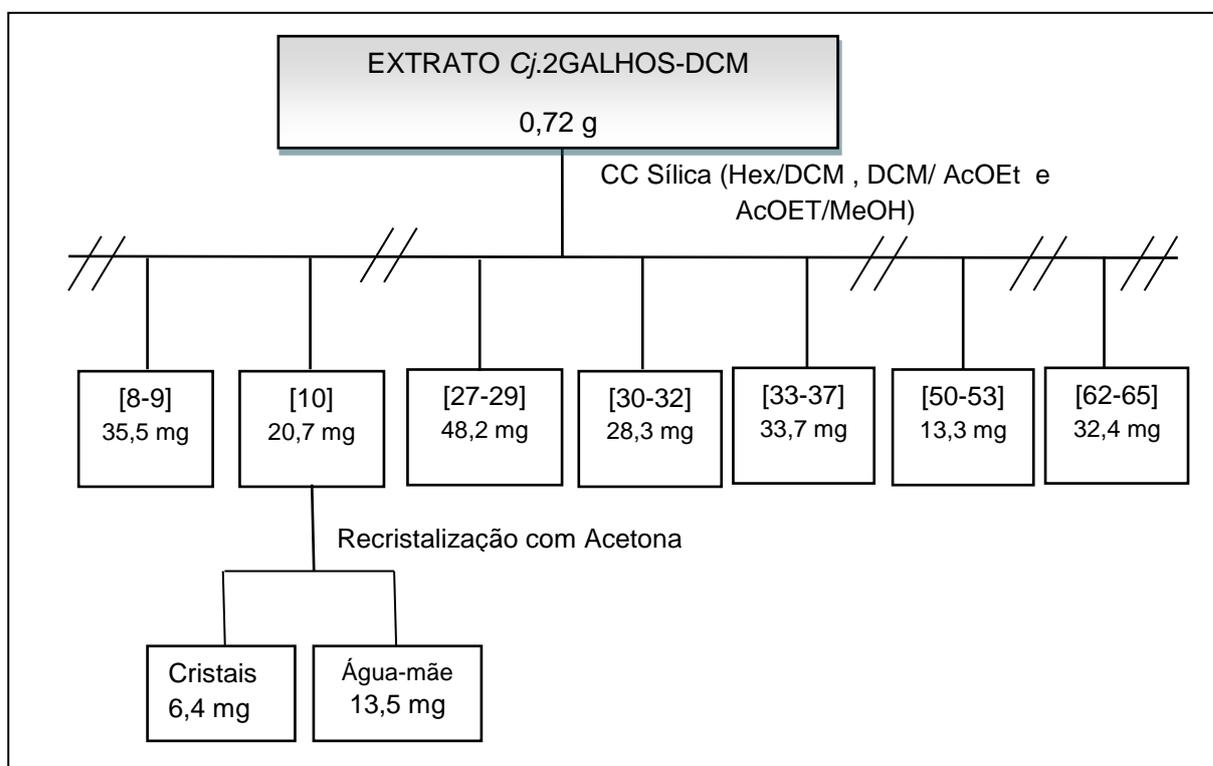


Figura 6 - Esquema do fracionamento cromatográfico do extrato Cj.2.Galhos-DCM

4.2.2.3 Análise cromatográfica dos extratos MeOH

Análise por CCDC de Extratos MeOH: aplicou-se 0,125 mg de cada extrato nas cromatoplasmas, que foram eluídas com AcOEt/MeOH (8:2 v/v). A revelação das cromatoplasmas empregou a luz ultravioleta (comprimento de onda de 254 nm e 365 nm), iodo ressublimado, sulfato cérico IV, cloreto férrico, cloreto de alumínio, anisaldeído sulfúrico e Dragendorff.

Essa metodologia também foi utilizada para a determinação dos procedimentos para o fracionamento e para a análise das frações obtidas colunas cromatográficas.

4.2.2.4 Partição dos extratos MeOH

Para realizar as partições, uma determinada quantidade de extrato foi solubilizada em H₂O:MeOH (9:1) e extraído três vezes com cada um dos solventes utilizados na partição. As partições foram realizadas com Hexano, DCM, AcOEt e *n*-BuOH. O volume de solvente utilizado variou conforme a massa do extrato submetido à partição, utilizando a proporção 1 g: 30 mL (m/v). Este procedimento permitiu uma separação preliminar dos constituintes químicos para facilitar o seu posterior fracionamento cromatográfico (figuras 7 - 9).

Os extratos submetidos à partição e as massas das fases obtidas estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Massas das fases obtidas das partições dos extratos.

Extrato	Material submetido à partição (g)	Fase Hexano (g)	Fase DCM (g)	Fase AcOEt (g)	Fase BuOH (g)	Fase H ₂ O:MeOH (g)
Cj.1.Galhos MeOH	5 g	--*	0,4	0,4	2,2	1,9
Cj.3.Folhas MeOH	5 g	0,4	0,05	0,5	0,7	2,9

* Não foi submetido à partição com Hexano.

4.2.2.5 Fracionamento do extrato Cj.1 – Galhos – MeOH

Fracionamento da Fase DCM do extrato Cj.1.Galhos.MeOH: a fase DCM obtida da partição (0,4 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica aberta, utilizando sílica gel como fase estacionária e eluição com gradiente de Hex/Acetona e Acetona/MeOH. Foram recolhidas 79 frações, que após a análise em CCDC, foram reunidas e resultaram em 20 frações finais. Destas, as três frações com maiores massas, 2-3, 8-12 e 40-47, foram submetidas a novas colunas cromatográficas, como ilustrado na figura 7.

Fracionamento da fração Cj.1.1.2-3: a fração (90 mg) foi submetida a uma coluna cromatografia aberta, 23 X 0,8 cm, recheada com sílica gel 60 como fase estacionária e um gradiente de eluição de Hex/DCM e DCM/MeOH.

Fracionamento da fração Cj.1.1.8-12: a fração (102 mg) fracionada em coluna cromatográfica aberta, 25 x 0,8 cm, com sílica gel como FE e eluição com um gradiente de Hex/AcOEt e AcOEt/MeOH. A fração [4] (3,2 mg) foi analisada também por CG-EM.

Fracionamento da fração Cj.1.1.40-47: a amostra (180 mg) foi fracionada em CC, 27 X 1,5 cm, empacotada com Florisil e eluição de Hex/AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH 100%.

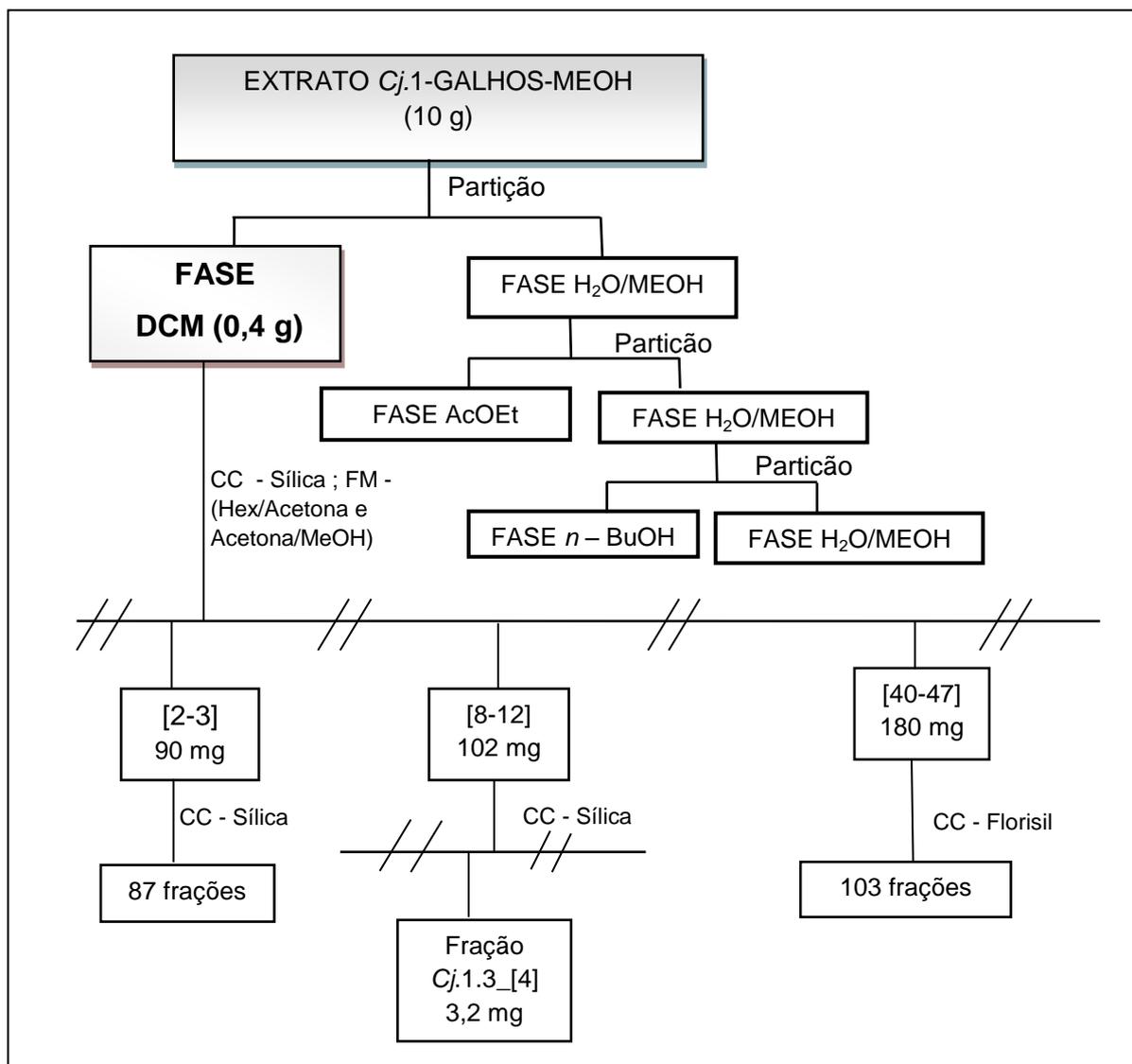


Figura 7 - Esquema do fracionamento cromatográfico da Fase DCM do extrato Cj.1 Galhos-MeOH.

Fracionamento da Fase AcOEt do extrato *Cj.1.Galhos.MeOH*: a fase AcOET obtida da partição (0,4 g) foi submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna aberta (CC), altura de 25,5 x 1,0 cm, utilizou fase estacionária (FE) sílica gel, e um gradiente de eluição com AcOEt/MeOH e MeOH/H₂O (figura 8). Quatro frações obtidas que apresentaram maior massa foram purificadas em CLAE, como mostrado na figura 9. Estas quatro amostras foram dissolvidas em MeOH e H₂O para obter a concentração de 60 mg/mL, e após foram filtradas em filtro com membrana de 0,45 µm, e injetadas no cromatógrafo.

Purificação da fração *Cj.1.4.4-9*: A amostra (76 mg) (figura 8) foi purificada utilizando coluna Semi-preparativa Ciano (Phenomenex), 250 x 10 mm, com volume de injeção de 45 µL, e fluxo de 5 mL/min. Gradiente H₂O/MeOH. T (min) – Concentração MeOH (%): 0' - 40%; 5' - 40%; 8' - 70%; 18' - 70%; 21' - 100%; 26' - 100%.

Purificação da fração *Cj.1.4.10*: A amostra (39 mg) (figura 8) foi purificada utilizando coluna Semi-preparativa C-18 (Phenomenex), 250 x10 mm, com volume de injeção de 45 µL e fluxo de 5 mL/min. Gradiente H₂O/MeOH. T (min) – Concentração MeOH (%): 0' - 50%; 5' - 50%; 8' - 65%; 15' - 65%; 19' - 100%; 24' - 100%.

Purificação da fração *Cj.1.4.11-13*: A fração (60 mg) (figura 8) foi purificada em coluna Semi-preparativa Ciano (Phenomenex), 250 x 10 mm, com volume de injeção de 45 µL e fluxo de 5 mL/min. Gradiente H₂O/MeOH. T (min) – Concentração MeOH (%): 0' - 40%; 5' - 40%; 8' - 70%; 18' - 70%; 21' - 100%; 26' - 100%.

Purificação da fração *Cj.1.4.15 -18*: (42 mg) (figura 8) foi purificada em coluna Semi-prep. Ciano (Phenomenex), 250 x10 mm, volume de injeção de 45 µL e fluxo

de 5 mL/min. Gradiente H₂O/MeOH. T (min) – Concentração MeOH (%): 0' - 35%; 8' - 35%; 13' - 60%; 28' - 60%; 33' - 90%; 38' - 90%.

Espectros de RMN ¹H (500 MHz) foram obtidos para as amostras coletadas. As amostras 4.10.3 e 4.10.4 foram analisadas também por RMN de ¹³C (75 MHz), e RMN bidimensional (HMQC) e por IES-EM-TOF.

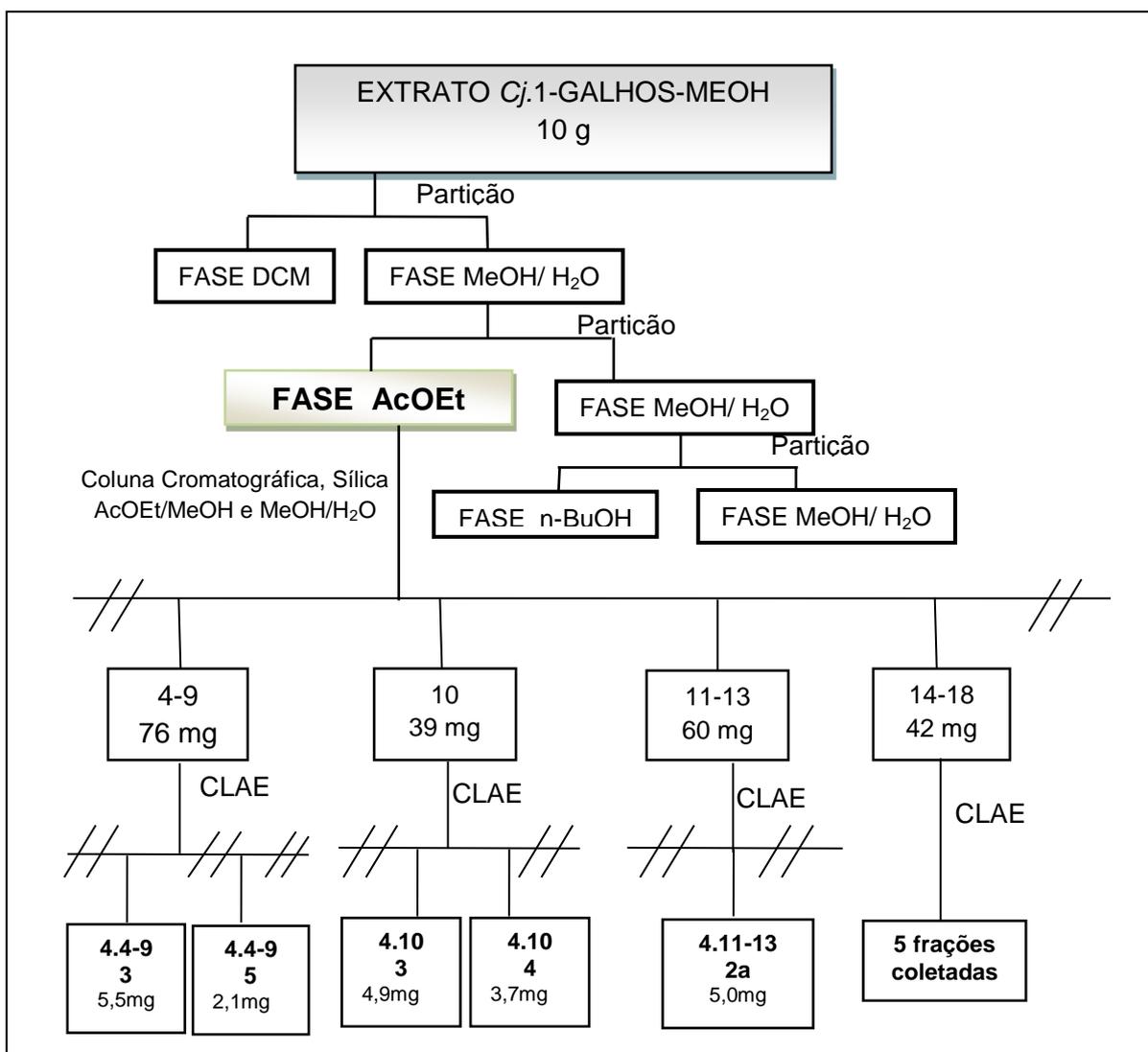


Figura 8 - Esquema do fracionamento cromatográfico da Fase AcOEt do extrato Cj.1-Galhos-MeOH.

Fracionamento da Fase *n*-BuOH do extrato *Cj.1.Galhos.MeOH*: Uma amostra (1,0 g) da fase BuOH foi fracionada em coluna cromatográfica por exclusão, 45 x 1,5 cm, utilizando a fase estacionária Sephadex LH-20. A eluição utilizou primeiramente condição isocrática de MeOH 100 % (500 mL). Em função de algumas substâncias ficarem retidas na fase estacionária, aplicou-se a eluição gradiente de uma mistura de MeOH/CHCl₃ e CHCl₃ 100%, como mostrado na figura 9.

As análises por CCDC das frações foram realizadas utilizando, além das cromatoplasmas de sílica, cromatoplasmas com fase estacionária Celulose F (Merk), e eluição com a fase BuOH:EtOH:H₂O 4:1:2,2 (v/v/v).

As frações 3, 4-5, 6, 8-11, 12-15 e 16 foram submetidas à análise por CLAE e RMN de ¹H (60 MHz). Para as análises em CLAE, estas amostras foram dissolvidas em MeOH/H₂O para obter a concentração de 60 mg/mL, filtradas em filtro de seringa de com membrana PTFE de 0,45 µm, e injetadas no cromatógrafo. As análises utilizaram coluna analítica C18 (Phenomenex), 250 x 4,6 mm, pré-coluna C18, com volume de injeção de 1 µL e fluxo de 1 mL/min. Gradiente utilizado: H₂O/MeOH. T (min) – Concentração MeOH (%): 0' - 40%; 10' - 70%; 15' - 70%; 20' - 100%.

Purificação da fração *Cj.1.5.12-15*: O fracionamento da amostra (45 mg) ocorreu em coluna cromatográfica aberta, 26 x 1,0 cm, utilizando como fase estacionária Poliamida 6 e como fase móvel um gradiente de H₂O/MeOH em modo reverso de eluição. Foram coletadas 130 frações, que após a análise em CCDC foram reunidas resultando em 15 frações. As frações foram analisadas por CCDC. A fração 95-129 foi analisada também por RMN de ¹H (300 MHz).

As frações 16-32, 38-57, 75-88 e 95-129 foram analisadas também por CLAE. As amostras foram diluídas, filtradas e analisadas nas mesmas condições das

frações 3, 4-5, 6, 8-11, 12-15 e 16, oriundas do fracionamento em coluna Sephadex LH-20.

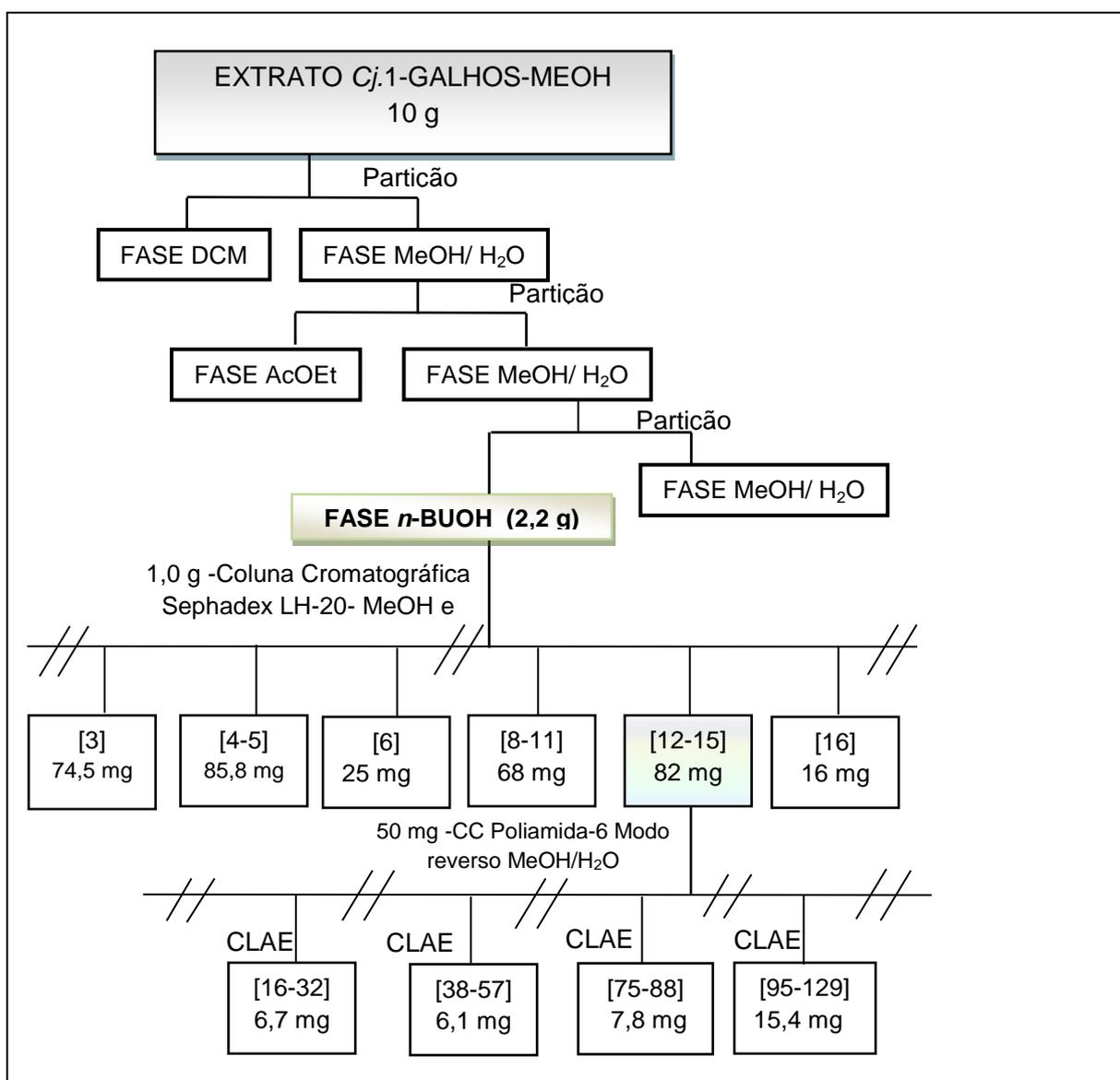


Figura 9 - Esquema do fracionamento cromatográfico da Fase n-BuOH do extrato Cj.1-Galhos-MeOH

4.2.3 Ensaio Biológicos

4.2.3.1 Determinação da atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antimicrobiana dos extratos e frações foram realizados segundo a metodologia de difusão em ágar, técnica cavidade-placa, descrita por Hu e colaboradores (2004). Os micro-organismos testados foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) e *Aeromonas hydrophila* (B32). Os micro-organismos foram inoculados em placas de Petri, contendo meio de cultura sólido Mueller-Hinton, através da técnica de “spread-plate”. Foram feitas incisões circulares com o diâmetro de 6,0 mm no meio de cultura, e em seguida, foi adicionado nas cavidades os extratos ou as fases das partições, nas concentrações estabelecidas para cada microrganismo. Foi utilizado como controle negativo de atividade antimicrobiana o solvente DMSO, no qual foram solubilizados os extratos e as fases das partições. Como controle positivo, foi utilizado o antibiótico oxitetraciclina. Após a adição dos extratos ou das fases, do antibiótico e do controle negativo, as placas foram incubadas em estufa por 24 horas. A temperatura de incubação para *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* utilizada foi 37 °C, e para *A. hydrophila* foi 30 °C.

Ao final do período de incubação, verificou-se que havia halos de inibição de crescimento e em caso de atividade positiva, a verificação do diâmetro do halo foi feito com o auxílio de uma régua.

4.2.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) para *Aeromonas hydrophila*

Concentração Inibitória Mínima (CIM): a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada em meio líquido, através da técnica de macro-diluição. Para isto, foram feitas diluições sucessivas dos extratos (64 mg/mL até 0,065 mg/mL) em tubos de ensaio contendo o meio líquido de crescimento (Müller-Hinton). Em seguida, foi inoculado microrganismo-teste, *Aeromonas hydrophila*, e os tubos foram incubados a 30 °C por um período de 18 a 24 horas. Foi considerado o valor de CIM a menor concentração do extrato onde não houve crescimento bacteriano visível.

Foram determinados a CIM dos extratos *Cj.1-Galhos-MeOH*, *Cj.3-Galhos-MeOH* e *Cj.3-Folhas-MeOH*.

Concentração Mínima Bactericida (CMB): Os tubos incubados para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio líquido foram utilizados para determinação da CMB. Uma alíquota (100 µL) de cada concentração (a partir da CIM) foi inoculada em placas de Ágar Müller-Hinton e posteriormente incubadas a 30 °C por um período de 18 a 24 horas. Foi considerada como CMB a menor concentração do extrato onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9 % de morte microbiana).

Foram determinados a CMB dos extratos *Cj.1-Galhos-MeOH*, *Cj.3-Galhos-MeOH* e *Cj.3-Folhas-MeOH*.

4.2.3.3 Teste de citotoxicidade utilizando *Artemia salina*

Para o teste, foi utilizado como meio de crescimento 1 L de solução salina 3,8 % (m/v) onde foram adicionados 10 mg de cistos de *Artemia salina* para a eclosão. As condições de crescimento utilizadas para a eclosão dos ovos foram: temperatura de 25 a 28 °C, e iluminação constante com lâmpada fluorescente, durante 48 horas. Após o período de eclosão, as larvas foram repassadas para placas de 24 poços, sendo distribuídas 10 larvas de *Artemia salina* para cada poço. Em cada placa, há o controle do meio salino, realizado em triplicata, o controle do solvente utilizado, também realizado em triplicata e os poços que foram adicionados o extrato a ser testado, também em triplicata. Os extratos foram adicionados nos poços do teste, na concentração inicial de 1000 µg/mL. As placas com as larvas de *A. salina* foram mantidas por 24 horas sob iluminação de lâmpada fluorescente. Após esse período, foram avaliados o número de larvas sobreviventes, tanto nos poços de controles quanto no teste. Após o teste dos extratos na concentração de 1000 µg/mL, as amostras que apresentaram acima de 50% de mortalidade das larvas, foram consideradas como citotóxicas, e foram testados novamente em concentrações menores para determinar a CL₅₀.

4.2.3.4 Ensaio antioxidante - metodologia empregando o DPPH

A avaliação do potencial antioxidante foi realizado segundo metodologia de Brand-Williams e colaboradores (1995) modificada. O método de avaliação da atividade antioxidante empregando o DPPH é baseado na captura do radical DPPH

(2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por substâncias antioxidantes, ocorrendo uma diminuição na absorção da luz no comprimento de onda de 517 nm.

A metodologia utilizada empregou a comparação da variação da absorbância do DPPH na presença dos extratos com a variação da absorbância do DPPH em diferentes concentrações do ácido ascórbico.

Para a determinação da curva da absorbância do DPPH na presença do ácido ascórbico foram utilizadas 10 μL das concentrações de 0; 22; 44; 88; 132 e 136 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácido ascórbico, nas quais foram adicionados 990 μL solução de DPPH na concentração de 0,28 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A absorbância em 517 nm destas soluções foi medida em espectrofotômetro logo após a adição do DPPH e após 30 minutos da adição. A variação da absorbância foi determinada e utilizada para o cálculo de parâmetros da regressão linear da curva do ácido ascórbico.

Após a obtenção da curva de calibração e calculada a sua linearidade, foram adicionados 10 μL de uma solução dos extratos na concentração de 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ nas soluções de 990 μL DPPH• (0,28 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em triplicata. Foi realizada a leitura da absorbância (517 nm) no espectrofotômetro das soluções logo após a adição de DPPH, e após 30 minutos de reação, a leitura foi realizada novamente. A variação da absorbância dos extratos é comparada com o ácido ascórbico para a avaliação quantitativa do potencial antioxidante. Para calcular a equivalência do potencial antioxidante dos extratos, foi utilizada a seguinte equação:

$$[\text{AA}] \text{ Equivalente} = (|\Delta\text{ABS}| - a) / b$$

Sendo:

a = coeficiente linear da curva de ácido ascórbico

b = coeficiente angular da curva de ácido ascórbico

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises cromatográficas e identificação dos constituintes dos extratos DCM

5.1.1 Análise dos extratos DCM por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Analisando as cromatoplasmas reveladas (figura 10, pág. 50), observa-se uma diferença significativa entre os perfis dos extratos dos galhos e os extratos das folhas. Em destaque, a presença da mancha azul ($R_f = 0,49$) fluorescente sob luz UV 365 nm que somente aparece nos extratos dos galhos, porém a concentração parece ser menor nos indivíduos jovens (figura 9 – III). Outra mancha que apenas aparece nas amostras dos galhos possui $R_f = 0,27$ reveladas com sulfato cérico (figura 10 – IV), que pode ser indicativo de terpenos, devido à cor avermelhada que aparece após o aquecimento da cromatoplasma.

A revelação química com cloreto férrico, o qual revela substâncias fenólicas, sugere que os extratos DCM possuam uma baixa quantidade desse grupo de metabólitos (figura 10 – V).

A revelação com anisaldeído sulfúrico mostrou que os extratos possuem uma complexidade de substâncias, porém, como esse revelador é universal (não revela um grupo específico de metabólitos), não é possível inferir sobre as classes de metabólitos presentes (figura 10 – VI).

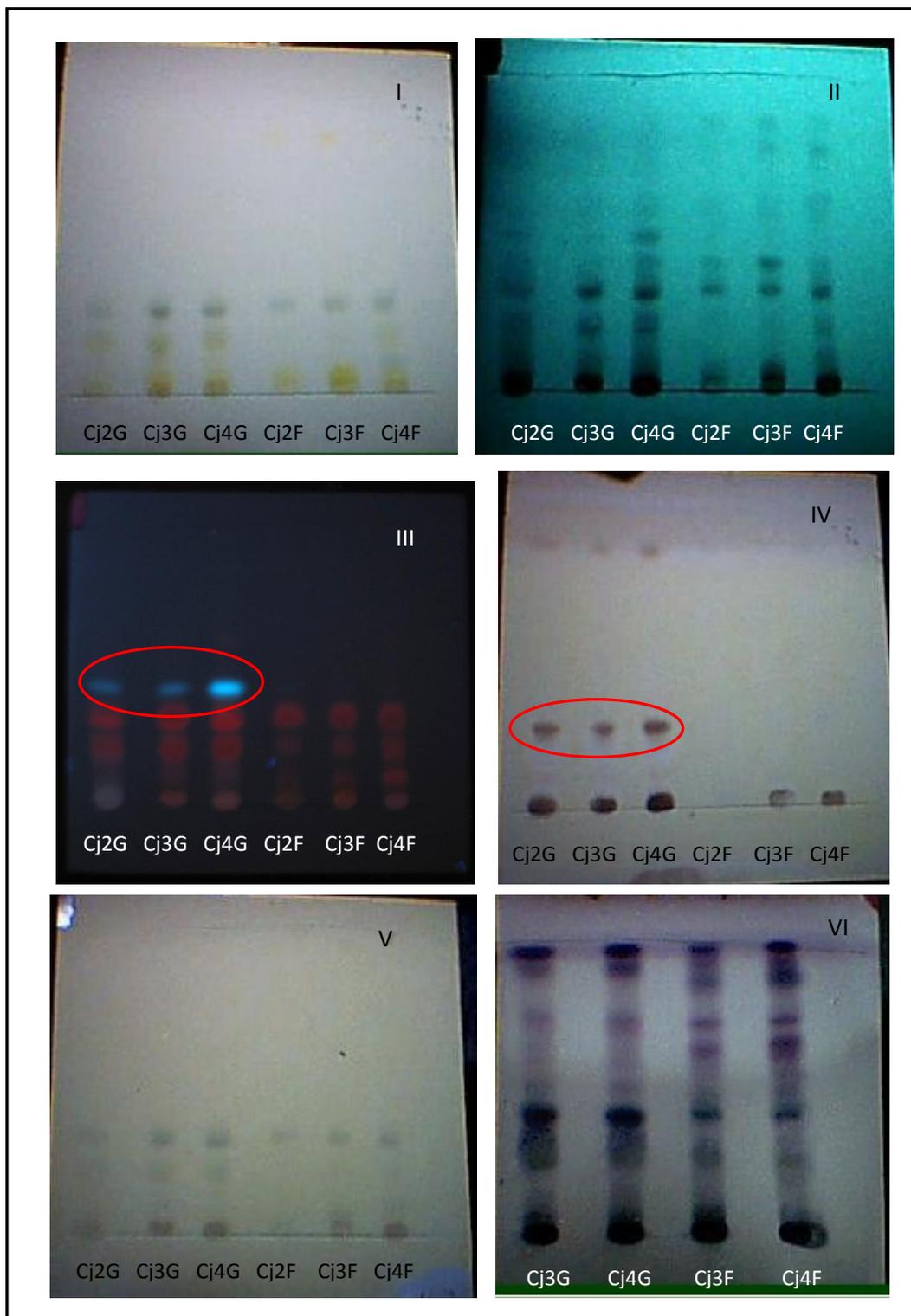


Figura 10 - Análise por CCDC dos extratos DCM. Eluição em Hex/AcOEt (8:2)

I – Luz visível ; II-UV 254 nm ; III – UV 365 nm; IV – sulfato cérico; V – cloreto férrico; VI- anisaldeído sulfúrico.G – Galho. F – Folha.

5.1.2 Análise dos extratos DCM por CG-EM

A análise por Cromatografia à Gás acoplada a Espectrômetro de Massas permitiu uma identificação mais precisa das diferenças dos extratos DCM em sua constituição química (apêndices 1 a 5, pag 105 - 107). Para a identificação dos metabólitos, foram comparados os espectros de massas com as bibliotecas, e a retenção relativa com amostras-padrão. Para calcular a retenção relativa, as amostras dos extratos e as amostras-padrão foram injetadas no aparelho juntamente com padrão interno (5- α -colestano), o qual foi adicionado a cada corrida cromatográfica. A abundância relativa também foi calculada.

As retenções relativas das substâncias presentes nas amostras-padrão e das presentes nos extratos estão apresentadas na tabela 4.

Os metabólitos encontrados nos extratos DCM dos galhos e das folhas de indivíduos de *Casearia javitensis* coletados na Reserva Ducke, e suas abundâncias relativas, estão descritos na tabela 5.

Entre os metabólitos identificados, esteroides, como o β -sitosterol destacam-se com uma abundância alta nos extratos, principalmente nos extratos dos galhos (tabela 5). O sitosterol é o esteroide mais amplamente distribuído no reino vegetal (SILVA, 1997) e sua ocorrência já havia sido relatada em espécies de *Casearia*.

Tabela 4 - Retenções relativas e Pico base de esteróides e triterpenos das amostras-padrão

Retenções Relativas das substâncias das amostras-padrão		
Metabólitos	RR	Base <i>m/z</i>
Campesterol	1,148	43
Estigmasterol	1,158	55
Sitosterol	1,183	43
Taraxerona	1,178	133
Epitaraxerol	1,186	204
Taraxerol	1,192	204
β -amirina	1,199	218
α - amirina	1,220	218
Lupeol	1,221	95
β - friedelanol	1,279	95
Friedelina	1,290	69
Acetato de Taraxerol	1,229	43
Acetato de β -amirina	1,239	218
Acetato de α - amirina	1,262	44
Acetato de lupeol	1,264	43
Acetato de baurenila	1,307	43
Acetato de pseudotaraxasterol	1,313	189
Acetato de taraxasterol	1,318	43
Acetato de β - friedelanol	1,333	95

O triterpeno friedelina foi detectado apenas nos extratos dos galhos, o que corrobora com a análise por CCDC com revelação em sulfato cérico (figura 10-IV), sugerindo que as manchas reveladas possam ser devido a este triterpeno. A friedelina já havia sido encontrada em espécies do gênero *Casearia* (GUNASEKERA, 1977; CHANG, 2003).

Outro metabólito detectado apenas nos extratos dos galhos é o esteroide Campesterol, que também é amplamente encontrado em extratos vegetais.

Tabela 5 - Metabólitos presentes nos extratos DCM e identificados por CG-EM

Abundância Relativa dos Metabólitos nos Extratos DCM (%)					
Metabólitos	Cj.2.Folhas	Cj.3.Folhas	Cj.3.Galhos	Cj.4.Folhas	Cj.4.Galhos
Alcanos e Ácidos graxos	75,15	60,40	30,01	57,59	36,89
Campesterol	--	--	3,07	--	2,05
β -Sitosterol	6,96	8,52	43,46	15,82	44,74
Friedelina	--	--	1,06	--	0,59
Tocoferóis	8,16	11,83	4,22	21,28	1,81
Metabólitos não identificados	9,69	19,25	18,18	5,3	13,92
Total	99,96	100	100	99,99	100

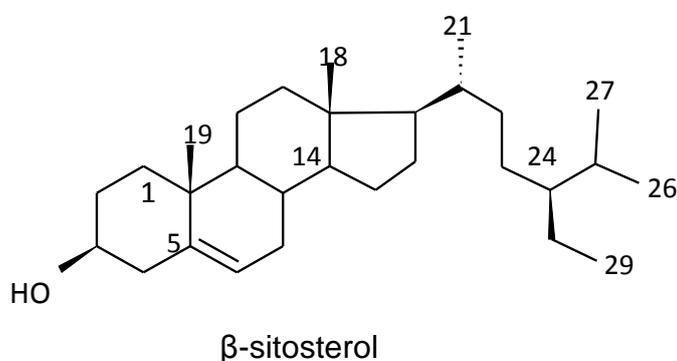
Os extratos de galhos e folhas obtidos de um indivíduo jovem (Cj.3) apresentaram a maior porcentagem de metabólitos não identificados, sendo que os espectros de massas da maior parte das substâncias não identificadas sugeria a presença de esteroides. Para uma identificação dos mesmos, seria necessária a co-injeção de padrões dos esteroides sugeridos pela análise dos espectros de massas.

5.1.3 Isolamento e identificação de Esteroides do extrato Cj.2-Galhos-DCM

Fração Cj.2.GD.1.10: esta fração apresentou indício da presença de esteroides ou triterpenos por CCDC, pois quando revelada com anisaldeído sulfúrico apresentou coloração violeta. Após a recristalização, os cristais e água-mãe foram analisados por RMN e Espectrometria de Massas (apêndices 06 a 10, páginas 107 a 110).

O espectro de RMN de ^1H dos cristais (6,4 mg) foi realizado em espectrômetro de 300 MHz, e os sinais observados são característicos de esteroides quando comparados com os dados da literatura: singleto em 0,68 ppm (grupo metílico C18), vários sinais entre 0,7 e 1,08 ppm (grupos metílicos), vários sinais entre 1,08 e 2,08 ppm (grupos metilênicos), multiplete em 3,4 (H ligado ao carbono 3), dubleto em 5,4 ppm (H ligado ao carbono 6) (NUNEZ, 1996).

A análise por CG-EM mostrou que o esteroide estava purificado. A retenção relativa da amostra (1,184) foi calculada aplicando o padrão (5- α -colestano) na fração e na amostra-padrão, e o valor foi o mesmo para a fração e para o β -sitosterol da amostra-padrão. O espectro de massas da fração também mostrou-se similar ao do β -sitosterol.



O espectro de RMN de ^1H da fração água-mãe (13,5 mg) foi realizado em espectrômetro de 60 MHz, e mostrou os mesmos sinais presentes no espectro dos cristais. Porém, o sinal em 1,25 ppm mostrou-se bastante intenso em proporção aos sinais dos esteroides, sugerindo a presença de cadeias alifáticas longas de alcanos ou ácidos graxos na amostra. As análises por CG-EM mostraram que a fração água-mãe consistia em uma mistura de campesterol (4,1 %), estigmasterol (0,68 %) e β -sitosterol (83 %), além de um esteroide sugerido por EM como sendo a sitostenona (4,31%).

As retenções relativas foram calculadas empregando a injeção do padrão interno (5- α -colestano) na fração e na amostra-padrão. As retenções relativas encontradas para o campesterol (1,151), estigmasterol (1,161) e β -sitosterol (1,185) da amostra correspondem ao mesmo valor das retenções relativas da amostra-padrão destes esteróides.

Fração Cj.2.GD.1.8-9: Mostrou a presença de β -sitosterol (76,68 %) e campesterol (3,54 %). A retenção relativa calculada para o β -sitosterol (1,189) foi aproximada da amostra padrão (1,185) e o espectro de massas apresentou também similaridade com o padrão (apêndice 11, página 109). A retenção relativa calculada do campesterol encontrado na fração (1,151) foi similar à retenção relativa ao campesterol da amostra-padrão, e o espectro de massas também possui similaridade com este esteroide.

Fração Cj.2.GD.1.30-32: A análise por CG-MS (apêndice 12 página 110) mostrou a presença do β -sitosterol, verificado pela similaridade da retenção relativa com o padrão e pela similaridade dos espectros de massas. Este esteroide está

presente em uma abundância relativa inferior à 1 %. O espectro de massas indica que a substância mais abundante na fração, cerca de 60 %, seja o ácido palmítico. No espectro de RMN de ^1H , o sinal bastante intenso em 1,25 ppm indica a presença de substâncias com cadeia alifática longa, e que pode ser atribuído à do ácido palmítico.

Fração Cj.2.GD.1.33-37: além da presença do β -sitosterol (12,2 %), mostra a presença de uma substância com pico base de 43 m/z (22,15 %) e outra substância com pico base de 174 m/z (19,84 %), as quais não foram identificadas (apêndice 14 e 15, página 111). Os sinais do espectro de ^1H mostram, além dos sinais característicos de esteroides, um singleto em 6,1 ppm, o que pode indicar a presença de substâncias com ligações duplas.

Fração Cj.2.GD.1.50-53: Observa-se o espectro de RMN de ^1H (apêndice 17, página 112), o sinal bastante intenso em 1,25 ppm indica a presença de substâncias com cadeia alifática longa, e sinais menos intensos, como singleto em 0,68 ppm, e sinais entre 0,87 e 0,97 ppm, o que pode ser indicativo da presença de esteróides. As análises por CG-EM (apêndice 16, página 112) mostraram a presença do β -sitosterol (13,5 %) e outros metabólitos não identificados.

Fração Cj.2.GD.1.62-65: As análises por CG-EM (apêndice 18, página 113) apontam a presença de β -sitosterol em mais de 50 %, além de estigmasterol (3 %).

5.2 Análises cromatográficas e identificação dos constituintes dos extratos

MeOH

5.2.1 Análise dos extratos MeOH por CCDC

As cromatoplasmas referente às análises dos extratos MeOH revelados com diferentes reagentes estão ilustradas na figura 11 (p. 58). As análises por CCDC mostraram que todos os extratos metanólicos preparados apresentam substâncias com polaridades bastante distintas. Esse fato pode ser observado na figura 13, onde diferentes revelações mostram a presença de manchas com R_f próximos a 1,0 e manchas que ficaram totalmente retidas na origem (R_f próximo a zero) quando eluídas com AcOEt/MeOH 8:2.

Assim como as análises dos extratos DCM, os extratos metanólicos de galhos diferem dos extratos de folhas, mas também aparecem manchas diferenciadas entre extratos do mesmo órgão vegetal. Como exemplo, a mancha amarelada com R_f 0,92, que aparece no extrato dos galhos Cj.4, quando revelado em luz UV 365 nm (figura 11 – III).

A figura 11 – V mostra que há uma maior concentração de substâncias fenólicas nos extratos metanólicos, porém a maior concentração permaneceu retida na origem.

O extrato metanólico dos galhos coletado na primeira coleta também apresenta um perfil bem diferenciado. Tal fato pode ser explicado pela diferença na época do ano das coletas que há entre a primeira coleta (realizada em abril de 2005) e as últimas três coletas (realizadas em julho e dezembro de 2008).

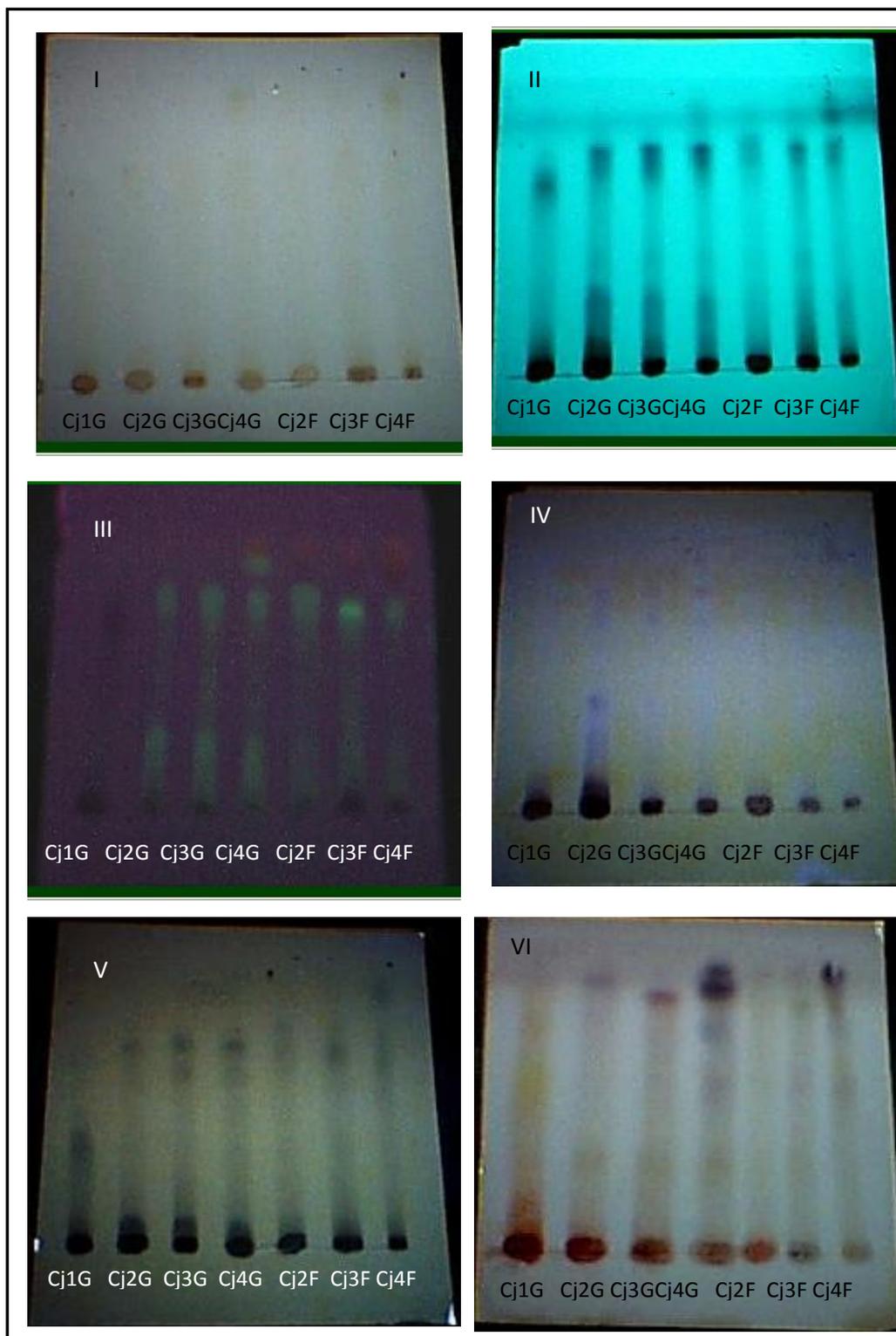


Figura 11 - Análise por CCDC dos extratos MeOH. Eluídas em AcOEt/MeOH (8:2)I – Luz visível ; II- UV 254 nm ; III – UV 365 nm; IV – sulfato cérico; V – cloreto férrico ; VI - anisaldeído sulfúrico. G – Galho F – Folha.

5.2.2. Fracionamento do Extrato Cj.1-Galhos-MeOH

5.2.2.1 Fracionamento da fase DCM da partição

A partir de análises em CCDC, o sistema de eluição e a fase estacionária foram determinados para a realização do fracionamento da fase DCM dos galhos. Após o fracionamento em coluna cromatográfica e a análise das frações obtidas (figura 8, pag. 40), constatou-se que nenhuma fração da coluna cromatográfica apresentou substâncias purificadas. Assim, as frações com maior massa foram novamente analisadas em CCDC para a escolha de um novo sistema de fracionamento.

As análises em CCDC com a revelação em sulfato cérico sugerem a presença de substâncias apolares, como terpenos e esteróides, nas frações obtidas (figura 12). Porém, com essas análises apenas não é possível determinar precisamente os grupos de metabólitos presentes.

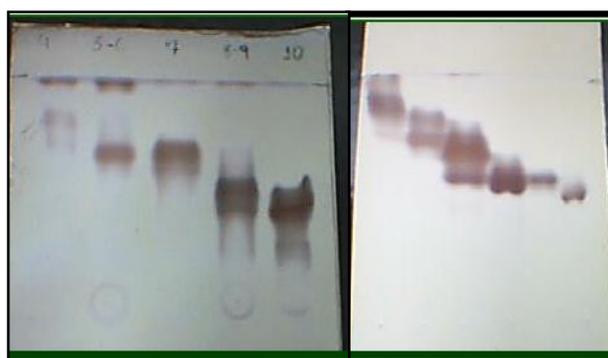
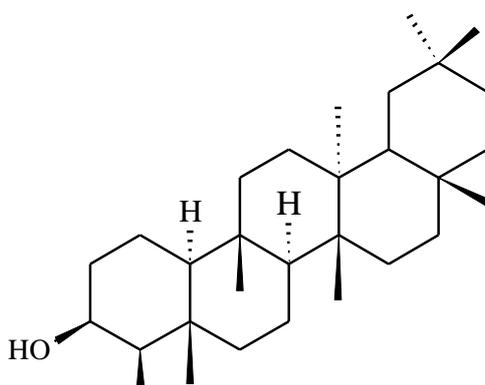


Figura 12 - Análise por CCDC das frações obtidas da coluna cromatográfica da partição DCM, eluídas com Hexano/Acetona (1:1) e reveladas com sulfato cérico.

Fracionamento da fração *Cj.1.GM1.2-3*: Após a verificação da massa e análise por CCDC das frações obtidas constatou-se que todas as frações possuíam uma massa diminuta e as mesmas estavam na forma de misturas, o que inviabiliza outras etapas para o fracionamento.

Fracionamento da fração *Cj.1.GM1.8-12*: Após a análise por CCDC das frações obtidas, foi verificada uma evidência de triterpenos na fração 4, pois apresentava uma coloração avermelhada no sulfato cérico. A fração 4 foi analisada por CG-EM (apêndice 42, página 125), e mostrou a presença majoritária (68 %) na fração do triterpeno β -friedelanol. A identificação ocorreu pela comparação com padrão (RR da amostra = 1,270) e pela análise da fragmentação no espectro de EM, que possuíam 92% de similaridade com o triterpeno.



β -friedelanol

Fracionamento da fração *Cj.1.GM1.40-47*: As frações obtidas foram analisadas por CCDC e mostravam várias manchas indicando que não estavam purificadas.

5.2.2.2 Fracionamento da fase AcOEt da partição

As frações obtidas da coluna cromatográfica para realizar o fracionamento da fase AcOEt que possuíam manchas com coloração intensa em anisaldeído sulfúrico, cloreto férrico e sulfato cérico (figura 13) e também possuíam as maiores massas, foram purificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

As frações purificadas foram Cj.1GM4: 4-9; 10; 11-13 e 14-18, e a análise prévia dessas frações por CCDC estão ilustradas na figura 13.

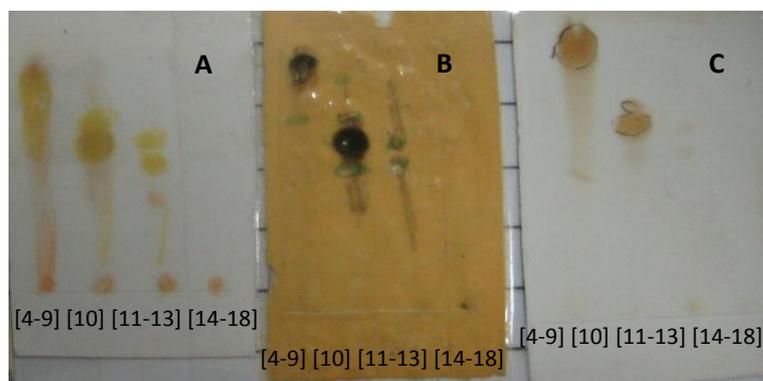


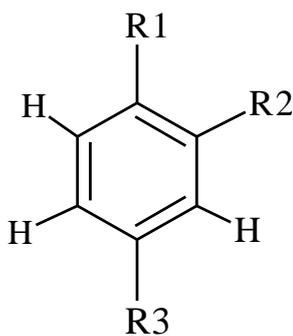
Figura 13 - Análise por CCDC das frações obtidas da coluna cromatográfica da partição AcOEt. Eluição com AcOEt/MeOH/H₂O (8,5:1:0,5) reveladas com A – Anisaldeído; B – Cloreto férrico; C – sulfato cérico.

As frações obtidas a partir da purificação em CLAE foram analisadas por RMN de ¹H, sendo que até o momento, os dados obtidos não permitiram uma completa determinação estrutural das substâncias isoladas. Os dados espectroscópicos e espectrométricos disponíveis até o momento das substâncias mais promissoras para a determinação estrutural foram analisados nesta dissertação.

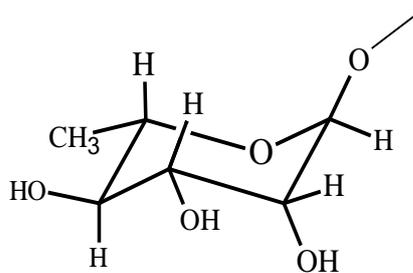
Substâncias isoladas de Cj.1.GM.4 [4-9]

As substâncias **4.4-9.3** (5,6 mg), e **4.4-9.5** (2,7 mg) (figura 8, pag. 42) foram analisadas por RMN, e os sinais do espectro de ^1H estão na tabela 6.

O espectro de RMN de ^1H de **4.4-9.3** (apêndice 19, pag. 113) mostra um dubleto em δ 0,94 com $J = 6,5$ (figura 15), integrando para 3 hidrogênios, além de absorções entre 3 e 4 ppm (figura 15) e um dubleto em 5 ppm, com $J = 1,5$ e integral para 1 H (tabela 6). Estas informações sugerem a presença do açúcar ramnose na substância, de acordo com dados da literatura (LEE *et al.*, 2003). Os dubletos em δ 6,91, 7,30, com $J = 8,5$ Hz sugere o acoplamento em *orto* de hidrogênios aromáticos (figura 14). Os dubletos em δ 7,34 acopla com o duplo dubleto em 7,30 ppm, com $J = 2$ Hz, o que sugere acoplamento em *meta* destes hidrogênios. Assim, as informações sugerem que a substância consista em um anel benzênico com três substituições, sendo uma delas o açúcar ramnose.



Padrão de substituição do anel benzênico de 4.4-9.3



Ramnose

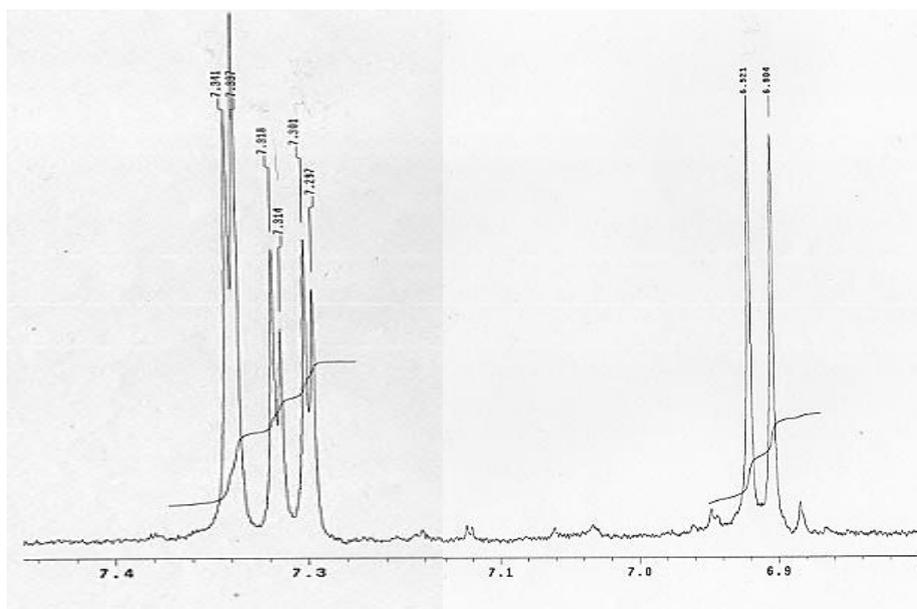


Figura 14 – Expansões da região de 6,8 a 7,5 ppm, espectro de ^1H de 4.4-9.3 (500 MHz, CD_3OD).

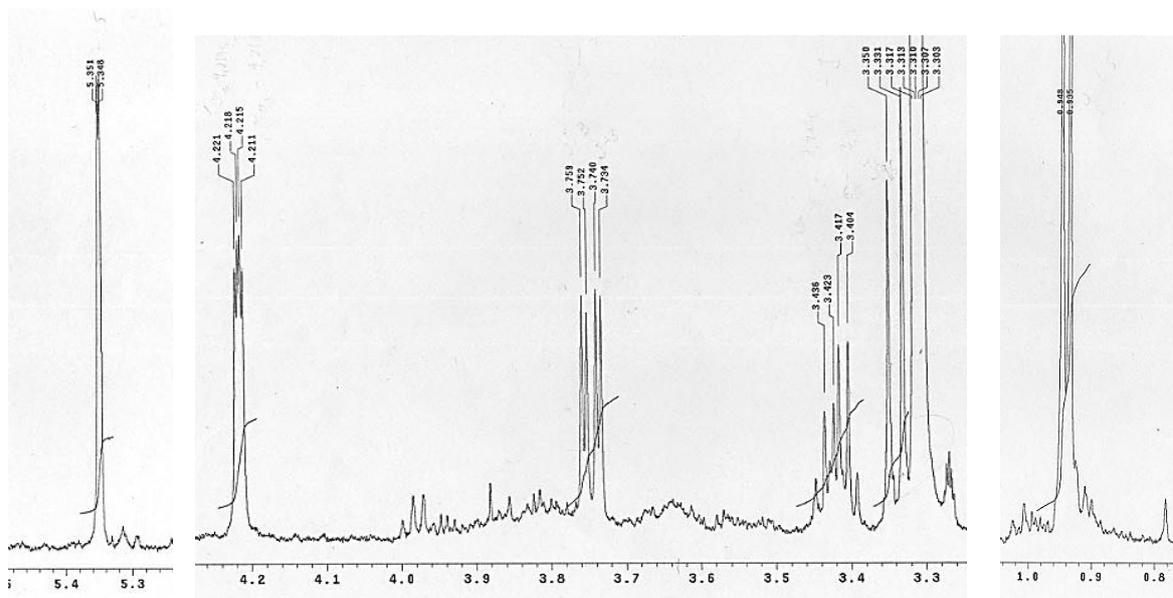
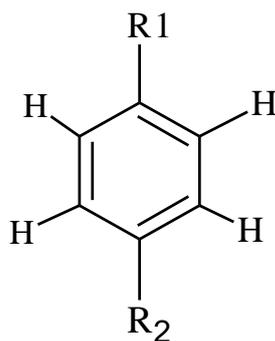


Figura 15 - Expansões da região de 0,8 a 5,4 ppm, espectro de ^1H de 4.4-9.3 (500 MHz, CD_3OD).

O espectro de RMN de ^1H de **4.4-9.5** (apêndice 20, pag. 114) também mostra sinais que sugerem a presença de ramnose, como um duplete em δ 0,91 com $J = 6$ Hz, além de absorções entre 3 e 4 ppm e um duplete em 5,36 ppm, com $J = 1,5$. As

integrals dos sinais do CH₃ da ramnose e do hidrogênio ligado ao carbono anomérico em 5,36 ppm (tabela 6) sugerem a presença de duas moléculas de ramnose na substância. Os dubletos em δ 6,93 e 7,75 com $J = 8,5$ e $9,0$ Hz sugerem o acoplamento em *orto* de hidrogênios aromáticos (figura 16), e a integração para dois hidrogênios, sugere um anel aromático *para* – substituído.



Padrão de substituição do anel benzênico de 4.4-9.5

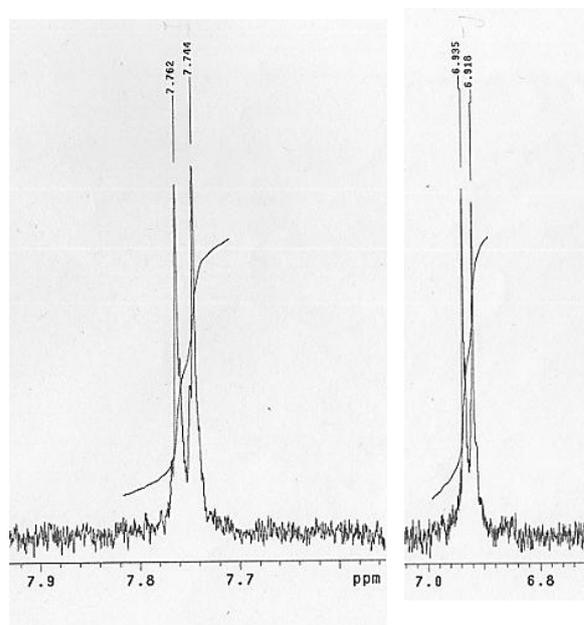


Figura 16 - Expansões da região de 6,8 a 7,9 ppm, espectro de ¹H de 4.4-9.5 (500 MHz, CD₃OD).

Tabela 6 - Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H das frações **4.4-9.3** e **4.4-9.5**, em CD_3OD , 500 MHz.

^1H – δ em ppm e multiplicidade	
4.4-9.3	4.4-9.5
0,9415 (3H, <i>d</i> , $J = 6,5$ Hz)	0,913 (6H, <i>d</i> , $J = 6$ Hz)
1,288 (1H, <i>s</i>)	1,89 (2H, <i>s</i>)
1,308 (1H, <i>d</i> , $J = 7$ Hz)	3,6 (<i>m</i>)
3,45 (1H, <i>dd</i> , $J = 9,5; 6,5$ Hz)	3,7 (<i>m</i>)
3,75(1H, <i>dd</i> , $J = 9,0$ e $3,0$ Hz)	4,216 (2H, <i>m</i>)
4,22 (1H, <i>dd</i> , $J = 1,5$)	5,36 (2H, <i>d</i> , $J = 1,5$ Hz)
5,35 (1H, <i>d</i> , $J = 1,5$ Hz)	6,13 (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)
6,20 (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,29 (1H, <i>d</i> , $J = 2$ Hz)
6,37 (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,93 (2H, <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)
6,91 (1H, <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	7,75 (2H, <i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)
7,30 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,5$ e $2,0$ Hz)	
7,34 (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	

Substâncias isoladas de Cj.1.GM.4.10:

O espectro de massas de **4.10.3** (apêndice 24, página 116) apresenta o íon *quasi* molecular $[\text{M}-\text{H}]^-$ de 579,14 m/z , realizado por IES-EM no modo negativo. Fragmentações realizadas por IES-EM no modo positivo mostraram o íon molecular sodiado $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 603,14 m/z e fragmento principal de 325,13 m/z . O espectro de UV desta fração mostrou bandas de absorção máxima em 228, 260 e 350 nm.

Os dados do RMN de ^1H de **4.10.3** (apêndice 21, página 114) apontam a presença da ramnose na substância, devido ao sinal em 1,02 ppm com $J = 6$ Hz, e integral de 3 hidrogênios (figura 18), e o sinal do hidrogênio do carbono anomérico como um dubleto em 5,35 ppm, além de outros sinais entre 3 – 4 ppm. O espectro de RMN de ^{13}C (apêndice 22, página 115) mostra o sinal em δ 16,7 ppm, que por experimentos de HMQC (apêndice 23, página 115) mostram a ligação com o

hidrogênio em 1,02 ppm e o sinal em δ 101,9 ppm ligado ao hidrogênio em 5,35 ppm, confirmando a presença de ramnose de acordo com os dados da literatura (LEE *et al.*, 2003). Dados do espectro de ^1H mostram três hidrogênios na região de aromáticos (tabela 7, figura 17), que está de acordo com a absorção de UV da amostra, e as constantes de acoplamento indicam a presença de um anel com 3 substituições, similar ao padrão de substituição da substância 4.4-9.3 (tabela 6).

Dados de espectros de massas mostram que a fórmula molecular da substância possui entre 26 a 28 carbonos, mas apenas 12 carbonos foram detectados no espectro de RMN de ^{13}C . Carbonos quaternários podem não ter aparecido devido ao tempo de relaxação, ou o número de *scans* não ter sido adequado. A molécula pode, também, possuir uma simetria, explicando assim a fórmula molecular encontrada possuir aproximadamente o dobro dos sinais de carbono e hidrogênios encontrados nos espectros de RMN.

Além disso, se considerarmos que a molécula possui um resíduo de ramnose e um anel aromático com três substituições, sobram sinais 3 sinais de ^{13}C na região de carbonos carbinólicos, e sinais de hidrogênios na região 3-4 ppm, os quais não foram atribuídos.

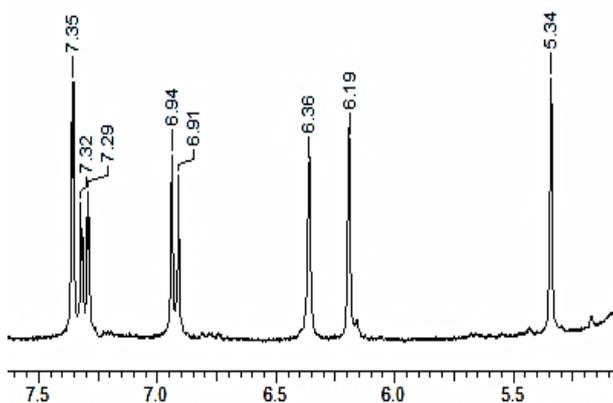


Figura 17 - Expansões da região de 5,3 a 7,5 ppm, espectro de ^1H de 4.10.3 (300 MHz, CD_3OD).

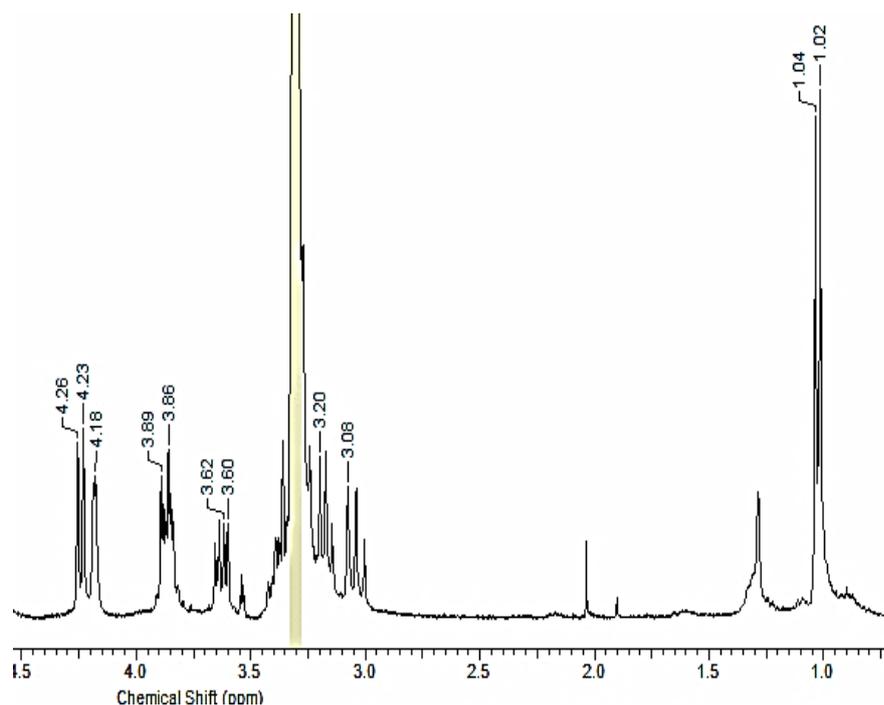
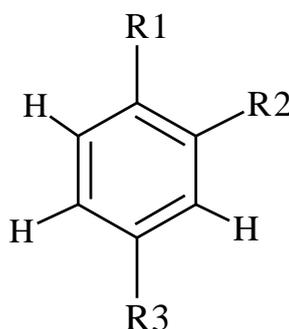


Figura 18 - Expansões da região de 1,0 a 4,5 ppm, espectro de ^1H de 4.10.3 (300 MHz, CD_3OD).



Padrão de substituição do anel benzênico de 4.10.3

O espectro de massas de **4.10.4** (apêndice 29 página 118) realizado por IES no modo negativo mostra o pico do íon *quase* molecular $[\text{M} - \text{H}]^-$ de 563,14 m/z , e fragmentos de 339, 325, 311, 281 e 255 m/z . Espectro de UV mostrou bandas de absorção máxima em 225, \approx 270 e 360 nm.

Os sinais observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (apêndices 26 e 27, página 117) e em experimentos de HMQC da substância **4.10.4** são muito similares

à **4.10.3** (tabela 7). Assim como nesta fração, a fração **4.10.4** apresenta os sinais característicos da ramnose e de mais três carbonos carbinólicos. Na região de aromáticos, porém, mostra a presença de dois dubletos em δ 6,94 e 7,80 ppm (figura 19), acoplando com constante de $J = 8,5$ Hz e integrando para dois hidrogênios cada sinal, o que indica que este anel aromático possui substituição em *para*.

Os dados de espectrometria de massas indicam que a fórmula molecular da substância **4.10.4** possui um oxigênio a menos que a substância **4.10.3**. Assim, se considerarmos a hipótese de uma molécula com simetria, esta também seria aplicada para a substância **4.10.4**, pois se observam apenas 13 sinais de carbonos no espectro de RMN.

Até o presente momento, ainda não encontramos dados semelhantes na literatura com os dados obtidos destas duas substâncias, e outros experimentos espectroscópicos bidimensionais são necessários para a elucidação da estrutura deste metabólito.

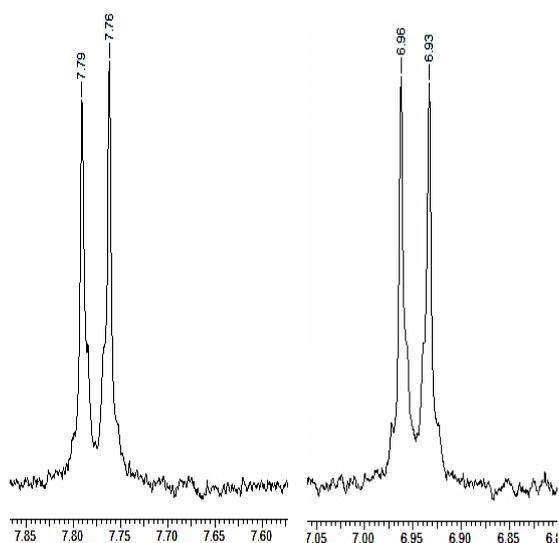
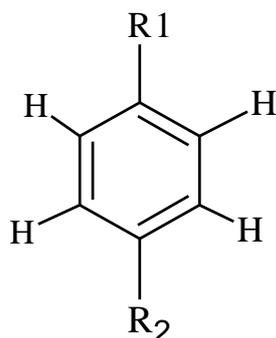


Figura 19 - Expansões da região de 5,3 a 7,5 ppm, espectro de ^1H de 4.10.4 (300 MHz, CD_3OD).



Padrão de substituição do anel benzênico de 4.10.4

Tabela 7 - Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e correlação em HMQC das frações **4.10.3** e **4.10.4**, em CD_3OD , TMS, 300 MHz.

$^{13}\text{C} \times ^1\text{H} - \delta$ em ppm e multiplicidade			
4.10.3		4.10.4	
^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
16,7	1,02 (3H, <i>d</i> , $J = 6,0$ Hz)	16,24	1,05 (3H, <i>d</i> , $J = 6,5$ Hz)
65,5	3,05 (1H, <i>dd</i> , $J = 11$ Hz)	73,79	3,18 (1H, <i>t</i> , $J = 11,0$ Hz)
73,7	3,18 (1H, <i>t</i> , $J = 9$ Hz)	76,24	3,28 (1H, <i>dd</i> , $J = 9; 7,5$ Hz)
76,2	3,28 (<i>sobreposto</i>)	72,2	3,34 (<i>sobreposto</i>)
71,4	3,34 (<i>sobreposto</i>)	69,36	3,40 (1H, <i>m</i>)
69,8	3,39 (1H, <i>m</i>)	65,09	3,68 (2H, <i>m</i>)
65,5	3,64 (1H, <i>dd</i> , $J = 12; 6$ Hz)	70,4	3,82 (1H, <i>dd</i> , $J = 9,5; 3,5$ Hz)
70,62	3,86 (2H, <i>m</i>)	81,34	4,21 (1H, <i>dd</i> , $J = 3,5; 2,5$ Hz)
81,25	4,18 (1H, <i>dd</i> , $J = 3,5; 1,5$ Hz)	--	4,29 (1H, <i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)
--	4,25 (1H, <i>d</i> , $J = 7,5$ Hz)	101,78	5,44 (1H, <i>d</i> , $J = 1,5$ Hz)
101,9	5,35 (1H, <i>d</i> , $J = 1,5$ Hz)	--	6,19 (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)
--	6,19 (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	--	6,35 (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)
--	6,35 (1H, <i>s</i>)	115,15	6,94 (2H, <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)
		(2C)	
114,87	6,92 (1H, <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	130,34	7,80 (2H, <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)
		(2C)	
121,52	7,30 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,5; 2,0$ Hz)		
115,22	7,37 (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)		

Substâncias isoladas de Cj.1.G.M.4.11 – 13:

Até o presente momento, apenas a substância **4.11-13.2** (5,05 mg) (figura 9, pag. 42) foi analisada por métodos espectroscópicos e espectrométricos. Os sinais apresentados no espectro de ^1H estão descritos na tabela 7. A massa do íon *quase* molecular $[\text{M} - \text{H}]^-$ encontrada para esta amostra foi 595,12 *m/z*.

Os sinais observados nos espectros de RMN de ^1H (tabela 7) da substância **4.11-13.2** possuem os mesmos padrões das demais substâncias isoladas da fase AcOEt e analisadas anteriormente. Porém, os sinais característicos da ramnose, como o sinal do hidrogênio ligado ao carbono anomérico e o sinal da metila, aparecem duplicados (figura 19). Porém a massa molecular encontrada difere apenas na presença de um fragmento de 16 *m/z* a mais que a substância 4.10.3, possivelmente um oxigênio a mais. Estes dados favorecem a hipótese de que estes metabólitos estão na forma de dímeros.

Na região de hidrogênios aromáticos (figura 20), os sinais de RMN indicam a presença do anel com três substituições, conforme padrão encontrado em 4.4-9.3 (tabela 5) e 4.10.3 (tabela 6).

As informações espectroscópicas e espectrométricas de substâncias isoladas da fase AcOEt mostram que as mesmas são heterosídeos, ligados a um anel benzênico. Sinais do espectro de RMN são indicativos do açúcar ramnose, e possivelmente estes metabólitos possuem duas unidades de ramnose.

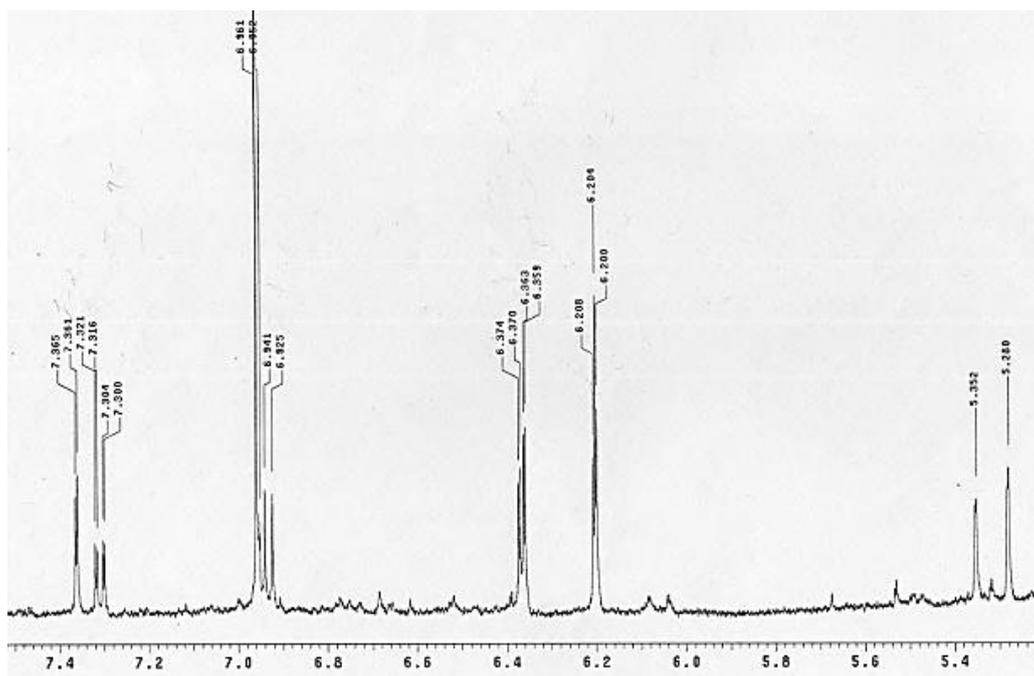


Figura 20 - Expansões da região de 5,3 a 7,5 ppm, espectro de ^1H de 4.11-13.2 (500 MHz, CD_3OD).

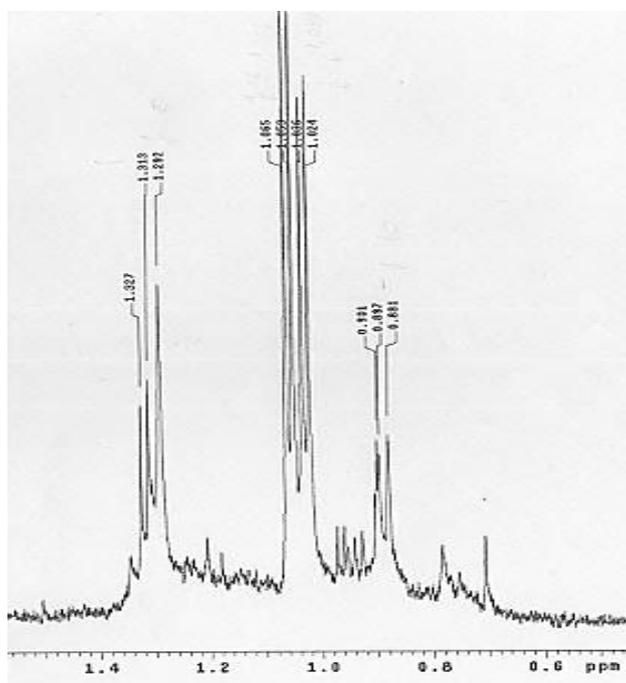


Figura 21- Expansões da região de 0,6 a 1,4 ppm, espectro de ^1H de 4.11-13.2 (500 MHz, CD_3OD).

Tabela 8 - Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H da fração 4.11-13.2, em CD_3OD , 500 MHz.

$^1\text{H} - \delta(\text{ppm})$
4.11-13.2
0,89 (<i>dd</i> , $J = 9$ Hz)
1,04 (<i>2d</i> , $J = 6,0$ Hz)
1,30 (<i>d</i> , $J = 7$ Hz)
3,038 (<i>dd</i> , $J = 14,5 ; 10$ Hz)
3,167 – 3,2(<i>m</i>)
3,61 – 3,65 (<i>m</i>)
3,82 – 3,88 (<i>m</i>)
4,18 (<i>s</i>)
4,24 (<i>dd</i> , $J = 14,5; 7,5$ Hz)
5,28 (<i>s</i>)
5,35 (<i>s</i>)
6,20 (<i>t</i> , $J = 3,0; 2,0$ Hz)
6,36 (<i>2d</i> , $J = 2,0$; Hz)
6,933 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)
6,961 (<i>s</i>)
7,31 (<i>dd</i> , $J = 8,0; 2,0$ Hz)
7,36 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)

5.2.2.3 Fracionamento da fase *n* - BuOH da partição

A fase *n*-BuOH foi fracionada em coluna cromatográfica por exclusão, sendo que o tamanho molecular é o fator que determina a separação dos constituintes de uma amostra por este tipo de cromatografia.

Análise por CLAE das frações: (figura 9 pag. 44) as amostras que apresentavam coloração intensa quando reveladas por CCDC foram analisadas por CLAE. A análise permitiu verificar que as frações Cj1.GM.5: [3], [4-5], [6] apresentavam misturas de substâncias com polaridades muito próximas, pois os tempos de retenção são muito próximos. Os cromatogramas destas frações estão ilustrados na figura 16.

A fração [8-11] possui quatro picos com absorção intensa em 365 nm (figura 16), o que pode ser indicativo de substâncias que contenham anéis aromáticos, ou cadeia com duplas ligações conjugadas. Os dois picos com maior absorção desta fração possuem os R_t 12,0 (b) e 13,25 (c) minutos.

A fração [12-15] possui estes dois picos, além de um pico intenso com um R_t de 10,2 minutos (a) e outros picos com absorção em 365 nm. Os picos desta fração, entretanto, apresentaram uma boa resolução na condição estabelecida para a análise. Parte da massa desta fração foi fracionada em coluna cromatográfica com Poliamida 6, e as frações obtidas foram também analisadas por CLAE.

A fração [16], por sua vez, apresenta dois picos com absorção mais intensa, com tempo de retenção de 10,2 (a) e 12,0 (b) minutos, e uma boa resolução dos picos na condição de análise.

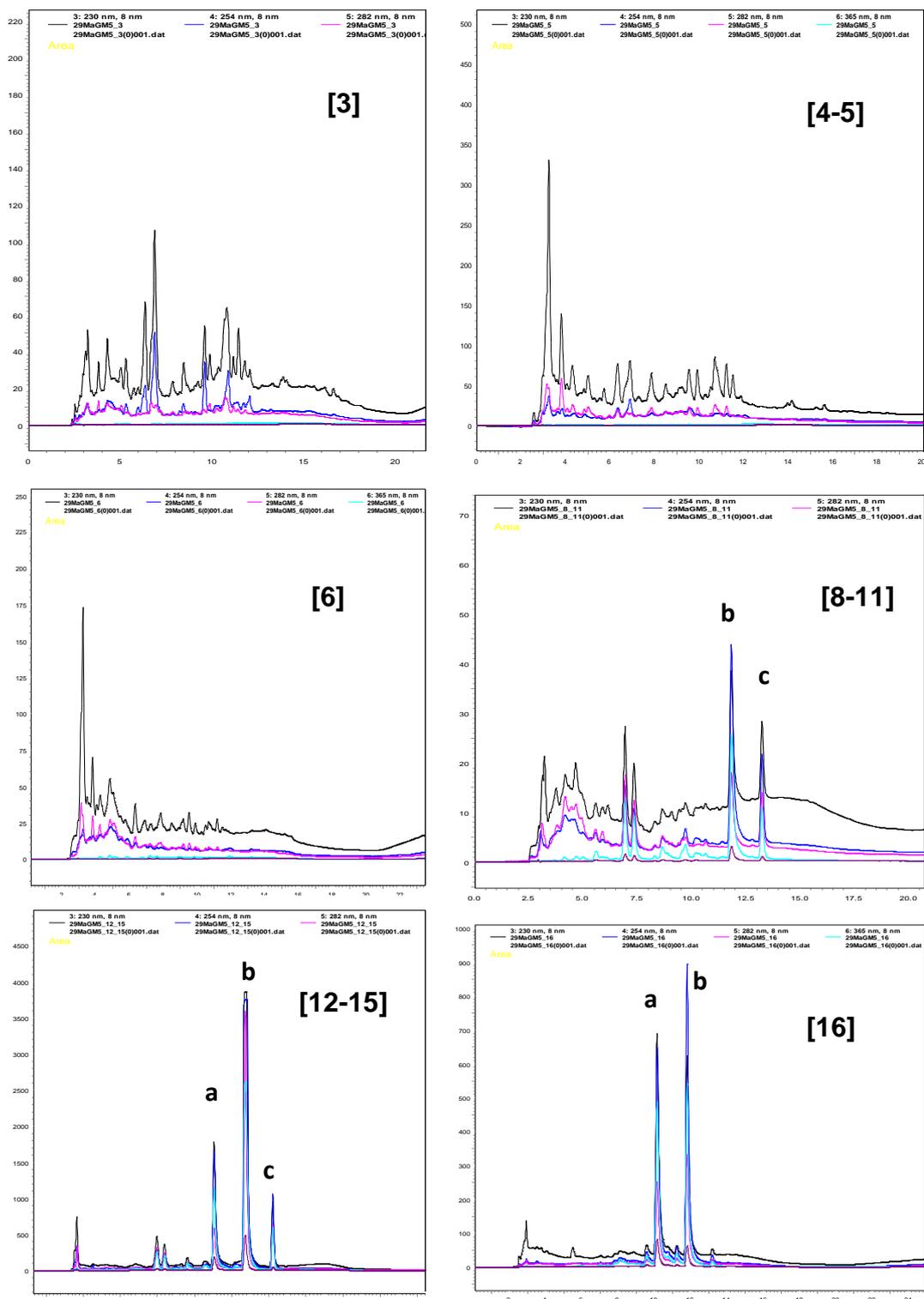


Figura 22 - Cromatogramas da análise por CLAE das frações obtidas do fracionamento da fase *n*-BuOH.

Análise por RMN de ^1H das frações: espectros foram obtidos em espectrômetro de 60 MHz. A fração Cj.1GM.5.[3]: apresentou dubletos entre 0,858 e 1,711 ppm (apêndice 35 página 121), com constante de acoplamento entre 3,5 e 5,2 Hz que podem ser devidos à metilas do açúcar ramnose, pois apresenta sinais intensos entre 3,2 e 4,1 ppm, região dos sinais dos hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos, característicos de açúcares. A fração Cj.1GM.5.[4-5]: apresentou sinais com baixa resolução (apêndice 36, página 122), o que dificultou a análise. A fração Cj.1GM.5.[8-11]: apresentou sinais entre 0,628 ppm e 0,982 ppm e um dubleto em 1,271 ppm com $J = 2$ Hz, um singlete em 3,55 ppm, e um singlete em 6,072 ppm (apêndice 37, página 122).

Fração Cj.1GM.5[12-15]: observa-se no espectro (apêndice 38, página 123) um dubleto em 1,036 ppm com $J = 6$ Hz, que pode ser CH_3 da ramnose, sinais entre 3,731 e 4,217 ppm, característicos de carbonos carbinólicos, possivelmente de açúcares. O sinal em 5,368 ppm pode ser o hidrogênio ligado ao carbono anomérico da ramnose. Apresenta sinais na região de aromáticos ou duplas conjugadas, como os sinais em 6,220 e 6,385 ppm, e os sinais em 6,982 e 7,377 ppm. Estas informações, somadas com as informações da absorção em UV, sugerem que as substâncias a, b e c possuam anéis aromáticos em suas estruturas. A Fração Cj.1GM.5[16]: apresentou sinais na região de 0,893 a 1,273 ppm, e sinais na região de hidrogênios aromáticos, de 6,2 a 7,4 ppm (apêndice 39, página 123). Esta fração possivelmente contém as substâncias a e b em maior proporção na amostra.

Fracionamento da fração Cj.1.GM.5 [12-15]: (figura 10 pag. 44) após a análise em CCDC, as frações foram reunidas, as que possuíam maior massa e coloração na revelação das cromatoplas foram analisadas por CLAE. Os cromatogramas das frações analisadas estão demonstrados na figura 23.

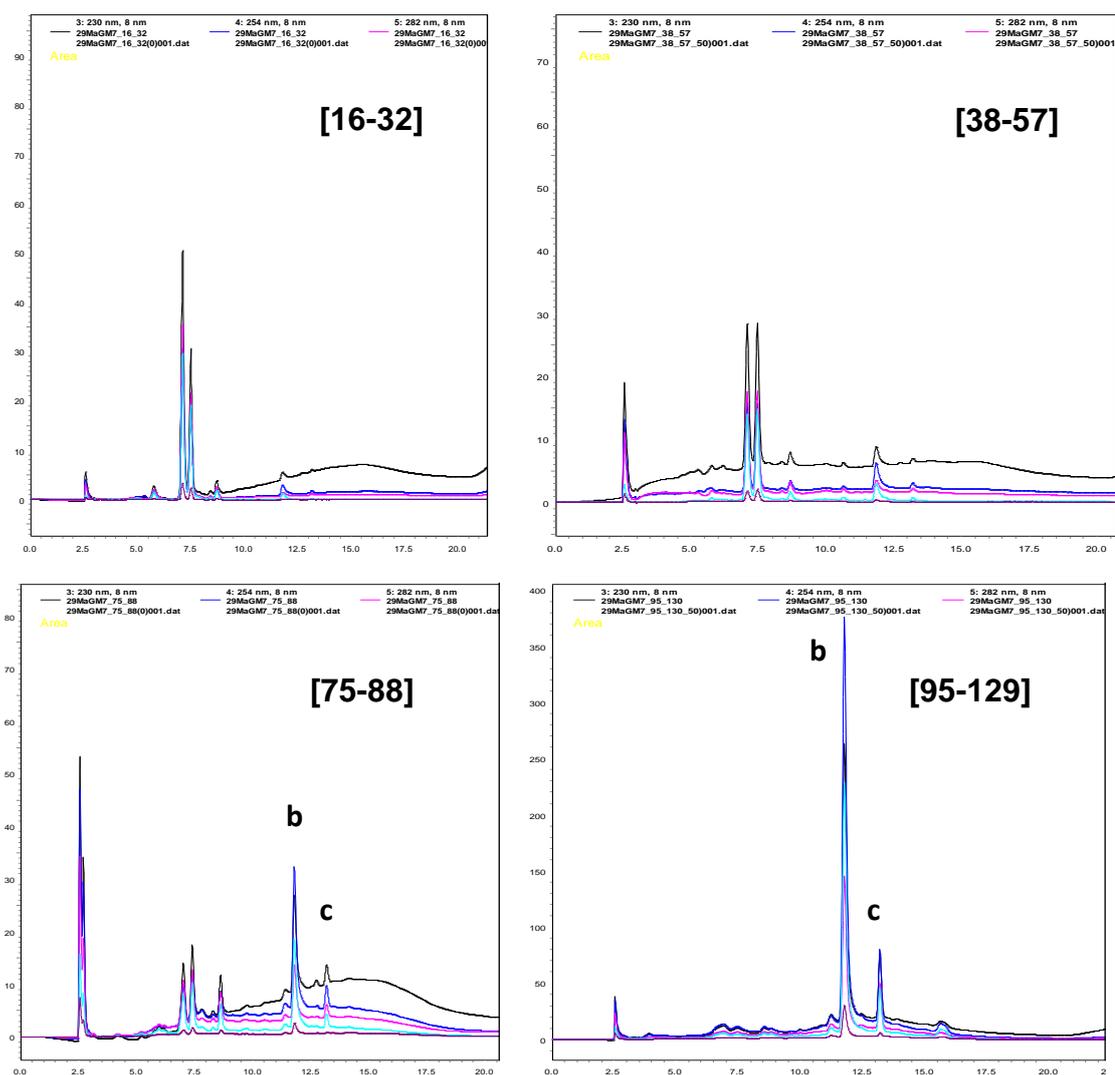


Figura 23 - Cromatogramas da análise por CLAE das frações obtidas do fracionamento da Fração [12-15]. Monitorados por absorção em UV (230, 254, 282 3 365 nm).

As análises realizadas demonstram que o fracionamento em Poliamida-6 permitiu uma separação dos constituintes da amostra [12-15] nos primeiros sistemas de eluição, e nos sistemas finais da eluição, como mostrado na figura 23. Nenhuma fração apresentou-se na forma purificada. A fração [75-88] apresentou quase todos os picos presentes na fração mãe.

A substância “a” (R_t de 10,0 min), figura 22, não apareceu em nenhuma das frações analisadas, podendo estar presente nas frações que não foram analisadas por CLAE. As frações com menor polaridade ([95-129]) mostraram uma forma possivelmente mais purificada que as demais, possuindo a substância “b” como a majoritária na fração.

A fração **Cj.1GM.5.[12-15].95-129** foi analisada por RMN de ^1H , 300 MHz (apêndice 40, página 124) e os deslocamentos químicos estão na tabela 9.

Os dados obtidos do espectro de RMN de ^1H apontam que o metabólito isolado da fase *n*-BuOH apresenta o mesmo padrão de sinais dos metabólitos isolados da fase AcOEt, como a possível presença da ramnose (figura 25) e do benzeno tri-substituído em *orto* e *para* (figura 24). Apresenta, porém, sinais em campo mais alto, como os tripleto em δ 0,99 ppm e os multipletos entre δ 1,2 e 2,15 ppm (figura 25), o que refletem a presença hidrogênios mais protegidos, como de uma cadeia alifática. Para a determinação estrutural deste metabólito, outros dados espectroscópicos bidimensionais e espectrométricos são necessários.

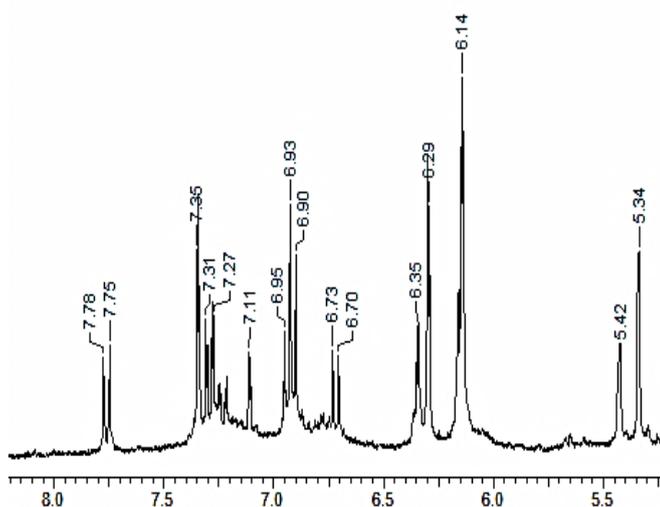


Figura 24 - Expansões da região de 5,2 a 8,0 ppm, espectro de ^1H de 5.[12-15].95-129 (300 MHz, CD_3OD).

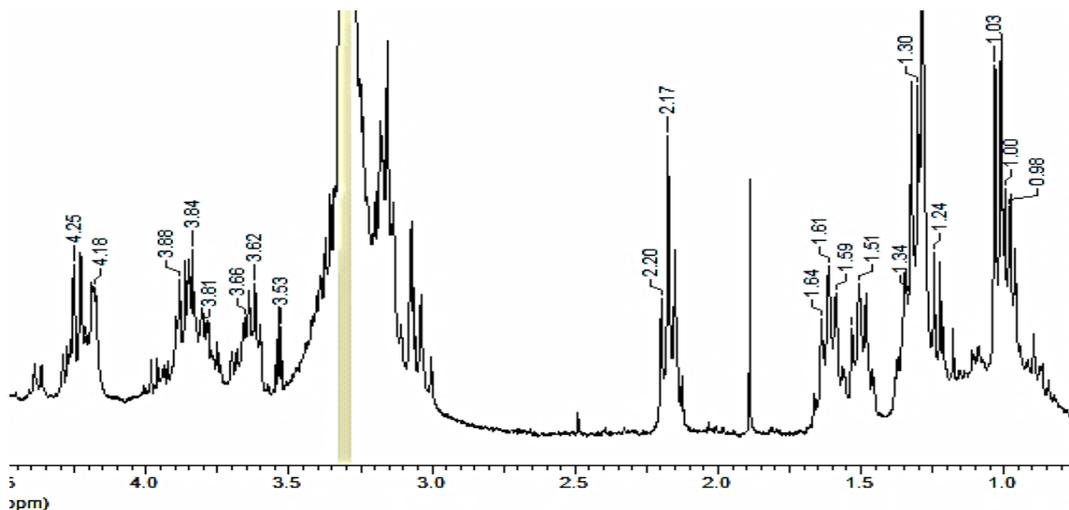


Figura 25 - Expansões da região de 0,9 a 4,3 ppm, espectro de ^1H de 5.[12-15].95-129 (300 MHz, CD_3OD).

Tabela 9 - Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H da fração 5.[12-15].95-129, em CD_3OD , TMS, 300MHz.

$^1\text{H} - \delta$ em ppm e multiplicidade
5.[12-15].95-129
0,99 (1H, <i>t</i> , $J = 6,5$ Hz)
1,027 (3H, <i>d</i> , $J = 6,5$)
1,29 – 1,349 (1H, <i>m</i>)
2,13 – 2,15 (<i>m</i>)
3,18 (3H, <i>dd</i> , $J = 7,5; 4,5$ Hz)
3,35 – 3,411 (2H, <i>m</i>)
3,63 (1H, <i>dd</i> , $J = 5,75$ Hz)
3,83 – 3,89 (2H, <i>m</i>)
4,18 (1H, <i>dd</i> , $J = 3,5; 1,5$ Hz)
4,25 (1H, <i>d</i> , $J = 7,5$ Hz)
5,35 (5H, <i>d</i> , $J = 1,5$ Hz)
6,20 (2H, <i>d</i> , $J = 2,5$ Hz)
6,37 (2H, <i>d</i> , $J = 2,5$ Hz)
6,93 (2H, <i>d</i> , $J = 3,0$ Hz)
7,31 (2H, <i>dd</i> , $J = 7,5; 2,0$ Hz)
7,36 (2H, <i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)

5. 3 Ensaio Biológicos

5.3.1 Ensaio antimicrobianos de extratos de *Casearia javitensis*

Ensaio antimicrobianos foram primeiramente realizados com os extratos de galhos e folhas obtidos nas quatro coletas, utilizando a metodologia cavidade-placa para a verificação do potencial de inibição dos extratos. Esta metodologia baseia-se na presença e no diâmetro de halo de inibição para qualificar o potencial antimicrobiano em alto, médio, baixo, ou inativo (tabela 10). Para tal qualificação, utilizamos a seguinte tabela de convenção:

Tabela 10 - Tabela de convenção para classificar a atividade antibacteriana.

Diâmetro do halo (mm)	Classificação
1 - 6	Baixa atividade
7 - 13	Média atividade
>13	Alta atividade

Foram testados extratos de *Casearia javitensis* contra *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Testes realizados com *Aeromonas hydrophila* utilizaram 5 mg/poço inicialmente, porém testes realizados com 2 mg/poço mostraram o mesmo diâmetro do halo de inibição. Desta forma, foi estabelecida a concentração de 2 mg/poço para os testes com as demais bactérias. Os diâmetros dos halos de inibição das bactérias testadas estão descritos na tabela 11.

Tabela 11 - Halos de inibição apresentados pelos extratos de *Casearia javitensis* para os diferentes micro-organismos-teste.

Extratos testados	Micro-organismos-teste			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. hydrophila</i>
Cj.1.GalhosMeOH	0 mm	0 mm	0 mm	10 mm
Cj.1.Folhas H ₂ O	2 mm	7 mm	10 mm	9 mm
Cj.2.Galhos DCM	--	--	--	0 mm
Cj.2.Galhos MeOH	0 mm	0 mm	8 mm	5 mm
Cj.2.Folhas DCM	0 mm	0 mm	4 mm	0 mm
Cj.2.Folhas MeOH	0 mm	0 mm	4 mm	7 mm
Cj.2.Folhas H ₂ O	0 mm	0 mm	0 mm	9 mm
Cj.3.Galhos DCM	--	--	--	7 mm
Cj.3.Galhos MeOH	0 mm	4 mm	0 mm	6 mm
Cj.3.Folhas DCM	0 mm	0 mm	0mm	2 mm
Cj.3.Folhas MeOH	0 mm	4 mm	3 mm	14 mm
Cj.3.Folhas H ₂ O	0 mm	0 mm	0mm	10 mm
Cj.4.Galhos DCM	0 mm	0 mm	0mm	2 mm
Cj.4.Galhos MeOH	4 mm	4 mm	3 mm	6 mm
Cj.4.Folhas DCM	0 mm	0 mm	0mm	4 mm
Cj.4.Folhas MeOH	0 mm	0 mm	4 mm	10 mm
Cont.Neg. (DMSO)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Oxitetraciclina	22 mm	22 mm	24 mm	20 mm

Como mostrado na tabela 11, a atividade antibacteriana dos extratos não permanece constante para os extratos do mesmo órgão vegetal e extraídos com o mesmo solvente. Como exemplo, o extrato metanólicos das folhas Cj.3 apresentou uma alta atividade (14 mm) contra *A. hydrophila*, enquanto que o extrato metanólico das folhas Cj.2, embora também seja de um indivíduo jovem, apresentou um halo de apenas 7 mm para esta bactéria. (Tabela 11, figura 26 B). Estudos relatam que a produção de metabólitos secundários é diretamente influenciada por fatores biológicos (maturidade do indivíduo, período reprodutivo), mas também fatores abióticos, como temperatura e sazonalidade influenciam na produção e armazenamento (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Como os extratos testados são oriundos de coletas diferentes, em diferentes épocas do ano, a concentração e a natureza das substâncias responsáveis pela atividade antibacteriana contra *A. hydrophila* podem estar variando conforme a época do ano e a idade do indivíduo.

Os resultados apontam que os extratos de maior polaridade, como o MeOH e H₂O, possuem maior potencial de inibição do crescimento bacteriano, quando comparados com os extratos DCM. Todos os extratos MeOH e H₂O testados até o momento apresentaram atividade classificada como média ou alta para pelo menos uma espécie de micro-organismo testado. Estes resultados sugerem que as substâncias ativas devem possuir uma polaridade média ou alta, porém o fator da difusão dos extratos no meio de crescimento pode ser um fator limitante, resultando em uma baixa atividade dos extratos DCM em função da sua baixa difusão no ágar.

Entre os extratos testados, o extrato H₂O das folhas Cj.1 e o extrato MeOH dos galhos Cj.4 apresentaram inibição para todas as espécies de bactérias testadas. O extrato H₂O das folhas Cj.1 mostrou média atividade para *A. hydrophila*, *P. aeruginosa*, e *S. aureus*, e baixa para *E. coli*. O extrato MeOH dos galhos Cj.4

apresentou baixa atividade para *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*. e média atividade para *A. hydrophila*. Estes extratos poderiam ser promissores no isolamento de substâncias ativas para o combate à infecções causadas por bactérias Gram-positivo e Gram-negativo.

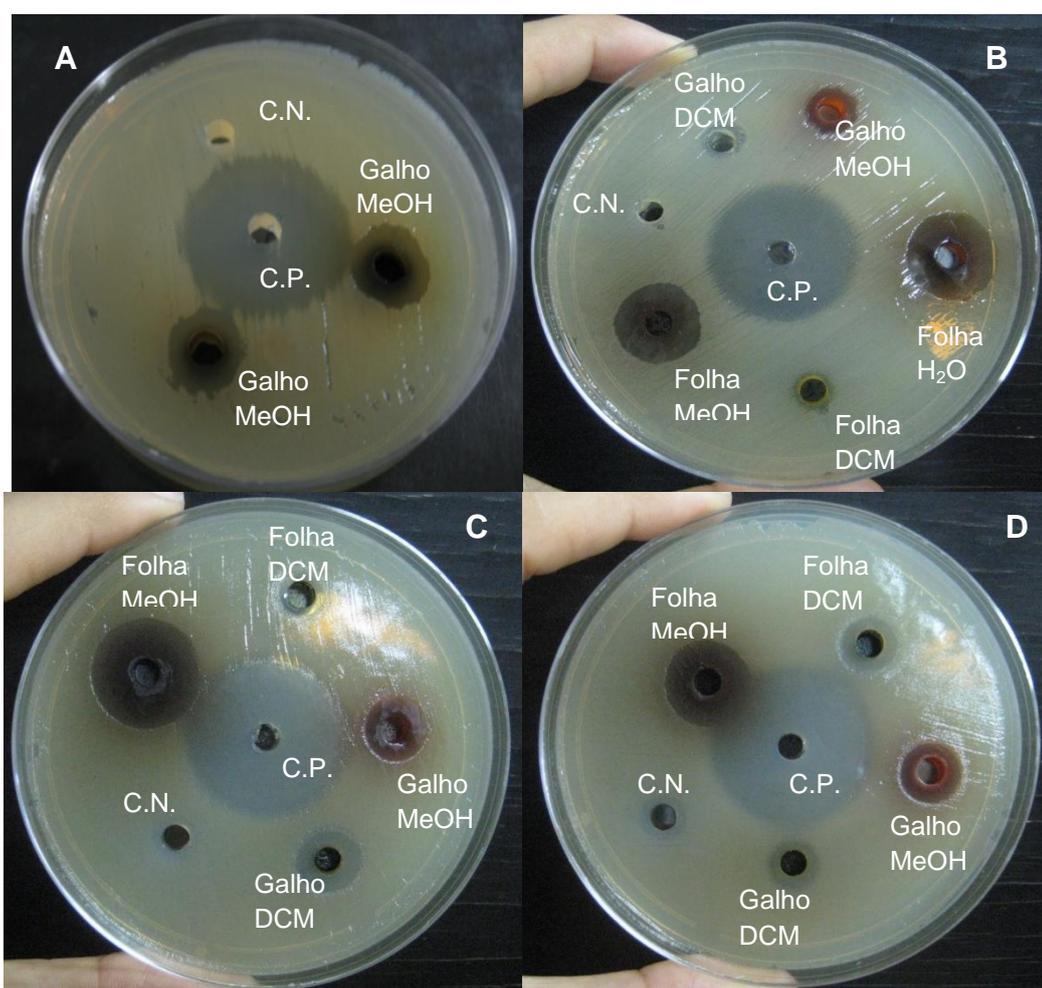


Figura 26 - Atividade antibacteriana contra *A. hydrophila* dos extratos de galhos e folhas de *Casearia javitensis*. Metodologia cavidade-placa. A – Cj.1; B – Cj.2; C- Cj. 3; D – Cj.4.; C.N – controle negativo; C. P. – oxitetraciclina.

Estudos realizados anteriormente já haviam relatado que extratos de folhas de *Casearia grewiifolia* e *Casearia* sp. apresentaram atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, *S. aureuse* *E. coli* (MOSADDIK *et al.*, 2004). Porém, ainda não há relatos de estudos com espécies do gênero *Casearia* para atividade contra *Aeromonas hydrophila*.

Quanto às bactérias testadas, *Aeromonas hydrophila* foi a mais susceptível à ação inibitória dos extratos (figura 26), sendo inibida por 62,5 % dos extratos testados. A linhagem de *E. coli*, por sua vez, foi a que apresentou maior resistência aos extratos, sendo inibida por dois extratos, porém com baixa inibição.

5.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Para a determinação da CIM e da CMB, foram realizados ensaios contra a bactéria *Aeromonas hydrophila*, em meio líquido, utilizando a técnica de macro diluição. Foram realizados os testes com os extratos Cj.1.Galho-MeOH, Cj.3.Galhos-MeOH e Cj.3. Folhas-MeOH, pois estes apresentaram atividade contra esta bactéria.

A maior concentração de extratos para este teste é 64 mg, porém, a dificuldade de solubilização dos extratos Cj.3.Galhos-MeOH e Cj.3.Folhas-MeOH permitiu a obtenção de uma solução de concentração de 46 mg/mL e 47,5 mg/mL, respectivamente, como concentração inicial. O valores de CIM e CMB para os extratos testados contra *A. hydrophila* estão na tabela 12.

Tabela 12 - Valores CIM e CMB contra *Aeromonas hydrophila* apresentados pelos extratos MeOH avaliados.

Extratos testados	CIM mg/mL	CMB mg/mL
Cj.1.Galhos.MeOH	2	>8
Cj.3.Galhos.MeOH	2,87	> 11,5
Cj.3.Folhas.MeOH	1,48	2,96

Os resultados indicam que o extrato Cj.3.Folhas.MeOH possui uma alta atividade também em meio líquido (tabela 12), apresentando tanto o maior halo de inibição em meio sólido, requisitando uma baixa concentração do extrato para a ação bactericida contra *A. hydrophila*. Para uma inibição seletiva, o extrato Cj.3.MeOH das folhas seria o mais promissor como fonte de metabólitos ativos contra a bactéria patogênica de peixes *Aeromonas hydrophila*.

5.3.3 Ensaios antimicrobianos das fases da partição de extratos MeOH de *Casearia javitensis*

Os extratos Cj.1.Galho-MeOH e Cj.3. Folhas-MeOH, por apresentarem os melhores resultados na atividade antimicrobiana contra *A. hydrophila*, foram submetidos à partição com Hexano ou DCM, AcOEt e *n*-BuOH e suas fases foram testadas para avaliação da atividade antimicrobiana, na concentração de 2 mg/poço. Este ensaio foi realizado para verificar se a atividade antimicrobiana apresentada poderia ser devido à substâncias presente em alguma destas fases ou um

sinergismo de substâncias de diferentes polaridades, e então neste caso, a atividade maior estaria no extrato bruto.

Os halos de inibição apresentados pelas fases das partições para as bactérias *A. hydrophila*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, e *E. coli*. estão mostrados na tabela 13.

Tabela 13 - Halos de inibição apresentados pelas fases das partições dos extratos MeOH de galhos e de folhas de *Casearia javitensis* para diferentes micro-organismos-teste.

Fases testadas	Micro-organismos-teste			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. hydrophila</i>
Cj.1.GM_DCM	--	--	--	7 mm
Cj.1.GM_AcOEt	5 mm	4 mm	5 mm	15 mm
Cj.1.GM_BuOH	0 mm	0 mm	0 mm	8 mm
Cj.1.GM_H ₂ O	--	--	--	3 mm
Cj.3.FM_HEX	--	--	--	1 mm
Cj.3.FM_AcOEt	2 mm	6 mm	5 mm	10 mm
Cj.3.FM_BuOH	0 mm	0 mm	0 mm	7 mm
Cj.3.FM_H ₂ O	--	--	--	2 mm
Cont.Neg (DMSO)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Oxitetraciclina	22 mm	22 mm	24 mm	21 mm

Observa-se, pelos resultados da tabela 13, que a fase AcOEt do extrato Cj.1.Galhos-MeOH possui uma alta atividade contra *A. hydrophila*, concentrando a atividade mostrada pelo extrato bruto. A fase AcOEt do extrato Cj.3.Folhas-MeOH

também apresentou atividade antimicrobiana, o que indica que esta fase é a mais promissora para o isolamento de substâncias com atividade antimicrobiana. Assim, para estudos futuros, as substâncias identificadas da fase AcOEt do extrato Cj.1.Galhos-MeOH serão testadas quanto a sua atividade antimicrobiana. As frações obtidas da fase AcOEt do extrato Cj.3.Folhas-MeOH também serão avaliadas, e o isolamento e identificação dos metabólitos presentes constitui uma etapa importante para a busca de novos agentes antimicrobianos.

5.3.4 Atividade citotóxica em *Artemia salina*

Os extratos de *Casearia javitensis* foram testados em larvas de *Artemia salina* a partir da concentração máxima (1000 µg/mL) (tabela 14), e, caso apresentassem uma mortalidade acima de 50%, seriam testado em concentrações menores até encontrar a CL₅₀.

Como se observa na tabela 14, os extratos de *C. javitensis* avaliados não apresentaram atividade citotóxica na concentração máxima testada (1000 µg/mL). Porém, vale ressaltar que este ensaio é muito preliminar, sendo necessárias outras metodologias para complementar o estudo citotóxico.

Entre os extratos testados, o extrato Cj.2-FolhasDCM foi o que apresentou a maior taxa de mortalidade para larvas de *A. salina* (46,6%) (tabela 14). Mas o valor ainda permaneceu abaixo do limite para ser considerado como citotóxico, que é convencionado como acima de 50% de mortalidade das larvas na concentração de 1000 µg/mL (MEYER *et al.*, 1982).

Tabela 14 - Taxas de mortalidade de larvas de *Artemia salina* observadas na presença dos extratos de *Casearia javitensis*.

Extrato testado	Concentração utilizada (µg/mL)	Mortalidade (%)
Cj.1- Folhas H ₂ O	1000	6,7
Cj.1- Galhos MeOH	1000	6,7
Cj.2- Galhos MeOH	1000	16,6
Cj.2- Folhas DCM	1000	46,6
Cj.2- Folhas MeOH	1000	3,3
Cj.2- Folhas H ₂ O	1000	40
Cj.3- Galhos MeOH	1000	10
Cj.3- Galhos H ₂ O	1000	0
Cj.3- Folhas MeOH	1000	13,3
Cj.3- Folhas H ₂ O	1000	0
Cj.4- Folhas MeOH	1000	3,3
Cj.4- Galhos MeOH	1000	3,3
Cj.4- Folhas DCM	1000	0
Controle (DMSO)		0
Controle (Solução salina)		0

Na literatura encontramos vários trabalhos que mostram a citotoxicidade em linhagens de células animais de extratos de espécies de *Casearia*, principalmente *Casearia sylvestris* (MESQUITA *et al.*, 2009; MOSADDIK *et al.*, 2004). Extratos de *Casearia sylvestris* coletada em Manaus apresentaram atividade citotóxica em *Artemia salina* (estudo realizado por este grupo de pesquisa, não publicado),

corroborando os resultados em linhagens celulares. Porém, esta atividade citotóxica de extratos de *Casearia* é muitas vezes atribuída aos diterpenos clerodânicos presentes nos extratos (MOSADDIK *et al.*, 2004), sendo que até o presente momento, não foi detectada a presença destes diterpenos nos extratos de *Casearia javitensis* estudados quimicamente.

A falta de atividade dos extratos pode sugerir a falta de citotoxicidade para células de mamíferos, um resultado que seria promissor, em função de vários extratos possuírem atividade antibacteriana. Ensaios de citotoxicidade utilizando linhagens celulares de mamíferos são necessários para um estudo mais aprofundado da atividade citotóxica.

5.3.3 Ensaio quantitativo de Atividade Antioxidante

Com o objetivo de verificar o potencial antioxidante dos extratos de *Casearia javitensis*, estes foram submetidos a ensaios colorimétricos quantitativos empregando o radical DPPH. Na presença de um redutor, o DPPH de coloração violeta ($\Delta_{\text{max}} = 517 \text{ nm}$) é convertido a DPPH de coloração amarelo pálido. Para determinar o potencial antioxidante, os valores obtidos da variação da absorbância são comparados com os valores do ácido ascórbico, o antioxidante padrão.

A tabela 15 mostra o resultado do ensaio antioxidante realizados com os extratos de *C. javitensis*, mostrando a equivalência com o ácido ascórbico, expressa em mg (extrato)/mg (ácido ascórbico), o potencial de cada extrato. Quanto menor o valor da equivalência, maior o potencial antioxidante do extrato.

Tabela 15 - Resultados dos testes de atividade antioxidante dos extratos brutos de *Casearia javitensis*

Extrato testado	Δ Abs 517 nm	[AA]-Equiv.	Equivalente
Cj.1- Folhas H ₂ O	0,63	0,523	8,439
Cj.1- Galhos MeOH	0,317	2,494	2,006
Cj.2- Galhos MeOH	1,021	4,017	1,245
Cj.2- Folhas DCM	0,011	0,118	42,330
Cj.2- Folhas MeOH	1,018	4,002	1,249
Cj.2- Folhas H ₂ O	1,014	3,988	1,254
Cj.3- Galhos DCM	0,026	0,205	24,391
Cj.3- Galhos MeOH	0,309	1,309	3,821
Cj.3 – Folhas DCM	0,022	0,191	26,178
Cj.3- Folhas MeOH	0,227	0,988	5,058
Cj.3- Folhas H ₂ O	0,168	0,760	6,585
Cj.4- Folhas DCM	0,056	0,323	15,480
Cj.4- Folhas MeOH	0,276	1,180	4,248
Cj.4- Galhos MeOH	0,257	1,108	4,514

Verificou-se que o potencial antioxidante de extratos de *Casearia javitensis* é maior para os extratos mais polares (tabela 15), enquanto que os extratos DCM não apresentam atividade antioxidante.

Este resultado corrobora com a caracterização química dos extratos estudados, uma vez que os extratos metanólicos apresentaram metabólitos da

classe dos fenólicos, os quais são muitas vezes os maiores responsáveis pela atividade antioxidante. Os extratos diclorometânicos, por sua vez, apresentaram uma baixa quantidade de fenólicos, o que pode ser devido a baixa concentração de substâncias fenólicas nestes extratos, conforme verificado por CCDC e análises por CG-EM.

Comparando a atividade antioxidante entre as coletas realizadas, percebe-se que os todos os extratos MeOH e o extrato H₂O das folhas da segunda coleta, realizada nos mês de julho, mostraram um alto potencial antioxidante (tabela 15), apresentando a equivalência com o ácido ascórbico próxima de 1,0 mg/mg[Ácido Ascórbico]. A produção de substâncias com atividade antioxidante pode, assim, estar relacionada com a época do ano, uma vez que estas substâncias podem estar sendo produzidas para diminuir o estresse oxidativo devido à maior incidência de luz solar no mês de julho, uma época do ano caracterizada pela pouca ocorrência de chuvas.

6 CONCLUSÕES

- Este trabalho relata o primeiro estudo químico de *Casearia javitensis*, o qual mostrou que os extratos obtidos desta espécie apresentam esteroides como substâncias majoritárias nos extratos de baixa polaridade.
- O fracionamento do extrato metanólico dos galhos forneceu o isolamento de seis substâncias, e os dados espectroscópicos e espectrométricos apontam estes metabólitos como sendo fenólicos com ramnose. A determinação estrutural ainda não está concluída, sendo necessários a obtenção de dados espectroscópicos bidimensionais para esta etapa.
- Os extratos metanólicos obtidos de galhos e folhas de *Casearia javitensis* apresentam-se como mais promissores para a obtenção de substâncias com atividade antimicrobiana contra a bactéria patogênica para peixes *Aeromonas hydrophila*;
- O extrato metanólicos dos galhos de um indivíduo jovem mostrou atividade bactericida em baixas concentrações;
- A fase AcOEt obtida do extrato metanólico dos galhos concentrou a atividade contra *A. hydrophila*, e inibiu crescimento de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.
- Os extratos polares (metanólico e aquoso) apresentaram um maior potencial antioxidante, que pode ser devido à possível maior concentração de substâncias fenólicas.
- A fase DCM do extrato metanólico dos galhos tem mostrado uma alta complexidade durante as etapas do fracionamento, dificultando a obtenção de

frações mais purificadas e conseqüentemente a identificação de seus constituintes.

- A alta atividade antimicrobiana e ausência de citotoxicidade dos extratos de *C. javitensis* corroboram a continuação do seu fracionamento e tentativa de purificação das substâncias ativas.

7. REFERÊNCIAS

- ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fonte de Fitoterápicos: **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n.3, 2001.
- AMARASHING, N. R.; JAYASHINGE, L.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y. Flacourside, a new 4-oxo-2-cyclopentenylmethyl glucoside from the fruit juice of *Flacourtia indica*. **Food Chemistry**, v. 102, p. 95-97, 2007.
- ANDRADE, J. I. A. Atividade antibacteriana dos extratos dos frutos de *Coussapoa asperifolia magnifolia* (Trécul) contra *Aeromonas hydrophila* e fracionamento do extrato metanólico. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual do Amazonas, Manaus, 2009
- BALESTRIN, L. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antibacteriana e antioxidante de *Dorstenia multiformis* Miquel, Moraceae. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- BARREIRO, E. & BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 679-688, 2009.
- BARREIRO, E. Desenho de Fármacos a partir de produtos naturais. *In*: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: editora Argós. 523 p., 2001.
- BEUTLER, J.A.; MCCALL, K.L.; HERBERT K.; JOHNSON, T.; SHOEMARKER, R.H.; BOYD, M.R. Cytotoxic clerodanedieterpene esters from *Laetia corymbulosa*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 233-236. 2000.

- BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; OLIVEIRA, F.; FRANSCHESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, p. 1863-1869, 2001.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.
- BROWN, P. D. & NGNENO, C. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from hospital and community sources in southern Jamaica. **International Journal of Infectious Diseases**. v.11, p. 220—225. 2003
- CALIXTO, J. B. Estudo Farmacológico Pré-Clínico de Plantas Medicinais. *In*: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Editora Argós. 523 p. 2001.
- CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R. A. Estudo Químico de Plantas Medicinais Orientado para a Análise Biológica: Obtenção, Determinação e Modificação Estrutural de Compostos Bioativos. *In*: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Editora Argós. 523 p., 2001.
- CHAI, X. Y.; XU, Z. R.; BAI, C. C.; ZHOU, F. R.; TU, P. F. A new seco-friedelolactone acid from the bark and twigs of *Itoa orientalis*. **Fitoterapia**, v. 80, n. 7, p. 408-410, 2009.
- CHANG, K. C.; DUH, C. Y.; CHEN, I. S.; TSAI, I. L. A cytotoxic butenolide, two new dolabellane diterpenoids, a chroman and a benzoquinol derivative from *Casearia membranacea*. **Planta Medica**, v. 69, p. 667-672, 2003.

- CHOU, C. J.; LIN, L.C., TSAI, W.J.; HSU, S.Y.; HO, L.K. Phenyl- β -D-glucopyranoside derivatives from the fruits of *Idesia polycarpa*. **Journal of Natural Products**. v. 60, 375-377, 1997
- CHRISTYBAPITA, D.; DIVYAGNANESWARI, M.; DINAKARAN MICHAEL, R. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23 p. 840-852, 2007.
- CORRÊA, P. G. Defesas Foliaves em Resposta à Herbivoria em Espécies Lenhosas de Restinga, Ipojuca - PE. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Pós Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007
- COSTA, I. R.; ARAÚJO, F. S.; LIMA-VERDE, L. W. Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasileira**.v 18, n.4, p. 759-770, 2004.
- DAPKEVICIUS, A., VENSKUTONIKS, H.; BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. **Journal of Science Food Agriculture**, v.77, 1998.
- DA SILVA, S.L.CALGAROTTO, A.K.; CHAAR, J.S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PL₂ activity. **Toxicon**, v. 52, p. 655-666, 2008.
- DAGVADORJ, E. SHAKER, K. H.; WINDSOR, D.; SCHNEIDER, B.; BOLAND, W. Phenolic glucosides from *Hasseltia floribunda* **Phytochemistry**, v. 71, p. 1900–1907, 2010.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2 ed. New York: John Wileys& Sons, 507 p., 2002.

- ESTEVEES, I, SOUZA, I. R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. G. V.; SANTOS, L. S.; SERTIE, J. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEERDOF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191–196, 2005.
- FERNANDES, C.C.; CURSINO, L. M. C.; NOVAES, J. P.; DEMETRIO, C. A.; PEREIRA-JUNIOR, O. L.; NUNEZ, C. V. Salicilatos isolados de folhas e talos de *Salix martiana* LEYB. (Salicaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 983-986, 2009.
- FIGUEIREDO, E. A. P.; RAMOS, H.; MACIEL, M.A.; VILAR, M. C. M.; LOUREIRO, N. G.; PEREIRA, R. G. *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.19, n.4,2007.
- FLORA BRASILIENSIS. v. 13, n.1, p. 483-484, 1871. Disponível em <http://florabrasiliensis.cria.org.br/fviewer>
- GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. Plantas Mediciniais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 374-381, 2007.
- GONZÁLES, A. M.; PRESA, M.; LATORRE, M. G.; LURÁ, M. C. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 24 p. 59-61, 2007.
- GUNASEKERA, S. P.; SULTANBAWA, M. U. S.; BALASUBRAMANIAM, S. Triterpenes of some species of Flacourtiaceae. **Phytochemistry**, v. 16, p. 788-789, 1977.

- JAROSZEWSKI, J. W.; OLAFSDOTTIR, E. S. Monohydroxylated cyclopentenone cyanohydrins glucosides of Flacourtiaceae. **Phytochemistry**, v.26, p. 3348-3349, 1987.
- JEFFERIES, P. R.; LAM, W. W.; TOIA, R. F.; CASIDA, J. E. Ryania Insecticide: Structural Assignments of Four Natural 8-Hydroxy-10-epiryranoids. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 40, p. 509-512, 1992.
- JOSSANG, A.; JOSSANG P.; BODO, B. Cinnamrutinoses A and B, Glycosides of *Populus tremula*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 2, p. 547-549, 1994.
- JUNGES, M. J.; SCHENKEL, E. P.; SIMÕES, C. M. O. Flavonoides de *Casearia sylvestris* (erva de bugre). **Cadernos de Farmácia.**, v. 1,p. 95-101. 1985.
- KAOU, A. M. ; MAHIOU-LEDDER, V.; CANLET, C. ; DEBRAUWER, L.; HUTTER, S.; LAGET, M.;FAURE, R.; AZAS, N.; OLLIVIER, E. Antimalarial compounds from the aerial parts of *Flacourtia indica* (Flacourtiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 272-274, 2010.
- KHAN, M. R.; GRAY, A. I.; SADLER, I. H.; WATERMAN, P. G. Cloredane Diterpenes from *Casearia corymbosa* stem bark. **Phytochemistry**, v. 29, n. 11, p. 3591-3595, 1990
- KOUTSAFTIS, A. & AOYAMA, I. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. **Science of the Total Environmental**, v. 387, p. 166–174, 2007.
- KUBITZA, F. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. Jundiaí, SP. p. 108, 2004.
- KWON, D. J.; BAE, Y. S. Phenolic glucosides from bark of *Populus alba x glandulosa* (Salicaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 130–132, 2009.

- LEE, S. W.; LI, G.; LEE, K. S.; SONG, D. K.; SON, J. K. A New Phenylpropanoid Glucoside from the Fruits of *Illicium verum*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 8, p. 591-593, 2003.
- LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. *In*: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Editora Argós. 523 p. 2001.
- LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v.111, p. 1265-127. 2003.
- MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438. 2002.
- MAIRESSE, L.A.S. Avaliação da Bioatividade de extratos de espécies vegetais, enquanto excipientes de aleloquímicos. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, 2005.
- MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. C. T.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 337–342, 2004.
- MALLAVAPURU, G. O. Contribution of medicinal plants to modern medicine. **Journal of Medicinal Plants to Modern Medicine**, v. 22, p. 572-578, 2001.
- MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513 – 524. 1998.
- MESQUITA, M. L ; PAULA, J. E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine

against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 439–445. 2009.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A convenient general Bioassay for Active Plant Constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MICHAEL, A.S.; THOMPSON, C.G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay. **Science**, v. 123, 1956.

MONTANARI, C. A. & BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24 n.1p.105-111, 2001.

MOREL, A. F.; MALDANER, G.; ILHA, V.; MISSAU, F.; SILVA, U. F.; DALCOL, I. I. Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss and their antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2571-2576, 2005.

MOSADDIK, M.A.; FOSTER, P.I.; BOOTH, R.; WATERMAN, P.G. Phenolic glycosides from some Australian species of Flacourtiaceae (Salicaceae *sensu lato*). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 166-168, 2007a.

MOSADDIK, M.A.; FOSTER, P.I.; BOOTH, R.; WATERMAN, P.G. Clerodanedieterpenes from the stems of *Caearia grewiifolia* var. *gelonioides* (Flacourtiaceae/Salicaceae *sensu lato*). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 631-633, 2007b

MOSADDIK, M. A.; BANBURY, L.; FORSTER, P.; BOOTH, R.; MARKHAM, J.; LEACH, D.; WATERMAN, P. G. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomedicine**, v. 11,p. 461–466, 2004.

MOURIÑO, J. L. P.; MARTINS, M. L.; YAMASHITA, M. M.; BATISTA, C. R. V.; PEREIRA, M. A. Isolamento de *Aeromonas hydrophila* em girinos de rã-touro na metamorfose. **Pesquisas em Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n.8, p.1325-1327, 2006

NOBRE, I.K. C. Atividade Antimicrobiana de Plantas Pertencentes ao gênero *Hyptis* Jacq coletadas no Semi-árido baiano. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, 2008.

NUNEZ, C. V. Sesquiterpenos e Esteróides da Casca do Tronco de *Guarea guidonia*(L.) Sleumer (Meliaceae). Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Antioxidant therapy: myth or reality? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, 2005.

ORIAN, C. M.; GRIFFITHS, M. E.; ROCHE, B. M.; FRITZ, R. S. Phenolic glycosides and condensed tannins in *Salix sericea*, *S. eriocephala* and their F1 hybrids: not all hybrids are created equal. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 619 – 632, 2000.

ORJALA, J.; ERDELMEIER, C.A.J; WRIGHT, A.D.; RALI, T.; STICHER, O. Chromenes and prenylated benzoic-acid derivative from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v.34, p. 813-818, 1993.

PARK, B. S. Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 255-262, 2006.

PATHAK D.; PATHAK K.; SINGLA, A.K. Flavonoids as medicinal agents - Recent advances. **Fitoterapia**, v. 62, p. 371-389, 1991.

- PAULO, M. Q. BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; MAIA, R. F.; BARBOSA, R. C.; KAPLAN, M. A. Antimicrobial activity of benzyloisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 39-41, 1992.
- PEREIRA, I. O.; MARQUES, M. J.; PAVAN, A. L.; CODONHO, B. S.; BARBIERI, C. L.; BEIJO, L. A.; DORIGHETTO, A. C.; D’MARTIN, E. C.; SANTOS, M. H. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, v. 17, p. 339-345, 2010.
- POHJAMO, S. P.; HEMMING, J. E.; WILLFÖR, S. M.; REUNANEN, M. H. T.; HOLMBOM, B. R. Phenolic extractives in *Salix caprea* wood and knots. **Phytochemistry**, p. 165-169, 2003.
- PRINCE, K. A. Determinação da atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* de metabólicos bioativos de fungos endofíticos empregando a técnica do MABA. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2008.
- RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens. **Fitoterapia**, v. 78, p. 434–436, 2007.
- REHILL, B.; CLAUSS, A.; WIECZOREK, L.; WHITHAM, T.; LINDROTH, R. Foliar phenolic glycosides from *Populus fremontii*, *Populus angustifolia*, and their hybrids. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 125-131, 2005.
- ROCHA, M.S. Estudo da ocorrência do gênero *Aeromonas* em sistemas de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização no município de Lins, SP. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Universidade do estado de São Paulo, São Paulo, 2004.

- ROEL, A. R. ; VENDRAMIN, J. D.; FRIGHETTO, T. S.; FRIGHETTO, N. Atividade Tóxica de Extratos Orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) Sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) **Anais Sociedade de Entomologia Brasileira**,v.29, n. 4,2000.
- RUEST, L.; TAYLOR, T. D. R.; DESLONGCHAMP, P. Investigation of the Constituents of *Ryania speciosa*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 63, p. 2840-2843, 1985.
- SANTO, E.; MACEDO, C.; MARIN, J. M. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a University Hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. v.48, n.4,2006.
- SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of Brazilian copaíba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p. 204-208, 2008.
- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. P. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC. 2004.
- SHAARI, K.; WATERMAN, P.G. Podophyllotoxin-Type Lignans as Major Constituents of the Stems and Leaves of *Casearia clarkei*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 6, p. 720-724, 1994.
- SI, S. L.; WU, L.; ZHU, Phenolic glycosides from *Populus davidiana* bark **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 37, p. 221–224, 2009.

- SILVA, D. H. S. Constituintes químicos de *Iryanthera sagotiana* e *Iryanthera lancifolia*. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
- SOUZA V. C.; LORENZI H. **Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Plantarum, 2005.
- STANSTRUP, J.; RUSCH, A. M.; AGNOLET, S.; RASMUSSEN, H. B.; MOLGAARD, P.; STADEN, J. V.; STAFFORD, G. I.; STAERK, D. Itoside A and 4-hydroxytremulacin from *Dovyalis caffra* and *Dovyalis zeyheri*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 346–348, 2010.
- TANAKA, E. M.; RIBEIRO, M. G.; MEGID, J.; LISTONI, F.J.P. Tris-EDTA no teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* em amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.3. 2002.
- THADEO, M.; MEIRA, R. M. S. A.; AZEVEDO, A. A.; ARAÚJO, J. M. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras da folha de *Casearia decandra* Jacq. (Salicaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 2, 2009.
- TORTORA, G. J. FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Editora Artmed. 2005
- VASQUEZ, S. P. F. Fenologia, Biologia Floral e polinização de três espécies de Flacourtiaceae na região de Manaus- AM. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração em Botânica). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2005.
- VERPOORTE, R.; MARASCHIN, M. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. *In*: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) **Plantas Medicinais sob a**

ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Editora Argós. 523 p. 2001.

WANG, W.; ALI, Z.; LI, X.-C.; SMILLIE, T.A.; GUO, D.-A.; KHAN, I.A..New clerodane diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Fitoterapia**. v. 80, n. 07, p. 404 – 407, 2009.

WANG, W.; ALI, Z.; LI, X.-C.; KHAN, I. A. Neolignans from the Leaves of *Casearia sylvestris* SWARTZ. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, 2010.

WILHELM-FILHO, D.; DA SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de Plantas Medicinais e Alimentos: Importância e Perspectivas Terapêuticas. *In*: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna.** Chapecó: editora Argós. 523 p. 2001.

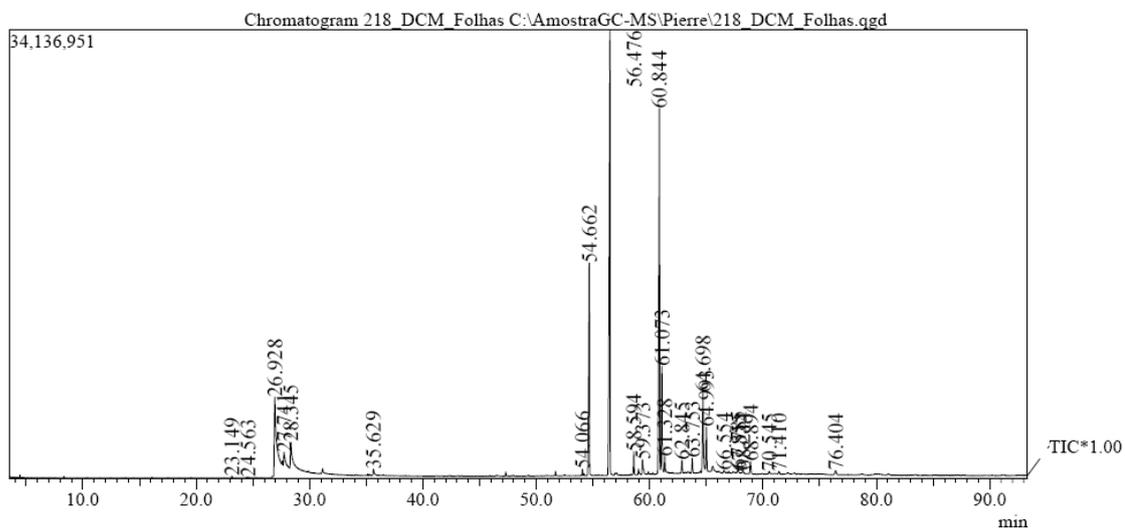
YAMADA, S. MATSUSHITA, S.; DEJSIRILERT, S.; KUDOH, Y. Incidence and clinical symptoms of *Aeromonas*-associated travellers diarrhoea in Tokyo. **Epidemiology and Infection**, v.119: p. 121-126, 1997.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. *In*: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna.** Chapecó: Editora Argós. 523 p.. 2001.

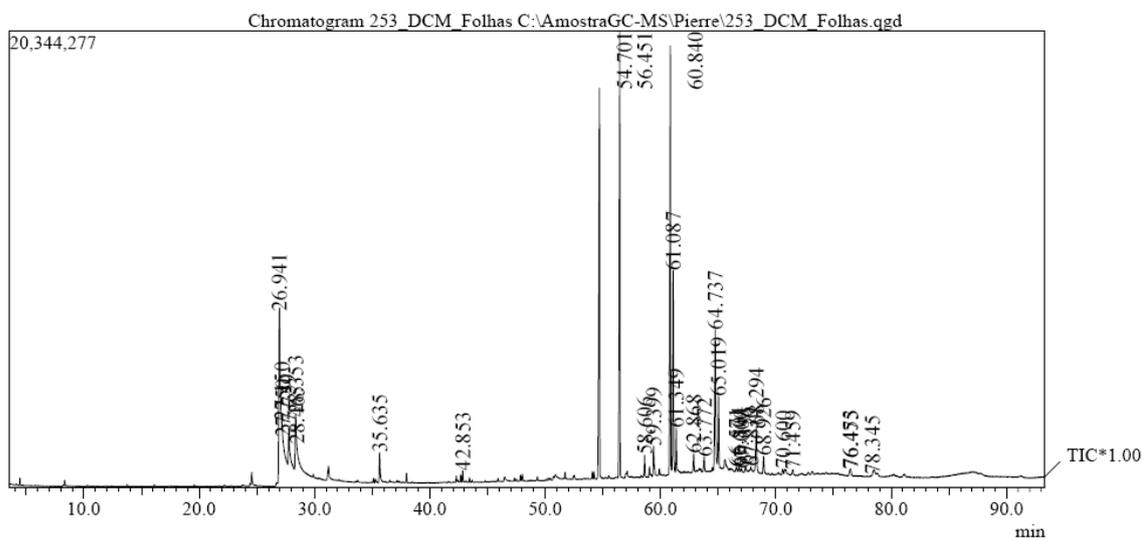
ZMARZTY, S. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Flacourtiaceae. **Rodriguésia**, v.58 n. 3, p. 663-694. 2007.

8. APÊNDICES

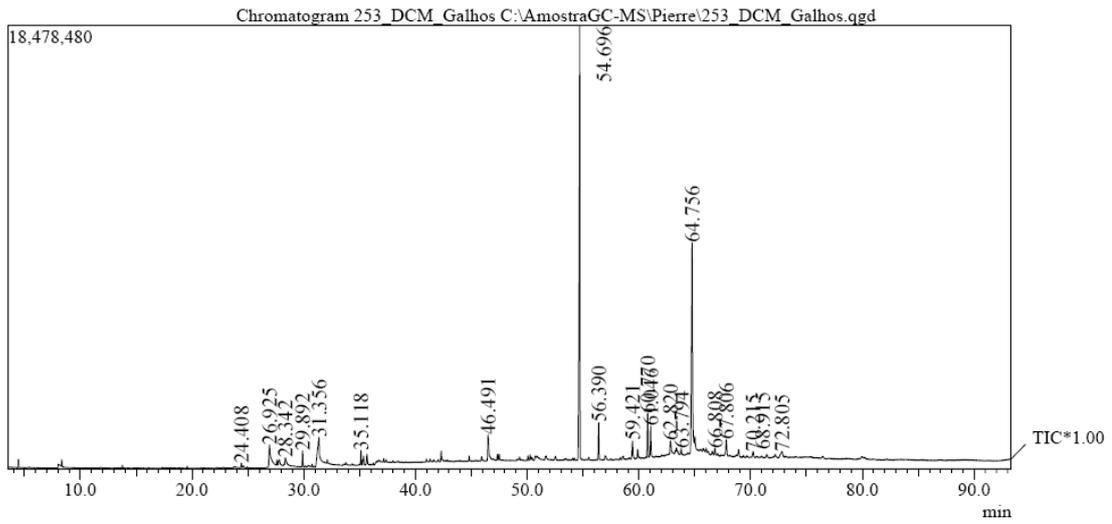
ESPECTROS DE RMN, MASSAS E CROMATOGRAMAS DE CG-MS



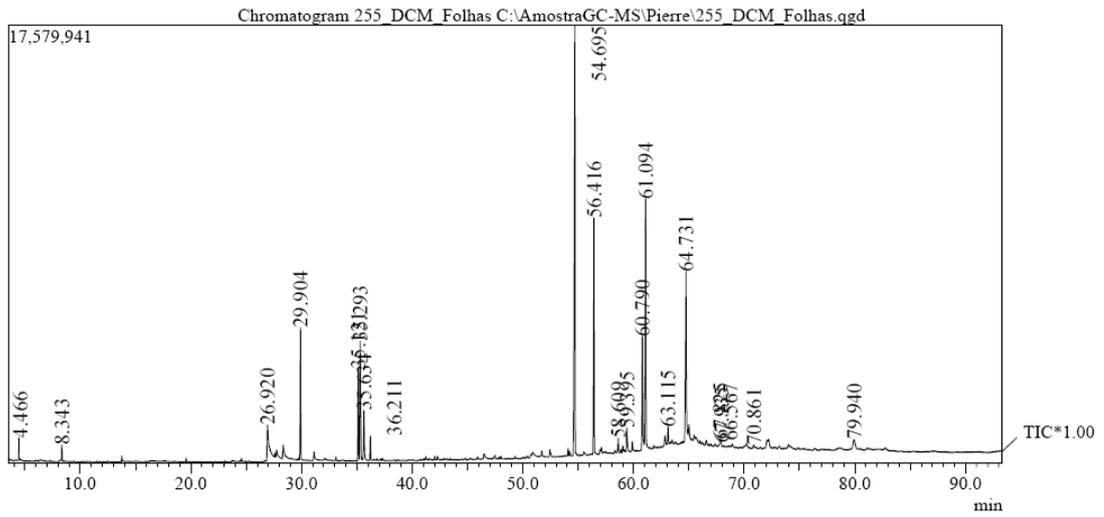
Apêndice 1 - Cromatograma Cj.2.Folhas-DCM



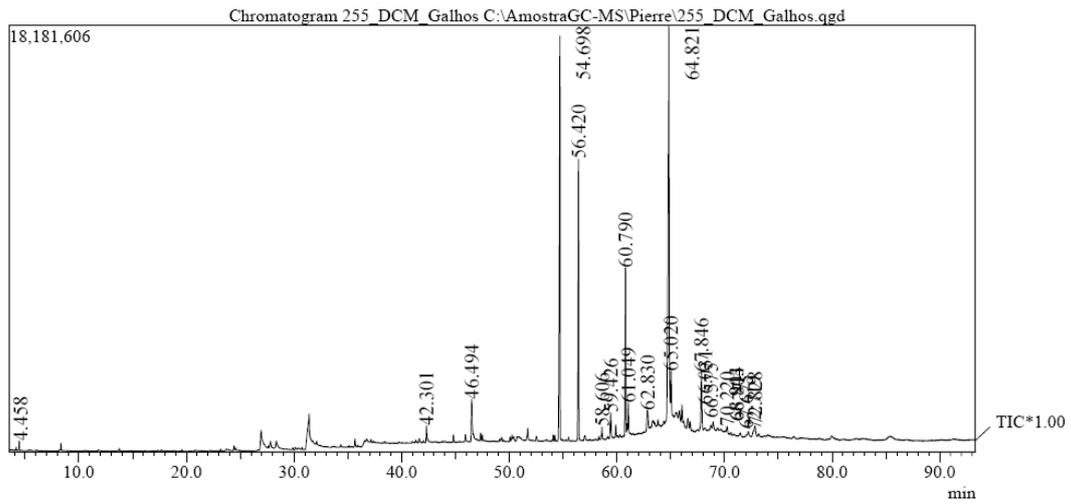
Apêndice 2 - Cromatograma Cj.3.Folhas-DCM



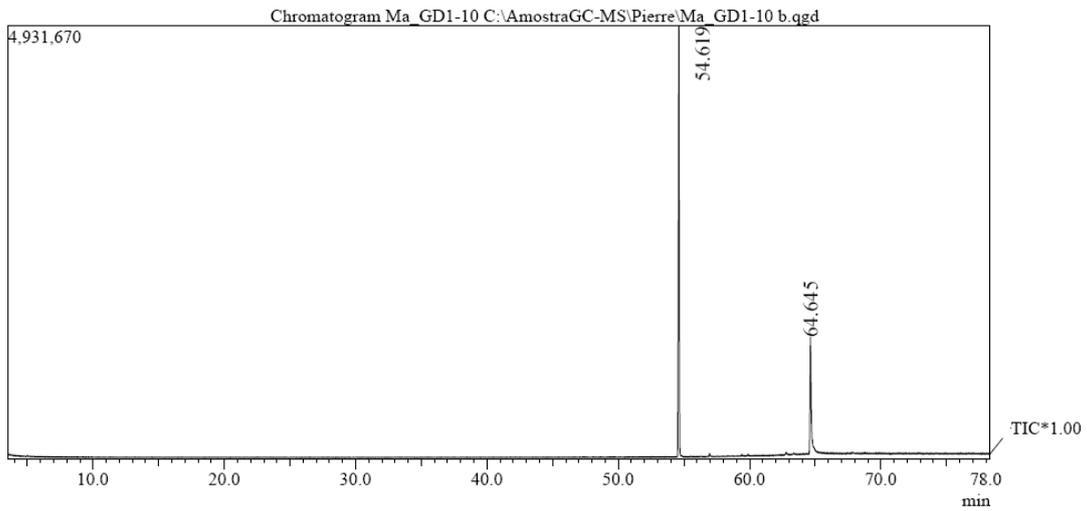
Apêndice 3 - Cromatograma Cj.3.Galhos-DCM



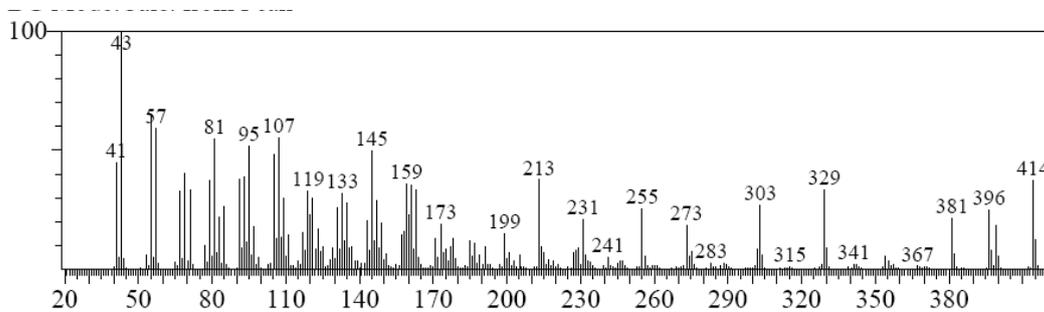
Apêndice 4 - Cromatograma Cj.4.Folhas-DCM



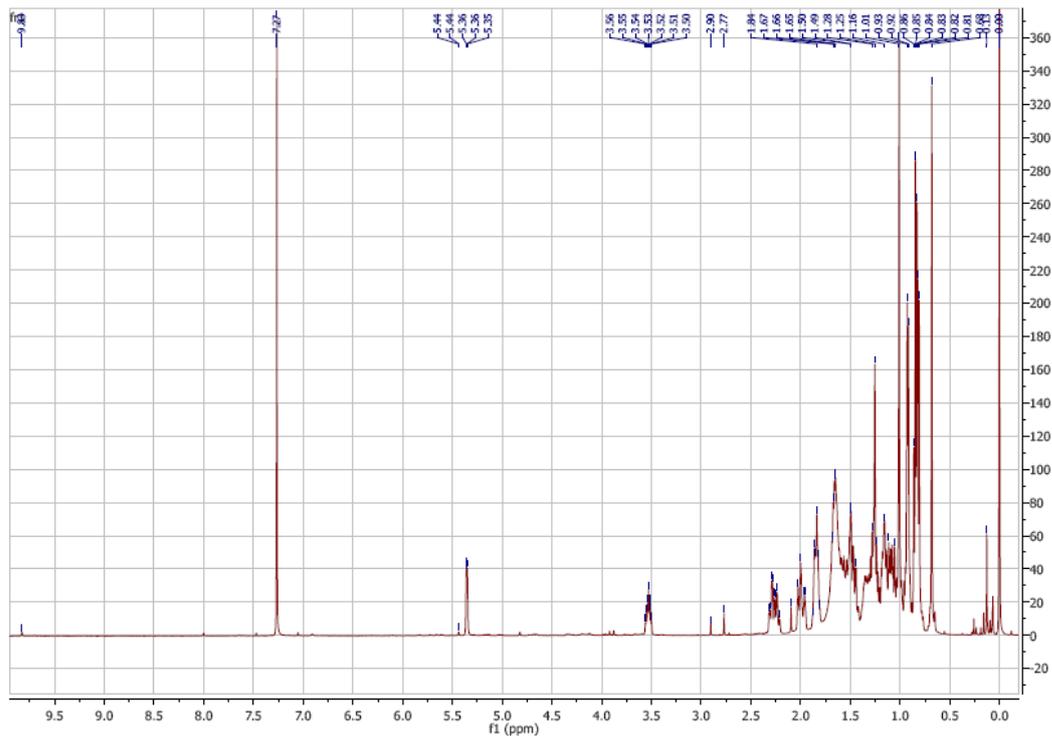
Apêndice 5 - Cromatograma Cj.4.Galhos-DCM



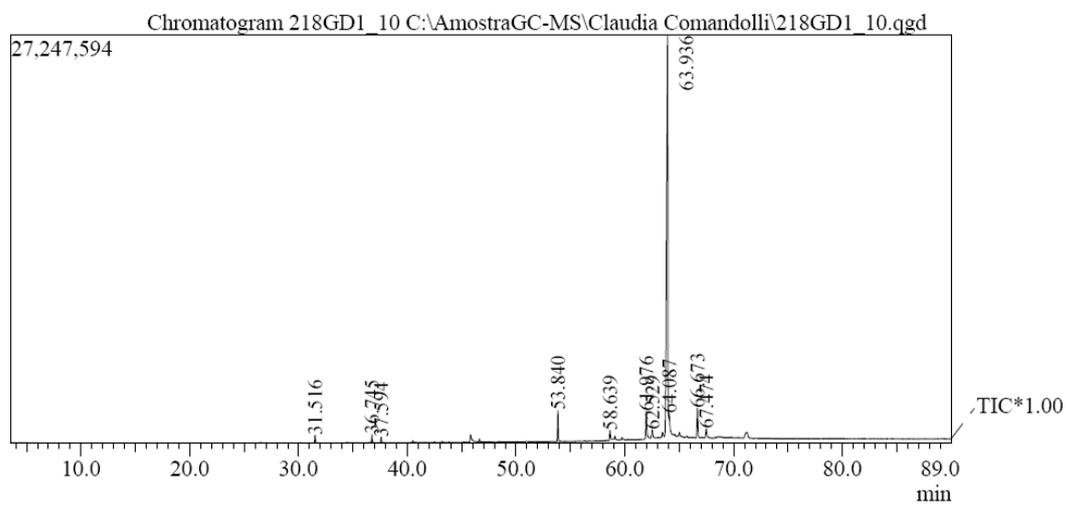
Apêndice 6 - Cromatograma da fração Cj.2.GD.1.10.Cristais



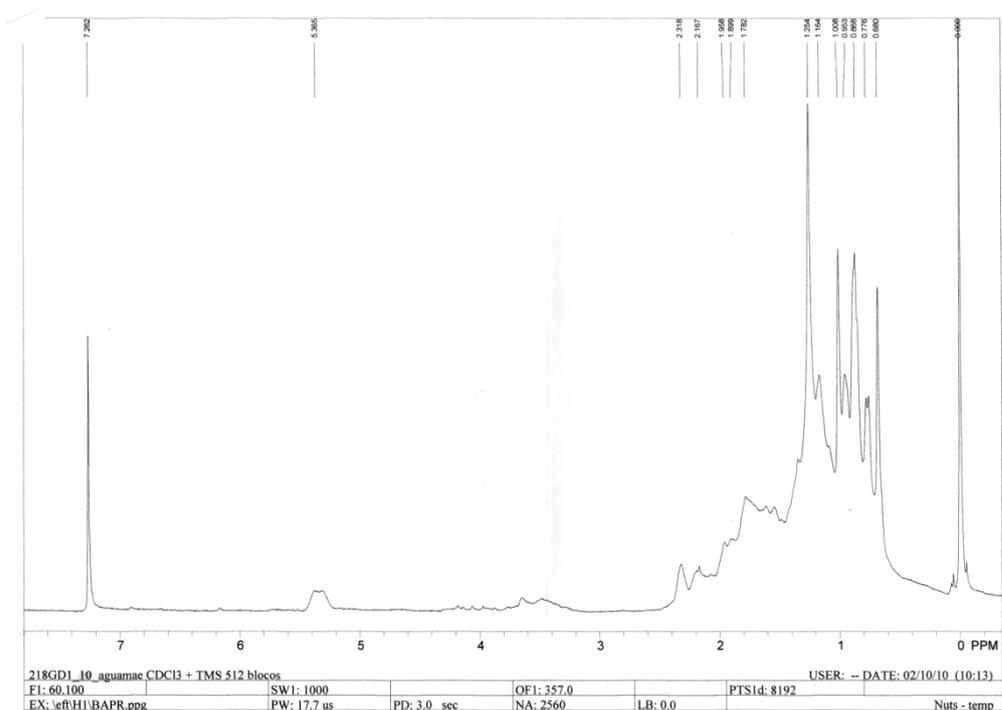
Apêndice 7 - Espectro de Massas da fração Cj.2.GD.1.10.Cristais



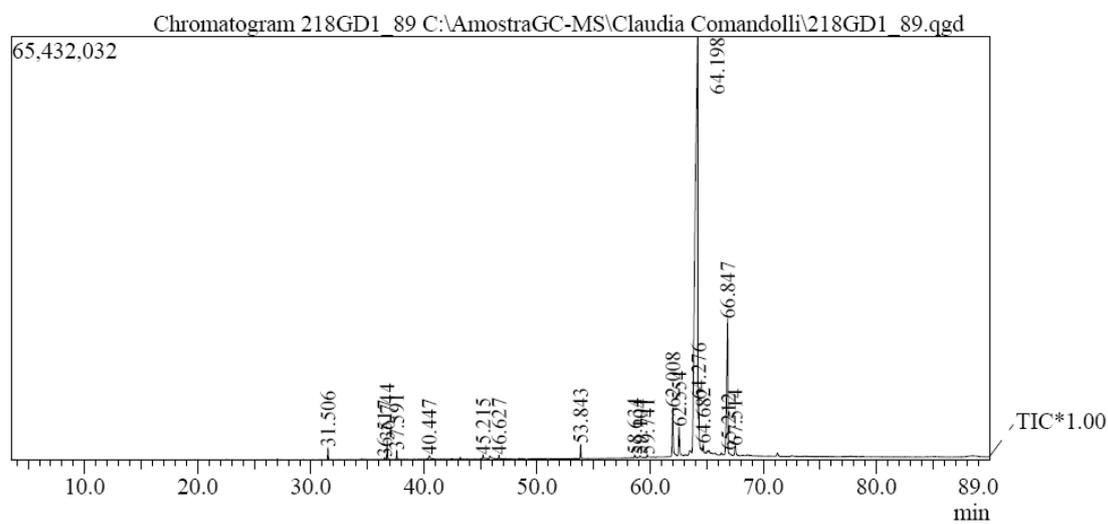
Apêndice 8 - Espectro de RMN de ^1H , 300 MHz da fração de Cj.2.GD.1.10.cristais



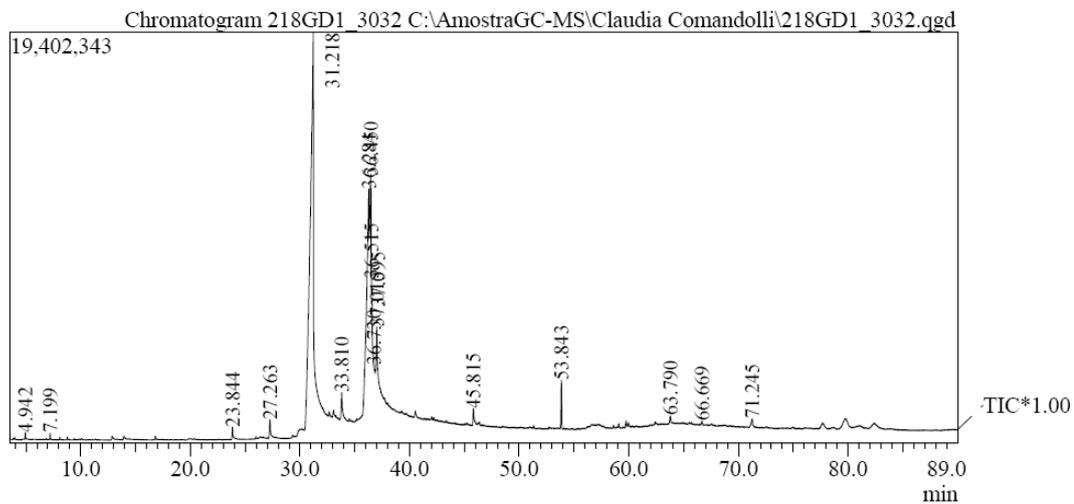
Apêndice 9 - Cromatograma da fração Cj.2.GD.1.10.agua-mãe



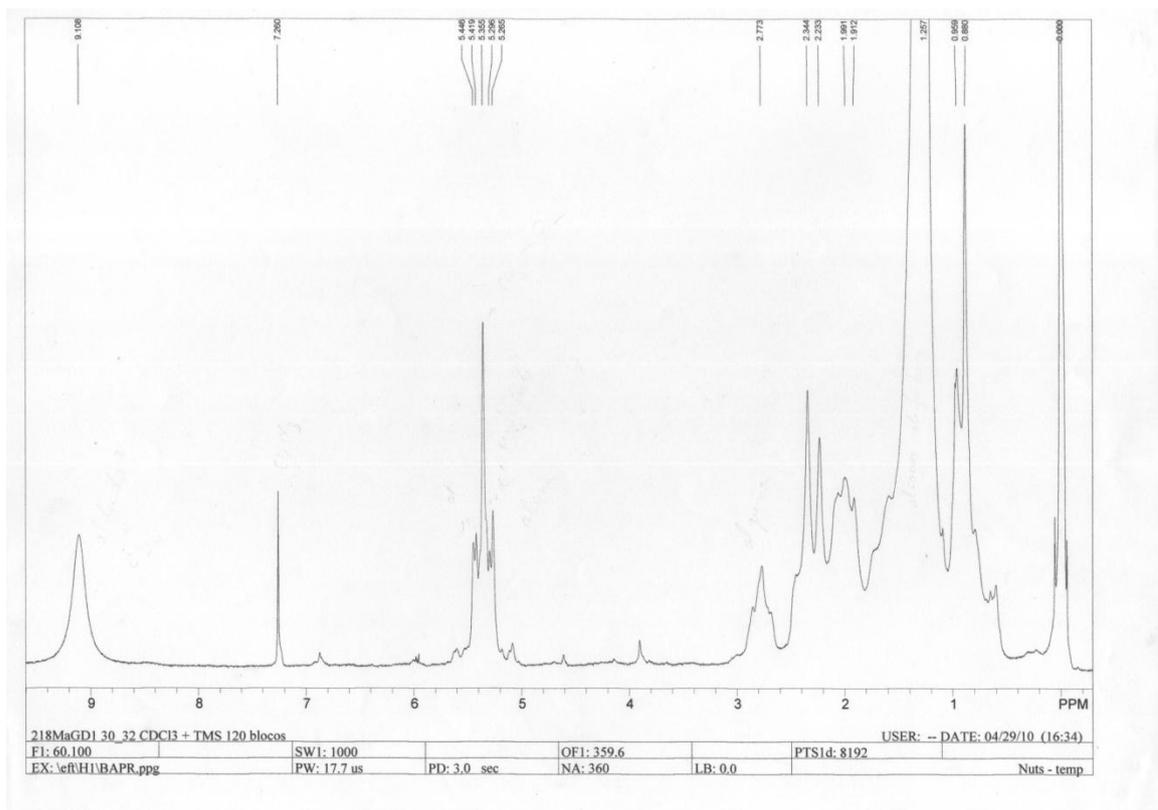
Apêndice 10 - Espectro de RMN de ^1H , 60 MHz, da fração Cj.2.GD.1.10.água-mãe



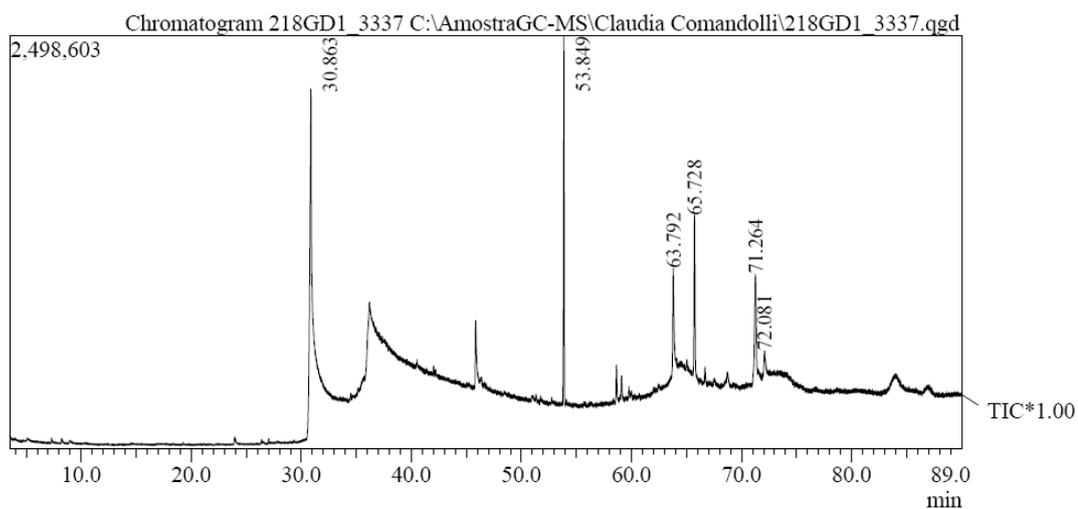
Apêndice 11 - Cromatograma da fração Cj.2.GD.1.8-9



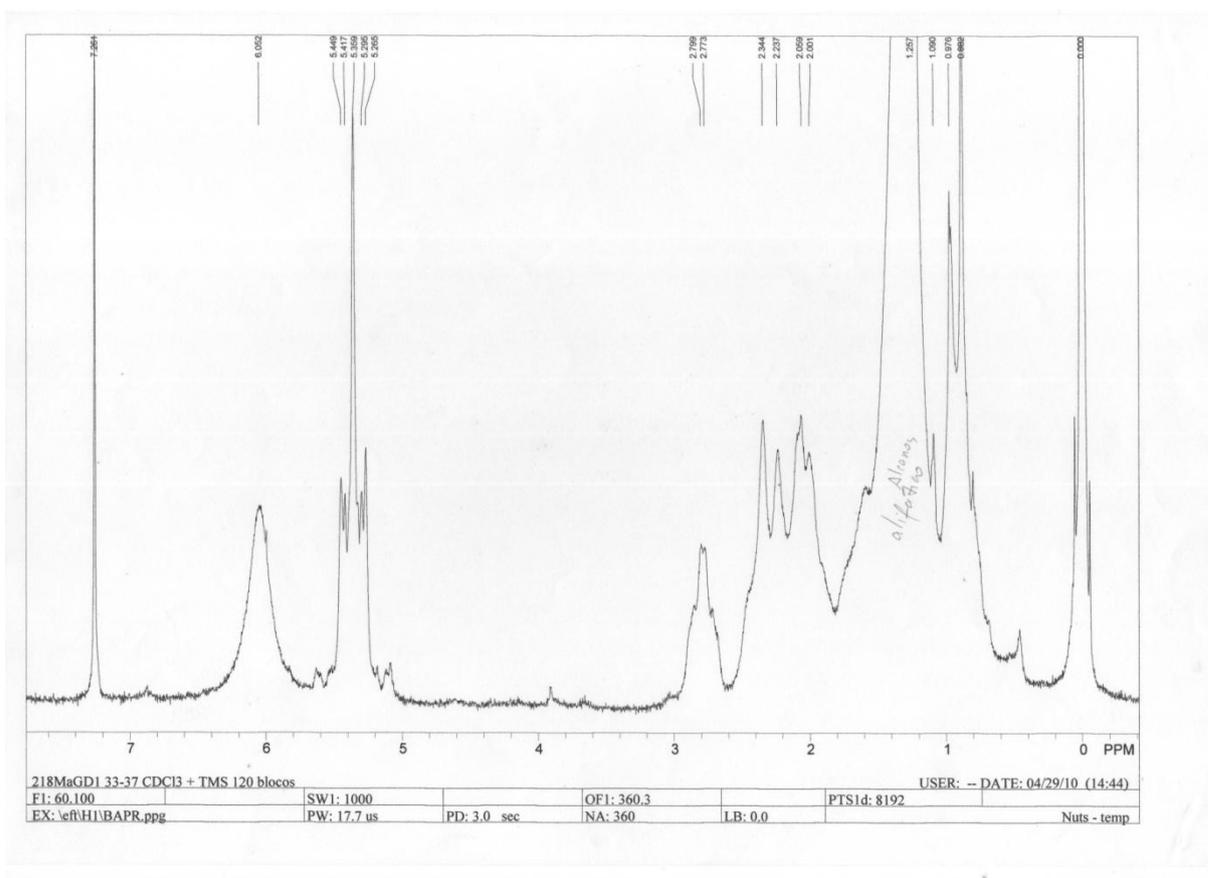
Apêndice 12 - Cromatograma da fração Cj.2.GD.1.30-32



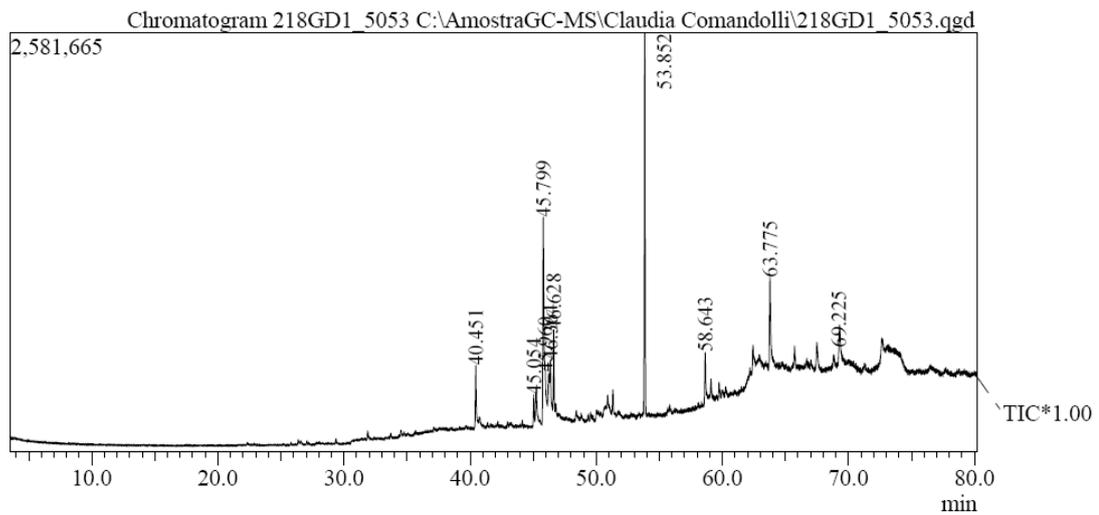
Apêndice 13 - Espectro de RMN de ^1H , 60 MHz, da fração Cj.2.GD.1.30-32



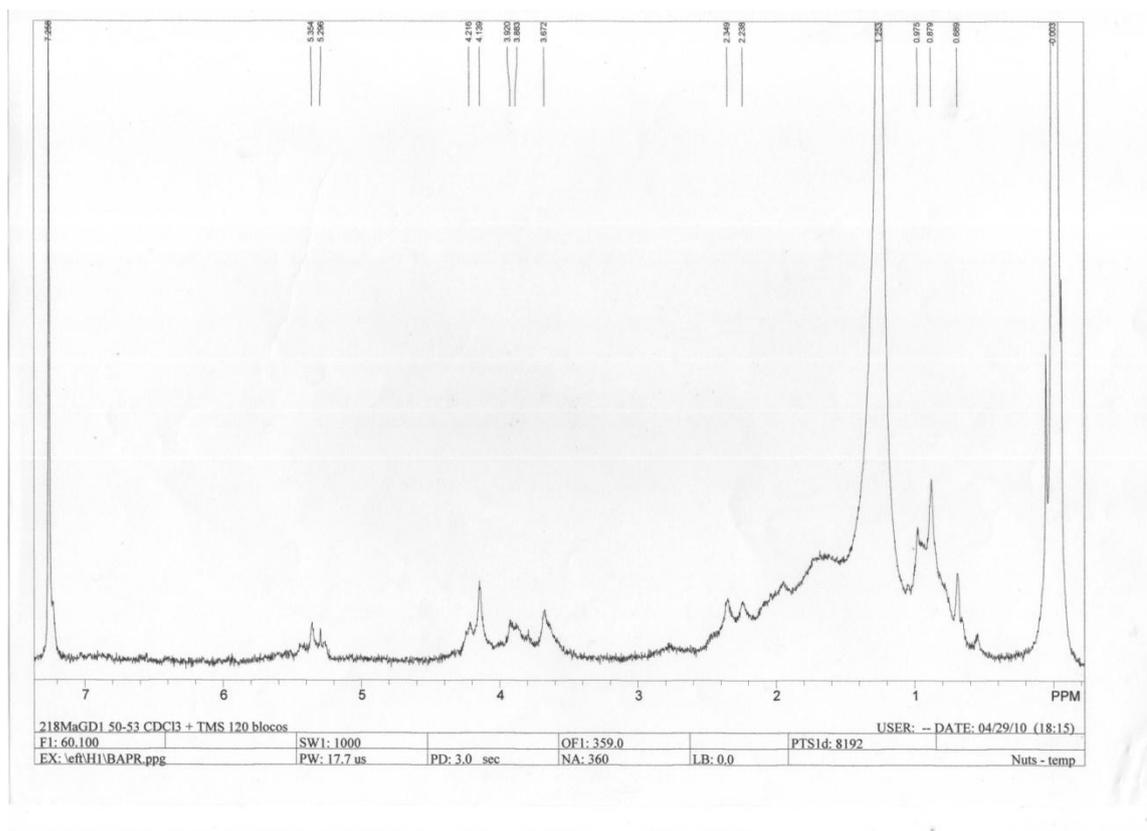
Apêndice 14 - Cromatograma da fração Cj.2.GD.1.33-37



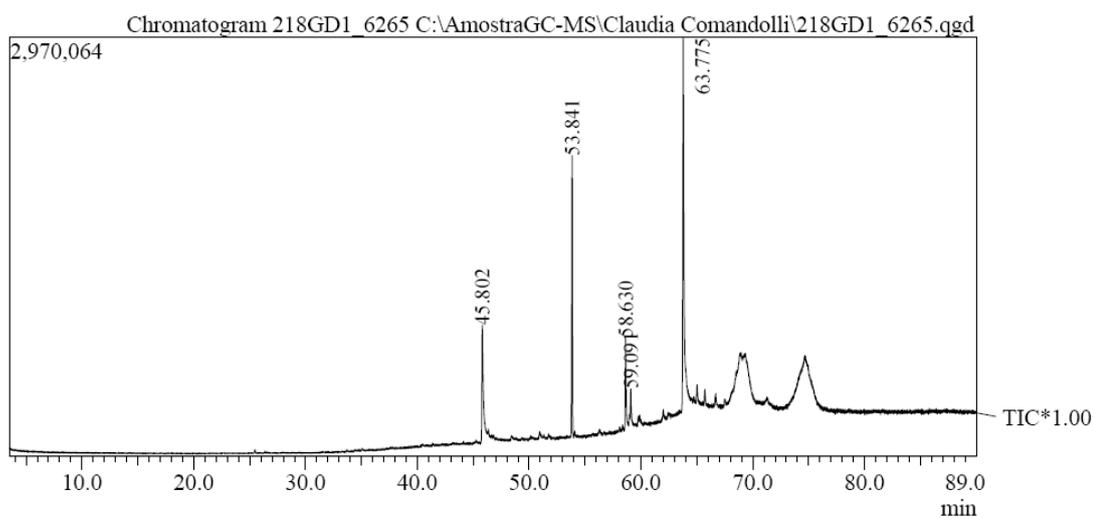
Apêndice 15 - Espectro de RMN de ¹H, 60 MHz, da fração Cj.2.GD.1.33-37



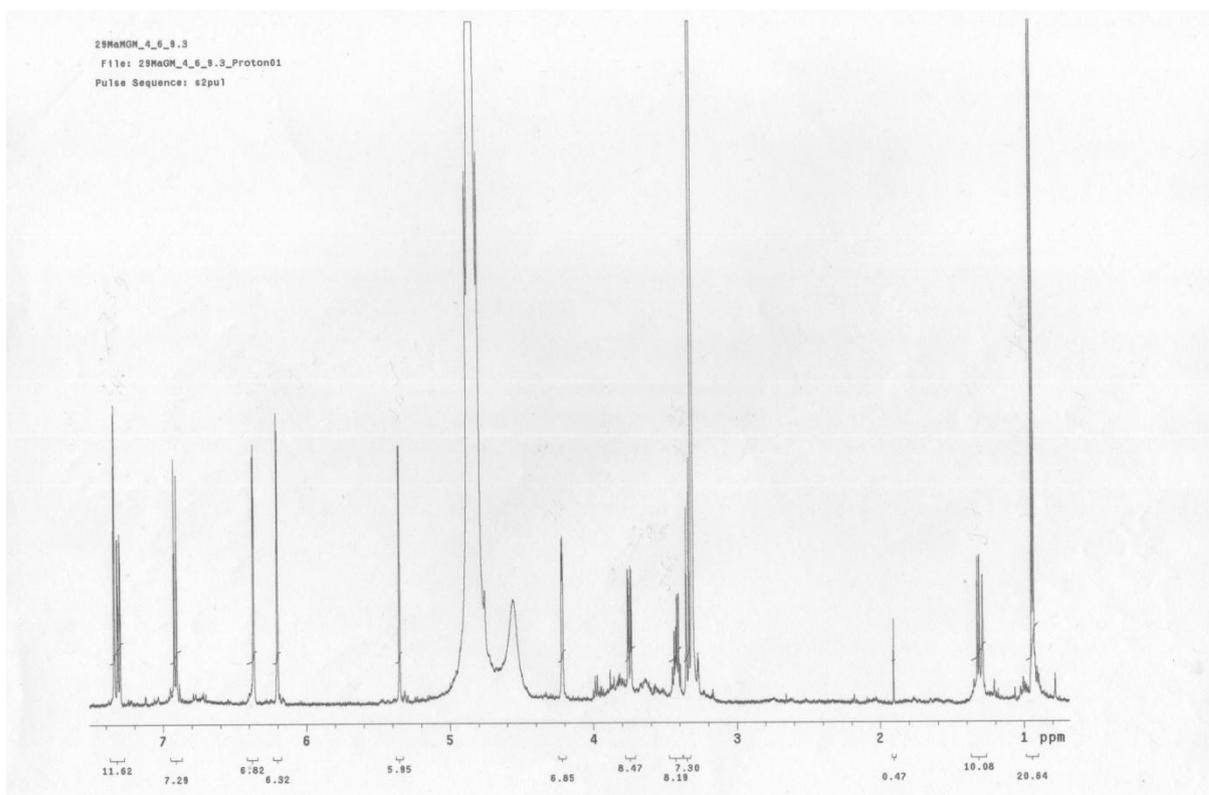
Apêndice 16 - Cromatograma da fração Cj.2.GD.1.50-53



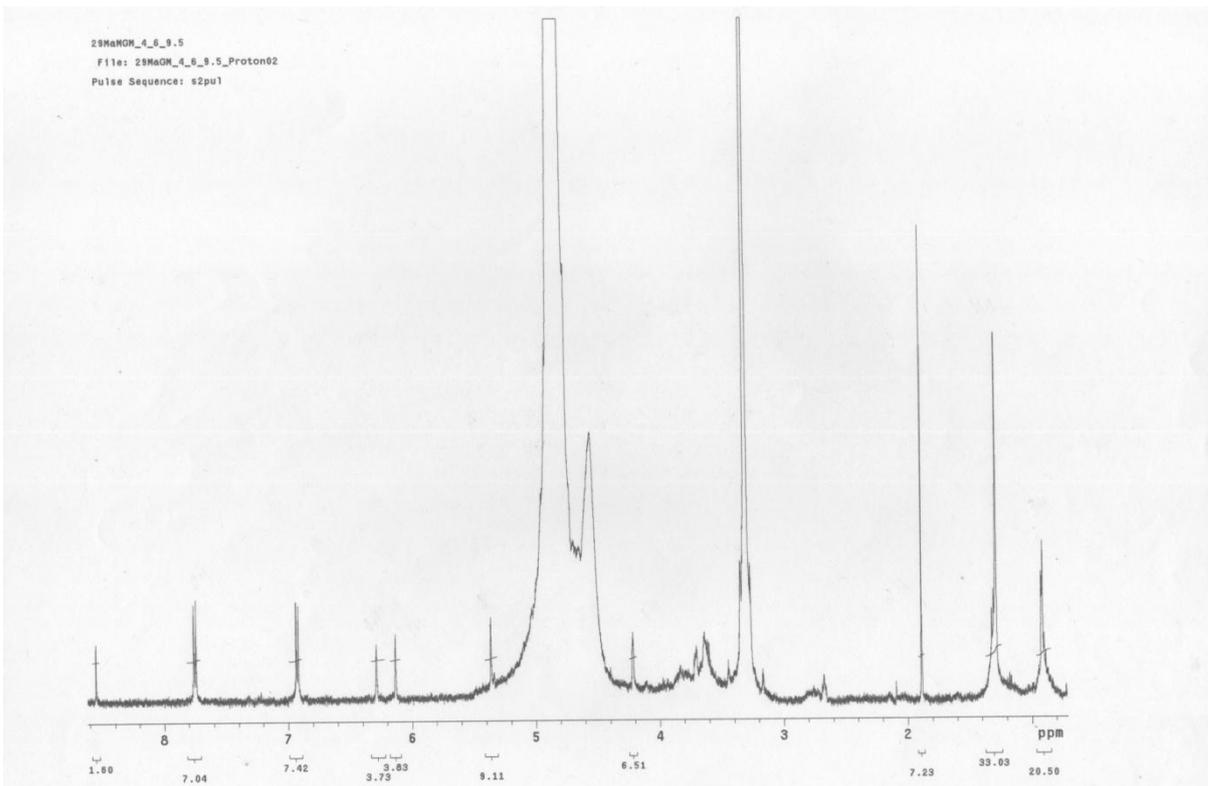
Apêndice 17 - Espectro de RMN de ^1H , 60 MHz, da fração Cj.2.GD.1.50-53



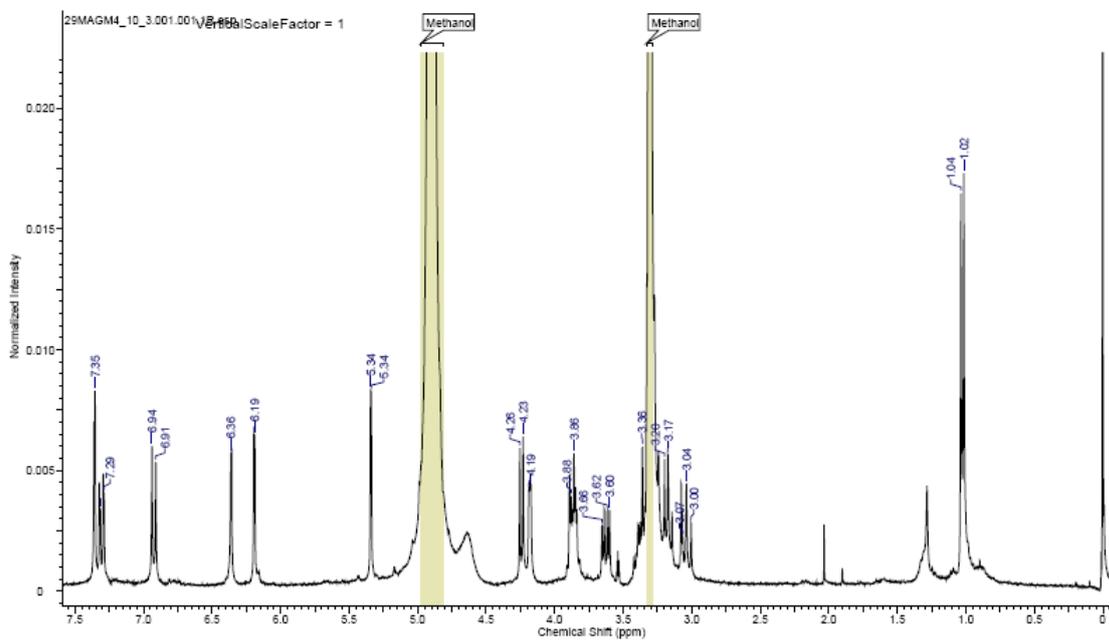
Apêndice 18 - Cromatograma da fração Cj.2.GD.1.62-65



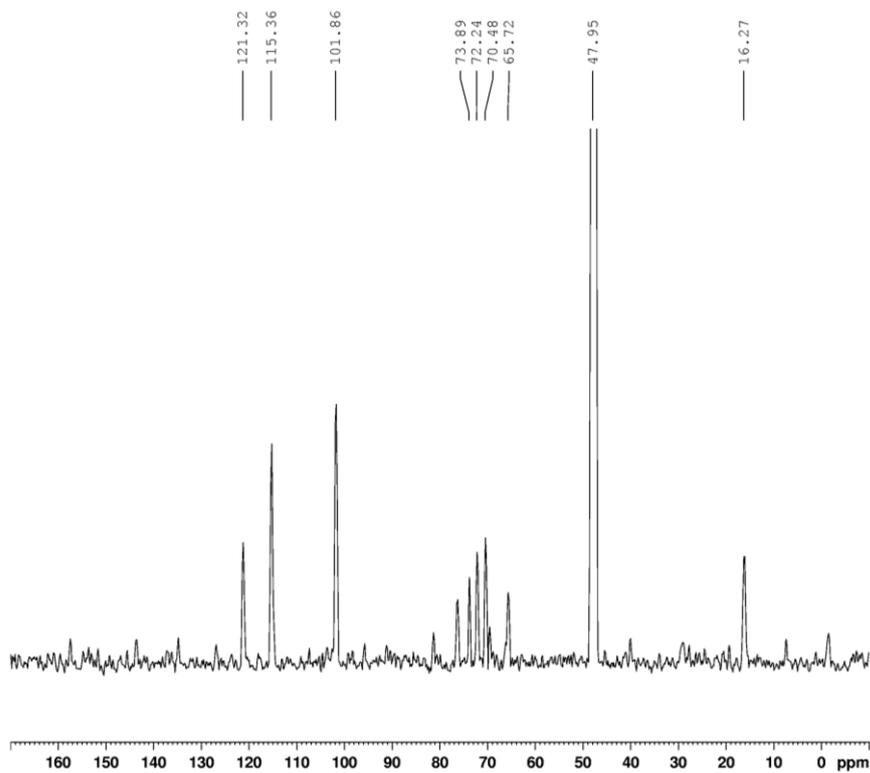
Apêndice 19 - Espectro de RMN de ^1H , 500 MHz, de 4.4-9.3



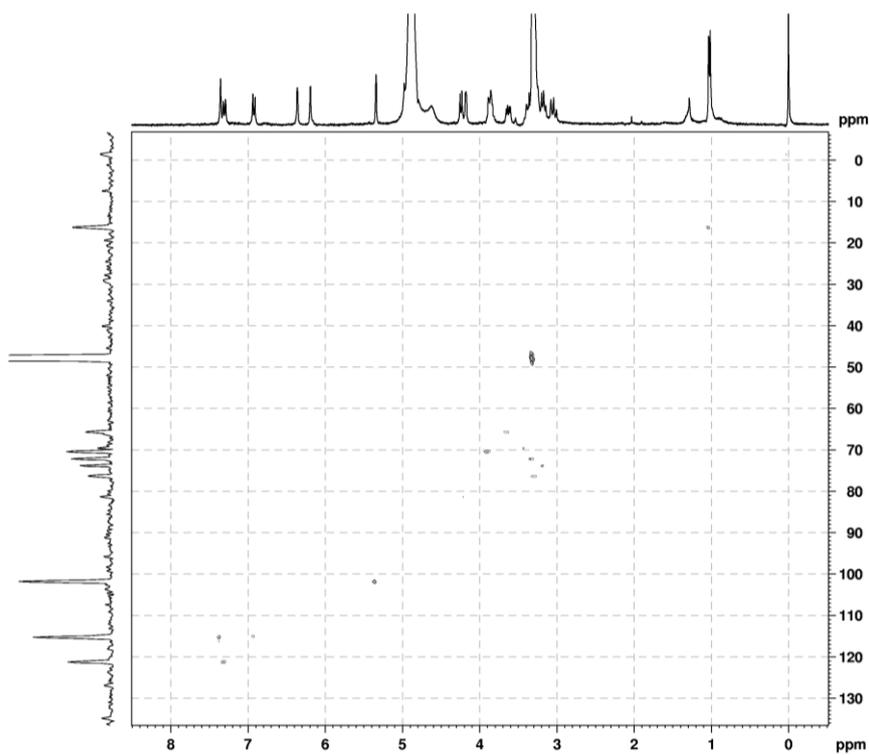
Apêndice 20 - Espectro de RMN de ^1H , 500 MHz, de 4.4-9.5



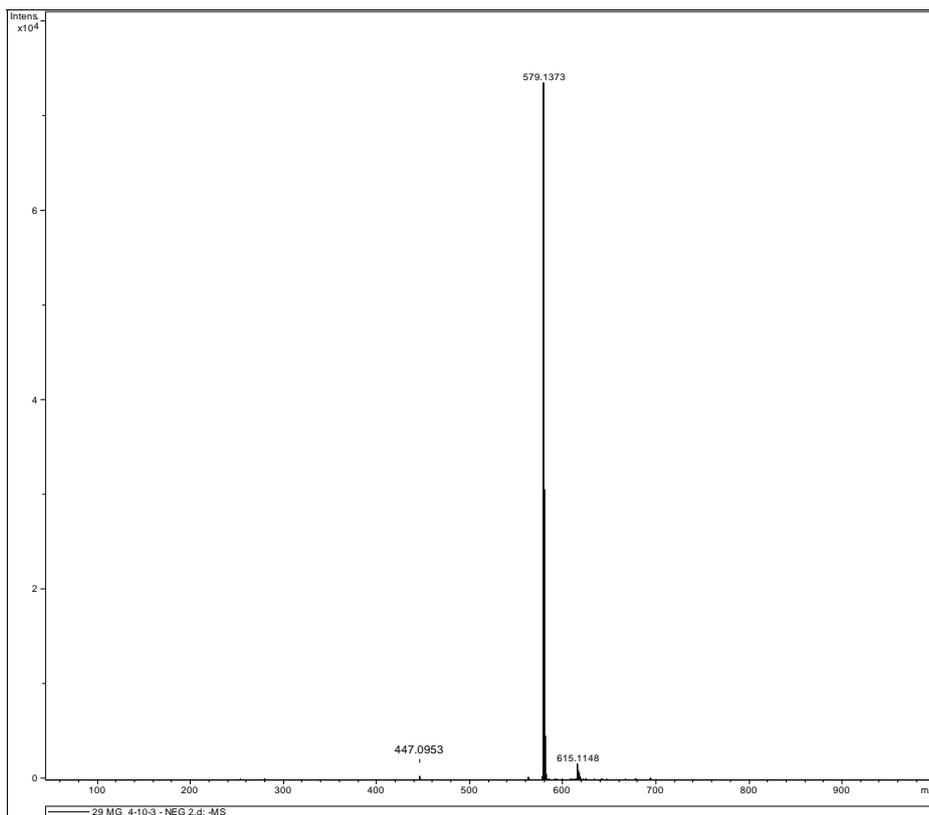
Apêndice 21 - Espectro de RMN de ^1H , 300 MHz, de 4.10.3



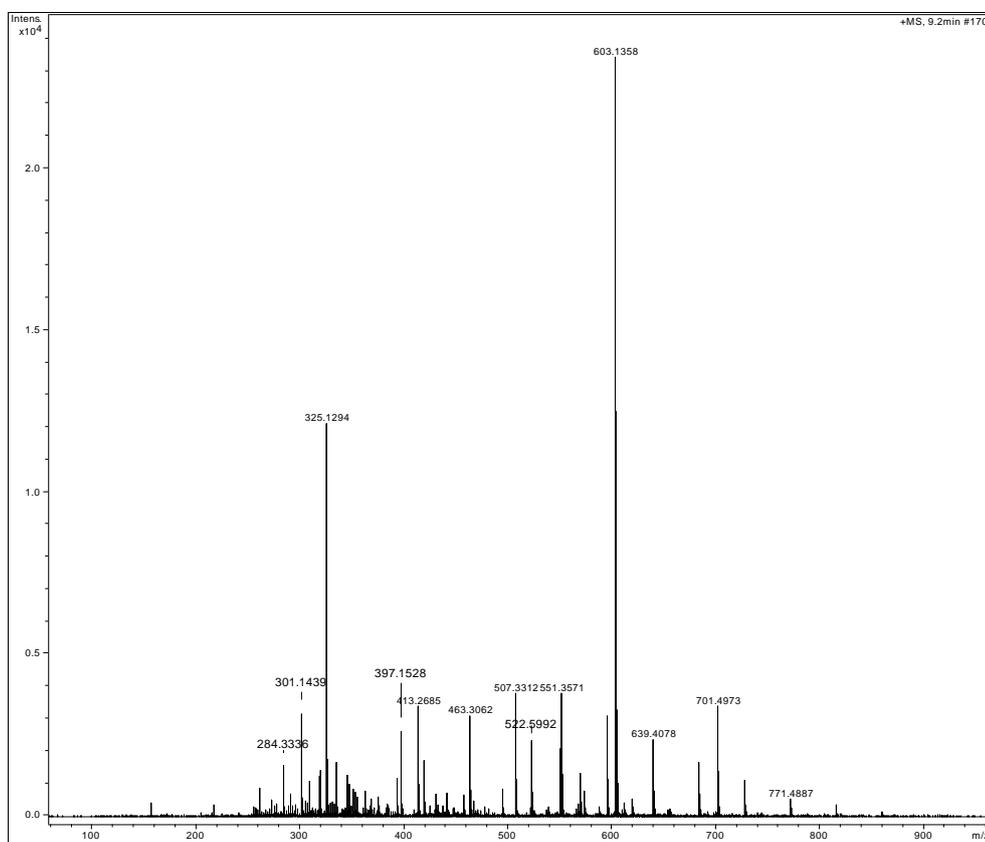
Apêndice 22 - Espectro de RMN de ^{13}C , 300 MHz, de 4.10.3



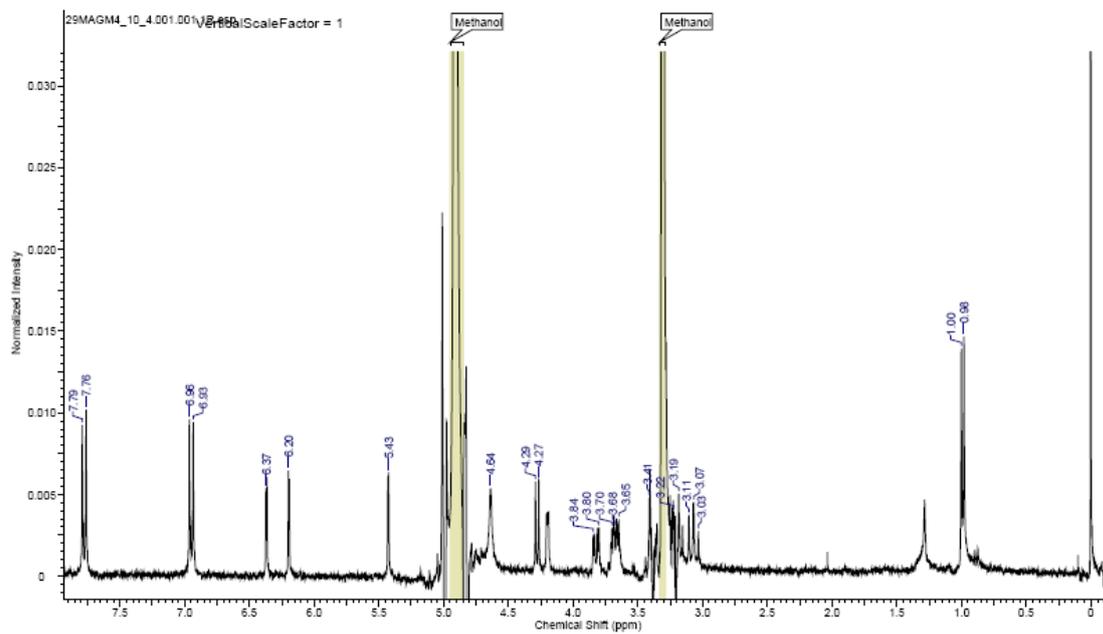
Apêndice 23 - Espectro de HMQC, 300 MHz, de 4.10.3



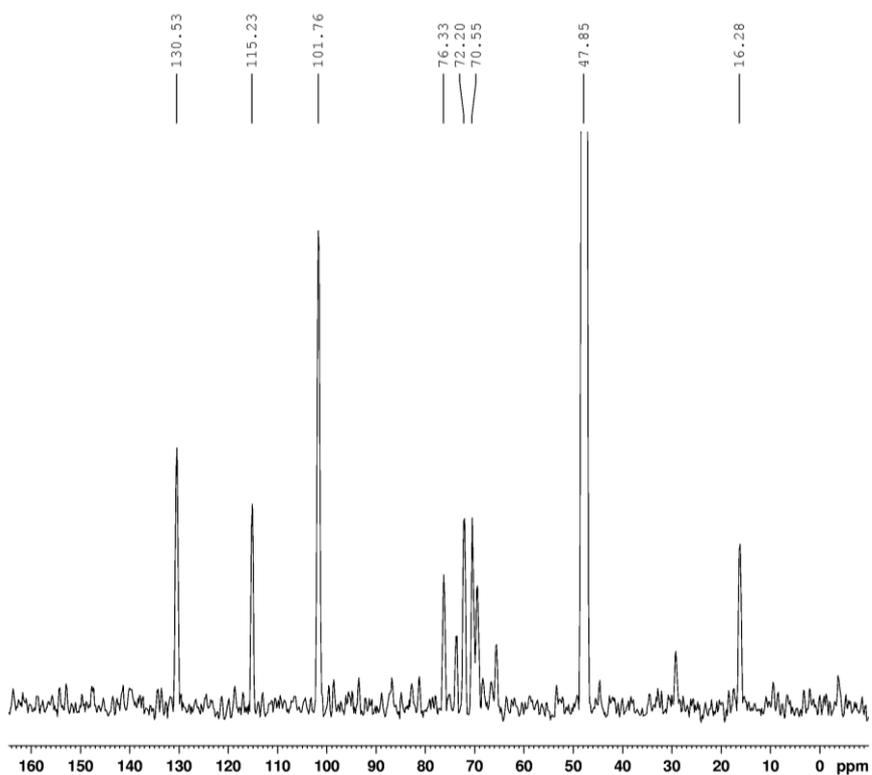
Apêndice 24 - Espectro de Massas, IES modo neg., de 4.10.3



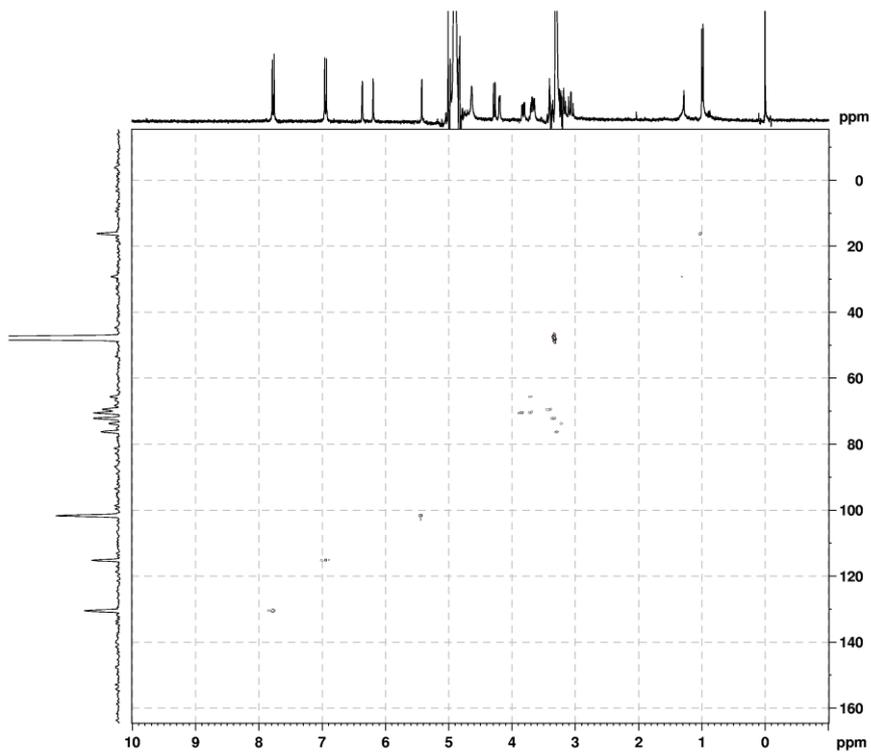
Apêndice 25 - Espectro de Massas, IES modo pos., de 4.10.3



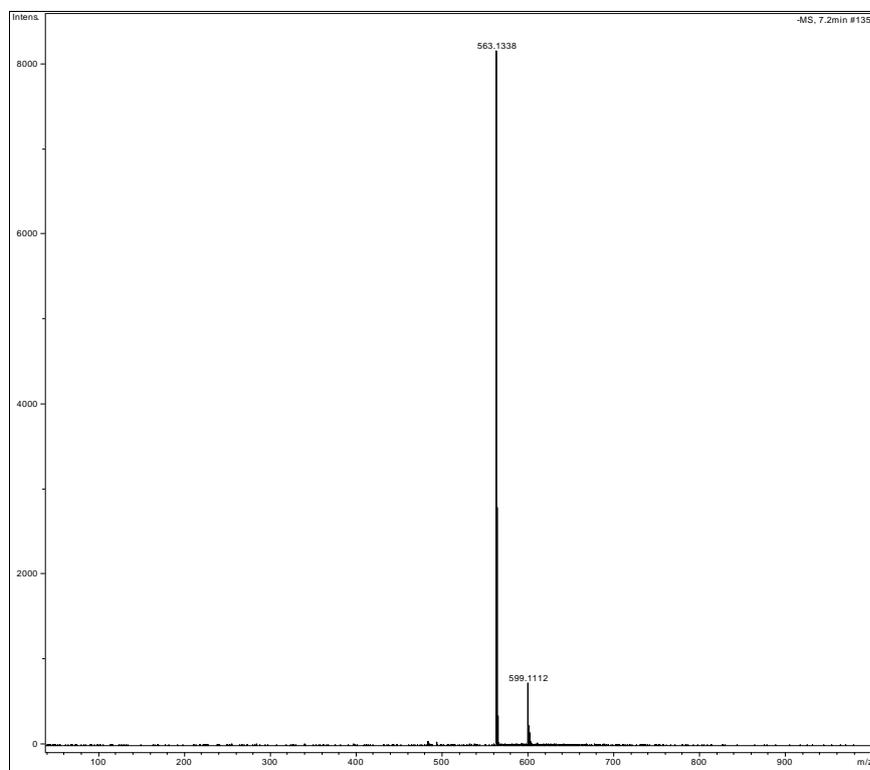
Apêndice 26 - Espectro de RMN de ^1H , 300 MHz, de 4.10.4



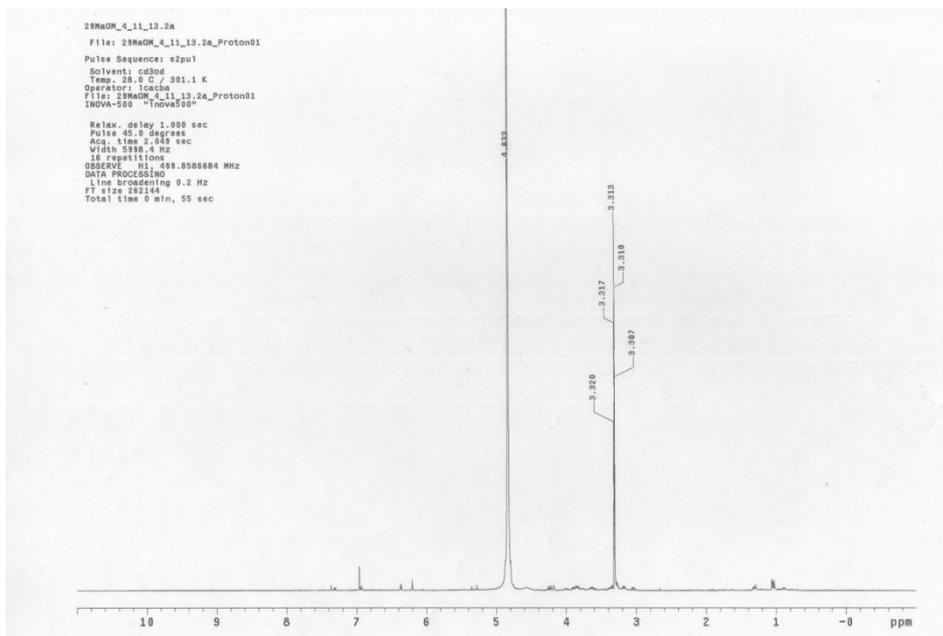
Apêndice 27 - Espectro de RMN de ^{13}C , 300 MHz, de 4.10.4



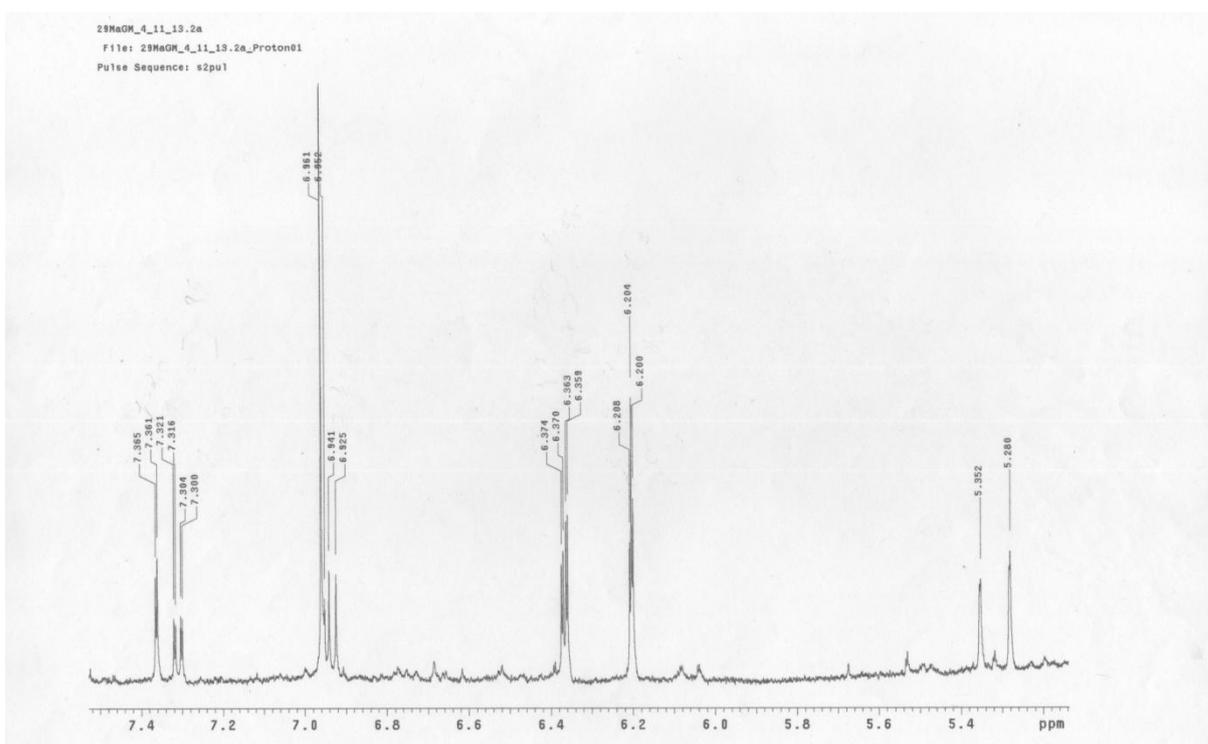
Apêndice 28 - Espectro de HMQC, 300 MHz, de 4.10.4



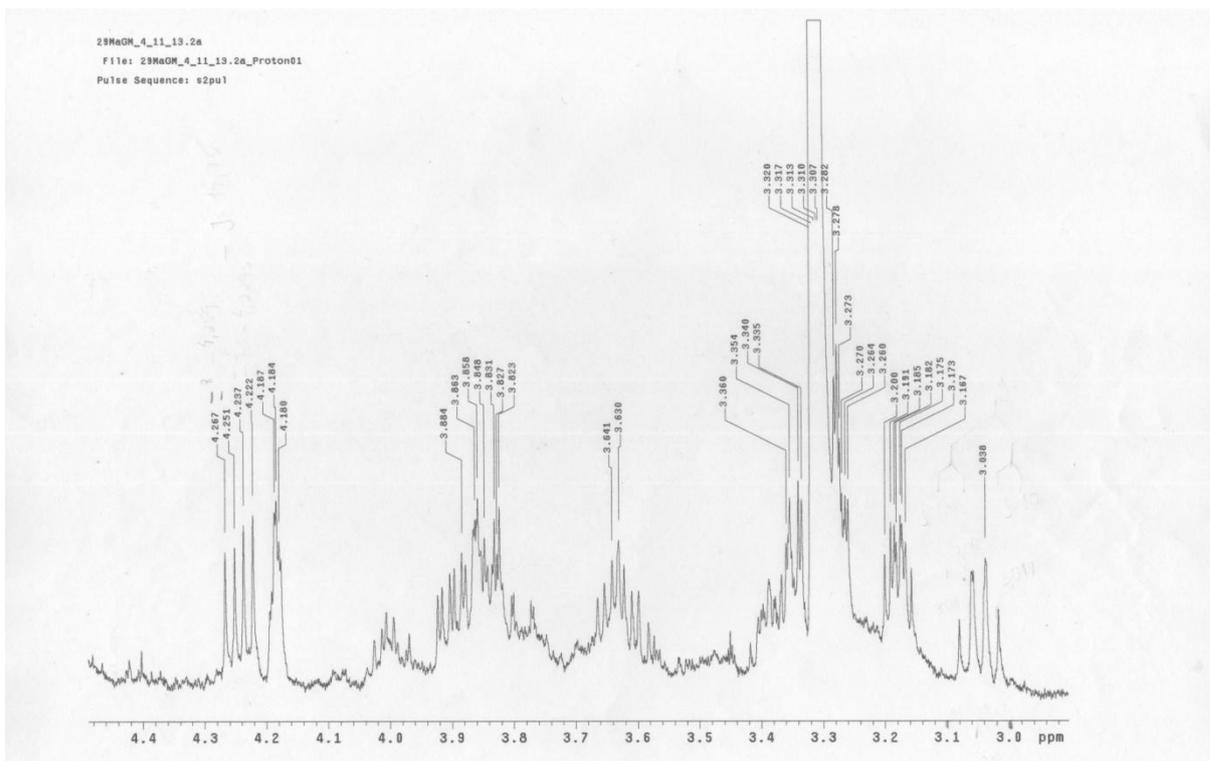
Apêndice 29 - Espectro de Massas, IES modo neg., de 4.10.4



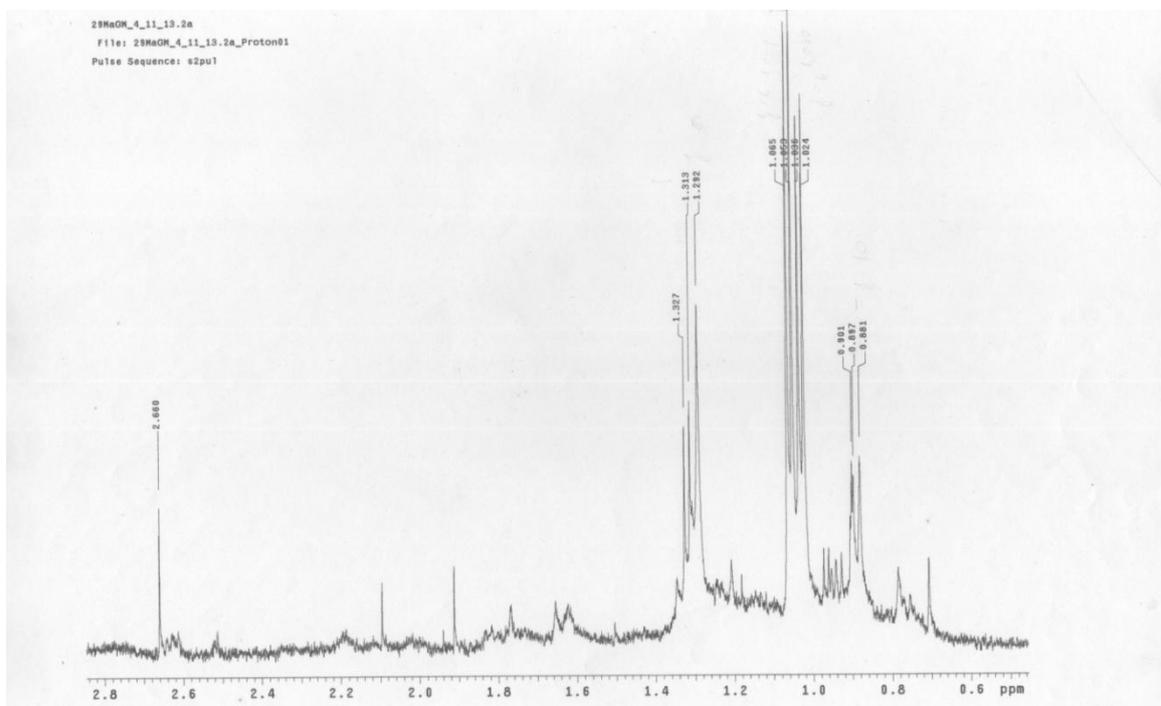
Apêndice 30 - Espectro de RMN de ^1H , 500 MHz de 4.11-13.2



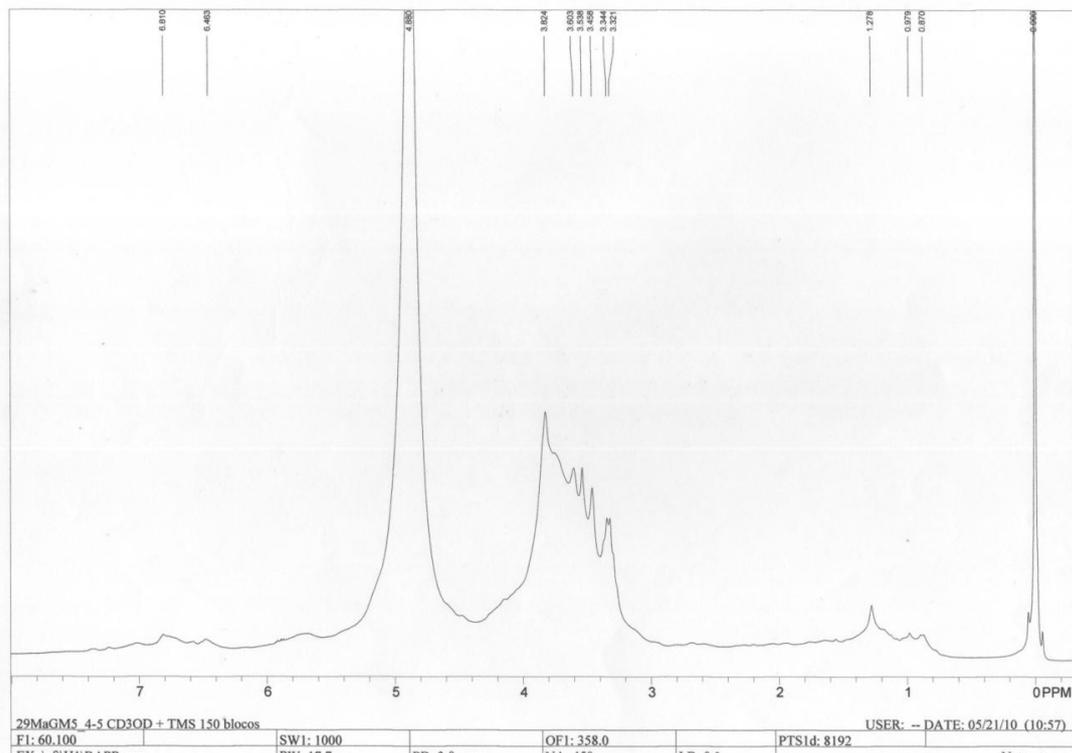
Apêndice 31 - Espectro de RMN de ^1H , 500 MHz de 4.11-13.2 (expansão)



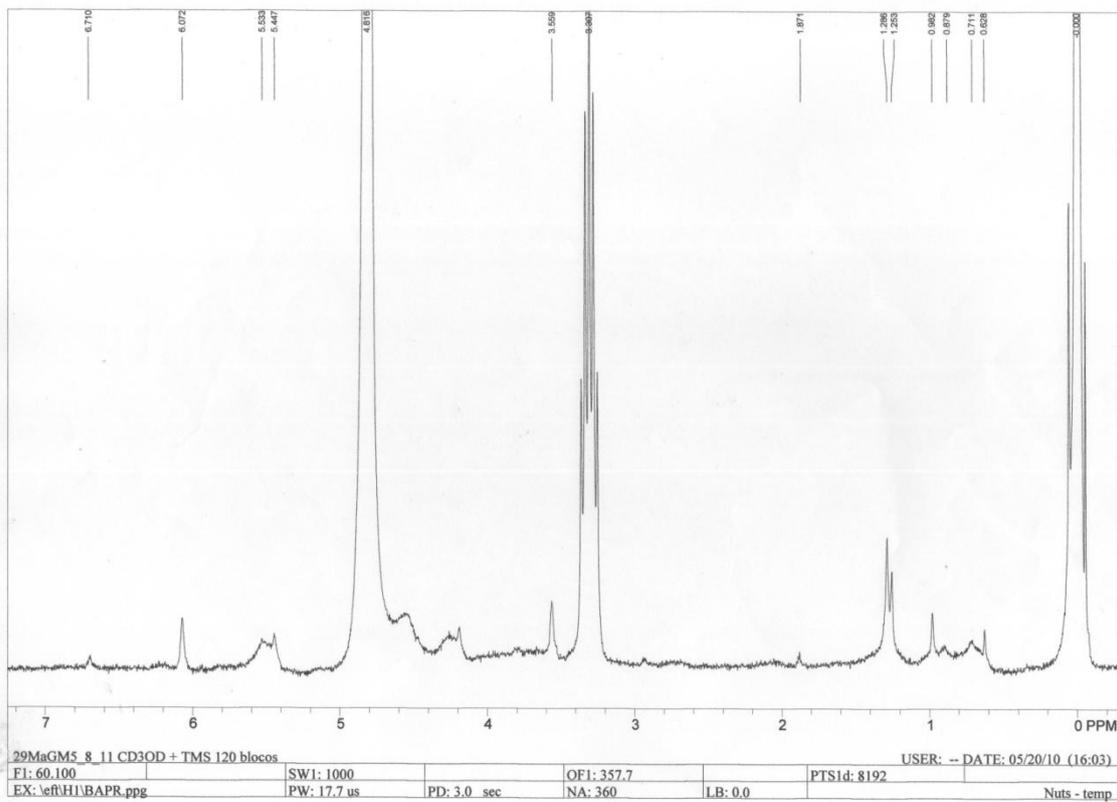
Apêndice 32 - Espectro de RMN de ^1H , 500 MHz, de 4.11-13.2 (expansão).



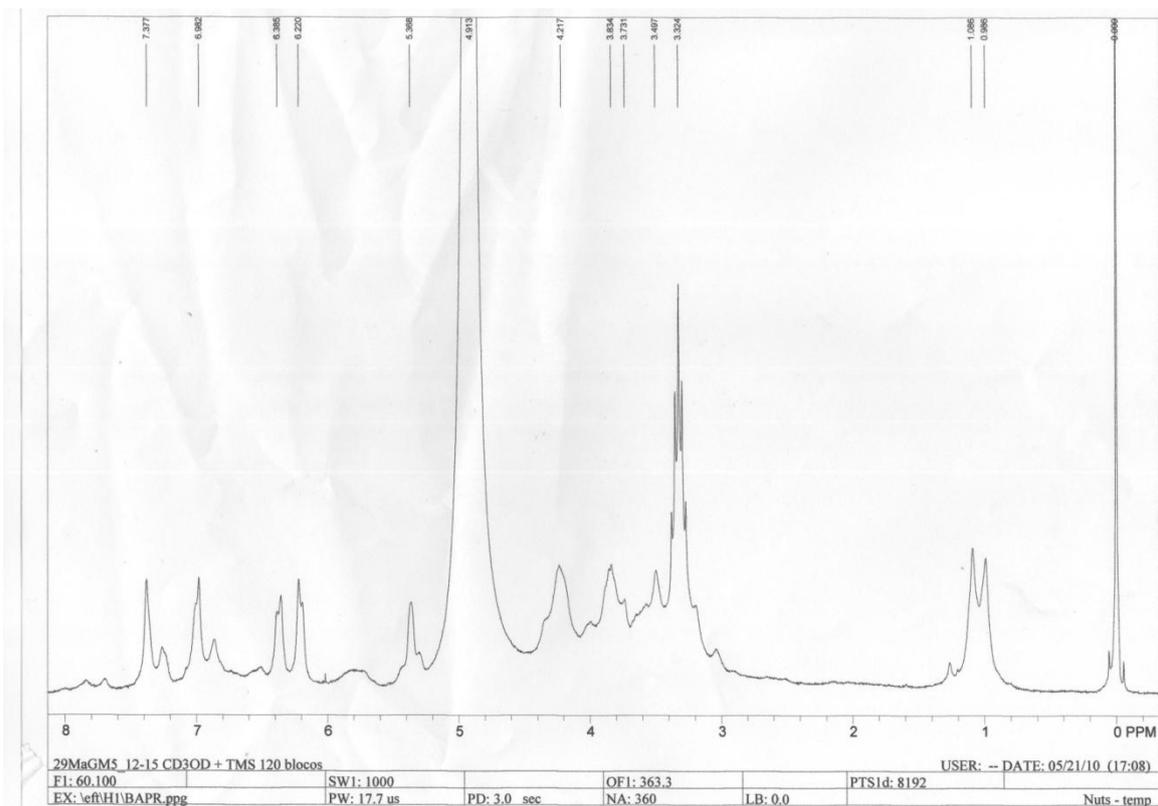
Apêndice 33 - Espectro de RMN de ^1H , 500 MHz, de 4.11-13.2 (expansão)



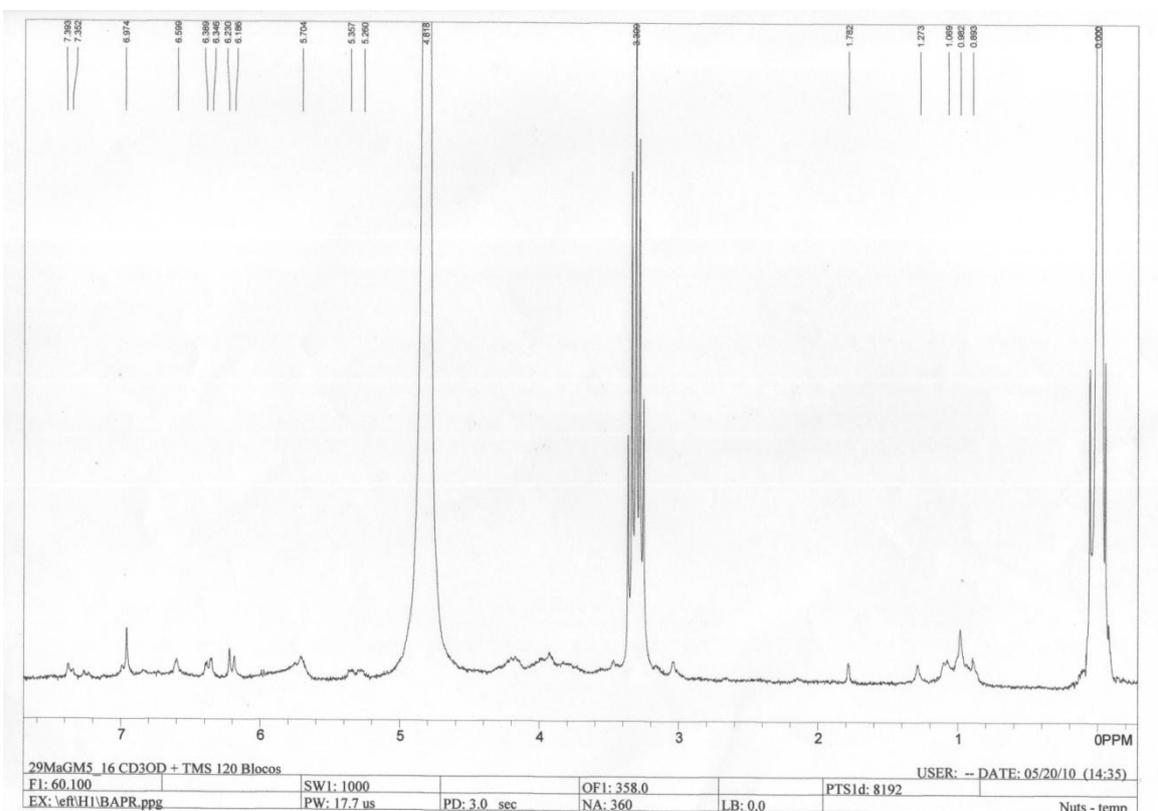
Apêndice 36 - Espectro de RMN de ^1H , 60 MHz, da fração Cj.1.GM.5.4-5



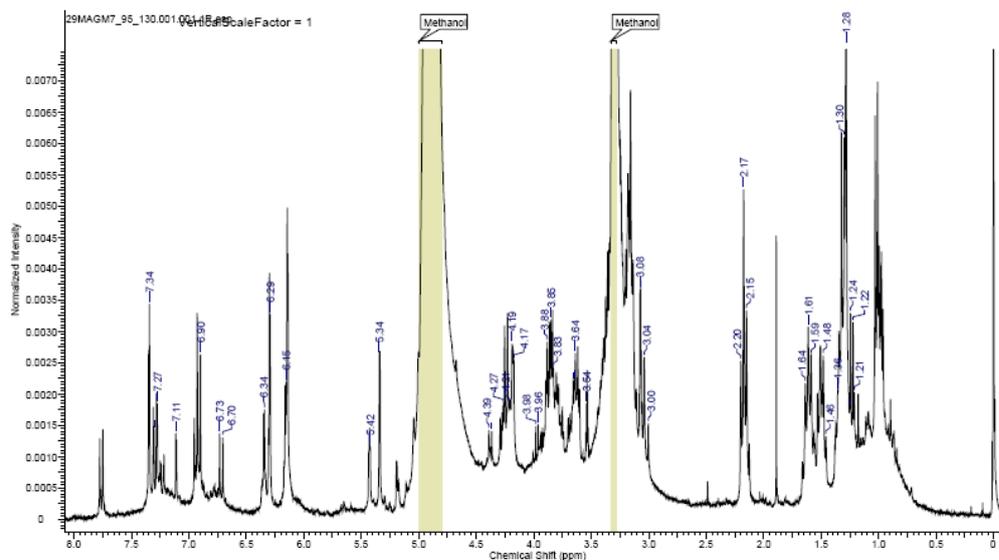
Apêndice 37 - Espectro de RMN de ^1H , 60 MHz, da fração Cj.1.GM.5.8-11



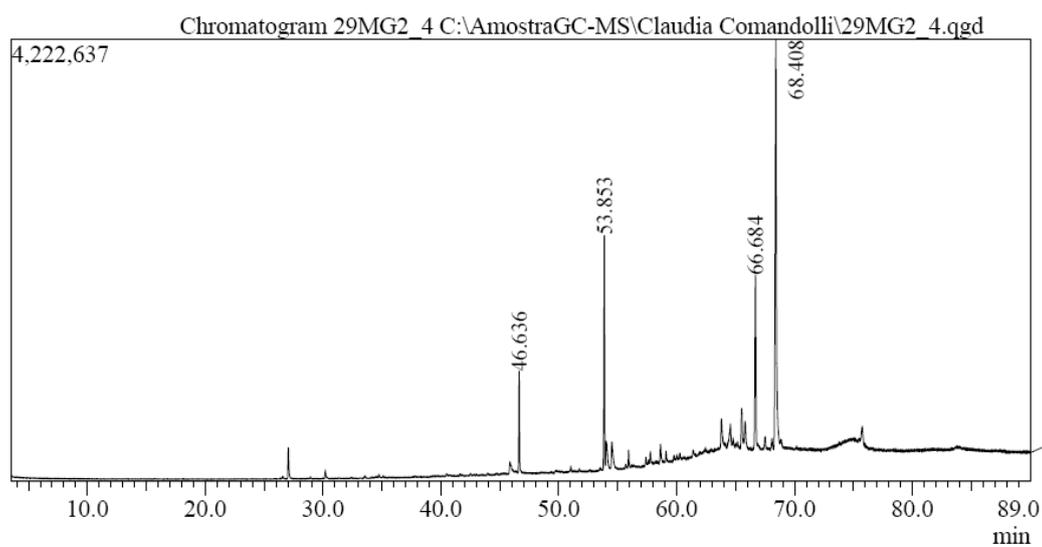
Apêndice 38 - Espectro de RMN de ^1H , 60 MHz, da fração Cj.1.GM.5.12-15



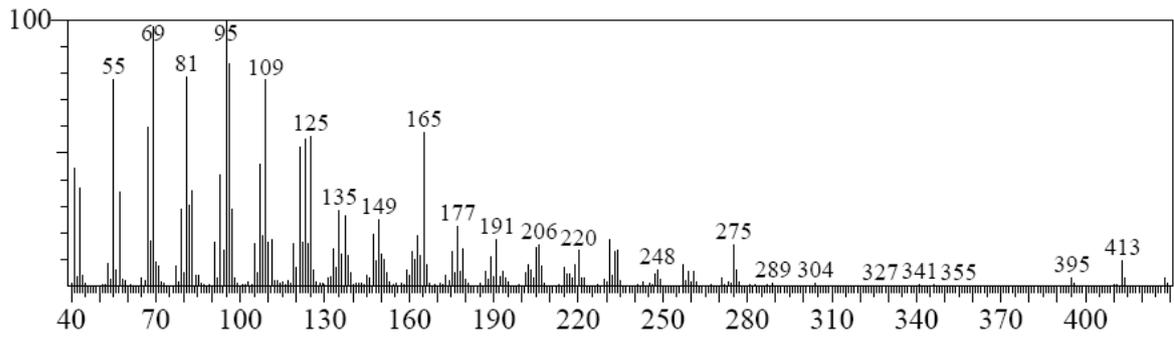
Apêndice 39 - Espectro de RMN de ^1H , 60 MHz, da fração Cj.1.GM.5.16



Apêndice 40 - Espectro de RMN de ^1H , 300 MHz, de 5.12-15.95-129



Apêndice 41 - Cromatograma da fração 29MaGM2-4.



Apêndice 42 - Espectro de Massas da fração 29MaGM4-2