

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Endopleura
uchi* Huber Cuatrecasas**

Magno Perêa Muniz

Manaus - Amazonas

Março - 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Magno Perêa Muniz

**Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Endopleura
uchi* Huber Cuatrecasas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química, com área de concentração em Química Orgânica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rita de Cássia Saraiva Nunomura

Manaus - Amazonas

Março - 2013

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Muniz, Magno Perêa

M966e Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Endopleura uchi* Huber Cuatrecasas / Magno Perêa Muniz. - Manaus: UFAM, 2013.

129 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Química) — Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

Orientadora: Prof^a. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura

1. Uxi-amarelo 2. *Endopleura uchi* 3. Fitoquímica 4. Anti-inflamatórios I. Nunomura, Rita de Cássia Saraiva (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (2007): 582.6/.9(043.3)

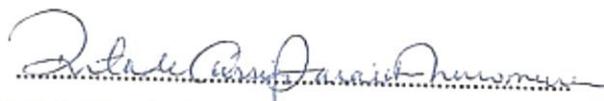
Magno Perêa Muniz

Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Endopleura uchi* Huber Cuatrecasas

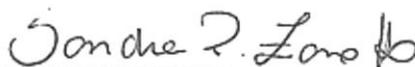
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química, com área de concentração em Química Orgânica.

Aprovado em 13 de Março de 2013.

BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. Rita de Cássia S. Nunomura – Presidente (UFAM)



Profª. Drª. Sandra Patrícia Zanotto – Membro (UEA)



Profª. Drª. Maria Lúcia Belém Pinheiro - Membro (UFAM).

*Dedico esse trabalho à minha família
por acreditar e me incentivar ao longo
dessa jornada, sou imensamente grato.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo seu amor e por toda sabedoria, bênçãos e proteção permitida;

Aos meus queridos pais Ivanir e Darcene pelo esforço e dedicação de todas as horas, a minha irmã Daynir pelas orações e encorajamento e meu sobrinho Lucas David pela alegria de sua chegada;

Aos meus tios Aroaldo e Gesimar e tias Jacineide e Darlene pelo imerso apoio e ajuda em todos os momentos e também aos demais familiares;

À minha orientadora Dra. Rita Nunomura pelo direcionamento, conhecimento adquirido, apoio, confiança e oportunidade e ao Dr. Sergio Nunomura pelo incentivo, dedicação e toda ajuda para a realização desse trabalho;

A todos os queridos amigos do LAPAAM e amigos da UFAM que fizeram parte desse processo, pela ajuda, troca de conhecimento, pelos cafezinhos, pelas crises compartilhadas e momentos de descontração;

Ao Prof. Dr. Emerson Silva Lima e seus alunos Patrícia e Arleilson da Faculdade de Farmácia - UFAM pela oportunidade de realizar os ensaios biológicos;

Ao Prof. Dr. Norberto Peoporine Lopes e ao Especialista José Carlos Tomaz (Farmácia-USP/Ribeirão Preto) pela obtenção dos espectros de massas;

À Prof. Caden Soucca, Wilma Felisbino e Maria do Carmo da Universidade Federal de São Paulo pela experiência de realizar o ensaio farmacológico da atividade antiúlcera;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química pela realização do curso de mestrado e aos professores pelo seu precioso tempo;

À agência de fomento CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

A espécie *Endopleura uchi*, da família Humiriaceae, nativa da Amazônia, é conhecida comumente como uxi-amarelo ou uxi-liso. O chá de suas cascas é popularmente indicado para inflamação uterina, urinária, e extremamente eficaz no tratamento específico de miomas e ovário policístico. Com base nas informações coletadas sobre o uso popular dessa espécie na região de Manaus, foi desenvolvida a investigação fitoquímica de *Endopleura uchi* que levou ao isolamento da friedelina, um triterpeno pentacíclico, e também da bergenina, um derivado do ácido gálico, conhecido por apresentar diversas atividades biológicas e por ser o principal componente na espécie. No presente estudo foi realizada a quantificação de bergenina em diferentes extratos de partes distintas da planta e também em amostras de cascas comerciais de *Endopleura uchi*. Os resultados dos extratos mostraram maior porcentagem de bergenina nos extratos metanólicos das cascas (CEM-1 = 4,17 % e CEM-2 = 4,75 %) seguido dos extratos das folhas e em menor quantidade nos extratos aquosos dos galhos (GEA-1 = 1,95 % e GEA-2 = 1,89%), indicando a bergenina como componente majoritário de *Endopleura uchi* e que pode estar relacionada às atividades biológicas indicadas popularmente para a espécie. Todas as amostras comerciais analisadas indicaram a presença de bergenina com porcentagens que variaram entre 0,20 % a 3,57 %, confirmando a autenticidade do material vegetal. Foi realizado a quantificação de fenólicos totais nos extratos pelo método de Folin–Ciocalteu, que revelou altos teores de compostos fenólicos entre 16,69 – 43,02 mg EAG/g de extrato seco. A avaliação da atividade antioxidante dos extratos pela redução de ferro variou de 230,43 a 567,89 mmol Fe⁺²/g de extrato seco e pelo sequestro de radicais de DPPH variou entre CS₅₀ = 12,04 a 24,20 µg/mL. O ensaio para avaliação da atividade antiúlcera das frações acetato de etila e clorofórmica das folhas evidenciaram efeitos preventivos das ulcerações tanto quanto o controle positivo. O ensaio anti-inflamatório dos extratos aquosos e frações de *Endopleura uchi* pela inibição de óxido nítrico (NO[•]) apresentaram capacidade de inibição significantes, sendo o melhor resultado atribuído à fração clorofórmica das folhas com IC₅₀ = 3,2 µg/mL. Os resultados obtidos das folhas, galhos e cascas revelam a espécie *Endopleura uchi* com amplo valor terapêutico pela presença de compostos antioxidantes e por sua capacidade anti-inflamatória e antiúlcera, possibilitando o uso popular mais seguro dessa espécie vegetal e para a contribuição do desenvolvimento de possíveis produtos fitoterápicos ou até de novos fármacos.

Palavras-Chave: uxi-amarelo, anti-inflamatório, quantificação, bergenina.

ABSTRACT

The species *Endopleura uchi*, Humiriaceae family, native to the Amazon, is commonly known as uxi-amarelo or uxi-liso. The tea from its bark is popularly referred to uterine inflammation, urinary, and extremely effective in treating specific fibroids and polycystic ovary. Based on information collected about the popular use of this species in the region of Manaus, the study was conducted to obtain the phytochemical investigation of *Endopleura uchi* which led to the isolation of friedelin, a pentacyclic triterpene, and also bergenin, a gallic acid derivative, known to have various biological activities and is the main component in the species. In the present study were quantified bergenin in different extracts of different parts of the plant and also in commercial bark *Endopleura uchi*. The result showed a higher percentage of Bergenin in methanol extracts of bark (CEM-1 = 4.17% and CEM-2 = 4.75%) followed by extracts of leaves and in lower concentrations in aqueous extracts of twigs (GEA-1 = 1.95% and GEA-2 = 1.89%), bergenin as indicating the major component *Endopleura uchi* and that may be related to biological activities popularly given to the species. All samples analyzed showed the presence of bergenin with percentages ranging from 0.20% to 3.57%, confirming the authenticity of the plant material. Was also performed quantification of total phenolics by Folin-Ciocalteu, which revealed high levels of phenolic compounds from 16.69 to 43.02 mg GAE/g dry extract. This evaluation of the antioxidant activity by reducing iron ranged from 230.43 to 567.89 mmol Fe⁺²/g of dry extract and the scavenge of radical DPPH ranged from CS₅₀ = 12.04 to 24.20 µg/ml. The test for evaluation of antiulcer activity of the fractions ethyl acetate and chloroform leaves showed preventive effects of ulcerations as much as the positive control. The anti-inflammatory assay of aqueous extracts and fractions of *Endopleura uchi* by inhibition of nitric oxide (NO[•]) showed significant inhibition capacity, the best result being attributed to chloroform fraction of the leaves with IC₅₀ = 3.2 µg/mL. The results obtained from the leaves, twigs and bark species *Endopleura uchi* with great therapeutic value by the presence of antioxidant compounds and their ability anti-inflammatory and antiulcer, enabling the use of this popular safer plant species and the possible contribution to the development of herbal products or news drugs.

Keywords: uxi-amarelo, inflammatory, quantification, bergenin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos gêneros da família Humiriaceae.	4
Figura 2. Árvore (A), casca (B), tronco (C), frutos (D) e folhas (F) de <i>Endopleura uchi</i>	6
Figura 3. Frutos de <i>Endopleura uchi</i>	7
Figura 4. Casca comercial (A) e tronco com casca retirada (B) de <i>Endopleura uchi</i> . ..	8
Figura 5. Metabólitos isolados de <i>Endopleura uchi</i>	11
Figura 6. Bergenina (1).	13
Figura 7. Fracionamento líquido-líquido dos extratos metanólicos.	31
Figura 8. Reação de redução do reagente Folin-Ceocalteu pelo ácido gálico.	42
Figura 9. Reação entre o radical livre (DPPH) e o antioxidante.	44
Figura 10. Reação de redução do complexo de Fe(III) para Fe(II).	45
Figura 11. Procedimento da atividade antiúlcera <i>in vivo</i>	48
Figura 12. Ampliação na região de δ 0,70 a 1,2 do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) referentes às metilas.	50
Figura 13. Ampliação na região de δ 6,0 a 35,5 do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD).	51
Figura 14. Ampliação na região de δ 109,9 a 151,1 do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) e ampliação de espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) na região de δ 7,15 a 7,05 da substância 1 (bergenina).	54
Figura 15. α -D-glicopirranose.	55
Figura 16. Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da região de δ 5,20 a 4,75.	55
Figura 17. Deslocamentos químicos de RMN ^1H ^{13}C da região glicosídica da substância 1 (bergenina).	56
Figura 18. Correlação de COSY dos hidrogênios referentes ao anel glicosídico da substância 1 (bergenina).	57
Figura 19. Ampliação da região de δ 4,1 a 3,2 do espectro de RMN de ^1H da substância 1 (bergenina). (500 MHz, CD_3OD).	58
Figura 20. Ampliação do Mapa de contorno COSY dos hidrogênio referentes a unidade glicosídica da da substância 1 (bergenina).	59

Figura 21. (A) método desenvolvido por Nunomura <i>et al.</i> , (2009); (B) método desenvolvido neste trabalho.....	64
Figura 22. Absorções máximas de bergenina e do solvente.	64
Figura 23. Curva analítica de bergenina obtida da análise <i>inter-day</i>	66
Figura 24. Cromatogramas do extrato metanólico das cascas de época seca.	67
Figura 25. Cromatograma obtido da amostra referência coletada na Reserva Ducke.	70
Figura 26. Porcentagem de bergenina nas amostras comerciais.....	71
Figura 27. Cromatograma expandido em 215 nm da amostra de referência das cascas de <i>Endopleura uchi</i>	72
Figura 28. Cromatograma expandido em 215 nm da amostra das cascas de <i>Endopleura uchi</i> com <i>U. tomentosa</i> (UUG).	72
Figura 29. Cromatogramas das amostras que apresentaram o tempo de retenção próximo a 9,906 característico da amostra de <i>Endopleura uchi</i> com <i>U. tomentosa</i> ..	73
Figura 30. Curva analítica de ácido gálico para quantificação de compostos fenólicos.	74
Figura 31. Gráfico da quantificação dos fenólicos nos extratos.....	75
Figura 32. Curva analítica de sulfato ferroso.	78
Figura 33. Gráfico da atividade antioxidante dos extratos.....	79
Figura 34. Gráfico da %CS em função da concentração de quercertina.	81
Figura 35. Gráfico da capacidade de sequestro de 50 % de radicais livres dos extratos.	82
Figura 36. Efeito da concentração em 25 µg/mL dos extratos e frações de <i>Endopleura uchi</i> na produção de NO em cultura de macrófagos estimulados por LPS. Os valores são expressos em média ± desvio padrão, obtido a partir de análises em triplicata (n=3).	85
Figura 37. Capacidade inibitória (IC ₅₀) de NO [•] induzido por LPS em macrófagos murinos J774 dos extratos e frações na produção). Os dados são representados por média ± desvio padrão.	86
Figura 38. Resultado da atividade antiúlcera das amostra FEM-1- AcOEt (1) e FEM-1-CHCl ₃ (2).....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Algumas atividades biológicas da Bergenina.....	14
Tabela 2. Distribuição de bergenina em espécies de plantas de famílias diferentes relacionadas na literatura.....	15
Tabela 3. Rendimento dos extratos metanólicos de <i>Endopleura uchi</i>	30
Tabela 4. Rendimento dos extratos aquosos de <i>Endopleura uchi</i>	30
Tabela 5. Rendimento dos extratos etanólicos de <i>Endopleura uchi</i>	31
Tabela 6. Rendimentos das partições líquido-líquido dos extratos metanólicos da época de chuva.....	32
Tabela 7. Deslocamentos químicos observados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 7 (friedelina) em CDCl ₃	52
Tabela 8. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) da substância 1 (bergenina) em CD ₃ OD.....	60
Tabela 9. Erro dos adutos formados.....	61
Tabela 10. Média das áreas obtidas das análises das diferentes concentrações do padrão em três dias diferentes no comprimento de onda em 272 nm.....	65
Tabela 11. Áreas das concentrações obtidas das análises <i>inter-day</i> em 272 nm....	66
Tabela 12. Equações das retas obtidas em comprimentos de ondas diferentes e seus respectivos limites de detecção e quantificação.....	67
Tabela 13. Resultado da quantificação de bergenina nas cascas, galhos e folhas de <i>Endopleura uchi</i>	68
Tabela 14. Resultado da quantificação de bergenina em amostras de cascas comerciais de <i>Endopleura uchi</i>	70
Tabela 15. Absorbâncias das amostras de ácido gálico para construção da curva analítica.....	74
Tabela 16. Quantificação dos fenólicos totais nos extratos de <i>Endopleura uchi</i>	75
Tabela 17. Absorções obtidas das soluções padrão de sulfato ferroso.....	78
Tabela 18. Atividade antioxidante dos extratos de <i>Endopleura uchi</i> pela redução de ferro.....	79
Tabela 19. Valores da CS ₅₀ dos extratos aquosos, metanólicos e etanólicos de <i>Endopleura uchi</i>	82

Tabela 20. Valores de NO• produzidos em 4 concentrações de extratos e frações de *Endopleura uchi*, controle positivo (sem LPS) e negativo (com LPS). Os dados são representados por média ± desvio padrão.84

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Formação do precursor dos triterpenos.....	18
Esquema 2. Biossíntese de alguns triterpenos.....	19
Esquema 3. Biossíntese da friedelina (7)	21
Esquema 4. Biossíntese de algumas substâncias fenólicas pela rota do ácido chiquímico e também pela combinação com a via do acetato	23
Esquema 5. Biossíntese de compostos fenólicos simples pela via do acetato.....	24
Esquema 6. Processo de separação cromatográfica dos cristais impuros obtidos da fração em acetado de etila do extrato metanólico das cascas (A), galhos (B) e folhas (C) dos de <i>Endopleura uchi</i>	35
Esquema 7. Separação cromatográfica da fração clorofórmica dos galhos (A) e folhas (B) de <i>Endopleura uchi</i>	37
Esquema 8. Pré-tratamento dos extratos para análise em CLAE.	39
Esquema 9. Processo de extração e pré-tratamento das amostras comerciais de <i>Endopleura uchi</i>	41
Esquema 10. Proposta para as principais fragmentações da bergenina.....	62

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro completo de RMN ^1H (500 MHz MeOD) da bergenina.....	105
Anexo 2. Espectro completo de RMN ^{13}C (125 MHz MeOD) da bergenina.....	106
Anexo 3. Espectro de massas por <i>Eletrospray</i> em modo positivo de bergenina. ...	107
Anexo 4. Espectro de ESI-MS/MS do pico 329 referente ao adulto protonado da molécula de bergenina.	108
Anexo 5. Espectro de RMN ^1H (500 MHz CDCl_3) da friedelina	109
Anexo 6. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz CDCl_3) da friedelina	110

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA% - Atividade antioxidante em porcentagem
- CBA - Centro de Biotecnologia da Amazônia
- CDCl_3 – Clorofórmio deuterado
- CD_3OD – Metanol deuterado
- CLAE - Cromatografia de Líquida de Alta Eficiência
- COX-1 - Ciclooxigenase 1
- COX-2 - Ciclooxigenase 2
- CS_{50} – capacidade de sequestro de 50 %
- CG-MS- Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
- CV% - Coeficiente de variância
- DPPH – Radical 1,1-difenil-2-picril hidrazil
- δ - Deslocamento químico
- d – dubleto
- dd - duplo dubleto
- EM – Espectrometria de massas
- ERO - Espécies reativas de oxigênio
- ERN - Espécies reativas de nitrogênio
- ESI – Electrospray
- FPP - Pirofosfato de farnesila
- FRAP - Ferric Reducing Power Assay
- INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
- IV – Infravermelho
- J – Constante de acoplamento
- LPS - Lipolissacarídeo
- m – Múltiplo
- MeOH – Metanol
- Me – Metila
- NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reduzido)
- NP-PEG - Difenilaminoborato-polietilenoglicol
- IC_{50} – Capacidade inibitória de 50 %
- NO – Óxido Nítrico
- PEP - Fosfoenol piruvato

PLA2 – Fosfolipase A2

RDC - Resolução de Diretoria Colegiada

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SAM - S-adenosil-metionina

TFA – Ácido trifluoroacético

TOF - Time of flight (tempo de voo)

TPTZ - 2,4,6- tripiridil-1,3,5-triazina

t - Tripleto

UV – Ultravioleta

µg - Microgramas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Aspectos Botânicos	3
2.1.2 Classificação Botânica	3
2.1.3 Descrição e Distribuição da Família Humiriaceae	3
2.2 Descrição e distribuição da espécie <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrecasas.....	5
2.3 Uso da espécie <i>Endopleura uchi</i>	5
2.4 Estudos relatados na literatura de <i>Endopleura uchi</i>	8
2.4.1 Frutos de <i>Endopleura uchi</i>	8
2.4.1.1 Estudo da composição química	8
2.4.1.2 Atividade biológica	9
2.4.2 Cascas de <i>Endopleura uchi</i>	10
2.4.2.1 Estudos fitoquímicos das cascas de <i>Endopleura uchi</i>	10
2.4.2.2. Atividades biológicas	11
2.5 Bergenina	12
2.6 Triterpenos.....	16
2.7 Compostos fenólicos e radicais livres	22
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivo Específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Equipamentos	27
4.2 Tratamentos dos solventes.....	27
4.3 Métodos cromatográficos.....	27
4.4 Métodos espectrométricos.....	28
4.5 Método espectroscópico	29
4.6 Fitoquímica desenvolvida com <i>Endopleura uchi</i>	29
4.6.1 Coleta e identificação botânica da espécie	29
4.6.2 Secagem / moagem	29
4.6.3 Preparo dos extratos	29
4.6.4 Extrato em metanol	30
4.6.5 Extrato aquoso	30
4.6.6 Extrato em etanol	31

4.6.7 Partição líquido-líquido dos extratos metanólicos	31
4.6.8 Separação cromatográfica	32
4.6.8.1 Fracionamento da fase acetato de etila dos extratos metanólico de <i>Endopleura uchi</i>	32
4.6.8.2 Fracionamento das frações hexânicas dos extratos em metanol dos galhos e folhas de <i>Endopleura uchi</i>	36
4.9 Quantificação de bergenina nos extratos de <i>Endopleura uchi</i> por Cromatografica Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	38
4.9.1 Sistema cromatográfico.....	38
4.9.2 Método em modo reverso	38
4.9.3 Preparação da curva analítica padrão de bergenina.....	38
4.9.4 Pré-tratamento dos extratos de <i>Endopleura uchi</i>	39
4.9.5 Pré-tratamento das amostras comerciais de <i>Endopleura uchi</i>	40
4.10 Quantificação de fenólicos totais	42
4.11 Ensaio de atividade antioxidante	43
4.11.1 Pelo sequestro de radicais livres (DPPH)	43
4.11.2 Pela capacidade redutora do Ferro (FRAP)	45
4.12 Atividade da supressão de óxido nítrico produzido por macrófagos murinos (J774).....	46
4.13 Ensaio antiúlcera <i>in vivo</i>	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Determinação e identificação das substâncias isoladas de <i>Endopleura uchi</i> ..	49
5.1.1 Friedelina	49
5.1.2 Bergenina.....	53
5.2 Quantificação de bergenina em <i>Endopleura uchi</i>	63
5.2.1 Curva analítica do padrão bergenina	63
5.2.2 Quantificação de bergenina nos extratos metanólicos e aquosos de <i>Endopleura uchi</i>	67
5.2.3 Quantificação de bergenina em amostras comerciais de <i>Endopleura uchi</i>	69
5.3. Quantificação de fenólicos totais	74
5.4 Atividade antioxidante.....	77
5.4.1 Capacidade redutora do Ferro (FRAP)	77
5.4.2 Sequestro de radicais livres (DPPH)	80

5.5 Atividade de inibição da produção de óxido nítrico (NO [•]) produzido por macrófagos murinos	84
5.6 Atividade antiúlcera: Lesão gástrica induzida por estresse a frio	86
6. CONCLUSÃO	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXOS	105

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas tradicionalmente para o tratamento de vários males por desempenharem algum tipo de ação farmacológica ao homem. Sua aplicação é vasta e compreende desde o combate ao câncer até a microrganismos patogênicos (SILVA & CARVALHO, 2004; CALIXTO, 2000). Apesar do grande desenvolvimento tecnológico de medicamentos, o uso popular de plantas medicinais ainda é muito significativo nos dias de hoje e servem como base para indicação da atividade farmacológica.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 80% da humanidade não tem acesso ao atendimento primário de saúde, sendo pelo acesso limitado aos centros de saúde ou ausência de alternativas econômicas viáveis para adquirir os medicamentos prescritos (AKERELE, 1993). Na Amazônia, muitas comunidades encontram-se isoladas dos centros urbanos e sem acesso a um serviço público de saúde, levando-os a utilizarem as plantas medicinais nas terapias alternativas como principais formas de tratamento de doenças (BORRÁS, 2003).

Entre milhares de espécies vegetais em todo o mundo, somente 17% das plantas apresentam estudos quanto ao seu emprego medicinal, onde na maioria dos casos, poucos estudos da composição química e farmacologia são realizados (HOSTETTMANN, *et al.*, 2003; FARIAS *et al.*, 1999). Na região amazônica, muitas plantas consideradas medicinais são utilizada deliberadamente sem qualquer estudo químico ou atividade biológica comprovada cientificamente, podendo ser nocivo a saúde, uma vez que a matriz de substâncias presentes no extrato podem não proporcionar a atividade biológica esperada e apresentar componentes com certo grau de toxicidade. Embora várias plantas sejam utilizadas com fins terapêuticos, e mesmo comercializadas, a grande maioria não possui dados científicos que comprovem a sua eficácia e seu aspecto toxicológico no homem, assim como garantia de qualidade do produto ou de sua produção. Consequentemente, o estudo químico na procura de novos agentes terapêuticos e a comprovação da atividade biológica para validar o uso popular dessas espécies são de fundamental importância.

Entre as várias espécies amazônicas utilizadas tradicionalmente pela população local, destaca-se a espécie *Endopleura uchi* Huber Cuatrecasas,

pertencente à família Humiriaceae, cujos frutos são muito apreciados na região e suas cascas são utilizadas na forma de chá como potente anti-inflamatório indicado para inflamações uterinas, miomas e ovário policístico (REVILLA, 2002). A procura de fitoterápicos à base do chá das cascas de *Endopleura uchi* em mercados municipais, feiras de produtos naturais e até mesmo pela Internet, tem sido crescente, expondo a população a riscos ainda desconhecidos por falta do conhecimento químico e biológico da espécie. Em um dos experimentos realizados anteriormente com as cascas da espécie *Endopleura uchi* foi possível isolar uma substância identificada como bergenina que apresentou atividade contra o crescimento fúngico para diferentes espécies de *Candida* (SILVA *et al.*, 2009), que é um dos principais gêneros de fungos causadores de inflamações uterinas feminina. A bergenina que está presente em torno de 3,19 % no extrato aquoso das cascas de *Endopleura uchi* também apresentou atividade inibitória seletiva de COX-2, uma das enzimas mediadoras de processos inflamatórios no organismo (NUNOMURA *et al.*, 2009).

Portanto, considerando que a bergenina é um dos componentes principais presente nas cascas de *Endopleura uchi* e que é considerada uma substância amplamente estudada na literatura com diversas atividades biológicas comprovadas, faz-se necessário uma análise quantitativa dessa substância em diferentes partes da planta, bem como conhecer a identidade química de outros componentes da espécie *Endopleura uchi*, cujos estudos são inéditos para galhos e folhas do ponto de vista fitoquímico e por meio da investigação da atividade biológica comprovar a eficácia e segurança do seu uso, possibilitando o desenvolvimento de produtos fitoterápicos ou fármacos, a partir dessa espécie vegetal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos Botânicos

2.1.2 Classificação Botânica

- **Reino:** Plantae
- **Divisão:** Magnoliophyta
- **Classe:** Magnoliopsida
- **Sub-classe:** Magnoliidae
- **Ordem:** Malpighiales
- **Família:** Humiriaceae
- **Gênero:** *Endopleura*
- **Espécie:** *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrecasas

2.1.3 Descrição e Distribuição da Família Humiriaceae

A família Humiriaceae pertence à ordem Malpighiales é considerada relativamente pequena, englobando 50 espécies de plantas classificadas em 8 gêneros (*Duckesia*, *Endopleura*, *Humiria*, *Humiriastrum*, *Hylocarpa*, *Sacoglottis*, *Schistostemon* e *Vantanea*) (GIORDANO e BOVE, 2008; CUATRECASAS, 1961).

No geral, as espécies da família Humiriaceae são árvores de porte grande com copas densas e botanicamente distingue-se pelo tronco frequentemente marrom-escuro / avermelhado, sendo que suas folhas são sempre glabras (lisas). O número de sépalas (cálice) e pétalas (corola) é sempre 5 e o número de sementes varia de 1 a 5. As flores são hermafroditas e sua polinização é desconhecida, provavelmente efetuada por abelhas. Os frutos da maioria das espécies são drupas (carnoso), sendo alguns comestíveis e em geral com adaptações para dispersão pela água além de serem disseminados por roedores, antas, primatas, pássaros e morcegos. Em geral a madeira de Humiriaceae é densa e pouco utilizada (RIBEIRO *et al.*, 1999).

Estudos de fitogeografia e filogenia da família Humiriaceae, demonstraram ser de origem neotropical, encontradas principalmente nas regiões tropicais das

Américas. Dessa forma tem sua distribuição geográfica na África tropical, América Central, e América do Sul tropical (HERRERA *et al.*, 2010). (Fig.1).

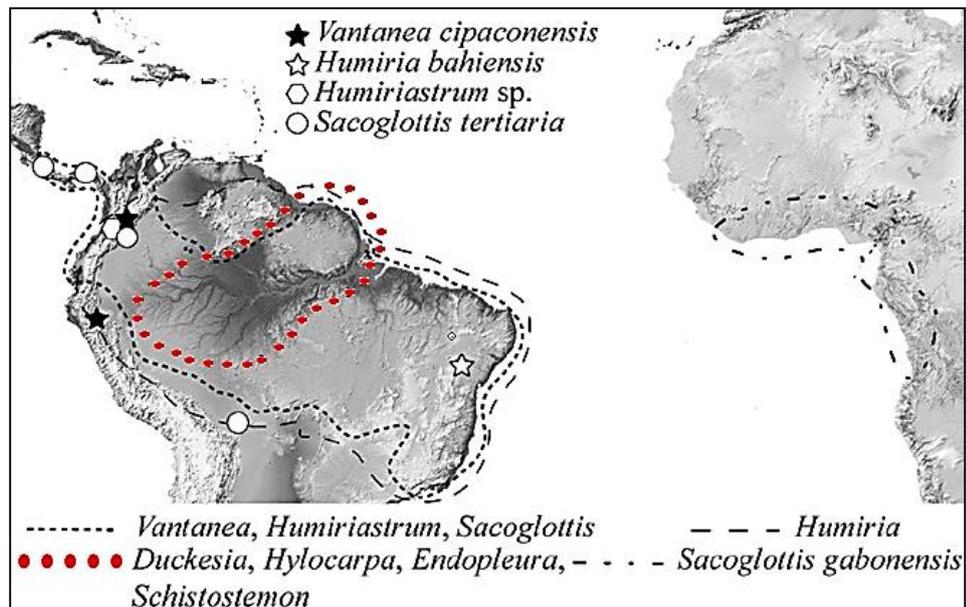


Figura 1. Distribuição dos gêneros da família Humiriaceae (Fonte: HERRERA, *et al.*, 2010).

Na reserva florestal Adolpho Ducke do INPA, localizada em Manaus, encontram-se 10 espécies de 5 gêneros:

- ***Endopleura uchi* (Huber) Cuatrecasas**
- *Duckesia verrucosa* (Ducke) Cuatrecasas
- *Humiria balsamifera* (Aubl.) St. Hil
- *Sacoglottis ceratocarpa* Ducke
- *Sacoglottis guianensis* Benth
- *Sacoglottis mattogrossensis* Malme var. *subintegra* (Ducke) Cuatrec
- *Vantanea guianensis* (Aubl.) Ducke
- *Vantanea macrocarpa* Ducke
- *Vantanea micrantha* Ducke
- *Vantanea parviflora* Lam

O estudo químico das espécies dessa família é pouco conhecida e surpreendentemente alguns estudos relatam a ausência de alcaloides para a família Humiriaceae que apresenta características semelhantes à família Erythroxylaceae conhecida pela presença dessa classe de substâncias (SHULTES, 1979).

2.2 Descrição e distribuição da espécie *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrecasas

José Cuatrecasas Arumí, botânico espanhol, estudou a espécie *Sacoglottis uchi* descrita por Jacques Huber e observou que algumas características como a antera (porção terminal do estame das flores) e o endocarpo não são encontradas no gênero *Sacoglottis*, então um novo gênero *Endopleura* foi criado para a espécie *uchi*. Portanto, a espécie *Endopleura uchi* é monotípica e tem como sinonímia *Sacoglottis uchi* (Huber) (CUATRECASAS, 1961; CAVALCANTE, 1996).

A espécie *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. [sin. *Sacoglottis uchi* Huber] é amplamente dispersa por toda Bacia Amazônica, tipicamente silvestre da mata primária de terra firme nos estados do Amazonas e principalmente no Pará, no estuário e região Bragantina (CUATRECASAS, 1961; SCHULTES, 1979; CAVALCANTE, 1996).

A espécie apresenta várias denominações comuns, sendo conhecida popularmente no Amazonas como uxi-amarelo, uxi-liso e no Pará como uxi-pucu, uxi, e também pode ser citada como uxi-ordinário, uxi-verdadeiro, axuá, cumatê, pururu (PRANCE e SILVA, 1975; LORENZI, 2006).

2.3 Uso da espécie *Endopleura uchi*

A *Endopleura uchi* é uma das espécies localmente valiosas que geram conflitos de uso por causa da sua excelente madeira e de seus valores frutífero, medicinal e como atrativo para caça, pois muitos animais silvestres se alimentam do fruto de uchi (SHANLEY e GAIA, 2004; SHANLEY e LUZ, 2002).

As árvores apresentam alto porte, podendo medir cerca de 25 a 30 metros de altura, apresentando tronco reto, cilíndrico, algumas vezes atingindo até 1 metro de diâmetro. Devido às suas características, a madeira dessa espécie é utilizada na construção civil e naval, marcenaria e carpintaria (Figura 2) (CORRÊA, 1984).



Fonte: A,F LORENZI *et al.*, 1998; B,D Fotos: Muniz M. P; C Internet: <http://www.ibama.gov.br>
Figura 2. Árvore (A), casca (B), tronco (C), frutos (D) e folhas (F) de *Endopleura uchi*.

A árvore de uchi é frutífera e raramente cultivada, provavelmente por ser uma árvore de crescimento lento e só frutifica após 15 anos (CAVALCANTE, 1996). Seus frutos apresentam uma fina espessura de polpa (mesocarpo) chegando a pesar de 50 a 70 g de constituição oleosa e resinosa, com caroço (endocarpo) lenhoso e duro, contendo em seu interior de uma ou duas sementes (Figura 3) (LORENZI, 2006).



Fonte: LORENZI *et al.*, 2006.
Figura 3. Frutos de *Endopleura uchi*.

A polpa dos frutos de uchi apresenta sabor e aroma peculiares, muito agradáveis e vem sendo valorizado devido a sua utilização comercial na forma *in natura*, constituindo um importante complemento na alimentação de muitas comunidades rurais mais distantes e das classes populares. Além disso, o fruto é a matéria-prima para a fabricação de sorvete, licor e óleo. A qualidade do óleo extraído da polpa é tão boa quanto do óleo de oliva, com uma cor ligeiramente esverdeada, podendo ser utilizado na comida e como remédio no tratamento de sinusite em crianças e prisão de ventre em adultos (SHANLEY e MEDINA, 2004).

As cascas (Figura 4A) são amplamente comercializadas em feiras e mercados, sendo popularmente utilizadas na forma de chá atuando como potente anti-inflamatório indicado no combate às inflamações uterinas, miomas e ovários policísticos (REVILLA, 2002), além de ser indicado para o tratamento de artrite, reumatismo, colesterol alto e diabetes (CORRÊA, 1984; SHANLEY e GAIA, 2004). O uso popular das folhas e galhos de *Endopleura uchi* ainda não foram descritos na literatura para fins medicinais.



Fonte: ^{A,B} Muniz, M. P.

Figura 4. Casca comercial (A) e tronco com casca retirada (B) de *Endopleura uchi*.

2.4 Estudos relatados na literatura de *Endopleura uchi*

2.4.1 Frutos de *Endopleura uchi*

2.4.1.1 Estudo da composição química

O fruto de *Endopleura uchi* tem importância alimentar e econômica na região amazônica, portanto alguns estudos científicos foram relevantes na análise de possíveis constituintes responsáveis pelas características terapêuticas e/ou nutricional dos frutos da espécie.

Estudos de caracterização e avaliação nutricional da polpa de frutos de *Endopleura uchi*, coletado aleatoriamente no mercado “Ver-o-peso” no estado do Pará, demonstraram possuir um teor bastante elevado de óleo, caracterizado pela abundância de ácido oléico (7.38%) e ácido palmítico (3.78%), além de ser observado também a presença de fibras dietéticas, fitosteróis e quantidades notáveis de vitamina C e minerais (MARX *et al.*, 2002). Segundo Costa *et al.*, (2010), o fruto de *Endopleura uchi* apresenta valores de vitamina E maiores do que a polpa dos

frutos do açaí, a polpa de inajá e castanha de buriti com $200.92 \mu\text{g.g}^{-1}$ equivalente de α -tocoferol. Na análise em CG-MS realizado por Marx *et al.*, (2002), foram identificados 42 compostos voláteis do aroma da polpa do fruto, incluindo uma predominância de compostos alcoólicos como 3,3-dimetil-2-butanol (18.8%), eugenol (14.0%) bem como ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos (18.5%). Outro estudo realizado por Magalhães *et al.*, (2007), analisando a polpa de frutos de *Endopleura uchi* coletados no Campos I do INPA em Manaus, verificou através da composição de carotenoides a presença do β -caroteno ($16 \mu\text{g.g}^{-1}$) que contribui para o maior valor de vitamina A, e também detectou a presença dos isômeros *trans*- β -caroteno (89,3 %), 13-*cis*- β -caroteno (8 %) e 9-*cis*- β -caroteno (3%), além de obter a partir do extrato em metanol um derivado de ácido gálico identificado como bergenina (Figura 6).

Considerando a importância do papel nutricional dos frutos utilizados na Região Amazônica, os estudos realizados revelaram o fruto de *Endopleura uchi* como sendo um suplemento alimentar com potente valor nutricional com efeitos benéficos devido a presença de nutrientes essenciais na dieta alimentar.

2.4.1.2 Atividade biológica

Em um estudo realizado com alguns frutos de origem amazônica, especificamente os frutos de *Endopleura uchi* apesar de mostrar significativa atividade antioxidante, não foi detectado nenhum dos seguintes compostos fenólicos: catequina, epicatequina, quercetina, kaempferol, cianidina, ácido hidroxicinâmico e ácido elágico, porém apresentou capacidade de inibir a enzima α -glicosidase, que é uns dos parâmetros terapêuticos usados para o tratamento de diabetes (GONÇALVES, LAJOLO e GENOVESE, 2010).

2.4.2 Cascas de *Endopleura uchi*

2.4.2.1 Estudos fitoquímicos das cascas de *Endopleura uchi*

As cascas de *Endopleura uchi* são largamente utilizadas na medicina popular e devido a indicação no tratamento de diversas enfermidades inflamatórias, alguns estudos foram desenvolvidos para o conhecimento dos constituintes químicos dessa espécie. Em estudos fitoquímicos das cascas de *Endopleura uchi*, a partir do extrato bruto em etanol, foi possível isolar a bergenina **(1)** e seu derivado 8,10-dimetilbergenina **(2)**, assim como dois triterpenóides pentacíclicos pertencentes à série oleanano: o ácido maslínico **(3)** e o éster masilinato de metila **(4)** (LUNA, 2000).

Em outro fracionamento cromatográfico das cascas de *Endopleura uchi*, além da bergenina **(1)**, o resultado levou ao isolamento de uma mistura de esteróides constituída por β -sitosterol **(5)** e estigmasterol **(6)**, do triterpeno pentacíclico friedelina (3-oxo-friedelina) **(7)** e do triterpeno pentacíclico pseudotaraxasterol **(8)** (LAGOS, 2006) (Figura 5).

Além desses constituintes químicos, a caracterização do extrato aquoso liofilizado das cascas de *Endopleura uchi*, por meio de uma triagem fitoquímica preliminar revelou a presença de açúcares redutores, glicosídeos cardíacos, purinas, lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas e taninos (PINHEIRO & ROSARIO, 2006; POLITI, 2009). Estudos fitoquímico dos galhos e folhas de *Endopleura uchi* não apresentam relatos na literatura.

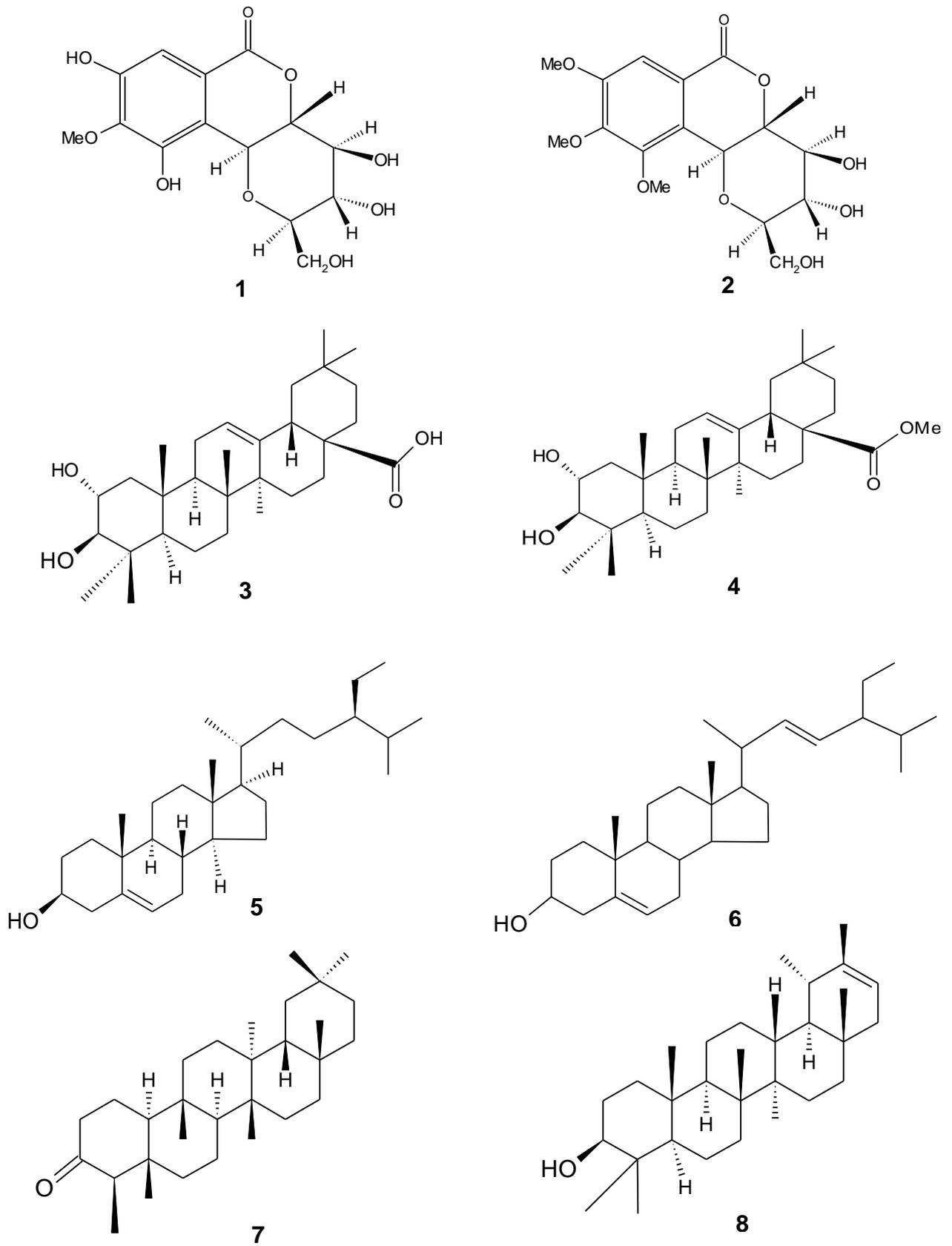


Figura 5. Metabólitos aislados de *Endopleura uchi*.

O extrato aquoso das cascas foi submetido ao teste preliminar de toxicidade oral aguda em camundongos, onde foram analisados os seguintes parâmetros nas concentrações dosagem de 500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg: frequência cardíaca e respiratória, número de óbitos e efeitos colaterais tais como piloereção, diarreia, sialorreia, hipnose e convulsões. Os resultados não revelaram sinais de toxicidade sistêmica com a administração do extrato, conferindo ao extrato aquoso das cascas de *Endopleura uchi*, utilizado na forma de chá pela população, como não apresentando riscos de toxicidade (POLITI, *et al.*, 2010).

Estudos químicos de atividade antioxidante frente ao método de sequestro de radicais de DPPH também foram realizados com o extrato aquoso de *Endopleura uchi*, que foi capaz de inibir 90 % dos radicais em uma concentração de 250 µg/mL, além de apresentar baixa citotoxicidade para células de fibroblastos (POLITI *et al.*, 2011)

Silva e colaboradores (2009) testaram o extrato aquoso, a fração solúvel em acetato de etila, a fração não solúvel em acetato de etila das cascas de *Endopleura uchi*, além de testar a bergenina que foi isolada da fração acetado de etila. As amostras foram testadas contra o crescimento de três tipos de levedura (*Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*), três fungos filamentosos (*Aspergillus flavus*, *A. nidulans* e *A. niger*), seis bactérias Gram negativa (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae*), e duas Gram positiva (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*). Todas as amostras foram capazes de inibir o crescimento das espécies testadas contra *Candida*, visto que a maior inibição foi atribuída à bergenina, mostrando que o efeito inibitório das amostras está associada com a presença de bergenina.

2.5 Bergenina

A bergenina é um C-glicosídeo de ácido 4-O-metilgálico (RASTOGI e RAWAT, 2008) que constitui em sua estrutura três anéis de seis membros, sendo um anel aromático (A), um anel δ -lactona (B) possuindo uma conformação esperada meio-cadeira e um anel glicopiranosose (C) exibindo um pequeno desvio de uma conformação cadeira ideal (Figura 6). Os anéis lactônico e glicopiranosose estão unidos por uma configuração *trans*, levando aos substituintes do anel aromáticos

(OH e MeO) adotarem uma conformação equatorial em relação ao anel glicopirranose (YE, SUN e PAN, 2004). A estrutura da bergenina favorece a formação de seis ligações hidrogênio intermoleculares e uma intra molecular levando a uma extensa rede de ligações de hidrogênio para a formação do cristal (RASTOGI e RAWAT, 2008).

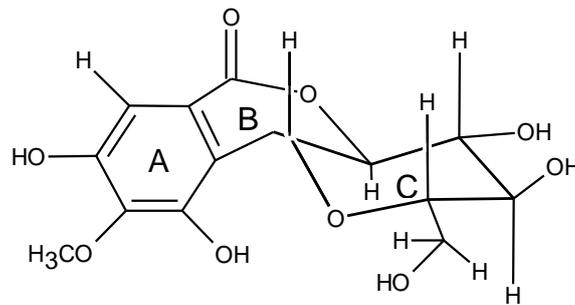


Figura 6. Bergenina (1).

Os cinco grupos hidroxilas presentes na bergenina são considerados potencialmente ativos (NAZIR *et al.*, 2011), portanto o interesse pelo estudo dessa substancia tem sido crescente, principalmente na medicina tradicional chinesa (YU *et al.*, 2009). Diferentes estudos farmacológicos têm demonstrado que a bergenina possui uma ampla possibilidade de atividades biológicas (Tabela 1). A bergenina tem sido mais relatada nos gêneros pertencentes às famílias Saxifragaceae, Euphorbeaceae, Myrsinaceae (CHAUHAN, RUBY e DWIVEDI, 2013) e Dipterocarpaceae (ITO *et al.*, 2012), além de ser descrita na literatura em outras diferentes famílias incluindo três espécies da família Humiriaceae (Tabela 2), indicando a bergenina como uma substância de grande biodisponibilidade e com alto potencial farmacológico.

O isolamento de bergenina nas cascas da espécie *Endopleura uchi* tem sido descrita na literatura e representa cerca de 3,19 % nas cascas secas quando utilizada na forma de chá, tradicionalmente utilizada na medicina popular (NUNOMURA *et al.*, 2009). Levando em conta a falta de estudos de outras partes da planta, faz-se necessário a inventigação qualitativa e o aprimoramento do método de quantificação de bergenina presente nas folhas e galhos de *Endopleura uchi*.

Tabela 1. Algumas atividades biológicas da Bergenina.

ATIVIDADE	MODELO	AÇÃO	FAMÍLIA	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
ANTIARRÍTMICA	Arritmias induzida por BaCl ₂ em ratos	Efeito terapêutico nas concentrações de 0.2 mg/kg, 0.4 mg/kg, e 0.8 mg/kg	Euphorbiaceae	<i>Fluggea virosa</i>	PU <i>et al.</i> , 2002
ANTI-CÂNCER	<i>In vitro</i> : células de hepatoma humano (HepG2)	IC ₂₀ = 18 µM IC ₂₀ = 53 µM IC ₉₀ = >1000 µM	*		NEWELL <i>et al.</i> , 2010
ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA	Teste de formalina, e citocinas hiperalgésico	Inibição da fase inflamatória e das citocinas IL-1β e TNF-α	*		DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2011
ANTIINFLAMATÓRIA	<i>In vitro</i> : inibição da Cox-1, Cox-2 e PLA2	Inibição seletiva da Cox-2	Humiriaceae	<i>Endopleura uchi</i>	NUNOMURA <i>et al.</i> , 2009
	<i>In vitro</i> : Produção de NO induzido por LPS	Inibição de NO em 20–30 µM	*		JUNG <i>et al.</i> , 2011
	<i>In vitro</i> : Produção de IL-6 e TNF-α induzido por LPS	Redução das citocinas inflamatórias de IL-6 e TNF-α	*		SHEN <i>et al.</i> , 2012
ANTIFUNGICA	<i>In vitro</i>	Inibição de fungos da espécie <i>Candida</i>	Humiriaceae	<i>Endopleura uchi</i>	SILVA <i>et al.</i> , 2009
ANTIÚLCERA	Úlcera gástrica induzida por estresse	Aumento da prostaglandina endógena	Euphorbiaceae	<i>Fluggea microcarpa</i>	GOEL <i>et al.</i> , 1997
ANTIOXIDANTE	DPPH	IC ₅₀ = 127,3 µg/mL	Saxifragaceae	<i>Peltiphyllyllumpe ltatum</i>	HABTEMARIAM e COWLEY, 2012
HEPATOPROTETOR	Danos no fígado de ratos induzidos por tetracloreto de carbono (CCl ₄)	Prevenção significativa de malondialdeído e esgotamento de glutatona reduzida	Euphorbiaceae	<i>Mallotus japonicus</i>	LIM <i>et al.</i> , 2000
ANTI-DIABETES E ANTI-OBESIDADE	Inibição de PTP1B	Moderado com IC ₅₀ = 157 µM	Myrsinaceae	<i>Ardisia japonica</i>	LI <i>et al.</i> , 2005.
ANTI-DIABETES (Tipo 2)	Indução da diabetes em ratos por estreptozotocina (STZ) nicotinamida	significativa atividade antidiabética e hipolipemiante nas dosagens de 2.5, 5, e 10 mg/kg	*		KUMAR <i>et al.</i> , 2012

COX: ciclooxigenase; PLA₂: Fosfolipase; IL-1β : interleucina-1 beta; TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa; LPS: lipolissacarídeo
* bergenina comercial

Tabela 2. Distribuição de bergenina em espécies de plantas de famílias diferentes relatadas na literatura.

Família	Espécies	Referências
Apocynaceae	<i>Trachelospermum jasminoides</i> (Lindl.) Lem.	JING <i>et al.</i> , 2012.
	<i>Astilbe chinensis</i> Maxim. ex Knoll ¹	CHEN <i>et al.</i> , 2004.
	<i>Astilbe thunbergii</i> Miq. ¹	KIMURA, SUMIYOSHI e SAKANAKA, 2007.
	<i>Astilboides tabularis</i> (Hemsl.) Engler ²	JIN <i>et al.</i> , 2011.
	<i>Astilbe rivularis</i> Buch.-Ham. ²	RAJBHANDARI <i>et al.</i> , 2011.
	<i>Bergenia ligulata</i> (wall.) Engl. ¹	CHAUHAN, SINGH e AGRAWAL, 2000.
	<i>Bergenia purpurascens</i> Engl. ¹	CHEN <i>et al.</i> , 2004.
	<i>Bergenia crassifolia</i> (L.) Fritsch ²	SUN <i>et al.</i> , 2010.
	<i>Bergenia cordifolia</i> (Haw.) Sternb. ²	ROSELLI, LENTINI e HABTEMARIAM, 2012
	Saxifragaceae	<i>Bergenia stracheyi</i> (Hook. f. & Thomson) Engl. ¹
<i>Bergenia scopulosa</i> T. P. Wang ²		CUI, 2011.
<i>Boykinia lycoctonifolia</i> Engl. ¹		IZAWA, NAGAI e INOUE, 1973.
<i>Bergenia ciliata</i> (Haw.) Sternb. ²		DHARMENDER <i>et al.</i> , 2010
<i>Peltiphyllum peltatum</i> (Torr. ex Benth.) Engl. ²		HABTEMARIAM e COWLEY, 2012
<i>Peltoboykinia watanabei</i> (Yatabe) Hara ¹		IZAWA, NAGAI e INOUE, 1973
<i>Rodgersia sambucifolia</i> Hemsl. ²		DENG <i>et al.</i> , 2010
<i>Rodgersia aesculifolia</i> Batal ²		CAI <i>et al.</i> , 2009
<i>Saxifraga stolonifera</i> W. Curtis ¹		TANEYAMA <i>et al.</i> , 1983.
<i>Saxifraga melanocentra</i> Franch. ¹		ZUO <i>et al.</i> , 2005.
Euphorbiaceae	<i>Flueggea virosa</i> (Willd.) Voigt ¹	NYASSE <i>et al.</i> , 2004.
	<i>Flogged microcarpa</i> Blume ¹	GOEL <i>et al.</i> , 1997.
	<i>Mallotus japonicus</i> Müll. Arg. ¹	ZHANG <i>et al.</i> , 2003.
	<i>Mallotus repandus</i> (Rottler) Müll. Arg. ¹	TOMIZAWA, ASUKE e SUGURO, 1976.
	<i>Mallotus anisopodus</i> (Gagnep.) Airy Shaw ¹	MINH <i>et al.</i> , 2009.
	<i>Mallotus philippinensis</i> Muell. ²	NGUYEN <i>et al.</i> , 2010.
	<i>Phyllanthus wightianus</i> Müll. Arg. ²	PRIYA <i>et al.</i> , 2011.
<i>Securinega melanthesoides</i> (F. Muell.) Airy Shaw ¹	SCHUTZ <i>et al.</i> , 1998.	
Myrsinaceae	<i>Ardisia crenata</i> Sims ²	DENG <i>et al.</i> , 2010.
	<i>Ardisia crispa</i> (Thunb.) A. de Candolle. ²	ZHANG <i>et al.</i> , 2010.
	<i>Ardisia japonica</i> Blume ¹	LI <i>et al.</i> , 2005.
	<i>Ardisia pusilla</i> A. de Candolle.	Kobayashi e Mejia, 2005.
	<i>Ardisia mamillata</i> Hance ² <i>Ardisia crenata</i> Sims ²	NEWELL <i>et al.</i> , 2010
Dipterocarpaceae	<i>Vateria indica</i> C.F. Gaertn. ¹	MISHIMA <i>et al.</i> , 2003.
	<i>Vatica pauciflora</i> Blume. ¹	ITO <i>et al.</i> , 2003.
	<i>Vatica bantamensis</i> (Hassk.) Benth. & Hook. ex Miq. ²	ITO <i>et al.</i> , 2012.
	<i>Vatica mangachpoi</i> Blanco ²	SONG <i>et al.</i> , 2012.
	<i>Hopea utilis</i> (Bedd.) Bole ¹	TANAKA <i>et al.</i> , 2001.
	<i>Hopea sangal</i> Korth ² <i>Dryobalanops aromatica</i> C. F. Gaertn. ²	NASSER <i>et al.</i> , 2009. WIBOWO <i>et al.</i> , 2011.

Continuação

Hamamelidaceae	<i>Corylopsis willmottiae</i> Rehder & E.H.Wilson ²	LI <i>et al.</i> , 2011.
Humiriaceae	<i>Sacoglottis gabonensis</i> Urb. ¹	OGAN, 1971; MADUKA e OKOYE, 2006
	<i>Humiria balsamifera</i> Aubl. ¹	CALDAS <i>et al.</i> , 2002
	<i>Endopleura uchi</i> Huber Cuatrec. ²	NUNOMURA <i>et al.</i> , 2009.
Crassulaceae	<i>Crassula</i> L cv. 'Himaturi' ¹	LEE <i>et al.</i> , 2005.
	<i>Rhodiola kirilowii</i> (Reg.) Reg ¹	ZHANG, WANG e ZHANG, 1991.
Fabaceae	<i>Peltophorum africanum</i> Sond. ¹	BESSONG <i>et al.</i> , 2005.
Sapindaceae	<i>Allophylus edulis</i> var. <i>edulis</i> ¹	HOFFMANN <i>et al.</i> , 1992.
	<i>Allophylus edulis</i> var. <i>gracilis</i> ¹	
Leguminosae	<i>Pentaclethra macrophylla</i> Benth. ¹	GABRIEL <i>et al.</i> , 2005.
	<i>Caesalpinia digyna</i> Rottl. ¹	SRINIVASAN <i>et al.</i> , 2007.
	<i>Caesalpinia decapetala</i> (Roth) Alston ²	WEI <i>et al.</i> , 2013
	<i>Cenostigma macrophyllum</i> Tul. ²	ALVES <i>et al.</i> , 2012
Caprifoliaceae	<i>Viburnum nervosum</i> Hook ²	TIWARI e KHOSA, 2012
Compositae	<i>Tridax procumbens</i> L. ²	JACHAK <i>et al.</i> , 2011.
Connaraceae	<i>Connarus monocarpus</i> ¹	AIYAR <i>et al.</i> , 1964.
Convolvulaceae	<i>Rivea hypocrateriformis</i> (Lam.) Choisy ²	ZARRAMUD <i>et al.</i> , 2011.
Moraceae	<i>Ficus racemosa</i> Linn. ¹	LI <i>et al.</i> , 2004.
Ericaceae	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng. ²	OLENNIKOV e CHEKHIROVA, 2013.
Proteaceae	<i>Helicia nilagirica</i> Bedd ²	WU <i>et al.</i> , 2010.
Ranunculaceae	<i>Cimicifuga foetida</i> L. ²	LI <i>et al.</i> , 2011.
Rosaceae	<i>Aruncus sylvestris</i> Kostel. ex Maxim. ²	ZHANG, ZHENG e LEI, 2010.
Vitaceae	<i>Cissus assamica</i> (M.A. Lawson) Craib ²	XIE <i>et al.</i> , 2009.
	<i>Cissus pteroclada</i> Hayata ²	CHI <i>et al.</i> , 2010

¹ (RASTOGI E RAWAT, 2008), ² Revisão de 2009-2010.

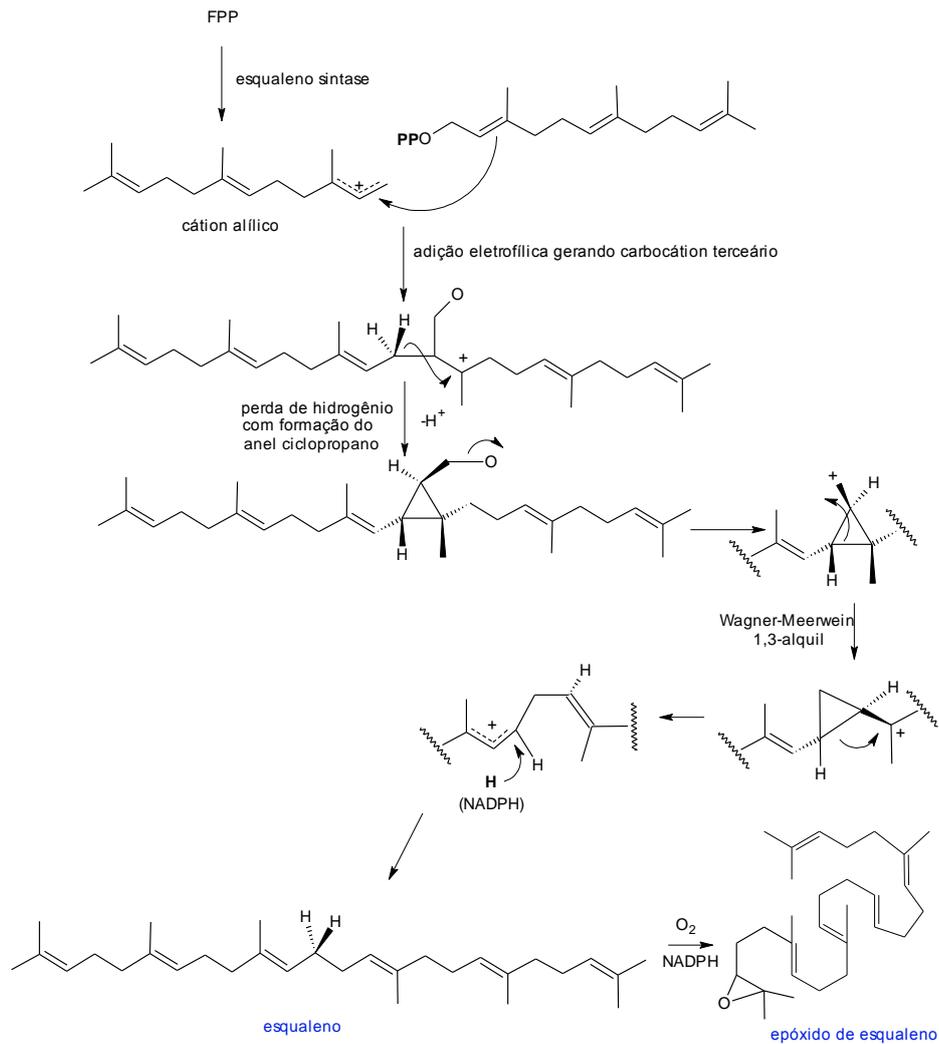
2.6 Triterpenos

Terpenóides são metabólitos secundários que compõem o maior grupo de produtos naturais, com mais de 20.000 membros conhecidos e podem ser classificados de acordo com o número de unidade de isoprenos (C₅) presentes em sua estrutura, subdividindo-se em hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpeno (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) (WANG, 2010; DEWICK, 2002).

Os triterpenos abrangem uma diversidade de grupos com estruturas alicíclicas complexas contendo trinta carbonos (C₃₀) e podem ser encontrados em vegetais e também em animais, desenvolvendo várias funções importantes, como constituintes da membrana (esteroides em células eucariotas, hopanoides em células procariotas), como hormônios (esteroides em plantas e animais), e como compostos de defesa (triterpenoides pentacíclicos nas plantas).

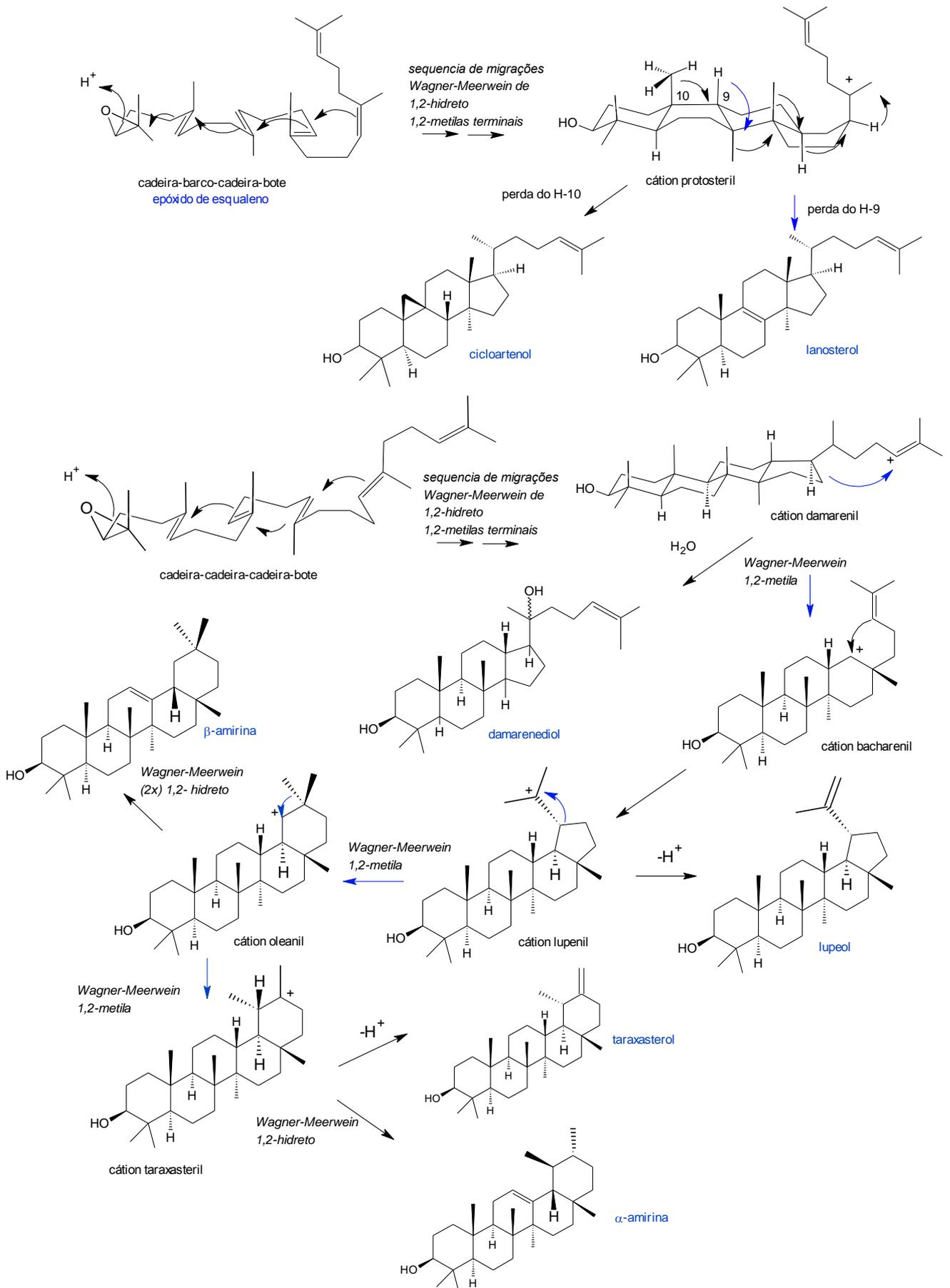
Duas vias são descritas para a formação dos triterpenos, a primeira sendo a via do mevalonato (BROWN, 1998), e a segunda pela via da desoxixilulose (ROHMER *et al.*, 1993). Porém, alguns estudos experimentais afirmam que os triterpenos são provenientes da via do mevalonato (FLORES-SANCHEZ, 2002).

A biossíntese desses compostos ocorre pela junção cauda-cauda de duas moléculas de pirofosfato de farnesila (FPP, C₁₅) produzindo o esqualeno considerado o precursor natural de triterpenos. Nessa reação, é utilizado um catalisador conhecido como esqualeno sintase que catalisa uma série de rearranjos catiônicos complexos com a finalidade de unir os dois carbonos C-1 dos grupos farnesil. O esqualeno produzido sofre então uma reação catalisada por uma flavoproteína produzindo um intermediário conhecido como 2,3-óxido de esqualeno que é ciclizado pelo óxido esqualeno ciclase, através de várias migrações concertadas do tipo Wagner-Meerwein de metilas e hidretos, através de uma reação de protonação inicia (Esquema 1). O tipo de ciclização é um passo importante para a formação dos produtos biossintéticos, pois definem a estrutura do triterpeno (SAWAI e SAITO, 2011; DEWICK, 2002; CROTEAU, KUTCHA e LEWIS, 2000). Animais e fungos apresentam apenas um tipo de óxido esqualeno ciclase (lanosterol sintase), para a biossíntese de esteróis. Porém, em plantas além de encontrada o tipo lanosterol sintase, também apresenta a cicloartenol sintase e vários outros tipos, favorecendo a formação de mais de 100 tipos de esqueletos de triterpenos encontrados na plantas (SAWAI e SAITO, 2011).



Esquema 1. Formação do precursor dos triterpenos. (DEWICK, 2002)

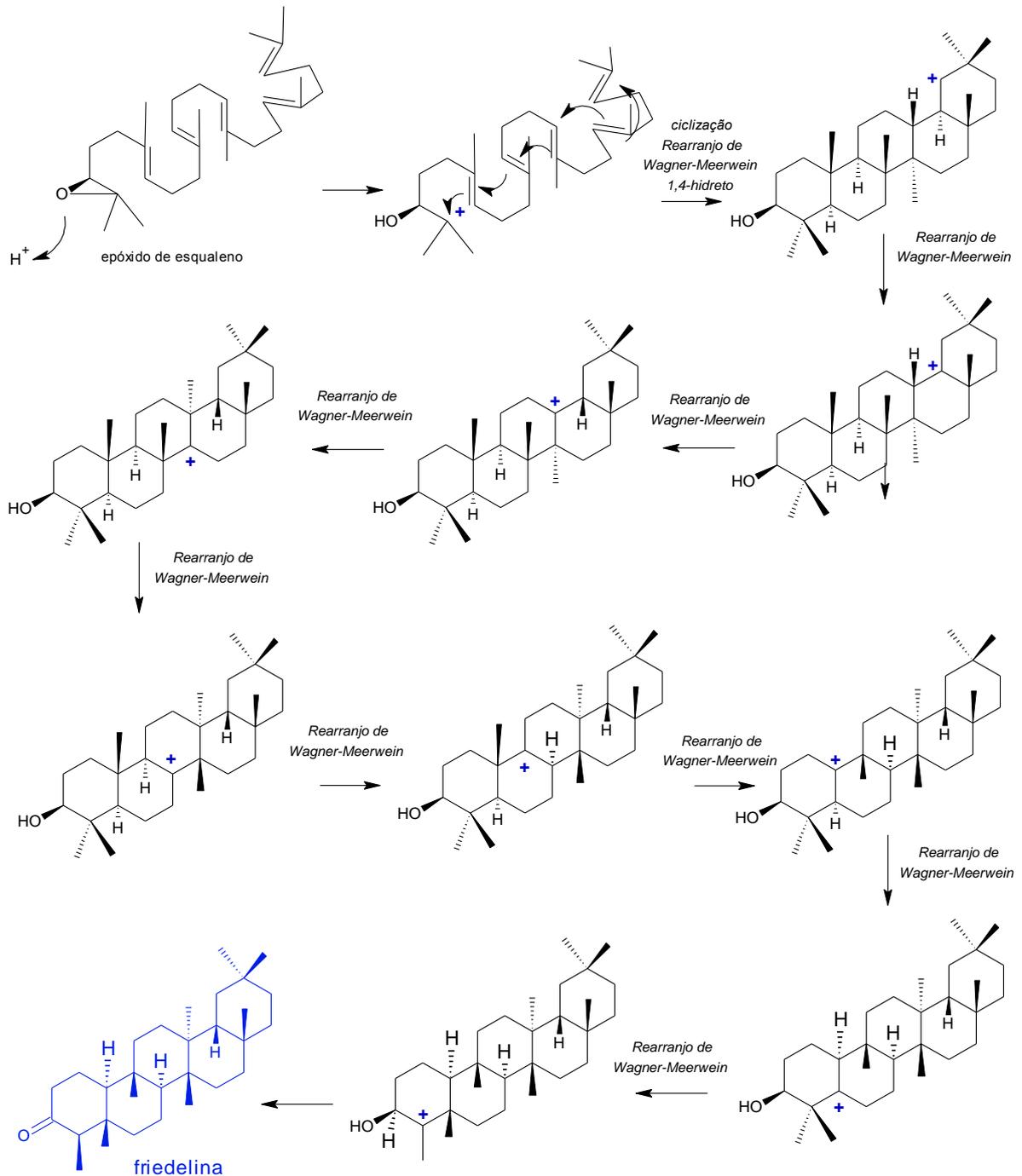
A conformação inicial do óxido de esqualeno define a ciclização e conseqüentemente os tipos de intermediários que vão gerar diferentes esqueletos. A configuração cadeira-bote-cadeira-bote formará o cation protosteril que sofrerá migrações 1,2 de hidreto do tipo Wagner-Meerwein para produzir um novo cation, seguido de outra migração 1,2 de hidreto, e pela perda de um hidrogênio formar o lanosterol, que é um triterpeno precursor do colesterol e outros esteróis, típico de animais. Em plantas o intermediário produzido é o cicloartenol. Outro tipo de enzima ciclase favorece a conformação cadeira-cadeira-cadeira-bote que produz como intermediário o cation damarenil, que apresenta uma estereoquímica diferente do cation protosteril. As sequencias dos rearranjos de Wagner-Meerwein dão origem outros cations intermediários que produzem uma diversa variedade de triterpenos (Esquema 2) (SAWAI e SAITO, 2011; DEWICK, 2002).



Esquema 2. Biossíntese de alguns triterpenos (DEWICK, 2002).

A biossíntese do triterpeno conhecido como friedelina (Esquema 3), faz parte de um caso especial no processo de formação, pois é considerado um produto tardio devido às sequências longas de rearranjos de 1,2 de hidretos e 1,2 de metila, ou seja, apresenta o máximo possível de intermediários catiônicos, em comparação com os demais triterpenos. Cerca de 10 intermediários estão presentes na formação da friedelina, pois a carga positiva percorre toda estrutura até voltar para o anel A, onde ocorre a desprotonação do grupo hidroxila. Estudos revelam que a friedelina é o único triterpeno cetônico formado diretamente pela ciclização inicial do óxido de esqualeno (WANG, *et al.*, 2010).

O triterpeno friedelina é conhecido por sua atividade anti-inflamatória testado na dosagem de 40 mg/kg, através do teste de edema de orelha induzido por óleo de cróton e edema de pata induzido por carragenina, que apresentou na fase aguda da inflamação um máximo de inibição de 52,5 e 68,7 % respectivamente. Na mesma dosagem a friedelina apresentou significativa redução de 36,8 % da formação de tecido granuloma induzido por “pellet” de algodão. No teste de artrite induzida por adjuvante a friedelina foi capaz de inibir 54,5 % da espessura da pata e também inibiu a permeabilidade vascular induzida por ácido acético em ratos. A atividade analgésica foi observada através da resposta de constrição abdominal induzida por ácido acético e também pela resposta de latência induzida por formalina. (ANTONISAMY, DURAI PANDIYAN e IGNACIMUTHU, 2011). A friedelina também apresentou atividade antifúngica contra *Trichophyton rubrum* (296) (MIC = 62,5 µg/mL), *Curvularia lunata* (MIC = 62,5 µg/mL) (DURAI PANDIYAN, GNANASEKAR e IGNACIMUTHU, 2010), além de apresentar atividade antimicrobiana *in vivo* frente *S. aureus*, *E. coli* e frente ao fungo *Aspergillus niger* (SHIMIZU e TOMOO, 1994). Os resultados descritos na literatura sugerem a friedelina como uma substância com potente atividade anti-inflamatória, analgésica e também antimicrobiana.



Esquema 3. Biossíntese da friedelina (**7**) (WANG, et al., 2010)

A bergenina e a friedelina, apesar de serem de classes diferentes, apresentam importante atividade anti-inflamatória, uma pela inibição da COX-2 (mediador inflamatório) e a outra por diminuição de edema de pata em ratos induzido por carragenina respectivamente, entre outras atividades biológicas já citadas anteriormente. A presença dessas substâncias com essas características biológicas podem justificar o uso terapêutico pela população.

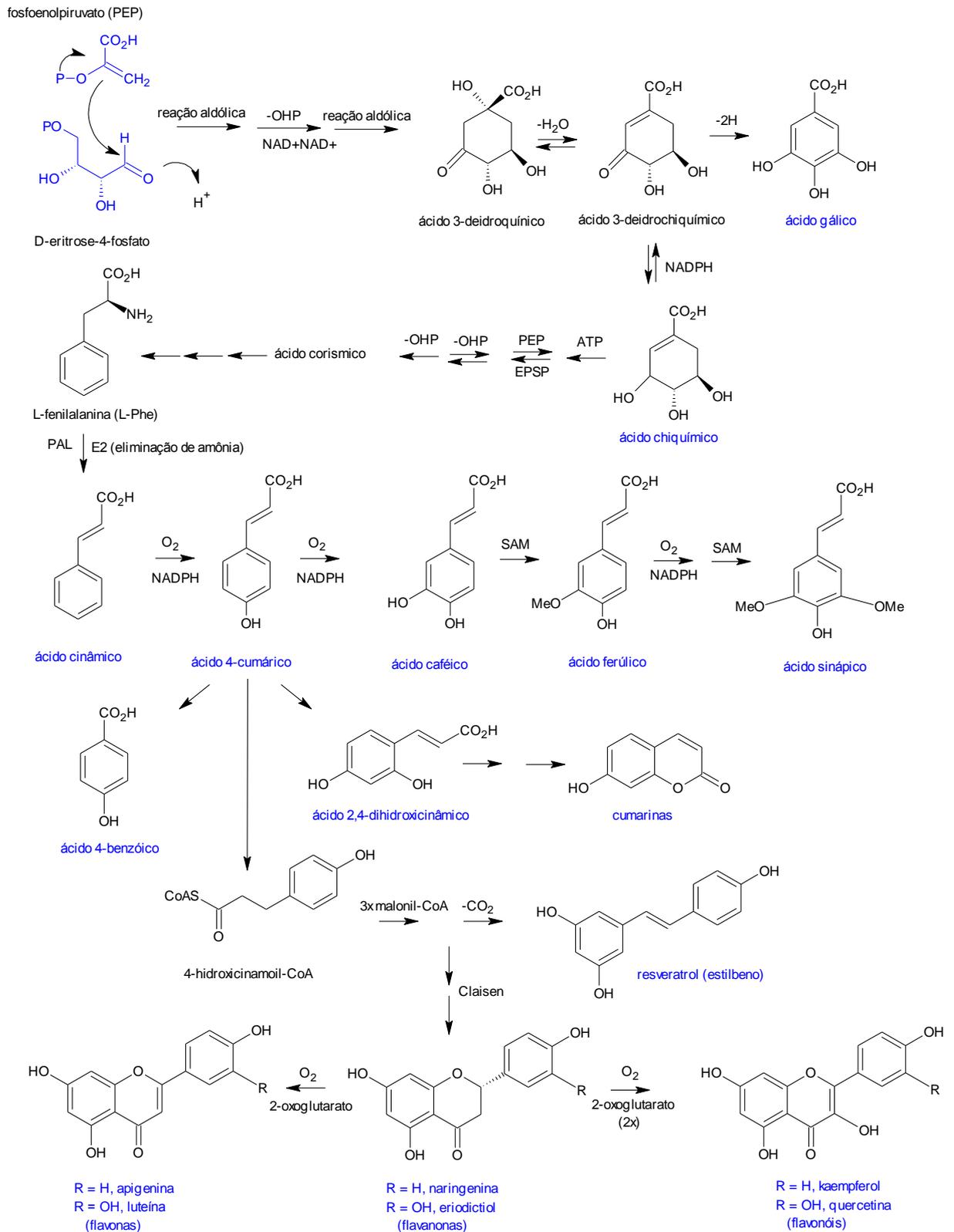
2.7 Compostos fenólicos e radicais livres

A classe de compostos denominados como fenólicos ou polifenóis constitui um dos mais numerosos e distribuídos grupos de substâncias presentes como metabólitos secundários nas plantas. Nas plantas, os compostos fenólicos podem apresentar variadas funções tais como fitoalexinas (mecanismo de defesa), contribuintes para a pigmentação da planta, agentes de proteção contra a luz UV, antioxidantes, manter uma relação de simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio dentre outras funções (NACZK e SHAHIDI, 2004).

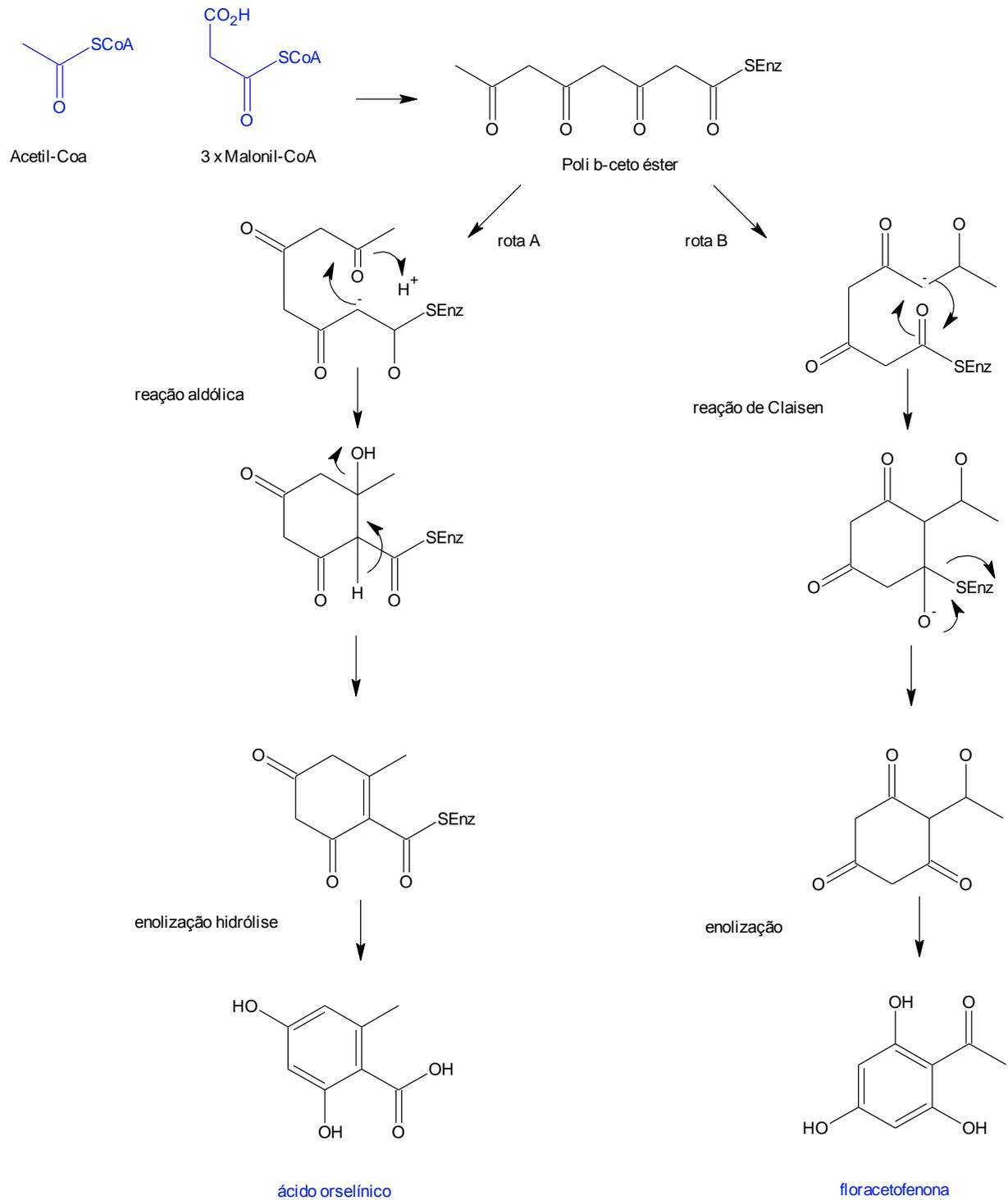
Substâncias fenólicas são dessa forma definidas para indicar a presença de um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas, podendo ser substituídos e encontrados de formas variadas, tais como ácidos carboxílicos, ésteres e glicosídeos, solúveis em água, ou também na forma de grandes polímeros insolúveis, ou seja, constitui um grupo quimicamente heterogêneo (TAIZ e ZEIGER, 2004; BRAVO, 1998). A explicação para a existência de aproximadamente 10.000 compostos fenólicos pode ser entendida do ponto de vista metabólico, pois são biossintetizados através de duas rotas metabólicas básicas: a rota do ácido chiquímico que tem como precursor a eritrose-4-fosfato e o fosfoenol piruvato (PEP), e também são originadas pela rota do acetato através dos precursores acetil coenzima A e sua forma ativada malonil coenzima A (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Nas plantas superiores a rota do ácido chiquímico é mais significativa na síntese de compostos fenólicos (Esquema 4), enquanto que em plantas inferiores, fungos e bactérias a principal rota é a do acetato (Esquema 5).

A via do ácido chiquímico não está presente em animais, porém tem grande importância, pois através dessa rota são sintetizados três aminoácidos (fenilalanina, tirosina e triptofano – que são essenciais à nutrição humana). Outros compostos obtidos por essa via são os ácidos benzoicos, ácidos cinâmicos, lignanas, ligninas, quinonas, fenilpropenos, e cumarinas. Também é possível produzir uma ampla variedade de classes de compostos fenólicos pela combinação das duas rotas formando flavonoides e suas subclasses (flavanas, flavanonas, flavonóis, flavonas, isoflavonas e antocianina), estilbenos, estilpironas e taninos condensados. Já pela via do acetato são produzidas as tetraciclinas, antraquinonas, e antranóis (DEWICK, 2002; TAIZ e ZEIGER, 2004; NACZK e SHAHIDI, 2004).



Esquema 4. Biossíntese de algumas substâncias fenólicas pela rota do ácido chiquímico e também pela combinação com a via do acetato (DEWICK, 2002).



Esquema 5. Biossíntese de compostos fenólicos simples pela via do acetato (DEWICK, 2002).

O interesse por essa classe de substâncias é crescente devido às evidências científicas que sugerem a prevenção de doenças através de uma dieta rica em polifenóis. Estudos experimentais em modelos animais confirmaram que a presença de fenólicos na dieta, limitam o desenvolvimento de cânceres, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, diabetes e osteoporose (SCALBERT *et al.*, 2005). São muitas as propriedades atribuídas aos compostos fenólicos, mas o grande interesse está relacionado às suas propriedades antioxidantes, por apresentarem habilidades redutoras ou sequestrante de radicais livres e quelantes de metais de transição. Essa capacidade ocorre através da formação de intermediários relativamente estáveis, devido ao efeito de ressonância característico de compostos que apresentam anéis aromáticos em sua estrutura (SOUSA *et al.*, 2007).

O organismo normalmente produz espécies reativas de oxigênio (ERO), nitrogênio (ERN) e várias outras espécies que fazem parte do metabolismo humano e apresentam funções fisiológicas. Em situações em que ocorre o aumento do nível dessas espécies reativas, o próprio organismo é capaz de produzir enzimas com a finalidade de catalisar reações para inativar a ação das espécies radicalares, restabelecendo o equilíbrio celular. Porém alguns fatores fisiológicos podem interferir no desempenho do organismo, provocando um desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, favorecendo uma situação de estresse oxidativo, devido a predominância das espécies reativas (radicais livres) que promovem processos de envelhecimento, transformação e morte celular, consequentemente favorecendo a incidência de processos patógenos (HALLIWELL, 1994; VASCONCELOS *et al.*, 2007; ARUOMA, 1998). Considerando que substâncias fenólicas podem atuar contra essas espécies reativas através de vários mecanismos, como pelo processo de sequestro de radicais livres pela inibição da etapa de iniciação ou de propagação, interrompendo o processo oxidativo, através da proteção e regeneração de outros oxidantes, e também atuando na quelação de íons metálicos (CIÉSLIK, GREDA e ADAMUS, 2006; BRAVO, 1998; NACZK e SHAHIDIB, 2004), fica evidente a importância do estudo na análise da presença desses compostos em plantas que são amplamente utilizadas popularmente, bem como a avaliação da capacidade antioxidante. Esses estudos podem servir como parâmetro para outros estudos de atividade biológicas que apresentam relação com a atividade antioxidante.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver o estudo fitoquímico de *Endopleura uchi* Huber Cuatrecasas (Humiriaceae) através da preparação de extratos, frações e isolamento dos constituintes químicos, monitorados por ensaios de atividade biológica e antioxidante empregando sistemas "*in vitro*" e "*in vivo*".

3.2 Objetivo Específicos

- Isolar os constituintes químicos presentes nas cascas, folhas e galhos de *Endopleura uchi*;
- Elucidar e identificar a estrutura das substâncias isoladas através de técnicas de RMN ^1H , ^{13}C mono e bidimensionais e EM;
- Realizar testes químicos de atividade antioxidante por sequestro de radicais livres (DPPH) e capacidade redutora de ferro (FRAP) dos extratos e da bergenina;
- Realizar teste de atividade biológica *in vivo*: antiúlcera e *in vitro*: anti-inflamatória (inibição de NO^*);
- Quantificar a bergenina nos extratos das cascas, folhas e galhos de *Endopleura uchi* em época de chuva e seca;
- Quantificar bergenina em amostras de *Endopleura uchi* comercial;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- ✓ Moinho de facas: Marca desconhecida (CPPN/INPA).
- ✓ Balança analítica:
 - Marca Adventurer OHAUS – Toledo, modelo AR2140, limite 210 g.
- ✓ Balança semi-analítica:
 - Marca Adventurer OHAUS – Toledo, modelo ARC120, limite 3100 g.
- ✓ Evaporador Rotativo: Marca Fisatom 802, modelo 550.
 - Lâmpada UV: Marca Spectroline, modelo CX-20, ultraviolet fluorescence analysis cabinet. Onda longa (365 nm) e onda curta (254 nm) (CPPN/INPA).
- ✓ Ultrassom: Marca Ultrasonic, modelo USC 1400.
- ✓ Extrator tipo Soxhlet (CPPN/INPA).
- ✓ Liofilizador : Marca Christ, modelo ALPHA 2-4 LSC, Freeze Dryers/Colling System, Série: 16547.

4.2 Tratamentos dos solventes

Os solventes utilizados nesse trabalho foram de grau técnico e previamente destilados para extrações e fracionamentos dos constituintes químicos. Para análises espectrofotométricas foram utilizados metanol grau HPLC e água tipo Milli-Q e ácido trifluoroacético P.A.

4.3 Métodos cromatográficos

- *Cromatografia em camada delgada (CCD e CCD-RP-18)*

As análises cromatográficas em camada delgada foram realizadas em placas prontas de 20 x 20 cm de sílica gel 60 em alumínio de CCD (sílica, MERCK, F₂₅₄) ou cromatoplaças de CCD-RP-18 (fase reversa, MERCK, F₂₅₄). Com auxílio de um capilar de 2 µL os extratos devidamente solubilizados foram aplicados. Em seguida as amostras foram eluídas em uma cuba previamente saturada com o sistema de

solventes pré-determinados. Para visualização dos compostos presentes, as placas foram reveladas por iluminação com luz UV no comprimento de onda em 254 e 366 nm, com vapores de iodo e borrifadas com o revelador universal anisaldeído (WAGNER, *et al.*, 1984). Para revelação de classes de substâncias específicas foi utilizado NP-PEG (difetilaminoborato-polietilenoglicol) (WAGNER, *et al.*, 1984). Para flavonoides, DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) para antioxidantes, FeCl₃ para fenólicos e Dragendorff para presença de alcaloides (MATOS, 1997).

- Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

As análises em CCDP foram realizadas em cromatoplasmas de vidro de 20 x 20 cm e espessura de face de 1,5 mm. A preparação das placas consistia em utilizar 60g de sílica de gel 60 com gesso (MERCK, PF₂₅₄) seguida de sua homogeneização com 150 mL de água destilada. Posteriormente a mistura foi aplicada uniformemente sobre as placas. Após a evaporação da água em temperatura ambiente, as placas foram ativadas a 80 °C por duas horas.

4.4 Métodos espectrométricos

Espectrometria de massas de alta resolução

A análise espectrométrica foi realizada na USP de Ribeirão Preto em colaboração com o Dr. Norberto Peporine Lopes e do especialista em massas José Carlos Tomaz, utilizando um Espectrômetro de Massa de Alta Resolução, marca Bruker Daltonics, modelo II - ESI-TOF Mass Spectrometer, fluxo de 180 µl/h, utilizando metanol grau HPLC como fase móvel para solubilização. Foi necessária a calibração interna com uma solução de NA-TFA a 10 mg / ml (TOF) antes de realizar as análises. Condições do equipamento: *end Plate*: 500 volts; *capillary*: 4500 volts; *capillary exit*: 70 volts; *skimmer 1*: 40.7 volts; *skimmer 2*: 23 Volts; *transfer*: 80µs; com detecção no modo positivo.

4.5 Método espectroscópico

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono foram obtidos de um espectrômetro da marca Varian modelo INOVA 500 de 11,7 T, operando na frequência de 500 MHz (RMN ^1H) e 125 MHz (RMN ^{13}C) utilizando CDCl_3 ou CD_3OD como solvente (Cambridge Isotope Laboratories Inc.), em colaboração com o Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA).

4.6 Fitoquímica desenvolvida com *Endopleura uchi*

4.6.1 Coleta e identificação botânica da espécie

A coleta da espécie *Endopleura uchi* identificada a partir de exsicatas depositadas no herbário do INPA sob o número 210503 foi realizada na Reserva Ducke do INPA, localizada no KM 26 da estrada AM 010, a coleta do material vegetal no período de seca em 11 de outubro de 2010 (1ª Coleta) e também no período chuvoso em 16 de abril de 2011 (2ª Coleta). As partes vegetais coletadas foram cascas, galhos e folhas.

4.6.2 Secagem / moagem

O material foi transferido para estufa e permaneceu por 48 horas à temperatura de 35°C para eliminação de umidade. Após esse procedimento, o material vegetal seco foi separado, cortado e posteriormente moído em moinho de facas (CPPN/INPA). A serragem resultante foi acondicionada em sacos plásticos e posteriormente utilizada para a realização das extrações.

4.6.3 Preparo dos extratos

Os extratos obtidos de cada procedimento foram filtrados e concentrados por evaporação rotatória sob pressão reduzida utilizando um banho de temperatura controlada (40° C) e liofilizados. Posteriormente foram calculados os seus rendimentos de extração. As extrações foram realizadas com o material vegetal de *Endopleura uchi* (cascas, galhos e folhas) das duas coletas.

Os teores de extrativos dos extratos metanólicos, aquosos e etanólicos obtidos foram determinados conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Teor de extrativo (\%)} = \frac{\text{massa do extrato (g)}}{\text{massa da serragem inicial(g)}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

4.6.4 Extrato em metanol

Com a finalidade de extrair os constituintes químicos da espécie, a serragem foi transferida para cartuchos de papel filtro e então submetida à extração em aparelhagem tipo soxhlet, utilizando metanol como solvente extrator renovando-se o solvente a cada 6h, totalizando 18 horas de extração.

Tabela 3. Rendimento dos extratos metanólicos de *Endopleura uchi*

Parte vegetal	Código	1ª Coleta		2ª Coleta	
		Amostra (g)	Rend. (%)	Amostra (g)	Rend. (%)
<i>Casca</i>	CEMe	14,0	13,5	12,4	13,7
<i>Galho</i>	GEMe	25,1	13,8	11,5	12,7
<i>Folha</i>	FEMe	30,1	16,6	14,5	16,0

4.6.5 Extrato aquoso

Os extratos aquosos foram obtidos pela extração do material vegetal por decocção conforme o uso popular. Foram utilizados 30 g do material que foram extraídos em 500 mL de água destilada até atingir seu ponto de ebulição e mantendo o aquecimento por 5 minutos.

Tabela 4. Rendimento dos extratos aquosos de *Endopleura uchi*

Parte vegetal	Código	1ª Coleta		2ª Coleta	
		Amostra (g)	Rend. (%)	Amostra (g)	Rend. (%)
<i>Casca</i>	CEA	3,2	10,6	3,0	9,9
<i>Galho</i>	GEA	3,0	10,1	2,8	9,3
<i>Folha</i>	FEA	4,8	15,9	4,3	14,1

4.6.6 Extrato em etanol

O material vegetal também foi submetido à extração a frio em etanol absoluto. 40 g de serragem foram imersa em 400 mL de etanol e extraída por três vezes no ultrassom por 15 minutos cada. Ao fim das extrações no ultrassom, a serragem foi então extraída por maceração durante um dia.

Tabela 5. Rendimento dos extratos etanólicos de *Endopleura uchi*

Parte vegetal	Código	1ª Coleta		2ª Coleta	
		Amostra (g)	Rend. (%)	Amostra (g)	Rend. (%)
Casca	CEE	2,4	6,0	3,2	8,0
Galho	GEE	2,2	6,0	2,7	6,8
Folha	FEE	5,6	14,0	4,6	12,0

4.6.7 Partição líquido-líquido dos extratos metanólicos

Os extratos metanólicos obtidos foram submetidos a um pré-fracionamento por partição líquido-líquido com grau crescente de polaridade por três vezes cada, iniciando com hexano, seguida da partição com clorofórmio e acetato de etila, com a finalidade de separar metabólitos secundários através de suas polaridades (Figura 7).

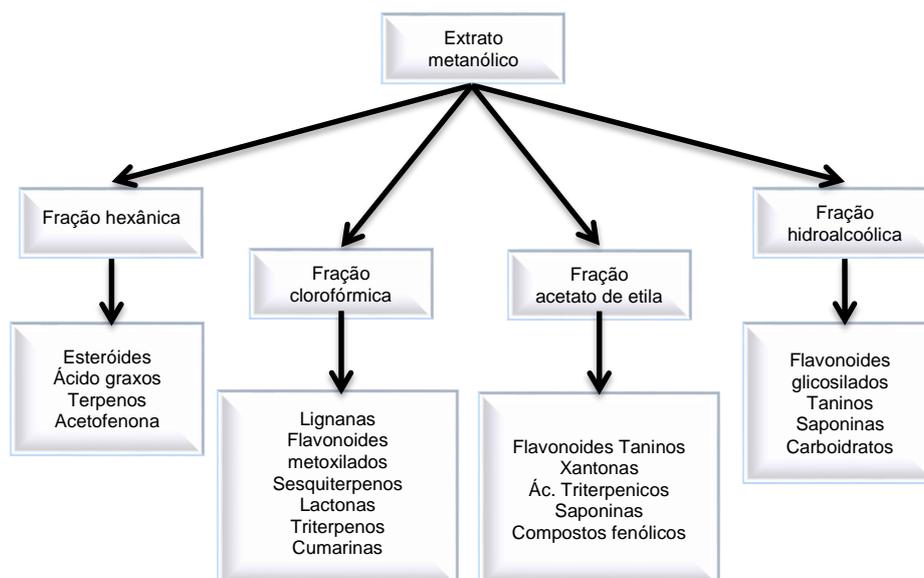


Figura 7. Fracionamento líquido-líquido dos extratos metanólicos (YUNES e CALIXTO, 2001)

O extrato metanólico bruto foi solubilizado em uma mistura de metanol/água (9:1) e transferido para um funil de separação. Em seguida a fração hidroalcoólica foi particionada por 3 vezes com hexano (1:1- v/v), obtendo-se uma fração hexânica. À fração hidroalcoólica foi adicionado um volume de água até atingir a proporção 7:3 (MeOH/H₂O), logo em seguida foi feito o mesmo procedimento, utilizando dessa vez o clorofórmio como solvente de média polaridade e obtido a fração clorofórmica. Por último, o volume foi novamente ajustado adicionando-se uma quantidade de água até atingir a proporção 1:1 (MeOH/H₂O) e particionado com acetato de etila, resultando na fração acetato de etila e também na fração hidroalcoólica (Tabela 6).

Tabela 6. Rendimentos das partições líquido-líquido dos extratos metanólicos da época de chuva.

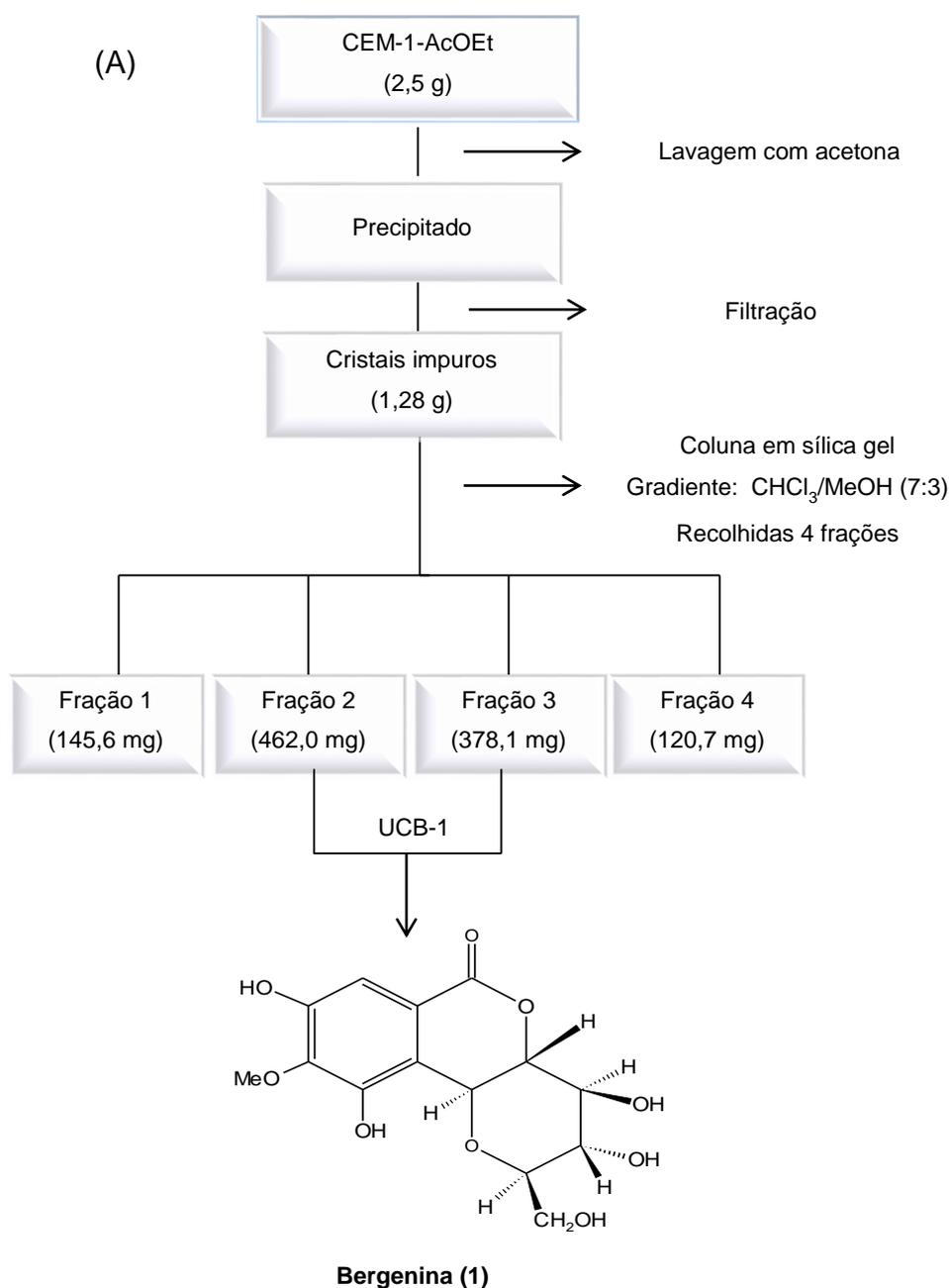
Frações	1ª Coleta					
	CEMe-1: 14,0 g		GEMe-1: 9,8 g		FEMe-1: 10,0 g	
	Massa (g)	Rend. (%)	Massa (g)	Rend. (%)	Massa (g)	Rend. (%)
<i>Hexano</i>	0,3	1,9	0,2	2,0	0,5	5,6
<i>Clorofórmio</i>	1,1	7,2	1,1	11,2	1,2	12,9
<i>Acetato de etila</i>	2,5	16,8	1,6	16,3	1,7	17,3
<i>Hidroalcoólica</i>	9,9	66,2	4,9	50,0	6,4	64,0

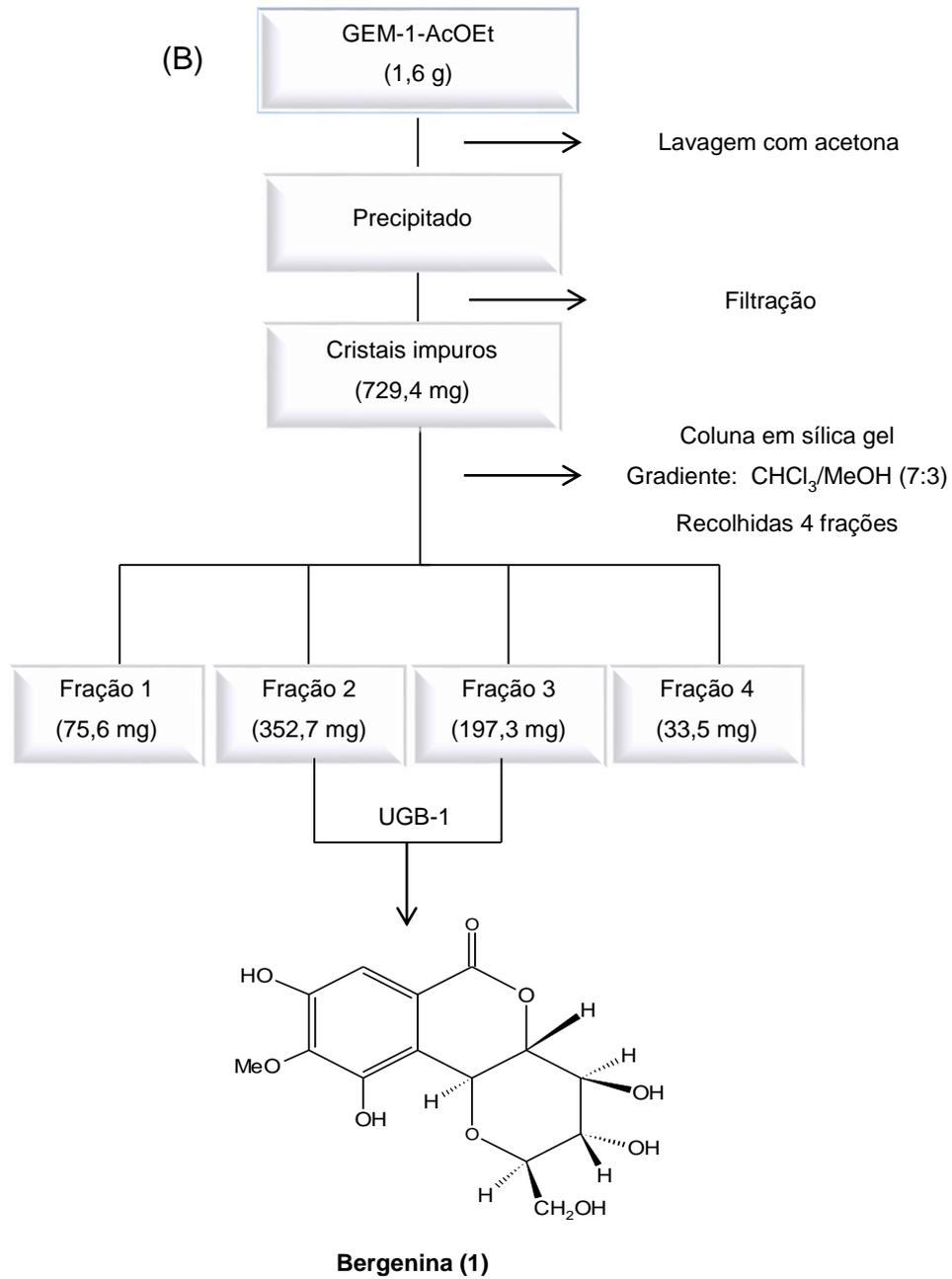
4.6.8 Separação cromatográfica

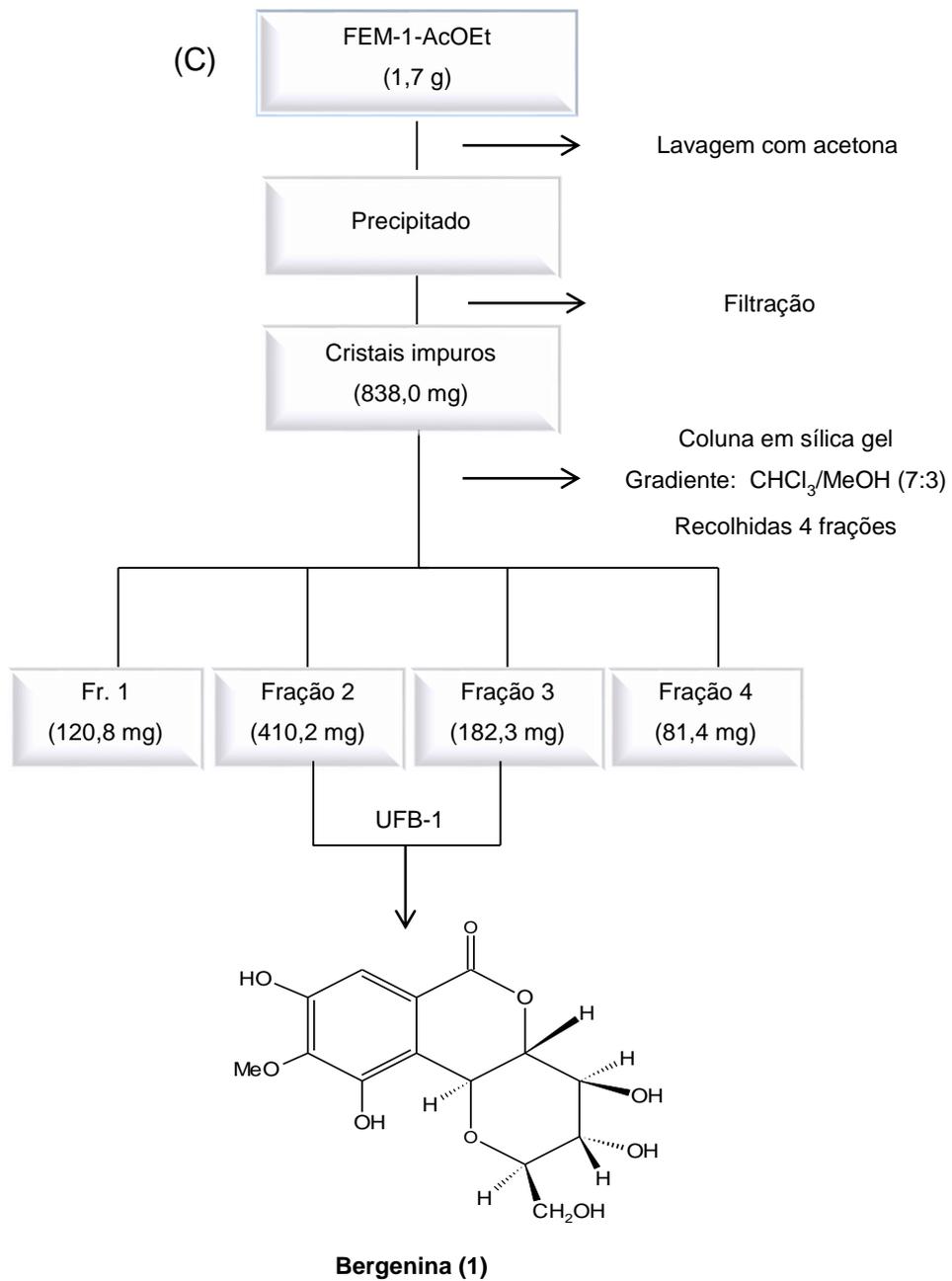
4.6.8.1 Fracionamento da fase acetato de etila dos extratos metanólico de *Endopleura uchi*

As frações obtidas da partição líquido-líquido foram analisadas em CCD e comparadas com o padrão de bergenina isolada de um projeto de PIBIC dentro do nosso grupo de pesquisa. Foi observado que a bergenina apresentava uma mancha de cor mais intensa nas frações acetato de etila ao ser revelado em anisaldeído. Ao ser analisada a solubilidade do padrão de bergenina, verificou-se pouca afinidade com acetona. Então foi adicionado acetona à fração acetato de etila da casca, resultando em um material precipitado que foi separado por filtragem em papel de filtro, lavado continuamente com acetona e posteriormente seco. A análise do precipitado em CCD em comparação com o padrão evidenciou a presença de poucas impurezas. O precipitado foi então submetido a um fracionamento cromatográfico utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (0,063 – 0,2 mm; ϕ x h

= 3,3 x 34,5 cm) e como fase móvel o sistema isocrático $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:3, 300 mL) monitorada por CCD, resultando em 4 frações, das quais os cristais das frações 2 e 3 apresentaram o mesmo RF e conseqüentemente reunidas e designadas como UCB-1 (840,1 mg). (Esquema 6). O mesmo procedimento foi realizado com as frações acetato de etila dos galhos e folhas de *Endopleura uchi*, sendo obtido os mesmos cristais designados como UGB-1 (550,0 mg) e UFB-1 (592,5 mg).



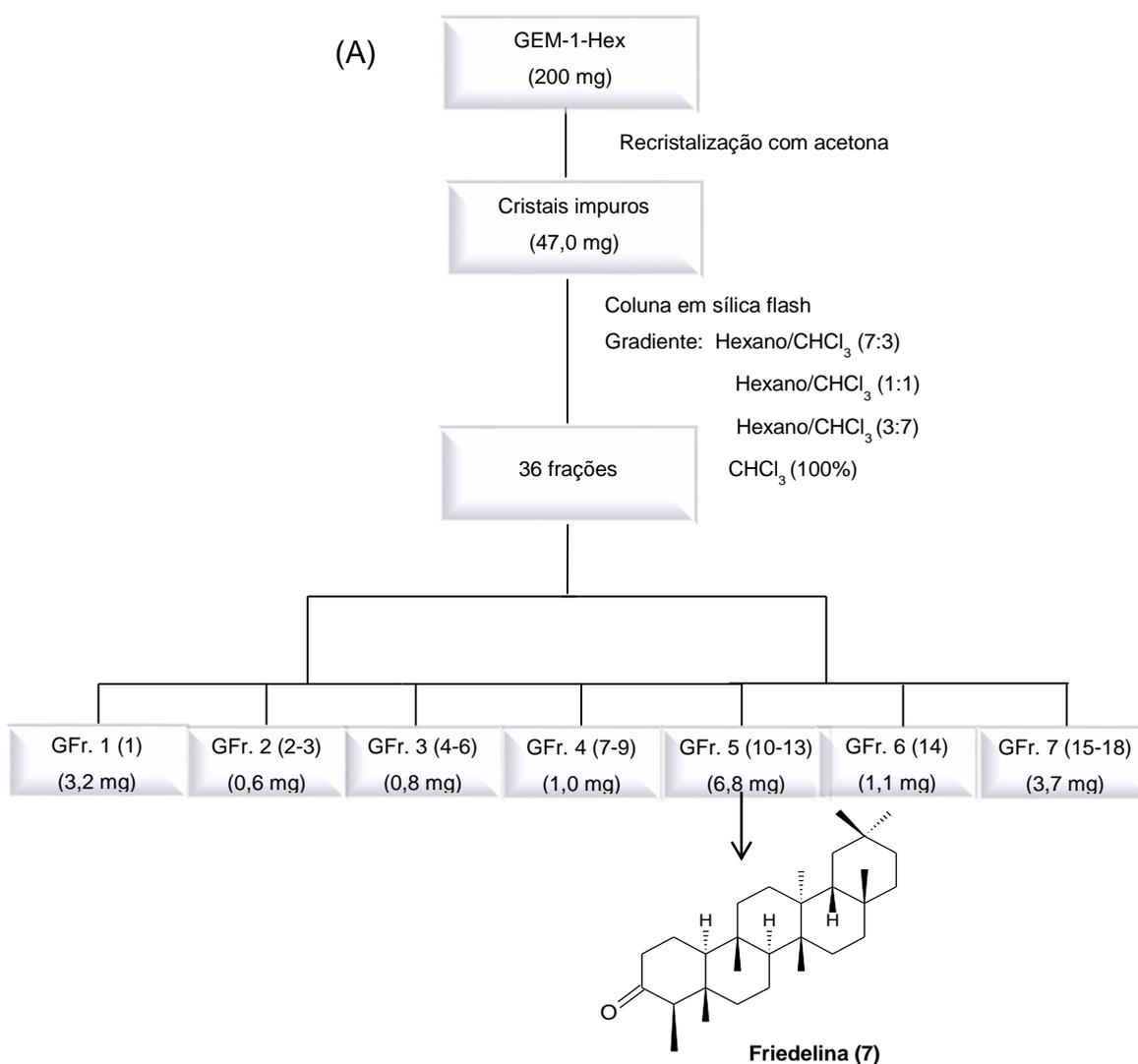


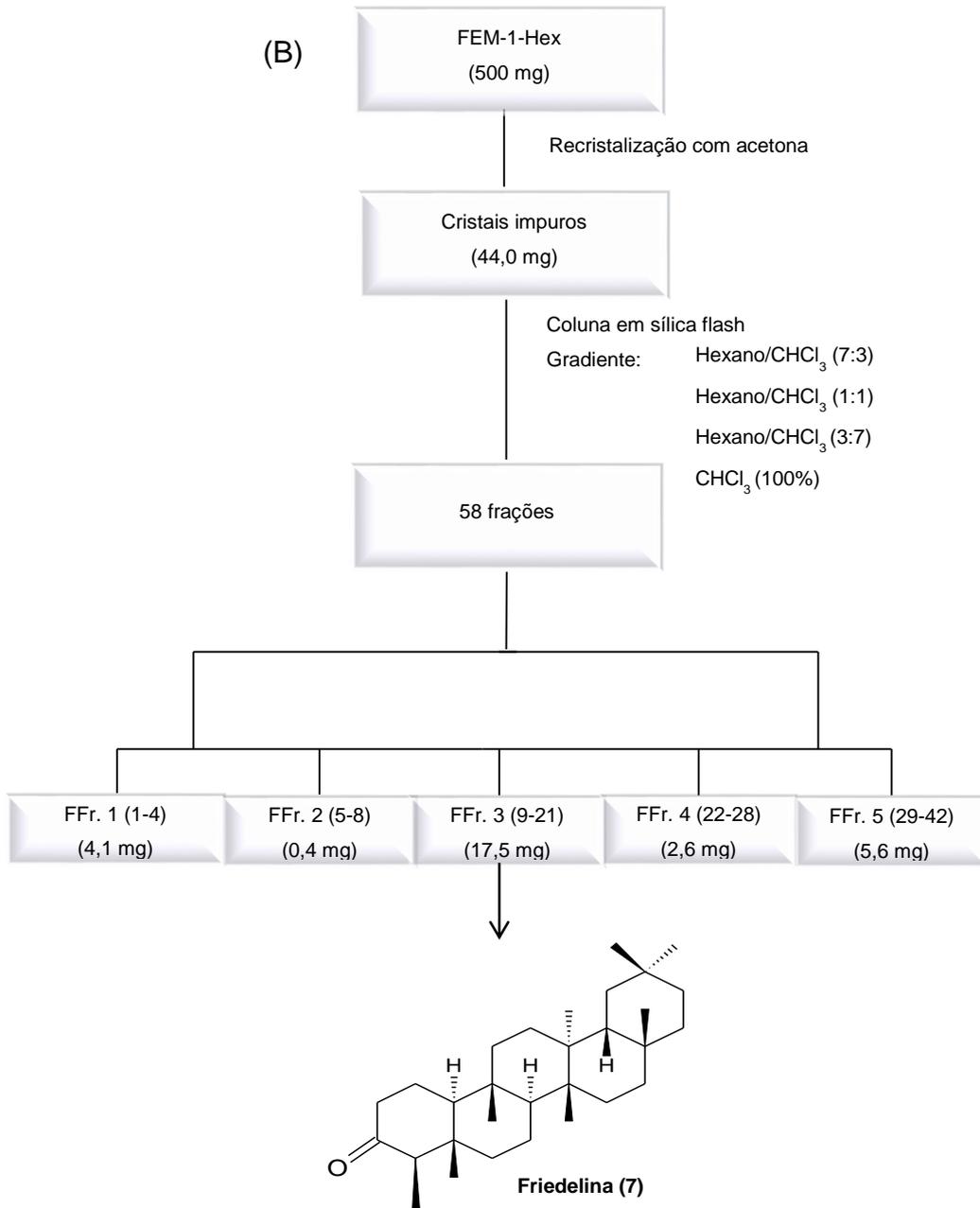


Esquema 6. Processo de separação cromatográfica dos cristais impuros obtidos da fração em acetato de etila do extrato metanólico das cascas (A), galhos (B) e folhas (C) dos de *Endopleura uchi*.

4.6.8.2 Fracionamento das frações hexânicas dos extratos em metanol dos galhos e folhas de *Endopleura uchi*

A fração hexânica dos galhos (GEM-1-Hex = 200 mg) foi recristalizada em acetona e posteriormente submetida a lavagem com acetona e foram obtidos 47 mg de cristais impuro. Esse material posteriormente foi submetido ao processo de separação em coluna de flash (40 – 63 μm) e eluída em Hexano / CHCl_3 (7:3), Hexano / CHCl_3 (1:1), Hexano / CHCl_3 (3:7) e CHCl_3 100 %. Foram obtidas um total 36 frações que foram analisadas em CCD e reunidas em outras 16 subfrações. A subfração 5 (6,8 mg) apresentou-se como um material cristalino que após análises dos dados espectroscópicos foi identificada como sendo um triterpeno conhecido como friedelina (**7**). O mesmo procedimento foi realizado com a fração hexânica das folhas (FEM-1-Hex = 500 mg) (Esquema 7)





Esquema 7. Separação cromatográfica da fração clorofórmica dos galhos (A) e folhas (B) de *Endopleura uchi*.

4.9 Quantificação de bergenina nos extratos de *Endopleura uchi* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.9.1 Sistema cromatográfico

A quantificação da bergenina nos extratos foi realizada em um cromatógrafo líquido da marca SHIMADZU Prominence LC-20A, equipado de uma bomba quaternária LC-10AT Vp, com um injetor automático SIL-20A, detector UV-Vis-DAD SPD-M20A e software LC Solutions.

4.9.2 Método em modo reverso

O método foi desenvolvido em modo reverso utilizando coluna LiChrospher 100 RP-18e, com partículas de tamanho de 5 µm, 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno. Como fase móvel foi empregado metanol grau HPLC e solução de trifluoroacético (TFA) pH = 2,0 na proporção 2:8 (MeOH/TFA). O volume de injeção foi de 50 µL.

4.9.3 Preparação da curva analítica padrão de bergenina

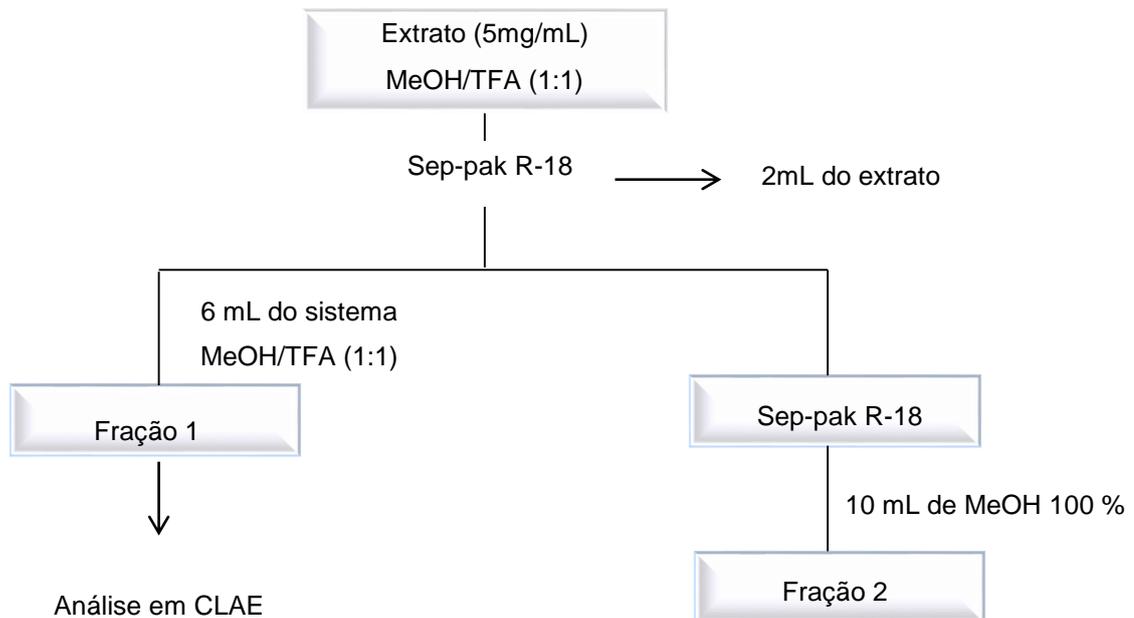
A quantificação dos extratos foi realizada pelo método de padrão externo utilizando bergenina como padrão. As curvas analíticas foram construídas a partir de solução-padrão na concentração de 200 µg/mL sendo diluída até a concentração de 6,25 µg/mL resultando em 6 concentrações. O padrão foi analisado nos comprimentos de onda de 215, 254 e 272 nm e injetado em duplicata em três dias consecutivos (*inter-day*). A concentração do padrão nos extratos foi calculada por regressão linear através da equação da reta ($y = ax + b$; em que y é a área do pico, x é a concentração em µg/mL) obtida da curva analítica resultante da plotagem da média das áreas versus a concentração do padrão. O teor da bergenina nos extrato foi calculado através da seguinte equação:

$$\% \text{ bergenina} = (cbe \cdot tee) / cea, \text{ onde} \quad (\text{Equação 2})$$

cbe = concentração de bergenina no extrato; tee = teor de extrativo do extrato; cea = concentração do extrato analisado (250 µg/mL);

4.9.4 Pré-tratamento dos extratos de *Endopleura uchi*

Os extratos metanólicos e aquosos foram submetidos a um pré-tratamento em cartucho SEP-PAK C₁₈ Cartridge. Para cada extrato foi preparado uma concentração de 5 mg/mL no sistema MeOH/TFA pH = 2,0 (1:1) sendo posteriormente submetido ao pré-tratamento conforme Esquema 8.

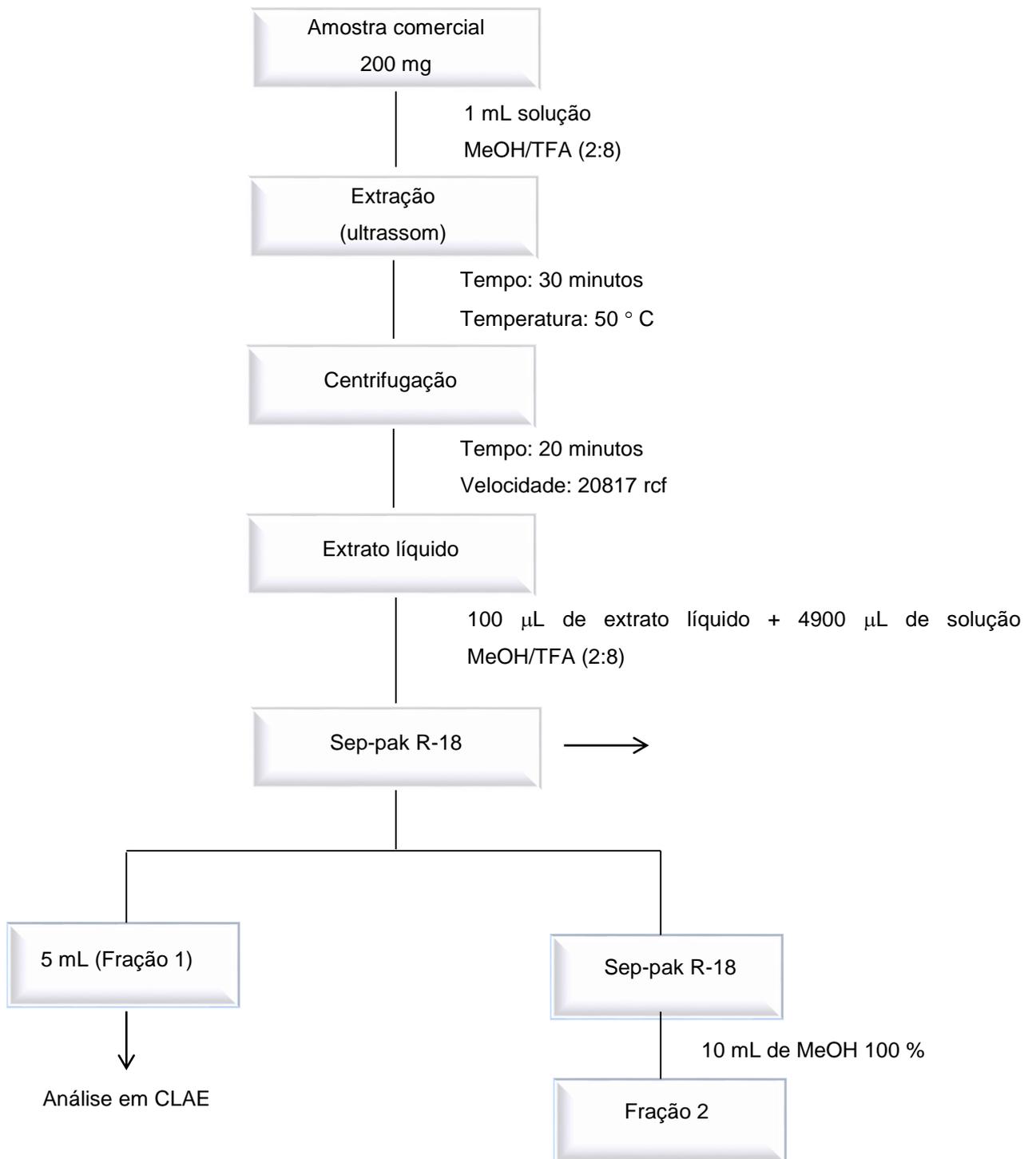


Esquema 8. Pré-tratamento dos extratos para análise em CLAE.

As frações 1 e 2 obtidas de cada extrato foram analisadas em CCD-RP-18 utilizando como fase móvel o sistema de eluição MeOH / H₂O (6:4) juntamente com o padrão para a confirmação da presença de bergenina. Apenas na fração para análise em CLAE (fração 1) mostrou a presença bergenina. A fração obtida de cada extrato foi seca e preparada na concentração de 250 µg/mL, filtrada em filtro Millipore de 0,2 µm e analisada em duplicata, e quantificadas pelo método do padrão externo.

4.9.5 Pré-tratamento das amostras comerciais de *Endopleura uchi*

As amostras das cascas de *Endopleura uchi* comercial foram processadas e peneiradas de forma que todas apresentassem a mesma granulometria para comparação. Com base no pré-tratamento desenvolvido para os extratos de *Endopleura uchi*, alguns passos foram acrescentados para otimização e agilização do processo. Vários procedimentos de extração foram realizados utilizando ultrassom, sendo testado a variação da proporção do sistema de análise em CLAE (MeOH / TFA pH =2), tempo e temperatura. A melhor condição de extração foi no sistema MeOH / TFA pH =2 (2:8), que é o mesmo sistema para análise do padrão em CLAE, com tempo de extração de 30 minutos à temperatura de 50 °C. A média das massa dos extratos obtidos foi de 25,8 mg com teor de extrativos de 12,6 %. A concentração para análise das amostras após o pré-tratamento foi de 516,0 µg/mL. Portanto, para o pré-tratamento das amostras comerciais, foram transferidos 200,0 mg da serragem para um eppendorf (2 mL) e acrescentou-se 1 mL da solução de análise em CLAE (MeOH / TFA, pH = 2) na proporção 2:8 e em seguida submetida à extração em ultrassom nas condições descrita anteriormente. Ao fim do processo de extração as amostras foram centrifugadas por 20 minutos à temperatura de 15 °C em uma rotação de 20817 rcf. Em seguida 100 µL do extrato foi submetido ao pré-tratamento utilizando cartucho SEP-PAK C₁₈ Cartridge eluída no sistema MeOH/TFA (2:8) até volume final de 5 mL. Por fim a amostra foi filtrada em filtro Millipore de 0,2 µm e analisada em duplicata, e quantificadas pelo método do padrão externo (Esquema 9).



Esquema 9. Processo de extração e pré-tratamento das amostras comerciais de *Endopleura uchi*.

4.10 Quantificação de fenólicos totais

Os antioxidantes são utilizados no organismo, principalmente, para retardar ou prevenir a oxidação do substrato envolvido nos processos oxidativos, impedindo a formação de radicais livres. Os antioxidantes apresentam tal propriedade por constituírem uma estrutura fenólica (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). Visto que a estrutura fenólica está diretamente ligada à atividade antioxidante, foi realizado preliminarmente ensaios químicos de dosagem de fenólicos totais para a realização posterior dos testes de atividade antioxidante.

A quantificação de fenólicos totais nos extratos de *Endopleura uchi* foi determinada através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (VELIOGLU *et al*, 1998) que utiliza o ácido gálico como padrão de referência.

O método utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu, que consiste de mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+ porém, em presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se o molibdênio azul e o tungstênio azul devido a mudança de oxidação para 5+, (Figura 8) (NACZK & SHAHIDI, 2004; IKAWA *et al.*, 2003) onde sua intensidade é medida a 725 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (Femto 800XI).

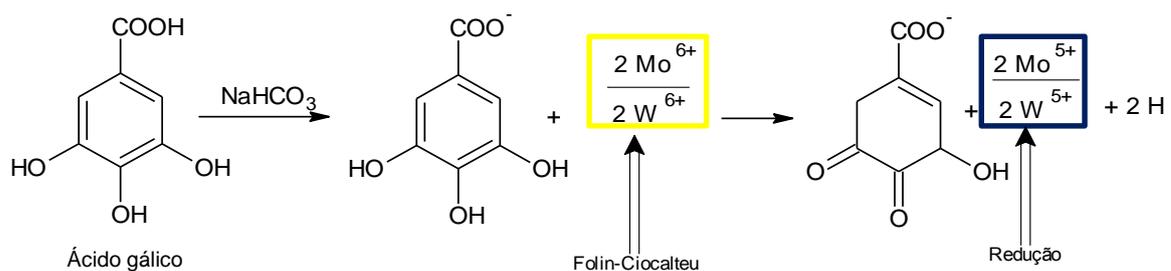


Figura 8. Reação de redução do reagente Folin-Ceocalteu pelo ácido gálico.

Procedimentos:

\propto *Curva analítica do padrão de ácido gálico:* Foi preparado ácido gálico em metanol (grau HPLC) na concentração de 1 mg/mL e então diluída sucessivamente nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,62 $\mu\text{g/mL}$ em triplicata.

∞ *Amostras:* para análise dos extratos/frações, as amostras foram solubilizadas em metanol (grau HPLC) na concentração de 1,0 mg/mL.

∞ *Reagentes:* foi preparado uma solução aquosa (Milli-Q) de bicarbonato de sódio (60 g/L) e do reagente Folin-Ciocalteu (diluído 10 vezes) em água Milli-Q.

∞ *Metodologia:* O ensaio consistiu em transferir 200 µL da amostra (ácido gálico, extrato ou fração) para um frasco âmbar e em seguida adicionar 1,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 5 minutos, foi adicionado 1,5 mL de solução de bicarbonato de sódio, e incubou-se a mistura por 90 minutos. Após o término da reação, a absorbância foi medida no comprimento de 725 nm em um Espectofotômetro UV/Vis (Femto 800XI). O branco é obtido com 3,0 mL de água milil-Q.

∞ *Quantificação do teor de fenólicos totais:* As absorbâncias obtidas das amostras, foram interpoladas na curva analítica do padrão de ácido gálico, e calculou-se o teor de fenólicos totais inicialmente expressos em miligramas (mg) de ácido gálico por mL e em seguida levando em consideração a massa inicial (1 mg) da amostra e seu rendimento, sendo o resultado expresso em mg Equivalente em Ácido Gálico por grama de extrato seco (EAG mg/g de extrato seco). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.11 Ensaio de atividade antioxidante

4.11.1 Pelo sequestro de radicais livres (DPPH)

Preliminarmente foi realizado o ensaio qualitativo em que as amostras após aplicadas em placas cromatográficas e eluídas em sistemas de solventes apropriados, foram nebulizadas com DPPH em solução metanólica (0,2 mg/mL) e exposta à luz ultravioleta no comprimento de onda em 254 nm, onde foi identificado a atividade conforme a intensidade da coloração amarela produzida e então a amostra foi submetida ao experimento quantitativo.

O método fotométrico para avaliação da atividade antioxidante (MENSOR *et al.*, 2001) utiliza como fonte de radical livre o DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazila), considerado estável devido ao deslocamento de um elétron não compartilhado em toda molécula. O deslocamento também confere a coloração violeta com um máximo

de absorção em 517 nm. Quando a solução de DPPH (violeta) está na presença de uma substância capaz de doar um átomo de hidrogênio (antioxidante), o radical DPPH passa à sua forma reduzida, caracterizada pela perda da coloração violeta para amarela. O ensaio quantitativo avalia a habilidade que uma substância ou mistura de substâncias tem de sequestrar o radical livre estável DPPH (Figura 9) que é observado através do descoramento das diluições da amostra de cor violeta, podendo ser determinado a capacidade da amostra de sequestrar 50% de radicais livres de DPPH, por meio da leitura das absorbâncias a 518 nm. Os valores obtidos são comparados com o padrão positivo quercetina (BRAÇA *et al.*, 2002; CHOI *et al.*, 2002). O método por sequestro de radicais livres (DPPH) tem aplicação em substâncias de média e alta polaridade (KOLEVA *et al.*, 2002).

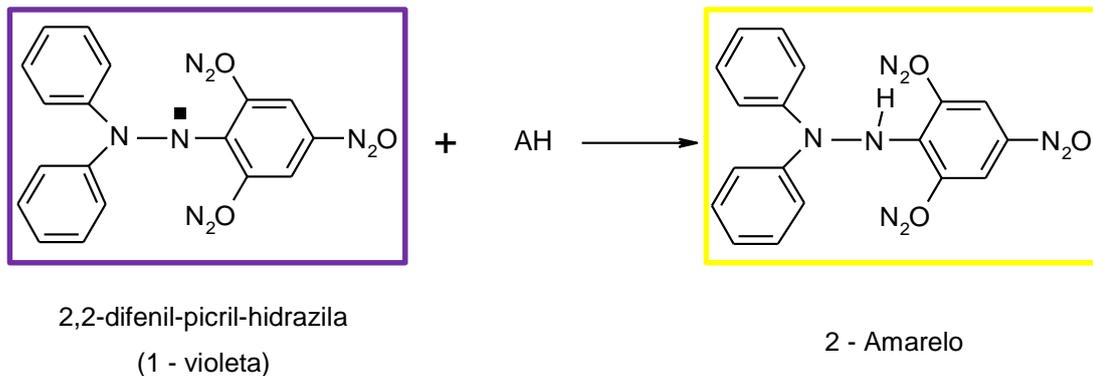


Figura 9. Reação entre o radical livre (DPPH) e o antioxidante.

Foi feito um ensaio preliminar para determinar a faixa de concentração dos extratos para verificar a resposta linear da concentração em função da absorbância, e conseqüentemente calcular a capacidade de sequestro de 50 % (CS₅₀) dos radicais livres. A partir das soluções metanólicas das amostras preparadas (concentração de 1 mg/mL), foram feitas duas diluições, uma de 0,1 e outra de 0,01 mg/mL que determinou uma faixa de trabalho. A partir desses resultados, as amostras foram diluídas sucessivamente em metanol em diferentes concentrações resultando em um volume de 2,5 mL. O controle negativo foi preparado com 2,5 mL de metanol e 1,0 mL de DPPH. A cada solução preparada (amostra/controlado positivo e negativo) foi adicionado 1,0 mL de solução de DPPH e após o tempo 30 min de incubação na ausência de luz foi feita a leitura da absorbância no comprimento de onda a 518 nm. O branco das amostras é constituído com 2,5 mL da maior concentração das amostras mais 1 mL de metanol. As absorbâncias obtidas foram

convertidas em porcentagem da atividade antioxidante (AA%) usando a seguinte fórmula:

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

Após obter os valores das AA% de cada uma das amostras analisadas, foi construída uma curva onde a abscissa representa as concentrações do extrato testado e a coordenada representa a AA%. Resultando-se em uma equação da reta linear, onde o valor de y equivale a 50% necessária para sequestrar os radicais livres de DPPH (CS50). Para esse ensaio preparou-se uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,2 mg / mL e utilizou-se quercetina como controle positivo da atividade antioxidante, preparando-se soluções em metanol nas concentrações de 1,25 à 20 µg/mL.

4.11.2 Pela capacidade redutora do Ferro (FRAP)

Outro ensaio que também pode ser empregado para determinar a atividade antioxidante consiste na caracterização de extratos preparados de forma padronizada ou de substâncias puras isoladas através de um ensaio denominado FRAP (ferric reducing/antioxidant power assay). O método analisa a capacidade da amostra em reduzir, em pH baixo, o complexo Fe^{3+} -TPTZ (ferritripiridiltriazina) [2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina, $C_{18}H_{12}N_6$, M.M. 312,33 g/mol] a ferroso-tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ) por redutores, no caso, os antioxidantes presentes na amostra. A formação do complexo Fe^{2+} -TPTZ é observada pela intensa cor azul e pode ser monitorado, a 593 nm, em um espectrofotômetro (Figura 10) (BENZIE e STRAIN, 1996; LUXIMON-RAMMA *et al.*, 2002).

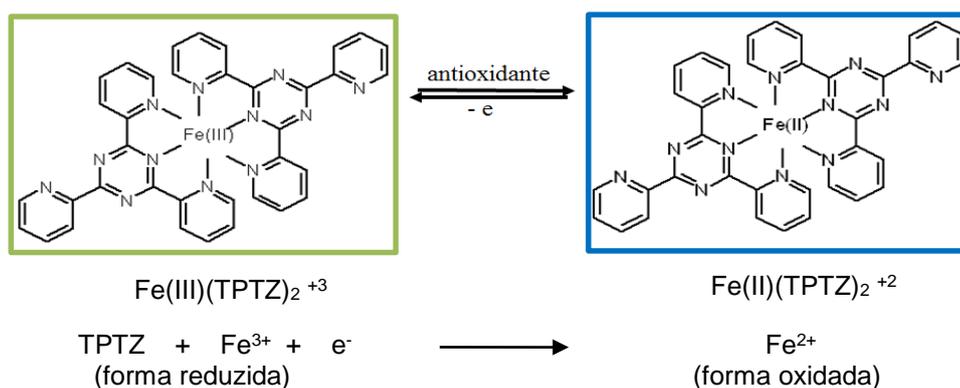


Figura 10. Reação de redução do complexo de Fe(III) para Fe(II).

A determinação da redução dos íons Fe^{+3} para Fe^{+2} pelas amostras é calculada por meio da construção da curva analítica de sulfato ferroso nas concentrações de 125 a 2000 μM segundo procedimento descrito por Luximon-Ramma (2002).

O reagente FRAP foi preparado fresco, sempre na proporção de 1:1:10 misturando-se 2,5 mL de solução de TPTZ (2,4,6- tripiridil-1,3,5-triazina, 10 mM) e 2,5 mL de solução de cloreto férrico (20 mM) em 25,0 mL de solução tampão de acetato de sódio 0,25 M e de $\text{pH} = 3,5$.

Foram transferidos 100 μL da amostra na concentração de 1 mg / mL para um frasco, adicionou-se 300 μL de água mili-Q, em seguida foi acrescentado 3,0 mL do reagente FRAP e incubou-se por quatro minutos para a leitura da absorbância no comprimento de onda a 593 nm. O branco foi obtido com 400 μL de água mili-Q com 3,0 mL de reagente FRAP. Os valores da concentração de Fe^{+2} encontrados foram obtidos por meio de regressão linear resultante da curva de calibração preparada com sulfato ferroso. Os valores de FRAP foram expressos em mmol de Fe(II) / mg extrato seco.

4.12 Atividade da supressão de óxido nítrico produzido por macrófagos murinos (J774)

O ensaio da atividade anti-inflamatória pelo método de supressão de óxido nítrico foi realizado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas sob coordenação do Dr. Emerson Silva Lima com a finalidade de avaliar a capacidade dos extratos e frações de *Endopleura uchi* em inibir a produção de óxido nítrico, um dos mediadores do processo da inflamação.

- Cultura de células

As células J774 macrófagos murínicos, foram obtidos do banco de células do Rio de Janeiro. O meio foi cultivado a 37 °C em incubadora umidificada com 5 % de CO_2 em meio RPMI 1640 contendo 10 % de soro bovino fetal (FBS), 50 U / mL de penicilina e 50 mg/mL de streptomycin (Invitrogen). Uma solução estoque de LPS foi preparado na concentração de 1 mg / mL em PBS estéril [137.0 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4 mM KH_2PO_4 , $\text{pH} 7.4$] e estocada a - 20 °C. As

amostras foram adicionadas ao meio de cultura antes do tratamento com LPS (CHAUDHURY *et al.*, 2006; GREEN *et al.*, 1982).

- *Medida da concentração de nitrito*

Após a pré-incubação das células (1×10^6 células / mL) com as amostras em diferentes concentrações (2,5; 5,0; 10,0 e 25,0 μg / mL), as células foram incubadas por 24 horas com o ativador de NO lipopolissacarídeo (LPS - 1 mg / mL), e também foi preparado um controle negativo com LPS e um branco sem LPS, a 37 °C em incubadora com 5% de CO₂. Posteriormente ao período de incubação, 50 μL do sobrenadante de cada poço foi transferido para uma nova placa e para determinação da produção de NO*, pelos macrófagos foi utilizado o método de Griess (CHAUDHURY *et al.*, 2006; GREEN *et al.*, 1982). Em cada poço foi adicionado 50 μL do reagente de Griess I (sulfalamina 0,05%) e após 5 minutos de reação foi adicionado 50 μL do reagente de Griess II (N-(1-naftill)-etilenodiamina dicloridrato 0,05%) e realizou-se as leituras das absorbâncias após 5 minutos num leitor de microplacas (DTX 800, Beckman) a 560 nm. As amostras foram analisadas em triplicatas. A concentração de nitrito foi determinada a partir de uma curva analítica de nitrito de sódio e os resultados foram expressos como sendo $\mu\text{M NO} / 1 \times 10^6$ de células.

4.13 Ensaio antiúlcera *in vivo*

O ensaio da atividade antiúlcera (*in vivo*) foi realizado no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Escola Paulista de Medicina, da UNIFESP em colaboração com o grupo do Prof. Antônio José Lapa sob supervisão da Dra. Caden Souccar.

A principal forma de ingestão do chá das cascas de *Endopleura uchi* é via oral, portanto, faz-se necessário a realização de um método que avalie o efeito do chá das diferentes partes vegetal (cascas, folhas e galhos) no sistema gástrico.

O modelo por estresse induzido a frio produz lesões hemorrágicas agudas da mucosa gástrica, semelhantes às úlceras induzidas por estresse no homem. Segundo o procedimento de Lapa e colaboradores (2003), o teste (Figura 11) é

realizado em camundongos (1) que são previamente pesados e identificados. O extrato vegetal, o controle positivo (carbenoxolone – 50 mg/Kg) ou o veículo (água de torneira 5 mL/Kg) é administrado por via oral (2). Após 1 hora dos tratamentos, imobilizar os animais com fita crepe em um contensor e mantê-los em câmara fria (a 4 °C) por 2 horas (3) e em seguida os animais são sacrificados (4). Após uma microcirurgia o estômago é localizado e retirado (5). A superfície externa do estômago é lavado e seccionado ao longo da pequena curvatura. O conteúdo gástrico é desprezado e a mucosa é delicadamente lavada com água destilada. Os estômagos são mantidos em béquer contendo solução salina gelada, até a inspeção em estereoscópio (6). O ensaio permite contar o número de úlceras e medir o seu tamanho, além de avaliar de forma semi-quantitativa, as lesões da mucosa gástrica que antecedem a ulceração, tais como cor, perda de pregas, petéquias, edemas, hemorragias, muco e a própria úlcera necrosada. Dessa forma o índice de lesão e o número de úlceras são determinados.



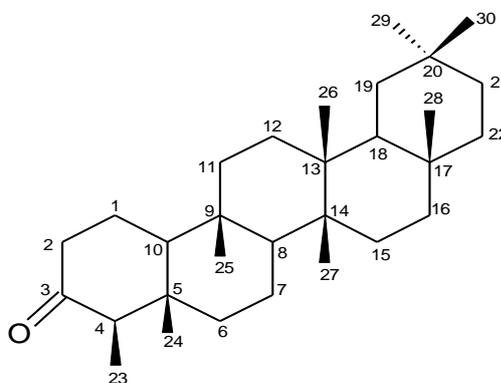
Figura 11. Procedimento da atividade antiúlcera *in vivo*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação e identificação das substâncias isoladas de *Endopleura uchi*

5.1.1 Friedelina

A substância obtida dos extratos hexânicos dos galhos (GFr.5) e folhas (FFr.4) de *Endopleura uchi*, apresentou-se na forma de um sólido branco amorfo, sendo positivo para o teste qualitativo em CCD para Liebermann-Burchard característico de terpenos. Através da análise por espectrometria de massas por *elétron-spray* (ESI-MS) em modo positivo, foi possível determinar a fórmula molecular do composto em $C_{30}H_{51}O$ correspondente a m/z 427,23 $[M+H]^+$. Os dados por espectrometria de RMN 1H e ^{13}C relacionados com os dados por espectrometria de massas em comparação com as informações descritas na literatura (ALMEIDA *et al.*, 2011; AKIHISA *et al.*, 1992) permitiram identificar um triterpeno, do tipo friedelano, caracterizado como 3-oxo-fridelano (friedelina).



7

No espectro de RMN 1H foi possível observar um duplo duplo dubleto em 2,39 e 2,30 ppm, que foram atribuídos aos hidrogênios H-2 e também a presença de um quarteto em δ 2,25 ($J_{4-23} = 6,5$ Hz) correspondente ao hidrogênio H-4. Os hidrogênios H-2 e H-4 são característicos de posição alfa ao grupo carbonila. Analisando o espectro na região acima de 3,00 ppm não foi possível verificar a presença de nenhum sinal, indicando dessa forma a ausência de ligações duplas ou ligações com hidroxilas, sugerindo que o esqueleto do terpeno fosse do tipo

friedelano (Anexo 5). Outro indicativo desse tipo de esqueleto é a presença de sinais referentes a sete singletos atribuídos às metilas terciárias em δ 1,18 (H-28), δ 1,05 (H-27), δ 1,01 (H-26), δ 1,00 (H-29), δ 0,96 (H-30), δ 0,89 (H-25) e δ 0,73 (H-24) e um dubleto em δ 0,88 ($J_{23-4} = 6,5$) referente aos hidrogênios H-23 de uma metila secundária (Figura 12). A identificação das oito metilas permitiu confirmar o triterpeno como sendo da série friedelano.

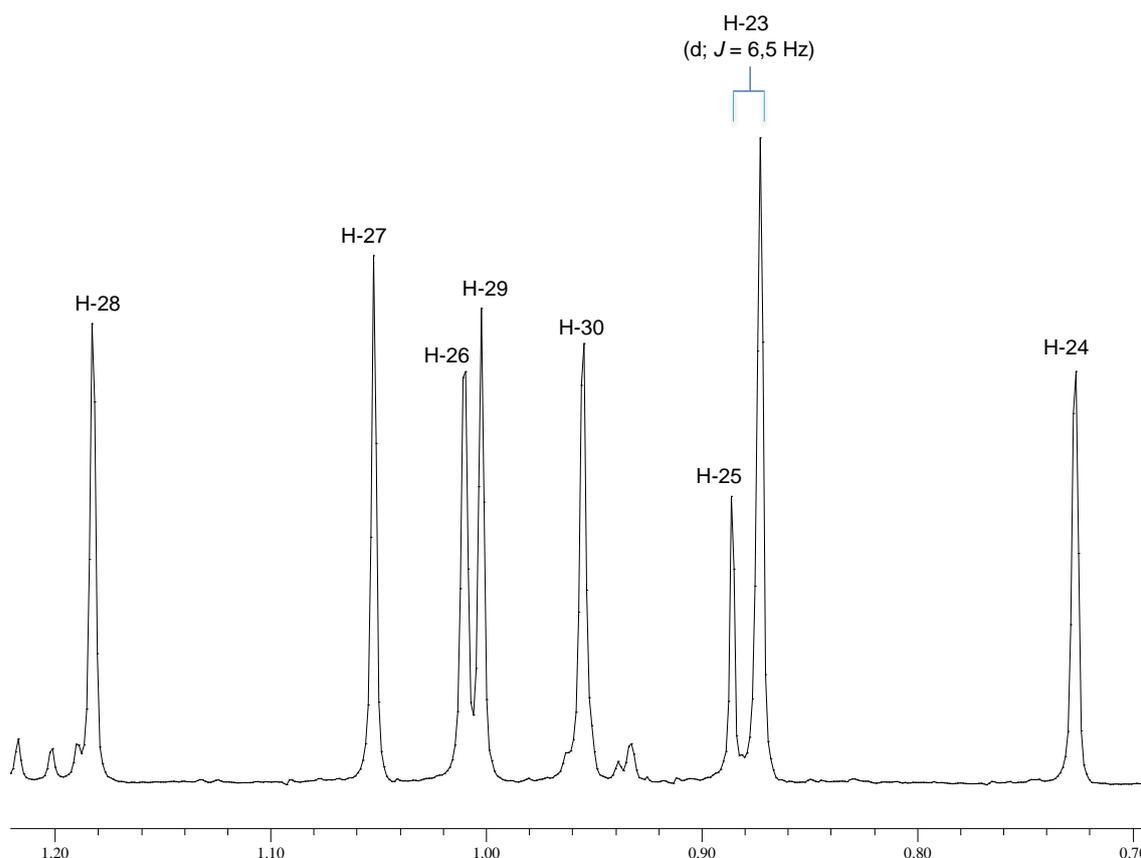


Figura 12. Ampliação na região de δ 0,70 a 1,2 do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) referentes às metilas.

O espectro de RMN ^{13}C evidenciou a presença de trinta carbonos do triterpeno, com sinais principais em δ 213,5 característico de um grupo cetona atribuído ao carbono C-3, sinais característicos de oito carbonos metílicos em δ 7,1 (C-23), δ 15,0 (C-24), δ 18,2 (C-25), δ 20,6 (C-26), δ 19,0 (C-27), δ 32,4 (C-28), δ 32,1 (C-29) e δ 35,3 (C-30), juntamente com os onze carbonos metilênicos, quatro carbonos metínicos e 6 carbonos não hidrogenados (Figura 13). A existência de um sinal com deslocamento anormalmente em campo baixo do carbono C-23, ou seja, a proteção do carbono, ocorre devido ao efeito de anisotropia pela presença da

carbonila no carbono C-3. Os deslocamentos relativamente desprotegidos observados em δ 41,8 e 58,5 foram atribuídos aos carbonos C-2 e C-4, devido à presença da carbonila.

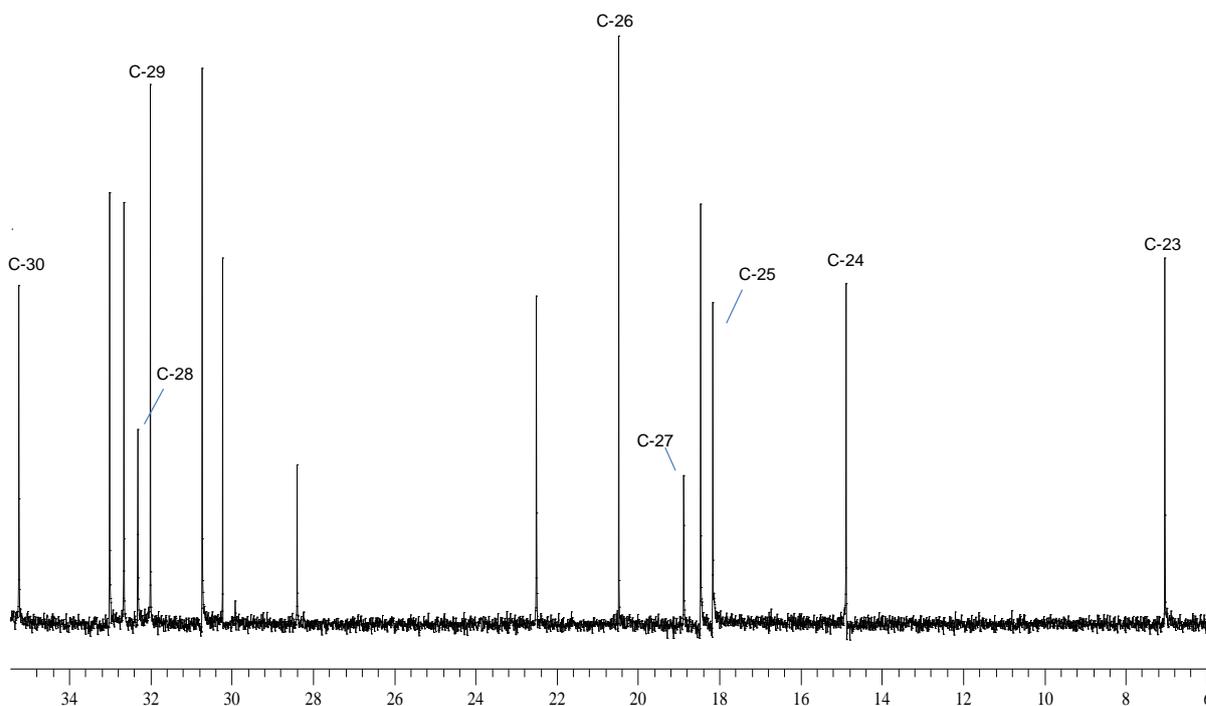


Figura 13. Ampliação na região de δ 6,0 a 35,5 do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD).

Os dados obtidos das análises dos espectros de ^1H e ^{13}C estão listados na Tabela 7 em comparação com aqueles da friedelina (ALMEIDA *et al.*, 2011; AKIHISA *et al.*, 1992), o que permitiram propor para a substância 7 (Página 11), a estrutura de um triterpeno pentacíclico da série friedelano, conhecido como friedelina.

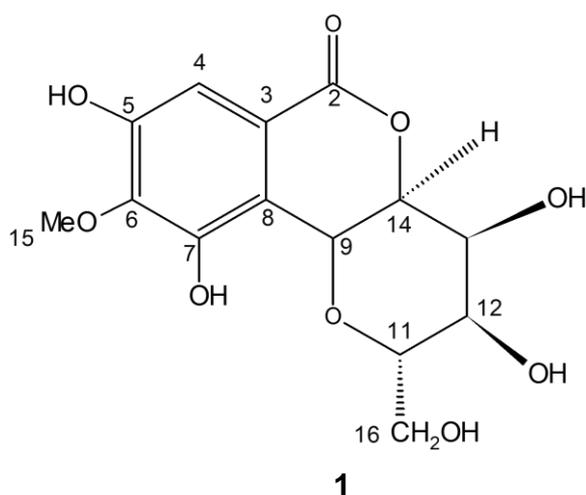
Tabela 7. Deslocamentos químicos observados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 7 (friedelina) em CDCl_3 .

Posição	δ_{H}	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{1,\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{2,\text{b}}$
1	1,97 (m; H-1a), 1,69 (dd; J = 13; 5, H-1b)	22,6	1,96 (m; H-1a), 1,68 (dq; J = 13,0; 5,1;H-1b)	22,3
2	2,40 (ddd; J = 14; 5; 2; H-2a), 2,30 (dd; 7,5; 13,5; 2H, H-2b)	41,8	2,39 (ddd; J = 13,7; 5,1; 1,9; H-2a), 2,29 (m; J = 13,8; 13,6; 6,5; H-2b)	41,5
3	-	213,5	-	213,2
4	2,25 (q; 6,5; 3H, H-4)	58,5	2,24 (q; J = 6,5; H-4)	58,2
5	-	42,4	-	42,1
6	1,76 (dd; J = 3; 16; 3H, H-6a), 1,28 (m; H-6b)	41,6	1,75 (m; H-6a), 1,27 (m; H-6b)	41,3
7	1,60 (m; H-7a), 1,48 (m; H-7b)	18,5	1,59 (m; H-7a), 1,47 (m; H-7b)	18,2
8	1,45 (m; H-8a), 1,40 (m; H-8b)	53,6	1,44 (m; H-8a), 1,39 (m; H-8b)	53,3
9	-	37,8	-	37,5
10	1,56 (m; H-10)	59,8	1,55 (m; H-10)	59,5
11	1,39 (m; H-11)	35,9	1,38 (m; H-11)	35,6
12	1,36 (m; H-12)	30,8	1,35 (m; H-12)	30,5
13	-	40,0	-	39,7
14	-	38,6	-	38,3
15	1,48 (m; H-15a), 1,28 (m; H-15b)	33,1	1,47 (m; H-15a), 1,27 (m; H-15b)	32,8
16	1,55 (m; H-16a), 1,37 (m; H-16b)	36,3	1,54 (m; H-16a); 1,36 (m; H-16b)	36
17	-	30,3	-	30
18	1,57 (m; H-18)	43,1	1,56 (m; H-18)	42,8
19	1,38 (m; H-19)	35,7	1,37 (m; H-19)	35,4
20	-	28,5	-	28,2
21	1,50 (m; H-21)	32,7	1,49 (m; H-21)	32,4
22	1,49 (m; H-22)	39,6	1,48 (m; H-22)	39,3
23	0,88 (d; J = 6,5 Hz; H-23)	7,1	0,87 (d; J = 6,5 Hz; H-23)	6,8
24	0,73 (s; H-24)	15,0	0,73 (s; H-24)	14,7
25	0,89 (s; H-25)	18,2	0,88 (s; H-25)	17,9
26	1,01 (s; H-26)	20,6	1,01 (s; H-26)	20,3
27	1,05 (s; H-27)	19,0	1,05 (s; H-27)	18,7
28	1,18 (s; H-28)	32,4	1,18 (s; H-28)	32,1
29	1,00 (s; H-29)	32,1	1,00 (s; H-29)	31,8
30	0,96 (s; H-30)	35,3	0,95 (s; H-30)	35

¹ALMEIDA *et al.*, 2011; ^a 500 MHz, CDCl_3 ; ²AKIHISA *et al.*, 1992, ^b 400 MHz, CDCl_3

5.1.2 Bergenina

A substância isolada a partir do fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila das cascas (UCB-1), galhos (UGB-1) e folhas (UFB-1) de *Endopleura uchi* apresentou-se como um sólido cristalino branco. Os dados dos espectros de RMN ^1H , experimentos mono e bidimensional, e ^{13}C , cujos deslocamentos químicos e correlações são apresentados na Tabela 8, juntamente com os dados dos espectros de massas foram comparados com dados da literatura (NUNOMURA *et al.*, 2009, NAZIR *et al.*, 2011) que indicou tratar-se de uma substância conhecida como bergenina, caracterizada pela presença de um anel aromático, um anel lactônico e um anel do tipo glicopiranosose. O mesmo composto foi isolado também das frações acetato de etila dos galhos e folhas e *Endopleura uchi*.



O espectro de RMN de ^{13}C mostrou a presença de 14 carbonos e observou-se sinais característicos para a distinção da estrutura. O deslocamento em δ_{C} 164,6 indica um sinal característico de uma carbonila (C-2) de um grupo éster e um deslocamento em δ_{C} 59,8 (C-15) indica um sinal característico de uma metoxila aromática. A metoxila foi confirmada pela observação no espectro de RMN ^1H da presença de um singlete com deslocamento em δ_{H} 3,91 com integração para três hidrogênios atribuído ao hidrogênio H-15 da metoxila. Como os carbonos em anéis aromáticos geram deslocamentos químicos entre 100 e 175, os deslocamentos de carbonos obtidos em δ_{C} 118,2 (C-3), δ_{C} 109,9 (C-4), δ_{C} 151,1 (C-5), δ_{C} 141,1 (C-6), δ_{C} 148,2 (C-7) e δ_{C} 116,0 (C-8) foram atribuídos aos seis carbonos aromáticos

(Figura 14). Os maiores deslocamento desses carbonos são atribuídos ao carbono C-5 e C-7 pela presença de hidroxilas e no carbono C-6 pela presença da metoxila. A presença dos 6 sinais diferentes para cada carbono do anel indica uma estrutura polissubstituída, sendo que cinco deles são carbonos do tipo *ipso* (carbono sem hidrogênio), e um carbono (C-4) que devido a maior intensidade entre eles indica que está ligado a um hidrogênio. O deslocamento no espectro de RMN ^1H em δ_{H} 7,08 com integração equivalente a um hidrogênio atribuído ao hidrogênio H-4 confirma a presença de apenas um hidrogênio aromático correspondente ao carbono C-4.

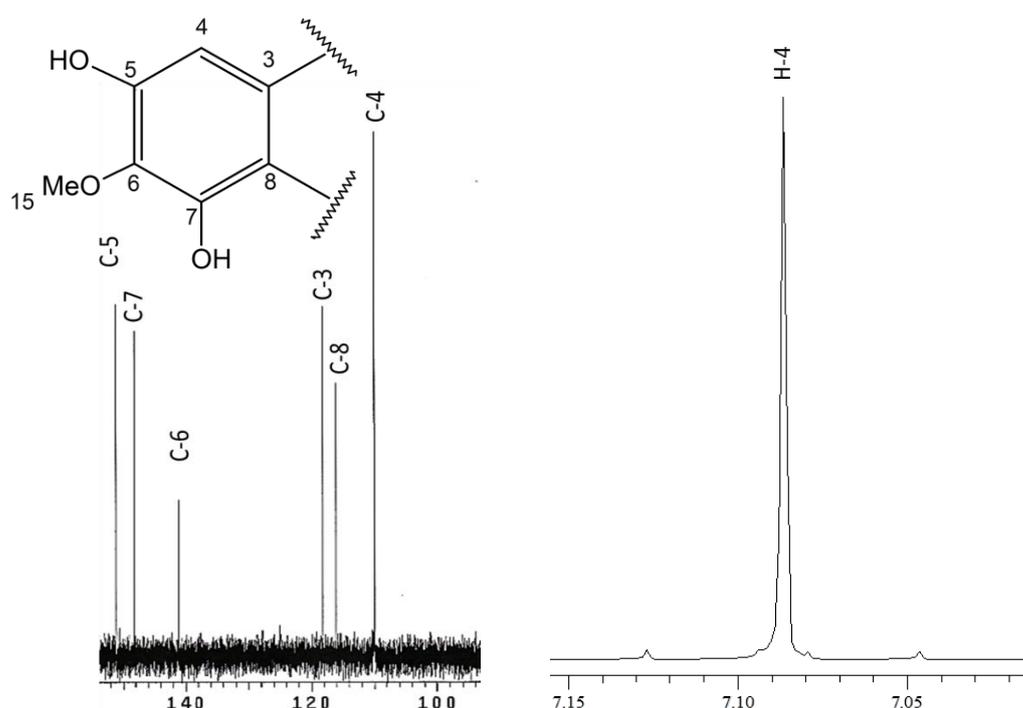


Figura 14. Ampliação na região de δ 109,9 a 151,1 do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) e ampliação de espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) na região de δ 7,15 a 7,05 da substância 1 (bergenina).

A presença de um carbono anomérico, proveniente do carbono redutor de um açúcar (Figura 15), geralmente indica deslocamento químico em campo mais baixo tanto para carbono entre δ_{C} 100 e δ_{C} 111, quanto para hidrogênio anomérico entre δ_{H} 4,5 e δ_{H} 5,9 (WARASHINA, NAGATANI e NORO, 2006; IGNOATO *et al.*, 2012), devido às ligações carbinólica e também oximetínica.

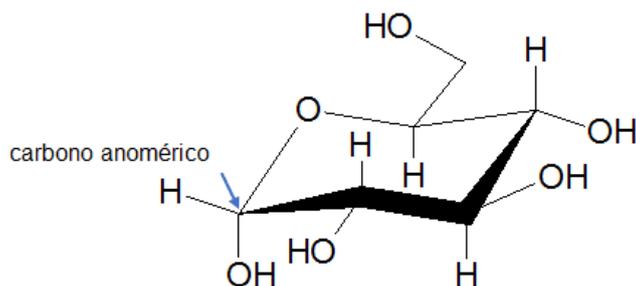


Figura 15. α -D-glicopirranose

Os dados obtidos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto mostraram a presença de um dubleto em δ_{H} 4,95 ($J = 10,0$ Hz, d) com integração para um hidrogênio correspondente ao H-9 e também a presença do deslocamento em δ_{C} 73,1 correspondente ao carbono C-9, ambos foram atribuídos ao átomo anomérico (Figura 16).

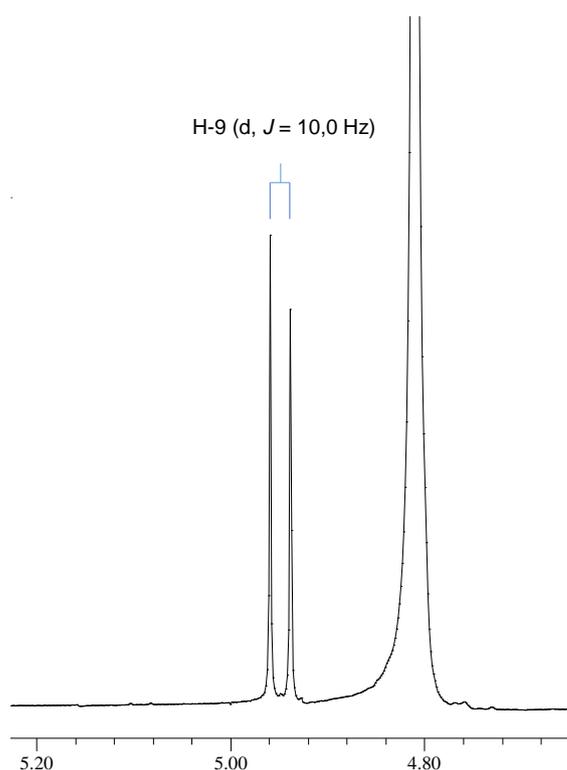


Figura 16. Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da região de δ 5,20 a 4,75 da substância 1 (bergenina).

Ao comparar os valores dos deslocamentos do carbono anomérico do um anel D-glicopirranose e do carbono anomérico (C-9) do composto estudado, observa-se uma grande diferença em torno de 27 unidades, provavelmente pela ausência da

ligação carbinólica, sugerindo que o anel seja condensado. A presença da unidade glicosídica é sugerida quando é observada a correlação no HOMOCOSY em 3J do sinal do hidrogênio anomérico H-9 com o hidrogênio H-14 em δ_H 4,06 ($J = 10,0; 9,5$ Hz, dd). A interação desses hidrogênios é confirmada pela mesma constante de acoplamento com $J = 10$ Hz que indica uma configuração *trans*. O sinal de RMN ^{13}C com deslocamento em δ_C 61,5 (C-16) característico de um carbono metilênico indica que a unidade glicosídica é derivada da glicose e não de outro tipo de glicosídeo. Outros sinais de carbono típicos de um anel glicosídico são observados nos deslocamentos em δ_C 70,7 (C-12), δ_C 74,4 (C-13), δ_C 80,2 (C-14) característicos de carbono carbinólico. O maior deslocamento entre esses carbonos atribuído ao carbono C-14 sugere que o oxigênio da ligação carbinólica está ligado ao carbono da carbonila (C-2) que indica o anel lactônico.

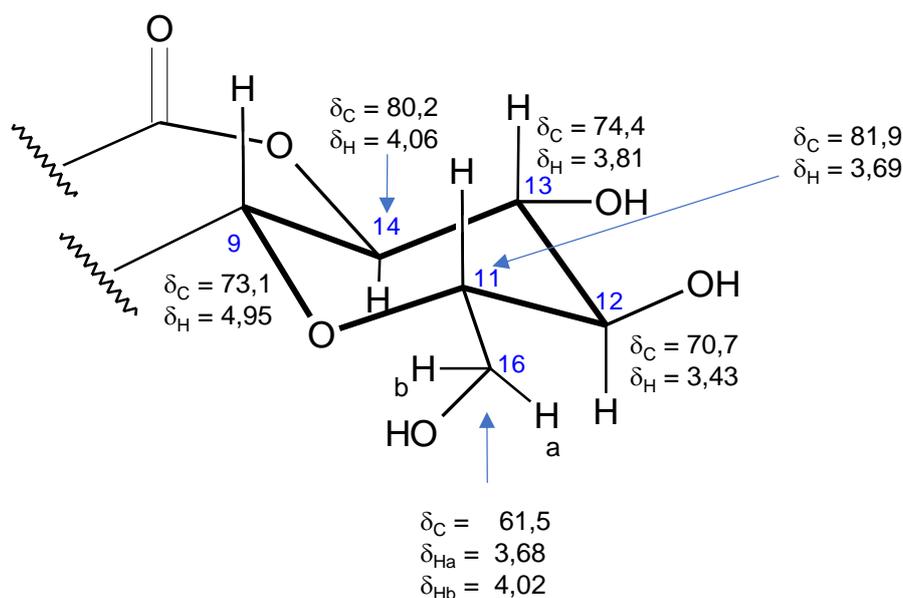


Figura 17. Deslocamentos químicos de RMN 1H ^{13}C da região glicosídica da substância 1 (bergenina).

Na ampliação do espectro de RMN de 1H , além dos sinais do hidrogênio anomérico (H-9), hidrogênio da metoxila (H-15) e também do anel aromático (H-4) citado anteriormente, também podemos destacar um duplo dubleto em δ_H 4,06 com interação para um hidrogênio ($J = 10,0; 9,5$) atribuído ao H-14 que está sobreposto a outro duplo dubleto em δ_H 4,02 ($J = 13,0; 3,0$) integrado para um hidrogênio atribuído

a um dos hidrogênios metilênicos correspondente ao hidrogênio H-16b. Observou-se também um duplo dubleto em δ_H 3,81 ($J = 9,5; 8,5$) cuja integral equivale a um hidrogênio, foi atribuído ao H-13. Nos sinais em δ_H 3,69 e 3,68 atribuídos aos hidrogênios H-11 e H-16a é possível observar um multiplete complexo. Por fim, o sinal em δ_H 3,43 referente a um duplo dubleto com integração para um hidrogênio ($J = 9,5; 8,5$) foi designado ao hidrogênio H-12 (Figura 17).

A análise da ampliação do mapa de contorno COSY (Figura 20) das correlações entre os hidrogênios (dispostos na Tabela 8 e demonstrados na Figura 18), confirmaram os acoplamentos (3J) entre os hidrogênios H-9 (δ_H 4,95) e H-14 (δ_H 4,06), o hidrogênio H-14 (δ_H 4,06) com o H-13 (δ_H 3,81), e o hidrogênio H-13 (δ_H 3,81) com o H-12 (δ_H 3,43). Observou-se também que o hidrogênio H-12 (δ_H 3,43) apresenta acoplamento (4J) com o hidrogênio metilênico H-16a (δ_H 3,68) provavelmente decorrente de uma conformação em W. O hidrogênio H-11 apresenta acoplamento (3J) com os dois hidrogênios metilênicos H-16a e H-16b e estes por conseguinte apresentam acoplamento germinal entre si (Figura 19).

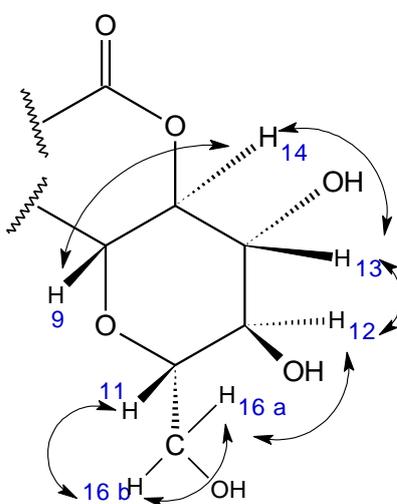


Figura 18. Correlação de COSY dos hidrogênios referentes ao anel glicosídico da substância 1 (bergenina).

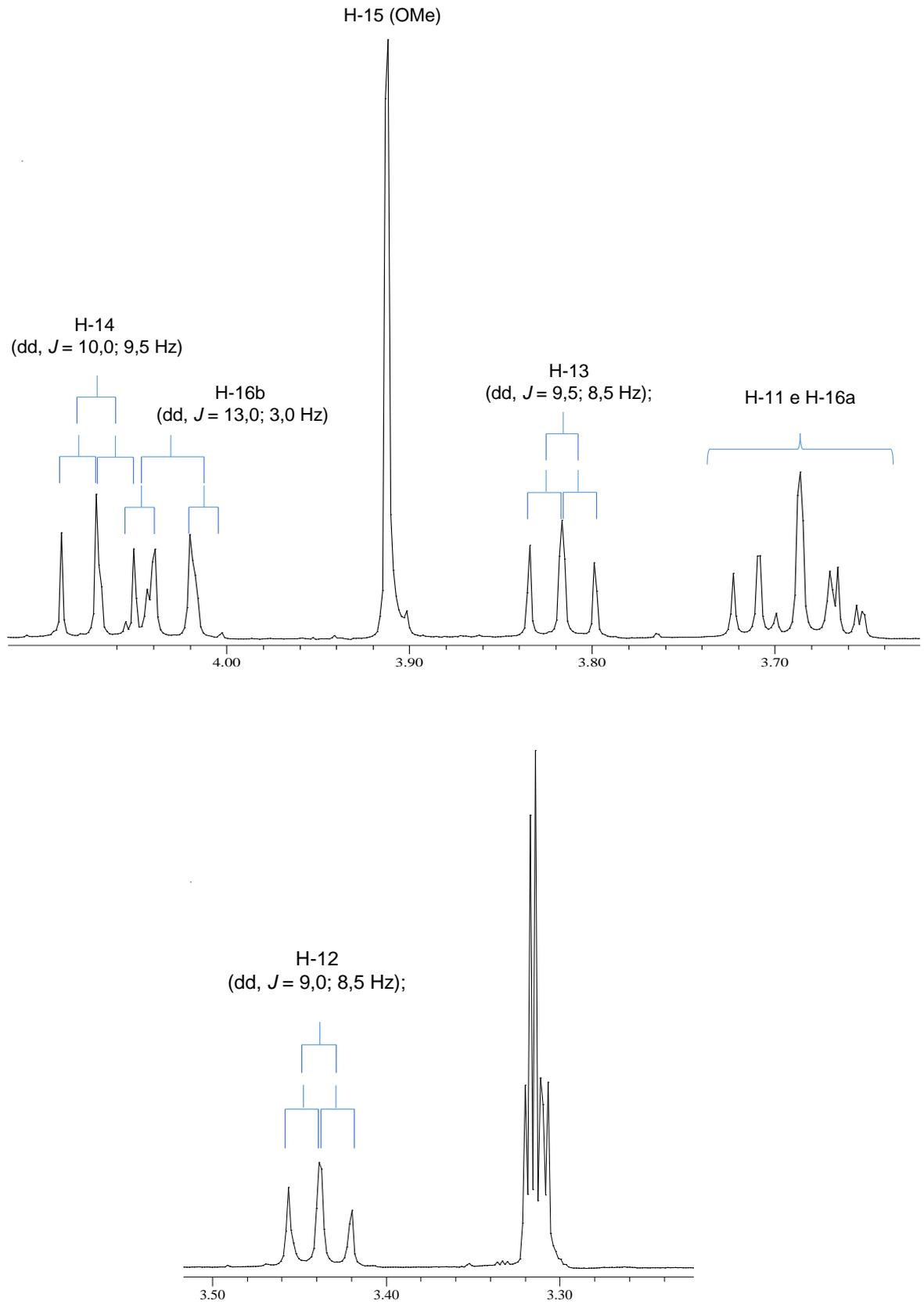


Figura 19. Ampliação da região de δ 4,1 a 3,2 do espectro de RMN de ^1H da substância 1 (bergenina). (500 MHz, CD_3OD).

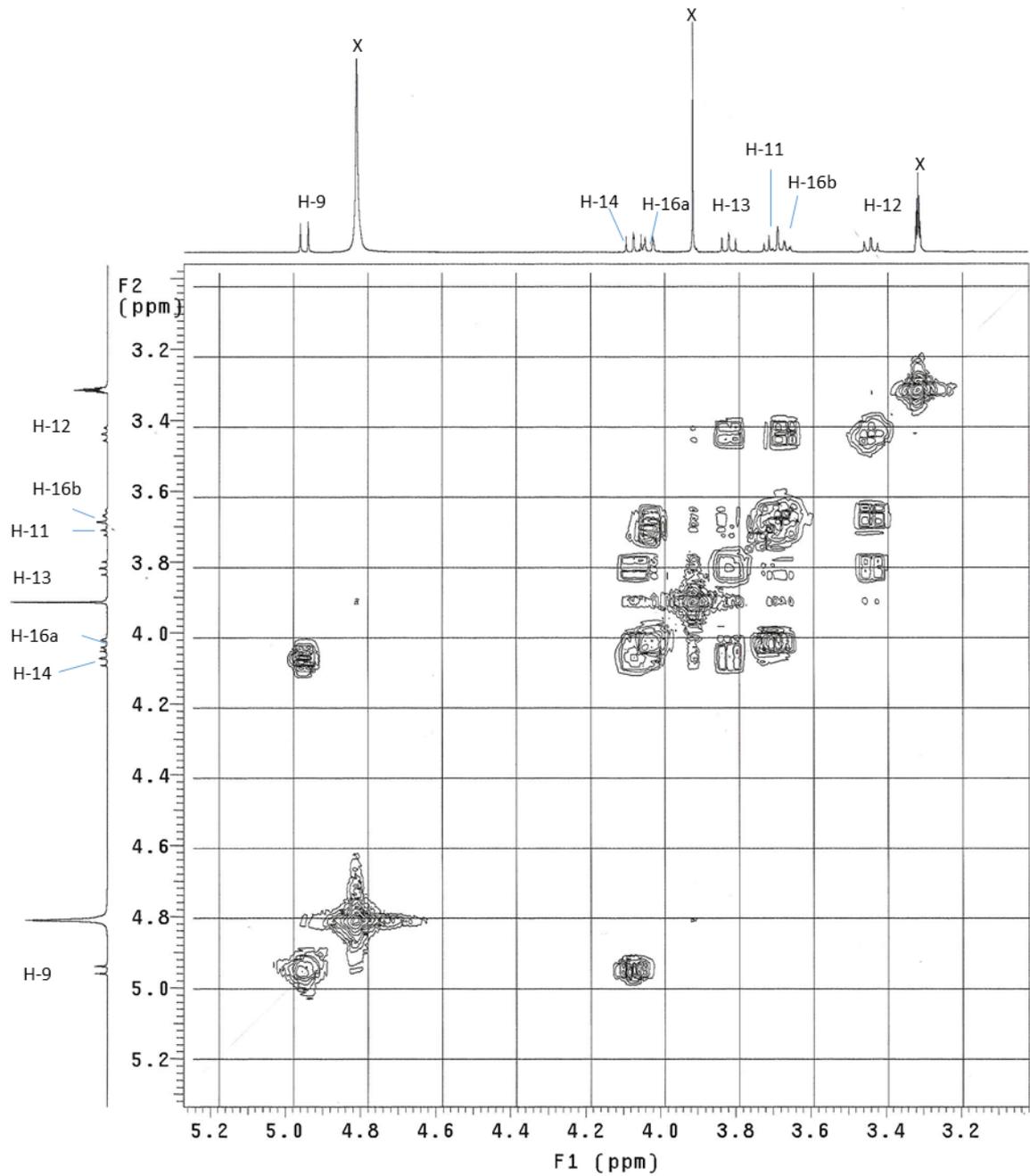


Figura 20. Ampliação do Mapa de contorno COSY dos hidrogênio referentes a unidade glicosídica da da substância 1 (bergenina).

Tabela 8. Deslocamentos químicos de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância 1 (bergenina) em CD_3OD .

C	δ_{H}	δ_{C}	COSY	$\delta_{\text{H}}^1, \text{a}$	$\delta_{\text{C}}^2, \text{b}$
2	-	164,6	-	-	165,8
3	-	118,2	-	-	119,5
4	7,08 (s, 1H, H-4)	109,9	-	7,09 (s, 1H, H-4);	111,1
5	-	151,1	-	-	152,4
6	-	141,1	-	-	142,3
7	-	148,2	-	-	149,5
8	-	116,0	-	-	117,3
9	4,95 (d, 10, 1H, H-9)	73,1	4,06	4,94 (d, 10, 1H, H-9);	74,3
11	3,69 (m, 1H, H-11);	81,9	4,02	3,68 (m, 1H, H-11);	83,1
12	3,43 (dd, 8,5; 8,5, 1H, H-12);	70,7	3,68; 3,81	3,43 (dd, 9,5; 8,5, 1H, H-12);	71,9
13	3,81 (dd, 9,5; 8,5, 1H, H-13);	74,4	3,43	3,81 (dd, 9,5; 8,5, 1H, H-13);	75,7
14	4,06 (dd, 9,5; 10,0, 1H, H-14);	80,2	3,81; 4,95	4,07 (dd, 9,5; 10,0, 1H, H-14);	81,5
15	3,91 (s, 3H, OMe);	59,8	-	3,91 (s, 3H, OMe);	60,9
16	3,68 (m, 1H, H-16); 4,02 (dd, 13,0; 3,0, 1H, H-16)	61,5	3,43; 4,02 3,68; 3,69	3,68 (m, 1H, H-16); 4,03 (dd, 10,7; 2,5, 1H, H-16)	62,7

(¹ NUNOMURA *et al.*, 2009; ^a $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$; 500 MHz; ² NAZIR *et al.*, 2011; ^b $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$, 125 MHz)

Todos os dados espectroscópicos obtidos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 1 (Página 11) estão em concordância com os dados relatados na literatura (NUNOMURA *et al.*, 2009; NAZIR *et al.*, 2011), e foi identificada como sendo a substância bergenina, um dos principais componentes presente na espécie *Endopleura uchi*. A observação das diferenças de deslocamentos químicos foram atribuídas aos diferentes solventes utilizados para obtenção dos espectros.

A confirmação da estrutura de bergenina identificada pelas análises espectroscópicas foi realizada através da análise por espectrometria de massas por *eletron-spray* de alta resolução (HR-ESI-MS) no qual foi possível determinar a fórmula molecular de bergenina em $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_9$ (Figura 5). A estrutura de bergenina apresenta em sua estrutura 9 oxigênios divididos em hidroxilas, metoxila e anel lactônico, favorecendo assim as reações de protonação $[\text{M} + \text{H}]^+$ e principalmente as reações catiônicas $[\text{M} + \text{Na}]^+$, $[\text{M} + \text{K}]^+$ que são capazes de formar fortes complexos devido à quelação dos íons por átomos de oxigênio que são facilmente identificados em análise de ESI/MS no modo positivo. Para obtenção do espectro de MS a amostra foi preparada em metanol (HPLC) na concentração de 1 mg/mL e filtrada em membrana de 0,20 μm . Foram realizadas análises da bergenina utilizando 200

μL de água e também alíquotas de ácido para ajudar na protonação. Os resultados experimentais obtidos foram comparados com a massa teórica calculada da bergenina-adutos (H^+ , Na^+ e K^+) decorrentes das reações catiônicas e de protonação. A análise de bergenina com água mostrou a presença dos três picos esperados para os adutos ($\text{M}+\text{H}^+$, $\text{M}+\text{Na}^+$ e $\text{M}+\text{K}^+$), e com pico mais intenso atribuído ao aduto de sódio proveniente da própria água. A razão carga-massa desses adutos foram submetidos à comparação teórica sendo analisado o erro permitido que deve estar entre 0-10 ppm para substâncias conhecidas. O cálculo do erro foi efetuado através da seguinte fórmula:

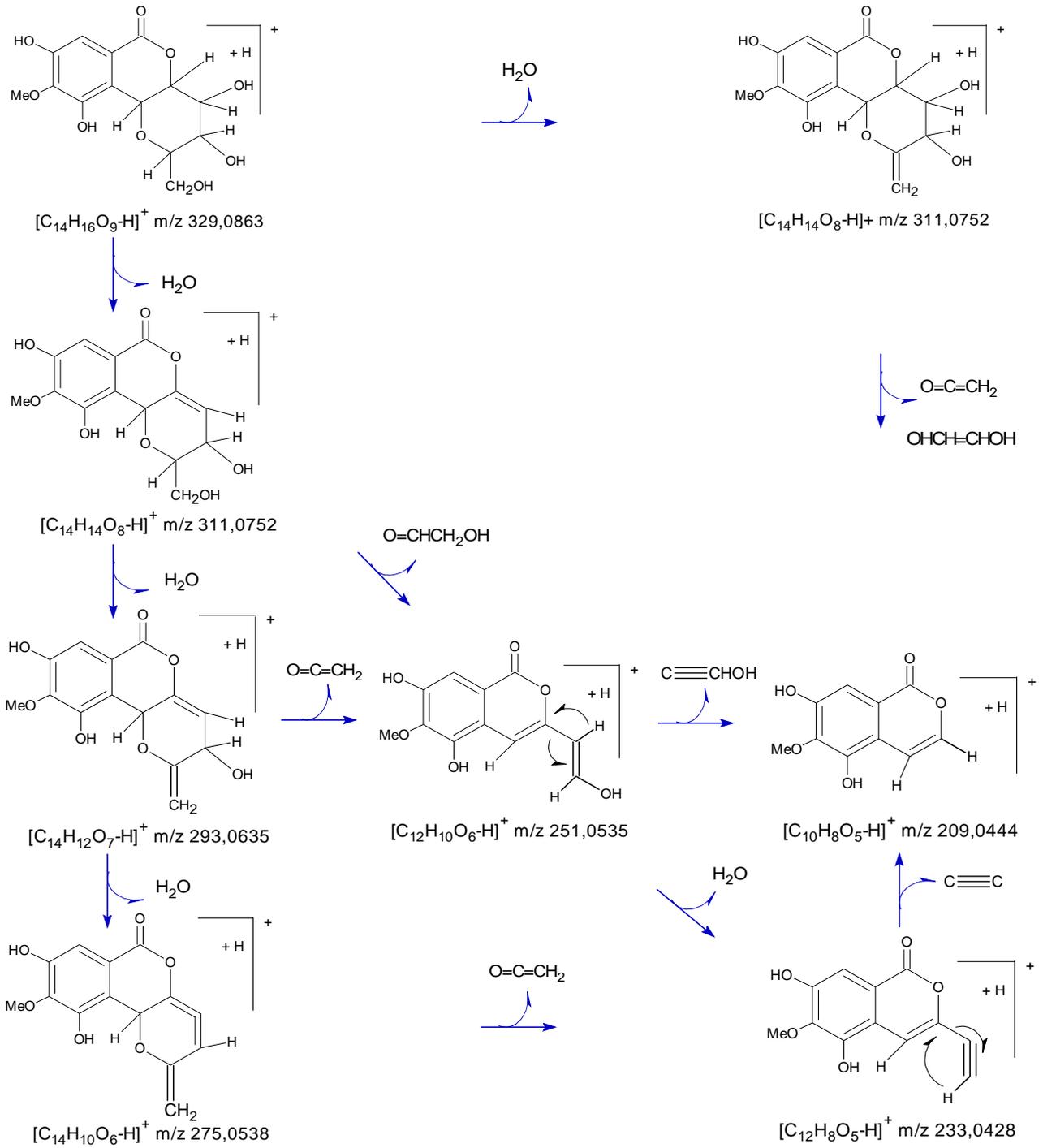
$$\% \text{ erro} = \frac{\text{Massa Teórica} - \text{Massa Experimental}}{\text{Massa Teórica}} \times 10^6 \quad (\text{Equação 3})$$

O erro obtido do espectro de massas de bergenina mostrou erros abaixo do valor limite de 10,0 ppm, podendo ser considerado dados de confiança para a confirmando da fórmula molecular de bergenina.

Tabela 9. Erro dos adutos formados.

Adutos	Massa teórica	Massa experimental	% Erro (ppm)
$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_9\text{-H}^+$	329,086009	329,08380	6,71253088
$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_9\text{-Na}^+$	351,068053	351,06503	8,61086611
$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_9\text{-K}^+$	367,041590	367,03839	8,71835804

A análise de bergenina com alíquota de ácido acético mostrou consequentemente o pico mais intenso em 329,0661 referente à molécula de bergenina protonada [$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_9\text{-H}^+$] e em menor intensidade o aduto de sódio (Anexo 4). Os picos em m/z 657,1626 e 679,1454 correspondem respectivamente aos dímeros dos adutos [$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_9\text{-H}^+$] e [$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_9\text{-Na}^+$]. Foram observados a presença das fragmentações em m/z 311,0752, m/z 293,0635, m/z 275,0538 correspondentes às perdas sucessivas de três moléculas de água, em m/z 251,0535 correspondente à abertura do anel glicopirranose, em m/z 233,0428 produzido pela perda de uma molécula de água ou pela perda de 42 unidades ($\text{O}=\text{C}=\text{CH}_2$), e também a massa em m/z 209,0444 correspondente à perda total do anel glicopirranose da molécula de bergenina (Esquema 10).



Esquema 10. Proposta para as principais fragmentações da bergenia.

5.2 Quantificação de bergenina em *Endopleura uchi*

A bergenina isolada das frações acetato de etila das cascas, galhos e folhas de *Endopleura uchi* em grande quantidade, indica sua predominância nessa espécie, podendo ser considerada um dos marcadores químico de *Endopleura uchi*.

A análise quantitativa de bergenina nos diferentes extratos de *Endopleura uchi* teve como objetivo determinar a concentração dessa substância nas diferentes partes da planta, fazer uma análise quantitativa em amostras de cascas utilizadas comercialmente, bem como comparar a eficiência de diferentes solventes na extração e também aprimorar a validação do método de quantificação. A bergenina isolada das frações acetato de etila e identificada conforme sessão anterior, apresentou um ótimo grau de pureza e foi utilizada como padrão.

5.2.1 Curva analítica do padrão bergenina

O método utilizado para a realização da quantificação da bergenina nos extratos de *Endopleura uchi* em CLAE foi baseado segundo Nunomura, *et al.*, (2009) que utiliza um sistema isocrático com 15 % de metanol em solução de TFA (pH = 2,0) em modo reverso com detecção UV de 215, 254 e 272 nm, sendo a bergenina detectada no tempo de retenção de 16 minutos na concentração de 1 mg / mL. Ao tentar reproduzir o método, foi observado que o tempo de retenção do padrão ocorria em 23 minutos em uma análise de 30 minutos. Então a proporção de metanol foi aumentada para 20 % e obtido o tempo de retenção de bergenina em torno de 11 minutos, resultando em um cromatograma semelhante ao apresentado pelo artigo (Figura 21). Portanto, a análise das concentrações de bergenina para a construção da curva analítica foi desenvolvida no sistema isocrático metanol/TFA (pH =2,0) na proporção 2:8.

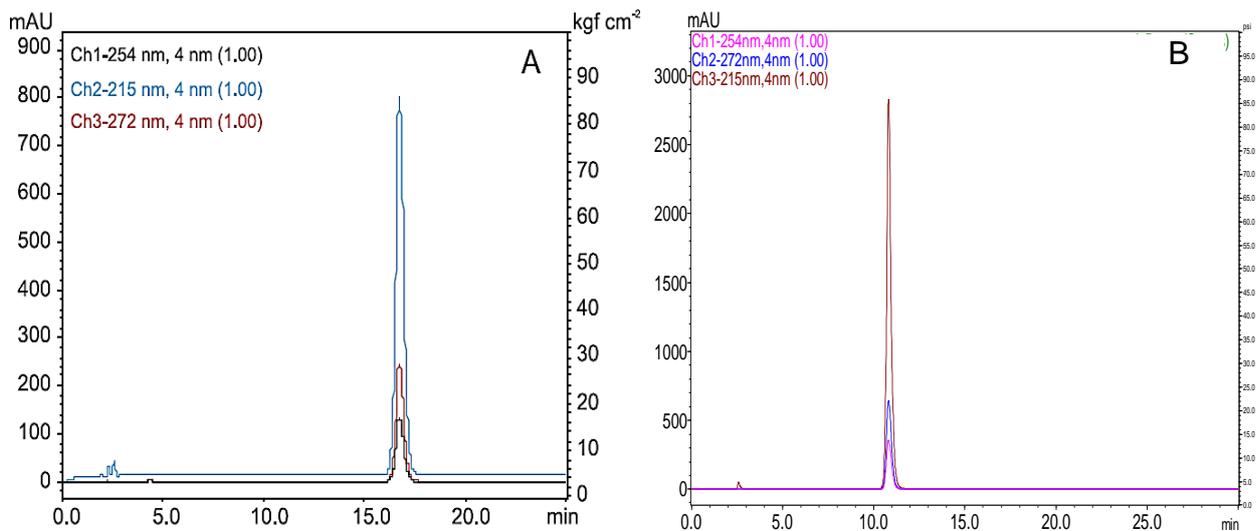


Figura 21. (A) método desenvolvido por Nunomura *et al.*, (2009); (B) método desenvolvido neste trabalho.

A quantificação de bergenerina foi realizada pelo método de padrão externo, a partir da construção de uma curva analítica obtida pela injeção do padrão no intervalo de concentração entre 6,25 à 200 $\mu\text{g/mL}$ em CLAE e analisada em duplicata nos comprimentos de onda de 215, 254 e 272 nm e as médias das áreas obtidas estão listadas nas Tabela 8-11. A análise do espectro no UV de bergenerina apresentou máximo de absorção em 215 e 272 nm (Figura 22). Pelo fato do solvente ter um máximo de absorção em 213 nm, relativamente próximo ao máximo em 215 nm, a quantificação de bergenerina foi calculada com base nos cromatogramas analisados apenas em 272 nm onde apresentou maior seletividade para o padrão.

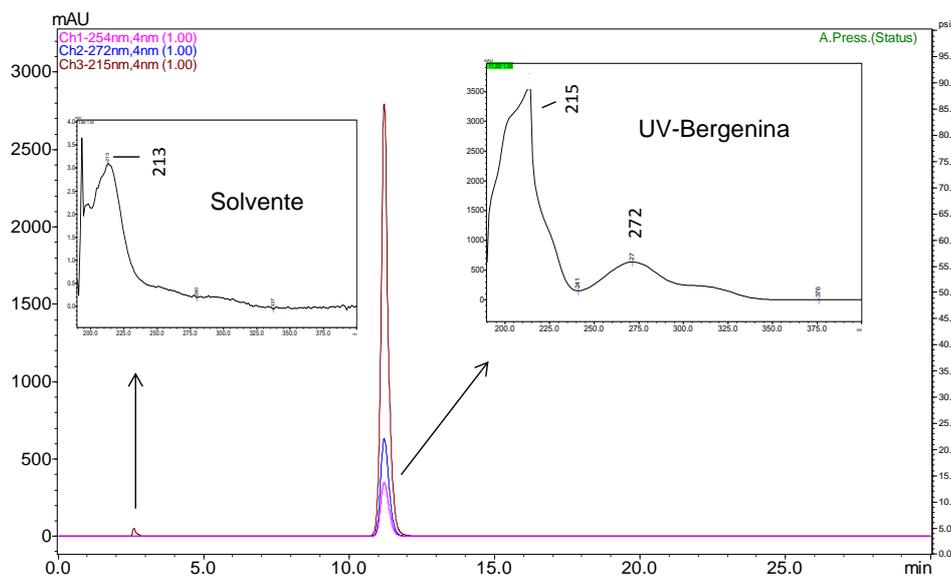


Figura 22. Absorções máximas de bergenerina e do solvente.

A precisão e a robustez foram avaliados pela injeção em dias diferentes (*inter-day*) e a variabilidade do método foi determinada por injeção no mesmo dia (*intra-day*), sendo avaliado como outro fator de precisão das análises o desvio padrão e o coeficiente de variância (CV%) que apresentaram valores abaixo de 1 % (Tabela 10).

Tabela 10. Média das áreas obtidas das análises das diferentes concentrações do padrão em três dias diferentes no comprimento de onda em 272 nm.

Conc. µg/mL	A1	A2	Média	Desvio padrão	CV%
200	13164020	13001021	13082521	115258	0,88
100	6477366	6473683	6475525	2604	0,04
50	3209008	3200573	3204791	5964	0,19
25	1594268	1589922	1592095	3073	0,19
12,5	790473	793051	791762	1823	0,23
6,25	395982	396859	396421	620	0,16

Conc. µg/mL	A1	A2	Média	Desvio padrão	CV%
200	13056730	12982834	13019782	52252	0,40
100	6479638	6505711	6492675	18436	0,28
50	3236936	3231909	3234423	3555	0,11
25	1614537	1614083	1614310	321	0,02
12,5	805777	804648	805213	798	0,10
6,25	400524	401605	401065	764	0,19

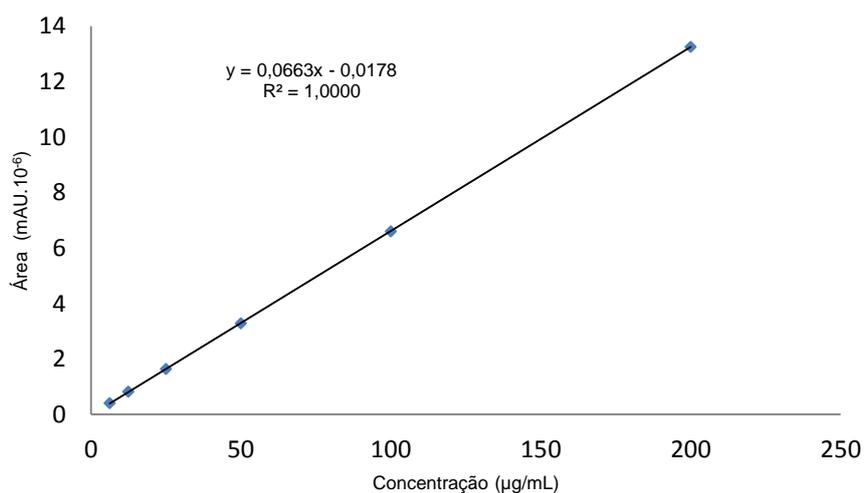
Conc. µg/mL	A1	A2	Média	Desvio padrão	CV%
200	13715637	13643306	13679472	51146	0,37
100	6870431	6823611	6847021	33107	0,48
50	3432479	3418474	3425477	9903	0,29
25	1710411	1711622	1711017	856	0,05
12,5	854100	854970	854535	615	0,07
6,25	427050	426797	426924	179	0,04

Para a construção da curva analítica as médias das áreas resultantes das análises das concentrações do padrão obtidas em dias diferentes (*inter-day*) (Tabela 11) foram reunidas e também calculados os desvios padrão e o coeficiente de variância para verificar a precisão do método.

Tabela 11. Áreas das concentrações obtidas das análises *inter-day* em 272 nm.

Conc. µg/mL	1º dia		2º dia		3º dia		Média	DP	CV%
	A1	A2	A1	A2	A1	A2			
200	13164020	13001021	13056730	12982834	13715637	13643306	13260591	331345	2,50
100	6477366	6473683	6479638	6505711	6870431	6823611	6605073	188336	2,85
50	3209008	3200573	3236936	3231909	3432479	3418474	3288230	107270	3,26
25	1594268	1589922	1614537	1614083	1710411	1711622	1639141	56573	3,45
12,5	790473	793051	805777	804648	854100	854970	817170	29576	3,62
6,25	395982	396859	400524	401605	427050	426797	408136	14707	3,60

A curva analítica obtida por regressão linear do gráfico das médias das áreas versus concentração (Figura 23) apresentou um excelente coeficiente de linearidade ($R^2 = 1$) na faixa de concentração analisada, e o coeficiente de variância com valores inferiores a 5 %, possibilitando a quantificação de bergenina nos extratos.

**Figura 23.** Curva analítica de bergenina obtida da análise *inter-day*.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados de acordo com as seguintes equações $LD = 3.3s / S$; $LQ = 10s / S$, onde s é o desvio padrão da resposta e S corresponde à inclinação ou coeficiente angular da curva analítica. Diluições sucessivas foram feitas a partir da última concentração da faixa de trabalho, na ordem de 10 e 2 vezes com a finalidade de estabelecer o intervalo de trabalho ou quantificação do método. Os valores foram calculados nos três comprimentos de ondas e estão representados na Tabela 12. Os resultados obtidos mostraram um alto nível de detecção, mostrando a sensibilidade e seletividade para quantificação de bergenina e análise de traços.

Tabela 12. Equações das retas obtidas em comprimentos de ondas diferentes e seus respectivos limites de detecção e quantificação

λ (nm)	Equação da reta ^a	Coefficiente de Linearidade(R ²)	LD ^b (ng/mL)	LQ ^c (ng/mL)
272	$y = 66.349,9399 x - 17.824,6393$	1,000	9,85	29,84
254	$y = 36.770,1945 x - 4.814,1791$	1,000	8,88	26,92
215	$y = 242.018,3217 x - 956.260,4163$	0,996	0,78	2,37

^a = seis pontos (n= 3). ^b = limite de detecção. ^c = limite de quantificação.

5.2.2 Quantificação de bergenina nos extratos metanólicos e aquosos de *Endopleura uchi*

Os extratos metanólicos (EM) e aquosos (EA) de *Endopleura uchi* da 1^a coleta (época seca) e 2^a coleta (época chuvosa) foram submetidos ao pré-tratamento (Esquema 8) por duas vezes para verificar a reprodutibilidade do procedimento e analisados nos comprimentos de onda em 254, 272 e 215 nm em duplicata na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ nas mesmas condições em que o padrão foi analisado. Para quantificação de bergenina nos extratos foi utilizada a curva analítica obtida no comprimento de onda em 272 nm. A alta concentração de bergenina foi evidenciada em todos os cromatogramas obtidos dos extratos analisados através de um pico intenso (Figura 24), permitindo identifica-la em cada amostra por meio da comparação do espectro de UV com o do padrão.

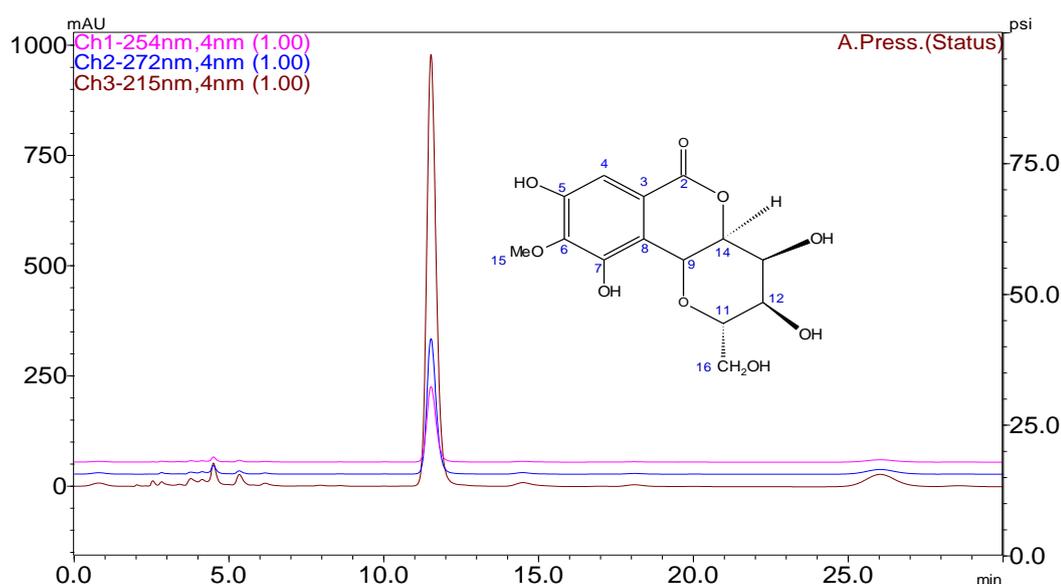


Figura 24. Cromatogramas do extrato metanólico das cascas de época seca.

As áreas dos picos de bergenina obtidos dos extratos foram interpoladas na curva analítica (Figura 22) do padrão e calculadas a concentração de bergenina através da equação da reta. A porcentagem de bergenina no extrato seco (Equação 2) foi determinada com base no teor de extrativo dos extratos. Os resultados da quantificação de bergenina nos extratos de *Endopleura uchi* estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13. Resultado da quantificação de bergenina nas cascas, galhos e folhas de *Endopleura uchi*.

Amostras	Teor de Ext. (%)	Bergenin no extrato ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	Bergenin no extrato seco (g/g)	Bergenin (%)
CEM 1	13,5	77,23	0,5	0,309	4,17
CEM 2	13,7	86,70	0,9	0,347	4,75
CEA 1	10,6	78,08	0,4	0,312	3,31
CEA 2	9,9	72,35	3,0	0,289	2,87
GEM 1	13,8	62,27	5,1	0,249	3,44
GEM 2	12,7	52,36	0,4	0,209	2,66
GEA 1	10,1	48,15	1,0	0,193	1,95
GEA 2	9,3	50,84	2,4	0,203	1,89
FEM 1	16,1	34,75	0,7	0,139	2,24
FEM 2	15,5	62,43	1,9	0,250	3,87
FEA 1	15,9	50,99	1,9	0,204	3,24
FEA 2	13,2	41,85	2,1	0,167	2,21

C = casca, G = galho, F = folha, 1 = época chuvosa, 2 = época seca, EA = extrato aquoso; EM = extrato metanólico. Os valores são expressos em média \pm CV (Coeficiente de Variação) obtido a partir de análises em triplicata (n = 4)

Os resultados confirmam que a bergenina é o principal constituinte presente nos extratos das cascas, folhas e galhos podendo ser apontada como um marcador químico da espécie, visto que essa substância também já foi isolada dos frutos (MAGALHÃES *et al.*, 2007). A maior porcentagem de bergenina foi obtida nos extratos metanólicos das cascas (CEM 1 e 2) com cerca de 4 %, em comparação com os demais extratos. A menor porcentagem foi obtida nos extratos aquosos dos galhos (GEA 1 e 2).

Ao analisar os extratos aquosos das cascas (CEA), os quais são empregados na medicina popular, verifica-se que mesmo com um teor de extrativo menor do que dos extratos metanólicos dos galhos (GEM) e folhas (FEM), é possível obter teores de bergenina semelhantes. A porcentagem de bergenina nos extratos aquosos das cascas está de acordo com os descrito na literatura (NUNOMURA *et al.*, 2009) que

apresentou 3,19%. Os extratos aquosos das folhas (FEA) também apresentaram bons teores de bergenina em comparação com os extratos metanólicos.

Os resultados revelam que a bergenina pode ser encontrada em partes diferentes da planta e que se levando em conta que essa substância é uma das responsáveis pelas atividades biológicas, outras alternativas de uso da espécie podem ser indicadas, por exemplo, as folhas, pois uma vez que a utilização constante das cascas de um mesmo indivíduo pode prejudicar o desenvolvimento da árvore ou até mesmo induzir à morte do indivíduo que leva cerca de quinze anos para atingir a maturidade.

5.2.3 Quantificação de bergenina em amostras comerciais de *Endopleura uchi*

Segundo a RDC-17 (Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA), marcadores químicos são definidos como: “componentes presentes na matéria-prima vegetal, preferencialmente o próprio princípio ativo, utilizados como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos”. Considerando os resultados da quantificação nos extratos, a bergenina pode ser considerada um marcador químico da espécie *Endopleura uchi*, conforme a definição da RDC 17. Portanto, o método validado e desenvolvido neste trabalho pode ser utilizado para o controle de qualidade eficiente de amostras das cascas de *Endopleura uchi* utilizadas comercialmente.

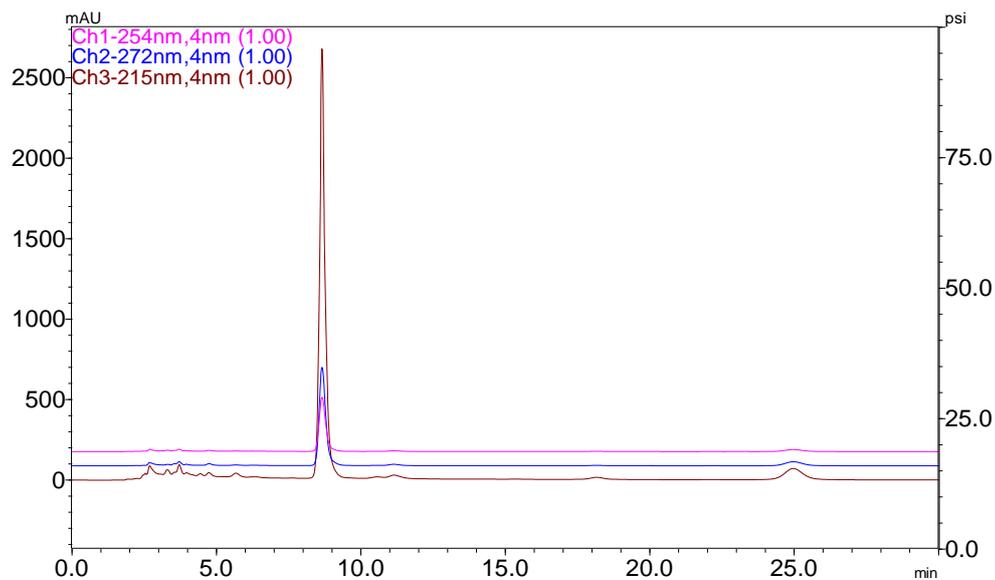
As amostras para análise foram adquiridas em Manaus e também em sites de venda de produtos naturais, totalizando quinze amostras comerciais. A título de comparação foi utilizado como referência as cascas de *Endopleura uchi* coletada na Reserva Ducke do INPA. Dez amostras de Manaus foram adquiridas no bairro Aparecida e também nas feiras livres do Centro de Manaus sendo que foi possível obter informações sobre a origem da matéria-prima apenas de algumas. Quatro amostras foram adquiridas via *online* de diferentes partes do Brasil, porém sem informações de sua origem. Todas as amostras foram tratadas conforme procedimento padrão descrito na sessão 4.10.4 (Esquema 9) e analisadas nas mesmas condições do padrão de bergenina. Os resultados obtidos da quantificação de bergenina em amostras comerciais de *Endopleura uchi* estão dispostos na Tabela 14.

Tabela 14. Resultado da quantificação de bergenina em amostras de cascas comerciais de *Endopleura uchi*.

Local	Amostras	Bergenina no extrato ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	Bergenina no extrato seco (g/g)	Bergenina (%)
Manaus - AM	RD ¹	151,02	1,78	0,60	3,76
Manaus - AM	UUG ²	88,54	0,74	0,35	2,21
Uberlândia - MG	Casa Cariri	100,30	0,56	0,40	2,50
Jacareí - SP	Chá & Cia	27,87	4,95	0,11	0,69
Vila Velha - ES	Kimix	40,41	3,41	0,16	1,01
Londrina - PR	Relva Verde	52,20	1,19	0,21	1,30
Manaus - AM	Manaquiri	50,56	0,03	0,20	1,26
Manaus - AM	Aparecida	47,20	3,42	0,19	1,18
Manaus - AM	Parintins 1	108,31	3,18	0,43	2,70
Manaus - AM	Parintins 2	8,06	0,51	0,03	0,20
Manaus - AM	Pará	74,58	2,55	0,30	1,86
Manaus - AM	Itapiranga	143,20	1,91	0,57	3,57
Manaus - AM	Maués 1	89,96	0,31	0,36	2,24
Manaus - AM	Maués 2	138,26	0,73	0,55	3,45
Manaus - AM	Maués 3	22,93	1,56	0,09	0,57

¹ Reserva Ducke; ² uchi e unha de gato

As análises resultaram em cromatogramas com o mesmo perfil obtido para a amostra da Reserva Ducke (amostra de referência) (Figura 25) e por comparação dos espectros de UV foi evidenciada a presença de bergenina em todas as amostras comerciais.

**Figura 25.** Cromatograma obtido da amostra referência coletada na Reserva Ducke.

O teor de bergenina da amostra de referência (RD, 3,76 %) foi comparado com os valores obtidos das outras amostras. Como resultado foi possível verificar que das quatro amostras comerciais adquiridas via internet, apenas uma obteve teor de bergenina satisfatório com 2,5 %. As amostras de Itapiranga e Maués 2 apresentaram os maiores percentuais de bergenina com 3,57 e 3,45 % respectivamente, seguidas das amostras de Parintins 1 (2,70 %) e Maués 1 (2,24 %). A amostra denominada UUG corresponde a uma forma comercializada das cascas de *Endopleura uchi* misturada com as cascas de *Uncaria tomentosa* popularmente conhecida como unha de gato, apresentou valores significativos de bergenina com 2,21 %. Cinco amostras apresentaram valores entre 1,0 e 1,8 % e três abaixo de 1 % de bergenina. Para melhor visualização dos resultados os valores das amostras foram expressos em porcentagem levando em consideração o percentual de bergenina da amostra de referência como sendo 100 % (Figura 26).

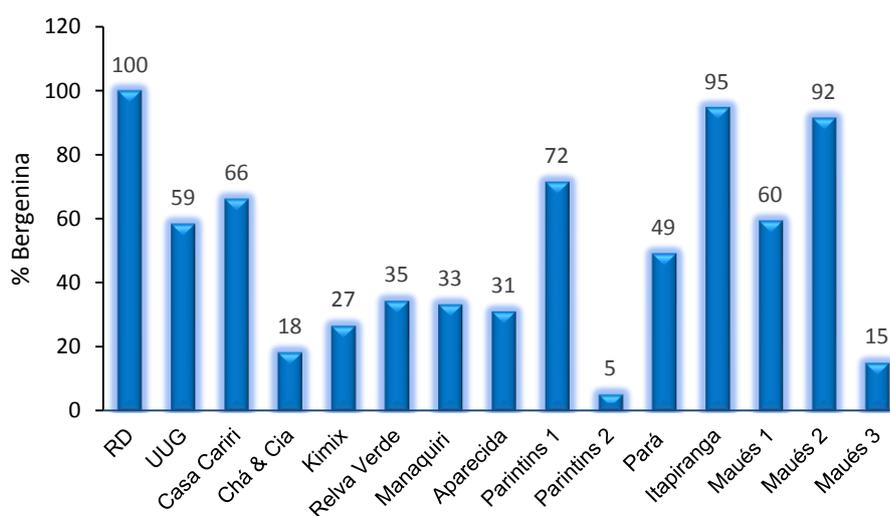


Figura 26. Porcentagem de bergenina nas amostras comerciais.

As amostras foram submetidas a uma análise qualitativa por meio da comparação do perfil cromatográfico da amostra de referência (Figura 27) e também com o perfil da amostra UUG, a qual a composição da matéria-prima é considerada modificada, ou seja, a mistura da casca de *Endopleura uchi* com casca de unha de gato (*U. tomentosa*) (Figura 28).

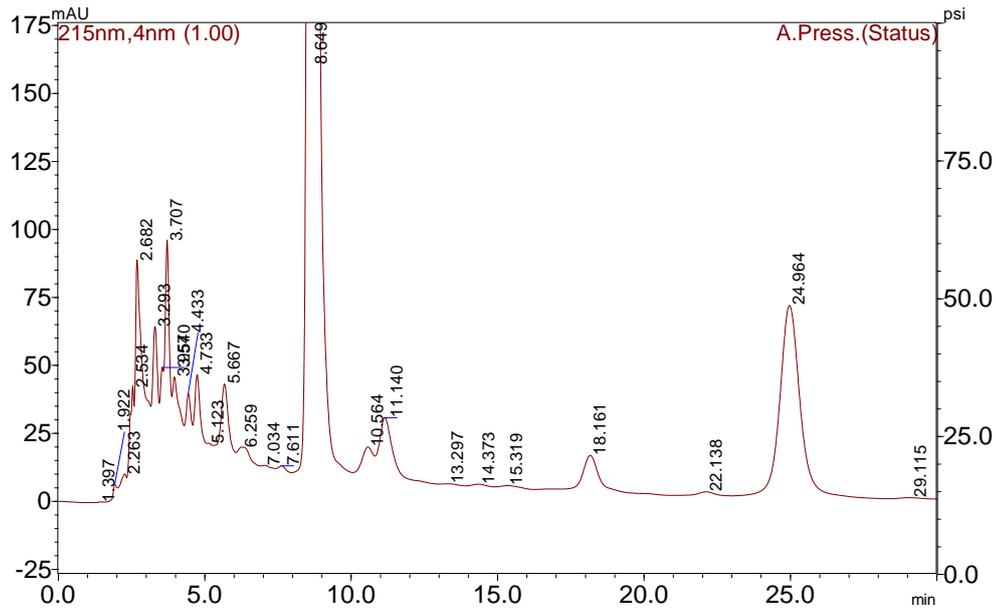


Figura 27. Cromatograma expandido em 215 nm da amostra de referência das cascas de *Endopleura uchi*

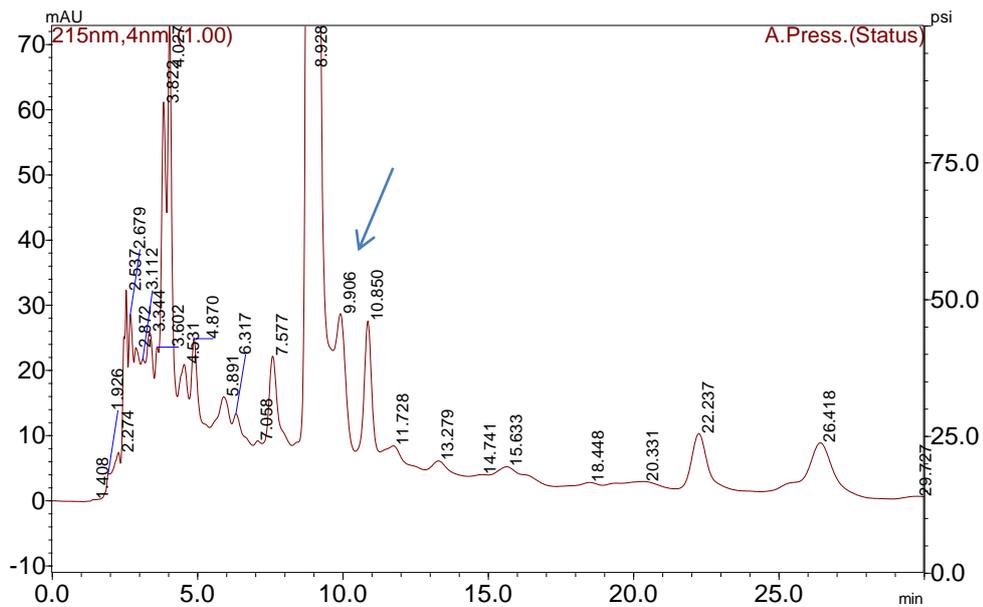


Figura 28. Cromatograma expandido em 215 nm da amostra das cascas de *Endopleura uchi* com *U. tomentosa* (UUG).

Ao comparar os perfis cromatográficos da amostra de referência com a amostra UUG, foi possível identificar alguns picos em comum com tempo de retenção entre 10.564 a 29.727. O pico com tempo de retenção em 9.906 presente na amostra UUG, não foi identificado no perfil da amostra de referência, portanto sendo considerado como um pico referente a uma substância externa. A presença do tempo de retenção em 9.906 e com as mesmas características podem indicar uma matéria-prima modificada com a espécie *U. tomentosa*.

A análise desse tempo de retenção nos perfis permitiu identificá-lo apenas nas amostras do Pará, Itapiranga e Parintins 2 (Figura 29) com características semelhantes observado na amostra UUG.

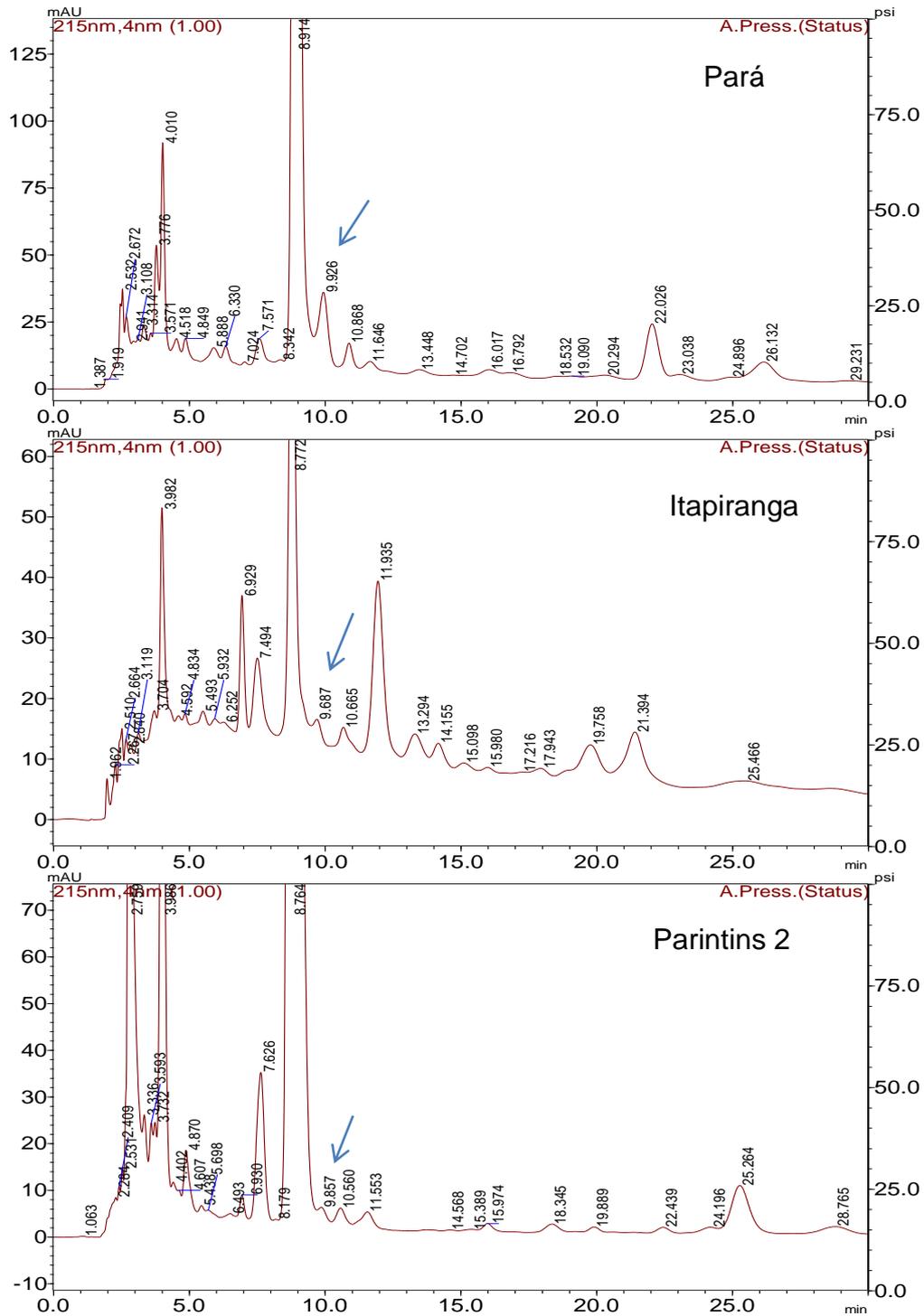


Figura 29. Cromatogramas das amostras que apresentaram o tempo de retenção próximo a 9,906 característico da amostra de *Endopleura uchi* com *U. tomentosa*.

5.3. Quantificação de fenólicos totais

Um dos indicadores para avaliar a atividade antioxidante é a determinação do conteúdo fenólico total, através do método de Folin-Ciocalteu, largamente aplicado nessas determinações, em que além de mensurar o número de grupos com características fenólicas, também contabiliza os grupos oxidáveis presentes na amostra, portanto essas análises devem ser expressas através de um padrão fenólico (BECKER, NISSEN e SKIBSTED, 2004). A presença de compostos fenólicos na amostra geralmente pode explicar sua atividade antioxidante. Com base nesse contexto o teor de substâncias fenólicas nos diferentes extratos de *Endopleura uchi* foi determinado pelo método de Folin–Ciocalteu descrito por Velioglu *et al*, (1998). A obtenção dos dados das absorbâncias das soluções padrão de ácido gálico em função da concentração permitiu a construção da curva analítica (Tabela 15 e Figura 30).

Tabela 15. Absorbâncias das amostras de ácido gálico para construção da curva analítica.

Conc.(mg/mL)	A1	A2	A3	Média A	DP	CV%
0,250	1,204	1,225	1,204	1,211	0,012	1,001
0,125	0,564	0,547	0,543	0,551	0,011	2,022
0,0625	0,258	0,257	0,252	0,256	0,003	1,257
0,03125	0,129	0,12	0,119	0,123	0,006	4,490
0,015625	0,050	0,049	0,045	0,048	0,003	5,512

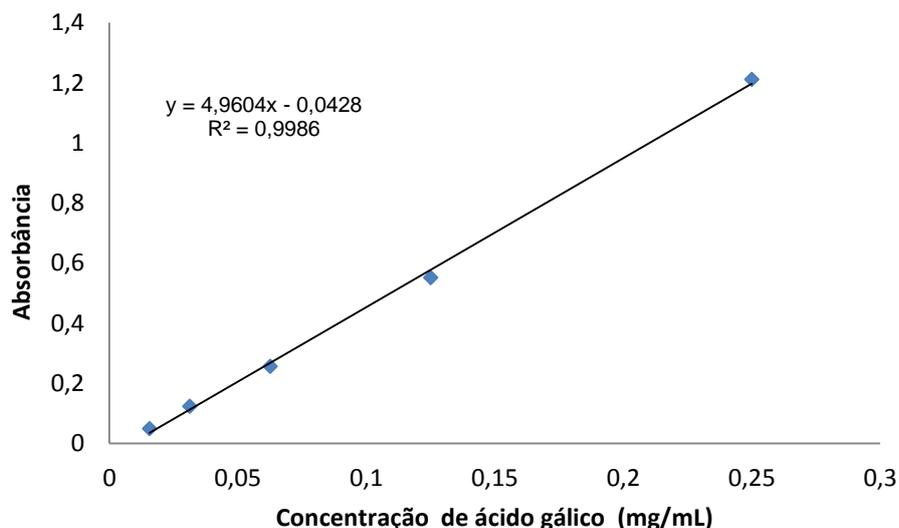


Figura 30. Curva analítica de ácido gálico para quantificação de compostos fenólicos.

O coeficiente linear (R^2) obtido a partir da curva analítica, apresentou valor próximo a 1 indicando boa linearidade entre os pontos. A quantificação de fenólicos totais foi estabelecida por interpolação das absorvâncias obtidas dos extratos na equação da reta da curva analítica. Os valores obtidos foram expressos em mg EAG/g extrato seco e estão listados na Tabela 16 e Figura 31.

Tabela 16. Quantificação dos fenólicos totais nos extratos de *Endopleura uchi*.

		mg EAG / g Extrato seco	CV%
Casca			
Extratos	CEA-1	23,7	3,8
	CEA-2	23,9	1,6
	CEM-1	42,5	0,7
	CEM-2	42,2	0,2
	CEE-1	18,4	2,4
	CEE-2	26,5	1,0
Galho			
Extratos	GEA-1	27,9	1,4
	GEA-2	26,0	4,3
	GEM-1	42,2	2,8
	GEM-2	40,0	1,3
	GEE-1	14,9	1,3
	GEE-2	21,7	0,5
Folha			
Extratos	FEA-1	38,94	2,0
	FEA-2	33,57	1,6
	FEM-1	36,75	2,6
	FEM-2	33,43	3,1
	FEE-1	32,46	2,9
	FEE-2	28,31	1,4

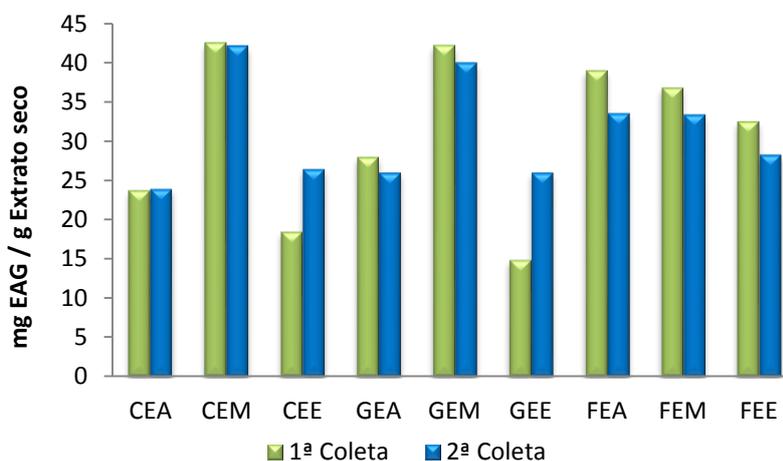


Figura 31. Gráfico da quantificação dos fenólicos nos extratos.

Ao ser analisado os resultados de fenólicos nos extratos de mesma origem (parte da planta) e de épocas diferentes verificamos que não houve variação significativa do teor de fenólicos, indicando que a presença desses compostos são constantes tanto na época de chuva como na época de seca. Pela comparação dos tipos de extrações, observou-se que o método de extração em aparelhagem tipo soxhlet (extrato metanólico – EM) apresentou maior capacidade de extrair compostos fenólicos nas cascas e galhos na faixa de 40,0 a 42,5 mg EA/g seguido das folhas com 36,75 e 33,43 mg EA/g. As extrações aquosas, normalmente utilizadas tradicionalmente na medicina popular, pelo método de decocção, apresentaram bons níveis de compostos fenólicos, exibindo maior concentração nas folhas de *Endopleura uchi* com FEA-1 = 38,94 e FEA-2 = 35,86 mg EA/g de extrato seco respectivamente. Entre os extratos etanólicos, novamente os obtidos das folhas obtiveram valores superiores de fenólicos com FEE-1 = 32,46 e FEE-2 = 28,30 mg EA/g de extrato seco.

O resultado da quantificação de compostos fenólicos nos extratos de *Endopleura uchi*, indicou níveis consideráveis de fenólicos presentes em todas as partes da espécie estudada. Considerando que compostos fenólicos incluem ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis entre outras estruturas (NACZK, 2004), espera-se que os extratos de *Endopleura uchi* apresentem atividade antioxidante pela redução de ferro (FRAP) e pelo sequestro de radical DPPH, visto que uma das principais características dessa classe de compostos é relativo às suas propriedades redutoras decorrente de sua estrutura química, que desempenham importante papel na neutralização ou sequestro de radicais livres, devido à formação de intermediários estáveis e quelação de metais de transição (SOARES, 2002; SOUSA *et al.*, 2007). Vale ressaltar alguns tipos de radicais livres prejudiciais formados nos processos biológicos (ERENEL *et al.*, 1993; RICE-EVANS & BURDON, 1993), os quais podem ser combatidos pelos antioxidantes, como:

- Radicais do oxigênio ou espécies reativas de oxigênio (OH, O₂^{••}, RO[•], ROO[•])
- Complexos de metais de transição (Fe⁺³/Fe⁺²)
- Radicais de nitrogênio (NO[•])

Desse modo as atividades empregadas nesse trabalho foram direcionadas para avaliar a capacidade dos extratos de *Endopleura uchi* em interferir na ação de alguns tipos desses de radicais.

5.4 Atividade antioxidante

Muitos estudos publicados vêm mostrando que as substâncias que ocorrem naturalmente em plantas superiores apresentam atividade antioxidante, relativo à presença de substâncias fenólicas que apresentam uma característica antioxidante pela transferência de um elétron (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). Portanto, devido à confirmação da presença de compostos fenólicos nos extratos de *Endopleura uchi*, é possível verificar a correlação da quantidade de fenólicos com a atividade antioxidante dos extratos. A atividade foi avaliada pelo método da Capacidade Redutora de Ferro (FRAP) e pela Capacidade de Sequestro de Radicais Livres de DPPH, sendo confirmada sua propriedade antioxidante.

5.4.1 Capacidade redutora do Ferro (FRAP)

A confirmação da capacidade antioxidante deve ser realizada pelo menos por mais de um método para minimizar conclusões equivocadas, visto que podem existir possíveis interferências e limitações do método de ensaio empregado (WONG, LEONG e KOH, 2006). O ensaio antioxidante pelo método FRAP produz resultados rápidos e reprodutíveis sendo aplicados sem limitações em extratos aquosos e alcóolicos. O ensaio tem como objetivo verificar a habilidade das amostras em reduzir o complexo Fe^{3+} -TPTZ [2,4,6-tri-(2-piridil) -1,3,5-triazina ao complexo Fe^{2+} -TPTZ (azul), por redutores, no caso, os antioxidantes presentes nos extratos (LUXIMON-RAMMAN *et al.*, 2002; BENZIE e STRAIN, 1996).

A partir das soluções padrão de $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (μM) foram obtidas as respectivas absorbâncias (Tabela 17) e correlacionadas em função da concentração. Foi construída uma curva analítica do padrão (Figura 32) que apresentou coeficiente de linearidade (R^2) com valores próximo a 1 mostrando boa correlação linear para a realização da capacidade redutora das amostras.

Tabela 17. Absorções obtidas das soluções padrão de sulfato ferroso.

Conc. ($\mu\text{mol de Fe}^{2+}$)	A1	A2	A3	Média A	DP	CV%
2000	1,262	1,253	1,263	1,259	0,006	0,437
1000	0,613	0,603	0,632	0,616	0,015	2,391
500	0,28	0,282	0,283	0,282	0,002	0,542
250	0,115	0,111	0,128	0,118	0,009	7,532
125	0,036	0,036	0,035	0,036	0,001	1,619
62,5	0,012	0,012	0,012	0,012	0,000	0,000

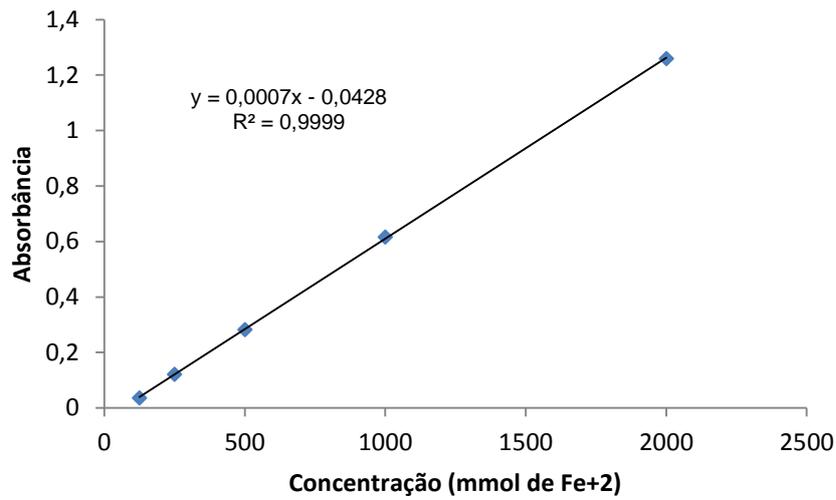


Figura 32. Curva analítica de sulfato ferroso.

As amostras foram submetidas ao ensaio e os valores das absorbâncias resultantes foram interpolados na curva analítica de $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e obtidos as capacidades redutoras de Fe^{+3} que são calculados para g de extrato com base no teor de extrativo dos extratos e frações, portanto sendo expressos como mmol de Fe^{+2}/g de extrato seco. Os resultados obtidos das atividades antioxidantes estão dispostos na Tabela 18 e Figura 33.

Tabela 18. Atividade antioxidante dos extratos de *Endopleura uchi* pela redução de ferro.

		(mmol Fe ²⁺ /g de extrato seco)	CV%
Casca			
Extratos	CEA-1	230,4	0,4
	CEA-2	239,3	0,9
	CEM-1	449,5	0,4
	CEM-2	495,6	0,9
	CEE-1	241,9	0,6
	CEE-2	326,5	0,7
Galho			
Extratos	GEA-1	359,3	0,3
	GEA-2	317,0	1,4
	GEM-1	527,9	0,9
	GEM-2	512,6	1,2
	GEE-1	211,5	1,6
	GEE-2	290,2	1,0
Folha			
Extratos	FEA-1	567,9	2,7
	FEA-2	470,0	0,6
	FEM-1	512,4	1,0
	FEM-2	476,4	1,9
	FEE-1	396,0	0,4
	FEE-2	365,4	0,5
Substância	Bergenina	176,1 (mmol Fe ²⁺ /g de bergenina)	0,4

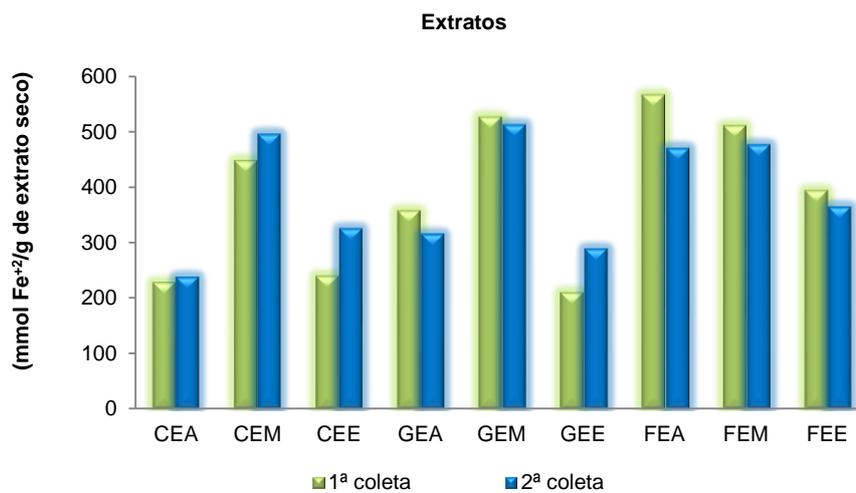


Figura 33. Gráfico da atividade antioxidante dos extratos.

Para o ensaio pelo método FRAP, novamente foi observado que os extratos apresentaram resultados próximos quando comparados em épocas distintas. A concentração de Fe^{+2} resultante dos extratos variou de 230,43 a 567,89 mmol Fe^{+2}/g , mostrando que os extratos metanólicos das cascas, galhos e folhas apresentaram maiores níveis de redução de ferro (476,35 - 527,85 mmol Fe^{+2}/g). Os valores de redução para os extratos aquosos mostraram também altos níveis de Fe^{+2} para os extratos das folhas com FEA-1 = 567,89 e FEA-2 = 469,99 mmol Fe^{+2}/g . Os extratos com menor capacidade de redução foram os aquosos das cascas (CEA-1 = 230,43 e CEA-2 = 239,30 mmol Fe^{+2}/g), seguidos dos extratos etanólicos dos galhos (GEE-1 = 211,47 e GEE-2 = 290,24 mmol Fe^{+2}/g). No geral, as folhas obtiveram resultados mais satisfatórios entre os três tipos de extrações, seguido dos galhos e cascas.

A bergenina também foi submetida ao ensaio de redução de Fe^{+3} , porém o resultado mostrou valores bem inferiores aos encontrados para os extratos de *Endopleura uchi*, indicando baixa atividade antioxidante pelo método de redução de Fe^{+3} para bergenina.

A comparação dos resultados da atividade antioxidante pela método FRAP com os obtidos para os fenólicos totais estão em concordância visto que as amostras que apresentaram maiores quantidades de compostos fenólicos resultaram consequentemente nas melhores capacidades de favorecer a redução de Fe^{+3} .

5.4.2 Sequestro de radicais livres (DPPH)

A atividade antioxidante dos extratos também foi analisada frente ao método de sequestro de radicais livres de DPPH, por ser uma técnica rápida para a triagem da atividade de sequestro de radicais de compostos específicos ou extratos (MENSOR *et al.*, 2001; AMAROWICZ *et al.*, 2004). Foi determinada a faixa de trabalho dos extratos nas concentrações de 100 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que define o intervalo entre as diluições. Para cada amostra, foram preparadas cinco diluições em concentrações conhecidas conforme a faixa de trabalho definida, e a partir dos valores de absorbância foram obtidos a porcentagem de capacidade de sequestro de DPPH através da equação 3, resultando em um gráfico desses valores (%CS) em função das concentrações da faixa de trabalho dos extratos e controle positivo (Figura 34).

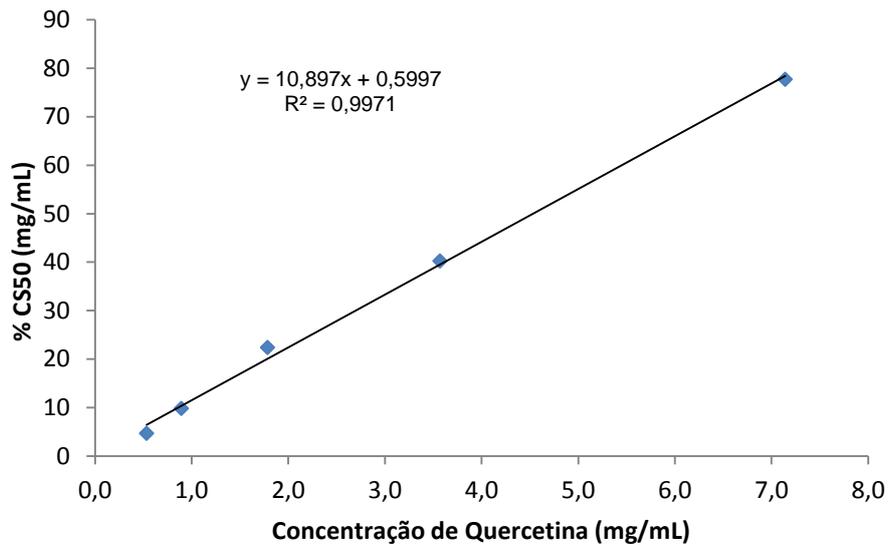


Figura 34. Gráfico da %CS em função da concentração de quercetina.

A partir da equação da reta de cada amostra foi calculada por meio de regressão linear a concentração em sequestrar 50 % dos radicais de DPPH (% CS₅₀) expressa em µg/mL do extrato. Para o controle positivo (quercetina) o valor de %CS₅₀ calculado foi de 4,5 µg/mL. Este valor foi utilizado como referência da atividade antioxidante, considerando que a quercetina é um composto polifenólico com características antioxidantes comprovadas. Os valores de CS₅₀ dos extratos e do padrão (quercetina) encontram-se dispostos na Tabela 19 e Figura 35.

Na literatura não há relatos da atividade antioxidante de *Endopleura uchi*, sendo portanto comparada também com os valores de %CS₅₀ obtidos do extrato das folhas do padrão comercial de *Gingko biloba*, que é amplamente utilizada na medicina popular, e conhecida por apresentar compostos fenólicos como flavonoides (BANOV *et al.*, 2006; CHENG, XU e WANG, 2009).

Tabela 19. Valores da CS₅₀ dos extratos aquosos, metanólicos e etanólicos de *Endopleura uchi*.

		%CS ₅₀ (µg/mL)	CV%	R ²
Casca				
Extratos	CEA-1	24,2	1,6	0,9934
	CEA-2	22,1	0,4	0,9960
	CEM-1	15,6	2,7	0,9925
	CEM-2	12,0	0,7	0,9942
	CEE-1	13,9	0,3	0,9938
	CEE-2	10,5	2,1	0,9931
Galho				
Extratos	GEA-1	13,9	4,2	0,9996
	GEA-2	12,4	1,4	0,9977
	GEM-1	13,6	0,9	0,9995
	GEM-2	12,1	2,3	0,9977
	GEE-1	13,5	1,7	0,9930
	GEE-2	12,4	1,7	0,9924
Folha				
Extratos	FEA-1	14,8	1,1	0,9953
	FEA-2	18,4	0,9	0,9939
	FEM-1	14,0	1,7	0,9991
	FEM-2	20,4	0,3	0,9954
	FEE-1	20,6	1,5	0,9970
	FEE-2	17,5	0,3	0,9954
Padrão	Quercetina	4,5	0,4	0,9971
Padrão extrato*	<i>Ginkgo biloba</i>	44,7	0,1	-

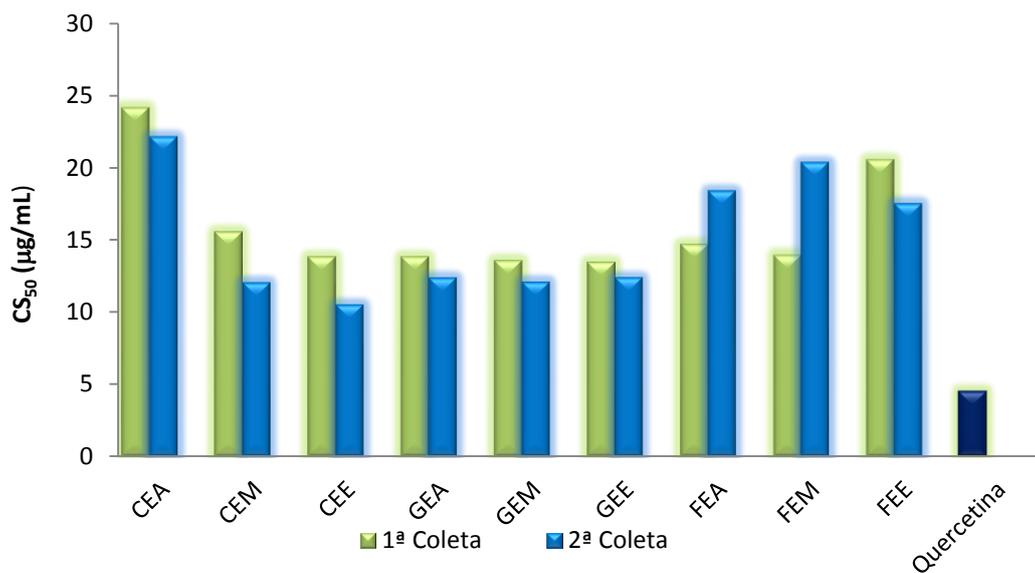
* MENSOR *et al.*, 2001

Figura 35. Gráfico da capacidade de sequestro de 50 % de radicais livres dos extratos.

A capacidade de sequestrar o radical livre de DPPH dos extratos de *Endopleura uchi* mostraram valores que variaram entre 10,5 a 24,2 $\mu\text{g/mL}$, bem abaixo do valor encontrado para o extrato de *Ginkgo biloba* ($\text{CS}_{50} = 44,7 \mu\text{g/mL}$) e relativamente próximo do valor de quercetina ($\text{CS}_{50} = 4,5 \mu\text{g/mL}$). Os extratos aquosos das cascas apresentaram os maiores valores de CS_{50} com CEA-1 = 24,20 e CEA-2 = 22,13 $\mu\text{g/mL}$, seguidos dos extratos metanólico das folhas (FEM-2 = 20,36 $\mu\text{g/mL}$) e etanólico (FEE-2 = 20,60 $\mu\text{g/mL}$). O extrato mais ativo foi atribuído ao extrato etanólico das cascas da 2ª coleta com $\text{CS}_{50} = 10,5 \mu\text{g/mL}$, porém não muito distante dos demais extratos que obtiveram CS_{50} entre 12,1 a 13,9 $\mu\text{g/mL}$ para todos os extratos dos galhos, seguido dos extratos metanólicos e etanólico (2ª coleta) das cascas entre 12,0 a 15,6 $\mu\text{g/mL}$ e por fim valores de CS_{50} entre 14,0 a 18,4 referentes aos extratos aquosos, metanólico (1ª coleta) e etanólico (2ª coleta) das folhas.

A capacidade antioxidante também foi avaliada para bergenina, porém ao tentar determinar a faixa de trabalho, observou-se que em uma concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, a bergenina apenas conseguia sequestrar cerca 33,0 % de radicais DPPH, ou seja, seria necessária uma concentração mais elevada para conseguir sequestrar 50 % dos radicais. Portanto, a bergenina não apresenta atividade antioxidante frente o método de sequestro de DPPH. O método utilizado mostrou resultados eficazes, pois ao serem comparados os valores de CS_{50} dos extratos de *Endopleura uchi* com o controle positivo quercetina ($\text{CS}_{50} = 4,50 \mu\text{g/mL}$), com o extrato de *Ginkgo biloba* ($\text{CS}_{50} = 44,7 \mu\text{g/mL}$) e também com outras plantas brasileiras (MENSOR *et al.*, 2001) o resultado sugere a espécie com elevada capacidade antioxidante tanto nas cascas quanto nos galhos e folhas de *Endopleura uchi*. A capacidade dos extratos polares em sequestrar radicais de DPPH pode estar relacionada com a presença de grupos hidroxilas disponíveis em compostos não fenólicos ou compostos fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos, taninos e diterpenos fenólicos (MENSOR *et al.*, 2001; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; POLTERAIT, 1997). Vários trabalhos vêm mostrando a existência da correlação da presença de fenólicos totais e a atividade antioxidante, nesse contexto os resultados das atividades antioxidantes dos extratos de *Endopleura uchi* pela redução de ferro (FRAP) e pelo sequestro de radical DPPH podem ser atribuídas às concentrações de fenólicos totais.

5.5 Atividade de inibição da produção de óxido nítrico (NO•) produzido por macrófagos murinos

Os extratos aquosos e algumas frações foram selecionados e submetidos ao ensaio de inibição de óxido nítrico em macrófagos ativados por lipopolissacarídeo (LPS) para avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo*.

As amostras foram incubadas com macrófagos murinos (J744) nas concentrações de 2,5; 5,0; 10,0 e 25,0 µg/mL, seguida da estimulação com LPS por 24 horas. Os resultados da supressão de óxido nítrico em µM e a capacidade inibitória (IC₅₀) dos extratos e frações de *Endopleura uchi* estão expressos na Tabela 20 e Figura 36 e 37 respectivamente. Como parâmetro, foi utilizado o controle negativo que resultou na produção de 8,52 µM de NO•, e o controle positivo, onde não houve produção detectável de NO•.

Tabela 20. Valores de NO• produzidos em 4 concentrações de extratos e frações de *Endopleura uchi*, controle positivo (sem LPS) e negativo (com LPS). Os dados são representados por média ± desvio padrão.

Extratos/Frações Controles	Concentrações (µg/mL)			
	2,5	5	10	25
	NO (µM)/1 x 10 ⁶ de células			
CEA-1	6,51 ± 0,6	6,42 ± 1,7	5,24 ± 0,5	2,77 ± 0,5
CEM-1-CHCl ₃	3,66 ± 1,1	3,72 ± 1,8	1,05 ± 1,4	0,59 ± 0,5
GEA-1	8,27 ± 1,0	7,96 ± 0,2	5,83 ± 1,2	1,39 ± 0,2
GEM-1-AcOEt	6,93 ± 1,5	6,11 ± 2,0	4,90 ± 1,5	0,52 ± 0,0
GEM-1-CHCl ₃	5,10 ± 4,0	4,80 ± 0,9	3,66 ± 0,9	0,62 ± 0,0
FEA-1	6,05 ± 1,25	5,03 ± 0,1	4,00 ± 1,1	2,42 ± 0,7
FEM-1-AcOEt	5,92 ± 2,0	5,56 ± 0,6	4,27 ± 1,4	3,54 ± 2,3
FEM-1-CHCl ₃	3,23 ± 0,6	2,60 ± 0,4	2,34 ± 0,8	0,1 ± 0,4
com LPS			8,52	
sem LPS			0,00	

Os resultados acima (Tabela 20) mostram que a inibição da produção de NO• é dependente da concentração da amostra, pois foi observado que a produção de espécies de NO• diminuiu com o aumento da concentração das amostras.

A Figura 36 apresenta o efeito das amostras na concentração de 25 µg/mL na produção de NO• em resposta ao estímulo por LPS. A fração clorofórmica das folhas (FEM-1-CHCl₃) afetou a produção de NO• quase completamente com apenas 0,1 µM

de NO[•] produzido, seguidas das frações clorofórmicas das cascas (CEM-1-CHCl₃), galhos (GEM-1-CHCl₃) e fração acetato de etila dos galhos (GEM-1-AcOEt) com 0,59, 0,62 e 0,52 μM de NO[•] respectivamente. Entre os extratos aquosos, a melhor inibição da produção de NO[•] foi observado nos extratos dos galhos (GEA-1), seguida dos extratos das folhas (FEA-1) e cascas (CEA-1) com 1,39; 2,42 e 2,77 μM de NO[•] respectivamente.

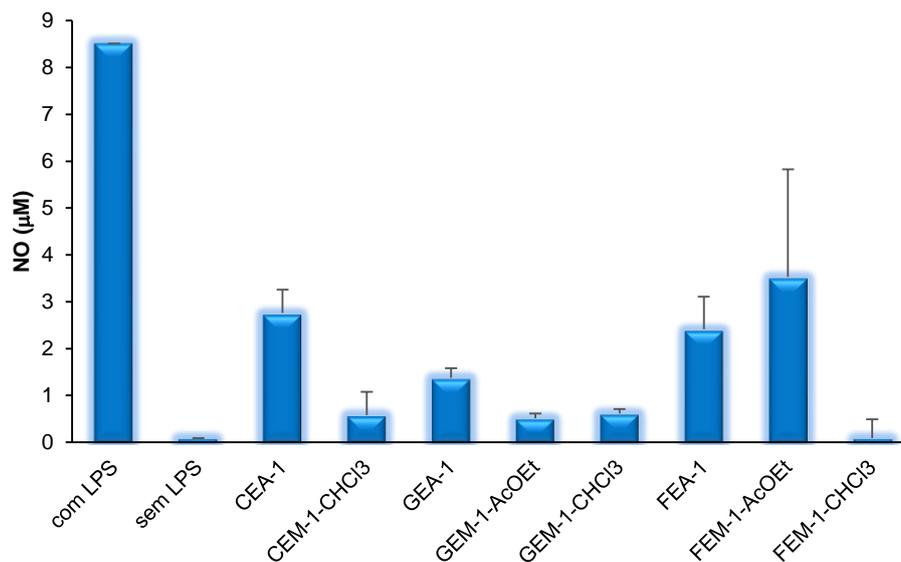


Figura 36. Efeito da concentração em 25 μg/mL dos extratos e frações de *Endopleura uchi* na produção de NO em cultura de macrófagos estimulados por LPS. Os valores são expressos em média ± desvio padrão, obtido a partir de análises em triplicata (n=3).

A capacidade de inibição em 50 % de NO[•] variou entre 3,2 – 12,97 μg/mL e estão representados na Figura 37. A melhor capacidade inibitória foi alcançada pela fração clorofórmica das folhas que apresentou inibição de 50 % de NO[•] com apenas 3,2 μg/mL, seguidas da fração clorofórmica das cascas (IC₅₀ = 4,81), acetato de etila dos galhos (IC₅₀ = 7,63) e extrato aquoso das folhas (IC₅₀ = 7,86). Vale ressaltar que a fração clorofórmica das folhas também apresentou atividade antiúlcera pelo método de lesão gástrica induzida por estresse a frio.

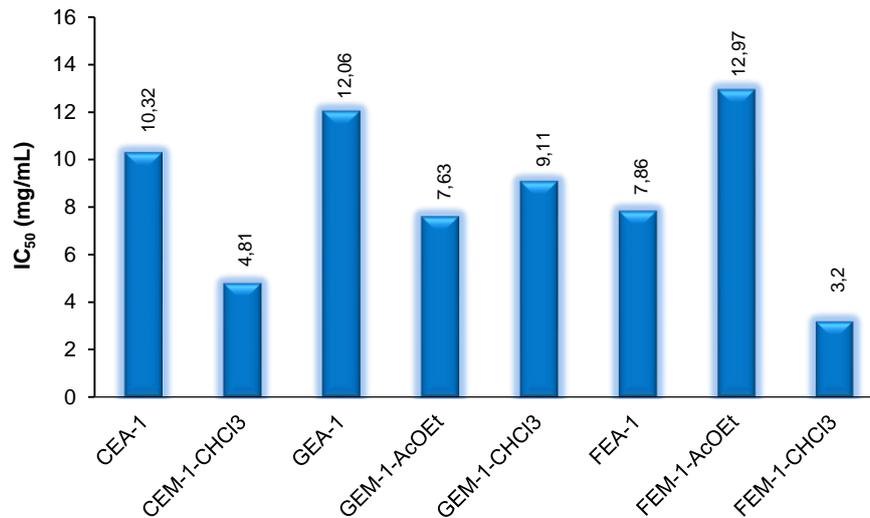


Figura 37. Capacidade inibitória (IC₅₀) de NO* induzido por LPS em macrófagos murinos J774 dos extratos e frações na produção). Os dados são representados por média ± desvio padrão.

Muitos estudos mostram indício de que a molécula de NO* quando produzido em excesso pode colaborar para algumas condições patológicas como artrite reumatoide, asma, doença de Parkinson e Alzheimer, principalmente doenças inflamatórias (CALABRESE *et al.*, 2004; HAMID *et al.*, 1993; NICHOLSON *et al.*, 1996; SAKURAI *et al.*, 1995). Portanto, é crescente a busca de mediadores capazes de atenuar a produção de NO*, pois podem ter estimável valor terapêutico no tratamento de estados patofisiológicos decorrente da produção excessiva de NO*, que é considerado um dos mediadores em processos inflamatórios (HOBBS, HIGGS e MONCADA 1999). Nesse contexto, através dos resultados obtidos para a inibição de NO* pela ação dos extratos aquosos e frações de *Endopleura uchi*, que apresentou definitivamente valores relevantes de inibição, podemos sugerir que a espécie *Endopleura uchi* pode ser útil no controle de doenças inflamatórias, justificando dessa forma o uso popular como anti-inflamatória.

5.6 Atividade antiúlcera: Lesão gástrica induzida por estresse a frio

Algumas espécies utilizadas tradicionalmente na medicina popular são apontadas por apresentarem propriedades gastrointestinais. (AKUODOR *et al.*, 2012), e as que são submetidas a estudos científicos têm mostrado resultados promissores para o tratamento de úlcera gástrica, portanto, as plantas medicinais

podem ser consideradas como fontes de novas substâncias para tratamento de doenças gastrointestinais (TOMA *et al.*, 2002).

A atividade antiúlcera das amostras de *Endopleura uchi* foi determinada em um modelo experimental *in vivo* por estresse induzido a frio, sendo capaz de mensurar o número de úlceras e o índice de lesão na mucosa gástrica, tais como cor, perda de pregas, petéquias, edemas, hemorragias, muco e a própria úlcera necrosada.

A atividade antiúlcera foi realizada com as frações acetato de etila (FEM-1-AcOEt) e clorofórmica das folhas (FEM-1-CHCl₃), o qual mostraram resultados bastante relevante quando comparado ao controle positivo (carbenoxolone) que é utilizado no tratamento de úlcera gástrica (Figura 38).

Analisando-se os resultados obtidos da fração acetato de etila (FEM-1-AcOEt) foi possível observar que a amostra na concentração de 30 mg/Kg apresentou uma atividade próxima ao do controle positivo que foi aplicado na dosagem de 200 mg/Kg.

A amostra FEM-1-CHCl₃ aplicada na concentração de 100 mg/Kg mostrou a mesma atividade que o controle positivo (200 mg/Kg) em relação ao número de úlceras e mais efetivo na diminuição do índice de lesão.

A presença de úlceras intestinais e duodenais afetam uma grande parte da população mundial, e sua incidência pode ser decorrente por diversos fatores, incluindo estresse, tabagismo, baixo nível nutricional, isquemia (falta de suprimento sanguíneo) da mucosa, ação da bactéria *Helicobacter pylori*, necrose tecidual, entre outros fatores que ocasionam conseqüentemente a formação de radicais livres. (TARNAWSKI *et al.*, 2010 BATISTA, *et al.*, 2004). Considerando que as frações das folhas de *Endopleura uchi* evidenciaram através dos resultados um efeito preventivo das ulcerações produzidas por estresse a frio, podemos relacionar esse resultado à presença dos compostos antioxidantes determinados anteriormente, pois espécies radiculares estão envolvidas no processo de desenvolvimento de úlceras.

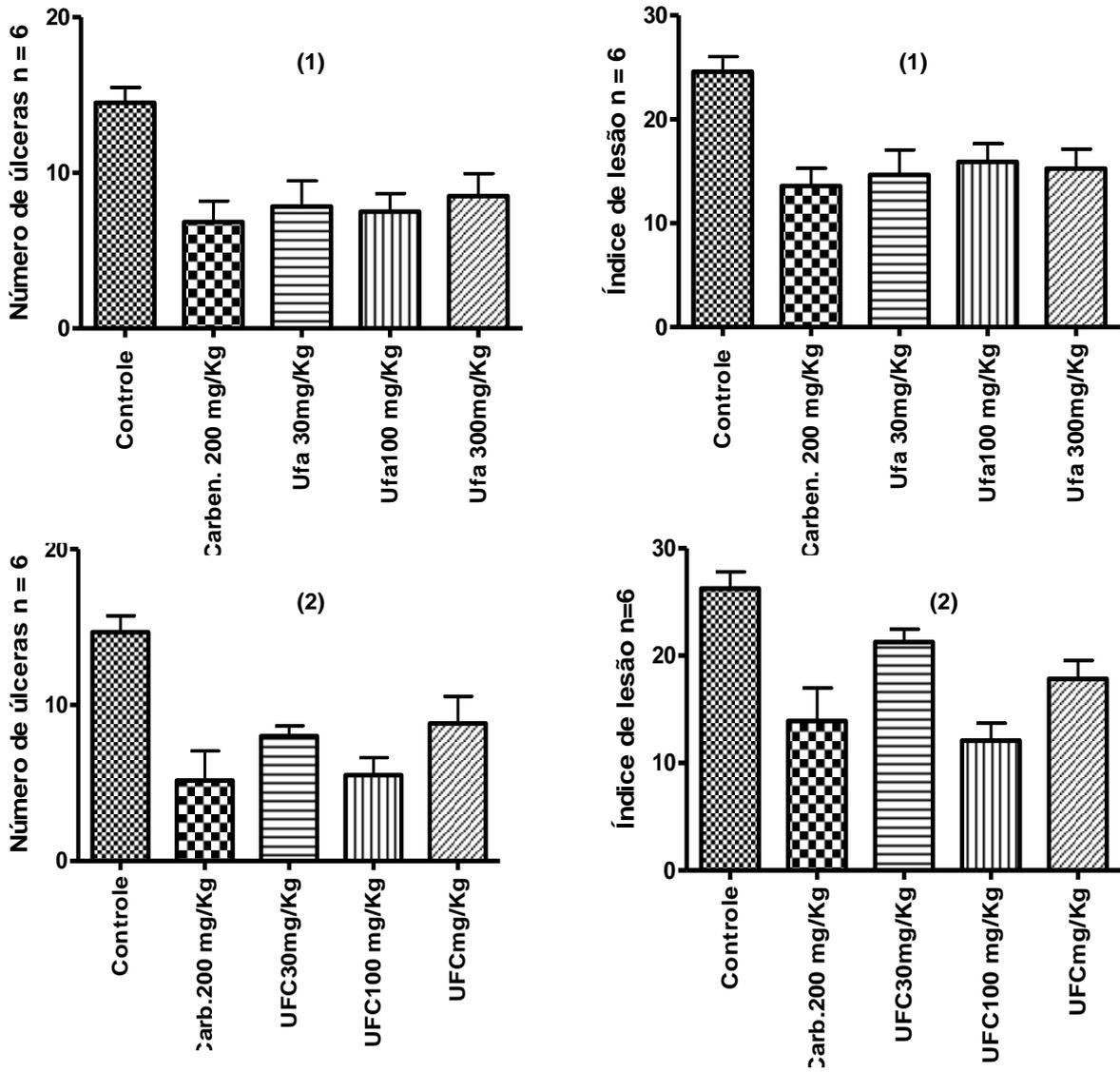


Figura 38. Resultado da atividade antiúlcera das amostra FEM-1- AcOEt (1) e FEM-1-CHCl₃ (2).

6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico da espécie *Endopleura uchi* levou ao isolamento da bergenina, um derivado do ácido gálico, que é considerado o marcador químico da espécie, pois através do estudo da quantificação demonstrou estar presente em grande quantidade nas cascas, galhos e folhas, além de já ter sido isolada também dos frutos (MAGALHÃES *et al.*, 2007). O triterpeno friedelina também foi isolado e identificado nos galhos e folhas de *Endopleura uchi*. Os isolamentos dessas substâncias são descritas pela primeira vez nos galhos e folhas dessa espécie. Outros dois compostos foram isolados, porém não foi possível identifica-los a tempo.

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Endopleura uchi* apresentou valores excelentes pelo método de sequestro de radicais DPPH e também pela redução de ferro (III), mostrando seu grande valor terapêutico, visto que a capacidade antioxidante está relacionada aos grandes benefícios da saúde, pelo efeito de inibição das reações de propagação de espécies radicalares. A bergenina, apesar de estar presente com alto teor na planta, não apresentou atividade antioxidante frente os dois métodos testados. O que não era de se esperar visto que sua estrutura apresenta duas hidroxilas ligadas ao anel aromático e outras três hidroxilas na parte glicosídicas. Porém a justificativa para tal comportamento deve-se a sua conformação que não é totalmente planar, fazendo com que ocorram muitas ligações hidrogênicas, diminuindo dessa forma a disponibilidade de elétrons ou prótons.

O resultado positivo da avaliação anti-inflamatória dos extratos aquosos e frações clorofórmica de *Endopleura uchi*, pela inibição da espécie reativa de óxido nítrico (NO^{*}) confirma sua habilidade antioxidante e seu efeito anti-inflamatório.

A quantificação de bergenina em amostras comerciais adquiridas em Manaus e também de outros lugares do Brasil, evidenciou a presença de bergenina quando comparada com o padrão original coletado da reserva Ducke, confirmando a autenticidade do material vegetal comercial de *Endopleura uchi*. Porém, no total de 14 amostras, apenas duas obtiveram rendimentos de bergenina próximos ao do padrão. As demais apresentaram valores variados entre 5 a 31 % de bergenina em comparação com o padrão. O baixo percentual de bergenina, pode estar relacionado com fatores, climáticos, sazonal entre outros, mas também pode estar relacionado à adulteração do matéria vegetal com outras tipos plantas.

A quantificação de bergenina e o isolamento de friedelina e bergenina nos galhos e folhas bem como a avaliação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de *Endopleura uchi* são descritos pela primeira vez na literatura, podendo servir como base para outros estudos biológicos relacionados à atividade antioxidante e anti-inflamatória e também na investigação de novos fármacos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIYAR, S. N.; JAIN, M. K.; KRISHNAMURTI, M.; SESHADRI, T. R. Chemical components of the roots of *Connarus monocarpus*. **Phytochemistry**, v. 3, p. 335-339, 1964;
- AKUODOR, G. C.; MBAH, C. C.; ESSIEN, A. D.; AKPAN, J. L.; EZEOKPO, B. C.; IWUANYANWU, T. C.; OSUNKWO, U. A. Ulcer-protective and Antidiarrhoeal effects of the aqueous Stem Bark Extract of *Bridelia ferruginea* in Rodents. **Pharmacologia** **3**, v. 11, p. 591-597, 2012.
- ALMEIDA, M. F. O.; MELO, A. C. R.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. P. Constituintes Químicos e Atividade Leishmanicida de *Gustavia elliptica* (LECYTHIDACEAE). **Quimica Nova**, v. 34, p. 1182- 1187, 2011.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; VILLAREAL, C. F.; SOARES, M. B. P.; DE QUEIROZ, L. P.; AGUIAR, R. M. Flavonoids and other bioactive phenolics isolated from *Cenostigma macrophyllum* (Leguminosae). **Quimica Nova**, v. 35, n. 6, p. 1137-1140, 2012.
- AKERELE, O. **Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines**. Herbal Gram, v. 28, p.13-19, 1993.
- AKIHISA, T.; YAMAMOTO, K.; TAMURA, T.; KIMURA, Y.; IIDA, T.; NAMBARA, T.; CHANG, F. C. Triterpenoid ketones from *Lingnania-chungii* McClure – Arborine, friedelin and glutinone. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 3, p. 789-791, 1992.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the *Canadian prairies*. **Food Chemistry**, v. 84, p. 551–562, 2004.
- ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetra-cantha* Lam. in mouse and rat model. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, p. 1070–1077, 2011.
- ARUOMA O. I. Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, 1998.
- BANOV, D.; BABY, A. R.; DEL BOSCO, L. M.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Caracterização do Extrato Seco de *Ginkgo biloba* L. em Formulações de Uso Tópico. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v, 25, n. 2; p. 219-224, 2006.
- BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; PIETRO M. L.; TOMA, W.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Gastric Antiulcer Activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 3, p. 328-332, 2004.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, v. 219, n. 6, p. 561-571, 2004.

BESSONG, P. O.; OBI, C. L.; ANDREOLA, M. L.; ROJAS, L. B.; POUYSEGU. L.; IGUMBOR, E.; MEYER, J. J.; QUIDEAU, S.; LITVAK. S. Evaluation of selected South African medicinal plants for inhibitory properties against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 83, 2005.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferri reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BORRÁS, M. R. L. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas – Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa**. Ed. Valer/Governo do Estado do Amazonas. p.19-27, 2003.

BRAÇA, A.; SORTINO, C.; POLITI, M.; MORELLI, I.; MENDEZ, J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. **Journal of Ethnopharmacology**. v .72, p. 379-381, 2002.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E. E BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie*. **Food Science and Technology**, v. 28, p.25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, 1998.

BROWN, G. D. The biosynthesis of steroids and triterpenoids. **Natural Products Reports**, v. 15, p. 653-696, 1998.

CAI, Z.; DAN, F.; WANG, W.; CHU, L. Study on the extraction of bergenin from *Rodgersia aesculifolia* Batal by ultrasonic technology. **Zhongguo Xiandai Yingyong Yaoxue**, v. 26, n. 7, p. 559-561, 2009.

CALABRESE, V.; BOYD-KIMBALL, D.; SCAPAGNINI, G.; BUTTERFIELD, D. A. Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of vitagenes. **In Vivo**, v. 18, n. 3, p. 245-267, 2004.

CALDAS, C. S.; De SIMONE, C. A; PEREIRA, M. A.; MALTA, V. R. S.; CARVALHO, R. L. P.; Da SILVA, T. B. C.; SANT'ANA, A. E. G.; CONSERVA, L. M. Bergenin monohydrate, a constituent of *Hurmiria balsamifera*, at 120 K. **Acta Crystallographica Section E**, v. 58, p. 609-611, 2002.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas Comestíveis da Amazônia**. 6ª ed. – Belém: CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi, (Coleção Adolpho Ducke) p. 228, 1996.

CHAUDHURY, I.; SUNIL K.; HEMANT, R.; GAUTAM, K.; DAS, H. R.; DAS, R. H. Suppression of inducible nitric oxide synthase by 10–23 DNazymes in murine macrophage. **FEBS Letters**, v. 580, 2046–2052, 2006.

CHAUHAN, S. K.; SINGH, B.; AGRAWAL, S. Simultaneous determination of bergenin and gallic acid in *Bergenia ligulata* Wall by high-performance thin-layer chromatography. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 83, p. 1480-1483, 2000.

CHEN, H.; CHEN, T.; LI, J. X.; XU, Q. Study on constituents in rhizome of *Astilbe chinensis*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 29, p. 652-654, 2004.

CHENG, S.; XU, F.; WANG Y.; Advances in the study of flavonoids in *Ginkgo biloba* Leaves. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 13, p. 1248-1252, 2009.

CHI, C.; WANG, F.; LEI, T.; XU, S.; HONG, A.; CEN, Y. Studies on chemical constituents from *Cissus pteroclada*. **Zhongyaocai**, v. 33, n. 10, p. 1566-1568, 2010.

CIÉSLIK, E.; GREDA, A.; ADAMUS, W. Contents of polyphenols in fruit and vegetables. **Food Chemistry**, v. 94, p. 135-142, 2006.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M.Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between korean medicinal plants and flavonoids by assy-guided comparassion. **Plant Science**, v, 163, p. 1161-1168, 2002.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, v. 6, 1984.

COSTA, P. A.; BALLUS, C. A.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 43, p. 1603-1606, 2010.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. **Natural products (secondary metabolites)**. in Biochemistry and Molecular Biology of Plants. eds BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (American Society of Plant Biologists, Rockville, MD), p. 1250-1268, 2000.

CUATRECASAS, J. A. **A taxonomic revision of Humiriaceae, Contributions from the United States National Herbarium**. Bulletin of the United States National Museum, Parte 2, 35, 1961.

CUI, Y. Chemical constituents of *Bergenia scopulosa* (l). **Zhongchengyao**, v. 33, n. 9, p. 1546-1549, 2011.

DHARMENDER, R.; THANKI, M.; AGRAWAL, R.; ANANDJIWALA, S. Simultaneous quantification of bergenin, (+)-catechin, gallicin and gallic acid; and quantification of

β -sitosterol using HPTLC from *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb. forma ligulata Yeo (Pasanbheda). **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 1, n. 1, p. 104, 2010.

DE OLIVEIRA, C. M.; NONATO, F. R.; DE LIMA, F. O.; COUTO, R. D.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; SOARES, M. B.; VILLARREAL, C. F. Antinociceptive properties of bergenin. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 10, p. 2062-2068, 2011.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5. n.1, p. 33-40, 2004.

DENG, J.; XIAO, X.; TONG, X.; LI, G. Preparation of bergenin from *Ardisia crenata* Sims and *Rodgersia sambucifolia* Hemsl based on microwave-assisted extraction/high-speed counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 74, p. 155–159, 2010.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach**. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 2ª edição, p. 507, 2002.

DURAIKANDIYAN, V.; GNANASEKAR, M.; IGNACIMUTHU, S. Antifungal activity of triterpenoid isolated from *Azima tetraantha* leaves. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 48, n. 2, p. 311-313, 2010.

ERENEL, G.; ERBAS, D.; ARICIOGLU, A. Free radicals and antioxidant systems. **Materia Medica Polona**, v.1, n.85, p.37-43, 1993.

FARIAS, M. R. **Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais**. In: SIMÕES, O. M. C.; SCHENKEL, R. P.; GOSMANN, G.; MELLO, P. C. J.; MENTZ, A. L.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta medicamento. Ed. UFRGS, Florianópolis: Ed. UFSC, p. 197-220, 1999.

FLORES-SÁNCHEZ, I. J.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; MONTES-HORCASITAS, M. del C.; RAMOS-VALDIVIA, A. C. Biosynthesis of Sterols and Triterpenes in Cell Suspension Cultures of *Uncaria tomentosa*. **Plant and Cell Physiology**, v. 43, n. 12, p. 1502-1509, 2002.

GABRIEL, N.; FOLEFOC, J. P. B.; ZACHARIAS, T. F.; BERNARD, B. Constituents from the roots of *Pentaclethra macrophylla*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 1280-1282, 2005.

GIORDANO, L. C. S.; BOVE, C. P. Taxonomic considerations and amended description of *Humiriastrum spiritu* – sancti, Humiriaceae. **Rodriguésia**, v. 59. n.1, p. 151-154, 2008.

GOEL, R. K.; MAITI, R. N.; MANICKAM, M.; RAY, A. B. Antiulcer activity of naturally occurring pyrano-coumarin and isocoumarins and their effect on prostanoid. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 35, n. 10, p. 1080-1083, 1997.

GONÇALVES, A. E. de S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and

Commercial Frozen Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4666–4674, 2010.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R.; Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, 131–138, 1982.

HALLIWELL, B. Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HAMID. Q.; SPRINGALL, D. R.; RIVEROS-MORENO, V.; CHANEZ, P.; HOWARTH, P.; REDINGTON, A.; BOUSQUET, J.; GODARD, P.; HOLGATE, S.; POLAK, J. M. Induction of nitric oxide synthase in asthma. **The Lancet**, v. 342, n. 8886-8887, p. 1510-1513, 1993.

HERRERA, F.; MANCHESTER, S. R.; JARAMILLO, C.; MACFADDEN, B.; SILVA-CAMINHA, S. A. Phytogeographic history and phylogeny of the Humiriaceae. **International Journal of Plant Sciences**, v. 171. n. 4, p. 392–408, 2010.

HABTEMARIAM, S.; COWLEY, R. A. Antioxidant and Anti- α -glucosidase Compounds from the Rhizome of *Peltiphyllum peltatum* (Torr.) Engl. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 11, p. 1656-1660, 2012.

HOBBS, A. J.; HIGGS, A.; MONCADA, S.; Inhibition of Nitric Oxide Synthase as A Potential Therapeutic Target. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, p. 191-220, 1999.

HOFFMANN, B. K.; LOTTER, H.; SELIGMANN, O.; WAGNER, H. Antihepatotoxic C-glycosylflavones from the leaves of *Allophyllus edulis* var. *edulis* and *gracilis*. **Planta Medica**, v. 58, p. 544-548, 1992.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ E. F., VIEIRA, P. C., **A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores**. Série de textos da Escola de Verão em Química-IV, São Carlos, SP, Ed. UFSCar, p. 152, 2003.

IGNOATO, M. C.; FABRÃO, R. M.; SCHUQUEL, I. T. A.; BOTELHO, M. F. P.; SANTIN, S. M. de O.; de ARRUDA, L. L. M.; BERSANI-AMADO, C. A.; de SOUZA, M. C. Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória de *Aeschynomene fluminensis* Vell. (Fabaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2241-2244, 2012.

IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 5, p. 1811-1815, 2003.

ITO, T.; TANAKA, T.; IINUMA, M.; ILIYA, I.; NAKAYA, K.; ALI, Z.; TAKAHASHI, Y.; SAWA, R.; SHIRATAKI, Y.; MURATA, J.; DARNAEDI, D. New resveratrol oligomers in the stem bark of *Vatica pauciflora*. **Tetrahedron**, v. 59, p. 5347-5363, 2003.

ITO, T.; HARA, Y.; OYAMA, M.; TANAKA, T.; MURATA, J.; DARNAEDI, D.; IINUMA, M. Occurrence of bergenin phenylpropanoates in *Vatica bantamensis*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 4, p. 743-746, 2012.

IZAWA K, NAGAI M, T. Triterpene acids and bergenin in *Peltoboykinia watanabei* and *Boykinia lycoctonifolia*. *Phytochemistry* 1973; 12:1508.

JACHAK, S. M.; GAUTAM, R.; SELVAM, C.; MADHAN, H.; SRIVASTAVA, A.; KHAN T. Anti-inflammatory, cyclooxygenase inhibitory and antioxidant activities of standardized extracts of *Tridax procumbens* L. **Fitoterapia**, v. 82, n. 2, p. 173-177, 2011.

JIN, Y.; YU, Y.; ZHANG, L.; LIU, X.; LI, X.; LI, Z.. Chemical constituents of *Astilboides tabularis* (Hemsl.) Engler. **Jilin Daxue Xuebao**, v. 49, n. 2, p. 340-342, 2011.

JING, L.; YU, N.; ZHAO, Y.; LI, Y. Trace chemical constituents contained in *Trachelospermum jasminoides* and their structure identification. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, v. 37, n. 11, p. 1581-1585, 2012.

JUNG, J.; LIM, E.; KIM, S. H.; KIM, N. S.; JUNG, M.; OH, S. Practical Synthesis and Biological Evaluation of Bergenin Analogs. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 78, p. 725-729, 2011.

KUMAR, R.; PATEL, D. K.; PRASAD, S. K.; LALOO, D.; KRISHNAMURTHY, S.; HEMALATHA, S. Type 2 antidiabetic activity of bergenin from the roots of *Caesalpinia digyna* Rottler. **Fitoterapia**, v. 83, p. 395-401, 2012.

KIMURA, Y.; SUMIYOSHI, M.; SAKANAKA, M. Effects of *Astilbe thunbergii* rhizomes on wound healing: Part 1. Isolation of promotional effectors from *Astilbe thunbergii* rhizomes on burn wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 72-77, 2007.

KOBAYASHI, H.; DE MEJIA, E. The genus *Ardisia*: a novel source of health-promoting compounds and phytopharmaceuticals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 347-354, 2005.

KOLEVA, I. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study of three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 8-17, 2002.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. Editora Átomo. Campinas – SP, 2009.

LAGOS, I. A. **Estudo químico de fitoconstituintes isolados de *Sacoglottis uchi* Huber (Humiriaceae)**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Amazonas, 2006.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Sociedade Brasileira de Plantas medicinais. p. 99-117, 2003.

- LEE, Y. Y.; JANG, D. S.; JIN, J. L.; YUN-CHOI, H. S. Anti-platelet aggregating and anti-oxidative activities of 11-O-(4'-O-methylgalloyl)-bergenin, a new compound isolated from *Crassula* cv. 'Himaturi'. **Planta Medica**, v. 71, p. 776-777, 2005.
- LI, C.; CHEN, X.; FANG, D.; LI, G. A new Bergenin derivative from *Corylopsis willmottiae*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 2, 194-196, 2011.
- LI, D.; NIAN, Y.; SUN, Y.; QIU, M. Three New Cycloartane (=9,19-Cyclolanostane) Glycosides from *Cimicifuga foetida*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 94, n. 4, p. 632-638, 2011.
- LI, R. W.; LEACH, D. N.; MYERS, S. P.; LIN, G. D, LEACH GJ, WATERMAN PG. A new anti-inflammatory glucoside from *Ficus racemosa* L. **Planta Medica**, v. 70, p. 421-426, 2004.
- LI, Y. F.; HU, L. H.; LOU, F. C.; LI, J.; SHEN, Q. PTP1B inhibitors from *Ardisia japonica*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 7, p. 13-18, 2005.
- LIM, H. K.; KIM, H. S.; CHOI, H. S.; OH, S.; CHOI, J. Hepatoprotective effects of bergenin, a major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride intoxicated rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 469-474, 2000.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Noca Odessa, SP, v. 2, p. 109, 1998.
- LORENZI, H.; BACHER, L. B.; LARCEDA, M. T. C. DE; SARTORI, S. F. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p.149, 2006.
- LUNA, J. S. **Estudo dos constituintes químicos de *Endopleura uchi* (Humiriaceae)**. Dissertação de Mestrado em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Brasil, 2000.
- LUXIMON-RAMMAN, B. T.; SOOBRALEE, M. A.; ARUOMA, O. I. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5042-5047, 2002.
- MADUKA, H. C. C.; OKOYE, Z. S. C. Bergenin, A Nigerian alcoholic beverage additive from *Sacoglottis gabonensis* as an antioxidant protector of mammalian cells against 2,4-dinitrophenyl hydrazine-induced lipid peroxidation. **Journal of Toxicology**, v. 3, p. 1, 2006.
- MAGALHÃES, L. A. M.; LIMA, M. DA P.; MARINHO, H. A.; FERREIRA, A. G. Identificação de bergenina e carotenóides no fruto de uchi (*Endopleura uchi*, Humiriaceae). **Acta Amazonica**, v. 37, n. 3, p. 447-450, 2007.
- MARX, F.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S. Studies of edible Amazonian plants. Part 5: Chemical characterization of Amazonian *Endopleura uchi* fruits. **European Food Research and Technology**, v. 214, p. 331-334, 2002.

MATOS, F. J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Ed. UFC, p. 128, 1997.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S.G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MINH, C. V.; NGUYEN, T. K. T.; QUANG, T. H.; NGUYEN, X. C.; NGUYEN, N. T.; NGUYEN, Ho. N.; VANDER HEYDEN, Y.; QUETIN-LECLERCQ, J.; KIEM, P. V. Two new megastigmane sulphonoglucosides from *Mallotus anisopodus*. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 7, p. 889-892, 2009.

MISHIMA, S.; MATSUMOTO, K.; FUTAMURA, Y.; ARAKI, Y.; ITO, T.; TANAKA, T.; IINUMA, M.; NOZAWA, Y.; AKAO, Y. Antitumor effect of stilbenoids from *Vateria indica* against allografted sarcoma S-180 in animal model. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, v. 3, p. 283-288, 2003.

MURIAS, M.; HANDLER, N.; ERKER, T.; PLEBAN, K.; ECKER, G.; SAIKO, P., SZEKERES, T.; JÄGER, W. Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure-activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 5571 – 5578, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n.1-2, p.95-111, 2004.

NASSER, J. A.; YAACOB, W. A.; DIN, L. B.; LATIP, J. Chemical components of *Hopea sangal*. **ACGC Chemical Research Communications**, v. 23, p. 23-25, 2009.

NAZIR, N.; KOUL, S.; QURISHI, M. A.; TANEJA, S. C.; AHMAD, S. F.; BANI, S.; QAZI, G. N. Immunomodulatory effect of bergenin and norbergenin against adjuvant-induced arthritis. A flow cytometric study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 401-405, 2007.

NAZIR, N.; KOUL, S.; QURISHI, M. A.; NAJAR, M. H.; ZARGAR, M. I. Evaluation of antioxidante and antimicrobial activities of Bergenin and its derivatives obtained by chemoenzymatic synthesis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 2415-2420, 2011.

NEWELL, A. M. B.; YOUSEF, G. G.; LILAA, M. A.; RAMÍREZ-MARES, M. V.; DE MEJIAA, E. G. Comparative in vitro bioactivities of tea extracts from six species of *Ardisia* and their effect on growth inhibition of HepG2 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 536–544, 2010.

NGUYEN, T. M.; NGUYEN, X. C.; NGUYEN, P. T.; NGUYEN, H. N.; NGUYEN, H. K.; MINH, C. V.; VANDER HEYDEN, Y.; THUAN, N. T.; NGUYEN, V. T.; QUETIN-LECLERCQ, J.; KIEM, P. V. A new lignan dimer from *Mallotus philippensis*. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 3, p. 423-426, 2010.

NICHOLSON, S.; BONECINI-ALMEIDA, M. G.; LAPA e SILVA, J. R.; NATHAN, C.; XIE, Q. W.; MUMFORD, R.; WEIDNER, J. R.; CALAYCAY, J.; GENG, J.; BOECHAT, N.; LINHARES, C.; ROM, W.; HO, J. L. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 5, p. 2293–2302, 1996.

NUNOMURA, R. C. S.; OLIVEIRA, V. G.; DA SILVA, S. L.; NUNOMURA, S. M. Characterization of bergenin in *Endopleura uchi* bark and its anti-inflammatory activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1060-1064, 2009.

OLIVEIRA, R. S.; CUNHA, S. C.; COLAÇO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2B, p. 650-659, 2009.

NYASSE, B.; NONO, J.; SONKE, B.; DENIER, C.; FONTAINE, C. Trypanocidal activity of bergenin, the major constituent of *Flueggea virosa*, on *Trypanosoma brucei*. **Pharmazie**, v. 59, p. 492-494, 2004.

OGAN, A. U. An isocoumarin from the bark of *Sacoglottis gabonensis*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 2832-2833, 1971.

OLENNIKOV, D. N.; CHEKHIROVA, G. V. 6-Galloylpicein and Other Phenolic Compounds from *Arctostaphylos uva-ursi*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 49, n. 1, 2013.

PINHEIRO, J. P.; ROSARIO, J. S. **Avaliação Fitoquímica e Antinociceptiva do extrato bruto aquoso liofilizado da espécie vegetal *Endopleura uchi* (Uxi amarelo)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de farmácia) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.

POLITI, F. A. S. **Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2009.

POLITI, F. A. S.; PIETRO, R. C. L. R.; MOREIRA, R. R. D.; SALGADO, H. R. N. Testes preliminares de motilidade intestinal e toxicidade oral aguda com extrato de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) em camundongos. **Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 187-189, 2010.

POLITI, F. A. S.; DE MELLO, J. C. P.; MIGLIATO, K. F.; NEPOMUCENO, A. L. A.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R. Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activities and Determination of the Total Tannin Content of Bark Extracts *Endopleura uchi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 2757-2768, 2011.

POLTERAIT, O. Antioxidants and free-radical scavengers of Natural Origin. **Current Organic Chemistry**, v. 1, p. 415-440, 1997.

PRANCE, G.; SILVA, M. **Árvores de Manaus**. 17^a ed. Manaus. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), p. 115-118, 1975.

PRIYA, O. S.; VISWANATHAN, M. B. G.; BALAKRISHNA, K.; VENKATESAN, M. Chemical constituents and *in vitro* antioxidant activity of *Phyllanthus wightianus*. **Natural Product Research**, v. 25, n. 10, p. 949–958, 2011.

PU, H.; HUANG, X. ZHAO, J.; HONG, A. Bergenin is the antiarrhythmic principle of *Fluggea virosa*. **Planta medica**, v. 68, n. 4, p. 372-374, 2002.

RAJBHANDARI, M.; LALK, M.; MENTEL, R.; LINDEQUIST, U. Antiviral activity and constituents of the Nepalese medicinal plant *Astilbe rivularis*. **Records of Natural Products**, v. 5, n. 2, p. 138-142, 2011.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidade econômicas e sustentáveis**. 1ª edição. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, Co-Edição SEBRAE. INPA, PP. p. 89-92, 2001.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia – Oportunidades Econômicas e Sustentáveis**. Ed. INPA e SEBRAE, Manaus-AM, p. 89-90, 283-284, 2002.

RIBEIRO, J. E. L. DA S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. DA S.; DE BRITO, J. M.; DE SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. DA C.; DA SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia**. In: SOTHERS, C. A.; BRITO, J. M.; PRANCE, G. T. Humiriaceae. Manaus: INPA, p. 502-503, 1999.

RICE-EVANS, C.; BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in Lipid Research**, v.32, n.1, p. 71-110, 1993.

ROHMER, M.; KNANI, M.; SIMONIN, P.; SUTTER, B.; SAHM, H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. **Biochemical Journal**, v. 295, p. 517-524, 1993.

ROSELLI, M.; LENTINI, G.; HABTEMARIAM, S. Phytochemical, Antioxidant and Anti- α -glucosidase Activity Evaluations of *Bergenia cordifolia*. **Phytotherapy Research**, v. 26, n.6, p. 908-914, 2012.

SAWAI, S.; SAITO, K. Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, n. 25, 2011.

SAKURAI, H.; KOHSAKA, H.; LIU, M. F.; HIGASHIYAMA, H.; HIRATA, Y.; KANNO, K.; SAITO, I.; MIYASAKA, N. Nitric Oxide Production and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Inflammatory Arthritides. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, p. 2357-2363, 1995.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 287-306, 2005.

SHANLEY, P.; GAIA, G. A “fruta do pobre” se torna lucrativa: a *Endopleura uchi* Cuatrec. em áreas manejadas próximo a Belém. Brasil, 1998, cap.11, p. 219-240. In: ALEXIADES, M. N.; SHANLEY, P. Productos forestales, medios de subsistencia y conservación: Estudios de caso sobre sistemas de manejo de productos forestales no maderables. Volumen 3 - América Latina. Centro para la Investigación Forestal Internacional (CIFOR), Bogor, Indonesia, p. 499, 2004.

SHANLEY, P.; LUZ, L.; Swingland, I. R. The faint promise of a distant market: a survey of Belém’s trade in non-timber forest products. **Biodiversity and Conservation**, v. 11, p. 615-636, 2002.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. Editora Supercores. CIFOR /IMAZON, Belém, 2004.

SHEN, Y.; CHEN, J.; XU, J.; GUAN, B.; LUO, Z. Effect of bergenin on LPS-induced expressions of IL-6, TNF- α and NF- κ B in RAW264.7 cells. **Zhongyaocai**, v. 35, n. 10, p. 1660-1662, 2012.

SHIMIZU, M; TOMOO, T. Anti-inflammatory constituents of topically applied drugs V: constituents with antiinflammatory from Aoki (*Aukuba japonica* Thumb.). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.17, p. 665-667, 1994.

SCHULTES, R. E. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes. XXI. Interesting native uses of the Humiriaceae in the northwest Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 1, p. 89-94, 1979.

SCHUTZ, B.; ORJALA, J.; STICHER, O.; RALI, T. Dammarane triterpenes from the leaves of *Securinega melanthesoides*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 96-98, 1998.

SILVA, M. C.; CARVALHO J. C. T. Plantas Medicinais: In: J. C. T. Carvalho. Fitoterápicos, antiinflamatórios, aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP, Tecmedd, p. 480, 2004.

SILVA, S. L.; OLIVEIRA, V. G.; YANO, T.; NUNOMURA, R. C. S. Antimicrobial activity of bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 187-192, 2009.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SONG, X.; CHEN, G.; SONG, X.; HAN, C.; CHEN, S.; WENG, S. Study on the chemical constituents of leaves from *Vatica mangachpoi* Blanco. **Linchan Huaxue Yu Gongye**, v. 32, n. 3, p. 102-106, 2012.

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

SOUZA, A. D. L.; RODRIGUES-FILHO, E.; SOUZA, A. Q. L.; PEREIRA, J. O.; CALGAROTTO, A. K.; MASO, V.; MARANGONI, S.; SILVA, S. L. Koninginins, phospholipase A₂ inhibitors from endophytic fungus *Trichoderma koningii*. **Toxicon**, v. 51, p. 240-250, 2008.

SRINIVASAN, R.; CHANDRASEKAR, M. J. N.; NANJAN, M. J.; SURESH, B. Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 284-291, 2007.

SUN, X.; HUANG, W.; MA, M.; GUO, B.; WANG, G. Comparative studies on content of arbutin, bergenin and catechin in different part of *Bergenia purpurascens* and *B. crassifolia*. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, v. 35, n. 16, p. 2079-2082, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ª edição. Porto Alegre: Armed Editora, 2004.

TANAKA, T.; ITO, T.; IDO, Y.; NAKAYA, K.; IINUMA, M.; CHELLADURAI, V. Hopeafuran and a C-glucosyl resveratrol isolated from stem wood of *Hopea utilis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, p. 785-787, 2001.

TANEYAMA, M.; YOSHIDA, S.; KOBAYASHI, M.; HASEGAWA, M. Isolation of norbergenin from *Saxifraga stolonifera*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 1053-1054, 1983.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing: state of the art 2010. **Gastroenterologia Polska**, v. 17, n. 3, p. 171-179, 2010.

TIWARI, B. K.; KHOSA, R. L. Studies on *Viburnum nervosum* hook chemistry and spectroscopy of bergenin and its derivatives. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 5, p. 1361-1363, 2012.

TOMA, W.; GRACIOSO, J. S.; DE ANDRADE, F. D. P.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. Antiulcerogenic Activity of Four Extracts Obtained from the Bark Wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 9, p. 1151-1155, 2002.

TOMIZAWA, S.; ASUKE, K.; SUGURO, N. Bergenin: Isocoumarin from the stems of *Mallotus repandus*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 328, 1976.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O., F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos Para Sua Determinação. **Quimica Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G., GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 8, p. 4113-4117, 1998.

- WAGNER, H. M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1984. 320 p.
- WANG, Z.; YEATS, T.; HAN, H.; JETTER, R. Cloning and Characterization of Oxidosqualene Cyclases from *Kalanchoe daigremontiana*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 39, p. 29703-29712, 2010.
- WARASHINA, T.; NAGATANI, Y.; NORO, T. Constituents from the Bark of *Tabebuia impetiginosa*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 1, p. 14-20, 2006.
- WEI, X.; YANG, S.; LIANG, N.; HU, D.; JIN, L.; XUE, W.; YANG, S. Chemical constituents of *Caesalpinia decapetala* (Roth) Alston. **Molecules**, v. 18, p. 1325-1336, 2013.
- WIBOWO, A.; AHMAT, N.; HAMZAH, A. S.; SUFIAN, A. S.; ISMAIL, N. H.; AHMAD, R.; JAAFAR, F. M.; TAKAYAMA, H. Malaysianol A, a new trimer resveratrol oligomer from the stem bark of *Dryobalanops aromatica*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 676-681, 2011.
- WONG, S. P.; LEONG, L. P.; KOH, J. H. W. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chemistry**, v. 99, n. 4, p. 775-783, 2006.
- WU, T.; LI, Y.; KONG, D.; LI, H. Chemical constituents of *Helicia nilagirica* beed. **Zhongguo Yaoxue Zazhi**, v. 45, n. 16, p. 1224-1227, 2010.
- XIE, Y.; DENG, P.; ZHANG, Y.; YU, W. Chemical constituents from *Cissus assamica*. **Zhongyaocai**, v. 32, n. 2, p. 210-213, 2009.
- YE, Y.; SUNB, H.; PAN, Y. Bergenin monohydrate from the rhizomae of *Astilbe chinensis*. **Acta Crystallographica Section C**, v. 60, p. 397-398, 2004.
- YU, W.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, D.; LAN, J.; LIU, Z.; GU, J.; FAWCETT, J. P. Quantitation of bergenin in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 877, 33-36, 2009.
- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. 1ª Edição, Editora Argos, 2001, 500p.
- ZAMARRUD; ALI, I.; HUSSAIN, H.; AHMAD, V. U.; QAISER, M.; AMYN, A.; MOHAMMAD, F. V. Two new antioxidant bergenin derivatives from the stem of *Rivea hypocrateriformis*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 722-725, 2011.
- ZHANG, C.; ZHENG, Y.; LEI, B. Method for extracting bergenin from root of *Aruncus sylvestris*. Faming Zhuanli Shenqing, CN 101817828 A 20100901, 2010. Shandong University at Weihai, People's Republic of China.
- ZHANG, N.; HU, J.; ZHOU, J.; ZHAO, Y. Chemical constituents of *Ardisia crispa* (Thunb) A. DC. **Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa**, v. 22, n. 4, p. 587-589 e 593, 2010.

ZHANG, Y. H.; FANG, L. H.; LEE, M. K.; KU, B. S. *In vitro* inhibitory effects of bergenin and norbergenin on bovine adrenal tyrosine hydroxylase. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 967-969, 2003.

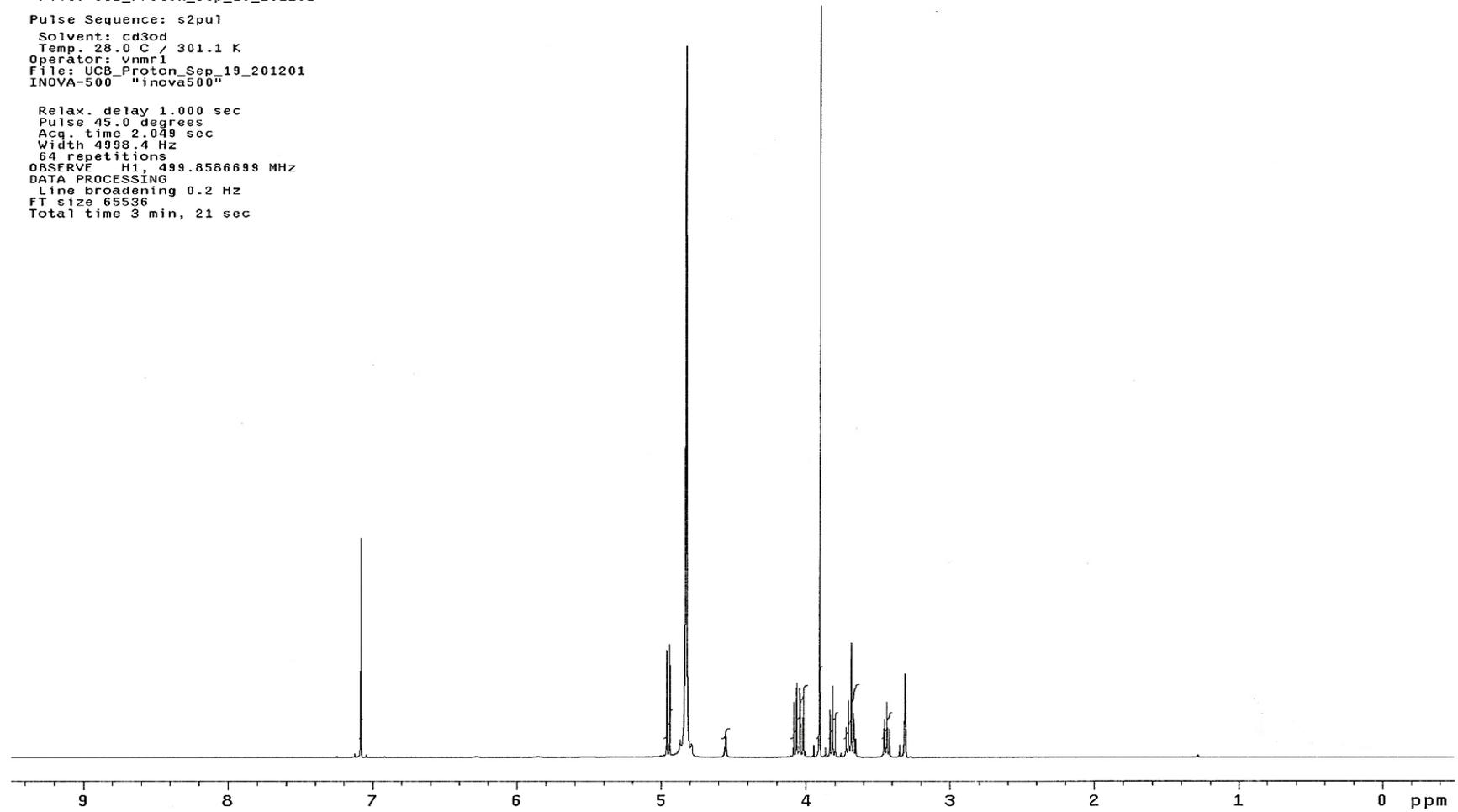
ZHANG, S.; WANG, J.; ZHANG, H. Chemical constituents of Tibetan medicinal herb *Rhodiola kirilowii* (Reg.) Reg. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 16, p. 483, 1991.

ZUO, G. Y.; LI, Z. Q.; CHEN, L. R.; XU, X. J. *In vitro* anti-HCV activities of *Saxifraga melanocentra* and its related polyphenolic compounds. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 16, p. 393-398, 2005.

ANEXOS

UCB
" File: UCB_Proton_Sep_19_201201
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: cd3od
Temp. 28.0 C / 301.1 K
Operator: vnmr1
File: UCB_Proton_Sep_19_201201
INOVA-500 "inova500"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.049 sec
Width 4998.4 Hz
64 repetitions
OBSERVE H1, 499.8586699 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.2 Hz
FT size 65536
Total time 3 min, 21 sec



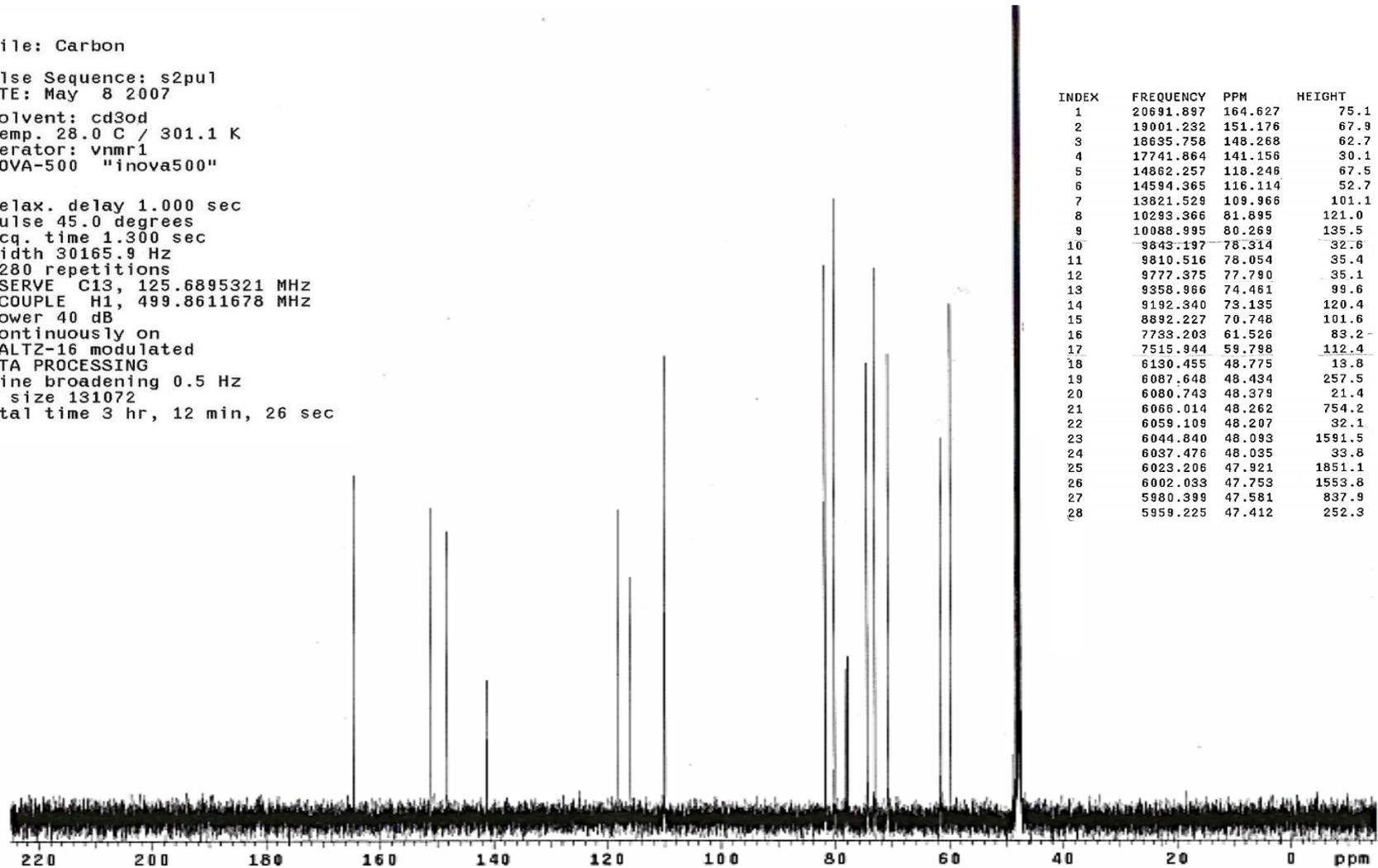
Anexo 1. Espectro completo de RMN ^1H (500 MHz MeOD) da bergenia.

File: Carbon

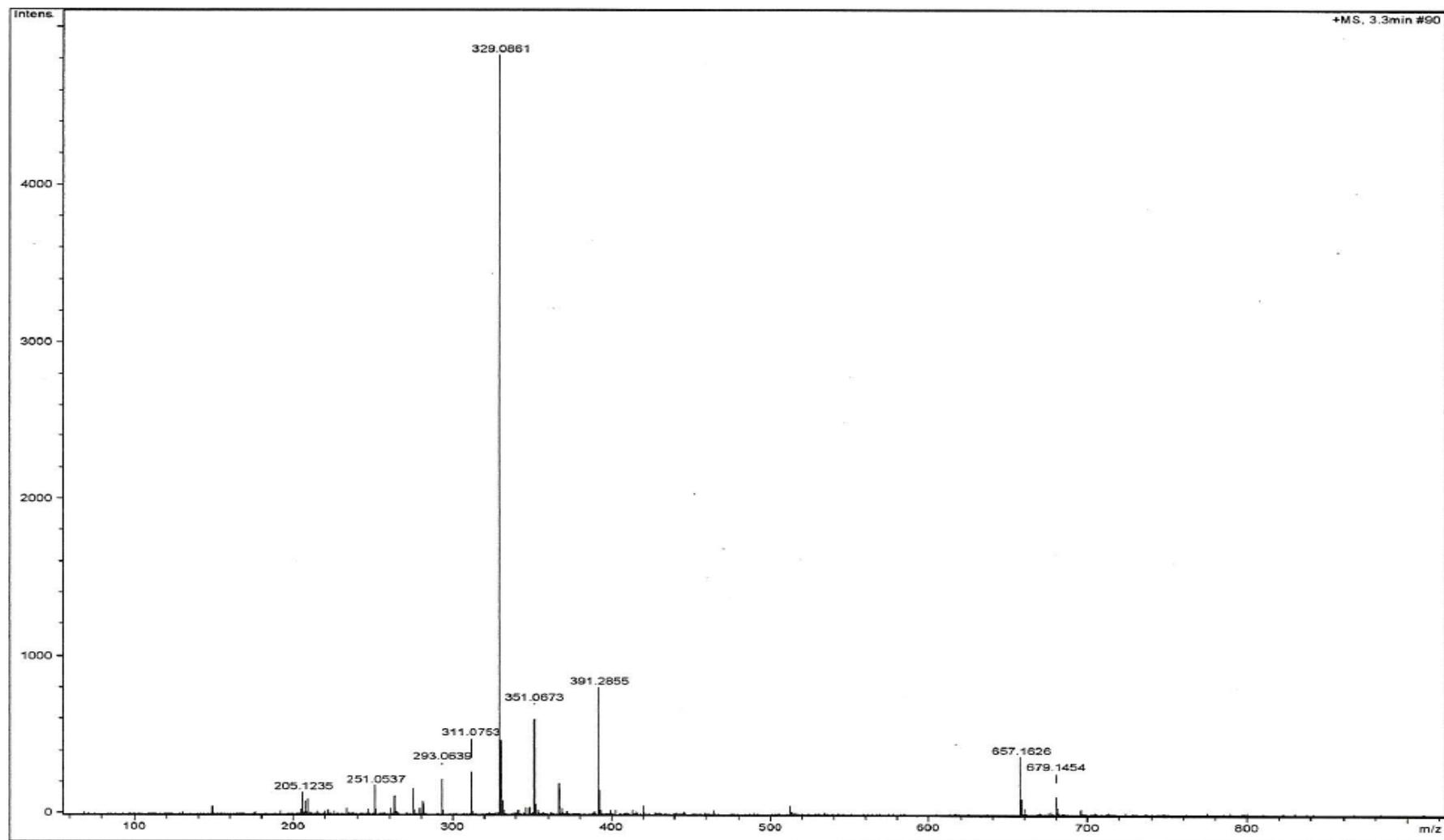
Pulse Sequence: s2pu1
DATE: May 8 2007

Solvent: cd3od
Temp. 28.0 C / 301.1 K
Operator: vnmr1
INOVA-500 "inova500"

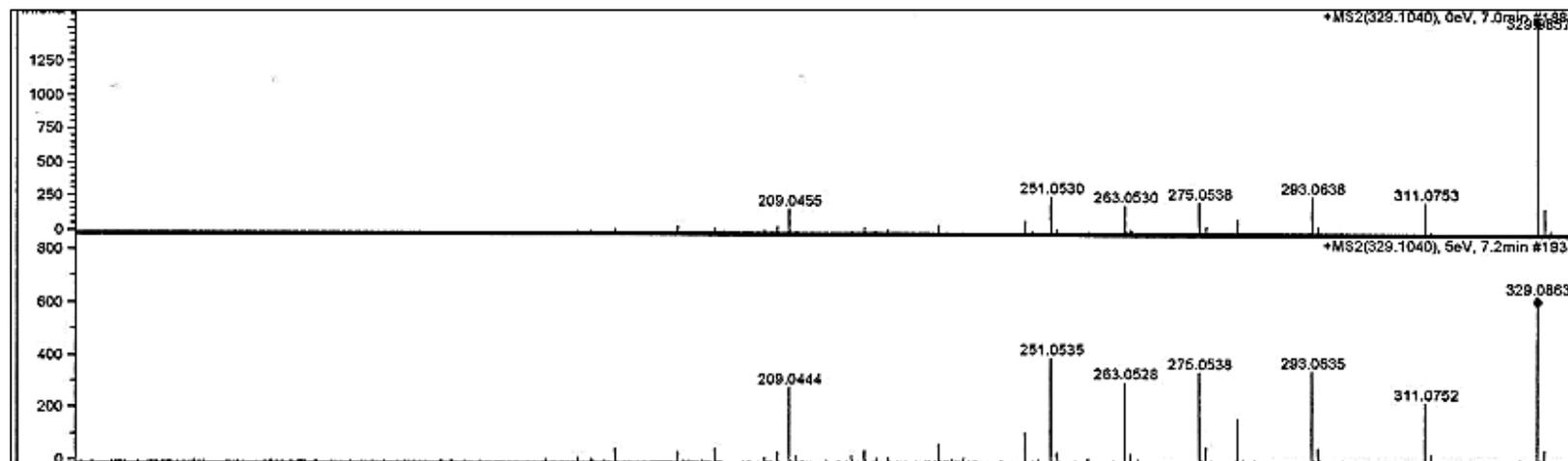
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.300 sec
Width 30165.9 Hz
1280 repetitions
OBSERVE C13, 125.6895321 MHz
DECOUPLE H1, 499.8611678 MHz
Power 40 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 131072
Total time 3 hr, 12 min, 26 sec



Anexo 2. Espectro completo de RMN ¹³C (125 MHz MeOD) da bergenia.



Anexo 3. Espectro de massas por *Eletrospray* em modo positivo de bergenina.



Anexo 4. Espectro de ESI-MS/MS do pico 329 referente ao adulto protonado da molécula de bergenina.

UF5_3

File: UF5_3_Proton_Aug__3_201201

Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: cdc13

Temp. 28.0 C / 301.1 K

Operator: vnmr1

File: UF5_3_Proton_Aug__3_201201

INOVA-500 "inova500"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 2.049 sec

Width 5998.4 Hz

32 repetitions

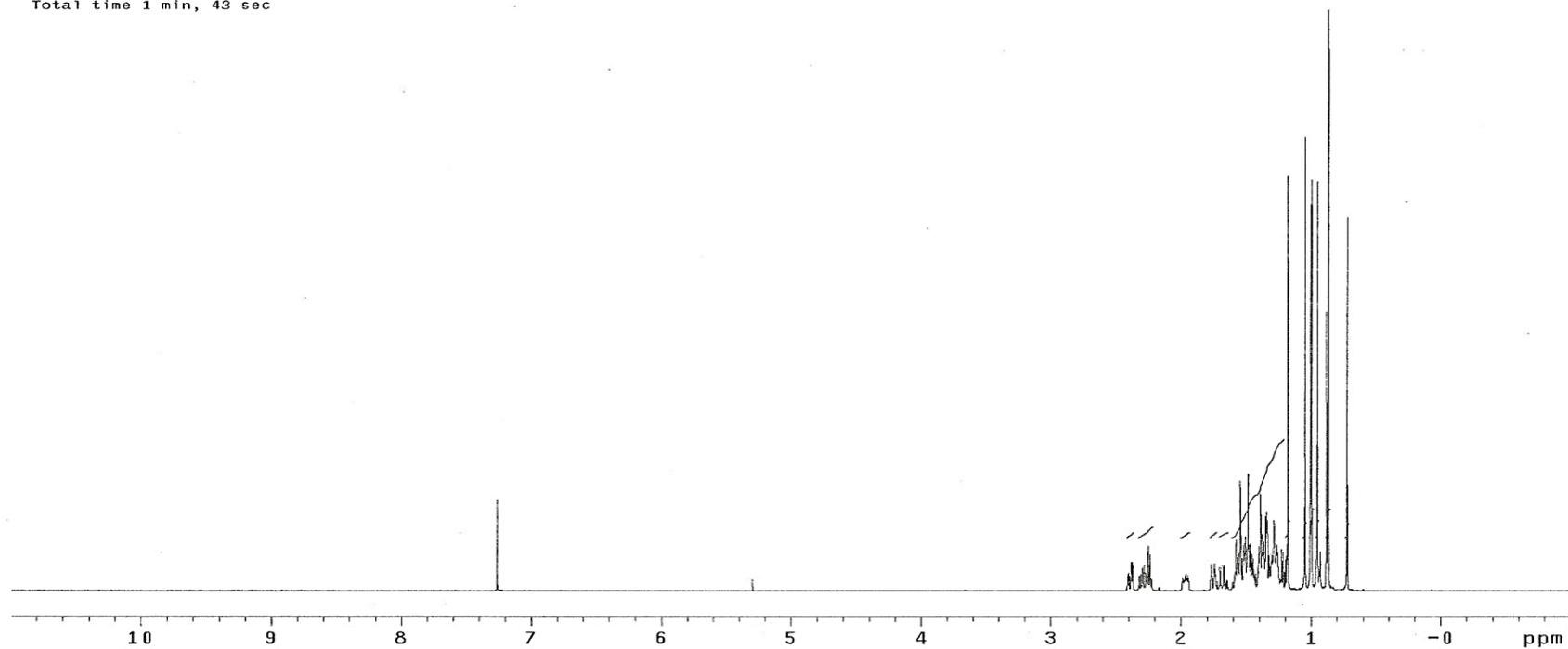
OBSERVE H1, 499.8567031 MHz

DATA PROCESSING

Line broadening 0.2 Hz

FT size 65536

Total time 1 min, 43 sec

Anexo 5. Espectro de RMN ¹H (500 MHz CDCl₃) da friedelina

UF5-3

File: UF5-3_Carbon_Oct_18_201201

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: cdcl3

Temp. 28.0 C / 301.1 K

Operator: vnmr1

File: UF5-3_Carbon_Oct_18_201201

INOVA-500 "inova500"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 1.300 sec

Width 30165.9 Hz

2000 repetitions

OBSERVE C13, 125.6890215 MHz

DECOUPLE H1, 499.8591983 MHz

Power 40 dB

continuously on

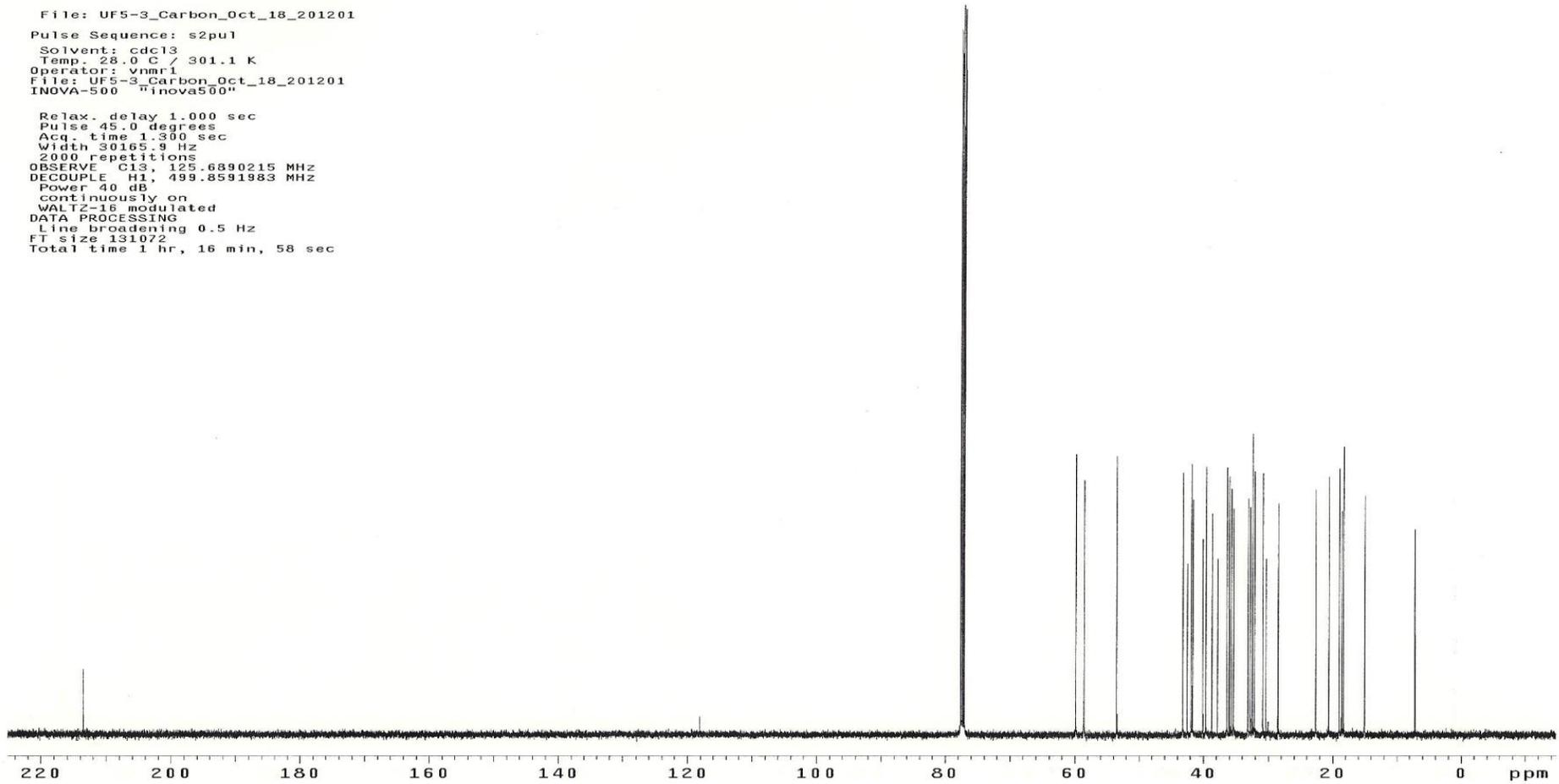
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 0.5 Hz

FT size 131072

Total time 1 hr, 16 min, 58 sec

Anexo 6. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz CDCl_3) da friedelina