

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

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Eperua duckeana*
E *Eperua glabriflora* (FABACEAE)



LIDIAM MAIA LEANDRO

MANAUS

2011

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

LIDIAM MAIA LEANDRO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Eperua duckeana* e
Eperua glabriflora (FABACEAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

MANAUS

2011

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Leandro, Lidiam Maia

L437e Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Eperua duckeana* e *Eperua glabriflora* (Fabaceae) / Lidiam Maia Leandro. - Manaus: UFAM, 2011.
217 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) — Universidade Federal do Amazonas, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

1. Essências e óleos essenciais 2. Plantas medicinais 3. Fitoquímica 4. Bioquímica I. Veiga Junior, Valdir Florêncio da (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 665.325.3(043.3)

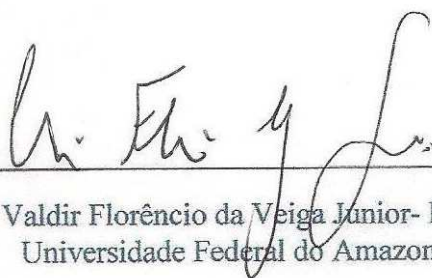
LIDIAM MAIA LEANDRO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Eperua
duckeana* e *Eperua glabriflora* (FABACEAE)**

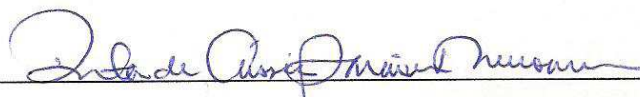
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química Orgânica.

Aprovada em 18 de abril de 2011.

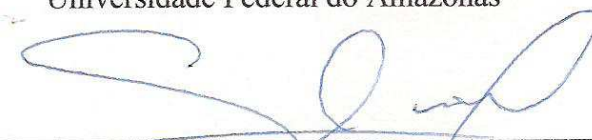
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior- Presidente
Universidade Federal do Amazonas



Prof.ª. Dr.ª. Rita de Cássia Saraiva Nunomura Membro
Universidade Federal do Amazonas



Prof. Dr. Emerson Silva Lima- Membro
Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por ter estado comigo e me reanimado quando mais precisei, por ter me dado saúde e colocado pessoas boas no meu caminho. Obrigada por mais essa conquista!

Aos meus pais, **Maria Rosivalda M. Leandro** (a melhor mãe do mundo!) e **João Batista A. Leandro** pelo amor, carinho, incentivo e apoio financeiro e minha querida irmã **Lilian M. Leandro** pelos conselhos e por sempre ter estado presente, mesmo distante. Obrigada família pelo amor imensurável de vocês!

A toda Família Maia e Família Leandro, em especial ao meu Tio Silas pelo incentivo. Ao **Leandro Prado** por todo amor, paciência e compreensão.

Ao **Prof. Dr. Valdir F. Veiga Júnior**, que me acolheu como aluna de iniciação científica e se disponibilizou a me orientar no curso de mestrado. Meus agradecimentos e admiração pelo exemplo de excelente orientador, incansável e determinado e que demonstra um amor incondicional à pesquisa, difícil de ser encontrado.

Às minhas queridas amigas **Klenicy Yamaguchi**, **Priscilla Oliveira**, **Joelma Alcântara**, **Milena Campelo** e **Paula Barbosa** que após várias batalhas, vitórias e derrotas, se tornaram parte da minha vida. Obrigada meninas por tornarem momentos de intenso trabalho em algo mais descontraído, e principalmente pelas palavras de alento sempre vindas em boa hora. Sucesso na carreira de vocês!

Aos amigos **Igor Medeiros**, e **Carol Mathias** pelos bons momentos de convivência e ajuda nas dificuldades.

Ao amigo e mano **André Rüdiger** pelos conhecimentos compartilhados e conversas que me ajudaram a tomar decisões importantes.

À bolsista de iniciação **Déborah** pelas companhias noturnas e nos fins de semanas no laboratório.

A todos os alunos (e ex-alunos) do Laboratório B-09 pela ajuda nas horas necessárias: **Daniele Cardoso**, **Lamark**, **Vanessa Campos**, **Priscila Moraes**, **Érika Izumi**, **Fabiano Vargas**, **Roosevelt Haad**, **Diego Rabelo**, **Iuri Barros** e **Daiana Custódio**.

Aos alunos do B-08, em especial, **Dominique Fernandes** e **Júnior Ribeiro** por me ajudarem sempre quando precisei.

A **Dr^a. Rita de Cássia Nunomura** e seus alunos de iniciação científica, **Viviane Guedes** e ao **Magno**, pelas ajudas iniciais dos ensaios antioxidantes. E ao bolsista do INPA **Nerilson** por sempre se mostrar prestativo.

Ao **Prof. Dr. Afonso Duarte** por disponibilizar os aparelhos do Laboratório da Central Analítica (UFAM) e aos alunos **Felipe Moura, Mayane Souza, Héctor** pelas análises realizadas.

Aos **professores da Pós-graduação** em Química PPGQ-UFAM pelas aulas ministradas contribuindo na minha formação.

As Prof^{as}. **Rita de Cássia Nunomura** e **Maria da Paz** pelas contribuições no Exame de Conhecimento.

Ao Prof. **Dr. Celso Vataru Nakamura** do Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais da Universidade Estadual de Maringá e alunos que realizaram os ensaios de atividade antimicrobiana.

À **Prof^a. Patrícia Orlandi** e as bolsistas **Ivanildes** e **Renata** da FIOCRUZ-AM que me ensinaram e ajudaram a realizar os ensaios atividade antibacteriana.

Aos **Profs. Dr. Manoel Odorico** e **Cláudia Pessoa** do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará pela realização dos ensaios de atividade citotóxica em células tumorais.

Ao **Prof. Massayoshi** e aos técnicos **Raimundo Júnior** e **Laura Cristina** pelas análises de RMN e CG e **Danielle Paiva** pela intermediação das solicitações de orçamentos.

Aos Professores da Banca.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Enfim, muito obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho!

RESUMO

Eperua é um gênero da família Fabaceae, endêmico da Amazônia Central. O óleo exsudado das espécies *Eperua oleifera*, *Eperua purpurea* e *Eperua falcata* é utilizado na medicina popular de modo análogo ao da copaíba, como cicatrizante, antifúngico e bactericida. De modo geral, duas classes de substâncias têm sido isoladas de espécies desse gênero: terpenos e flavonóides. Apesar das espécies *Eperua glabriflora* e *Eperua duckeana* serem comuns na Amazônia, nunca foram estudadas química ou farmacologicamente. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a composição química dos extratos obtidos das cascas do tronco e folhas e determinar as atividades antioxidantes, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária e citotoxicidade em células tumorais, além de analisar a composição química dos óleos essenciais das folhas e talos dessas espécies. O material vegetal foi coletado na Reserva Ducke em Manaus e as cascas e folhas foram secas à temperatura ambiente e posteriormente trituradas. Os extratos foram preparados por maceração com solvente em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol). Foram obtidos doze extratos brutos. Os extratos apolares das cascas foram analisados por Cromatografia à Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) e ao Detector de Ionização de Chama (CG-DIC). Foram identificadas quatorze substâncias, sendo essas: seis ácidos graxos (ácido hexadecanóico, ácido 9,12-octadecadienóico, ácido 9-octadecenóico, ácido octadecanóico, ácido tetracosanóico e ácido hexacosanóico); quatro ácidos diterpênicos (ácido catívico, ácido 3-hidroxi-labda-7,13-dieno-15-óico, ácido 3-clerodeno-15-óico e um isômero dele); um hidrocarboneto (esqualeno); uma vitamina (α -tocoferol); e dois esteróis (estigmasterol e β -sitosterol). As duas últimas substâncias foram isoladas em mistura e identificadas por métodos espectrométricos. Do extrato obtido em acetato de etila das cascas de *E. glabriflora* foi isolado um 3-*O*-glicosil-flavanonol conhecido como engeletina, presente também no extrato da *E. duckeana*, porém, em menor concentração; e um flavonóide de M^+ 476. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação, em aparelho clevenger modificado durante 4h, e seco com sulfato de sódio e analisados por CG-DIC e CG-EM. Foram identificados nos óleos essenciais 35 constituintes, sendo o β -cariofileno e o germacreno D os constituintes majoritários. Os óleos essenciais das folhas e talos apresentaram atividade citotóxica em linhagens de células tumorais de câncer de mama (MDA/MB-435), cólon (HCT8) e sistema nervoso central (SKF-295) com inibições de crescimento de aproximadamente 90%. Os extratos testados apresentaram fraca ou nenhuma atividade antileishmania, trypanosoma cruzi, antifúngica e antibacteriana, exceto para o extrato obtido em hexano das cascas de *E. glabriflora* que apresentou significativa atividade contra a bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis* (CIM= 62,5 $\mu\text{g/mL}$). Com relação ao potencial antioxidante, a maior atividade de seqüestro de radical livre DPPH $^{\bullet}$ foi apresentada pelos extratos obtidos em acetato de etila e metanol das cascas (CI₅₀ 10,5 -17,8 $\mu\text{g/mL}$) e ambas espécies. Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o conhecimento químico e biológico de duas espécies da biodiversidade amazônica.

Palavras chaves: Leguminosae, muirapiranga, antioxidante, citotoxicidade, diterpenos e engeletina.

ABSTRACT

Eperua is a genus of the Fabaceae-Caesalpinioideae, endemic to the Central Amazon. The oil-resin of *E. oleifera*, *E. purpurea* e *E. falcata* is used in folk medicine in order analogous to “copaiba”, as a healing agent antifungal and bactericide. In general, two class substances have been isolated from this species: terpenes and flavonoids. Despite the species *E. glabriflora* and *E. duckeana* are common in the Amazon, have never been studied chemically and pharmacologically. This study aimed to evaluate the chemical composition of extracts of bark of trunk and leaves and to determine the antioxidant, antibacterial, antifungal, antiprotozoal and cytotoxic activity against tumor cells, and analyzing the chemical composition of essential oils from leaves and stems of these species. The plant material was collected in Ducke Reserve near Manaus and the bark and leaves were dried at room temperature and later crushed. The extracts were prepared by maceration with solvent in order of increasing polarity (hexane, ethyl acetate and methanol) were obtained twelve crude extracts. The non-polar extracts of bark of trunk were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and flame ionization detector (GC-FID). It was identified fourteen substances among them: six fatty acids (hexadecanoic acid, 9,12-octadecadienoic acid, 9-octadecenoic acid, octadecanoic acid, tetracosanoic acid and hexacosanoic acid); four diterpene acids (caticic acid, 3-hydroxylabd-7,13-dien-15-oic acid, 3-cleroden-15-oic acid and one isomer); one hydrocarbon (squalene); one vitamin (α -tocopherol); and two sterols (stigmasterol and β -sitosterol). The latter two substances were isolated in mixture and identified by spectrometric methods. From ethyl acetate extract of bark of trunk *E. glabriflora* was isolated from 3-*O*-glycoside-flavanonol, engeletin also present in the extract of *E. duckeana*, but in lower concentration. Other flavonoid was isolated from M^+ 476 u.ma. Essential oils were obtained by hydrodistillation in Clevenger apparatus changed during 4h, then dried with sodium sulfate and analyzed by GC-FID and GC-MS. We identified 35 constituents in essential oils, and the β -caryophyllene and germacrene D the major constituents. Essential oils from leaves and stems showed cytotoxic activity against tumor cell lines of breast cancer (MDA/MB-435), colon (HCT8) and central nervous system (SKF-295) with inhibitions of growth of approximately 100%. The extracts tested showed weak or no trypanosoma cruzi or leishmania activity and antibacterial and antifungal activity, except the hexane extract of the bark of *E. glabriflora* that showed significant activity against gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* (MIC = 62.5 μ g /mL). With respect to antioxidant potential, the highest activity of free radical sequestration was presented by the extracts in ethyl acetate and methanol of bark of trunk (IC₅₀ 10.5 -17.8 mg / mL) in both species. The results of this study contribute to the knowledge of chemical and biological of two species from Amazonian biodiversity.

Key-words: Leguminosae, muirapiranga, antioxidant, cytotoxicity, diterpenes and engeletin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estruturas do sesquiterpeno e triterpeno encontrados em espécies de <i>Eperua</i>	32
Figura 2.	Esqueletos e numeração dos diterpenos labdanos e clerodanos.....	33
Figura 3.	Estruturas de diterpenos labdânicos isolados de espécies de <i>Eperua</i> ...	35
Figura 4.	Estruturas de diterpenos clerodânicos isolados de espécies de <i>Eperua</i> ...	36
Figura 5.	Ácidos fenólicos e flavonóides identificados em espécies de <i>Eperua</i>	38
Figura 6.	Estrutura do ácido labda-8-eno-15-óico.....	40
Figura 7.	Rota biossintética dos diterpenos.....	41
Figura 8.	Diterpenos com atividades biológicas.....	43
Figura 9.	Estrutura básica dos flavonóides: núcleo flavona.....	44
Figura 10.	Rota biossintética dos flavonóides.....	45
Figura 11.	Estrutura da quercetina. Principais aspectos responsáveis pela atividade antioxidante dos flavonóides.....	48
Figura 12.	Mecanismo da estabilização elétron desemparelhado.....	49
Figura 13.	Estrutura da quercetina. Atribuição dos principais pontos responsáveis pela atividade antioxidante.....	49
Figura 14.	Reação de redução da radical DPPH [•]	50
Figura 15.	Descoloração da solução de DPPH [•] na presença de substâncias antioxidantes.....	51
Figura 16.	Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.....	52
Figura 17.	Aumento da absorvância devido à presença de compostos fenólicos...	52
Figura 18.	Estrutura e classe dos principais fármacos antibacterianos de origem natural.....	53
Figura 19.	Estrutura e classe dos principais fármacos antifúngicos.....	56
Figura 20.	Leishmaniose.....	57
Figura 21.	Doença de Chagas.....	58
Figura 22.	Fármacos derivados de plantas usados na terapia do câncer.....	60
Figura 23.	Substâncias derivados de plantas em estudo pré-clínico ou clínico para a terapia do câncer.....	62

Figura 24.	Etapas da revelação de placa de cromatografia em camada delgada preparativa.....	68
Figura 25.	Sistema de cromatografia em coluna utilizando sílica flash.....	71
Figura 26.	Localização da Reserva Florestal Adolpho Ducke.....	76
Figura 27.	Exsicatas depositadas no Herbário do INPA.....	76
Figura 28.	Separação e etapas do tratamento do material vegetal.....	77
Figura 29.	Fórmula para o cálculo do Índice de Retenção.....	79
Figura 30.	Fórmula para cálculo da porcentagem de inibição da atividade antioxidante.....	87
Figura 31.	Etapas do Ensaio de atividade bacteriana.....	90
Figura 32.	Estruturas dos constituintes majoritários dos óleos essenciais.....	98
Figura 33.	Ampliação dos cromatogramas de íons totais dos óleos essenciais de <i>E. duckeana</i>	99
Figura 34.	Ampliação dos cromatogramas de íons totais do óleo essencial das folhas da 1 ^o coleta de <i>E. glabriflora</i>	100
Figura 35.	Ampliação dos cromatogramas de íons totais do óleo essencial das folhas e talos de <i>E. glabriflora</i> da 2 ^o coleta.....	101
Figura 36.	Resultado do ensaio qualitativo da presença de compostos fenólicos em CCD utilizando FeCl ₃	107
Figura 37.	CCD dos extratos obtidos em acetato de etila das cascas.....	107
Figura 38.	Curva de calibração (padrão) para o teor de fenólicos totais.....	108
Figura 39.	Comparativo dos conteúdos fenólicos dos extratos brutos das folhas e cascas da <i>E. duckeana</i> e <i>E. glabriflora</i>	109
Figura 40.	Resultado do teste de shinoda.....	110
Figura 41.	Resultado do ensaio qualitativo de Captura do radical livre DPPH [•] em CCD utilizando DPPH [•]	111
Figura 42.	CCD dos extratos brutos das cascas reveladas com DPPH [•]	112
Figura 43.	CCD dos extratos brutos das folhas revelados com DPPH.....	112
Figura 44.	Gráfico de correlação entre fenóis totais e atividade de captura do DPPH [•] dos extratos brutos.....	114
Figura 45.	Ensaio de atividade antibacteriana (método de difusão de disco).....	116
Figura 46.	CCD comparativa dos extratos das cascas de <i>E. dukeana</i> e <i>E. glabriflora</i>	125

Figura 47.	Cromatogramas de íons totais dos extratos obtido em hexano das cascas das duas espécies de <i>Eperua</i>	127
Figura 48.	Estrutura do ácido palmítico.....	131
Figura 49.	Espectros de massas da substância identificada como ácido palmítico...	131
Figura 50.	Rearranjo de McLafferty resultando em fragmento de m/z 60.....	132
Figura 51.	Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido palmítico.....	132
Figura 52.	Mecanismo de formação do íon molecular e fragmentação do pico base de ésteres metílicos saturados.....	133
Figura 53.	Estrutura do ácido 9,12-octadecadienóico.....	133
Figura 54.	Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido linoleico.....	134
Figura 55.	Mecanismo de fragmentação do 9,12-octadecadienóico de metila.....	134
Figura 56.	Estrutura do ácido 9-octadecenóico.....	135
Figura 57.	Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido oleico.....	135
Figura 58.	Mecanismo de fragmentação do 9-octadecenoato de metila.....	136
Figura 59.	Estrutura do ácido octadecanóico.....	136
Figura 60.	Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido esteárico.....	137
Figura 61.	Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do isômero do ácido 3-clerodeno-15-óico.....	137
Figura 62.	Espectro de massas da substância com t _r : 32,3 minutos.....	138
Figura 63.	Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido 3-clerodeno-15-óico.....	139
Figura 64.	Fragmentação do composto identificado como éster metílico do ácido 3-clerodeno-15-óico.....	139
Figura 65.	Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido catívico.....	140
Figura 66.	Mecanismo de fragmentação do éster metílico do ácido catívico.....	140
Figura 67.	Espectro de massas da substância identificada como éster metílico de um ácido diterpênico não identificado.....	141
Figura 68.	Espectro de massas da substância identificada como éster metílico de	

	um ácido graxo não identificado.....	141
Figura 69.	Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido 3-hidroxi-labda-7,13-dieno-15-óico.....	142
Figura 70.	Fragmentação do composto identificado com éster metílico do ácido 3-hidroxi-labda-7,13-dieno-15-óico.....	142
Figura 71.	Estrutura do ácido tetracosanóico.....	142
Figura 72.	Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido lignocérico.....	143
Figura 73.	Estrutura do ácido hexacosanóico.....	144
Figura 74.	Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido hexacosanóico.....	144
Figura 75.	Espectro de massas da substância identificada como éster metílico de um ácido graxo não identificado.....	145
Figura 76.	Estrutura do esqualeno.....	145
Figura 77.	Espectros de massas da substância identificada como esqualeno.....	146
Figura 78.	Clivagem alílica do esqualeno.....	146
Figura 79.	Estrutura do α -tocoferol.....	147
Figura 80.	Espectros de massas da substância com $t_r = 41,6$ min e do α -tocoferol....	147
Figura 81.	Fragmentação do α -tocoferol.....	148
Figura 82.	Estrutura do estigmasterol.....	148
Figura 83.	Espectros de massas da substância com $t_r = 42,5$ min e do estigmasterol.	149
Figura 84.	Estrutura do β -sitosterol.....	149
Figura 85.	Espectros de massas da substância com $t_r = 43,1$ min e do β -sitosterol.....	150
Figura 86.	Proposta de fragmentação do β -sitosterol.....	150
Figura 87.	Cromatograma de íons totais da fração f1-PP1-HCd.....	154
Figura 88.	Espectros de massas do pico de tempo de retenção 15,5 minutos da fração f1-PP1-HCd e do lupeol.....	155
Figura 89.	Espectro de IV da fração f4-PP2-HCd.....	156
Figura 90.	Cromatograma de íons totais da fração f4-PP2-HCd.....	157
Figura 91.	Espectro de RMN ^{13}C da fração f4-PP2-HCd.....	157
Figura 92.	Espectros de RMN ^1H da fração f4-PP2-HCd.....	159
Figura 93.	Mapa de contornos HSQC da fração f4-PP2-HCd.....	160
Figura 94.	Estrutura do β -sitosterol e estigmasterol.....	161

Figura 95.	CCD comparativa dos extratos das cascas de <i>E. duckeana</i> e <i>E. glabriflora</i>	168
Figura 96.	Cromatograma obtido por CLAE, espectro de UV e EM da fração f1-PP4-ACg2.....	171
Figura 97.	Espectro de RMN ¹ H da fração f1-PP4-ACg2.....	172
Figura 98.	Suposições da estrutura do flavonóide da fração f1-PP4-ACg2.....	173
Figura 99.	Cromatograma obtido por CLAE e espectro de UV da fração f2-PP4-ACg2.....	174
Figura 100.	Cromatograma obtido por CLAE e espectro de UV da substância com tempo de retenção 17,7 min da fração f7-C3-ACglab.....	176
Figura 101.	Espectro de massas da substância com tempo de retenção 17,7 min.....	176
Figura 102.	Ampliação do espectro de RMN ¹ H da amostra f7-C3-ACg.....	177
Figura 103.	Mapa de contornos ¹ H- ¹ H-COSY da fração f7-C3-ACg.....	179
Figura 104.	Espectro de RMN ¹³ C da amostra f7-C3-ACglab.....	181
Figura 105.	Mapa de contornos HSQC da fração f7-C3-ACglab.....	182
Figura 106.	Expansão do mapa de contornos HMBC da fração f7-C3-ACglab.....	183
Figura 107.	Estrutura da engeletina.....	184
Figura 108.	Resultado da purificação da fração f9-C2-ACd.....	189
Figura 109.	Espectros de RMN ¹ H dos extratos brutos obtidos em metanol.....	190
Figura 110.	Ampliação da região 1 dos espectros de RMN ¹ H dos extratos metanólicos.....	191
Figura 111.	Ampliação da região entre δ_H 5,5 – 4,5 ppm dos espectros de RMN ¹ H dos extratos brutos metanólicos.....	192
Figura 112.	Ampliação da região δ_H 4,1 – 3,3 ppm dos espectros de RMN ¹ H dos extratos brutos metanólicos.....	193
Figura 113.	Ampliação da região δ_H 3,2 – 0 ppm dos espectros de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) dos extratos brutos.....	194
Figura 114.	CCD comparativa dos extratos das folhas de <i>E. duckeana</i> e <i>E. glabriflora</i>	195
Figura 115.	CCD comparativa dos extratos das folhas obtidos e acetato de etila.....	199
Figura 116.	Espectros de RMN ¹ H dos extratos metanólicos das folhas.....	200

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Informações taxonômicas sobre o gênero <i>Eperua</i>	28
Tabela 2.	Espécies e partes da planta estudadas em trabalhos anteriores.....	31
Tabela 3.	Diterpenos encontrados em espécies de <i>Eperua</i>	34
Tabela 4.	Compostos fenólicos encontrados em espécies de <i>Eperua</i>	37
Tabela 5.	Relação entre diâmetro da coluna e quantidade da amostra na cromatografia em coluna com sílica flash.....	71
Tabela 6.	Eluentes utilizados na CCD comparativa dos extratos brutos.....	81
Tabela 7.	Bactérias gram (+) e (-) utilizadas no ensaio de atividade bacteriana.....	89
Tabela 8.	Massas dos materiais vegetais após secagem e trituração.....	96
Tabela 9.	Rendimento dos óleos essenciais.....	97
Tabela 10.	Espectros de massas dos constituintes majoritários não identificados no OF2Eglab e OTEglab.....	102
Tabela 11.	Diterpenos identificados no OTEglab.....	103
Tabela 12.	Composição química percentual do óleo essencial das folhas (1° e 2° coleta) e talos de <i>E. duckeana</i> e <i>E. glabriflora</i>	104
Tabela 13.	Massas e rendimentos dos extratos brutos e dos materiais vegetais da primeira coleta.....	105
Tabela 14.	Resultado da quantificação de fenólicos totais.....	109
Tabela 15.	Resultado do ensaio quantitativo de Captura do radical DPPH*.....	113
Tabela 16.	Resultados do Ensaio Antibacteriano (Método de difusão em ágar).....	117
Tabela 17.	Resultados do Ensaio Antibacteriano (Método de diluição de caldo).....	120
Tabela 18.	Resultados do Ensaio Antifúngico (Método de diluição de caldo).....	121
Tabela 19.	Resultados da atividade Antiparasitária expressa em CI ₅₀	122
Tabela 20.	Resultado do ensaio de Atividade Citotóxica em Linhagens de Células Tumorais dos óleos essenciais.....	123
Tabela 21.	Resultado do ensaio de atividade citotóxica em linhagens de células tumorais dos extratos brutos.....	124
Tabela 22.	Substâncias detectadas a partir do CG-DIC e CG-EM.....	128
Tabela 23.	Substâncias detectadas nos extratos hexânicos derivatizados com TSM..	130
Tabela 24.	Dados de RMN ¹ H da mistura de estigmasterol e β-sitosterol.....	162

Tabela 25.	Dados de RMN ¹³ C e DEPT da mistura de estigmasterol e β-sitosterol..	163
Tabela 26.	Eluentes e massa das frações da coluna C1-ACg2.....	169
Tabela 27.	Dados de RMN ¹ H e [¹ H- ¹ H]-COSY da fração f7-C3-ACg e engelentina.....	184
Tabela 28.	Dados de RMN ¹³ C da fração f7-C3-ACg e engeletina.....	185
Tabela 29.	Eluentes e massas das frações coletadas no fracionamento do extrato das folhas obtido em hexano de <i>E. glabriflora</i>	197

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Esquema geral da obtenção das frações neutra e ácida dos extratos brutos.....	70
Esquema 2.	Esquema geral das extrações realizadas a partir do material vegetal seco.....	78
Esquema 3.	Esquema geral dos Ensaio químicos e biológicas realizados com os extratos brutos.....	83
Esquema 4.	Pré-fracionamento do extrato hexânico das cascas da <i>E. duckeana</i>	151
Esquema 5.	Fracionamento da fração não-ácida do EHCEduck.....	152
Esquema 6	Fracionamento da fração f4-C2-HCd.....	153
Esquema 7	Fracionamento da fração ácida A1-EHCEduck.....	164
Esquema 8	Fracionamento do extrato EHCEglab1.....	165
Esquema 9.	Fracionamento da fração ácida A1-EHCEglab1.....	166
Esquema 10.	Pré-fracionamento do extrato EHCEglab2.....	167
Esquema 11.	Fracionamento da fração f4-C1-ACg2.....	170
Esquema 12.	Fracionamento da fração f5-C1-ACg2.....	175
Esquema 13	Fracionamento da fração f6-C1-ACg2.....	186
Esquema 14	Pré-fracionamento do EACEduck.....	187
Esquema 15	Fracionamento da fração f4-C1-ACd.....	188
Esquema 16	Fracionamento da fração ácida f4-C1-HFEg2.....	198

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs.: absorvância

AcOEt: acetato de etila

CG-DIC: cromatografia à gás acoplada ao detector de ionização de chama

CG-EM: cromatografia à gás acoplada ao espectrômetro de massa

CIM: concentração inibitória mínima

CBM: concentração bactericida mínima

CFM: concentração fungicida mínima

CCD: cromatografia em camada delgada

CCDP: cromatografia em camada delgada preparativa

CI₅₀: concentração inibitória de 50 %

CHCl₃: clorofórmio

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

DPPH-H: 2,2-difenilpicril-hidrazina

EAG: equivalente de ácido gálico

EHCEduck: extrato obtido em hexano das cascas de *E. duckeana*

EACEduck: extrato obtido em acetato de etila das cascas de *E. duckeana*

EMCEduck: extrato obtido em metanol das cascas de *E. duckeana*

EHCEglab: extrato obtido em hexano das cascas de *E. glabriflora*

EACEglab: extrato obtido em acetato de etila das cascas de *E. glabriflora*

EMCEglab: extrato obtido em metanol das cascas de *E. glabriflora*

EtOH: álcool etílico

FeCl₃: cloreto férrico

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

Hex: hexano

HCl: ácido clorídrico

HPLC: *High Performance/Pressure Liquide Chromatography*

INCA: Instituto Nacional do Câncer (Brasil)

INPA: Instituto de Pesquisas da Amazônia

LIT: Meio de cultura “liver infusion tryptose”

LOExp: Laboratório de Oncologia Experimental

MH: Müller Hinton

MeOH: metanol

m/z: razão massa/carga

MTT: sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium

NCI: *National Cancer Institute* (Estados Unidos)

nm: nanômetro

OFduck: óleo essencial das folhas de *E. duckeana*

OFglab: óleo essencial das folhas de *E. glabriflora*

OMS: Organização Mundial da Saúde

OTduck: óleo essencial dos talos de *E. duckeana*

OTglab: óleo essencial dos talos de *E. glabriflora*

RDA: Reação de retro Diels-Alder

rH: rearranjo de hidrogênio

RL: radicais livres

SFB: Soro Fetal Bovino

SVS: Secretaria de Vigilância Sanitária

UEM: Universidade Estadual de Maringá

UFAM: Universidade Federal do Amazonas

UFC: Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1. Considerações gerais sobre a Família Fabaceae.....	27
2.2. Gênero <i>Eperua</i> Aublet.....	28
2.2.1. Usos etnofarmacológicos.....	29
2.2.2. Constituintes químicos do gênero <i>Eperua</i>	30
2.2.2.1. Terpenos de <i>Eperua</i>	32
2.2.2.2. Compostos fenólicos de <i>Eperua</i>	36
2.2.3. Atividades biológicas do gênero <i>Eperua</i>	38
2.3. Diterpenos.....	40
2.3.1. Atividades biológicas de diterpenos.....	42
2.4. Flavonóides.....	44
2.4.1. Biossíntese dos flavonóides.....	45
2.5. Considerações gerais sobre atividades químicas e biológicas estudadas.....	46
2.5.1. Atividade antioxidante.....	46
2.5.1.1. Flavonóides como antioxidantes.....	47
2.5.1.2. Captura de radical livre DPPH [•] - Ensaio indicativo de atividade antioxidante.....	50
2.5.2. Determinação de fenólicos totais - Método de Folin-Ciocalteu.....	51
2.5.3. Atividade antimicrobiana.....	52
2.5.3.1. Fármacos antibacterianos de origem naturais disponíveis.....	53
2.5.3.2. Fármacos antifúngicos disponíveis.....	55
2.5.4. Atividade antiprotozoária.....	57
2.5.4.1. Leishmaniose.....	57
2.5.4.2. Doença de Chagas.....	58

2.5.5. Câncer.....	59
2.5.5.1. Agentes antineoplásicos a partir de plantas.....	60
3. OBJETIVOS.....	63
3.1. Objetivo geral.....	64
3.2. Objetivos específicos.....	64
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
4.1. Métodos Cromatográficos.....	66
4.1.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	66
4.1.1.1. Reveladores de CCD.....	66
4.1.2. Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP).....	67
4.1.3. Cromatografia em Coluna Aberta e sob pressão.....	69
4.1.4. Cromatografia em fase Gasosa (CG).....	72
4.1.4.1. Derivatização das amostras para injeção em cromatógrafo em fase gasosa.....	72
4.1.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	72
4.2. Métodos espectrométricos.....	73
4.2.1. Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	73
4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	74
4.2.3. Espectroscopia de massa por electrospray (ESI-EM).....	74
4.3. Solventes.....	75
4.4. Equipamentos e acessórios do laboratório.....	75
4.5. Coleta e identificação do material vegetal.....	75
4.6. Tratamento do material vegetal.....	77
4.7. Extração do material vegetal.....	78
4.7.1. Extração dos óleos essenciais.....	78
4.7.1.1. Análises cromatográficas e espectrométricas dos óleos essenciais.....	78

4.7.1.2. Identificação dos componentes dos óleos essenciais.....	79
4.7.2. Obtenção dos extratos brutos.....	80
4.7.2.1. Nomenclatura dos extratos e frações.....	80
4.8. Análise comparativa dos extratos brutos por CCD.....	81
4.9. Análise dos extratos apolares das cascas por CG-DIC e CG-EM.....	82
4.10. Ensaio químicos e biológicos.....	82
4.10.1. Ensaio químicos.....	83
4.10.1.1. Fenólicos Totais.....	83
4.10.1.1.1. Ensaio qualitativo de compostos fenólicos.....	84
4.10.1.1.2. Quantificação de Fenólicos Totais.....	84
4.10.1.2. Teste de Shinoda.....	85
4.10.1.3. Ensaio indicativos de atividade antioxidante.....	86
4.10.1.3.1. Captura do Radical Livre DPPH [•] -Ensaio qualitativo.....	86
4.10.1.3.2. Captura do Radical Livre DPPH [•] -Ensaio quantitativo.....	86
4.10.2. Ensaio Biológicos.....	88
4.10.2.1. Ensaio de Atividade Antimicrobiana.....	88
4.10.2.1.1. Ensaio de Atividade Antibacteriana-Método de difusão em ágar (disco).....	88
4.10.2.1.2. Ensaio de Atividade Antibacteriana-Método de diluição em caldo.....	90
4.10.2.2. Ensaio de Atividade Antifúngica.....	91
4.10.2.3. Ensaio de Atividade Antiprotozoária.....	91
4.10.2.3.1. Ensaio de Atividade Antileishmania.....	92
4.10.2.3.2. Ensaio de Atividade Antitrypanossoma cruzi.....	92
4.10.2.4. Ensaio de Citotoxicidade em Linhagens de Células Tumorais.....	93
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
5.1. Coleta dos materiais vegetais.....	96

5.2. Extração e análise dos óleos essenciais.....	96
5.3. Obtenção dos extratos brutos.....	105
5.4. Ensaio químicos.....	106
5.4.1. Ensaio qualitativo de compostos fenólicos.....	106
5.4.2. Quantificação de fenólicos totais.....	108
5.4.3. Teste de Shinoda.....	109
5.4.4. Ensaio indicativo de atividade antioxidante.....	110
5.4.4.1. Ensaio qualitativo da Captura do Radical Livre DPPH [•]	110
5.4.4.2. Ensaio quantitativo da Captura do Radical Livre DPPH [•]	113
5.4.4.3. Compostos fenólicos vs. Captura do Radical Livre DPPH [•]	114
5.5. Ensaio Biológicos.....	115
5.5.1. Ensaio de Atividade Antimicrobiana.....	115
5.5.1.1. Ensaio de Atividade Antibacteriana- Método de difusão em ágar.....	115
5.5.1.2. Ensaio de Atividade Antibacteriana- Método de diluição de caldo.....	119
5.5.1.3. Ensaio de Atividade Antifúngica.....	120
5.5.2. Ensaio de Atividade Antiprotozoária.....	121
5.5.3. Ensaio de Citotoxicidade em Linhagens de Células Tumorais.....	122
5.6. Estudo Fitoquímico	125
5.6.1. Extratos das cascas obtidos em hexano.....	125
5.6.1.1. Avaliação dos perfis cromatográficos dos extratos por CCD.....	125
5.6.1.2. Análise dos extratos apolares das cascas por CG-DIC e CG-EM.....	126
5.6.1.2.1. Compostos identificados por dados espectrais.....	131
5.6.1.2.1.1. Ácido hexadecanóico (ácido palmítico).....	131
5.6.1.2.1.2. Ácido 9,12-octadecadienóico (ácido linoléico).....	133
5.6.1.2.1.3. Ácido 9-octadecenóico (ácido oléico).....	135

5.6.1.2.1.4. Ácido octadecanóico (ácido esteárico).....	136
5.6.1.2.1.5. Isômero do ácido 3-clerodeno-15-óico.....	137
5.6.1.2.1.6. Ácido 3-clerodeno-15-óico.....	138
5.6.1.2.1.7. Ácido catívico.....	140
5.6.1.2.1.8. Ácido diterpênico não-identificado.....	141
5.6.1.2.1.9. Ácido graxo não-identificado.....	141
5.6.1.2.1.10. Ácido 3-hidroxiabda-7,13-dieno-15-óico.....	142
5.6.1.2.1.11. Ácido tetracosanóico (ácido lignocérico).....	143
5.6.1.2.1.12. Ácido hexacosanóico (ácido cerótico).....	144
5.6.1.2.1.13. Ácido graxo não-identificado.....	145
5.6.1.2.1.14. Esqualeno.....	145
5.6.1.2.1.15. α -tocoferol.....	147
5.6.1.2.1.16. Estigmasterol.....	148
5.6.1.2.1.17. β -sitosterol.....	149
5.6.1.3. Fracionamentos cromatográficos do extrato bruto EHCEduck.....	151
5.6.1.3.1. Fracionamento da fração C1-EHCEduck.....	152
5.6.1.3.1.1. Fracionamento da fração f4-C2-HCd.....	153
5.6.1.3.1.2. Purificação da fração f6-C3-HCd.....	153
5.6.1.3.1.3. Fração f1-PP1-HCd.....	154
5.6.1.3.1.4. Purificação da fração f5-C2-HCd.....	155
5.6.1.3.1.5. Fração f4-PP2-HCd.....	156
5.6.1.3.2. Fracionamento da fração A1-EHCEduck.....	164
5.6.1.4. Fracionamento cromatográfico do extrato bruto EHCEglab1.....	165
5.6.1.4.1. Fracionamento da fração A1-EHCEglab1.....	166
5.6.1.5. Fracionamento cromatográfico do extrato bruto EHCEglab2.....	167

5.6.2. Extratos das cascas obtidos em acetato de etila.....	168
5.6.2.1. Avaliação dos perfis cromatográficos dos extratos por CCD.....	168
5.6.2.2. Fracionamento do extrato bruto EACEglab2	169
5.6.2.2.1. Fracionamento da fração f4-C1-ACg2.....	170
5.6.2.2.2. Purificação da fração f1-C2-ACg2.....	171
5.6.2.2.3. Fração f1-PP4-ACg2.....	171
5.6.2.2.4. Fração f2-PP4-ACg2.....	173
5.6.2.2.5. Fracionamento da fração f5-C1-ACg2.....	174
5.6.2.2.6. Elucidação estrutural da fração f7-C3-ACg2.....	175
5.6.2.2.7. Fracionamento da fração f6-C1-ACg2.....	186
5.6.2.2.8. Purificação da fração f7-C4-ACg2.....	186
5.6.2.3. Fracionamento do extrato bruto EACEduck.....	187
5.6.2.3.1. Fracionamento da fração f4-C1-ACd.....	188
5.6.2.3.2. Purificação da fração f9-C2-ACd.....	188
5.6.3. Extrato metanólicos das cascas: Avaliação por RMN ¹ H.....	189
5.6.4. Extratos das folhas obtidos em hexano.....	195
5.6.4.1. Avaliação dos perfis cromatográficos dos extratos por CCD.....	195
5.6.4.2. Pré-fracionamento do extrato bruto EHFEGlab2.....	196
5.6.5. Extratos das folhas obtidos em acetato de etila.....	198
5.6.5.1. Avaliação dos perfis cromatográficos dos extratos por CCD.....	198
5.6.6. Extratos metanólicos das folhas: Avaliação por RMN ¹ H.....	199
6. CONCLUSÃO.....	201
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	204

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. A Organização Mundial da Saúde estima que 80% da população mundial utiliza plantas como medicamentos (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2005). Além do seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, as plantas têm contribuído para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados, como exemplo a morfina, a emetina, a vincristina, a colchicina, a rutina, etc (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998). Cerca de 30% dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2003).

A busca de novas substâncias bioativas foi intensificada especialmente nas florestas tropicais, onde se concentra grande parte da biodiversidade (PINTO *et al.*, 2002). Como consequência, pode-se esperar que as potenciais descobertas de novos produtos naturais biologicamente ativos ocorrerão nas florestas tropicais, como a da Amazônia (GARCIA, 1995).

O Brasil possui cerca de 60.000 espécies de plantas, o que corresponde 20% de toda flora mundial, porém a flora brasileira é praticamente desconhecida em termos químicos, pois de toda essa riqueza têm-se estudos químicos e/ou farmacológicos de apenas 1% dessas plantas (BARATA, 2001; GARCIA, 1995). Além disso, o Brasil é considerado o maior país do planeta em número de espécies endêmicas (BARREIRO & BOLZANI, 2009), porém, a maioria das plantas medicinais comercializadas no país foram introduzidas de outros países. Assim, as plantas medicinais endêmicas ainda são pouco conhecidas o que constituem em um fascinante assunto de pesquisa acadêmica e de desenvolvimento (PINTO *et al.*, 2002).

Apesar das doenças tropicais (malária, mal de Chagas, esquistossomose e leishmaniose), juntamente com a tuberculose, somarem cerca de 5% das doenças do mundo,

elas não recebem a atenção que merecem. Dos mais de 1.300 novos medicamentos introduzidos entre 1975 e 1999, apenas 13 eram para doenças tropicais. Além disso, no ano de 2000 somente cerca de 0,1% do investimento global em pesquisa em saúde foi dedicada à descoberta de medicamentos para as doenças tropicais (PINK *et al.*, 2005). Isto ocorre porque o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento dessas doenças, que afetam sobretudo populações de países em desenvolvimento, pouco interessa à indústria farmacêutica, pois embora estes países reúnam 80% da população mundial, correspondem a apenas 20% das vendas globais de remédios (FUNARI & FERRO, 2005).

Considerando a escassez e a importância de estudos químicos das plantas endêmicas e a necessidade de pesquisas por substâncias que auxiliem no tratamento de doenças que afligem a humanidade, o objetivo desse trabalho foi estudar a composição química e atividades biológicas das espécies *Eperua duckeana* e *Eperua glabriflora* que apesar de serem endêmicas e comuns na Amazônia Central não possuem estudo químico ou farmacológico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae, equivalente Leguminosae, pertence à ordem Fabales, classe Magnoliopsida e divisão Magnoliophyta (ROSKOY *et al.*, 2007) e é composta por cerca de 19.000 espécies distribuídas em 695 gêneros (GIULIETTI *et al.*, 2005). Esta família é formada por árvores, arbustos, lianas e ervas e tem distribuição cosmopolita, ou seja, distribuídas mundialmente (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002). O Brasil possui cerca de 3.200 espécies dessa família distribuídas em 176 gêneros, sendo que aproximadamente 2.144 dessas espécies são endêmicas (32 gêneros endêmicos) (GIULIETTI *et al.*, 2005).

É uma das maiores e mais importantes famílias botânicas, visto o grande número de espécies vegetais e a sua importância como fonte de produtos alimentares, medicinais, ornamentais, madeireiros e fornecedores de forragem, fibras, corantes, gomas, resinas e óleos (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002; WATSON & DALLWITZ, 2009). Essa família é geralmente dividida em três subfamílias: Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae (SOUZA & LORENZI, 2008).

A família Fabaceae é uma das poucas famílias que possui isoflavonas, subclasse de flavonóides conhecida pelas suas propriedades bactericidas, antifúngicas e estrogênicas (SIMÕES *et al.*, 2007).

2.2. O GÊNERO *Eperua* Aublet

O gênero *Eperua* Aublet é constituído por 14 espécies distribuídas pela Amazônia Central, principalmente pelo sul do Equador, Venezuela, Guianas e norte do Brasil, em especial nas áreas da cidade de Manaus (COWAN, 1975). Na Tabela 1 encontra-se a posição taxonômica do gênero *Eperua* (ROSKOY *et al.*, 2007). Em geral, as espécies desse gênero são árvores de grande porte, podendo variar de 5 a 70 metros de altura. Apresentam vagens de coloração esverdeada a tons enegrecidos.

Tabela 1. Informações taxonômicas sobre o gênero *Eperua*

Categoria	Taxón
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Fabales
Família	Fabaceae
Subfamília	Caesalpinioideae
Gênero	<i>Eperua</i>

Segundo Cowan (1975) existe uma relação entre o tipo de solo e as diferentes espécies de *Eperua* que eles suportam. Por exemplo, *E. glabriflora* é encontrada apenas em locais com solos úmidos e ácidos de areia branca e húmus negro, já a *E. schomburgkiana* é encontrada em solos pantanosos às margens de rios e córregos em pequena florestas.

O principal uso das espécies de *Eperua* está relacionado com a indústria madeireira, pois as árvores possuem crescimento e regeneração rápida, cerca de 30 anos de corte a corte, além disso, possuem particular resistência à deterioração em contato com a água, por esse motivo são usadas em construções de casas, cercas e telhas e também como lenha e carvão vegetal (COWAN, 1975). As madeiras retiradas de árvores desse gênero são conhecidas comercialmente como *wallaba*, mas podem ser encontradas pelos nomes de espadeira, copaibarana, muirapiranga, *yoboko*, bois-de-sabre, eperu, *wapa*, *roode walaba*, *bijlhout* e *tamoene* (COWAN, 1975; RICHTER & DALLWITZ, 2009).

As espécies do gênero *Eperua* encontradas na Amazônia brasileira são conhecidas popularmente como Muirapiranga (SILVA *et al.*, 2004). Várias espécies exsudam óleo-resina do tronco, segundo Janzen (1974 *apud* MEDINA & DE SANTIS, 1981, p. 202) o óleo-resina exsudado da *E. purpurea* é o responsável pela notável resistência ao ataque de insetos ao tronco da árvore. Alguns dos óleos-resinas de *Eperua* são conhecidos popularmente com nomes correlatos aos da copaíba, como os das espécies *E. oleifera* e *E. purpurea*, que são conhecidas como copaíba-jacaré e copaibarana, respectivamente. A espécie *E. duckeana* recebeu esse nome em homenagem ao Adolpho Ducke, pioneiro na coleção e estudo de Leguminosas do Brasil (COWAN, 1975) e é conhecida vulgarmente por muirapiranga de folha miúda (ou Pau-de-óleo). A espécie *E. glabriflora* tem a sinonímia: *Eperua bijuga* var. *glabriflora* Ducke e é conhecida como muirapiranga de folha grande (SILVA *et al.*, 2004). Os folíolos dessa espécie possuem margem revoluta, o que facilita reconhecer os mesmos na liteira da floresta (MARTINS & SILVA, 1999). Apesar das espécies *E. duckeana* e *E. glabriflora* serem comuns na Amazônia Central, nunca foram estudadas quimicamente e/ou farmacologicamente.

2.2.1. USOS ETNOFARMACOLÓGICOS

Muitas das espécies do gênero *Eperua* são indicadas para o tratamento de úlcera e diarreia e como emético. Há relatos que a infusão de “wallaba” (*Eperua* sp.) juntamente com o “suco” dos galhos de *Saccharum officinarum* são usados para o tratamento de envenenamento por curare pelos índios *Macusi* da Guiana. Além disso, a decocção da parte interna das cascas de *E. grandiflora* é usada para aliviar dor de dente (DEFILIPPS *et al.*, 2004).

A espécie com mais indicações etnofarmacológicas é *E. falcata*. A decocção das cascas do caule dessa espécie é usada como: analgésico dental (HENRY *et al.*, 2007), para induzir vômito e para tratamento de diarreia (DEFILIPPS *et al.*, 2004). Além disso, o óleo da espécie *E. falcata* é utilizado na medicina popular de modo análogo ao da copaíba (como cicatrizante, antifúngico e bactericida) (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002); e é usado como pomada contra reumatismo e na cicatrização de feridas. A mistura do óleo-resina da *E. falcata* com a resina da espécie *Protium aracouchini* é usada como emplastro para feridas (DEFILIPPS *et al.*, 2004).

Apesar das espécies do gênero *Eperua* apresentarem várias indicações etnofarmacológicas, nenhuma das atividades descritas para os óleos-resinas ou para os extratos possui comprovação científica.

2.2.2. CONSTITUINTES QUÍMICOS DO GÊNERO *Eperua*

Por ser um gênero endêmico da Amazônia, grande parte dos estudos fitoquímicos foram realizados por pesquisadores de países desta Região. Destacando-se os estudos realizados na Venezuela por Ávila, De Santis, Medina e Maillo. A maioria dos estudos foi feito nas décadas de 1980 e 1990.

Dois trabalhos foram realizados no Brasil com a química das Eperuas, ambos com *E. bijuga*, porém com propósitos diferentes. Um deles, realizado por Braz Filho e colaboradores (1973) teve como objetivo buscar flavonóides em leguminosas, e o outro referente à análise de óleo essencial das folhas da mesma espécie, realizado por Maia e Godoy (1984), este citado no Banco de Dados de Plantas Aromáticas da Região Amazônica elaborado por Maia e Andrade (2009).

Os poucos trabalhos fitoquímicos encontrados na literatura se concentram nas espécies: *E. purpurea*, *E. leucantha*, *E. falcata*, *E. bijuga* e *E. grandiflora*. As espécies, as partes das plantas utilizadas, os números de trabalhos e as classes das substâncias isoladas nos estudos fitoquímicos estão expostos na Tabela 2.

Tabela 2. Espécies e partes da planta estudadas em trabalhos anteriores

Espécie	Parte estudada	Classes de substâncias	Referências
<i>E. bijuga</i>	folhas	sesquiterpenos, triterpenos e flavonoides	BRAZ FILHO <i>et al.</i> , 1973
			MAIA & ANDRADE, 2009
<i>E. falcata</i>	madeira	diterpenos, ácidos fenólicos e flavonoides	KING & JONES, 1955
			BLAKE & JONES, 1963
			VILLENEUVE <i>et al.</i> , 1988
			AMUSANT <i>et al.</i> , 2007
<i>E. grandiflora</i>	madeira	Diterpenos	ROYER <i>et al.</i> , 2010
	madeira	Diterpenos	AMUSANT <i>et al.</i> , 2007
<i>E. leucantha</i>	resina	Diterpenos	MAILLO <i>et al.</i> , 1987
	sementes	Diterpenos	ÁVILA <i>et al.</i> , 1992
<i>E. purpurea</i>	resina	Diterpenos	MEDINA & DE SANTIS, 1981
			DE SANTIS & MEDINA, 1981
			DE SANTIS & MEDINA, 1987
<i>E. purpurea</i>	sementes	Diterpenos	ÁVILA & MEDINA, 1991
			ÁVILA & MEDINA, 1993

As classes de substâncias investigadas foram basicamente terpenos (principalmente diterpenos) e flavonóides. A espécie com o maior número de estudos é a *E. falcata*, talvez por ser a espécie com maior número de relatos de uso etnofarmacológico.

2.2.2.1. TERPENOS DE *Eperua*

Os estudos fitoquímicos com o gênero *Eperua* relatam diversos terpenos, principalmente diterpenos. Maia e Godoy (1984 *apud* MAIA & ANDRADE, 2009, p. 595) descreveram o componente majoritário dos óleos essenciais das folhas de *E. bijuga* como sendo (*E*)-cariofileno (**1**). Braz Filho e colaboradores (1973) isolaram o triterpeno friedelano-3 α -ol (**2**) de *E. bijuga*, o único identificado no gênero até o momento (Figura 1).

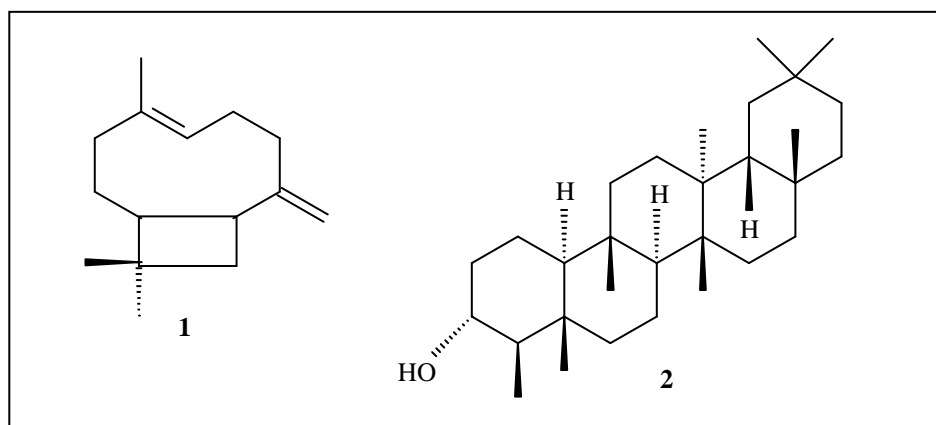


Figura 1. Estruturas do sesquiterpeno e triterpeno encontrados em espécies de *Eperua*: (*E*)-cariofileno (**1**) e friedelano-3 α -ol (**2**)

Os óleos-resinas exsudados do tronco das espécies do gênero *Eperua* são conhecidos por apresentarem uma grande quantidade de ácidos diterpênicos. King e Jones (1955) citam que os óleos-resinas de *E. falcata* e de outras espécies de *Eperua* da Guiana Inglesa são constituídas por cerca de 85% de ácidos diterpênicos, principalmente o ácido eperúico, que recebeu esse nome por ter sido isolado pela primeira vez em espécies do gênero *Eperua*.

Em geral, os diterpenos relatados para esse gênero são de estruturas labdânicas e clerodânicas (Figura 2). As diferenças dos esqueletos labdanos para os clerodanos são as posições das metilas 19 e 20. Em geral os diterpenos de *Eperua* apresentam estes dois esqueletos com algumas modificações.

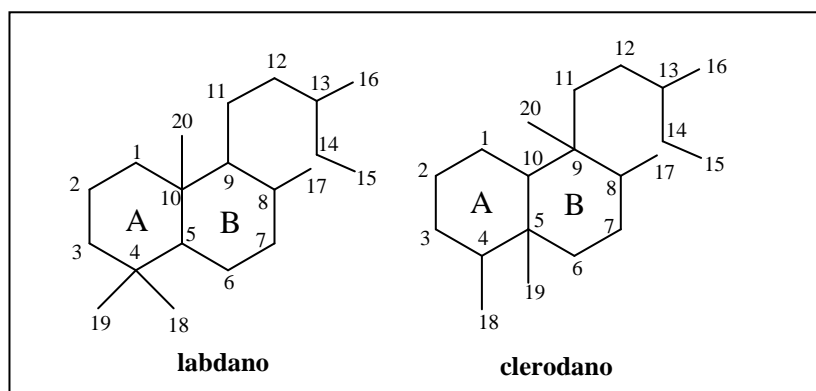


Figura 2. Esqueletos e numeração dos diterpenos labdanos e clerodanos

As modificações mais frequentes são: posição e o número de insaturações, as mais comuns em 8-17 e 13-14; presença de hidroxilas e carboxilas na posição 15 e a ocorrência de norditerpenos. A Tabela 3 apresenta os diterpenos identificados no gênero *Eperua* e as Figuras 3 e 4 apresentam as estruturas dos diterpenos correspondentes.

Todos os diterpenos clerodânicos foram isolados das sementes das vagens e nenhum deles foi encontrado em outra parte da planta, o que pode indicar a possibilidade das espécies do gênero *Eperua* produzirem diterpenos clerodânicos apenas nas sementes das vagens.

Tabela 3. Diterpenos encontrados em espécies de *Eperua*

N°	Constituinte	Referências
Cetonas		
3	14,15- <i>bisnor</i> -labda-13-ona	DE SANTIS & MEDINA (1987) ^c
4	9-metil-14,15,20- <i>trinor</i> -labda-1(10)-eno-13-ona	DE SANTIS & MEDINA (1987) ^c
5	14,15- <i>bisnor</i> -labda-7-eno-13-ona	DE SANTIS & MEDINA (1987) ^c
Ésteres		
6	eperuato de metila	MAIA & GODOY (1984 <i>apud</i> MAIA & ANDRADE, 2009) ^a
7	labda-8(17)-eno-15-oato de labda-8(17)-eno-15-ila	MEDINA & DE SANTIS (1981) ^c MAILLO <i>et al.</i> (1987) ^d
Álcoois		
8	labda-8(17)-eno-15-ol	MEDINA & DE SANTIS (1981) ^c MAILLO <i>et al.</i> (1987) ^d
9	labda-8(17),13 <i>E</i> -dieno-15-ol	MEDINA & DE SANTIS (1981) ^c MAILLO <i>et al.</i> (1987) ^d
Ácidos (labdanos)		
10	ácido labda-8(17)-eno-15-óico (ácido eperúico)	KING & JONES (1955) ^b MEDINA & DE SANTIS (1981) ^c MAILLO <i>et al.</i> (1987) ^d AMUSANT <i>et al.</i> (2007) ^{b,e}
11	ácido labda-8(17),13 <i>E</i> -dieno-15-óico (ácido copálico)	ÁVILA & MEDINA (1993) ^c MEDINA & DE SANTIS (1981) ^c DE SANTIS & MEDINA (1981) ^c AMUSANT <i>et al.</i> (2007) ^e
12	Ácido <i>ent</i> -copálico	MAILLO <i>et al.</i> (1987) ^d
13	ácido labda-7-eno-15-óico (ácido catívico)	MAILLO <i>et al.</i> (1987) ^d AMUSANT <i>et al.</i> (2007) ^b
14	ácido 7-oxo-labda-8-eno-15-óico	ÁVILA & MEDINA (1993) ^c AMUSANT <i>et al.</i> (2007) ^e
15	ácido (-)-7-oxo-labda-8,13 <i>E</i> -dieno-15-óico	AMUSANT <i>et al.</i> (2007) ^e
Ácidos (clerodanos)		
16	ácido (-)-cleroda-7,13 <i>E</i> -dieno-15-óico	ÁVILA & MEDINA (1993) ^c
17	ácido (-)-2-oxo-cleroda-3,13 <i>E</i> -dieno-15-óico (ácido 2-oxo-covalênico)	ÁVILA & MEDINA (1991) ^c ÁVILA <i>et al.</i> (1992) ^d ÁVILA & MEDINA (1993) ^c
18	ácido (-)-7β-hidróxicleroda-8(17),13 <i>E</i> -dieno-15-óico	ÁVILA <i>et al.</i> (1992) ^d
19	ácido <i>nor</i> -hardwíkiico	ÁVILA <i>et al.</i> (1992) ^d
20	ácido 16-oxo-13,14 <i>H</i> -hardwíkiico	ÁVILA <i>et al.</i> (1992) ^d

a- Isolado de *E. bijuga*; b- Isolado de *E. falcata*; c- Isolado de *E. purpurea*; d- Isolado de *E. leucantha*; e- Isolado de *E. grandiflora*

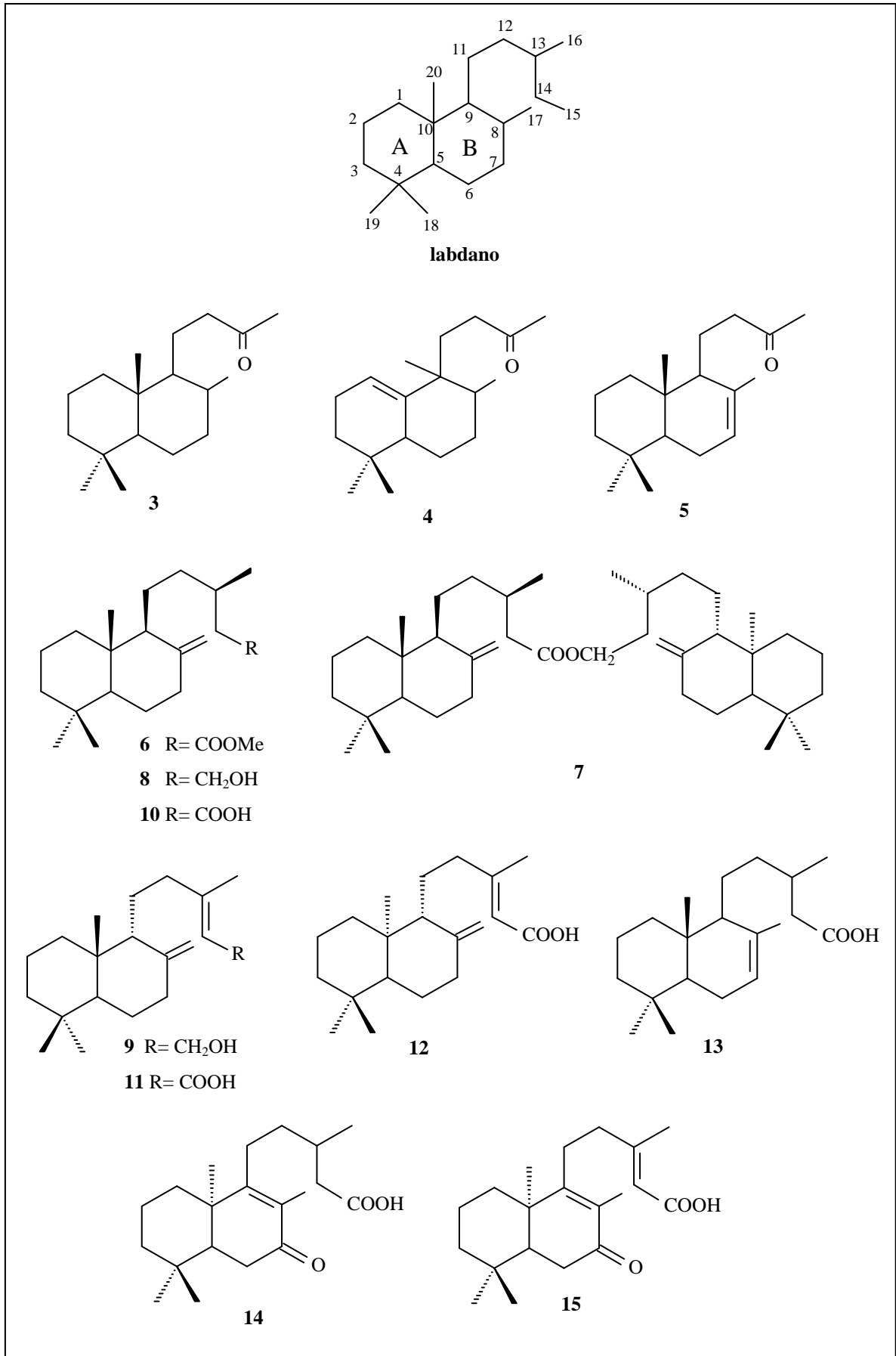


Figura 3. Estruturas de diterpenos labdânicos isolados de espécies de *Eperua*

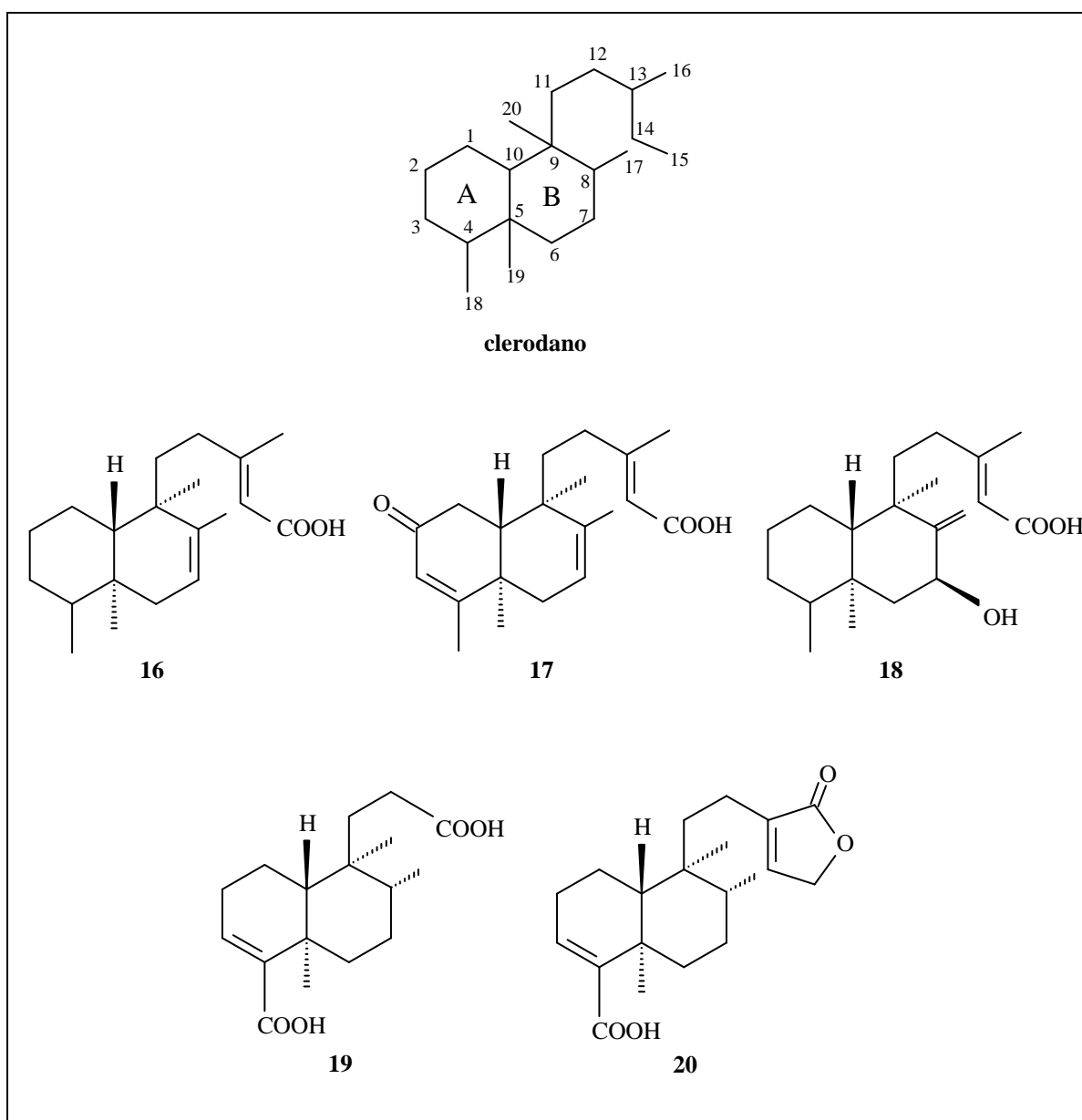


Figura 4. Estruturas de diterpenos clerodânicos isolados de espécies de *Eperua*

2.2.2.2. COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Eperua*

Braz e colaboradores (1973) isolaram a flavona tricina (**26**), das folhas de *E. bijuga*. Do cerne de *E. falcata* foram isoladas a (+)-catequina (**23**) e a (-)-epicatequina (**24**) (VILLENEUVE *et al.*, 1988).

Em 2007, Henry e colaboradores depositaram uma patente relatando que no extrato das cascas de *E. falcata*, os flavonóides engeletina e a astilbina são os principais responsáveis pela atividade antiinflamatória.

O trabalho realizado por Royer e colaboradores em 2010 apresentou treze substâncias do extrato metanólico de *E. falcata*. As moléculas foram isoladas por CLAE e identificadas por comparação dos espectros de RMN 1D e 2D com os dados da literatura, sendo onze flavonóides (**23** - **33**) e dois ácidos fenólicos: o ácido gálico (**21**) e ácido *p*-hidroxibenzóico (**22**). Quatro dos flavonóides isolados (**23**), (**24**), (**27**) e (**31**) já tinham sido isolados anteriormente.

A Tabela 4 apresenta os compostos fenólicos isolados das espécies de *Eperua* e a Figura 5 apresenta a estrutura dos flavonóides e ácidos fenólicos correspondentes.

Tabela 4. Compostos fenólicos encontrados em espécies de *Eperua*

Nº	Substância	Referência
Ácidos fenólicos		
21	ácido gálico	ROYER <i>et al.</i> (2010) ^b
22	ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	ROYER <i>et al.</i> (2010) ^b
Flavonóides		
23	(+)-catequina	VILLENEUVE <i>et al.</i> (1988) ^b ROYER <i>et al.</i> (2010) ^b
24	(-)- <i>epicatequina</i>	VILLENEUVE <i>et al.</i> (1988) ^b ROYER <i>et al.</i> (2010) ^b
25	(-)-3-(4-hidroxibenzoil) <i>epicatequina</i>	ROYER <i>et al.</i> (2010) ^b
26	tricina	BRAZ FILHO <i>et al.</i> (1973) ^a
27	engeletina	ROYER <i>et al.</i> (2010) ^b
28	isoengelentina	ROYER <i>et al.</i> (2010) ^b
29	neoengelentina	ROYER <i>et al.</i> (2010) ^b
30	neoisengelentina	ROYER <i>et al.</i> (2010) ^b
31	astilbina	ROYER <i>et al.</i> (2010) ^b
32	neoastilbina	ROYER <i>et al.</i> (2010) ^b
33	(-)-dihidrocampferol	ROYER <i>et al.</i> (2010) ^b

a- Isolado de *E. bijuga*; b- Isolado de *E. falcata*.

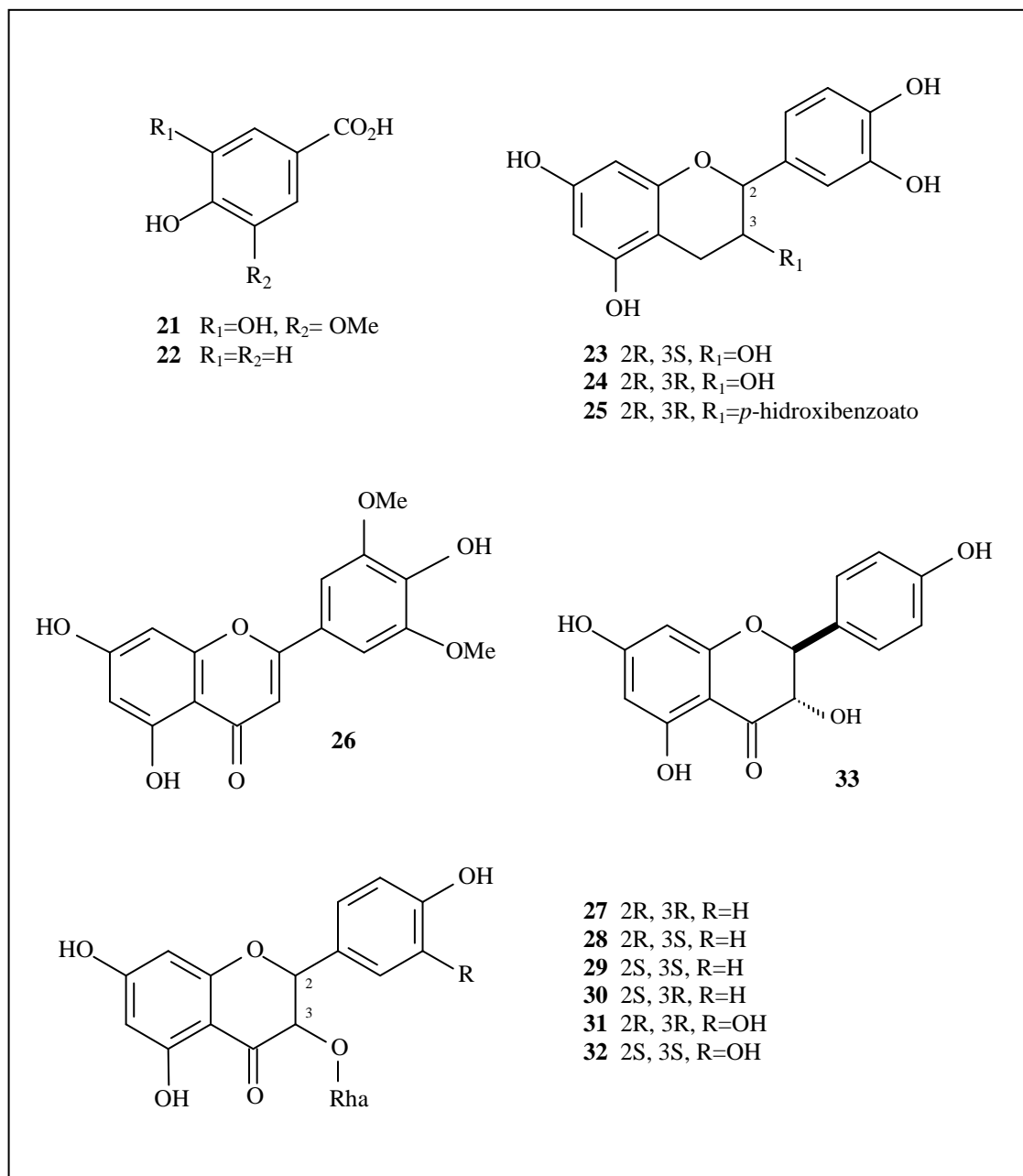


Figura 5. Ácidos fenólicos e flavonóides identificados em espécies de *Eperua* (Rha= α -L-raminose)

2.2.2. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO GÊNERO *Eperua*

Grande parte dos ensaios biológicos realizados com extratos ou resinas de *Eperua* é direcionada para testes com microorganismos que degradam a madeira, pois uma das principais interessadas nas espécies desse gênero são as indústrias madeireiras. Entretanto, as

indústrias farmacêuticas também se interessam pelos constituintes sintetizados por espécies de *Eperua*, em especial pelos compostos fenólicos.

A resina de *E. grandiflora* apresentou atividade inseticida contra cupim (DL₅₀: 1,261 µg/2 mg) (GOURNELIS *et al.*, 1986). Nos extratos de *E. falcata* e *E. grandiflora* foi observada atividade contra o fungo *Coriolus versicolor* (AMUSANT *et al.*, 2007) e atribuída a maior durabilidade da madeira à composição de ácidos diterpênicos e compostos polifenólicos. No trabalho de Royer e colaboradores (2010) foi atribuída a estabilidade da madeira da *E. falcata* aos polifenóis, comprovadas através de isolamento e identificação dos constituintes do extrato metanólico.

O trabalho realizado por Gournelis e colaboradores (1986) comprovou a atividade bactericida (CIM: 12,5 µg/mL) para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus hemolyticus* da resina de *Eperua grandiflora*.

As propriedades dos extratos de *E. falcata* são relatadas em patentes na área de cosméticos. Pauly e Moretti (2003a,b e 2005) relatam a ação antiradicalar do extrato e licenciaram um cosmético com ação anti-rugas. Henry e colaboradores (2007) licenciaram uma preparação contendo o extrato de *E. falcata*, que é útil para inibir a liberação de promotores inflamatórios e neuropeptídeos incluindo CGRP e SP, para tratamento de pele e cabelo e que também os protege dos efeitos danosos dos raios UV-A e UV-B.

A mistura dos ácidos eperúico (**10**), catívico (**13**) e ácido labda-8-eno-15-óico (**34**) é usada como acelerador da produção de colágeno (YAMAMOTO *et al.*, 2005), ativador do crescimento celular (TAMAI *et al.*, 1999) e inibição de melanina (TAMAI *et al.*, 2001). As mesmas atividades são relatadas para os sais e ésteres metílicos e etílicos desses ácidos. Dois desses diterpenos, (**10**) e (**13**), já foram isolados de espécies de *Eperua*. Nas patentes geradas pela utilização dessas moléculas, *E. falcata* é citada como fonte dessas moléculas.

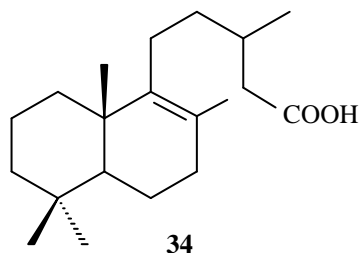


Figura 6. Estrutura do ácido labda-8-eno-15-óico

2.3. DITERPENOS

Os diterpenos são metabólitos secundários formados por 20 átomos de carbonos derivados biogeneticamente a partir do geranyl-geranylpirofosfato (GGPP), que contém quatro unidades isoprenos ligados no modo “cabeça-cauda” (HANSON, 1991).

As unidades isoprenos são formadas a partir da condensação entre as unidades difosfato de 3,3'-dimetilalila (DMAPP) e o difosfato de 3-isopentenila (IPP). Existem duas vias biossintéticas possíveis para a formação do DMAP e do IPP: a via do mevalonato e a via do fosfato de deoxixilulose (LOBO & LOURENÇO, 2007).

A condensação “cabeça-cauda” entre as unidades DMAPP e IPP, catalisada pela enzima prenil-transferase, forma a cadeia de geranyl pirofosfato (GPP), precursora dos monoterpeno. A condensação desta cadeia com novas unidades de IPP origina sucessivamente as cadeias de farnesil pirofosfato (C_{15}), geranylgeranyl pirofosfato (C_{20}) precursoras dos sesquiterpenos e diterpenos, respectivamente (DEWICK, 2001; LOBO & LOURENÇO, 2007). A Figura 7 mostra resumidamente a rota biossintética dos diterpenos.

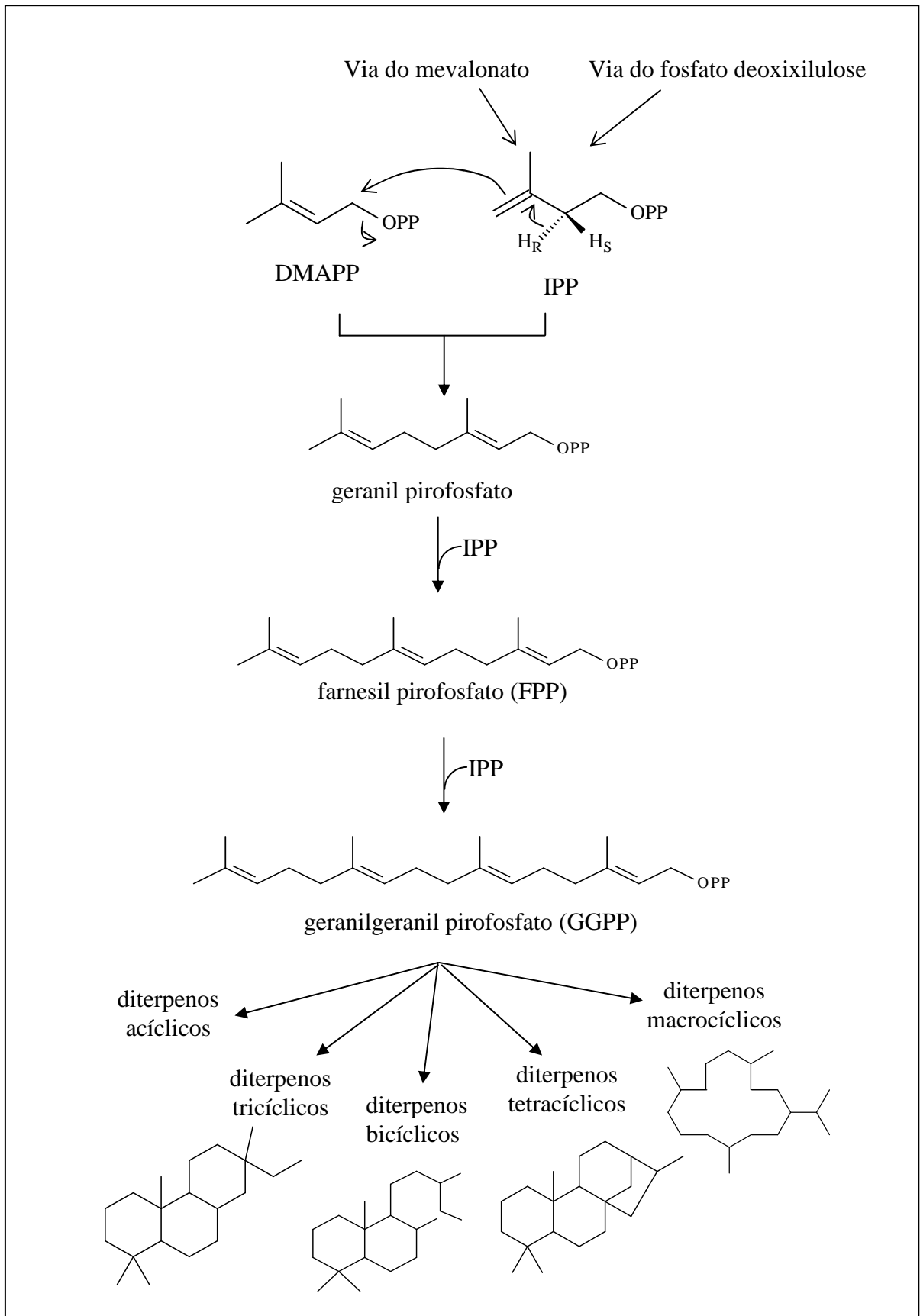


Figura 7. Rota biossintética dos diterpenos (FONTE: modificado de LOBO & LOURENÇO, 2007)

Diferentes esqueletos de diterpenos são formados a partir do GGPP: diterpenos acíclicos, bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos e macrocíclicos. De modo geral, o GGPP pode se ciclizar de duas maneiras, para formar os diterpenos bicíclicos (e a partir desses os tri- e tetracíclicos) e os macrocíclicos (HANSON, 1991).

2.3.1. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE DITERPENOS

O principal interesse no isolamento de moléculas de diterpenos está relacionado à sua ampla área de atividades biológicas. Os estudos com essa classe devem-se principalmente ao diterpeno da classe dos taxanos, taxol (Paclitaxel®) (**35**) que possui atividade antitumoral comprovada e é atualmente utilizado no tratamento do câncer de mama e ovário (CORRÊA, 1995; KINGSTON, 2007).

Hanson (1998 e 2000) listou, em dois artigos, cerca de 300 diferentes diterpenos dos mais variados esqueletos isolados a partir de propriedades relatadas pela medicina popular.

Para os diterpenos labdânicos são descritas diversas atividades biológicas, tais como: antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, cardiotônica, antileishmania e citotóxica (SINGH *et al.*, 1999). Dimas e colaboradores (1998) relataram a atividade citotóxica *in vitro* do diterpeno labda-13(E)-eno-8 α -15-diol (**38**) contra 13 linhagens de células leucêmicas humanas.

Vários diterpenos labdânicos e clerodânicos são indicados como sendo os compostos responsáveis pela atividade biológica de seus extratos brutos. Por exemplo, o diterpeno clerodânico *trans*-desidrocrotonina (**36**), substância majoritária das cascas do caule de *Croton cajucara*, é responsável por grande parte das propriedades terapêuticas dessa planta, tais como: ação antiinflamatória, antinociceptiva, efeito hipoglicemiante, atividade antiespasmódica e atividade antiulcerogênica (MACIEL *et al.*, 2002). Outro exemplo é o óleo

de copaíba, que é constituído por uma mistura de sesqui- e diterpenos e nenhuma outra classe de substâncias. Esses óleos são amplamente utilizados na medicina popular e possuem diversas atividades biológicas comprovadas, tais como: atividade antiinflamatória, antitumoral, analgésica, antineoplásica, tripanossomicida e entre outras. Dentre os constituintes diterpênicos dos óleos de copaíba, encontra-se: covalenol, ácido copálico, ácido hardwíkiico e o ácido caurenóico (VEIGA-JUNIOR. & PINTO, 2002).

Os diterpenos clerodânicos também são conhecidos por inibirem crescimento fúngico (CAVIN *et al.*, 2006). Por exemplo, os ácidos covalênico (**37**) e o 2-oxo-covalênico (**20**), o último já isolado de *Eperua*, apresentam atividade antifúngica contra *Phomopsis viticola* e *Botrytis cinerea* (SALAH *et al.*, 2003).

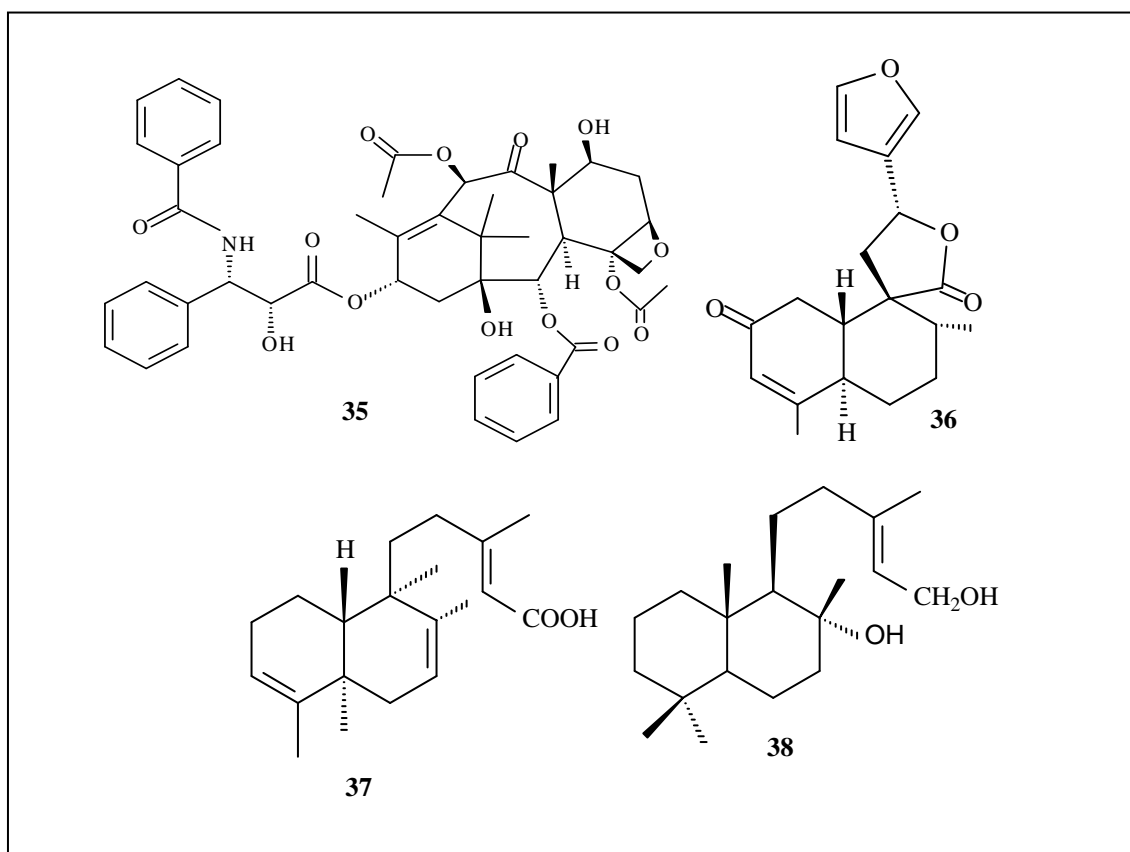


Figura 8. Diterpenos com atividades biológicas

2.4. FLAVONÓIDES

Flavonóides são metabólitos secundários caracterizados pela presença de 15 átomos de carbono em seu esqueleto básico (núcleo flavona) arranjos em três anéis ($C_6-C_3-C_6$), designado como A, B e C, como mostrado na Figura 9 (PIETTA, 2000; ZUANAZZI & MONTANHA, 2007).

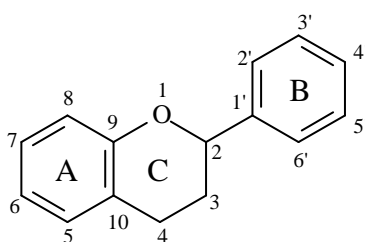


Figura 9. Estrutura básica dos flavonóides: núcleo flavona

As diversas classes de flavonóides diferem no nível de oxidação e padrão de substituição do anel C, enquanto compostos individuais dentro de uma classe diferem no padrão de substituição dos anéis A e B. As estruturas das principais classes de flavonóides estão mostradas na Figura 10.

Flavonóides desempenham diferentes funções nas plantas, como: proteção contra a radiação ultravioleta, patógenos e herbívoros, atração de animais com finalidade de polinização, controle da ação de hormônios vegetais e agentes alelopáticos (HEIM *et al.*, 2002; ZUANAZZI & MONTANHA, 2007). Também são importantes para a saúde humana devido à sua elevada atividade farmacológica como sequestradores de radicais livres, sendo relacionados à prevenção de doenças humanas tais como câncer e doenças cardiovasculares e algumas patologias de úlceras gástricas e duodenais, alergias, doenças vasculares, infecções virais e bacterianas (YAO *et al.*, 2004).

2.4.1. BIOSÍNTESE DOS FLAVONÓIDES

Os flavonóides são compostos de biossíntese mista, três unidades de acetato dão origem ao anel A, enquanto que os três átomos de carbono que interligam os anéis, juntamente com o anel B, derivam da rota do chiquimato. Durante a biossíntese dos flavonóides, o primeiro a ser formado é a chalcona e os outros são seus derivados (PIETTA, 2000; LOBO & LOURENÇO, 2007; DEWICK, 2001). A Figura 10 mostra resumidamente a biossíntese de alguns flavonóides, incluindo chalconas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavanonol e flavonol.

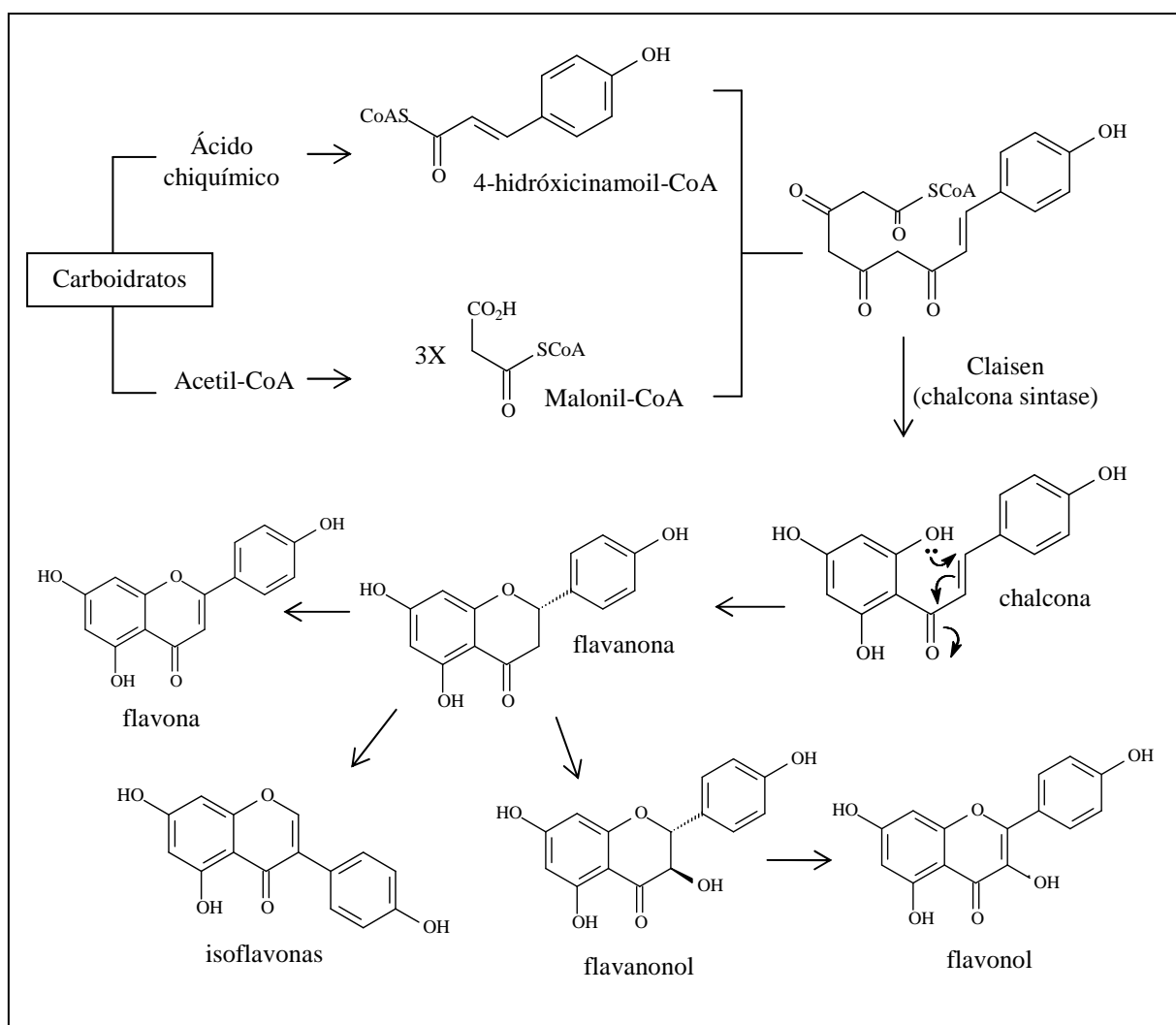


Figura 10. Rota biossintética dos flavonóides- incluindo chalconas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavanonol e flavonol (FONTE: modificado de DEWICK, 2001)

2.5. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ATIVIDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS ESTUDADAS

2.5.1. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Atualmente existe um grande interesse nos estudos dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres (RL) no organismo. Os RL são espécies químicas (átomos, moléculas orgânica ou inorgânica) que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Quando o elétron desemparelhado encontra-se localizado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) ou Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), respectivamente. As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila (HO^\bullet), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet), alcoxila (RO^\bullet); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de oxigênio, ácido hipocloroso. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO^\bullet), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2) e peroxinitritos (ONOO^-) (BARREIROS *et al.*, 2006).

Espécies reativas são formadas continuamente durante os processos metabólicos-normais ou patogênicos- ou são provenientes de fontes exógenas. Porém, quando a concentração excede ao normal ocorre o chamado estresse oxidativo, então esse excesso de espécies reativas produz danos oxidativos às biomoléculas, como por exemplo, peroxidação dos lipídios das membranas celulares, agressões às proteínas dos tecidos e membranas, enzimas e DNA (OLIVEIRA *et al.*, 2009; BIANCHI & ANTUNES, 1999). Desta forma, os RL estão relacionados ao envelhecimento e ao desenvolvimento de diversas patologias, tais como: câncer, doenças cardíacas, stress, doenças neurodegenerativas e inflamatórias (CHOI *et al.*, 2002; LUXIMON-RAMMA *et al.*, 2002; SOLER-RIVAS *et al.*, 2000).

Os RLs são controlados pelas substâncias antioxidantes que podem ser de origens endógenas ou exógenas. Porém, os componentes celulares não são totalmente protegidos pelos antioxidantes endógenos, por isso os antioxidantes obtidos da dieta alimentar são indispensáveis contra as oxidações (CERQUEIRA *et al.*, 2007)

As substâncias antioxidantes são capazes de retardar ou inibir a oxidação de um substrato bloqueando a formação dos radicais livres ou interagindo com estes, inativando-os (SOUSA *et al.*, 2007). Neste contexto, os antioxidantes de origem natural merecem atenção especial, pois as plantas sintetizam um grande número de metabólitos capazes de captar os radicais livres, tais como: vitaminas, carotenóides, ácidos fenólicos, flavonóides, antocianinas, catequinas e procianidinas (LARSON, 1988).

As principais substâncias naturais com atividade antioxidantes são os compostos polifenólicos, devido ao poder redutor do grupo hidroxila aromático, que reduz radicais livres reativos e produz o radical fenoxila estabilizado por ressonância (CERQUEIRA *et al.*, 2007).

2.5.1.1. FLAVONÓIDES COMO ANTIOXIDANTES

Segundo Barreiros e colaboradores (2006), a atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: (1) reatividade como agente doador de H e elétrons, (2) estabilidade do radical flavonoil formado, (3) reatividade frente a outros antioxidantes, (4) capacidade de quelar metais de transição e (5) solubilidade e interação com as membranas.

Entre os principais aspectos responsáveis pela capacidade antioxidantes podemos citar: presença de hidroxila na posição C-7 no anel A e C-3 no heterocíclico, hidroxilas na posição *orto* (especialmente na posição 3',4'-diidroxil- sistema catecol); ligação dupla 2,3 conjugada com o grupo 4-oxo no anel C; conjugação da carbonila em C4 com hidroxilas em

C5 do anel A e C3 do anel C; estabilidade do radical flavanoil formado; solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS *et al.*, 2006; PIETTA, 2000; WILLIAMS *et al.*, 2004). Os principais aspectos estão mostrados na Figura 11.

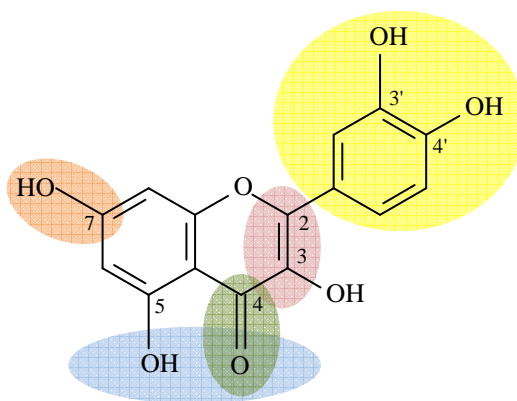


Figura 11. Estrutura da quercetina. Principais aspectos responsáveis pela atividade antioxidantes dos flavonóides (FONTE: modificado de WILLIAMS *et al.*, 2004).

Em geral, quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H e de elétrons. A doação do H[•] ocorre principalmente nas posições 7, 4' e 5, sendo maior na posição 7 e menor na posição 5. Foi constatado a necessidade de no mínimo 2 hidroxilas fenólicas, preferivelmente *orto* difenólicas como a apresentada pelo sistema catecol (3',4'-diidroxil).

A estabilidade do radical flavanoil formado depende da habilidade do flavonóide em deslocalizar o elétron desemparelhado. Os radicais aroxil formados podem ter seu elétron deslocalizado pela estrutura com maior estabilidade devido à estabilização resultante das ligações de H (Figura 12).

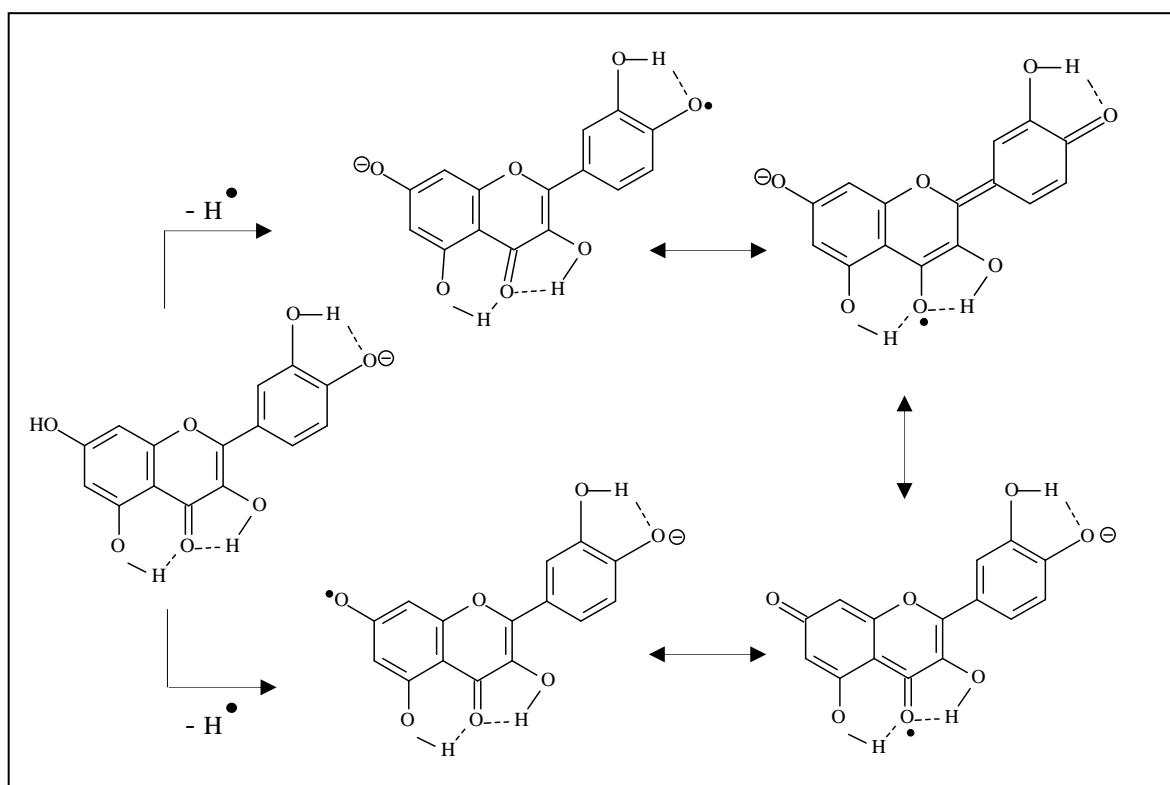


Figura 12. Mecanismo da estabilização elétron desemparelhado (FONTE: BARREIROS *et al.*, 2006)

Para a quelatação de metais de transição é fundamental a presença de grupos orto-fenólicos e /ou estruturas cetol como 4-ceto-3-hidroxi e 4-ceto-5-hidroxi (Figura 13).

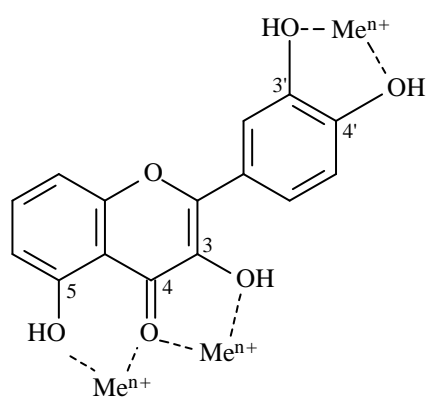


Figura 13. Estrutura da quercetina. Atribuição dos principais pontos responsáveis pela atividade antioxidantes dos flavonóides (FONTE: PIETTA, 2000).

2.5.1.2. CAPTURA DO RADICAL LIVRE DPPH[·]- ENSAIO INDICATIVO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Existem vários ensaios *in vitro* que indicam a potencial atividade antioxidante de extratos ou substâncias isoladas, sendo os mais comuns: TEAC (radical ácido 2,20-azino-bis(3-ethylbenzotiazolina)-6 sulfônico), DPPH[·] (radical 2,2-difenil-1- picrihidrazil usado para mensurar a capacidade redutora) e ORAC (capacidade de sequestro do radical oxigênio) (SHARMA *et al.*, 2007 e TABART *et al.*, 2009). Neste trabalho foi selecionado o método baseado no sequestro de radical livre DPPH[·].

O método consiste em avaliar a capacidade de um extrato ou substância isolada que atuando como antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R[·]), reduz o radical livre 2-2'-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH[·]) de coloração púrpura (que absorve no comprimento de onda a 517 nm) formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) de coloração amarela (SOUSA *et al.*, 2007), como ilustrado na Figura 14. O radical formado pela reação é mais estável que o radical DPPH[·]. No caso dos compostos fenólicos, por exemplo, os radicais gerados podem ser estabilizado por ressonância.

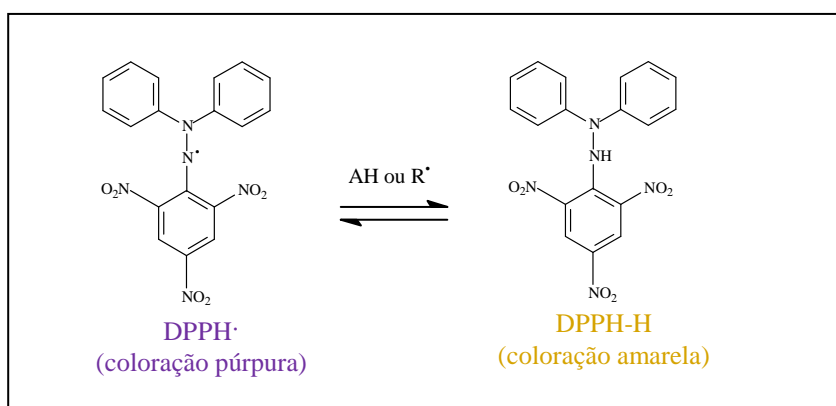


Figura 14. Reação de redução do radical DPPH[·]

O decréscimo de absorvância ocasionado pela perda de coloração (Figura 15) originada pelas diferentes concentrações de substâncias antioxidantes é monitorado em espectrofotômetro (OLIVEIRA *et al.*, 2009). A partir do resultado determina-se a porcentagem de atividade sequestradora do radical livre, correspondente à quantidade de DPPH[•] consumida pelo antioxidante.



Figura 15. Descoloração da solução de DPPH na presença de substâncias antioxidantes

2.5.2. DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

A quantificação de compostos fenólicos presentes nos extratos foi determinada usando o reagente de Folin-Ciocalteu (SOUSA *et al.*, 2007; LUXIMON-RAMMA *et al.*, 2002; TSAI *et al.*, 2002). Este reagente consiste na mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungúístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+, porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (OLIVEIRA *et al.*, 2009). A Figura 16 mostra a reação entre o ácido gálico e o molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.

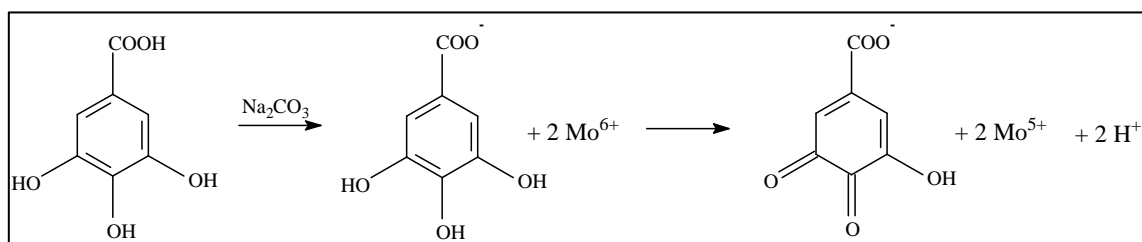


Figura 16. Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.

A mudança na coloração da solução de Folin-Ciocalteu na presença de substâncias fenólicas (Figura 17) é avaliada em espectrofotômetro.



Figura 17. Aumento da absorvância devido à presença de compostos fenólicos

2.5.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Infecções humanas, particularmente aquelas envolvendo a pele e mucosas constituem um sério problema, especialmente em países desenvolvidos tropicais e subtropicais (DUARTE, 2006). Os fármacos usados no tratamento de doenças infecciosas são denominados agentes antimicrobianos e podem ser classificados como bactericida/fungicida, quando causam a morte da bactéria/fungo, ou bacteriostáticos/fungistáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano. Assim como para outras áreas de descoberta da droga, existem duas fontes que conduzem aos agentes antimicrobianos: produtos naturais e compostos sintéticos.

Considerando que nenhuma nova classe de antibiótico foi descoberta nos últimos anos, apesar das intensas pesquisas das indústrias farmacêuticas, além do aumento da resistência dos microorganismos aos antibióticos convencionais e os efeitos colaterais que os medicamentos atuais apresentam (SANTOS *et al.*, 2008a) fica clara a necessidade de busca por novas substâncias antimicrobianas.

2.5.3.1. FÁRMACOS ANTIBACTERIANOS DE ORIGEM NATURAL DISPONÍVEIS

A maioria dos medicamentos antibacterianos em uso clínico atualmente são ou foram projetados usando como modelos os produtos naturais (BUTLER, 2008), o que estimula a procura de novas substâncias a partir de fontes naturais, incluindo as plantas.

Antibióticos de fontes naturais variam de pequenos a grandes compostos de massa molecular, entre os principais temos: os β -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas carbapenemas (que diferem estruturalmente pelo anel não β -lactâmicos); os fenilpropanóides (cloranfenicol), poliketídeos (tetraciclina), aminoglicosídeos (estreptomicina), macrolídeos (eritromicina) e glicopeptídeos (vancomicina), mostrados na Figura 18 (SINGH & BARRETT, 2006).

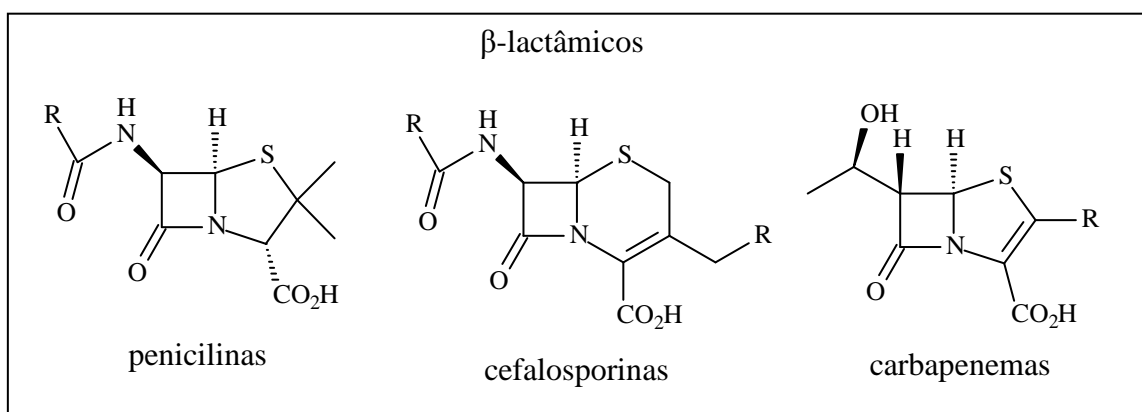


Figura 18. Estrutura e classe dos principais fármacos antibacterianos de origem natural

Cont. da Figura 18

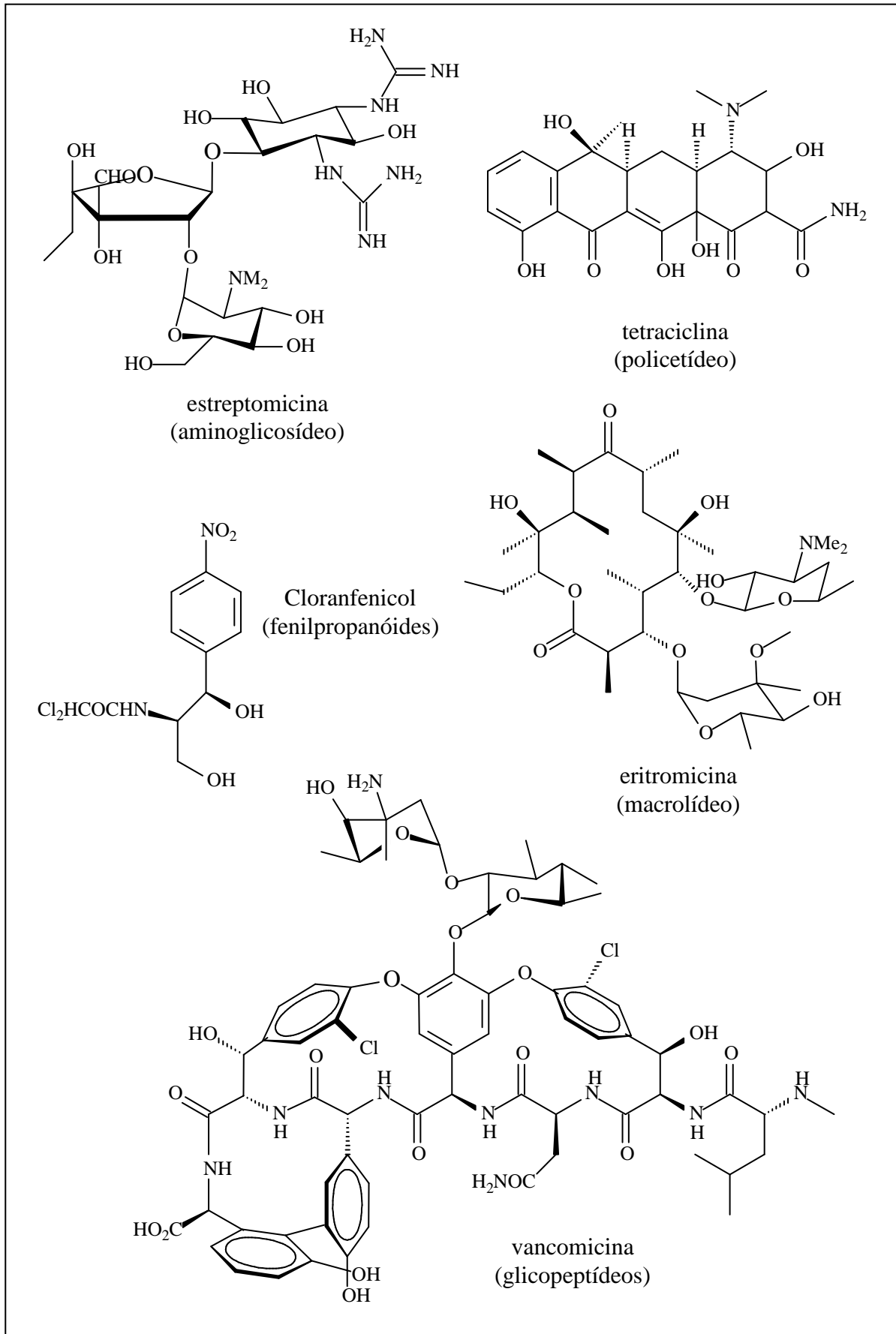


Figura 18. Estrutura e classe dos principais fármacos antibacterianos de origem natural

2.5.3.2. FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS DISPONÍVEIS

A quantidade de antifúngicos utilizados atualmente é relativamente restrita, quando comparada ao de fármacos antibacterianos. Existem cinco classes de antifúngicos: a dos azóis, representada por um imidazol (cetoconazol, I) e dois triazóis (fluconazol, II; e itraconazol, III); a das alilaminas, representada pela terbinafina (IV); a das fluoropirimidina, representada pela 5-fluorocitosina (V); a dos polienos, representada pelos antibióticos macrolídeos anfotericina B (VI) e nistatina (VII); e das equinocandinas, representada pela caspofungina (VIII), mostrados na Figura 19.

Apesar da maioria dos antifúngicos existentes no mercado serem de origem sintética, estudos com produtos naturais são de extrema importância, pois o conhecimento etnofarmacológico tem mostrado que várias espécies vegetais são utilizadas na medicina popular como antifúngicas (HOLETZ *et al.*, 2002; DUARTE, 2006; FENNER *et al.*, 2006).

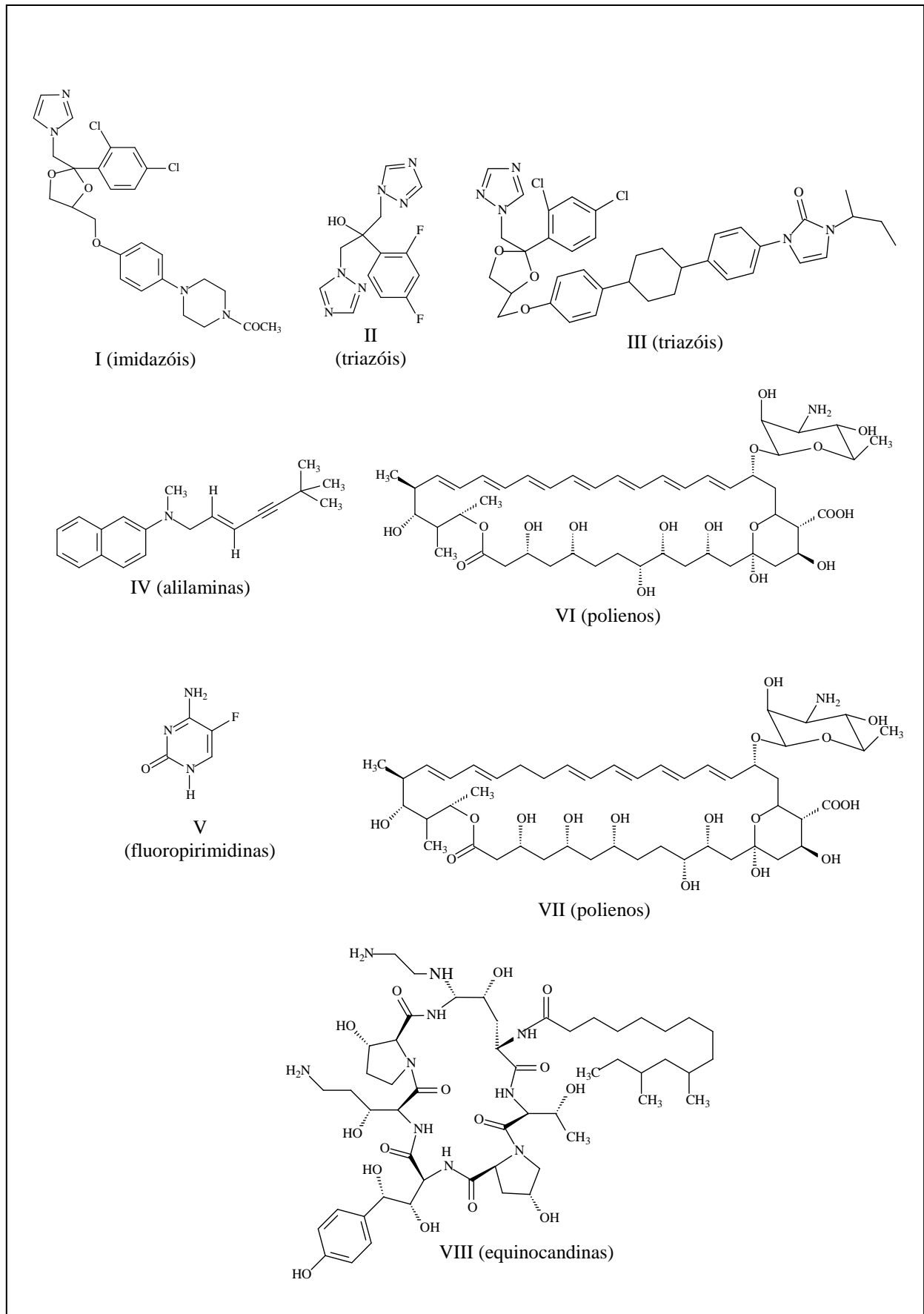


Figura 19. Estrutura e classe dos principais fármacos antifúngicos

2.5.4. ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA

As plantas são uma potencial fonte alternativa de agentes terapêuticos na procura por novos e seletivos agentes para o tratamento de doenças tropicais causadas por protozoários. Diversos fatores, tais como: a não-renovação medicamentosa, o surgimento de resistência aos medicamentos existentes, os efeitos colaterais e o longo tratamento indicam a necessidade do desenvolvimento de novos e mais eficientes fármacos para as doenças causadas por protozoários tais como a leishmaniose e a doença de Chagas.

2.5.4.1. LEISHMANIOSE

A Leishmaniose é uma doença infecciosa causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (OMS, 2010). A transmissão dessa doença ocorre através da picada do inseto transmissor infectado. Na América do sul, os mosquitos responsáveis pela transmissão são principalmente os flebotomíneos (Figura 20).

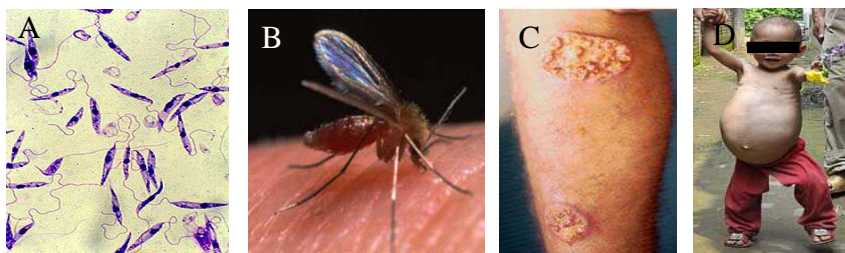


Figura 20. Leishmaniose. (A) protozoário *Leishmania* spp.; (B) flebotomíneo; (C) leishmaniose tegumentar; (D) leishmaniose visceral

A doença pode se manifestar através de lesões na pele e nas mucosas (leishmaniose tegumentar) podendo evoluir para formas crônicas e torna-se desfigurantes; ou atingir o baço e/ou fígado (leishmaniose visceral) podendo ser fatal (SVS, 2005; 2006). Em todo o mundo, registram-se aproximadamente 2 milhões de novos casos de leishmaniose por ano. Esta alta

incidência da doença levou a Organização Mundial de Saúde a incluí-la entre as seis mais importantes endemias do mundo.

2.5.4.2. DOENÇA DE CHAGAS

A Doença de Chagas é uma doença infecciosa causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Figura 21-A). A transmissão natural, ou primária, da doença é vetorial, que ocorre através das fezes dos triatomíneos, conhecido como “barbeiro” (Figura 21-B). Esses, ao picarem os vertebrados eliminam formas infectantes de trypomastigotas metacíclicas nas fezes, e que acabam penetrando pelo orifício da picada no ato de coçar (SVS, 2005).

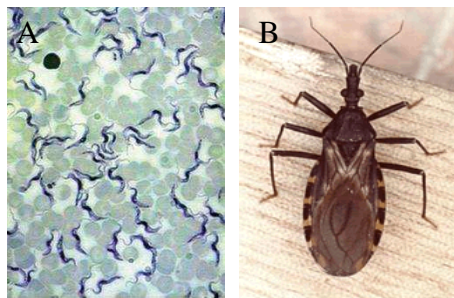


Figura 21. Doença de Chagas. (A) protozoário *trypanossoma cruzi*.;(B) barbeiro

Os mecanismos secundários de transmissão são por via transfusional sangüínea, materno-infantil (transplacentária ou por aleitamento), por via oral, transplante de órgãos e transmissão acidental, mais freqüente pela manipulação de material contaminado em laboratório (FIOCRUZ, 2010).

A Doença de Chagas é endêmica do continente americano, e afeta cerca de 17 milhões de pessoas na América Latina e é responsável pela morte de mais de 45.000 pacientes por ano (OMS, 2005). As principais drogas utilizadas no tratamento dessa doença são: benzonidazol e nifurtimox. Porém esses compostos não são eficientes e possuem sérios efeitos colaterais,

incluindo toxicidade cardíaca e renal, e são deficientes na cura de pacientes com doença crônica. Por isso, são necessárias drogas mais eficazes para o tratamento de pacientes com doença de Chagas (LUIZE *et al.*, 2005).

2.5.5. CÂNCER

O câncer é um termo usado para as doenças em que as células dividem sem controle e são capazes de invadir outros tecidos. As células cancerosas podem se espalhar para outras partes do corpo através do sangue e sistema linfático (NCI, 2010).

O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo configurando-se como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial (GUERRA *et al.*, 2005). As causas são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (INCA, 2010).

Apesar da cura de muitos tipos de câncer não tenha sido descoberta, a natureza tem fornecido moléculas que têm conseguido amenizar a deficiência de substâncias que possam inibir totalmente tal patologia (NIERO *et al.*, 2003). Os produtos naturais tem sido fonte importante de efetivos agentes anticâncer, prova disso é que 60% dos medicamentos anticâncer usados atualmente são derivados de plantas, organismos marinho ou microorganismos (CRAGG & NEWMAN, 2005). Além disso, um total de 13 fármacos

derivados de produtos naturais foram aprovados para utilização clínica entre 2005 e 2007 (BUTLER, 2008).

2.5.1. AGENTES ANTINEOPLÁSICOS A PARTIR DE PLANTAS

As plantas têm uma longa história de uso para tratamento de câncer (CRAGG & NEWMAN, 2009). Podendo fornecer moléculas de estruturas complexas com atividades biológicas ou servir como modelo para síntese de uma variedade de análogos mais potentes e/ou menos tóxicos que as substâncias de origem.

Entre as substâncias, derivadas de plantas, que deram origem aos fármacos anticâncer, podemos citar: os alcalóides da vinca, extraídos da planta *Catharantus roseus*, a vimblastina (**1**, Velban®) e os análogos vincristina (**2**, Oncovin®), vindesina (**3**, Eldisine®), vinorelbina (**4**, Navelbine®); o diterpeno extraído de *Taxus brevifolia*, paclitaxel (**5**, Taxol®) e o análogo docetaxel (**6**, Taxotere®); a lignana extraída de *Podophyllum peltatum*, o podofilotoxina (**7**) e os análogos etoposídeo (**8**, Etopophos®) e teniposídeo (**9**, Vumon®); o alcalóide extraído de *Camptotheca accuminata*, a camptotecina (**10**) e seus derivados topotecano (**11**, Hycamtin®) e irinotecano (**12**, Camptosar®), mostrados na Figura 22.

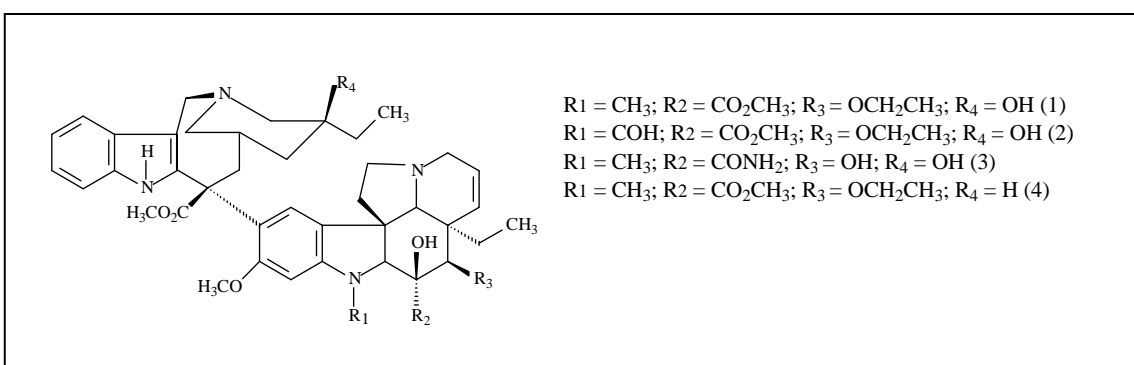


Figura 22. Fármacos derivados de plantas usados na terapia do câncer

Cont. da Figura 22

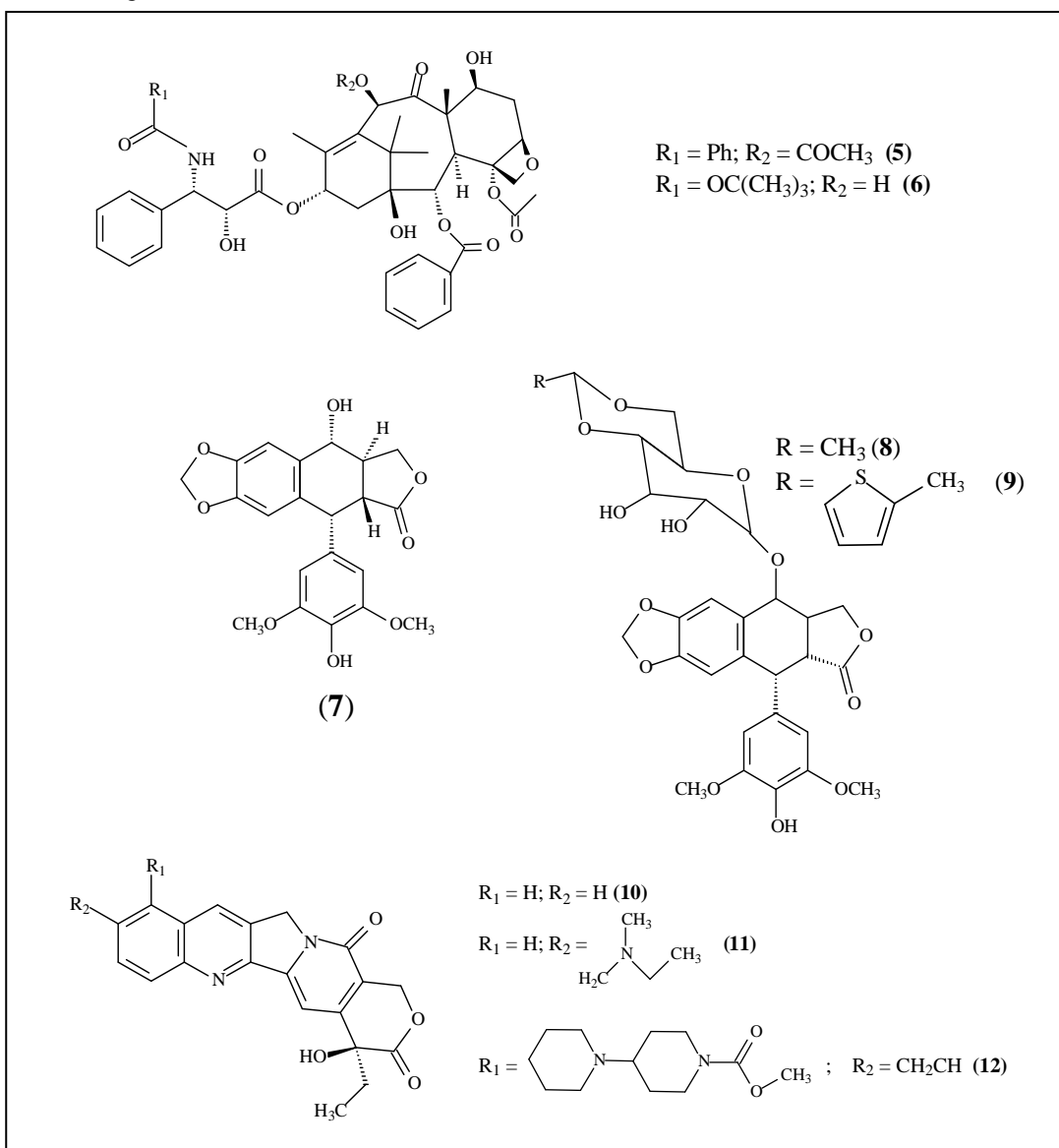


Figura 22. Fármacos derivados de plantas usados na terapia do câncer

Além dos compostos que já contribuem para a terapia do câncer, várias são as substâncias originadas de plantas que se encontram em fase de testes pré-clínicos e clínicos. Butler (2008) listou uma série de substâncias que estão em testes clínicos, entre elas os derivados das isoflavonas: daidzeina e genisteína; o composto fenólico resveratrol; a curcumina, a quinona β -lapachona, o diterpeno gossipol, além de substâncias derivadas dos triterpenos: ácido oleanólico e ácido betulínico. Destacam-se também o flavopiridol que foi obtido após o isolamento e síntese do produto natural rohitukina e o combretastatina A-4

fosfato, derivado dos estilbenos combretastatinas, isolados de *Combretum caffrum*, mostrado na Figura 23 (MALHEIROS *et al.*, 2010). Portanto, as plantas são fontes de promissoras substâncias antineoplásicas, apresentando substâncias ativas das mais variadas classes de compostos tais como diterpenos, flavonóides, isoflavonas, estilbenos, lignanas e alcalóides.

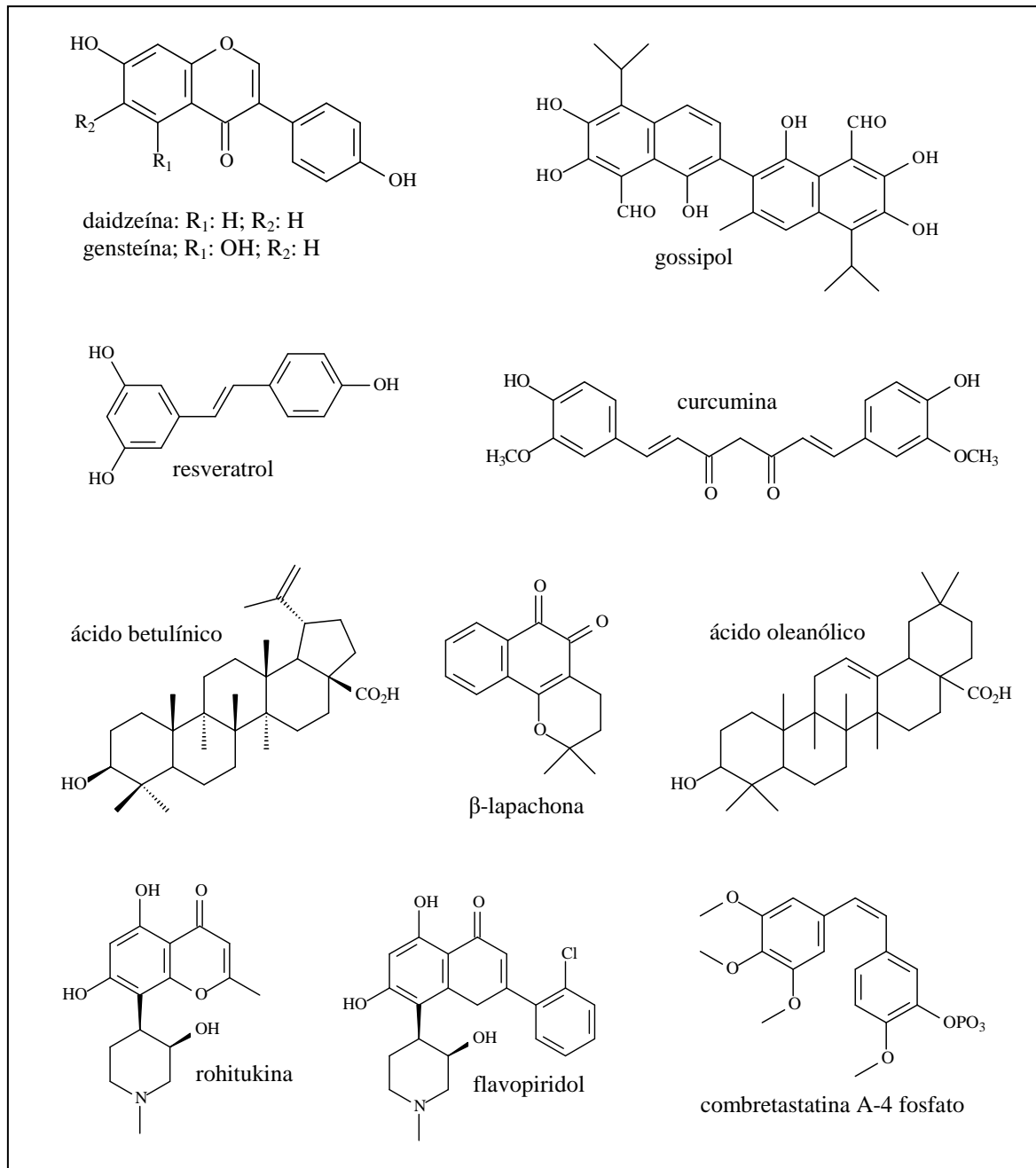


Figura 23. Substâncias derivados de plantas em estudo pré-clínico ou clínico para a terapia do câncer

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar fitoquimicamente e realizar estudos biológicos de extratos das espécies *Eperua duckeana* e *Eperua glabriflora*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a composição química dos extratos apolares.
- Descrever a composição dos óleos essenciais das folhas e talos das espécies estudadas.
- Descrever qualitativamente e quantitativamente a atividade antioxidante dos extratos.
- Avaliar as atividades antibacteriana, antifúngica, antileishmania, anti-trypanosoma cruzi e a citotoxicidade em linhagens de células tumorais dos extratos brutos em ensaios *in vitro*.
- Isolar e identificar por métodos espectrométricos substâncias metabolizadas pelas espécies estudadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

4.1.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

As análises de cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatoplasmas de fase normal de sílica gel 60 com indicador de fluorescência F₂₅₄ da Sorbent Technologies com suporte de alumínio e 200 µm de espessura. Para a revelação das cromatoplasmas foram utilizados reveladores físicos (luz UV-254 nm e 365 nm) e químicos (ver preparo das soluções no item 4.1.1.1).

4.1.1.1. REVELADORES DE CCD

- **Solução de sulfato cérico** (WAGNER & BLADT, 1995). Solução de 1% de sulfato cérico (IV) em ácido sulfúrico a 10 %. A cromatoplasma foi então borrifada e aquecida por alguns minutos. Esse revelador detecta várias classes de substâncias.
- **Solução de vanilina sulfúrica** (WAGNER & BLADT, 1995). Solução (A): 10 % de ácido sulfúrico em etanol. Solução (B): 1% de vanilina em etanol. A cromatoplasma foi então borrifada com uma mistura da solução A e B na proporção 1:1 e aquecida por alguns minutos. Esse revelador é indicado principalmente para detecção de terpenos (coloração lilás/roxa), porém detecta várias classes de substâncias podendo ser usado como revelador universal.
- **Solução de FeCl₃ 1%** (SIMÕES *et al.*, 2007). Solução a 1% de FeCl₃ em etanol. As cromatoplasmas foram borrifadas com a solução e observadas até o aparecimento de manchas marrons sob fundo de coloração amarela (laranja), indicativa de compostos fenólicos.
- **Solução de DPPH[•] 0,3 mol/L** (SOLER-RIVAS *et al.*, 2000). Solução 0,3 mol/L do radical DPPH[•] em metanol. As cromatoplasmas foram imersas por 10 segundos na solução e

observadas até o aparecimento de manchas amarelas sob fundo de coloração púrpura, indicativa de possível atividade antioxidante.

- **Solução de ácido sulfúrico 10%** (WAGNER & BLADT, 1995). Solução 10% de ácido sulfúrico em etanol. A cromatoplaça foi então borrifada e aquecida por alguns minutos. Esse revelador detecta várias classes de substâncias.
- **Solução de cloreto de alumínio 1%** (SIMÕES *et al.*, 2007). Solução 1% de cloreto de alumínio em etanol. A cromatoplaça foi então borrifada e aquecida por alguns minutos e em seguida observada em UV-365nm, a fluorescência indica a possível presença de flavonóides.

4.1.2. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PREPARATIVA

As placas de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) de fase normal foram preparadas usando 20 g de Sílica gel HF254 com 13% de gesso 400 Mesh ASTM e 50 mL de água destilada (para placas de vidro de 20 x 20 cm com 1,5 cm de espessura). As placas foram secas à temperatura ambiente por 24 h e ativada em estufa à 100°C por no mínimo 1h.

A revelação foi realizada, principalmente, por luz ultravioleta (UV-254 e 365 nm). Porém, em alguns casos, a revelação foi realizada pela aplicação de soluções reveladoras (as mesmas utilizadas em CCD) seguidas de aquecimento. As revelações realizadas desta forma requerem um pouco mais de cuidado que na revelação com a luz UV, pois há risco de degradar a amostra. A revelação foi realizada da seguinte forma: primeiramente aplicou-se a amostra em três faixas distintas, duas faixas pequenas nas laterais e uma maior no centro da placa, deve-se deixar uma distância razoável (cerca de 2 cm) entre as faixas para que o revelador não ultrapasse para a amostra do centro (Figura 24- Passo 1). Após eluição da placa e evaporação do solvente, aplicou-se a solução reveladora nas faixas laterais da placa (Figura

24- Passo 2), caso o revelador necessite de aquecimento, a placa deve ser aquecida apenas nas laterais, onde o revelador foi aplicado. A área central correspondente às manchas reveladas deve ser retirada com auxílio de uma espátula (Figura 24- Passo 3) e em seguida solubilizada em solvente volátil e posteriormente filtrada. As etapas principais estão ilustradas na Figura 24.

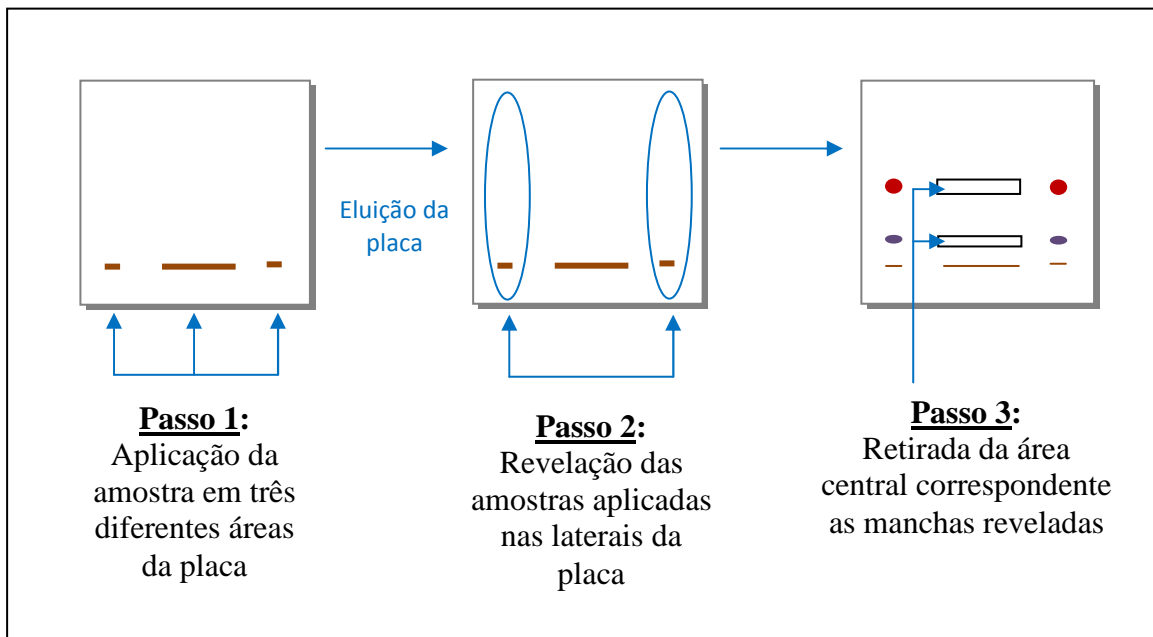


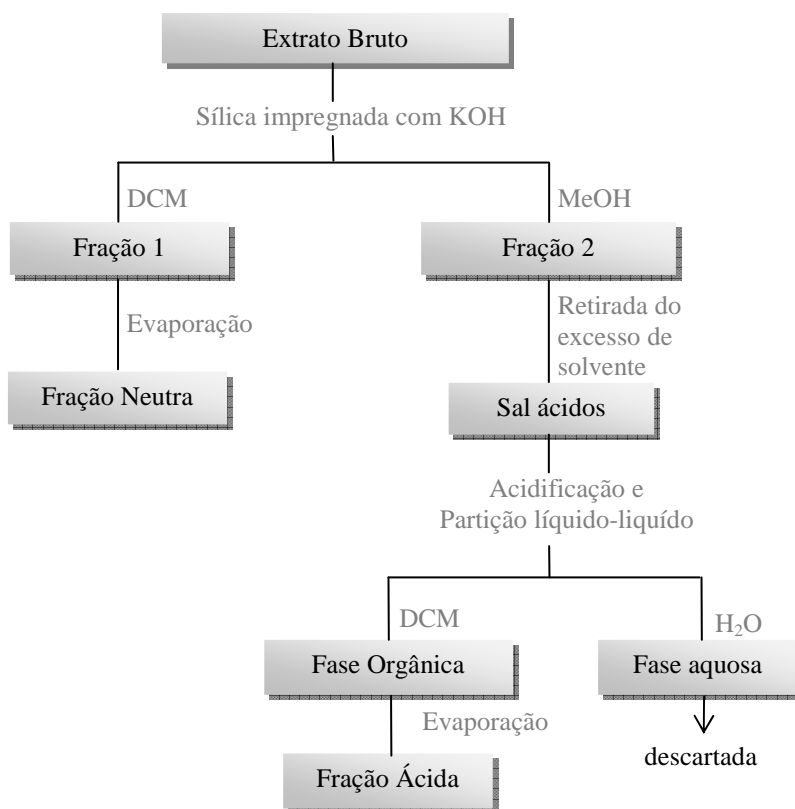
Figura 24. Etapas da revelação de placa de cromatografia em camada delgada preparativa

4.1.3. CROMATOGRAFIA EM COLUNA ABERTA E SOB PRESSÃO

Nos fracionamentos cromatográficos em coluna aberta foram utilizadas colunas de vidro com diâmetro interno e altura variando de acordo com a quantidade do material utilizado. As fases móveis foram escolhidas por CCD, usou-se eluentes na forma de gradientes, aumentando gradativamente a polaridade dos solventes, ou na forma isocrática. As frações foram coletadas em Erlenmeyers ou em frascos de coletas dependendo do objetivo do fracionamento.

Foram utilizados três diferentes tipos de sílica: sílica gel 60 (0,063- 0,20 mm), sílica gel (0,063- 0,20 mm) impregnada com KOH (coluna de troca iônica) e sílica *flash* (0,040- 0,063 mm).

Na coluna de troca-iônica, a impregnação da sílica foi realizada pela adição de solução de KOH 10% até saturação da sílica, em seguida a sílica foi levada à estufa a 100 °C por 24h (PINTO *et al.*, 2000). Macerou-se a sílica em pistilo para redução dos grânulos. Nesse tipo de coluna são utilizados apenas dois eluentes: diclorometano (DCM), correspondente a fração neutra; e metanol (MeOH), correspondente a fração ácida. Porém, em alguns trabalhos utiliza-se hexano antes da adição do DCM (BRAGA *et al.*, 1998; BIAVATTI *et al.*, 2006). A fração coletada em MeOH foi submetida a tratamento ácido-base em funil de separação. Foi adicionada à fração, água deionizada e o meio foi acidulado com solução de HCl (1M) até pH 3. Adicionou-se 30 mL de DCM para extração da parte orgânica, por 5 vezes. A parte orgânica foi submetida à evaporação em evaporador rotatório sob pressão reduzida. A fração aquosa foi descartada. O Esquema 1 mostra resumidamente essas etapas.



Esquema 1. Esquema geral da obtenção das frações neutra e ácida dos extratos obtidos em hexano das cascas

Na cromatografia em coluna de sílica *flash* utiliza-se sílica 0,040-0,063 mm. As partículas extremamente pequenas impedem a passagem do solvente, sendo necessário o uso de pressão no topo da coluna para ocorrer o fluxo da fase móvel pela fase estacionária. A pressão pode ser fornecida ao sistema por um compressor. Esse processo requer a utilização de uma válvula que controle a pressão do sistema. Na Figura 25 está ilustrado o sistema de cromatografia em coluna de sílica *flash*.

O eluente utilizado nesse tipo de processo é escolhido pela melhor separação das amostras em CCD, o qual requer variação do fator de retenção (ΔR_f) maior que 0,1 para que a separação seja eficiente. O empacotamento é realizado à seco, a sílica é colocada na coluna até a altura de aproximadamente 16 cm e então o solvente é adicionado e a pressão aplicada para o empacotamento acontecer.

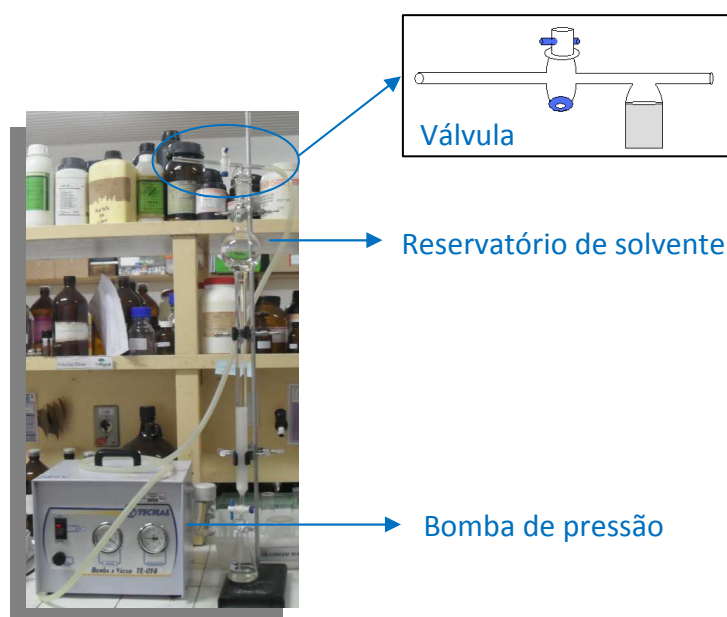


Figura 25. Sistema de cromatografia em coluna utilizando sílica *flash*

Há uma relação entre a quantidade de amostra e os seguintes fatores: variação do R_f , diâmetro da coluna, volume da fração coletada e o volume total do eluente, para que a separação aconteça com a mesma eficiência da observada na CCD. Todas essas relações estão expostas na Tabela 5, retirada de Still *et al.*, 1978.

Tabela 5. Relação entre diâmetro da coluna e quantidade da amostra na cromatografia em coluna com sílica *flash* (STILL *et al.*, 1978)

Diâmetro da coluna (cm)	Volume do eluente (mL)	Quantidade de amostra (mg)		Volume da fração (mL)
		$\Delta R_f \geq 0,2$	$\Delta R_f \geq 0,1$	
1	100	100	40	5
2	200	400	160	10
3	400	900	360	20
4	600	1600	600	30
5	1000	2500	1000	50

4.1.4. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (CG)

Para as análises utilizou-se cromatógrafo da Shimadzu[®] modelo CG 2010 com detector de ionização de chama (CG-DIC) usando coluna CP-Sil 5 CB (100% dimetilpolissiloxano) da Varian[©], com medidas de 15 m x 0,25 mm x 0,25 mm e Cromatógrafo modelo QP-2010 da Shimadzu[®] com detector por espectrometria de massas (CG-EM) e coluna VF-1MS da Varian[©], com medidas de 15 m x 0,25 mm x 0,25 mm, ambos do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). As condições de análise serão descritas na Seção 4.7.1.1 (pág. 78) para os óleos essenciais e na Seção 4.9 (pág. 82) para os extratos apolares das cascas.

4.1.4.1. DERIVATIZAÇÃO DE AMOSTRAS PARA INJEÇÃO EM CROMATÓGRAFO EM FASE GASOSA

A metodologia empregada nas esterificações foi adaptada do trabalho de Hu *et al.*, 2011. Foram pesados 1 mg das amostras e solubilizadas em 30 µL de acetona/metanol (90:10, v/v) e 20 µL da solução de TMS (2M em hexano). Antes da injeção em cromatógrafo, as amostras foram incubadas por 30 minutos para que a reação se completasse e só então foram adicionados 0,5 mL de diclorometano.

4.1.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foram realizadas no Laboratório da Central Analítica (UFAM) sob a responsabilidade do Prof. Afonso Duarte. Utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) do modelo Surveyor (Thermo

Electron Corporation), dotado de detector de arranjo de fotodiodo acoplado a espectrômetro de massas TSQ- Quantum Access. Os espectros de UV foram obtidos no modo de varredura (200 a 600 nm). Foi utilizada coluna de fase reversa C18, Microsorb MV (4,6 x 250 mm, 5 μ m) da Varian.

Preparou-se uma solução da amostra a ser analisada em MeOH HPLC na concentração de 1 mg/mL. Injetou-se o volume de 10 μ L em um fluxo de 1 mL/min. Utilizou-se dois gradientes diferentes para eluição das frações.

O gradiente 1 foi programado da seguinte forma: iniciou-se com 30 % de MeOH e 70% de H₂O, aumentando gradativamente para 100% de MeOH em 30 min.

O gradiente 2 foi programado da seguinte forma: iniciou-se com 30% de MeOH e 70% de H₂O, aumentou-se gradativamente para 80% de MeOH e 20% de água em 35 min, seguida de isocrática por 2 minutos, seguido de aumento para 100% MeOH em 3 minutos, manteve-se esse eluente por 10 min, em seguida condicionou-se a coluna para MeOH/ H₂O 70:30 (V:V). O tempo total da corrida foi de 60 minutos.

4.2. MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS

4.2.1. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro da Perkin Elmer modelo Spectrum 2000 da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas e em aparelho Bomem modelo M FTLA-2000-104 do Centro de Biotecnologia da Amazônia, ambos com Transformada de Fourier. As amostras foram analisadas em pastilhas comprimidas de brometo de potássio (KBr). A aquisição dos espectros ocorreu na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.2.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C - ^1H desacoplado), DEPT, HSQC e HMBC foram registrados em espectrômetro da Varian modelo INOVA de 11,7 T, do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), operando a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C . As amostras foram solubilizadas em 600 μL de solvente deuterado: clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) ou DMSO- d_6 . Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) em relação ao padrão interno TMS ($\delta = 0,00$) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete) e m (multiplete).

4.2.3. ESPECTROSCOPIA DE MASSAS POR ELETRONSPRAY

Os espectros de massas foram obtidos no Laboratório da Central Analítica (UFAM) sob a responsabilidade do Prof. Afonso Duarte. Utilizou-se espectrômetro de massas LCQ-Fleet (marca Thermo Electron) do tipo íon trap, operando com fonte de electrospray. As amostras foram solubilizadas em MeOH HPLC (1 mg/mL) e injetadas diretamente no aparelho através de uma seringa no fluxo de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$, a detecção foi realizada no modo negativo.

4.3. SOLVENTES

Todos os solventes utilizados neste trabalho foram previamente purificados por destilação fracionada. Os solventes de média e baixa polaridade foram secos com Na₂SO₄ anidro. Os solventes utilizados nos ensaios biológicos foram de grau HPLC.

4.4. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS DO LABORATÓRIO

- Balança analítica: Marca Tecnal
- Lâmpada de Ultravioleta -254nm e 365nm: Marca Solab
- Moinho de Facas: sem identificação da marca (UFAM- Bloco B)
- Evaporador Rotatório: Marca Fisatom
- Banho de ultrasson: Marca Unique
- Leitor de microplaca: Marca Thermo plate
- Espectrofotômetro de UV-Vis: Marca Shimadzu
- Fitas para determinação de pH (1-14) da Merck
- Placa aquecedora: Marca Tecnal
- Estufa: sem identificação da marca
- Manta aquecedora: Marca Quimis
- Bomba de vácuo portátil: Marca Tecnal, modelo TE-058

4.5. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As coletas das duas espécies de *Eperua* foram realizadas na Reserva Floresta Ducke, localizada na Rodovia AM – 010 (Manaus – Itacoatiara), Km 26 e guiadas pelo mateiro Sr.

Everaldo, funcionário do INPA. A primeira coleta ocorreu em março de 2008 (período de chuva) e a segunda coleta em outubro de 2009 (período de seca). Foi coletado um espécime de *E. duckeana* e dois espécimes de *E. glabriflora*.

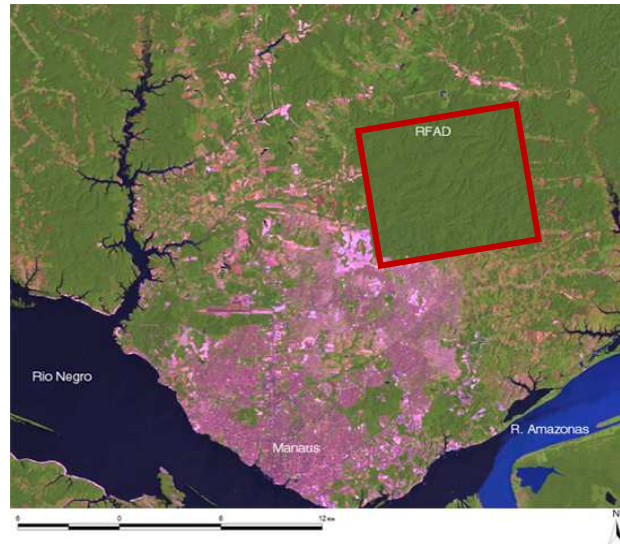


Figura 26. Localização da Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD)

As duas espécies fazem parte do Projeto da Reserva Ducke, portanto estão catalogadas e identificadas e as suas exsicatas depositadas no Herbário do INPA sob o número de registro N° 230699 e N° 15031 para *E. duckeana* e *E. glabriflora*, respectivamente (Figura 27).

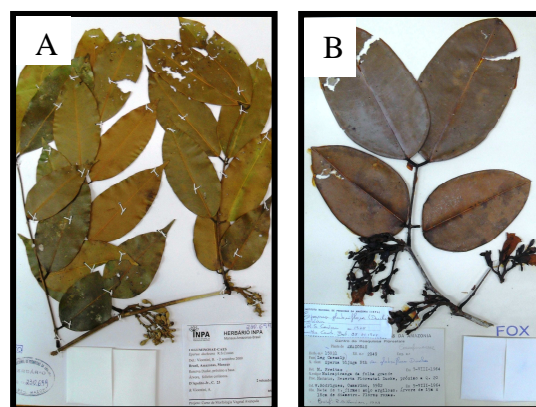


Figura 27. Exsicatas depositadas no Herbário do INPA. A) *E. duckeana* (N°230699) e B) *E. glabriflora* (N°15031)

4.6. TRATAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal da primeira coleta foi separado em folhas e cascas do caule. Na segunda coleta incluíram-se os talos (raquis foliares) para extração dos óleos essenciais, pois na literatura há relatos de que há diferenciação dos constituintes produzidos por diferentes partes das plantas (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

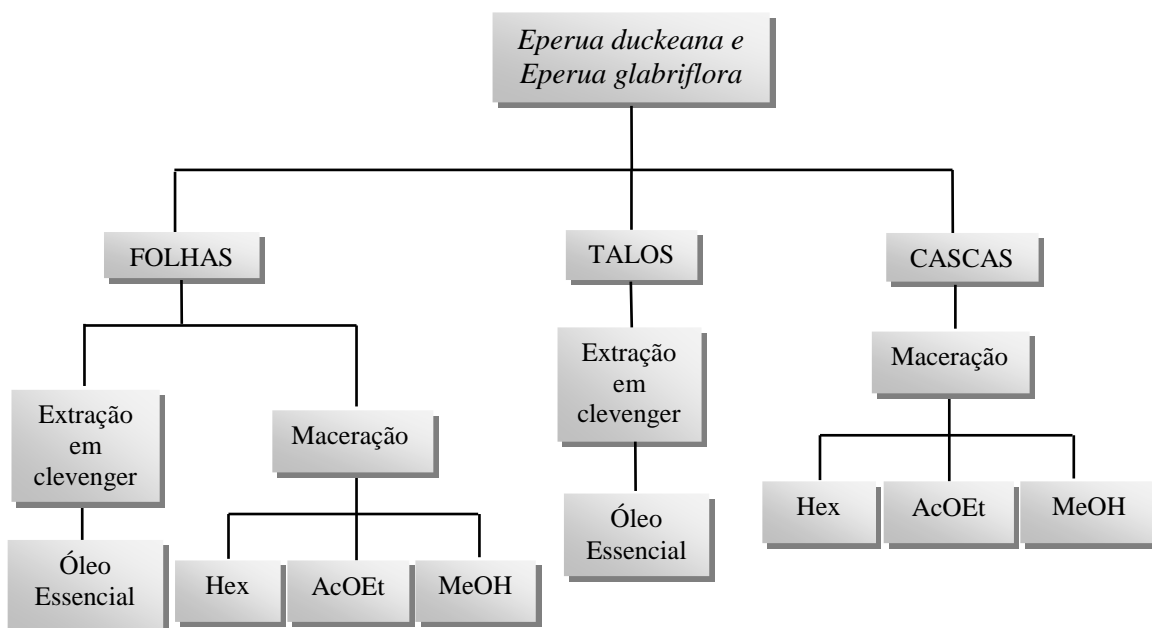
As folhas foram limpas com um pano úmido e as cascas e os talos foram limpos com escova e faca para se retirar partes não pertencentes à planta, então o material foi reduzido a pedaços menores (Figura 28). Após limpeza foram colocados sobre jornais à temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, foram triturados em moinho de quatro facas da UFAM.



Figura 28. Separação e etapas do tratamento do material vegetal

4.7. EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Foram obtidos óleos essenciais das folhas e talos, e extratos das cascas do caule e folhas das duas espécies de *Eperua*. O Esquema 2 resume as extrações realizadas com cada parte da planta. As extrações dos óleos essenciais e obtenção dos extratos brutos serão descritos com mais detalhes a seguir.



Esquema 2. Esquema geral das extrações realizadas a partir do material vegetal seco

4.7.1. EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As folhas e talos foram triturados em liquidificador e submetidos à hidrodestilação utilizando extrator de vidro tipo Clevenger modificado durante 4h. Os óleos obtidos foram tratados com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para eliminação de água. O rendimento do óleo essencial foi calculado com base no peso do material seco e triturado.

4.7.1.1. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A análise por cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de ionização de chama (CG-DIC) foi conduzida sob as seguintes condições: o gás hélio (He) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 2,0 mL/min, a injeção foi realizada em modo split 1:10, a

temperatura do injetor em 250 °C e do detector em 290 °C. A programação do forno foi 60 °C a 240 °C a 3 °C/min.

A análise qualitativa realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) foi realizada sob as mesmas condições utilizadas para CG-DIC. Para a detecção foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70 eV.

4.7.1.2. IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os compostos foram identificados por comparação dos espectros de massas com os da espectroteca Wiley 7.0 e pelo cálculo dos Índices de Retenção (IR) e por comparação com os Índices disponíveis na literatura (ADAMS, 2007).

Para o cálculo do IR usou-se a equação proposta por Kovats e modificada posteriormente por Van den Dool e Kratz em 1963. Kovats propôs que os logaritmos dos tempos de retenção de uma série homóloga obtidos para uma determinada coluna a uma determinada temperatura são linearmente proporcionais ao número de carbonos. Posteriormente, Van den Dool e Kratz notaram que quando uma programação de temperatura é feita, o índice aritmético é mais apropriado que o índice logarítmico. Então, o índice de retenção para uma determinada substância pode ser expresso pela Equação da Figura 29.

$$\mathbf{IR = 100 \times N + 100 \times \frac{[T_r(\text{amostra}) - T_r(N)]}{[T_r(N+1) - T_r(N)]}} \quad \text{(Equação 1)}$$

Figura 29. Fórmula para o cálculo do Índice de Retenção. Onde IR é o Índice de retenção; N: hidrocarboneto (anterior ao pico analisado); Tr: tempo de retenção; N+1: hidrocarboneto (posterior ao pico analisado)

Para utilizar a Equação 1 na identificação dos constituintes do óleo essencial é necessário injetar a amostra e as substâncias de referência (série homóloga de *n*-alcanos- C8 a C20) nas mesmas condições de análise e depois comparar o tempo de retenção do hidrocarboneto anterior ao pico da substância analisada e o posterior. Outro aspecto importante é a programação de temperatura, pois para seguir os requisitos da Equação 1, não pode-se usar isotermas, a taxa de aquecimento não deve variar, pois o aumento de temperatura deve ser gradativo e linear.

4.7.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Após limpeza, secagem e trituração, as folhas e as cascas foram submetidas à extração exaustiva por maceração, à temperatura ambiente, utilizando solventes em ordem crescente de polaridade: hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH). O excesso de solvente foi removido em evaporador rotatório e os rendimentos foram calculados baseados no peso do material vegetal seco e triturado.

4.7.2.1. NOMENCLATURA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Os códigos dos extratos são iniciados com “E”, seguido do solvente utilizado na extração, hexano: “H”, acetato de etila: “A”, metanol: “M”. Seguido da parte da planta utilizada, cascas: “C” e folhas “F”. E por último, a identificação da espécie utilizada : *E. duckeana* (E.duck) ou *E. glabriflora*: (E.glab).

O código das frações inicia com “F” seguido da numeração da fração após a reunião. Cada processo cromatográfico em coluna recebe a identificação de “C” ou “A”. A letra “C” é usada para os fracionamentos em coluna cromatográfica de todos os extratos ou frações,

exceto para fracionamentos das frações ácidas dos extratos em hexano das cascas que são identificados como a inicial “A”. Seguido de um número que indica o fracionamento, para cada extrato recomeça a numeração.

O processo cromatográfico de placa preparativa recebe a identificação inicial de “PP” seguida de uma numeração. Para cada extrato recomeça a numeração.

4.8. ANÁLISE COMPARATIVA DOS EXTRATOS BRUTOS POR CCD

Para comparação dos extratos brutos das espécies, preparou-se uma solução 5 mg/mL (solventes utilizados conforme a solubilidade) de cada extrato bruto e aplicou-se quantidades iguais dos extratos nas cromatoplas. Os eluentes utilizados e a solubilidade estão citados na Tabela 6. As revelações das cromatoplas foram realizadas em luz ultravioleta (UV) de 254 e 365 nm, soluções de sulfato cérico, vanilina sulfúrica, ácido sulfúrico em etanol 10%, DPPH* 0,3 mg/mL, FeCl₃ 1% e/ou solução de AlCl₃ 1%. Os fatores de retenção (R_f) foram calculados através da razão entre a distância percorrida pelo composto e a distância percorrida pelo sistema de eluente, a partir do ponto de aplicação da amostra.

Tabela 6. Eluentes utilizados na CCD comparativas dos extratos brutos

Extratos	Solubilidade	Eluentes
EHCEduck e EHCEglab	CHCl ₃	Hex/AcOEt 8:2
EACEduck e EACEglab	MeOH	CHCl ₃ /MeOH 4:1
EHFEduck e EHFEglab	CHCl ₃	Hex/Et ₂ O 6:4
EAFEduck e EAFEglab	AcOEt e MeOH	Hex/CHCl ₃ /MeOH 2:3:0,5

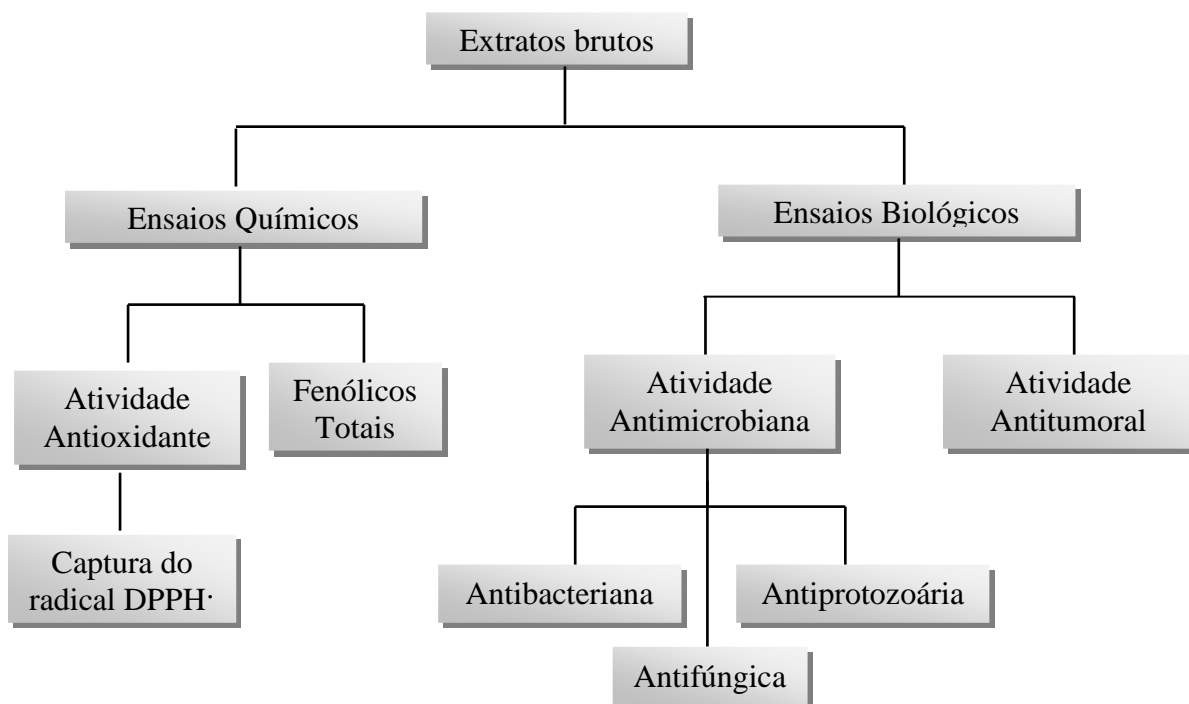
4.9. ANÁLISE DOS EXTRATOS APOLARES DAS CASCAS POR CG-DIC E CG-EM

Uma maneira rápida e eficiente de identificar compostos em extratos apolares ou de média polaridade é realizada através da análise por CG-DIC e CG-EM. Os cromatogramas dos extratos possuem regiões características para determinadas classes de substâncias. A identificação dos compostos conhecidos é realizada através de comparação dos tempos de retenção (t_r), detecção dos íons moleculares e pelos íons resultantes de fragmentações características das classes de produtos naturais presentes nas amostras estudadas (PATITUCCI *et al.*, 1995).

A programação da temperatura do forno utilizada para análise dos extratos hexânicos das cascas foi de 100°C seguida de taxa de 3° C/min até 180° C e nova taxa de 6° C/min aplicada até 240° C, seguido de taxa de 12° C/min aplicada até 290°C, permanecendo em isoterma por 10 min, em um tempo total de 51 min de corrida.

4.10. ENSAIOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

Foram realizados ensaios químicos através da quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante e ensaios biológicos através das varreduras *in vitro* das atividades antimicrobianas e citotoxicidade de linhagens de células tumorais. O esquema 3 ilustra os ensaios químicos e biológicos realizado com os extratos brutos. Os ensaios serão descritos com mais detalhes a seguir.



Esquema 3. Esquema geral dos ensaios químicos e biológicos realizados com os extratos brutos

4.10.1. ENSAIOS QUÍMICOS

Na literatura foram encontrados registros da presença de compostos fenólicos, tais como os flavonóides, para o gênero *Eperua*. Com base nesses dados foram realizados testes qualitativos e quantificação de compostos fenólicos. Além do ensaio indicativo da atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH·.

4.10.1.1. FENÓLICOS TOTAIS

A avaliação de fenólicos totais foi realizada por três processos: (1) ensaio qualitativo de compostos fenólicos em CCD; (2) quantificação dos compostos fenólicos, para os extratos

previamente selecionados no teste qualitativo e (3) teste de Shinoda realizado para indicar a presença de flavonóides, uma classe específica de fenólicos (já descrita no gênero *Eperua*).

4.10.1.1.1. ENSAIO QUALITATIVO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A presença/ausência de compostos fenólicos foi avaliada de acordo com Matos (2001) com modificações para placas de CCD. Foi preparada uma solução na concentração de 1 mg/mL para cada extrato e então 20 µL foi aplicado em uma placa de CCD. Após a evaporação completa do solvente, borrifou-se na placa uma solução de cloreto férrico (FeCl_3) 1%. A detecção de compostos fenólicos é observada pelo aparecimento de manchas escuras de tom azulado sob o fundo amarelo.

Esse teste baseou-se na facilidade de oxidação dos compostos fenólicos, através da adição de um oxidante (FeCl_3) à solução do extrato, o resultado é observado através do escurecimento da solução do extrato. A cor dos produtos de oxidação deve-se ao elevado grau de conjugação (SIMÕES *et al.*, 2007).

4.10.1.1.2. QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

Os extratos avaliados foram os obtidos em AcOEt e MeOH das cascas e folhas das duas espécies. Os extratos obtidos em Hex não foram incluídos porque não apresentaram manchas escuras no ensaio qualitativo.

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado através do reativo de Folin-Ciocalteu, de acordo com Velioglu e colaboradores (1998). A 0,2 mL de cada solução de extrato bruto (concentração 1 mg/mL MeOH) foram adicionados 1,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu 10%, em água deionizada. Após 5 minutos, adicionou-se 1,5 mL da solução de

Na_2CO_3 (60 g/L). O sistema foi agitado e em seguida deixado em repouso por 90 minutos. As absorvâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 725 nm. Como branco utilizou-se uma solução preparada conforme descrito acima, porém, sem a presença da solução de extrato.

Foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 15 a 500 $\mu\text{g/mL}$, diluído em metanol, para comparação. Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de fenólicos totais foi determinado em mg de equivalente de ácido gálico/g de extrato seco (mg EAG/g do extrato seco).

4.10.1.2. TESTE DE SHINODA

O teste de Shinoda foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Matos (2001). Preparou-se uma solução do extrato em EtOH na concentração de 1,0 mg/mL. Em seguida aproximadamente 3 mL da solução foi transferida para tubos de ensaio e adicionou-se alguns centigramas de magnésio granulado e 0,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado. Aguardou-se o término da reação indicada pelo fim da efervescência e observou-se por comparação da mudança na cor da solução do extrato. O resultado positivo é observado através do aparecimento ou intensificação de cor vermelha, indicativo da presença de anel benzopirano (SIMÕES *et al.*, 2007) podendo portanto, extratos apresentarem flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

4.10.1.3. ENSAIOS INDICATIVOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O ensaio de captura do radical livre DPPH[•] foi utilizado como indicativo de atividade antioxidante dos extratos. Os testes foram realizados em duas etapas, a primeira etapa consistiu em uma avaliação qualitativa dos extratos, resultando em uma pré-seleção dos extratos para a segunda etapa que consistiu na quantificação da atividade antioxidante desses extratos.

4.10.1.3.1. CAPTURA DO RADICAL LIVRE DPPH[•]- ENSAIO QUALITATIVO

O ensaio qualitativo foi realizado segundo Soler-rivas e colaboradores (2000). As soluções dos extratos (20 µL), na concentração de 1 mg/mL, foram aplicadas em uma placa de CCD. Após a evaporação completa do solvente, borrifou-se na placa a solução do DPPH[•] na concentração de 0,3 mM. O resultado é avaliado pelo aparecimento de manchas amarela sob o fundo púrpura, indicando atividade do extrato.

4.10.1.3.2. CAPTURA DO RADICAL LIVRE DPPH[•]- ENSAIO QUANTITATIVO

O ensaio indicativo de atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH[•] foi realizado de acordo com Mensor e colaboradores (2001) com algumas modificações para microplaca.

Foram preparadas soluções estoques dos extratos e do padrão (1 mg/mL) em metanol grau HPLC e realizadas diluições sucessivas na própria microplaca. Então a cada poço,

contendo 250 μL da solução metanólica do extrato em diferentes concentrações, foram adicionados 100 μL da solução de DPPH $^{\bullet}$ a 0,3 mM. As microplacas foram mantidas ao abrigo da luz durante 30 minutos e após o término do período de incubação as absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 517 nm. Além do teste com a amostra foi realizado um branco (250 μL da solução da amostra + 100 μL de MeOH) e um controle (100 μL da solução de DPPH + 250 μL de MeOH). Todos os testes das amostras foram realizados em triplicatas e o padrão utilizado para a construção da curva de calibração foi a quercetina.

Os valores das absorvâncias foram convertidos em porcentagem de capacidade de seqüestro (%CS) usando a equação da Figura 30 (MENSOR *et al.*, 2001; SOUSA *et al.*, 2007; VICENTINO *et al.*, 2007):

$$\%CS = 100 - \left\{ \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right\} \quad \text{(Equação 2)}$$

Figura 30. Fórmula para o cálculo da porcentagem de inibição de atividade antioxidante (%CS). Onde $Abs_{amostra}$ é a absorvância da amostra (extrato ou padrão); Abs_{branco} é a absorvância do branco e $Abs_{controle}$ é a absorvância do controle

Os valores de CI_{50} (concentração necessária para se obter 50% do efeito antioxidante máximo estimada de 100%) foram calculados por regressão linear, onde a abscissa representa a concentração do extrato em teste e a ordenada, a média de porcentagem da capacidade de seqüestro das triplicatas. Quanto maior o consumo de DPPH $^{\bullet}$ por uma amostra, menor será o valor do CI_{50} e maior a sua atividade antioxidante.

4.10.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.10.2.1. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios farmacológicos de atividade antifúngica e antibacteriana (método de diluição de caldo) foram realizados no Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade Estadual de Maringá - UEM, Departamento de Análises Clínicas, sob coordenação do Prof. Dr. Celso V. Nakamura.

Os ensaios de atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Fundação Oswaldo Cruz Amazônia (FIOCRUZ), no Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane sob a coordenação da Prof.^a Patrícia Orlandi.

4.10.2.1.1. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA- MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR (DISCO)

Os ensaios de atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar (disco), foram realizados de acordo com o método recomendado pelo *National Commitee for Clinical Laboratory Standardss* (NCCLS, 2000) com algumas modificações. Os extratos foram testados frente às espécies de bactérias citadas na Tabela 7.

Tabela 7. Bactérias gram (+) e (-) utilizadas no ensaio de atividade bacteriana

Gram (+)	Gram (-)
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Bacillus liqui (isolado clínico)</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Salmonella choleaesuis</i>
<i>Staphylococcus aureus sensível</i>	<i>Shiguella flexneri</i>
<i>Staphylococcus aureus resistente</i>	

As bactérias foram previamente cultivadas em tubo de ensaio contendo meio de cultura *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) por 24 h a 37 °C. Após o período de incubação, a cultura bacteriana foi diluída em BHI para atingir a equivalência de 0,5 segundo a escala de McFarland (10^8 unidades formadoras de colônia [UFC]/mL).

As suspensões bacterianas (3 mL) foram inoculadas em placas de petri contendo meio Muller Hinton. Em seguida, os discos de papéis estéreis (6 mm) impregnados com os extratos, óleos essenciais, o controle positivo e negativo foram depositados nos meios contendo o inóculo e incubados em estufa à 37°C (Figura 31). Após 24h, as placas foram inspecionadas quanto à presença de zonas de inibição de crescimento. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

A preparação do disco com o extrato foi realizado com a adição de 30 µL de extrato na concentração de 80 mg/mL (ou seja, 2400 µg de extrato/disco). Os discos foram transferidos para o ágar na placa apenas após evaporação completa do solvente. Para os óleos essenciais foram utilizados 5 µL do óleo puro. O controle positivo (antibiótico) utilizado para as bactérias gram (+) foi a levofloxacina (Sensifar®) e para as bactérias gram (-) a norfloxacina (DME®). O controle negativo consiste em 30 µL do solvente utilizado para solubilizar a amostra (hex, AcOEt e MeOH).



Figura 31. Etapas do Ensaio de atividade antibacteriana: (A) Preparação do meio de cultura; (B) Inoculação das bactérias; (C) Aplicação dos discos no meio de cultura.

4.10.2.1.2. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA- MÉTODO DE DILUIÇÃO EM CALDO

Os ensaios de atividade antibacteriana pelo método de diluição em caldo foram realizados de acordo com o método recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005a). A atividade antibacteriana dos extratos foi testada para as seguintes espécies de bactérias: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

As bactérias foram previamente cultivadas em tubo de ensaio contendo meio de cultura líquido Müller-Hinton (MH) por 24 h a 37°C. Após o período de incubação, a cultura bacteriana foi diluída em solução salina 0,9% para atingir a equivalência de $1,5 \times 10^8$ células/mL, segundo a escala de McFarland, e então uma nova diluição de 1:10 foi feita em meio de cultura. Desta última diluição bacteriana, 5 μ L foi colocados em cada poço da placa de 96 poços, já contendo 100 μ L de meio de cultura MH juntamente com diferentes concentrações da droga a ser testada (concentração máxima de 1000 μ g/mL). A placa foi então incubada por 24 h a 37°C. Os poços onde a droga inibiu o crescimento bacteriano (CIM) foram plaqueados em meio sólido ágar MH para determinação de atividade bactericida ou bacteriostática após mais 24 h de incubação. Após o período de incubação, a presença de

colônias indicará uma concentração bacteriostática e a ausência de colônias indicará uma concentração bactericida.

4.10.2.2. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados de acordo com os métodos recomendados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005b,c). A atividade antifúngica dos extratos foi testada para as seguintes espécies de fungos leveduriformes: *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

As leveduras foram previamente cultivadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura líquido Sabouraud por 24 h a 37°C. Após o período de incubação, a cultura foi diluída em solução salina 0,9% para atingir a equivalência de $1,5 \times 10^8$ células/mL, segundo a escala de McFarland, e então uma nova diluição de 1:100 será feita em meio de cultura. Desta última diluição, 5 µL foram colocados em cada poço da placa de 96 poços, já contendo 100 µL de meio de cultura juntamente com diferentes concentrações da droga a ser testada (concentração máxima de 1000 µg/mL). A placa foi então incubada por 48 h a 37°C. Os poços onde a droga inibiu o crescimento das leveduras (CIM) foram plaqueados em meio sólido ágar Sabouraud para determinação de atividade fungicida ou fungistática após mais 48 h de incubação. Após o período de incubação, a presença de colônias indicará uma concentração fungistática e a ausência de colônias indicará uma concentração fungicida.

4.10.2.3. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA

A atividade antiprotozoária foi determinada para dois diferentes tipos de protozoários parasitas: *Leishmania amazonensis* (agente etiológico da Leishmaniose) e *Trypanosoma cruzi*,

(causador da Doença de Chagas). Os ensaios farmacológicos de atividade antileishmania e anti-trypanosoma cruzi foram realizados no Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade Estadual de Maringá - UEM, Departamento de Análises Clínicas, sob coordenação do Prof. Dr. Celso V. Nakamura.

4.10.2.3.1. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

O método utilizado foi a contagem direta dos parasitas em câmara hemocinética (neubauer) conforme descrito em Luize e colaboradores (2005).

As formas promastigotas foram previamente cultivadas em garrafas plásticas contendo meio de cultura Warren suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 48 h a 25°C. Após esse período, em uma placa de 24 poços, foi realizada a inoculação de 1×10^6 parasitas/mL em cada poço, juntamente com meio de cultura e 10% de SFB, adicionado a várias concentrações da droga a ser testada na concentração máxima de 500 µg/mL, sendo 1 mL o volume final de cada poço. A placa foi incubada por 72 h a 25°C e ao final do período foi realizada a contagem dos parasitas em câmara de Neubauer, em microscópio óptico. O resultado foi representado pela concentração que inibe o crescimento do parasita em 50%.

4.10.2.3.2. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTITRYPANOSOMA CRUZI

O método utilizado foi da contagem direta dos parasitas em câmara hemocinética (neubauer) conforme descrito em Luize e colaboradores (2005).

As formas epimastigotas foram previamente cultivadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura LIT (abreviação de “liver infusion tryptose”) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 96 h a 28°C. Após esse período, em uma placa de 24 poços, foi

realizada a inoculação de 1×10^6 parasitas/mL em cada poço, juntamente com meio de cultura e 10% de SFB, adicionado a várias concentrações das drogas a serem testadas na concentração máxima de 500 $\mu\text{g/mL}$, sendo 1 mL o volume final de cada poço. A placa foi incubada por 96 h a 28°C e ao final do período foi realizada a contagem dos parasitas em câmara de Neubauer, em microscópio óptico. O resultado foi representado pela concentração que inibe o crescimento do parasita em 50%.

4.10.2.4. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS

Os ensaios de atividade antitumoral foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental (LOExp) da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob coordenação do Prof^ª. Cláudia Pessoa.

Os extratos brutos foram submetidos à ensaio *in vitro* contra três linhagens de células tumorais: células cancerígenas HCT8 (Câncer do Colon), MDA/MB-435 (Câncer de Mama) e SKF-295 (Câncer do Sistema Nervoso Central).

A atividade antitumoral foi avaliada utilizando método de análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazam segundo o método de Mossman *et al.* (1983).

Resumidamente, o ensaio foi realizado da seguinte forma: as células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-8. Em seguida foram adicionadas as amostras na concentração final de 50 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO_2 a 37°C . Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, adicionou-se 150 μL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por

3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 μL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição do crescimento celular (IC%), calculado utilizando o programa *GraphPad Prism*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COLETA DOS MATERIAIS VEGETAIS

As massas dos materiais vegetais da 1° e 2° coleta após secagem e trituração estão listadas na Tabela 8.

Tabela 8. Massas dos materiais vegetais após secagem e trituração

Parte	<i>E. duckena</i>		<i>E. glabriflora</i>	
	1° Coleta	2° Coleta	1° Coleta	2° Coleta
Folhas	223g	937g	406g	1.054g
Talos	-	109g	-	110g
Cascas	442g	883g	120g	362g

Foram realizados extração de óleos essenciais das folhas da 1° e da 2° coleta e talos da 2° coleta. Os extratos das folhas e cascas foram obtidos com o material da 1° coleta. Entretanto, o rendimento do extrato das cascas de *E. glabriflora* foi baixo (Tabela 13) então julgou-se necessário a extração das cascas da 2° coleta. Os rendimentos dos óleos essenciais e extratos estão mostrados na Tabela 9 (pág. 97) e Tabela 13 (pág. 105), respectivamente.

5.2. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Foram extraídos óleos essenciais das folhas (primeira e segunda coleta) e dos talos (somente segunda coleta). As massas dos materiais vegetais utilizados na extração, dos óleos essenciais e dos rendimentos estão listados na Tabela 9.

As extrações dos óleos essenciais das folhas da *E. duckeana* forneceram os rendimentos de 0,40% e 0,64% para a 1° e 2° coleta, respectivamente. A extração do óleo essencial dos talos forneceu rendimento 0,10%. Nos óleos essenciais das folhas da *E.*

glabriflora, obtive-se rendimentos de 0,49% e 0,16% para 1° e 2° coleta, respectivamente, e o rendimento dos talos foi de 0,42%. Portanto, os rendimentos dos óleos apresentaram variação para as diferentes partes da planta e também entre as coletas.

Tabela 9. Rendimento dos óleos essenciais

Espécie	Parte da planta/coleta	Coleta	Massa do material (g)	Massa do óleo (g)	Rendimento (%)
<i>E. duckeana</i>	Folhas	1° coleta	52,52	0,21	0,40
		2° coleta	152,60	0,97	0,64
	Talos	2° coleta	52,01	0,05	0,10
<i>E. glabriflora</i>	Folhas	1° coleta	53,35	0,26	0,49
		2° coleta	151,80	0,24	0,16
	Talos	2° coleta	50,50	0,21	0,42

Os óleos essenciais foram analisados por Cromatografia em Fase Gasosa acoplado a detectores de Ionização de Chama (CG-DIC) e de Espectrometria de Massas (CG-EM) com o objetivo de identificação dos constituintes dos óleos. As ampliações dos cromatogramas estão mostradas nas Figuras 33, 34 e 35.

Optou-se por diminuir a taxa de temperatura usada na análise dos óleos da 1° coleta que foi de 3 °C/min para 1,5 °C/min, na 2° coleta para tentar “abrir” as áreas dos cromatogramas que estavam muito congestionadas e tentar identificar mais compostos, pois alguns picos ficaram muito próximos no cromatograma da primeira coleta. Essa decisão não afeta os valores dos índices de retenção, pois os padrões de hidrocarbonetos foram injetados na mesma programação dos óleos e uma vez que a comparação é realizada com esses padrões, não há problema com a mudança da taxa de variação, com tanto que ela seja constante, conforme a programação utilizada.

Os cromatogramas dos óleos da *E. duckeana* apresentaram perfis semelhantes, variando as quantidades dos constituintes (Figura 33). O óleo essencial das folhas da primeira coleta de *E. duckeana* (OF1Educk) apresentou 42 constituintes. Foi possível a identificação de 81% da composição química percentual. Os constituintes majoritários foram o (*E*)-

cariofileno (29,18%) e o germacreno D (11,87%). O óleo essencial das folhas da 2^o coleta (OF2Educk) apresentou 46 constituintes e 83,31% da composição percentual foi identificada, apresentando o (*E*)-cariofileno (31,79%) e o óxido de cariofileno (25,74%) como os componentes majoritários.

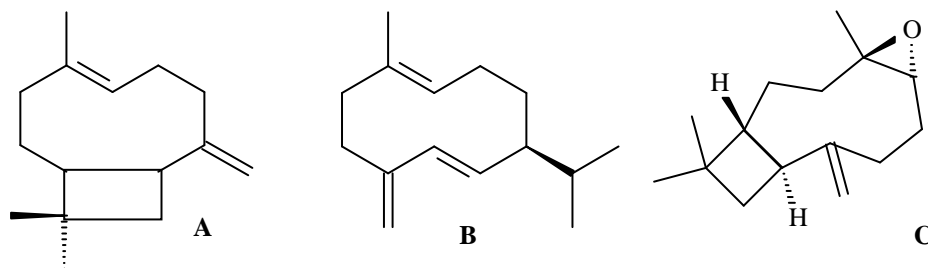


Figura 32. Estruturas dos constituintes majoritários dos óleos essenciais de *E. duckeana*. (A) (*E*)-cariofileno; (B) germacreno D e (C) óxido de cariofileno

A principal diferença da composição química dos óleos das folhas de *E. duckeana* entre as coletas foi a variação na quantidade do germacreno D e do óxido de cariofileno. O germacreno D, um dos constituintes em maior concentração no OF1Educk (11,87%), apresentou apenas a área de 1,07% no OF2Educk. O óxido de cariofileno está presente no OF1Educk na concentração de 7,69% e no OF2Educk é um dos constituintes majoritários, representando 25,74% da composição percentual.

A composição química do óleo essencial dos talos da *E. duckeana* (OTEduck) foi semelhante à composição da folhas, principalmente com o OF1Educk. Foram detectados 41 constituintes, sendo o (*E*)-cariofileno (34,47%) e o germacreno D (25,86%) os constituintes majoritários. Os índices de retenção (IR) e as porcentagens dos constituintes identificados nos óleos essenciais estão listados na Tabela 12.

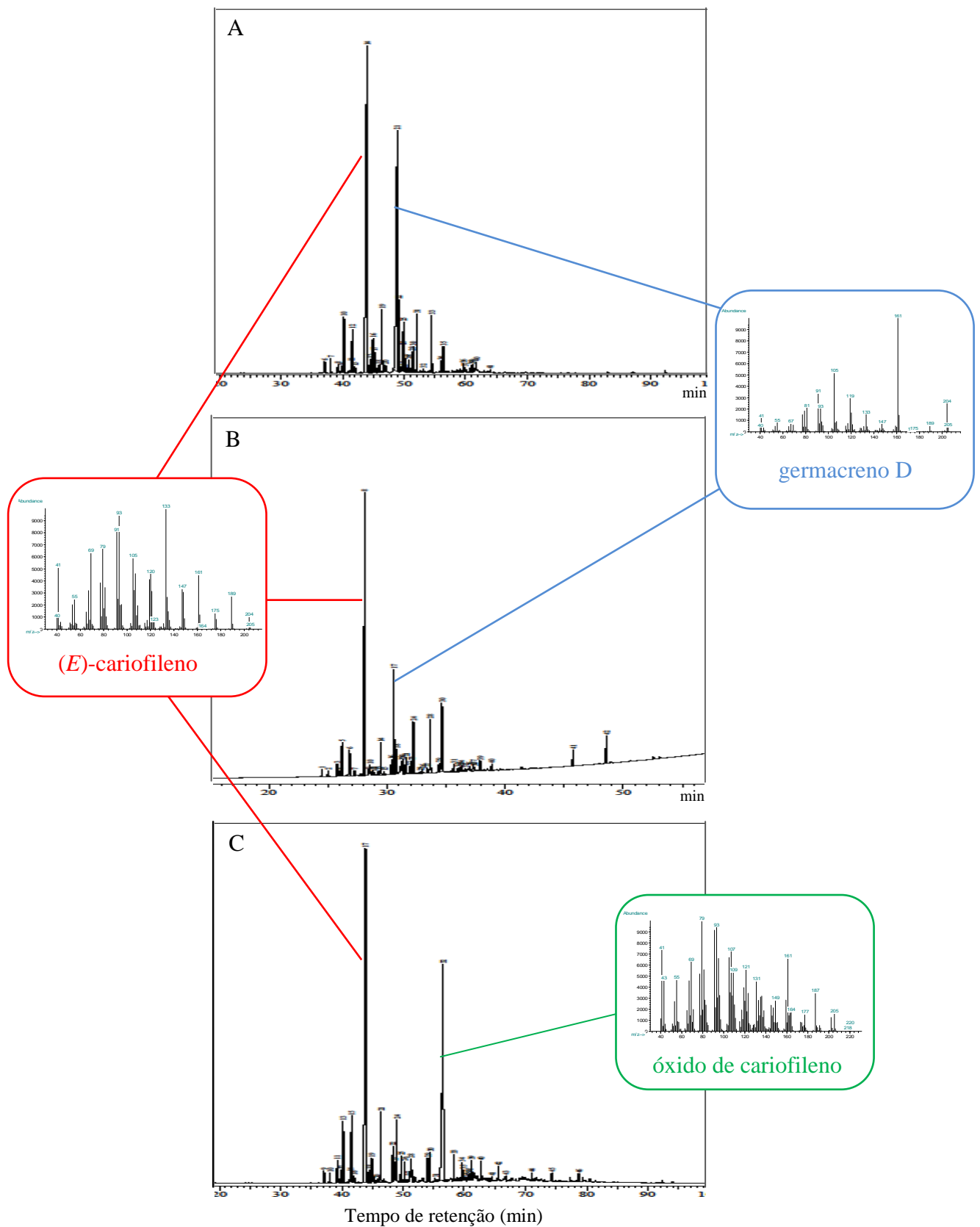


Figura 33. Ampliação dos cromatogramas de íons totais dos óleos essenciais de *E. duckeana*. (A) óleo essencial dos talos da 2^o coleta; (B) óleo das folhas da 1^o coleta e (C) óleo das folhas da 2^o coleta

Os cromatogramas dos óleos essenciais de *E. glabriflora* apresentaram perfis diferentes, principalmente no que diz respeito as coletas. Nos óleos essenciais das folhas (OF2Eglab) e dos talos (OTEglab) da 2ª coleta observam-se perfis semelhantes entre si e diferentes do óleo essencial das folhas da 1ª coleta (OF1Eglab). Essa diferença na composição pode ser justificada pela coleta do material em diferentes espécimes, além de épocas diferentes.

O óleo essencial das folhas da 1ª coleta de *E. glabriflora* (OF1Eglab) apresentou 37 constituintes, sendo que 74,26% da composição química percentual foi identificada. A ampliação do cromatograma de íons totais está exposta na Figura 34. Os constituintes majoritários foram o (*E*)-cariofileno (14,70%) e o germacreno D (11,85%). Portanto, semelhante à composição dos óleos da *E. duckeana*.

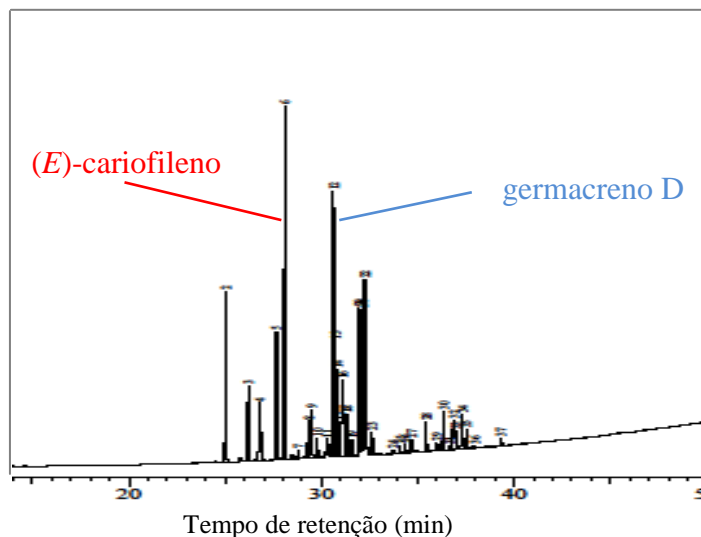


Figura 34. Ampliação do cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas da 1ª coleta de *E. glabriflora*

A composição química dos óleos essenciais das folhas (OF2Eglab) e talos (OTEglab) da 2ª coleta de *E. glabriflora*, mostraram-se semelhantes e vários constituintes apresentaram

os mesmos índices e os mesmos padrões de fragmentação, inclusive os constituintes majoritários. Os cromatogramas podem ser observados na Figura 35.

O OF2Eglab apresentou 46 constituintes e apenas 26,08% da composição química foi identificada. No OTEglab foi detectado 41 constituintes e apenas 26,47% da composição química foi identificada. Os valores de IR calculados e os espectros de massas não foram suficientes para identificar os constituintes majoritários, por isso o baixo valor na identificação dos constituintes.

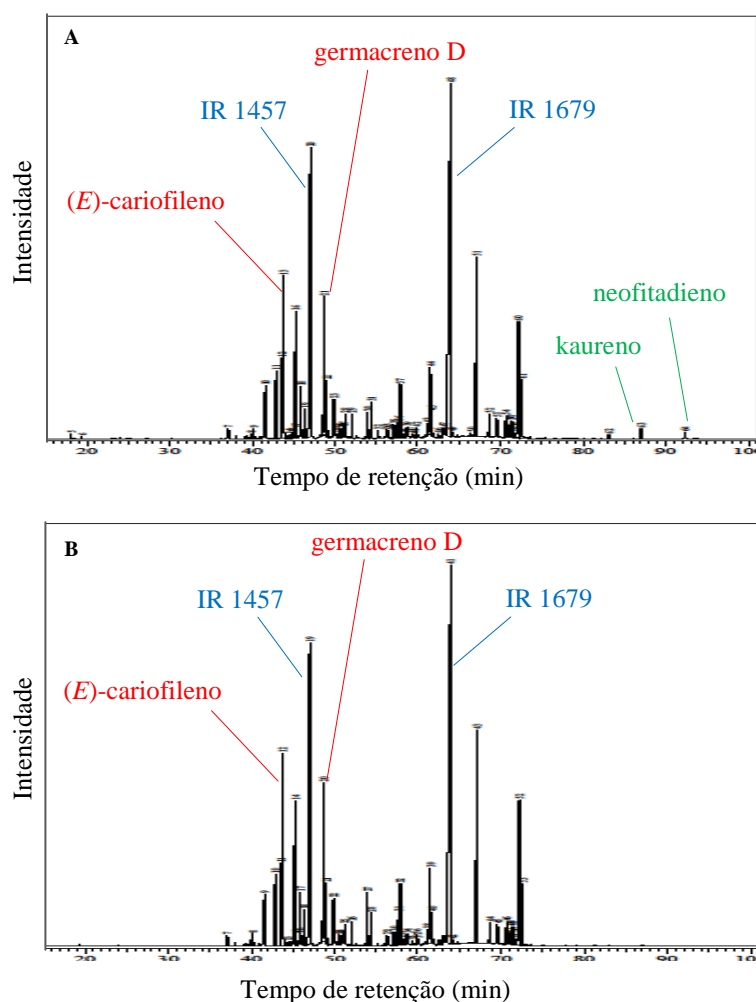


Figura 35. Ampliação dos cromatogramas de íons totais dos óleos essenciais das folhas (A) e talos (B) da *E. glabriflora* coletada em 2009 (2ª coleta)

O constituinte cujo IR foi de 1457 apresentou área de 12,51% nos óleos das folhas e 11,89% nos talos. O espectro de massas desse composto, observado na Tabela 10, revela o seguinte padrão de fragmentação: m/z (intensidade relativa) M^{*+} 204(35), 119(100); 161(55); 93(92); 69(79), 105(50), 41(47), 133(35), 77(35).

O constituinte de IR 1679 possui área de 23,80% nas folhas e 22,98% nos talos. Esse constituinte apresenta fragmentos de razão m/z (intensidade relativa): M^{*+} 204(8), 189(40), 161(52), 121(68), 107(67), 93(100), 81(68), 67(52).

Tabela 10. Espectros de massas dos constituintes majoritários não identificados nos óleos essenciais das folhas (OF2Eglab) e talos (OTEglab) da *E. glabriflora* coletada em 2009 (2ª coleta)

IR	Espectro de massas
1457	<p>Abundância</p> <p>Razão massa/carga (m/z)</p>
1679	<p>Abundância</p> <p>Razão massa/carga (m/z)</p>

O óleo essencial OF2Eglab apresentou três picos de tempo de retenção acima do esperado para sesquiterpenos, na área de diterpenos. Não foi possível calcular o IR porque os padrões utilizados foram de no máximo 20 carbonos, porém esses picos apresentaram espectros de massas com similaridade igual a 99% com substâncias propostas pela biblioteca

Wiley, e foi por comparação com o padrão de fragmentação proposta pela espectroteca que os dois constituintes foram identificados.

A substância de tempo de retenção 87,0 min e com padrão de fragmentação m/z (int. rel.): M^{+} 272(49), 257(100), 229(60), 105(70), 91(90) foi identificada como o diterpeno caureno.

O constituinte de tempo de retenção de 92,3 min foi identificado como sendo o diterpeno linear neofitadieno, baseado na similaridade do padrão de fragmentação: m/z 278 (M^{+}) (11), 123(76), 96(96), pico base de m/z 82 (100), 68(83), 57(76) e 43(76).

Tabela 11. Diterpenos identificados no óleo essencial das folhas da *E. glabriflora* (OF2Eglab) coletada em 2009 (2^o coleta)

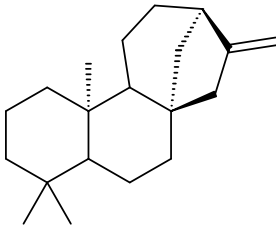
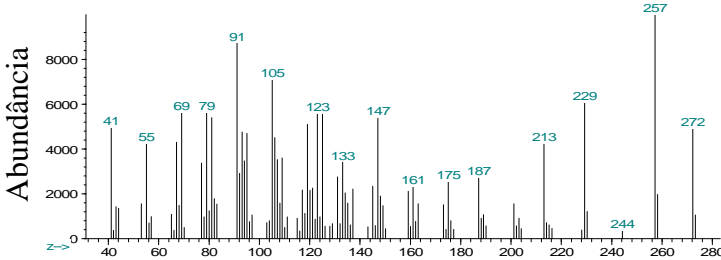
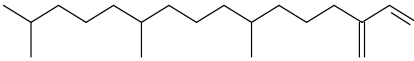
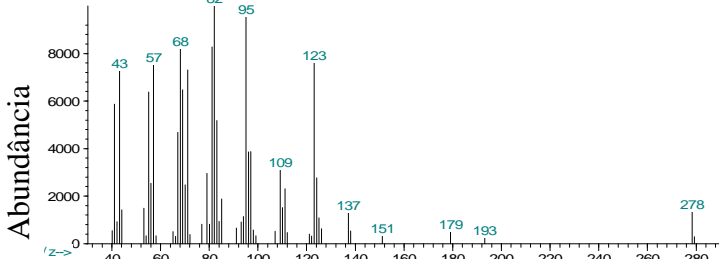
Substância	Espectro de massas
 <p data-bbox="411 1346 501 1373">caureno</p>	 <p data-bbox="884 1350 1214 1384">Razão massa/carga (m/z)</p>
 <p data-bbox="389 1697 528 1724">neofitadieno</p>	 <p data-bbox="884 1736 1214 1769">Razão massa/carga (m/z)</p>

Tabela 12. Composição química percentual do óleo essencial das folhas (1° e 2° coleta) e talos de *E. duckeana* e *E. glabriflora*

IR	Constituinte	Percentual (%)					
		<i>E. duckeana</i>			<i>E. glabriflora</i>		
		F1	F2	T	F1	F2	T
1335	δ -elemeno	0,72	0,66	0,68	-	0,32	0,30
1345	α -cubebeno	0,57	0,52	0,75	6,58	-	-
1369	ciclosativeno	1,30	1,24	0,39	-	-	-
1373	α -ylageno	0,56	0,70	0,41	-	-	-
1374	α -copaeno	3,26	3,60	3,03	2,97	0,29	0,33
1387	β -cubebeno	-	0,47	0,50	3,45	-	-
1389	β -elemeno	2,99	3,96	2,45	-	1,72	1,53
1409	α -gurjuneno	0,51	-	-	5,13	-	-
1410	α -cedreno	-	-	-	-	2,25	2,15
1417	(<i>E</i>)-cariofileno	29,18	31,79	34,47	14,70	6,45	7,08
1431	γ -elemeno	-	1,35	1,86	-	0,14	-
1432	α -bergamoteno	-	-	1,37	-	4,87	5,07
1437	α -guaiano	-	-	-	0,29	0,19	-
1439	aromadendreno	-	-	-	1,55	1,70	1,50
1452	α -humuleno	3,40	4,42	3,89	2,08	0,93	1,03
1457	n.i.	-	-	-	-	12,51	11,89
1458	allooromadendreno	0,46	-	0,41	0,95	-	-
1483	α -amorfenol	1,88	-	-	-	-	-
1484	germacreno D	11,87	1,07	25,86	11,85	5,47	5,81
1489	β -selineno	2,52	3,27	3,58	4,23	1,75	1,68
1492	δ -selineno	-	-	1,30	-	-	-
1498	α -selineno	-	-	-	-	-	-
1496	valenceno	-	1,68	-	5,51	-	-
1500	biciclogermacreno	-	-	-	1,86	-	-
1500	α -muuroloeno	1,26	1,08	0,74	0,75	-	-
1522	δ -cadineno	5,22	-	3,27	6,65	-	-
1537	α -cadineno	-	-	0,15	-	-	-
1559	germacreno B	5,50	1,76	3,22	-	-	-
1567	palustrol	-	-	-	0,46	-	-
1577	espatulenol	0,88	-	-	-	-	-
1582	óxido de cariofileno	7,69	25,74	-	-	-	-
1602	ledol	-	-	-	1,29	-	-
1600	cedrol	-	-	-	1,50	-	-
1615	óxido de humuleno	0,97	-	-	-	-	-
1652	α -cadinol	-	-	-	0,77	-	-
1644	α -muurolol	-	-	-	1,70	-	-
1679	n.i.	-	-	-	-	23,80	22,98
	TOTAL	80,75	83,31	88,32	74,26	26,08	26,47

IR: Índice de retenção; **F1:** folhas da 1° coleta (2008); **F2:** folhas da 2° coleta (2009); **T:** talos (2° coleta); **n.i.:** constituinte não identificado

5.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Os extratos brutos foram obtidos por maceração das cascas e folhas das espécies de *E. duckeana* e *E. glabriflora* com solvente em ordem crescente de polaridade: hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH). Os rendimentos (%) dos extratos estão listados na Tabela 13.

Tabela 13. Massas e rendimentos (%) dos extratos brutos e dos materiais vegetais

Espécie	Parte da planta (g)	Hex		AcOEt		MeOH	
		Extrato (g)	%	Extrato (g)	%	Extrato (g)	%
<i>E. duckeana</i>	Folhas (171)	6,2	3,6	5,5	3,2	2,70	1,6
	Cascas (442)	0,6	0,1	7,2	1,6	44,3	10,0
<i>E. glabriflora</i>	Folhas (353)	6,9	4,0	11,0	6,4	16,1	9,4
	Cascas1 (120)	0,3	0,2	1,5	1,2	9,3	7,8
	Cascas2 (362)	1,0	0,2	5,9	1,6	17,9	5,0

As folhas de *E. glabriflora* forneceram extratos com maiores rendimentos que os obtidos das folhas de *E. duckeana*. O menor rendimento dos extratos das folhas da *E. glabriflora* foi de 4,0% e o maior de 9,4% para os extratos obtidos em Hex e MeOH, respectivamente. Enquanto que para as folhas de *E. duckeana* o menor foi de 1,6% e o maior de 3,6% para os extratos obtidos em MeOH e AcOEt, respectivamente. Com base nos valores dos rendimentos pode-se indicar que as folhas da *E. glabriflora* são constituídas principalmente por compostos de alta polaridade, enquanto que as folhas da *E. duckeana* são constituídas principalmente por compostos de baixa e média polaridade.

O menor e o maior rendimento apresentado pelos extratos das cascas de *E. duckeana* foram 0,6 e 10% para os extratos obtidos em Hex e MeOH, respectivamente e os das cascas da *E. glabriflora* apresentaram rendimentos de 0,3 a 7,8% para Hex e MeOH,

respectivamente. Esses valores indicam que as cascas de ambas as espécies são constituídas principalmente por substâncias de alta polaridade devido os maiores rendimentos terem sido obtidos nos extratos metanólicos.

5.4. ENSAIOS QUÍMICOS

5.4.1. ENSAIO QUALITATIVO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Os extratos foram avaliados quanto à presença de compostos fenólicos através da aplicação dos extratos brutos em cromatoplacas (inicialmente não-eluídas) e seguidos de aplicação da solução de cloreto férrico. A presença de compostos fenólicos é sinalizada pelo aparecimento de manchas escuras no local de aplicação dos extratos. Os solventes utilizados para solubilizar os extratos também foram aplicados na placa de CCD para se verificar a presença de alguma interferência do solvente no resultado.

Observou-se que os extratos hexânicos das folhas (fH) e das cascas (cH) de ambas as espécies não apresentaram manchas escuras, indicando a ausência de compostos fenólicos, por isso não foram realizados quantificação dos compostos fenólicos desses extratos. Todos os outros extratos apresentaram escurecimento nos locais de aplicação (Figura 36). Portanto, foram selecionados para a quantificação de fenólicos totais os extratos das folhas e cascas obtidos em AcOEt e MeOH de ambas espécies.

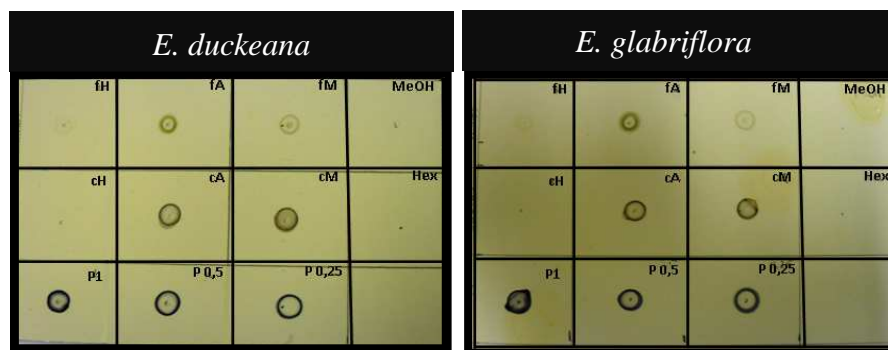


Figura 36. Resultado do ensaio qualitativo da presença de compostos fenólicos em CCD utilizando FeCl_3 . fH: extrato das folhas obtido em hexano; fA: extrato das folhas obtido em AcOEt; fM: extrato das folhas obtido em MeOH; cH: extrato das cascas obtido em hexano; cA: extrato das cascas obtido em acetato de etila; cM: extrato das cascas obtido em metanol; P: padrão (ácido gálico), nas concentrações de 1, 0,5 e 0,25 mg/mL; MeOH e Hex foram os solventes utilizados para solubilizar os extratos

Para os extratos obtidos em AcOEt (cascas e folhas) foi realizado também o procedimento de eluição da cromatoplaça antes da aplicação da solução de FeCl_3 . As cromatoplaças dos extratos obtidos em acetato de etila foram desenvolvidas com o eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1). Observou-se que há principalmente duas substâncias distintas que contribuem para a atividade desses extratos, como mostrado na Figura 37. No extrato da *E. duckeana* (d) é a substância de R_f 0,41 e na *E. glabriflora* (g) é a substância de R_f 0,54 (Figura 37-A).

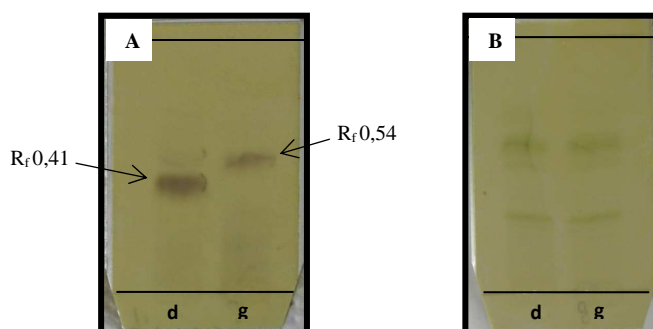


Figura 37. CCD dos extratos obtidos em acetato de etila das cascas (A) e folhas (B) de *E. duckeana* (d) e *E. glabriflora* (g). Eluente: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 4:1 (cascas) e Hex/ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:3:0,5 (folhas). Revelador: solução de FeCl_3

Para os extratos das folhas, observaram-se algumas manchas esverdeadas, porém, essas mesmas manchas eram observadas antes da aplicação do revelador, então não foi possível saber se a coloração esverdeada é proveniente apenas da coloração do extrato ou se

os compostos fenólicos estão “mascarados” por essa coloração (Figura 37-B), por isso, foram realizadas quantificações desses extratos. O procedimento de eluição das cromatoplasas não foi realizado para os extratos obtido em hexano porque os mesmos não apresentaram manchas escuras na cromatoplasa não-eluída, e nem para os extratos obtido em metanol porque não se encontrou um eluente apropriado.

5.4.2. QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

A curva de calibração (Figura 38) foi construída a partir de uma solução de ácido gálico (15 - 500 $\mu\text{g/mL}$) diluída em MeOH de grau HPLC. A equação da curva de calibração foi $y=0,0057x + 0,0042$, onde x é a concentração do ácido gálico e y é a absorvância medida a 750 nm e o coeficiente de correlação (R^2) foi 0,9998.

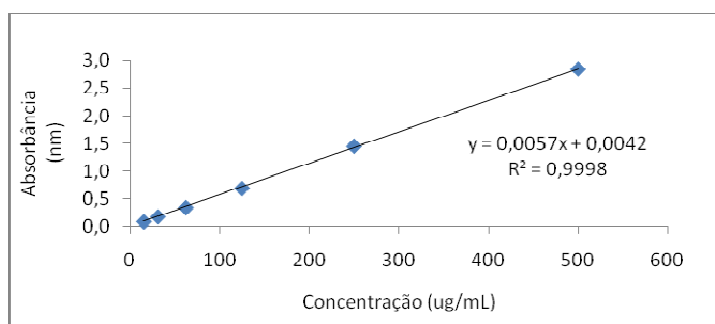


Figura 38. Curva de calibração (padrão) para o teor de fenólicos totais

O resultado da quantificação de fenólicos totais foi expresso em equivalente de ácido gálico por grama do extrato seco (mg EAG/g do extrato), resultados apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Resultados da quantificação de fenólicos totais

Espécie	Parte utilizada	Extratos	Fenólicos totais (mgEAG/g do extrato \pm DP)
<i>Eperua duckeana</i>	Folhas	EAFEduck	32,82 \pm 1,60
		EMFEduck	36,75 \pm 0,53
	Casca	EACEduck	275,54 \pm 9,16
		EMCEduck	287,62 \pm 7,20
<i>Eperua glabriflora</i>	Folhas	EAFEGlab	57,57 \pm 3,10
		EMFEglab	46,54 \pm 1,18
	Casca	EACEglab	242,76 \pm 5,77
		EMCEglab	223,00 \pm 5,47

EAG: Equivalente de Ácido Gálico; DP: Desvio Padrão

O maior conteúdo fenólico foi observado para o extrato obtido em MeOH das cascas de *E. duckeana*, EMCEduck (287,62 \pm 7,20 mg EAG/g de extrato). E o menor conteúdo fenólico para o extrato das folhas obtidos em AcOEt da *E. duckeana*, EAFEduck, (32,82 \pm 1,60 mg EAG/g de extrato). Em geral, os extratos das cascas apresentaram seis vezes mais conteúdo fenólico que os extratos das folhas (Figura 39).

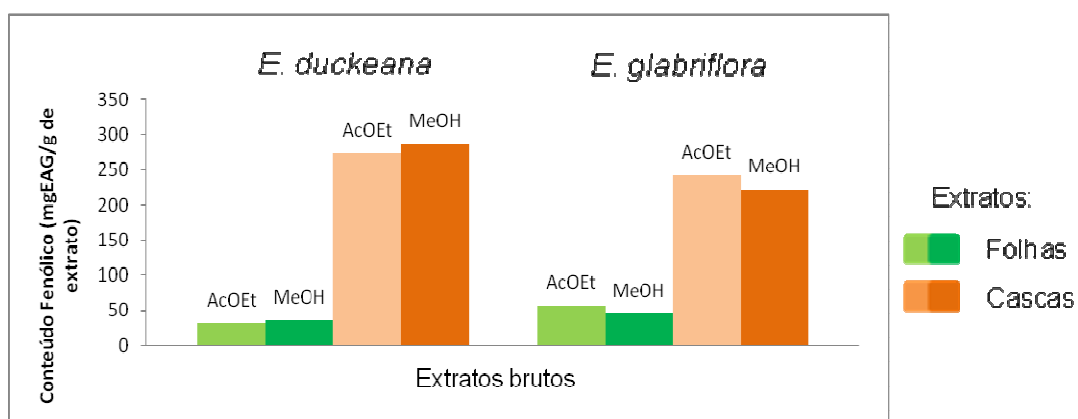


Figura 39. Comparativo dos conteúdos fenólicos dos extratos brutos das folhas e cascas da *E. duckeana* e *E. glabriflora*

5.4.3. TESTE DE SHINODA

O teste de Shinoda indicou que os compostos fenólicos presentes nos extratos obtidos em AcOEt e em MeOH das cascas de ambas as espécies podem ser substâncias contendo um núcleo benzopirona, tais como os flavonóis, flavona, flavanonóis e xantonas (MATOS, 2001;

FALKENBERG *et al.*, 2007). A Figura 40 mostra a coloração das soluções dos extratos antes da aplicação do reagente e o desenvolvimento de cor vermelha depois da aplicação.

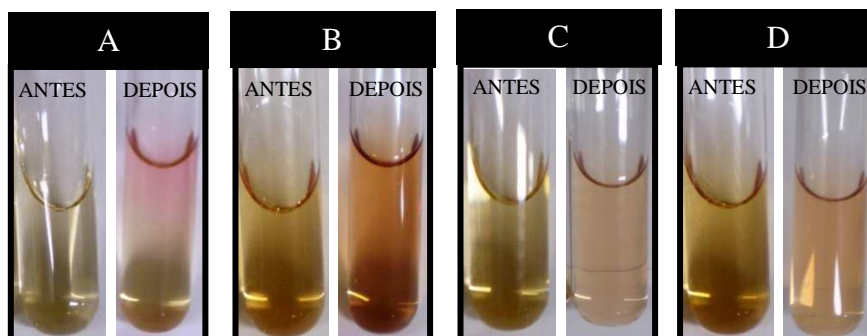


Figura 40. Resultado do teste de Shinoda (indicativo da presença de flavonóides). Solução dos extratos antes da aplicação do reagente e depois da aplicação. (A) EACEduck; (B) EMCEduck; (C) EACEglab e (D) EMCEglab

5.4.4. ENSAIO INDICATIVO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.4.4.1. ENSAIO QUALITATIVO DA CAPTURA DO RADICAL LIVRE

DPPH[•]

Os extratos foram avaliados quanto à capacidade sequestradora de radicais livres através da aplicação do extrato bruto em cromatoplaça, inicialmente não-eluída, seguido de aplicação da solução do radical livre DPPH[•]. O resultado positivo foi avaliado pelo surgimento de manchas claras (amarelo a branco) sob o fundo púrpura, resultantes da redução do DPPH (Figura 41). Os solventes utilizados para solubilização dos extratos foram aplicados nas cromatoplaças para se verificar a presença de alguma interferência no resultado.

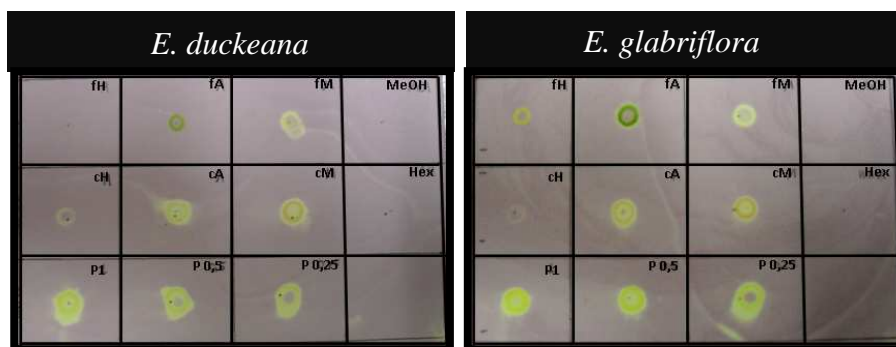


Figura 41. Resultado do ensaio qualitativo de captura do radical DPPH^{*} em CCD. fH: extrato das folhas obtido em hexano; fA: extrato das folhas obtido em AcOEt; fM: extrato das folhas obtido em MeOH; cH: extrato das cascas obtido em hexano; cA: extrato das cascas obtido em acetato de etila; cM: extrato das cascas obtido em metanol; P: padrão(quercetina), nas concentração de 1, 0,5 e 0,25 mg/mL; MeOH e Hex foram os solventes utilizados para solubilizar os extratos

O extrato das folhas de *E. duckeana* obtido em hexano (fH) foi o único que não apresentou nenhuma atividade frente ao radical DPPH^{*} (não foi observado halo de coloração amarelada) e os extratos obtidos em hexano das cascas de *E. duckeana* (cH) e *E. glabriflora* (cH) e das folhas de *E. glabriflora* (fH) apresentaram pouca atividade antioxidante quando comparada com o padrão quercetina, portanto esses 4 extratos não foram analisados quantitativamente. Então, os extratos selecionados foram os obtidos em AcOEt e em MeOH das cascas e folhas de ambas as espécies.

Os extratos obtidos em hexano e em acetato de etila foram eluídos para se tentar localizar as substâncias que deram origem as manchas amarelas. Para os extratos obtidos em metanol, não se realizou a eluição porque não se encontrou um eluente apropriado.

Os extratos das cascas obtidos em hexano foram eluídos em Hex/AcOEt 8:2 e apresentaram o mesmo perfil. A mancha de R_f 0,54 foi a principal responsável pela atividade do extrato. Os extratos obtido em acetato de etila foram eluídos em CHCl₃/MeOH 4:1 e após aplicação da solução de DPPH^{*}, as cromatoplasas apresentaram manchas e rastros, o que significa que várias substâncias são responsáveis pela atividade nesses extratos (Figura 42).

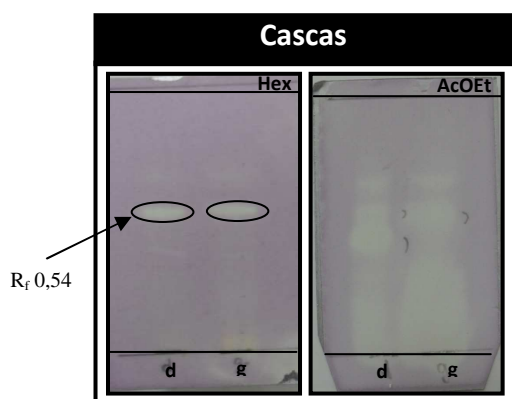


Figura 42. CCD dos extratos brutos das cascas obtidos em hexano (**Hex**) e acetato de etila (**AcOEt**) revelados com solução de DPPH[•]. Espécies: **d**: *E. duckeana* e **g**: *E. glabriflora*. Eluentes: Hex/AcOEt 8:2 (para os extratos obtidos em Hex) e CHCl₃/MeOH 4:1 (para os extratos obtidos em AcOEt)

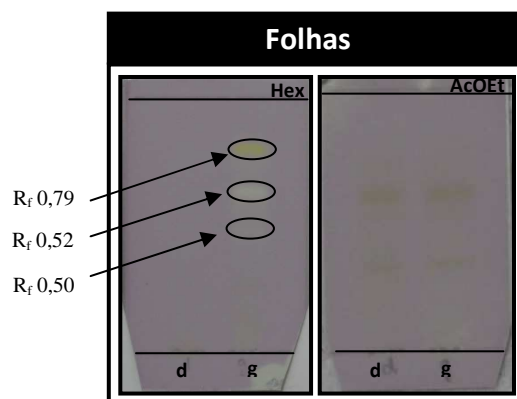


Figura 43. CCD dos extratos brutos das folhas obtidos em hexano (**Hex**) e acetato de etila (**AcOEt**) revelados com solução de DPPH[•]. Espécies: **d**: *E. duckeana* e **g**: *E. glabriflora*. Eluentes: Hex/AcOEt 8:2 (para os extratos obtidos em Hex) e CHCl₃/MeOH 4:1 (para os extratos obtidos em AcOEt)

Os extratos das folhas obtidos em hexano foram eluídos em Hex/Et₂O 6:4 (Figura 43). O extrato da *E. glabriflora* apresentou três manchas amareladas de R_f 0,50, 0,52 e 0,79. O extrato das folhas de *E. duckeana* não apresentou nenhuma mancha, mesmo resultado da cromatoplaça não-eluída. Os extratos obtidos em acetato de etila foram eluídos em Hex/CHCl₃/MeOH 2:3:0,5 e após aplicação da solução de DPPH[•], as cromatoplaças apresentaram manchas esverdeadas e nenhuma amarela ou branca, o que sugere que a mancha mostrada na cromatoplaça não-eluída é proveniente da coloração do extrato e não uma atividade, podendo ser um falso-positivo. Apesar disso, o extrato foi analisado quantitativamente, pois, a coloração a esverdeada poderia mascarar a cor amarela do resultado positivo.

5.4.4.2. ENSAIO QUANTITATIVO DA CAPTURA DO RADICAL LIVRE DPPH[•]

Os resultados do ensaio de atividade frente ao radical livre DPPH[•] foram expressos em CI₅₀, concentração inibitória de 50% da atividade. Portanto, quanto menor for o valor de CI₅₀, maior é a atividade antioxidante. Os resultados estão expressos na Tabela 15.

Tabela 15. Resultados do ensaio quantitativo de captura do radical DPPH[•]

Espécie	Parte utilizada	Extratos	CI ₅₀ (µg/mL±DP)
<i>Eperua duckeana</i>	Folhas	EAFEduck	> 500
		EMFEduck	217,92±4,25
	Casca	EACEduck	17,78 ± 0,15
		EMCEduck	13,10 ± 0,15
<i>Eperua glabriflora</i>	Folhas	EAFEglab	> 500
		EMFEglab	128,8±1,99
	Casca	EACEglab	16,05±0,79
		EMCEglab	10,52±0,24
Padrão	Quercetina	3,7±0,04	

CI₅₀: concentração inibitória de 50% do máximo da capacidade de seqüestro

Os extratos das folhas obtidos em acetato de etila (EAFEduck e EAFEglab) não apresentaram atividade antioxidante significativa (CI₅₀ > 500 µg/mL) quando comparada com o padrão quercetina (CI₅₀ = 3,7 µg/mL) e os extratos obtidos em metanol (EMFEglab e EMFEduck) apresentaram pouca atividade (CI₅₀ = 217,92 e 128,8 µg/mL, respectivamente). Em contrapartida, os extratos das cascas de ambas as espécies apresentaram alta atividade antioxidante. O melhor resultado foi apresentado pelo extrato EMCEglab (CI₅₀ = 10,52 µg/mL).

5.4.4.3. COMPOSTOS FENÓLICOS VS. CAPTURA DO RADICAL DPPH[•]

O extrato que apresentou a maior captura do radical DPPH[•] (EMCEglab) não foi o que apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos (EMCEduck). Então, foi realizada uma correlação entre os testes para avaliar a relação entre a captura do radical livre DPPH[•] e o conteúdo de compostos fenólicos nos extratos (Figura 44).

A correlação entre a captura do DPPH[•] e a quantificação de compostos fenólicos apresentou um coeficiente de $R^2 = 0,8682$, indicando que 87% da atividade antioxidante foi relacionada com a presença dos compostos fenólicos. Ou seja, os compostos fenólicos não são as únicas substâncias que contribuem para a atividade antioxidante do extrato.

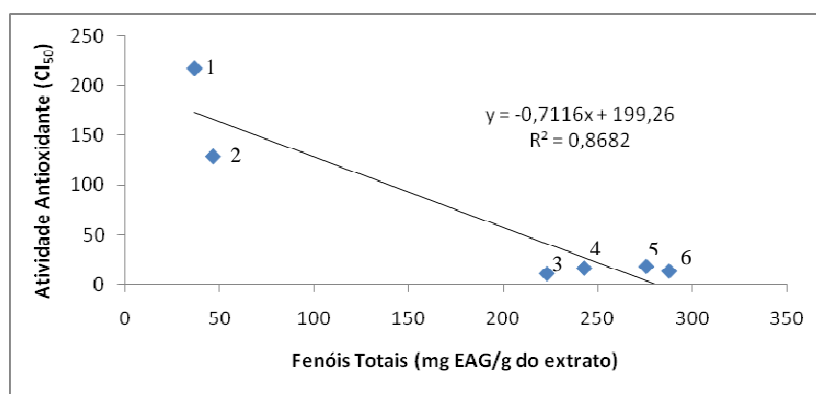


Figura 44. Gráfico de correlação entre fenóis totais e atividade de captura do DPPH[•] dos extratos brutos. (1) EMFEduck; (2) EMFEglab; (3) EMCEglab; (4) EACEglab; (5) EACEduck; (6) EMCEduck

Portanto, pode-se sugerir duas razões para a correlação observada, uma delas seria a presença de outras substâncias, que não as fenólicas, contribuindo na atividade antioxidante e a outra razão poderia ser atribuída aos diferentes métodos utilizados para avaliação da atividade, o primeiro ensaio é baseado na captura de radical livre (Método utilizando DPPH[•]) e o outro na complexação de íons metálicos (Método utilizando reagente de Folin-Ciocalteu). Isso pode ter contribuído para a correlação encontrada, uma vez que os antioxidantes agem por meio de diferentes mecanismos (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

5.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.5.1. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram divididos em atividade antibacteriana e antifúngica. Na literatura não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com os antibióticos padrões, alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram como bom potencial somente aqueles com níveis de inibição superiores.

Os resultados obtidos no presente trabalho foram avaliação de acordo com o proposto por Santos e colaboradores (2008a). Os autores consideram como atividade significativa o extrato que apresenta CIM menor que 100 µg/mL; moderada quando o CIM for entre 100 a 500 µg/mL; atividade fraca quando os valores de CIM estiverem entre 500 e 1000 µg/mL e inativos quando maior que 1000 µg/mL.

5.5.1.1. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA - MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR (DISCO)

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada por dois diferentes métodos: difusão em ágar através de disco e diluição em caldo (concentração da mínima inibitória).

No ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco, os extratos das folhas e cascas e os óleos essenciais das folhas foram avaliados contra às bactérias gram-positivas: *S. aureus* sensível e resistente à antibiótico, *Bacillus cereus*, *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus liqui* (isolado clinico) e gram-negativas: *Escherichia coli* (ETEC, EHEC,

EPEC, EAEC, DAEC), *Staphylococcus choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella flexneri*.

Os extratos apresentaram três diferentes tipos de resultados: o primeiro grupo, constituído pela maioria dos extratos, não apresentou halos de inibição (exemplo na Figura 45-A e B); o segundo grupo apresentou halos ligeiramente maiores que o disco (0,6 cm) variando de 0,7 a 1,1 cm (exemplo na Figura 45-C e D) considerados fracos quando comparados com o padrão (2,5 a 3,5 cm dependendo do micro-organismo); e o terceiro e último grupo de extratos apresentou halos não uniformes e não tão eficientes quanto o antibiótico, mas que merecem atenção (exemplo na Figura 45- E e F). Os resultados de todos os extratos e óleos analisados estão mostrados na Tabela 16.

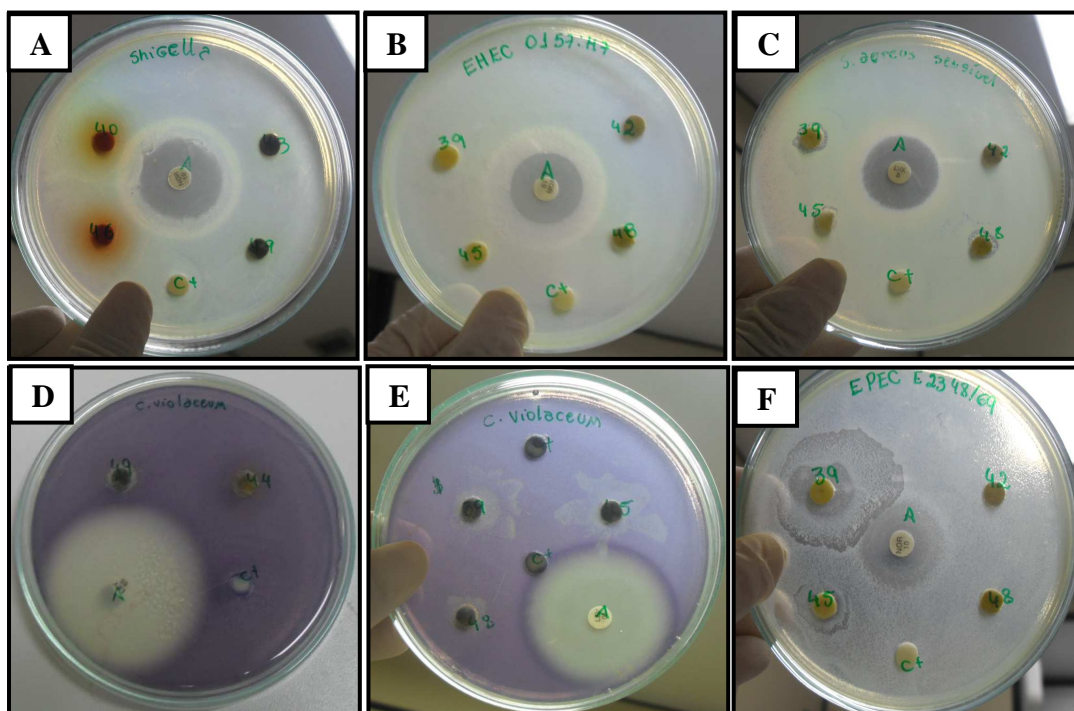


Figura 45. Ensaio de atividade antibacteriana (método de difusão de disco). Bactérias testadas: (A) *S. flexneri*; (B) *E. coli*; (C) *S. aureus*, (D) e (E) *C. violaceum* e (F) *E. coli* EPEC

Tabela 16. Resultados do ensaio antibacteriano (método de difusão em ágar)

Espécie	Parte utilizada	Extratos	Bactérias Gram +										Bactérias Gram -													
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
<i>Eperua duckeana</i>	Folhas	EHFEduck	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		EAFEduck	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		EMFEduck	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Casca	EHCEduck	-	-	-	+	+	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		EACEduck	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		EMCEduck	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Óleo	OFEduck	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		OTEduck	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		EHFEglab	-	-	*	+	+	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Eperua glabriflora</i>	Folhas	EAFEglab	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EMFEglab			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EHCEglab			-	-	*	-	+	+	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Casca		EACEglab	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		EMCEglab	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		OFEGlab	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Óleo		OTEGlab	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Levofloxacina	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Norfloxacina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

LEGENDA: (-) inativo; (+) halo de inibição pequeno; (++) halo de inibição intermediário; (+++) halo de inibição grande; (*) inibição característica- não uniforme ; (ND) não determinado. Bactérias Gram (+): (A) *Bacillus cereus*; (B) *Bacillus liqui*; (C) *Chromobacterium violaceum*; (D) *Staphylococcus aureus sensível*; (E) *Staphylococcus aureus resistente*. Bactérias Gram (-): (F) *Escherichia coli* ETEC; (G) *E. coli* EPEC;(H) *E. coli* EAEC; (I) *E. coli* EHEC ; (J) *E. coli* DAEC; (K) *Pseudomonas aeruginosa*; (L) *Salmonella choleraesuis*; (M) *Shigella flexneri*

Os extratos obtidos em acetato de etila (EACEduck, EAFEduck, EACEglab e EAFEglab) foram inativos contra todas as cepas analisadas, exceto o EACEduck que apresentou um pequeno halo de inibição contra a bactéria gram-positiva *S. aureus* sensível.

Os extratos obtidos em metanol (EMCEduck, EMFEduck, EMCEglab e EMFEglab) também foram inativos, exceto EMCEduck e EMCEglab que apresentaram atividades fracas contra *S. aureus* resistente e *B. cereus*, respectivamente. O extrato EMFEduck apresentou halos de limites não uniformes contra a bactéria *C. violaceum*.

As bactérias *P.aeruginosa*, *S. flexneri*, *S. choleraesuis* e *E coli* EHEC não foram inibidas pelos extratos obtidos em hexano (EHCEduck, EHFEduck, EHCEglab e EHFEGlab), entretanto a bactéria *S. aureus* sensível apresentou uma fraca inibição pelos extratos EHCEduck, EHFEduck e EHFEGlab. E a bactéria *S. aureus* resistente apresentou fraca inibição pelos extratos EHCEduck, EHCEglab e EHFEGlab.

As bactérias gram-positiva *C.violaceum* e gram-negativas *E. coli* (ETEC, EPEC, DAEC e EAEC) apresentaram um tipo de interação/inibições características. Os aspectos dos halos de inibição foram distintos dos apresentados pelos padrões utilizados, conforme apresentado na Figura 45-E e F, aparentemente, os extratos impediram que apenas uma parte da população bacteriana se proliferasse. Os extratos EHCEduck, EHCEglab e EHFEGlab mostraram esse tipo de halo de inibição contra as bactérias *C violaceum* e *E. coli* (DAEC e EAEC). Além dos extratos EHCEduck e EHCEglab contra as bactérias *E. coli* (ETEC e EPEC).

No caso dos óleos essenciais, apenas 3 cepas de bactérias (*C. violaceum*, *P.aeruginosa*, e *S. aureus* resistente) foram avaliadas devido à pequena quantidade de óleo disponível. Os resultados indicam que nenhum dos óleos foi capaz de inibir o crescimento das bactérias testadas.

No trabalho de Nascimento e colaboradores (2007) é mencionado que testes de difusão em ágar não são os mais adequados para óleos essenciais, e por analogia também não são adequados para extratos apolares, pois os testes de difusão são padronizados para condições hidrofílicas, sendo mais apropriados, então, para substâncias com esse caráter. Os extratos hexânicos e óleos essenciais são de natureza hidrofóbica e essa característica impede a difusão uniforme destas substâncias através do meio contendo ágar. Apesar disso, esse teste ainda continua sendo amplamente utilizado por diversos autores para esses materiais (AGUIAR *et al.*, 2008; FERRONATTO *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2009). De fato, foi observada a difusão dos extratos mais polares (por exemplo, Figura 43-A), porém a visualização só pôde ser acompanhada porque os extratos metanólicos possuem cores mais escuras (marrom) que os hexânicos (amarelo).

5.5.1.2. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA- MÉTODO DE DILUIÇÃO DE CALDO (CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA-CIM)

Os extratos avaliados quanto à atividade antibacteriana pelo método da diluição em caldo foram: EHCEglab, EHCEduck, EACEglab e EACEduck. Os extratos foram testados contra às seguintes bactérias: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S.aureus*, *B. subtilis*. Apenas o *B. subtilis* não tinha sido avaliado pelo método de difusa em ágar. A Tabela 17 mostra os valores de CIM encontrado para os extratos analisados.

Os resultados indicam que o extrato obtido em hexano das cascas de *E. glabriflora* (EHCEglab) apresentou atividade antibacteriana significativa contra a bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis* com CIM igual a 62,5 µg/mL e foi inativa para os restantes dos cepas testadas (CIM maior que 1000 µg/mL).

Os extratos obtidos em acetato de etila (EACEglab e EACEduck) apresentaram fraca atividade contra a bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis* com CIM igual a 1000 µg/mL e foi inativo para as outras cepas.

As bactérias gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli* e a gram –positiva *S. aureus* não foram inibidas por nenhum dos extratos testados (CIM maior que 1000 µg/mL). Esse resultado concorda com o resultado encontrado no teste de difusão em ágar para esses micro-organismos, onde a avaliação foi realizada a 2400 µg de extrato/disco.

Tabela 17. Resultados da atividade antibacteriana (método de diluição de caldo) expressa em µg/mL

Amostras	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
EHCEglab	>1000	>1000	>1000	62,5
EHCEduck	>1000	>1000	>1000	>1000
EACEglab	>1000	>1000	>1000	1000
EACEduck	>1000	>1000	>1000	1000

5.5.2. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os extratos avaliados quanto à atividade antifúngica pelo método da diluição em caldo foram: EHCEglab, EHCEduck, EACEglab e EACEduck. Os extratos foram testados contra as seguintes leveduras: *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Os extratos das cascas obtidos em hexano (EHCEglab e EHCEduck) foram inativos contra todas as leveduras testadas (CIM maior que 1000 µg/mL).

Os extratos EACEglab e EACEduck foram inativos contra as leveduras *C. albicans*, *C. parapsilosis* (CIM maior que 1000 µg/mL) e fracamente ativos contra *C. tropicalis* (CIM igual a 1000 µg/mL).

Com base nos resultados obtidos, apesar de preliminares, para atividade antimicrobiana foi possível demonstrar que os extratos das cascas e folhas das espécies *E.*

glabriflora e *E. duckeana* não apresentam atividades significativas contra as bactérias (exceto *B.subtilis*) e os fungos testados. Embora a literatura indique que algumas espécies do gênero *Eperua* são usadas como antimicrobianos (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2002).

Tabela 18. Resultados da atividade antifúngica (método de diluição de caldo) expressa em µg/mL

Amostras	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)		
	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
EHCEglab	>1000	>1000	>1000
EHCEduck	>1000	>1000	>1000
EACEglab	1000	>1000	>1000
EACEduck	1000	>1000	>1000

5.5.2. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA

Os extratos avaliados quanto à atividade antiprotozoária foram: EHCEglab, EHCEduck, EACEglab e EACEduck. Os extratos foram testados contra os protozoários: *Trypanosoma cruzi* na forma epimastigota e *Leishmania amazonensis* na forma promastigota.

Na Tabela 19 estão apresentados os resultados das atividades antiprotozoárias dos extratos. Observa-se que os extratos não apresentaram atividade significativa quando comparada com o padrão anfotericina B (CI₅₀ 0,05 µg/mL), porém é importante ressaltar que extratos obtidos em hexano de ambas as espécies (EHCEglab e EHCEduck) apresentaram algum tipo de atividade contra os dois parasitas e ainda, o protozoário *T. cruzi* mostrou-se mais suscetível aos extratos obtidos em hexano que o *L. amazonensis* apresentando CI₅₀ menores.

Tabela 19. Resultados da atividade antiparasitária expressa em CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)

Amostras	Parasitas	
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Leishmania amazonensis</i>
EHCEglab	140	200
EHCEduck	250	300
EACEglab	>500	>500
EACEduck	500	>500
Anfotericina B	-	0,05 ^(a)

CI_{50} : concentração (em $\mu\text{g/mL}$) que inibe o crescimento de 50% dos parasitas em relação ao controle. (a) SANTOS *et al.* 2008b

5.5.3. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS

Os extratos obtidos em hexano, acetato de etila, e metanol das cascas e folhas e os óleos essenciais das folhas e talos da *E. duckeana* e *E. glabriflora* foram enviados para avaliação da atividade citotóxica em linhagens de células tumorais e os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de crescimento celular (IC%). Os valores de IC% foram comparados com a tabela abaixo para se verificar a toxicidade do extrato. Se o extrato apresentar pelo menos para 2 linhagens de células tumorais valores maiores que 90% significa que o extrato tem potencial atividade citotóxica para linhagens de células tumorais.

RESULTADO	
IC%	Citotoxicidade
$\geq 90\%$	Elevada
$\leq 90\%$	Baixa

Os valores das porcentagens de inibição dos óleos essenciais para as linhagens de células tumorais estão listados na Tabela 20 e os resultados dos extratos estão na Tabela 21.

Tabela 20. Resultado do ensaio de atividade citotóxica em linhagens de células tumorais dos óleos essenciais na concentração de 50 µg/mL

AMOSTRAS	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO (% ±DP)		
	HCT-8	MDA/MB-435	SKF-295
OFEduck	99,04 ± 2,03	92,49 ± 0,85	98,15 ± 0,65
OTEduck	98,92 ± 2,32	85,23 ± 1,93	96,67 ± 1,44
OFEglab	99,64 ± 2,32	95,22 ± 5,43	96,16 ± 4,39
OTEglab	101,36 ± 0,45	100,81 ± 0,42	98,70 ± 0,52

Legenda: HCT8: Câncer do Cólon; MDA/MB-435; Câncer de Mama; SKF-295; Câncer do Sistema Nervoso Central

Os resultados indicam que os óleos essenciais apresentaram uma alta citotoxicidade para as três linhagens de células tumorais testadas, com valores de percentagem de inibição acima de 92%. A análise cromatográfica e espectrométrica (CG-DIC e CG-EM) dos óleos essenciais indicou que os componentes majoritários de pelo menos folhas e talos de *E. duckeana* e folhas da 1ª coleta da *E. glabriflora* são os sesquiterpenos *trans*-cariofileno e o germacreno D.

A atividade apresentada pelo óleo pode ser causada pelos compostos majoritários, que nesse caso é o β- cariofileno e/ou germacreno D, ou ser atribuída ao sinergismo entre as substâncias presentes no óleo essencial que podem atuar com efeitos aditivos, causando a inibição do crescimento das células tumorais. O sesquiterpeno β- cariofileno é descrito na literatura como componente citotóxico de outras plantas (SILVA *et al.*, 2008; SYLVESTRE *et al.*, 2005).

Por outro lado, os extratos brutos apresentaram pouca ou nenhuma atividade contra as células cancerígenas. Dentre os extratos, os que apresentaram maior inibição de crescimento para as células de câncer de cólon (HCT8) foram os extratos EAFEduck, capaz de inibir

22,40 % ($\pm 1,05\%$) e EHCEglab ($20,14 \pm 6,21\%$). As células de câncer de mama (MDA/MB-435) foram as menos suscetíveis aos extratos, muitos não inibiram o seu crescimento, o maior valor de inibição observado foi do extrato EHCEglab, capaz de inibir $15,97\% (\pm 0,39\%)$. Os extratos EHCEduck, EAFEglab, e o EHCEglab foram os que mais apresentaram atividade contra a célula de câncer do sistema nervoso central (SKF-295), com porcentagem de inibição (\pm desvio padrão) igual a $23,09 (\pm 1,23\%)$; $25,35\% (\pm 1,38\%)$ e $24,78 \pm (5,80\%)$, respectivamente (Tabela 21).

Tabela 21. Resultado ensaio da atividade citotóxica em linhagens de células tumorais dos extratos brutos

AMOSTRAS	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO (% \pm DP)			
	HCT-8	MDA/MB-435	SKF-295	
<i>E. duckeana</i>	EHCEduck	$19,54 \pm 3,14$	$2,79 \pm 1,55$	$23,09 \pm 1,23$
	EACEduck	$5,82 \pm 1,11$	-	$7,90 \pm 6,31$
	EMCEduck	-	-	-
	EHFEduck	ND	ND	ND
	EAFEduck	$22,40 \pm 1,05$	$6,22 \pm 2,39$	$17,34 \pm 2,25$
	EMFEduck	$7,99 \pm 8,36$	ND	$18,93 \pm 2,47$
<i>E. glabriflora</i>	EHCEglab	$20,14 \pm 6,21$	$15,97 \pm 0,39$	$24,78 \pm 5,80$
	EACEglab	$4,20 \pm 0,39$	-	$2,36 \pm 2,98$
	EMCEglab	-	-	-
	EHFEglab	$9,75 \pm 1,70$	-	$3,59 \pm 0,65$
	EAFEglab	$16,81 \pm 1,11$	$2,52 \pm 3,88$	$25,35 \pm 1,38$
	EMFEglab	ND	ND	ND

Legenda: HCT8: Câncer do Cólon; MDA/MB-435; Câncer de Mama; SKF-295; Câncer do Sistema Nervoso Central; ND: Não determinado; (-): sem atividade

De forma geral, os produtos naturais têm se mostrados promissores fontes na descoberta de novos agentes antineoplásicos o que justifica a procura dessas substâncias em plantas (CRAGG & NEWMAN, 2005; BUTLER, 2008).

5.6. ESTUDO FITOQUÍMICO

5.6.1. EXTRATOS DAS CASCAS OBTIDOS EM HEXANO

5.6.1.1. AVALIAÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS POR CCD

Os extratos obtidos em hexano foram solubilizados em CHCl_3 e avaliados por CCD. O melhor eluente foi Hex/AcOEt 8:2. A Figura 46 mostra a cromatoplaça revelada em luz UV-254 nm (1), UV-365 nm (2), sulfato cérico (3), vanilina (4) e ácido sulfúrico (5). O melhor revelador foi a solução de vanilina sulfúrica (Figura 46-4).

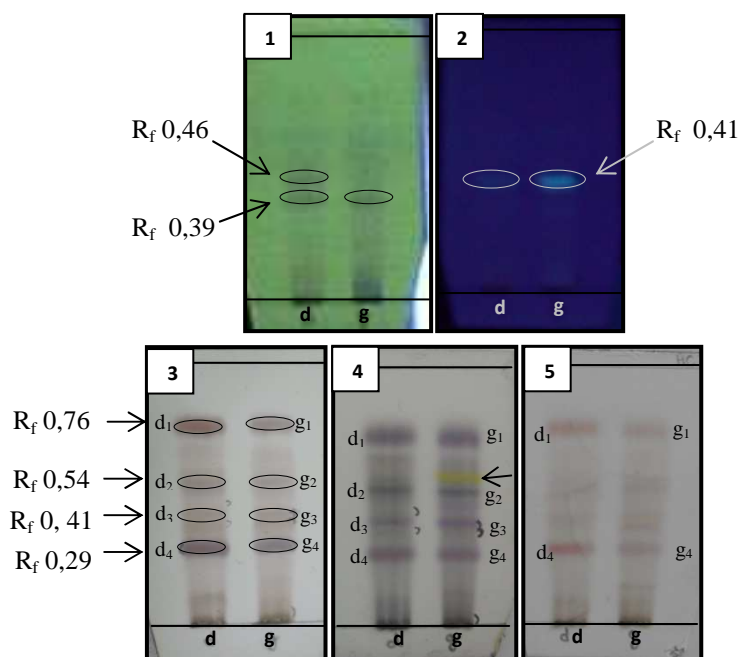


Figura 46. Cromatoplaças comparativas dos extratos das cascas de *E. duckeana* (**d**) e *E. glabriflora* (**g**) obtidos em hexano reveladas em luz UV-254 nm (1), 365 nm (2), e soluções de sulfato cérico (3), vanilina sulfúrica (4) e ácido sulfúrico (5). Eluente: Hex/AcOEt 8:2

A análise da cromatoplaça revelada em luz UV-254 nm (Figura 46-1) mostrou duas manchas escuras bem definidas: uma mais apolar com R_f 0,46, observada apenas no **d** (EHCEduck) e outra com R_f 0,39 que aparece tanto em **d** quanto em **g** (EHCEglab), essas

manchas não revelam com sulfato cérico, vanilina ou ácido sulfúrico. No comprimento de onda 365 nm foi observada uma mancha fluorescente azul de R_f 0,41, presente em ambos os extratos, porém mais intensa em **g** (Figura 46-2).

De modo geral, os extratos possuem o mesmo perfil. Quando revelada em sulfato cérico (Figura 46-3), ambos os extratos apresentaram quatro manchas significativas: a mais apolar de R_f 0,76 (**d**₁ para EHCEduck e **g**₁ para EHCEglab) possui coloração marrom; a segunda mancha mostrou R_f 0,54 (**d**₂ e **g**₂); a terceira mancha apresentou R_f 0,41 (**d**₃ e **g**₃), o mesmo da mancha fluorescente em UV-365 nm; a quarta mancha, mais polar, apresentou R_f 0,29 (**d**₄ e **g**₄), que no início do aquecimento apresentou coloração azulada e com o passar dos minutos adquiriu coloração arroxeadada. A cor azul em sulfato cérico é indicativa de esterol (WAGNER & BLADT, 1995).

A principal diferença nos perfis dos extratos foi a presença da mancha de R_f 0,56 presente apenas no **g** de coloração amarela, observada na cromatoplaça revelada com vanilina sulfúrica (Figura 46-4).

5.6.1.2. ANÁLISE DOS EXTRATOS APOLARES DAS CASCAS POR CG-DIC E CG-EM

Os extratos hexânicos das cascas das duas espécies de *Eperua* foram analisados por CG-DIC e CG-EM. Para cada extrato foi obtido dois cromatogramas, um referente ao extrato bruto (sem derivatização) com o objetivo de avaliar a fração não ácida do extrato e um cromatograma obtido após a derivatização a fim de se identificar os ácidos graxos e diterpênicos presentes nos extratos.

Os cromatogramas dos extratos analisados sem derivatização possuem perfis semelhantes nas regiões características de eluição de ácidos graxos, diterpenos, esteróis e triterpenos (Figura 47).

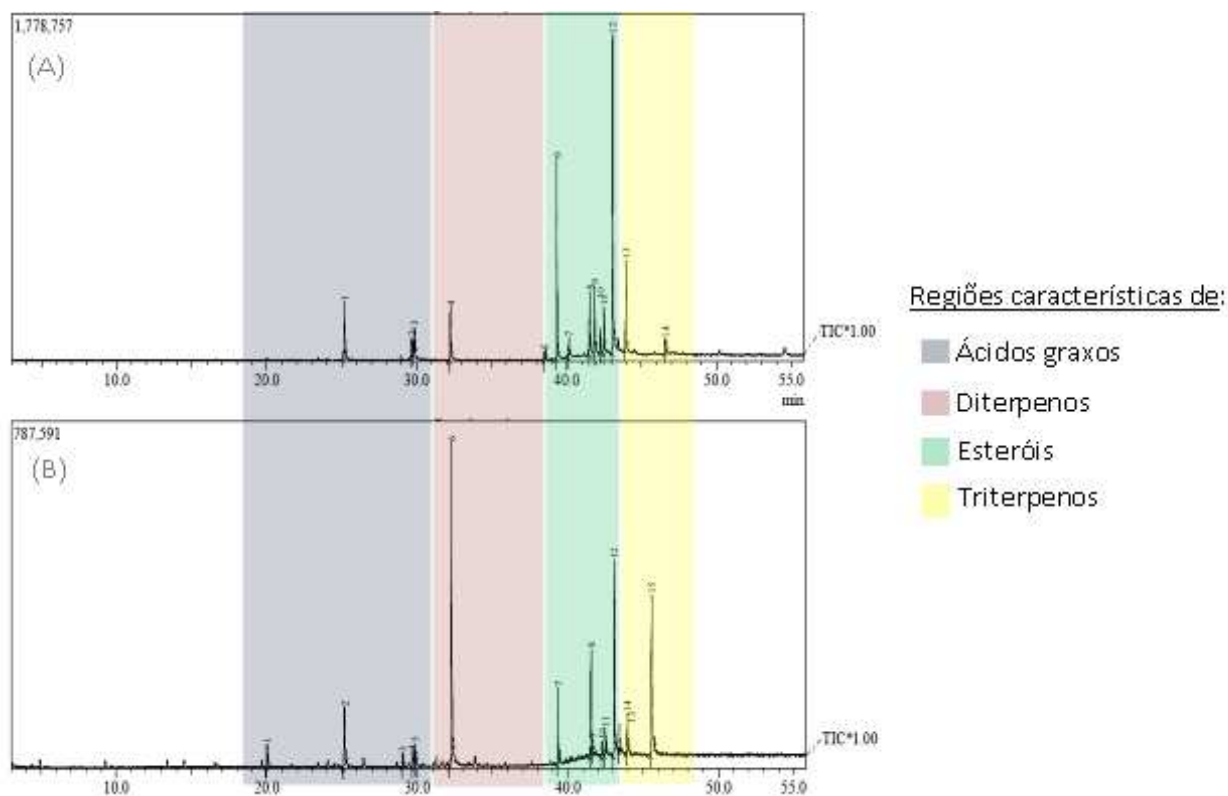


Figura 47. Cromatogramas de íons totais dos extratos obtido em hexano das cascas de *Eperua duckeana* (A) e *E. glabriflora* (B)

Através dos tempos de retenção, íons moleculares, padrão de fragmentação e sugestão da espectroteca Wiley do espectrômetro de massas, pôde-se identificar seis compostos, são eles: o ácido palmítico, o ácido diterpênico 3-clerodeno-15-óico, o hidrocarboneto esqualeno, a vitamina α -tocoferol, e os esteróis estigmasterol e β -sitosterol (Tabela 22). Os espectros de todas as substâncias identificadas estão mostradas a seguir, juntamente com as propostas de fragmentação de cada molécula.

Tabela 22. Substâncias detectadas nos extratos hexânicos (sem derivatização) a partir do CG-EM

Substâncias	t _r (min)	Íon molecular (m/z)	Fórmula molecular	Área (%)	
				<i>E. duckeana</i>	<i>E. glabriflora</i>
ácido palmítico	25,2	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	6,18	6,43
ácido 3-clerodeno-15-óico	32,3	306	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	5,20	28,00
esqualeno	39,4	410	C ₃₀ H ₅₀	15,25	4,49
α-tocoferol	41,6	430	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	4,70	6,75
stigmasterol	42,5	412	C ₂₉ H ₄₈ O	3,67	2,24
β-sitosterol	43,1	414	C ₂₉ H ₅₀ O	37,93	17,10

Os componentes majoritários nos extratos hexânicos sem derivatização foram o esqualeno para a *E. duckeana* e o ácido 3-clerodeno-15-óico para a *E. glabriflora*. Ou seja, mesmo sem a derivatização, pôde-se detectar um ácido diterpênico (o ácido 3-clerodeno-15-óico) e um ácido graxo (o ácido palmítico) no extrato bruto, isso se deve à grande quantidade desses compostos presentes nos extratos. Porém, para se analisar por completo a fração ácida dos extratos, esterificou-se o extrato bruto com TMS e a composição está descrita na Tabela 23. Além dos dois extratos analisados anteriormente (com espécimes coletadas em 2008), foi realizada a derivatização do extrato hexânico da *E. glabriflora* (espécime coletada em 2009).

As quantidades de ácidos graxos e diterpênicos são diferentes entre as espécies estudadas. A espécie *E. duckeana* apresentou aproximadamente 93% de ácido graxo e 7% de ácido diterpênico. Já para a espécie *E. glabriflora* foi detectado 58% de ácidos graxos e 42% de ácidos diterpênicos para o espécime coletado em 2008. O espécime coletado em 2009 foi a que apresentou uma maior quantidade de ácidos diterpênicos (73%) e conseqüentemente, a menor proporção de ácidos graxos (27%).

O componente majoritário do extrato derivatizado da *E. duckeana* foi um ácido graxo, o ácido hexadecanóico (32%), e para *E. glabriflora* foi um ácido diterpênico, o ácido 3-clerodeno-15-óico, nas proporções de 35 e 39% para os espécimes coletados em 2008 e 2009, respectivamente.

Nos extratos foram detectados ácidos graxos saturados (ácido hexadecanóico, octadecanóico, tetracosanóico e hexacosanóico) e insaturados com uma (ácido 9-octadecenóico) e duas ligações duplas (ácido 9,12-octadecadienóico). Além de identificados quatro ácidos diterpênicos diferentes: um isômero do ácido 3-clerodeno-15-óico, ácido 3-clerodeno-15-óico, o ácido catívico e o ácido 3-hidroxi-labda-7-13-dieno-15-óico, sendo os dois últimos presentes apenas no extrato de *E. glabriflora* coletada em 2009; e um ácido diterpênico não-identificado com íon molecular de m/z 318.

Os espectros das substâncias identificadas nos extratos sem derivatização prévia e os ésteres metílicos identificados e os não identificados nos extratos derivatizados com TMS estão mostrados a seguir juntamente com as propostas de fragmentação das substâncias identificadas.

Tabela 23. Substâncias detectadas nos extratos hexânicos derivatizados com TMS

t_r (min)	Substâncias	Íon molecular (m/z)	Pico base (m/z)	Similaridade (%)	Fórmula molecular	Área (%)	
						<i>E. duck</i>	<i>E. glab1</i> / <i>E. glab2</i>
1	hexadecanoato de metila	270	74	97	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	32,29	28,21 / 13,82
2	9,12-octadecadienoato de metila	294	67	95	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	8,68	5,47 / -
3	9-octadecenoato de metila	296	55	95	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	10,79	8,00 / 7,02
4	octadecanoato de metila	298	74	96	C ₁₈ H ₃₈ O ₂	2,27	- / -
5	éster metílico do isômero do ácido 3-clerodeno-15-óico	320	95	-	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	-	2,76 / 4,94
6	éster metílico do ácido 3-clerodeno-15-óico	320	95	-	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	7,38	35,39 / 38,83
7	éster metílico do ácido catívico	320	109	-	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	-	- / 5,84
8	éster metílico do ácido diterpeno n.i.	318	95	-	-	-	3,56 / 5,25
9	éster metílico do ácido graxo n.i.	-	57	-	-	4,62	3,84 / 5,86
10	Éster metílico do ácido 3-hidróxi-labda-7-13-dieno-15-óico	334	205	-	C ₂₁ H ₃₄ O ₃	-	- / 18,44
11	tetracosanoato de metila	382	74	89	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	7,92	3,44 / -
12	hexacosanoato de metila	410	74	90	C ₂₇ H ₅₄ O ₂	18,56	9,32 / -
13	éster metílico do ácido graxo n.i.	-	55	-	-	7,50	- / -
TOTAL DE ÁCIDOS GRAXOS						92,63	58,28 / 26,70
TOTAL DE ÁCIDOS DITERPÊNICOS						7,38	41,71 / 73,30

5.6.1.2.1. COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR DADOS ESPECTRAIS

5.6.1.2.1.1. ÁCIDO HEXADECANÓICO (ÁCIDO PALMÍTICO)

O ácido hexadecanóico ($C_{16}H_{32}O_2$), conhecido como ácido palmítico, foi detectado nos extratos hexânicos de *E. duckeana* e *E. glabriflora*, tanto o extrato bruto sem derivatização prévia quanto no extrato derivatizado, sendo que no último caso foi detectado como éster metílico do ácido palmítico.

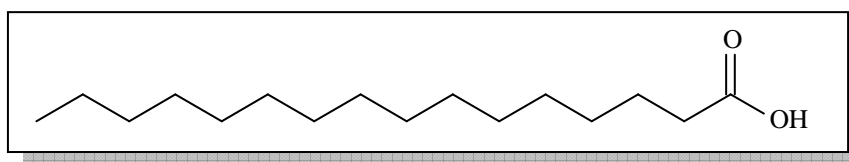


Figura 48. Estrutura do ácido palmítico

Os extratos brutos sem derivatização apresentaram cerca de 6% desse ácido graxo. O espectro da substância que foi identificada como o ácido palmítico está mostrado na Figura 49.

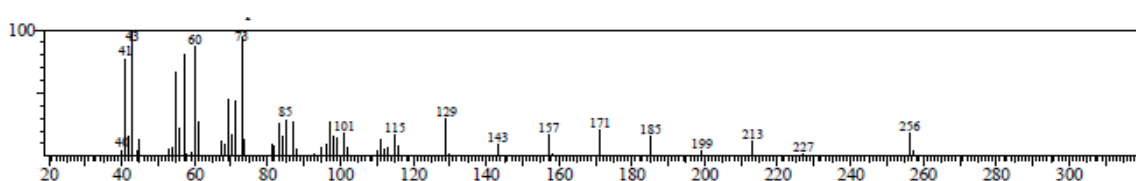


Figura 49. Espectro de massas da substância identificada como ácido palmítico obtido por CG-EM (impacto eletrônico) do extrato sem derivatização prévia

O pico de m/z 60 é resultante de um rearranjo de McLafferty, como mostrado na Figura 50.

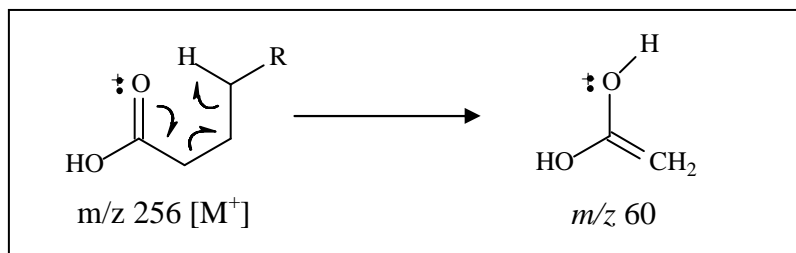


Figura 50. Rearranjo de McLafferty resultando em fragmento de m/z 60

Os outros fragmentos são oriundos de quebras sucessivas das ligações C-C, com retenção de carga pelo fragmento alquila (m/z 43, 85, 99) ou pelo fragmento que contém o oxigênio (m/z 73, 101, 115, 129, 143, 157, 171, 185, 199, 213) com intervalos de 14 unidades de massas (CH_2), comuns em hidrocarbonetos e seus ácidos carboxílicos correspondentes (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os extratos derivatizados apresentaram altas porcentagens desse ácido graxo. O extrato hexânico de *E. duckeana* apresentou 32%, enquanto que os extratos da *E. glabriflora* coletada em 2008 e 2009 apresentaram 28% e 14%, respectivamente. O espectro de massas do éster do ácido palmítico está apresentado abaixo na Figura 51.

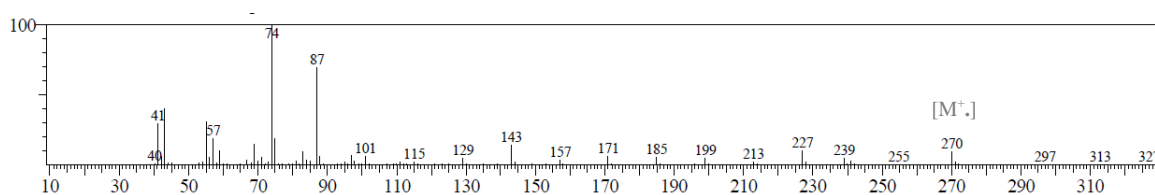


Figura 51. Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido palmítico obtido por CG-EM (impacto eletrônico)

O espectro apresentou dois picos de alta intensidade: m/z 74 e 87. O fragmento m/z 74 (que é o pico base) é originado da fragmentação do íon molecular m/z 270 $[\text{M}^+]$. Este íon molecular sofre um rearranjo de McLafferty onde o hidrogênio γ é transferido ao átomo de oxigênio da carbonila. Em sequência ocorre uma clivagem entre os carbonos α e β formando-

se o íon m/z 74, conforme mostrado na Figura 52. Esse íon é bastante estável devido a possibilidade de ressonância.

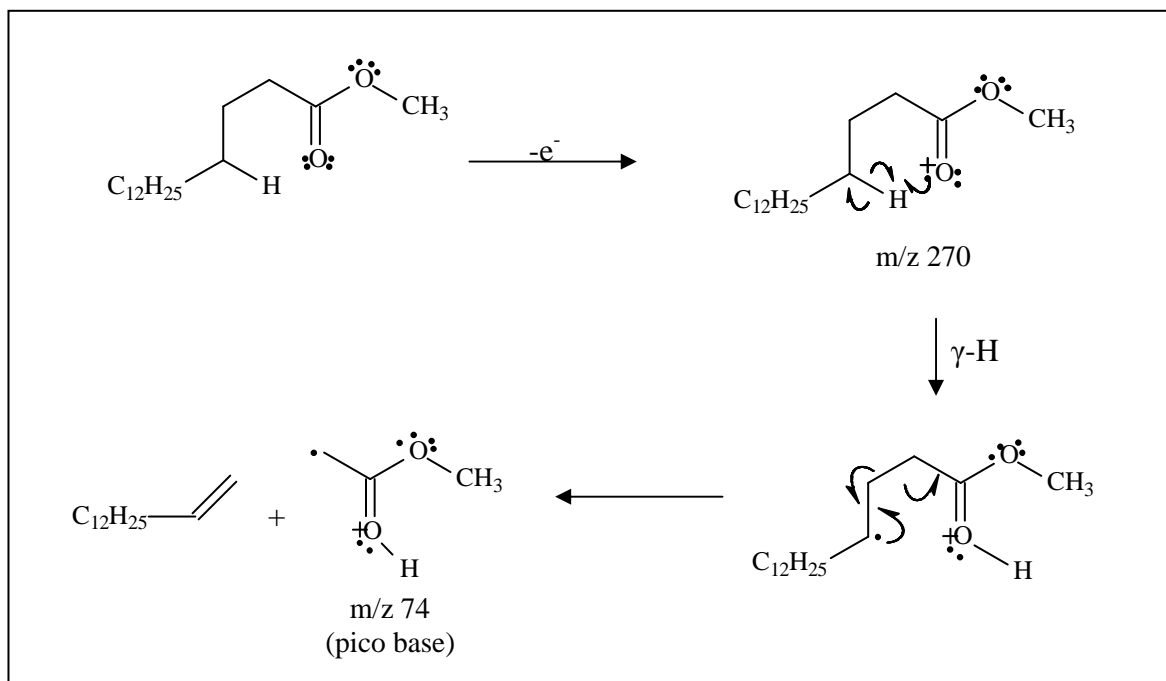


Figura 52. Mecanismo de formação do íon molecular e fragmentação do pico base de ésteres metílicos saturados

5.6.1.2.1.2. ÁCIDO 9,12-OCTADECADIENÓICO (ÁCIDO LINOLÉICO)

O ácido 9,12-octadecadienóico (conhecido como ácido linoléico) foi detectado nos extratos derivatizados, tanto de *E. duckeana* (aproximadamente 8%) quanto em *E. glabriflora* coletada em 2008 (cerca de 5%). A estrutura dessa substância, que possui fórmula molecular $C_{18}H_{32}O_2$, está mostrada na Figura 53.

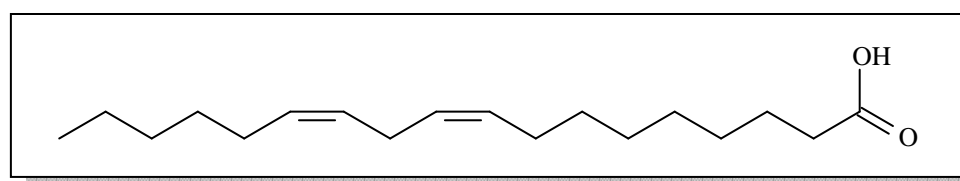


Figura 53. Estrutura do ácido 9,12-octadecadienóico

Esse ácido foi detectado na forma de éster metílico e o seu espectro de massas é mostrado na Figura 54.

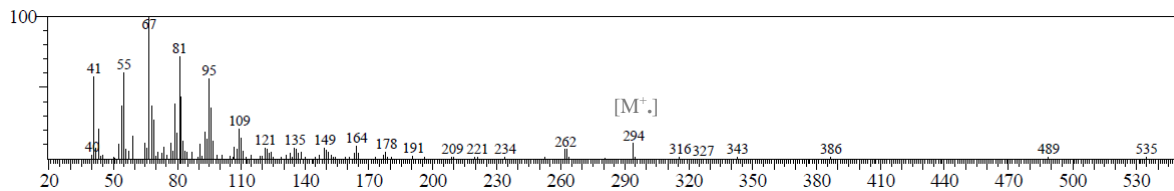


Figura 54. Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido linoléico obtido por CG-EM (impacto eletrônico)

O pico $[M-31]^+$ surge da clivagem da ligação C-O adjacente à carbonila. A formação do íon $C_5H_7^+$ de m/z 67 (pico base) ocorre com uma transferência de uma ligação dupla (não mostrada no mecanismo) seguida de clivagem da ligação C-C.

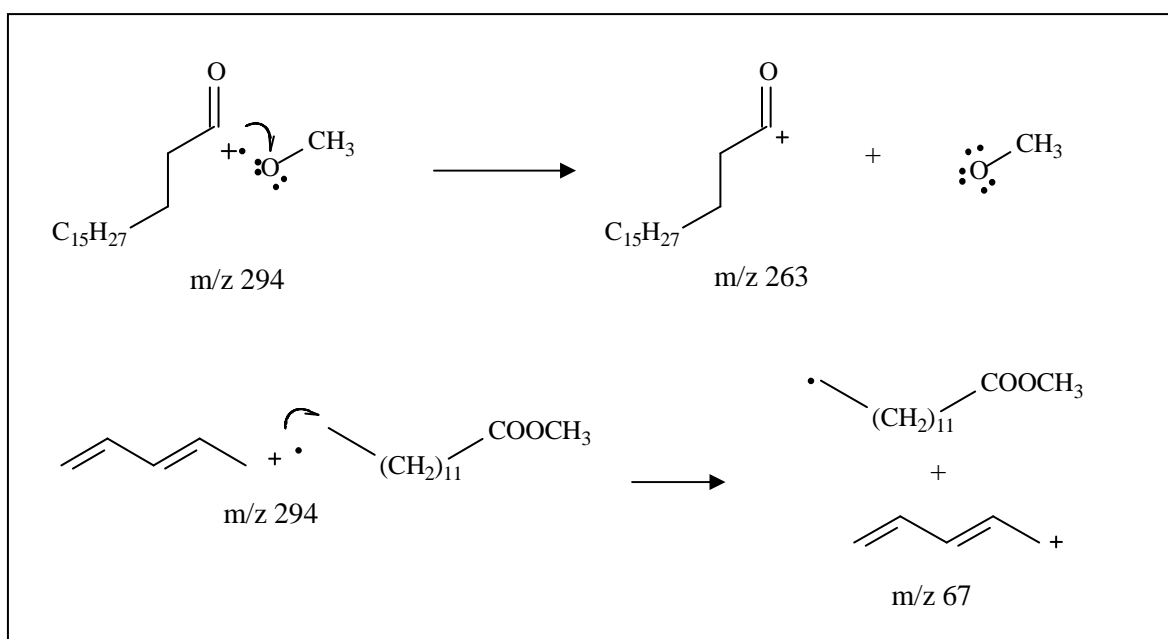


Figura 55. Mecanismo de fragmentação do 9,12-octadecadienoato de metila

5.6.1.2.1.3. ÁCIDO 9-OCTADECENÓICO (ÁCIDO OLÉICO)

O ácido 9-octadecenóico (conhecido com ácido oleico) foi detectado em todos os extratos derivatizados na proporção de 8%, 7% e 11% para os extratos hexânicos da *E. duckeana*, *E. glabriflora*/2008 e *E. glabriflora*/2009, respectivamente. O referido ácido possui fórmula molecular $C_{18}H_{34}O_2$ e sua estrutura está representada na Figura 56.

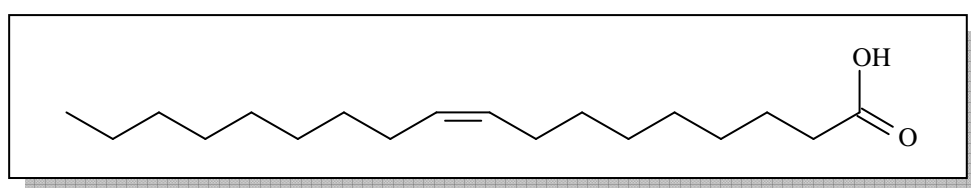


Figura 56. Estrutura do ácido 9-octadecenóico

O ácido foi detectado na forma de éster metílico (devido a derivatização) e seu espectro de massas está exposto na Figura 57.

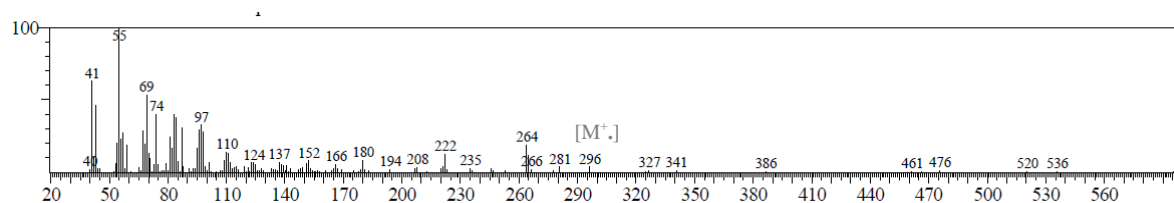


Figura 57. Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido oleico obtido por CG-EM (impacto eletrônico)

O 9-octadecenoato de metila sofre um rearranjo de McLafferty com consequente formação do íon $[M-32]^+$. Em seguida, forma-se o íon m/z 69 pela quebra de uma ligação C-C. O pico base surgiu da transferência da ligação dupla (não mostrada no mecanismo) do carbono 9 para o carbono 6 seguida de uma clivagem da ligação C-C (Figura 58).

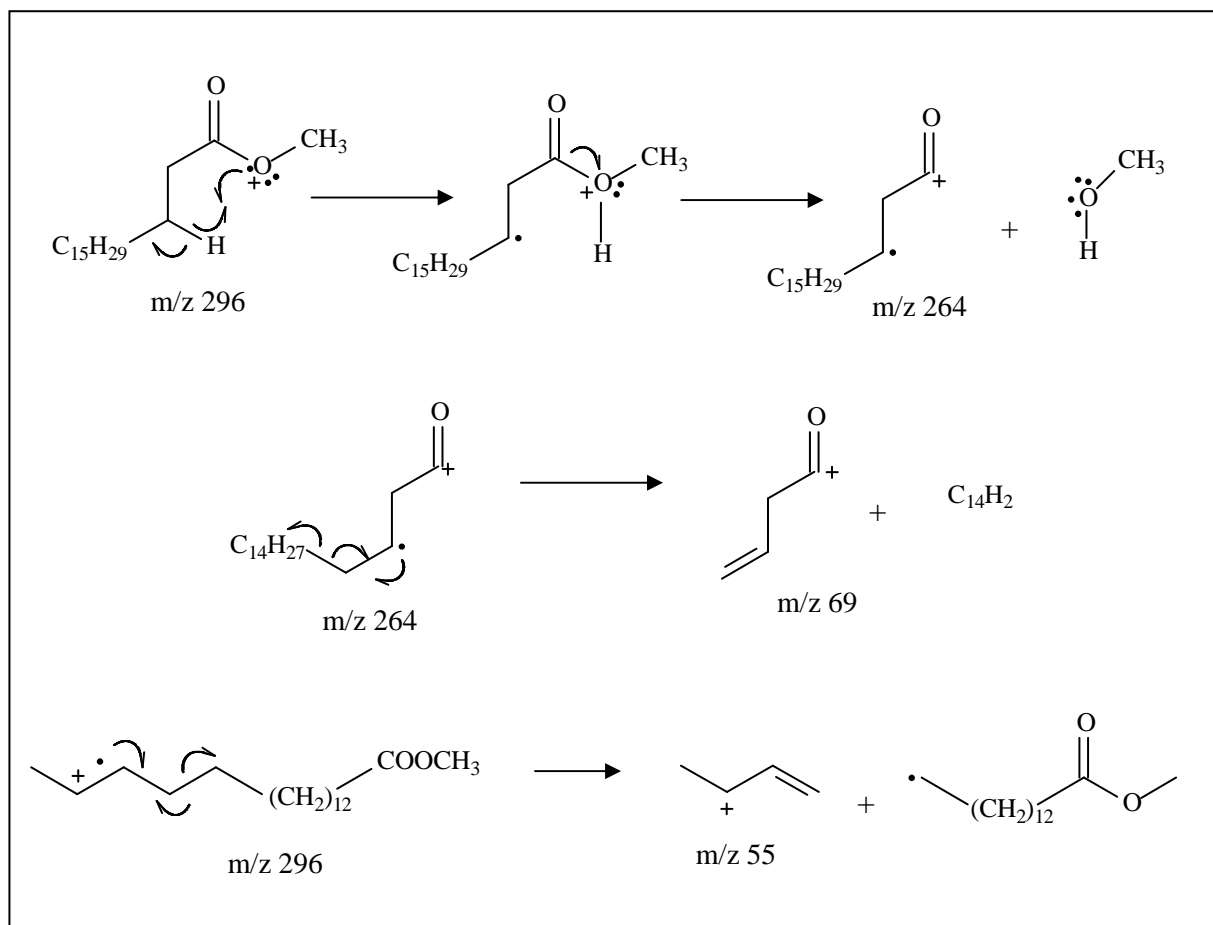


Figura 58. Mecanismo de fragmentação do 9-octadecenoato de metila

5.6.1.2.1.4. ÁCIDO OCTADECANÓICO (ÁCIDO ESTEÁRICO)

O ácido octadecanóico (conhecido como ácido esteárico) foi detectado no extrato derivatizado da *E. duckeana* e apresentou 2,27% da composição percentual do extrato bruto. A estrutura do ácido, que tem fórmula molecular $C_{18}H_{36}O_2$, está exposta na Figura 59.

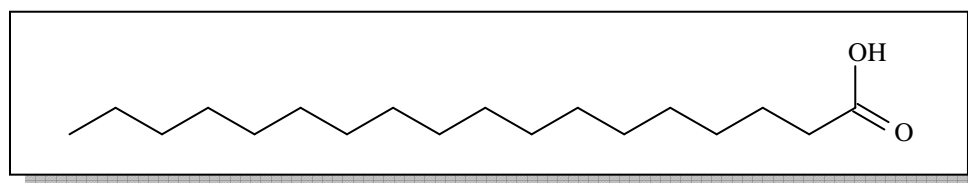


Figura 59. Estrutura do ácido octadecanóico

O espectro do éster metílico do ácido esteárico (Figura 60) apresentou íon molecular de m/z 298 e pico base de m/z 74 corresponde ao íon $[\text{CH}_2\text{C}(\text{OH})\text{OCH}_3]^+$ referente ao pico característico ao rearranjo de McLafferty com quebra da ligação β em relação ao grupo $\text{C}=\text{O}$, como mostrado na Figura 52. O pico m/z 87 corresponde ao íon $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3]^+$.

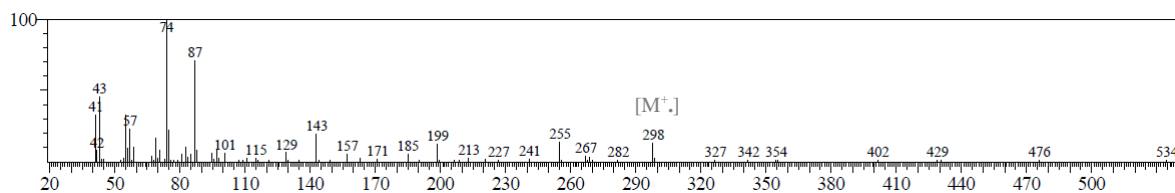


Figura 60. Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido esteárico obtido por CG-EM (impacto eletrônico)

5.6.1.2.1.5. ISÔMERO DO ÁCIDO 3-CLERODENO-15-ÓICO

A substância com tempo de retenção 39,17 min foi identificada como sendo um isômero do ácido 3-clerodeno-15-óico. Seu espectro de massas (Figura 61) mostra os mesmos padrões de fragmentação do ácido 3-clerodeno-15-óico, diferenciando apenas nas intensidades relativas entre os íons.

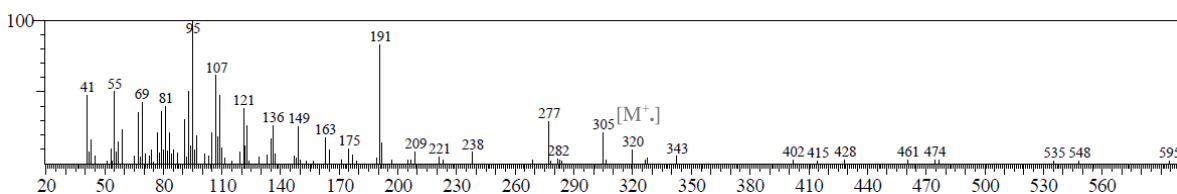


Figura 61. Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do isômero do ácido 3-clerodeno-15-óico obtido por CG-EM (impacto eletrônico)

5.6.1.2.1.6. ÁCIDO 3-CLERODENO-15-ÓICO

Nos extratos hexânicos sem derivatização foi detectada a presença de mesmo diterpeno, pois o pico da substância, tanto no EHCEduck quanto no EHCEglab1, possuem o mesmo tempo de retenção ($t_r = 32,3$ min) e apresentaram o mesmo padrão de fragmentação do espectro de massa, como pode-se observar no Figura 62.

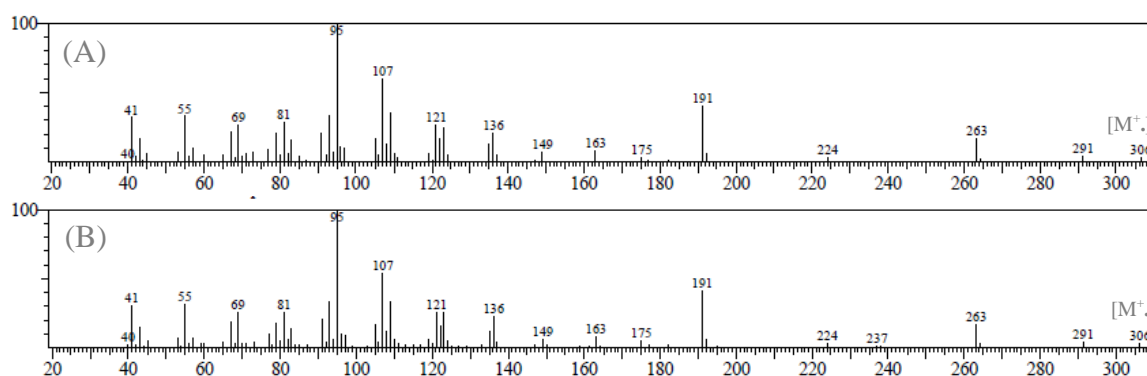


Figura 62. Espectros de massas da substância com $t_r = 32,3$ min. (A) *E. duckeana* e (B) *E. glabriflora*

Propõem-se que sejam ácidos diterpenos de esqueleto labdano, pois o íon molecular de m/z 306 é típico de ácido diterpênico e o pico base de m/z 95 é característica de diterpenos de esqueleto labdano.

A estrutura desse composto pôde ser confirmada após a esterificação do extrato. O composto foi identificado como éster metílico do ácido 3-clerodeno-15-óico. Este composto não foi anteriormente descrito em espécies de *Eperua*. O espectro de massas (Figura 63) e a rota de fragmentação proposta para os íons mais intensos (Figura 64) são apresentadas a seguir.

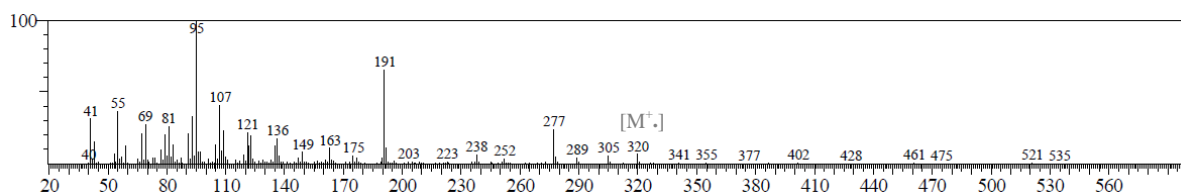


Figura 63. Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido 3-clerodeno-15-óico obtido por CG-EM (impacto eletrônico)

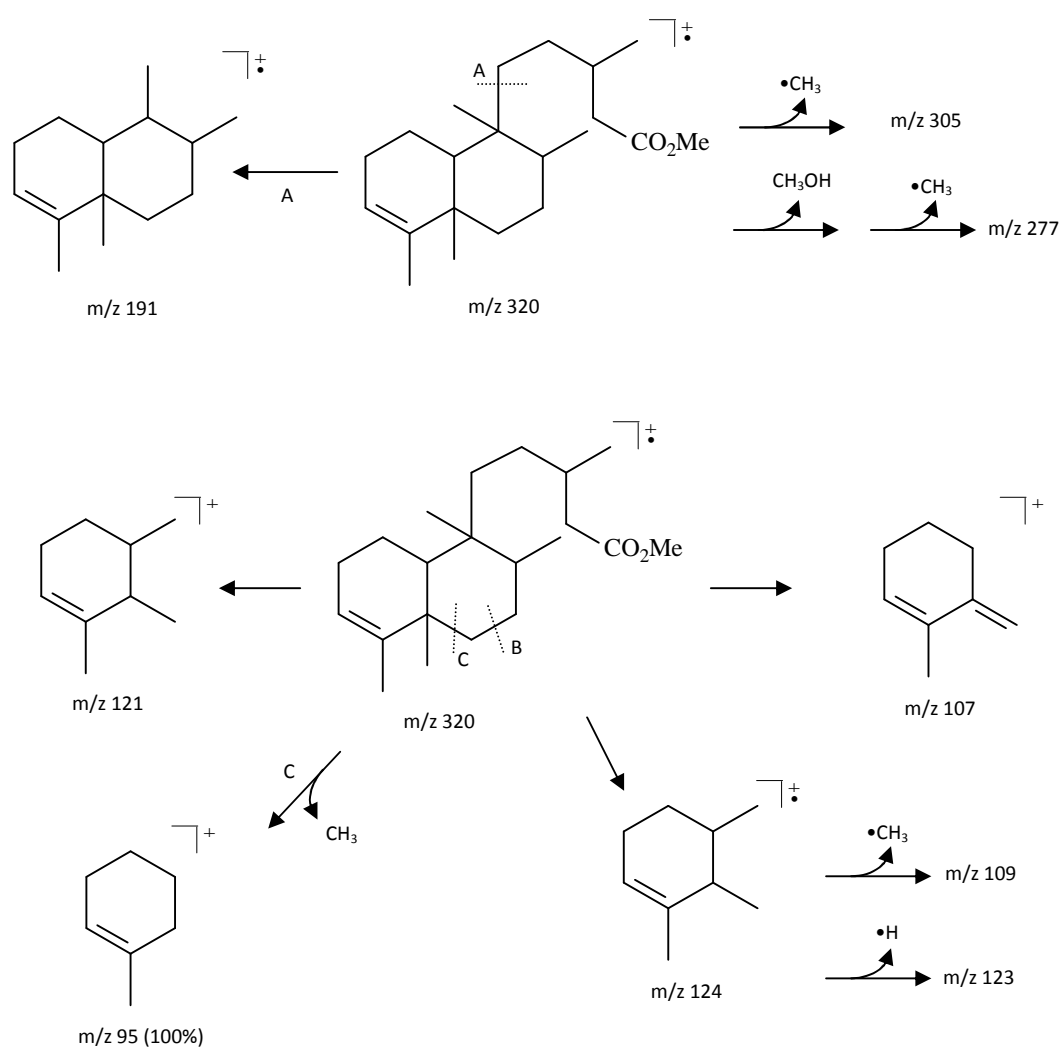


Figura 64. Fragmentação do composto identificado como éster metílico do ácido 3-clerodeno-15-óico (retirado de VEIGA-JUNIOR, 1997)

5.6.1.2.1.7. ÁCIDO CATÍVICO

O ácido labda-7-eno-15-óico (conhecido como ácido catívico) foi detectado no extrato hexânico da *E. glabriflora* (coletada em 2009) após derivatização, na forma de éster metílico. Esse ácido foi anteriormente isolado de *E. leucantha* (MAILLO *et al.*, 1987). O espectro de massas (Figura 65) e a proposta de fragmentação (Figura 66) são mostrados abaixo.

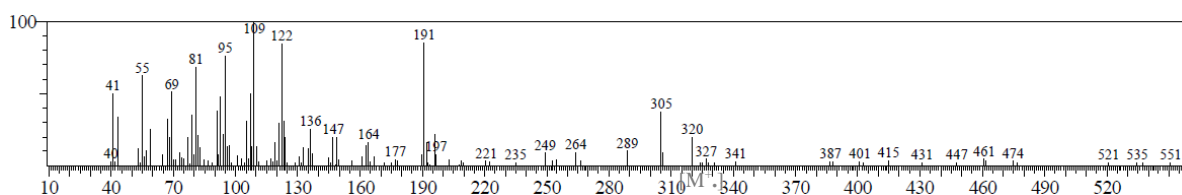


Figura 65. Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido catívico obtido por CG-EM (impacto eletrônico)

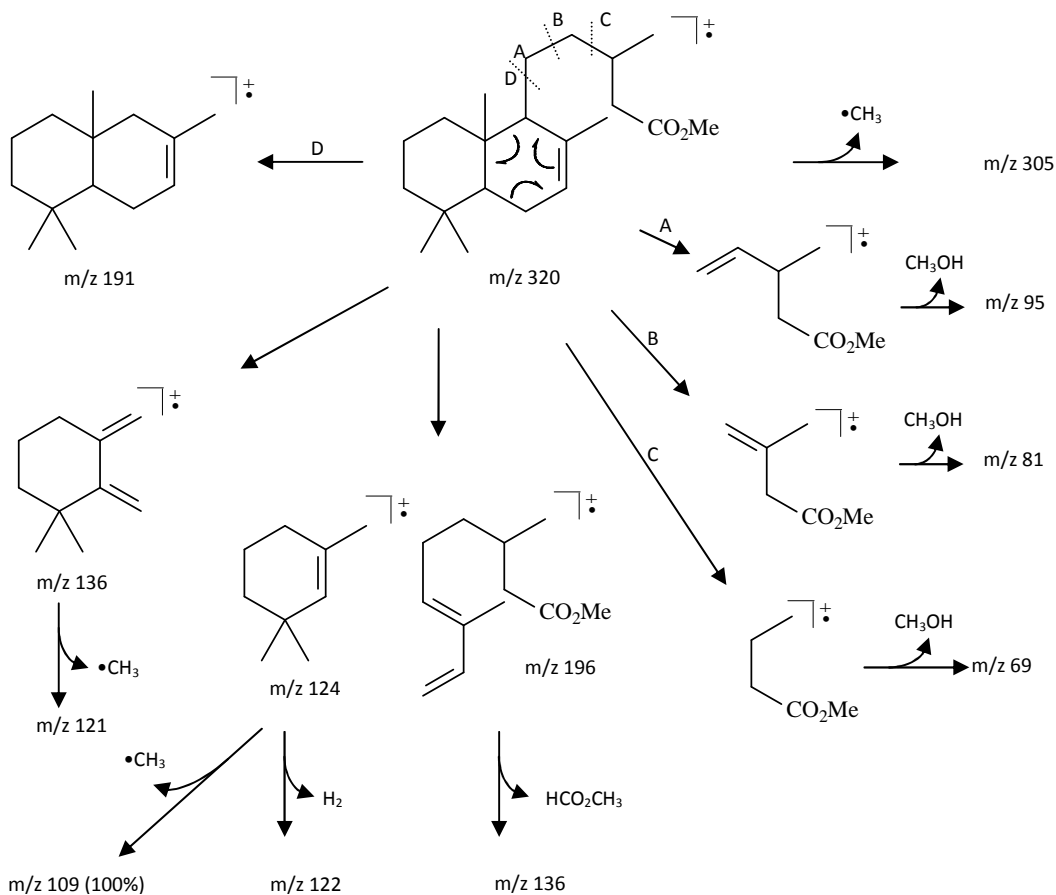


Figura 66. Mecanismo de fragmentação do éster metílico do ácido catívico (retirado de VEIGA-JUNIOR, 1997)

5.6.1.2.1.8. ÁCIDO DITERPÊNICO NÃO-IDENTIFICADO

Esse composto não pôde ser identificado, pois, a comparação com os dados da literatura não forneceu dados suficientes. O espectro de massas é mostrado na Figura 67. Pode-se sugerir que o composto é um diterpeno, pois apresentou fragmentos característicos de diterpenos, como por exemplo, o pico base de m/z 95. O composto apresentou íon molecular de m/z 318.

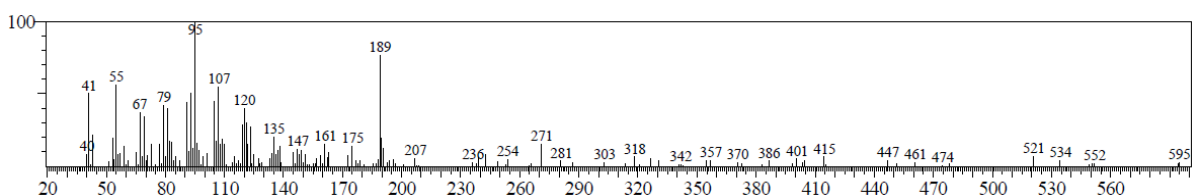


Figura 67. Espectro de massas do éster metílico do ácido diterpênico não identificado

5.6.1.2.1.9. ÁCIDO GRAXO NÃO-IDENTIFICADO

O composto de tempo de retenção de 41,03 min não pode ser identificado pelos dados fornecidos pelo espectro de massas, porém, pode-se sugerir que esse composto seja um ácido graxo, pois apresentou características típicas de compostos graxos, tais como: sequência de fragmentação sendo caracterizado por aglomerados de picos afastados um dos outros por 14 unidades de massa (CH_2).

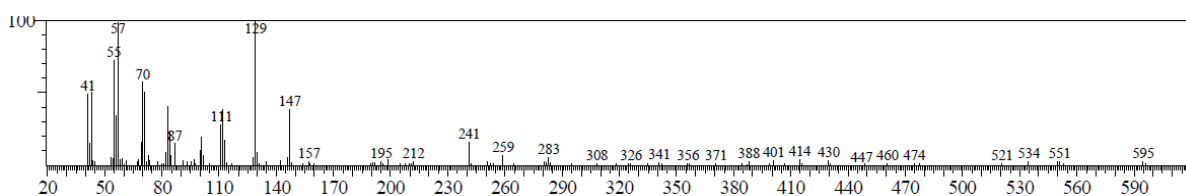


Figura 68. Espectro de massas do éster metílico de um ácido graxo não identificado obtido por CG-EM (impacto eletrônico)

5.6.1.2.1.10. ÁCIDO 3-HIDROXI-LABDA-7,13-DIENO-15-ÓICO

O ácido 3-hidroxi-labda-7,13-dieno-15-óico foi detectado no extrato hexânico da *E. glabriflora* (coletada em 2009). A comparação com a literatura mostrou o mesmo padrão de fragmentação do éster metílico do ácido 3-hidroxi-labda-7,13-dieno-15-óico. O espectro de massas (Figura 69) e a proposta de fragmentação (Figura 70) estão mostrados a seguir.

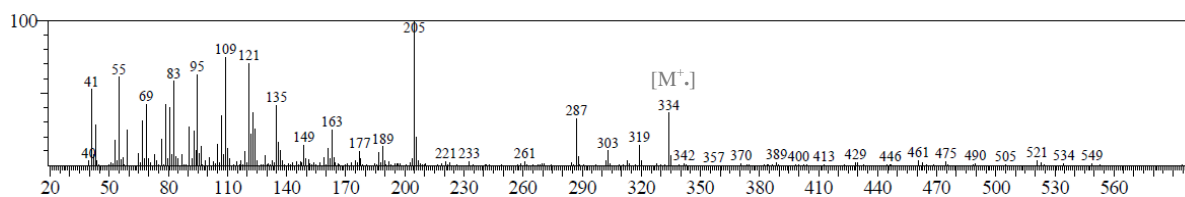


Figura 69. Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido 3-hidroxi-labda-7,13-dieno-15-óico obtido por CG-EM (impacto eletrônico)

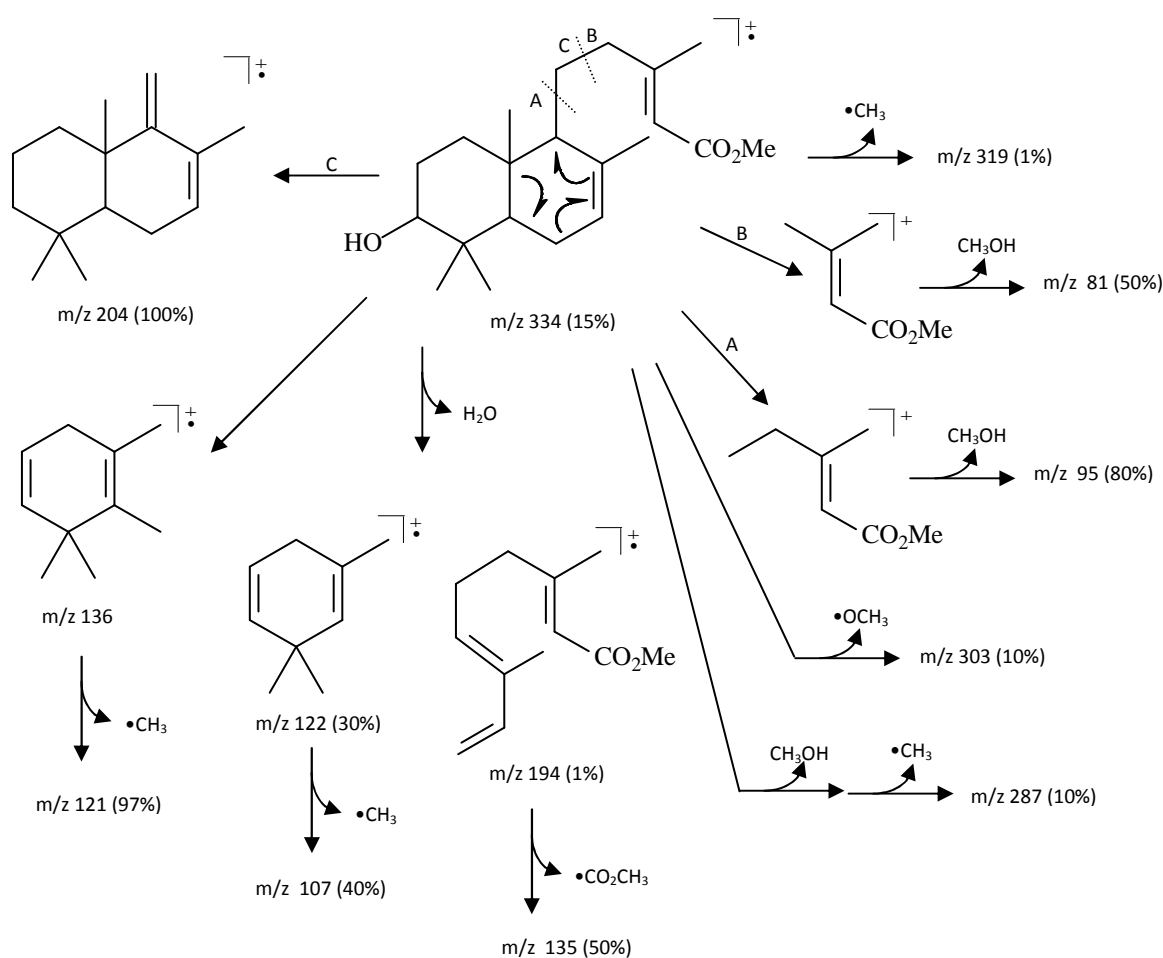


Figura 70. Fragmentação do composto identificado como éster metílico do ácido 3-hidroxi-labda-7,13-dieno-15-óico (retirado de VEIGA-JUNIOR, 1997)

Cont. da Figura 70

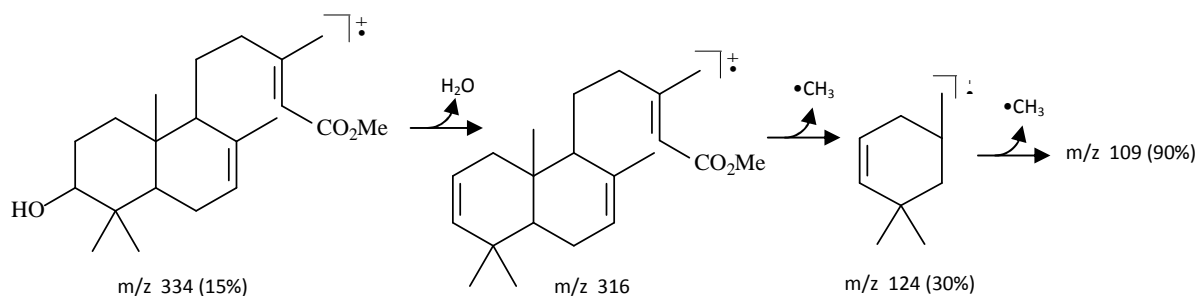


Figura 70. Fragmentação do composto identificado como éster metílico do ácido 3-hidroxi-labda-7,13-dieno-15-óico (retirado de VEIGA-JUNIOR, 1997)

5.6.1.2.1.11. ÁCIDO TETRACOSANÓICO (ÁCIDO LIGNOCÉRICO)

O ácido tetracosanóico, também conhecido como ácido lignocérico, foi detectado nos extratos hexânicos da *E. glabriflora* e *E. duckeana* nas proporções de 3% e 8%, respectivamente. A Figura 71 mostra a estrutura do ácido tetracosanóico o qual foi detectado na forma de éster metílico por causa da esterificação do extrato com TMS.

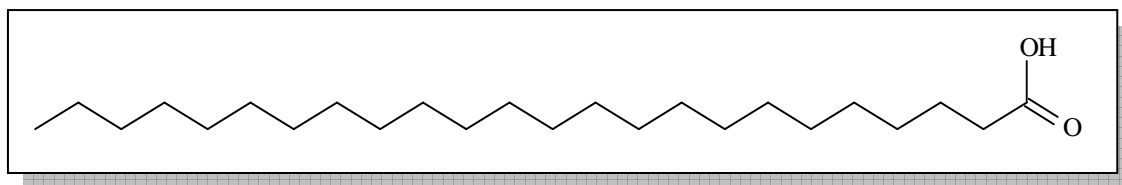


Figura 71. Estrutura do ácido tetracosanóico

O espectro do tetracosanoato de metila está mostrado na Figura 72. O íon molecular é representado pelo fragmento de m/z 382. O pico base de m/z 74 é originado do rearranjo de McLafferty, como mostrado na Figura 52.

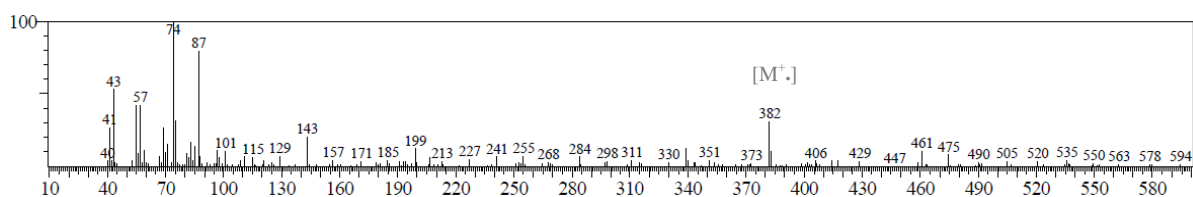


Figura 72. Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido lignocérico obtido por CG-EM (impacto eletrônico)

5.6.1.2.1.12. ÁCIDO HEXACOSANÓICO (ÁCIDO CERÓTICO)

O ácido hexacosanóico, conhecido também como ácido cerótico, foi detectado nos extratos hexânicos da *E. glabriflora* (coletado em 2008) e no da *E. duckeana* nas proporções de 9% e 18%, respectivamente.

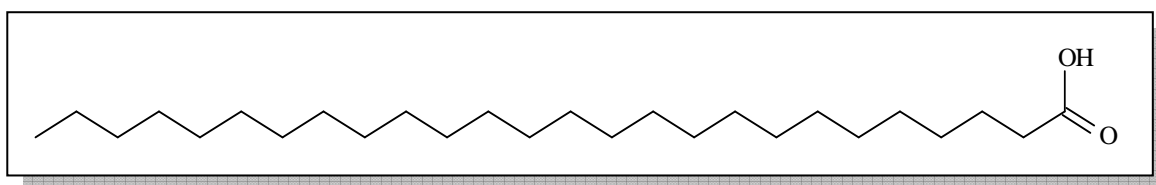


Figura 73. Estrutura do ácido hexacosanóico

O espectro do hexacosanoato de metila é mostrado na Figura 74. O íon molecular é representado pelo fragmento de m/z 410. O pico base de m/z 74 é originado do rearranjo de McLafferty, como mostrado na Figura 52.

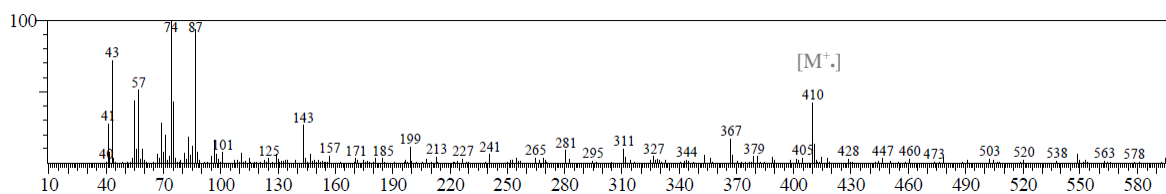


Figura 74. Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido hexacosanóico obtido por CG-EM (impacto eletrônico)

5.6.1.2.1.13. ÁCIDO GRAXO NÃO-IDENTIFICADO

A substância não pode ser identificada, porém sugeriu-se que esse composto trata-se de um ácido graxo, pois a sequência de fragmentação difere em 14 unidades (CH_2). O espectro da substância em questão está mostrada na Figura 75.

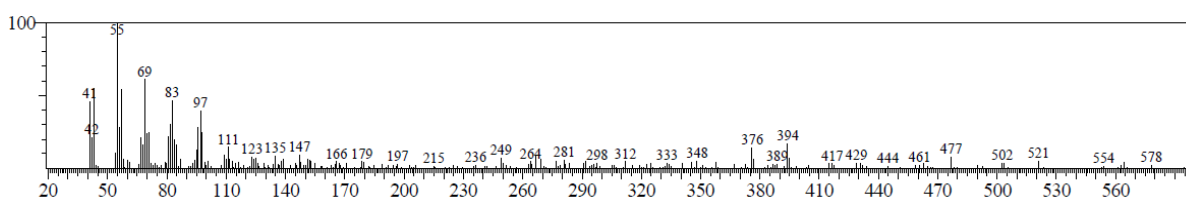


Figura 75. Espectro de massas da substância identificada como éster metílico do ácido graxo não identificado obtido por CG-EM (impacto eletrônico)

5.6.1.2.1.14. ESQUALENO

A substância com o tempo de retenção em 39,4 min foi identificada como sendo o hidrocarboneto esqualeno ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}$).

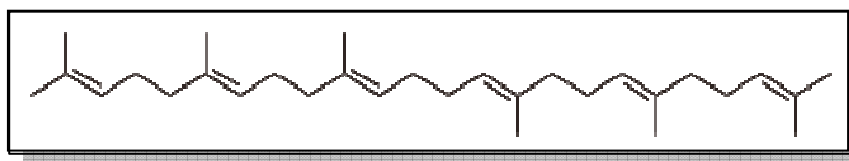


Figura 76. Estrutura do esqualeno.

Os espectros das substâncias que apresentaram t_r 39,4 min para EHCEduck (A) e EHCEglab (B) juntamente com o espectro do esqualeno fornecido pela espectroteca estão mostradas na Figura 77. O pico base de m/z 69 é fragmento resultante de uma clivagem alílica (Figura 78).

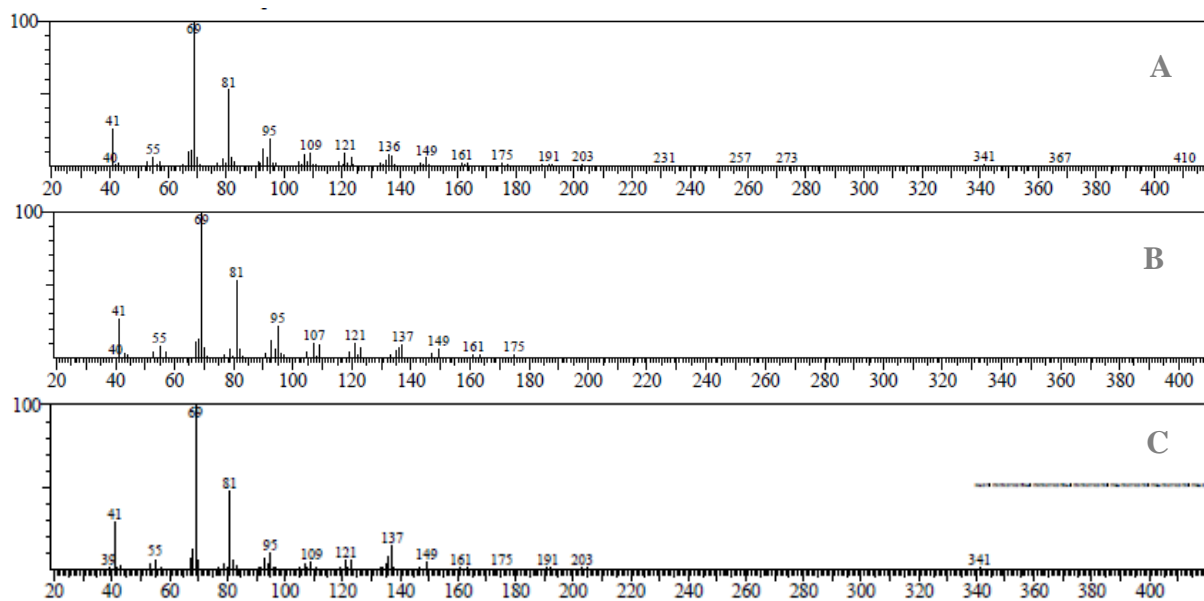


Figura 77. Espectros de massas da substância identificada como esqualeno, obtido por CG-EM (impacto eletrônico): (A) EHCEduck e (B)EHCEglab; (C) Espectro de massas obtido da biblioteca Wiley (esqualeno).

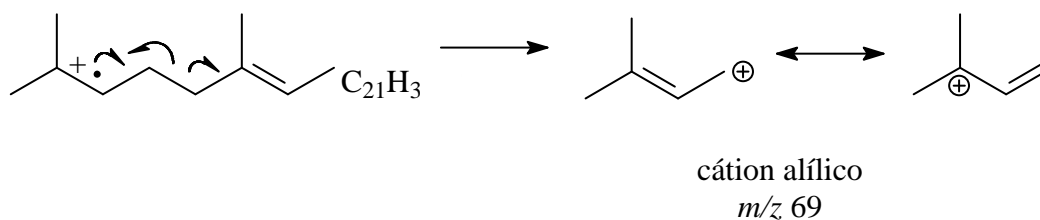


Figura 78. Clivagem alílica do esqualeno.

O íon molecular do esqualeno sofre fragmentação através de clivagem homolítica de uma ligação simples produzindo cátion alílico (m/z 69) estabilizado por ressonância (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

5.6.1.2.1.15. α -TOCOFEROL

A substância com o tempo de retenção em 41,6 min foi identificada como sendo o α -tocoferol (vitamina E) de fórmula molecular $C_{29}H_{50}O_2$.

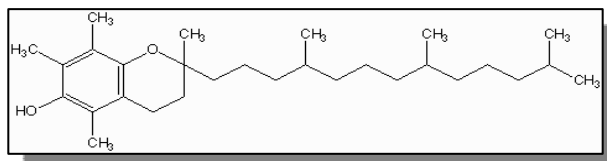


Figura 79. Estrutura do α -tocoferol

Os espectros apresentam apenas dois picos intensos: o íon molecular de m/z 430 e pico base de m/z 165 (Figura 80). O íon molecular (m/z 430) sofre um processo de fragmentação através de um rearranjo de hidrogênio (rH) uma reação de retro Diels-Alder (RDA) no anel pirânico do tocoferol, para dar origem ao íon m/z 165 conforme Figura 81 (SIQUEIRA *et al.*, 2003).

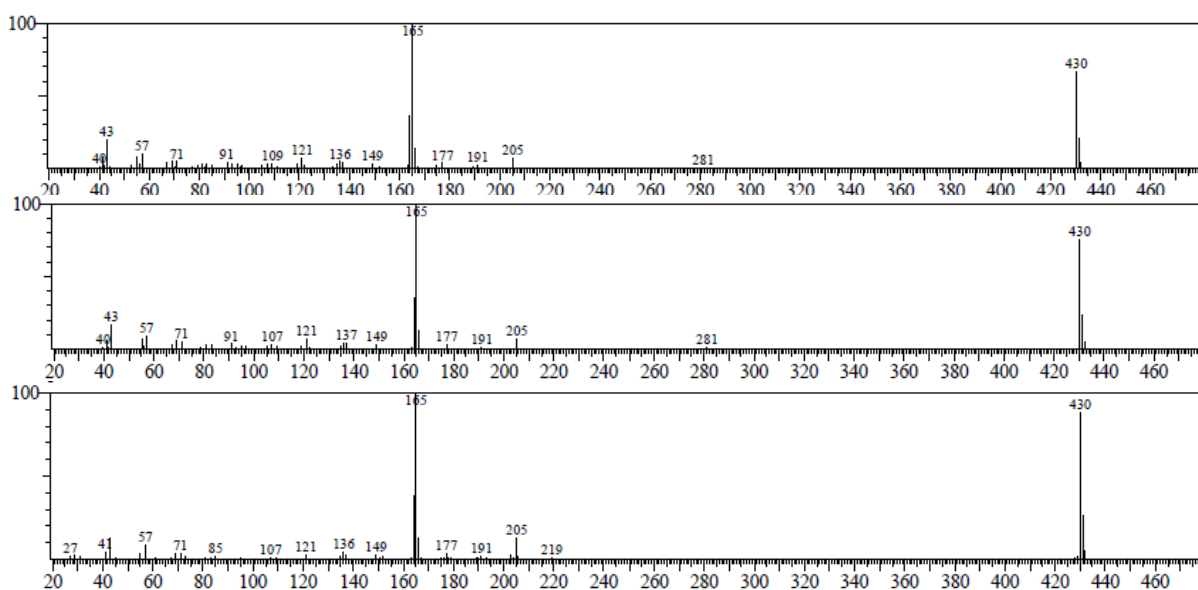


Figura 80. Espectros de massas da substância com $t_r = 41,6$ minutos dos extratos de *E. duckeana* e *E. glabriflora*, além do espectro fornecido pela espectroteca Wiley para o α -tocoferol

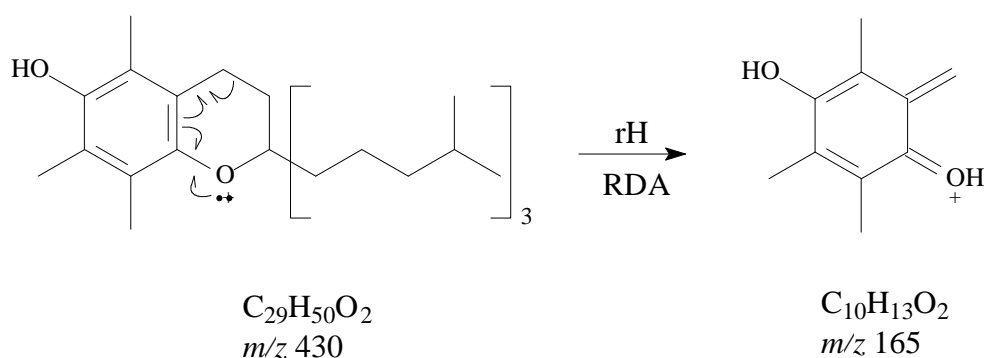


Figura 81. Fragmentação do α -tocoferol

5.6.1.2.1.16. ESTIGMASTEROL

Os espectros das substâncias com $t_r = 42,5$ min dos extratos da *E. duckeana* e *E. glabriflora* apresentaram padrão de fragmentação semelhante ao espectro de massa do estigmasterol ($C_{29}H_{48}O$) como mostra a Figura 83.

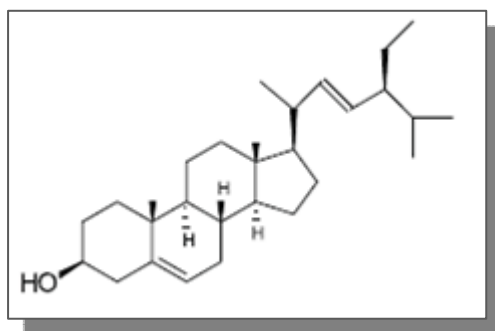


Figura 82. Estrutura do estigmasterol.

É possível observar nos espectros o pico do íon molecular m/z 412 e o pico base de m/z 55, provavelmente com estrutura de fórmula $C_4H_7^+$. O pico de m/z 255 é formado a partir da perda de uma molécula de água seguida da perda da cadeia lateral ligada ao anel pentacíclico, fragmentação semelhante ocorre com o β -sitosterol, como mostrado na Figura 86.

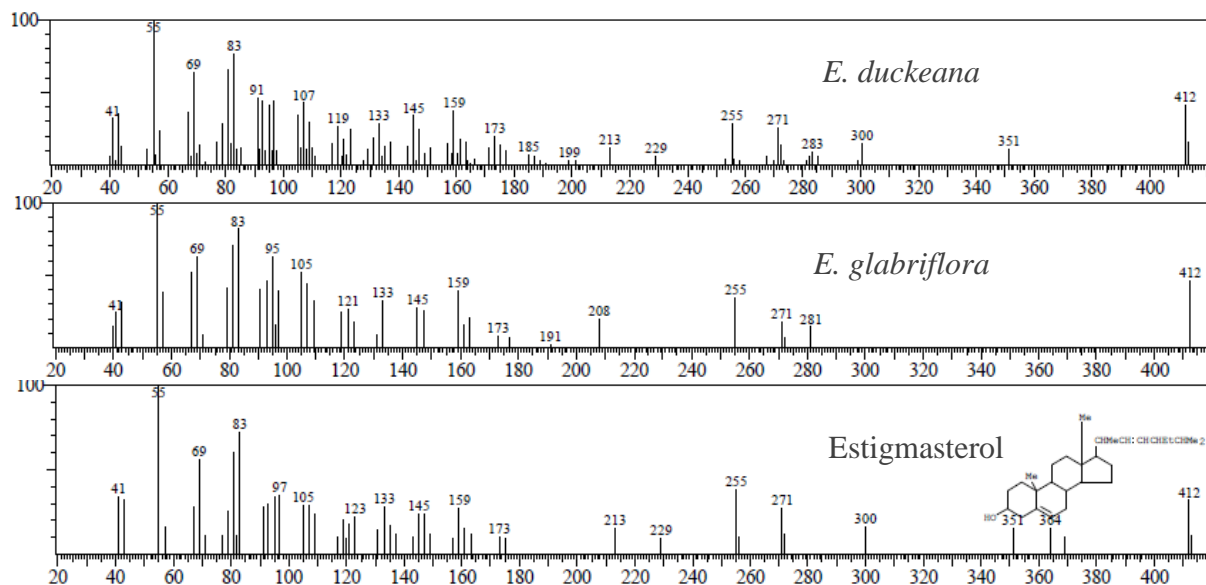


Figura 83. Espectros de massas das substâncias com $t_r = 42,5$ minutos dos extratos de *E. duckeana* e *E. glabriflora*, além do espectro fornecido pela espectroteca Wiley para o estigmasterol

5.6.1.2.1.17. β -SITOSTEROL

As substâncias com o tempo de retenção em 43,1 min foram identificadas como sendo o esteroide β -sitosterol ($C_{29}H_{50}O$).

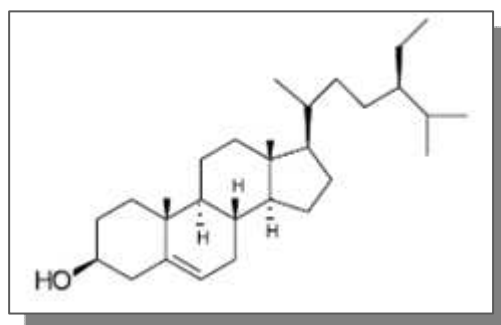


Figura 84. Estrutura do β -sitosterol

O espectro de massa do β -sitosterol (Figura 59) apresenta íon molecular de m/z 414, seguido de um pico em m/z 396 devido à perda de uma molécula de água [(M-H₂O)]. O pico em m/z 43 (pico base) pode ter estrutura de fórmula $C_3H_7^+$, como mostrada na Figura 86.

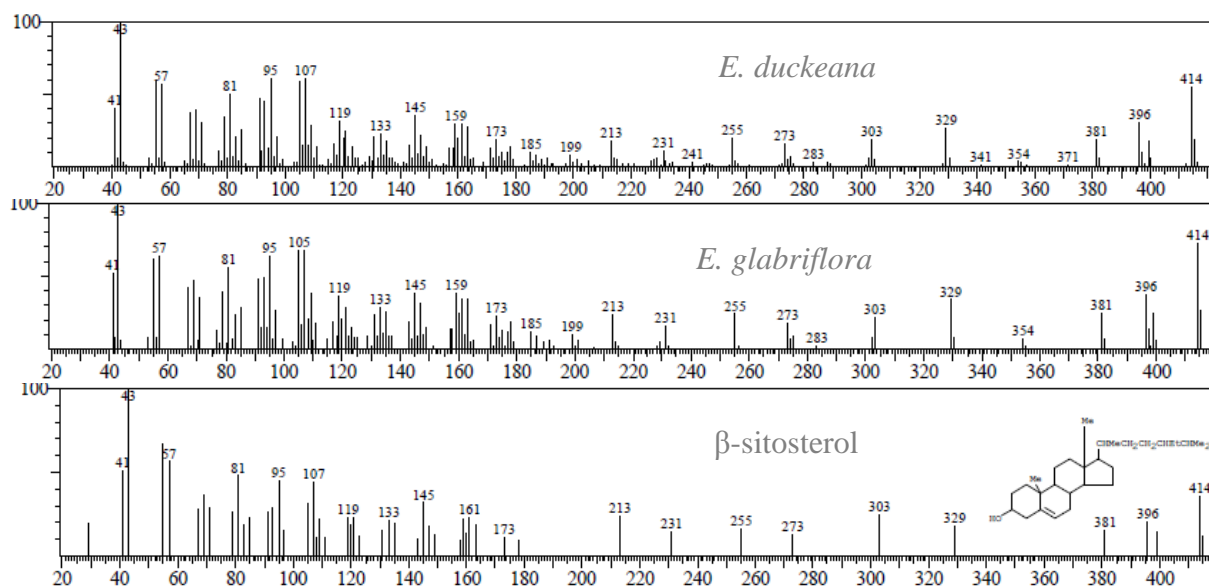


Figura 85. Espectros de massas da substância de $t_r = 43,1$ minutos do extratos de *E. duckeana* e *E. glabriflora*, além do espectro fornecido pela espectroteca Wiley para o β -sitosterol

O fragmento de m/z 396 perde uma metila para originar o fragmento de m/z 381, este por sua vez, perder a cadeia lateral ligada ao anel pentacíclico originando o pico de m/z 255 (Figura 86).

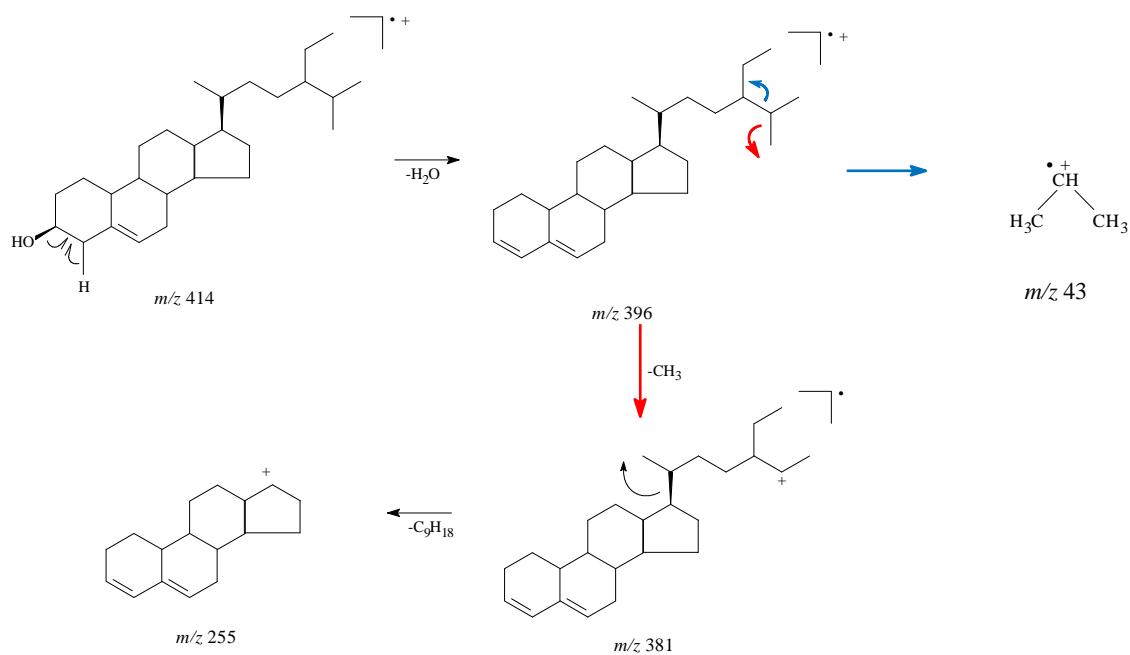
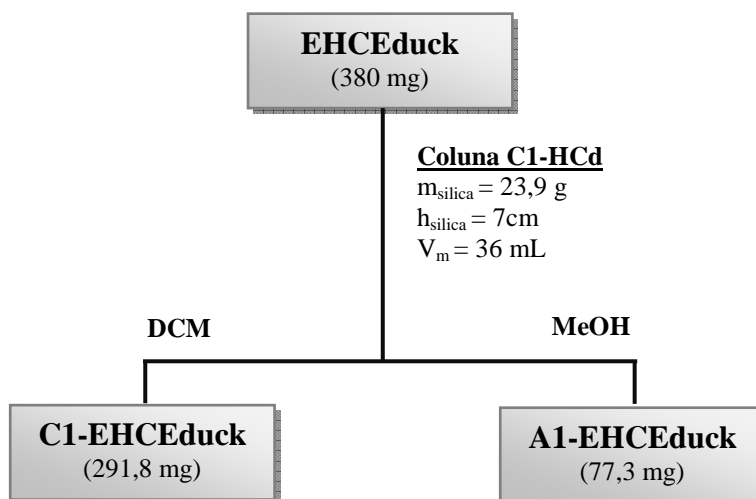


Figura 86. Proposta de fragmentação do β -sitosterol

5.6.1.3. FRACIONAMENTOS CROMATOGRÁFICOS DO EXTRATO OBTIDO EM HEXANO DAS CASCAS DA *E. duckeana* (EHCEduck)

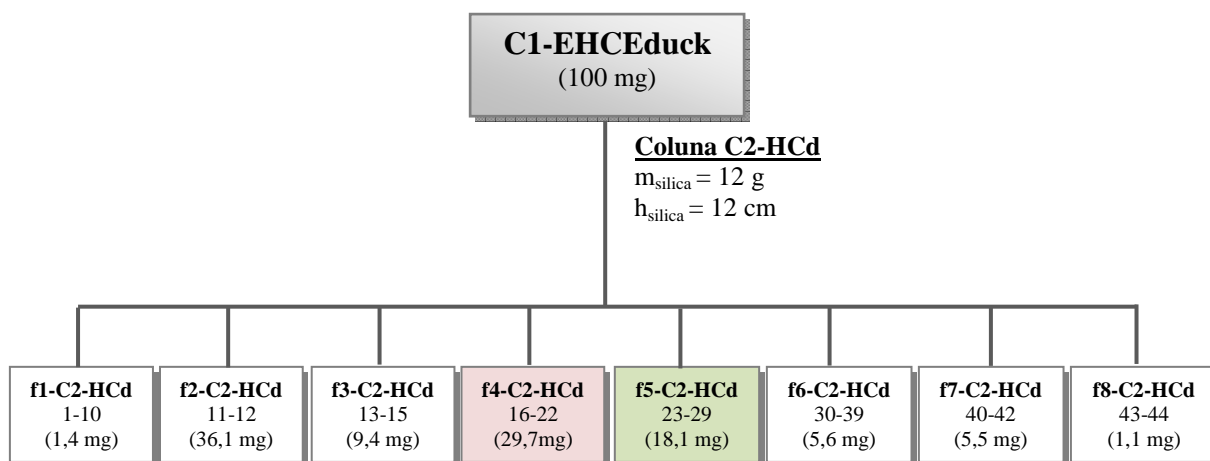
Uma porção (380 mg) do extrato foi pré-fracionado em coluna ($\varnothing = 2,5\text{cm}$) de sílica gel impregnada com KOH (ver seção 4.1.3. dos Materiais e Métodos, pág 69). Foram coletadas 2 frações, uma com 290 mL de DCM e outra com 100 mL de MeOH. A fração recolhida em MeOH é a fração que contém os ácidos na forma de sais. Então, após a retirada do excesso do solvente em evaporador rotatório, a fração foi acidificada para a protonação dos ácidos e em seguida foi realizada uma partição líquido-líquido com DCM. As duas frações obtidas no pré-fracionamento, C1-EHCEduck e A1-EHCEduck, foram submetidas a fracionamentos posteriores como descrito a seguir. A massa do extrato utilizado no fracionamento e das frações obtidas, assim como os dados do pré-fracionamento, estão mostrados no Esquema 4.



Esquema 4. Pré-fracionamento do extrato hexânico das cascas da *E. duckeana* (EHCEduck)

5.6.1.3.1. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO C1-EHCEduck

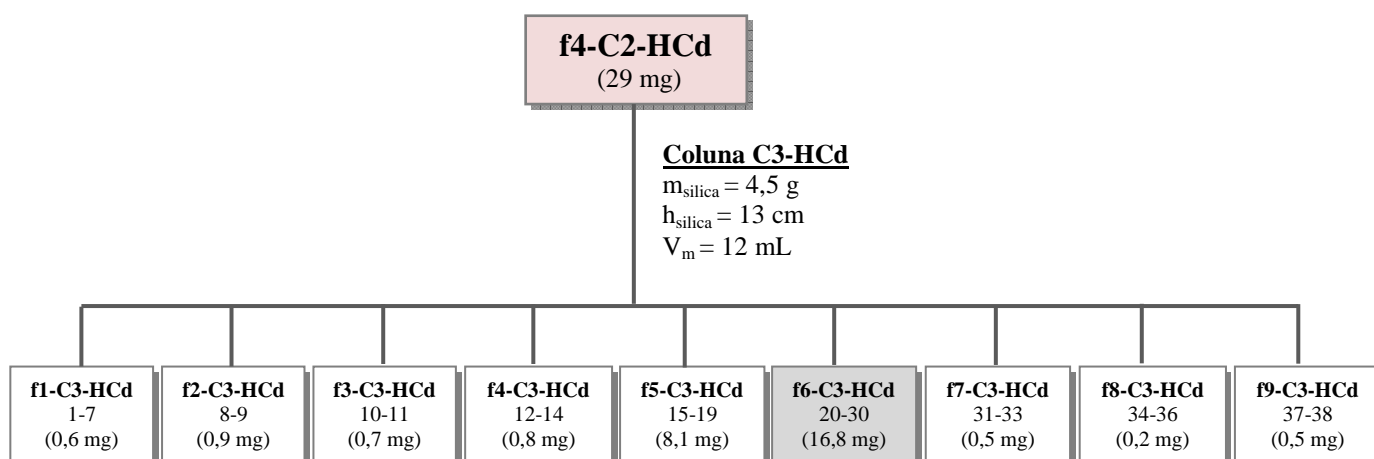
Uma porção (100 mg) da fração neutra C1-EHCEduck foi fracionada utilizando-se coluna cromatográfica ($\varnothing = 2,0$ cm) de sílica gel (70-230 mesh). Usou-se hexano como eluente aumentando gradativamente a polaridade com o acréscimo de acetato de etila (AcOEt), com as proporções de AcOEt: 0, 2, 4, 6, 10, 12, 16, 18, 20, 25 e 100%. Foram recolhidas 44 frações de aproximadamente 10 mL cada. Após análise em CCD, as frações foram reunidas de acordo com seu perfil cromatográfico em 8 novas frações, como mostrado no Esquema 5. As frações f4-C2-HCd e f5-C2-HCd foram as escolhidas para a continuação do fracionamento (pág. 153 e 155, respectivamente). As massas das frações obtidas estão mostradas no Esquema 5.



Esquema 5. Fracionamento da fração não-ácida do EHCEduck

5.6.1.3.1.1. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO f4-C2-HCd

A fração f4-C2-HCd (m= 29 mg) foi submetida a cromatografia em coluna ($\phi = 1,0$ cm) de sílica gel (70-230 mesh). Usou-se como eluente Hex e Et₂O nas proporções de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50 e 100% deste último. Foram recolhidas 38 frações de 3 mL cada e após análise em CCD foram agrupadas em 9 frações, conforme Esquema 6. As massas das frações obtidas estão mostradas no Esquema 6. Optou-se por purificar a frações f6-C3-HCd por CCDP, por apresentar maior quantidade de material e uma substância majoritária.



Esquema 6. Fracionamento da fração f4-C2-HCd

5.6.1.3.1.2. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO f6-C3-HCd

A fração f6-C3-HCd (aproximadamente 16 mg) foi submetido à cromatografia em camada delgada preparativa (sílica gel HF254) utilizando-se como eluente Hex/Et₂O 7:3. A placa foi eluída duas vezes. Uma mancha azul fluorescente no UV-365nm foi retirada da placa e identificada como f1-PP1-HCd, esta fração apresentou-se como um sólido branco amorfo (5,3 mg) e foi enviado para análise no CG-DIC e CG-EM.

5.6.1.3.1.3. FRAÇÃO f1-PP1-HCd

O cromatograma de íons totais da fração f1-PP1-HCd revelou que essa fração é constituída de uma mistura. A mistura possui uma substância majoritária (44,5%) com tempo de retenção em 15,5 min, como observada no cromatograma de íons totais da Figura 87. A espectroteca sugeriu que essa substância majoritária seja o lupeol, com índice de similaridade igual superior à 90% (Figura 88).

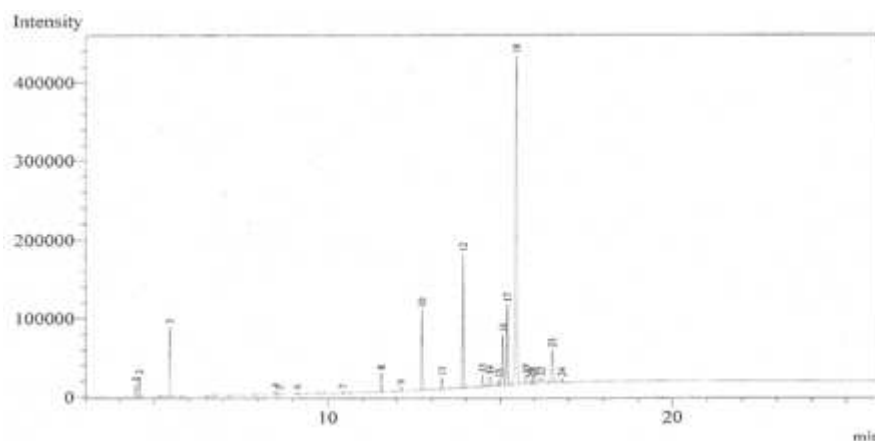


Figura 87. Cromatograma de íons totais da fração f1-PP1-HCd

O espectro de massas do pico de tempo de retenção 15,5 minutos apresentou os seguintes fragmentos de m/z 426 [M^+], 218, 207, 135, 109, 81, 68, 43 (Figura 88-A). Porém, com apenas os dados de CG-EM não é possível afirmar que a substância seja o álcool triterpênico lupeol.

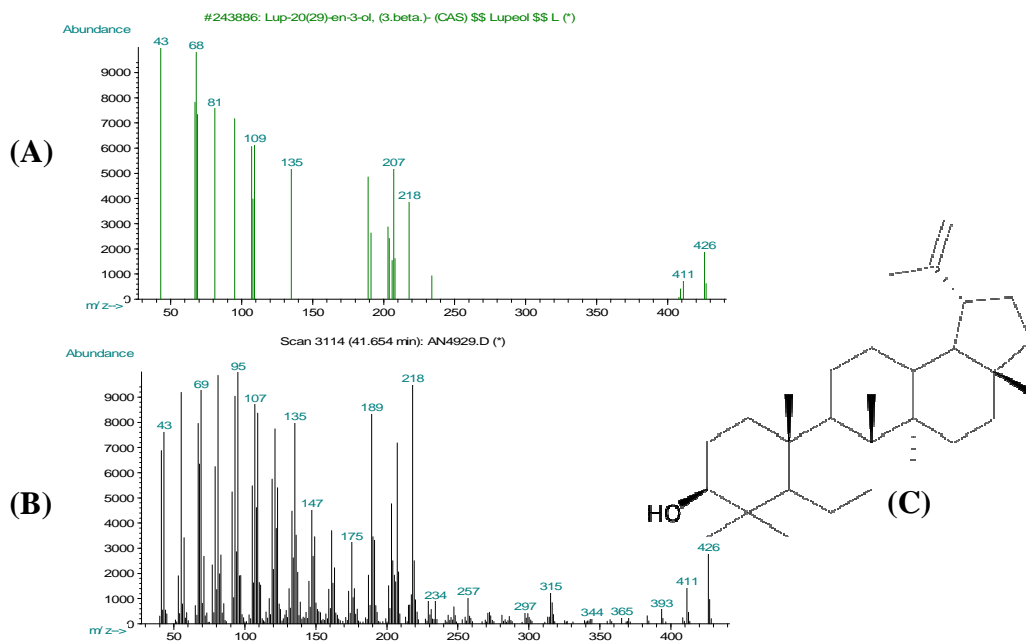


Figura 88. Espectro de massas do pico de tempo de retenção 15,5 minutos da fração f1-PP1-HCd (A); espectro de massa do lupeol fornecido pela espectroteca Wiley (B) e estrutura do lupeol (C)

5.6.1.3.1.4. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO f5-C2-HCd

A fração f5-C2-HCd (aproximadamente 15 mg) foi submetida a cromatografia em placa delgada preparativa. Utilizou-se Hex/CHCl₃/Acetona 5:5:1 como eluente. A revelação da placa preparativa foi realizada com solução de sulfato cérico (ver procedimento na seção 4.1.2 dos Materiais e Métodos, pág. 67). A mancha de R_f 0,41 foi separada e identificada como f4-PP2-HCd. A fração foi analisada por CG-EM, RMN ¹H e ¹³C e bidimensionais e os resultados estão descritos a seguir.

5.6.1.3.1.5 FRAÇÃO f4-PP2-HCd

A fração f4-PP2-HCd caracterizou-se com um sólido branco cristalino, solúvel em CHCl_3 . Em CCD, essa fração apresentou-se como uma mancha de R_f 0,32, quando eluída em Hex/ CHCl_3 /Acetona 5:5:1. Quando revelada em sulfato cérico, apresentou mancha de cor azul que com o passar do aquecimento, em chapa aquecedora, torna-se lilás. A fração foi analisada por CG-DIC, IV, RMN ^1H e ^{13}C e HSQC.

O espectro de absorção de IV revelou na região de 3432 cm^{-1} uma banda de absorção do grupamento hidroxila, característico de álcool, confirmada pela banda em 1055 cm^{-1} responsável pelo estiramento C-O. O espectro mostrou bandas intensas na região de 2958 cm^{-1} , 2936 cm^{-1} ; 2867 cm^{-1} atribuídas as vibrações C-H alifáticas e banda em 1641 cm^{-1} característica de absorção de estiramento do C=C (BARBOSA, 2007).

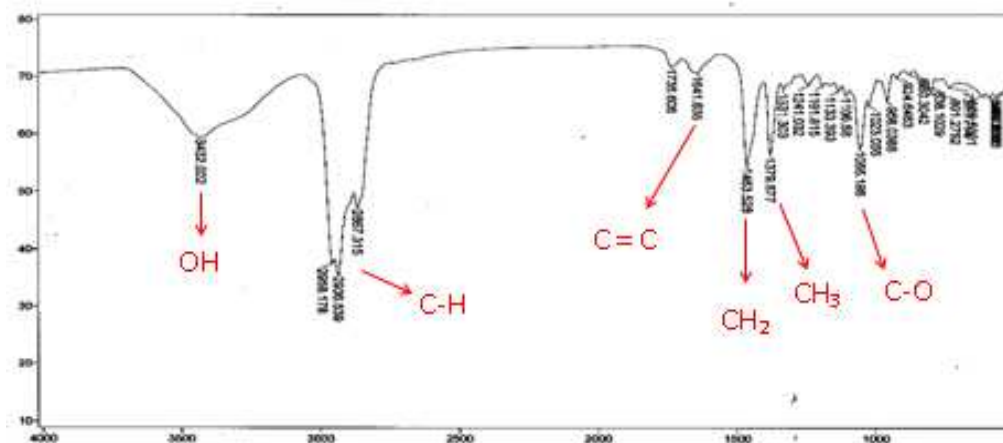


Figura 89. Espectro de Infravermelho da fração f4-PP2-HCd

A análise por CG-DIC (Figura 90) da fração f4-PP2-HCd resultou em um cromatograma com pelo menos 3 substâncias com tempo de retenção (área do pico): 23,914 min (**1**: 8,9%); 24,634 minutos (**2**: 13,8%) e 26,015 minutos (**3**: 68,7%).

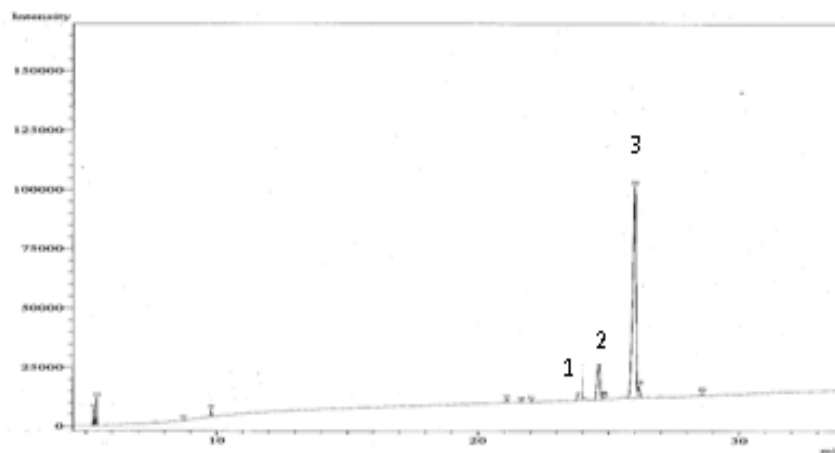


Figura 90. Cromatograma de íons totais da fração **f4-PP2-HCd**

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 91) e DEPT 135° apresentaram 6 sinais de carbonos metílicos δ_{CH} 12,09 (C-18), δ_{CH} 19,62 (C-19), δ_{CH} 19,01 (C-21), δ_{CH} 20,04 (C-26), δ_{CH} 19,27 (C-27) e δ_{CH} 12,21 (C-29); 11 sinais de carbonos metilênicos; 9 sinais de carbonos metínicos, listados na Tabela 25; e 3 sinais de carbonos não hidrogenados: δ_{C} 141,00 (C-5), δ_{C} 36,74 (C-10) e δ_{C} 42,55 (C-13). O sinal em δ_{C} 77,00 (triplete) refere-se ao solvente utilizado para a solubilização da amostra, CDCl_3 (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

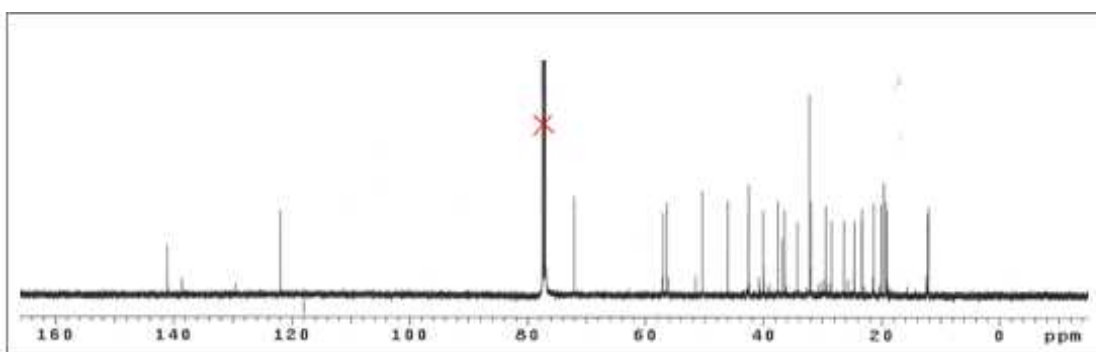


Figura 91. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da fração **f4-PP2-HCd**

O espectro de RMN ^1H (Figura 92) sugeriu a presença de uma mistura complexa de substâncias de núcleo esteroidal. Essa suposição foi feita com base nos seguintes sinais: o duplete em δ_{H} 5,35 (d, $J=5,5$) correspondentes ao hidrogênio olefínico H-6 do anel B do núcleo esteroidal; o sinal δ_{H} 3,52 (m) atribuído ao hidrogênio carbinólico em H-3 do anel A e

a região bastante complexa entre δ_H 0,6 e δ_H 2,4, característico de esteróis (RUIZ, 2003; LIMA, 2005; OLIVEIRA, 2005; SANNOMIYA, 2001). O sinal em δ_H 7,26 (singleto) refere-se ao solvente utilizado para a solubilização da amostra, $CDCl_3$ (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os sinais correspondentes aos hidrogênios H-3 e H-6 são facilmente identificáveis, pois encontram-se em região mais desblindada que o restante dos hidrogênios, esse fato ocorre devido a esses dois hidrogênios estarem em ambientes mais eletronegativos, no caso do H-3, está ligado à um carbono carbinólico e no caso do H-6 está ligado a um átomo de carbono hibridizado sp^2 . Esses deslocamentos facilitaram a correlação com os carbonos correspondentes: H-3/C-3 (δ_H 3,52/ δ_C 72,05) e H-6/C-6 (δ_H 5,35/ δ_C 121,94) em HSQC, mostrado em vermelho na Figura 93-A.

A região complexa entre δ_H 0,6 e δ_H 2,4 (Figura 92-C) foi analisada através do mapa de contornos HSQC e pode-se sugerir que região entre δ_H 0,6 - 1,0 ppm pode ser atribuída aos hidrogênios metílicos (CH_3). Foram observadas correlações entre H-18/C-18 (δ_H 0,68/ δ_C 12,09); H-19/C-19 (δ_H 1,01/ δ_C 19,64), H-21/C-21 (δ_H 0,92/ δ_C 19,01), H-26/C-26 (δ_H 0,82/ δ_C 29,04), H-27/C-27 (δ_H 0,81/ δ_C 19,27) e H-29/C-29 (δ_H 0,84/ δ_C 12,21) como mostrado na Figura 93-B. A região complexa entre δ_H 1,0 - 2,3 ppm pode ser atribuída aos grupos metilênicos (CH_2) e metínicos (CH).

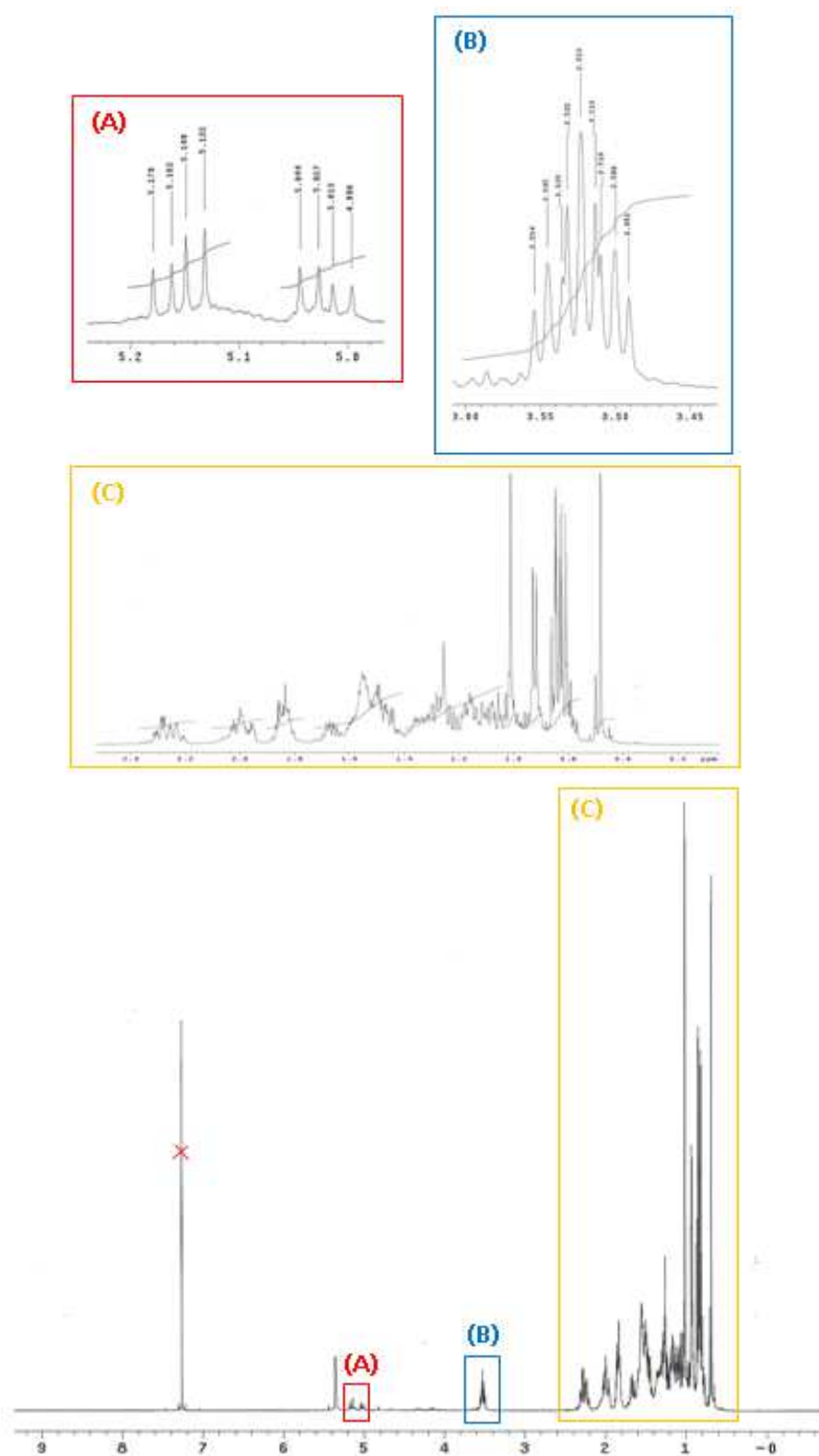


Figura 92. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração f4-PP2-HCd. (A) Ampliação da região δ_{H} 5,2- 5,0 ppm; (B) Ampliação da região δ_{H} 3,60- 3,45 ppm; (C) Ampliação da região δ_{H} 2,4- 0,4 ppm

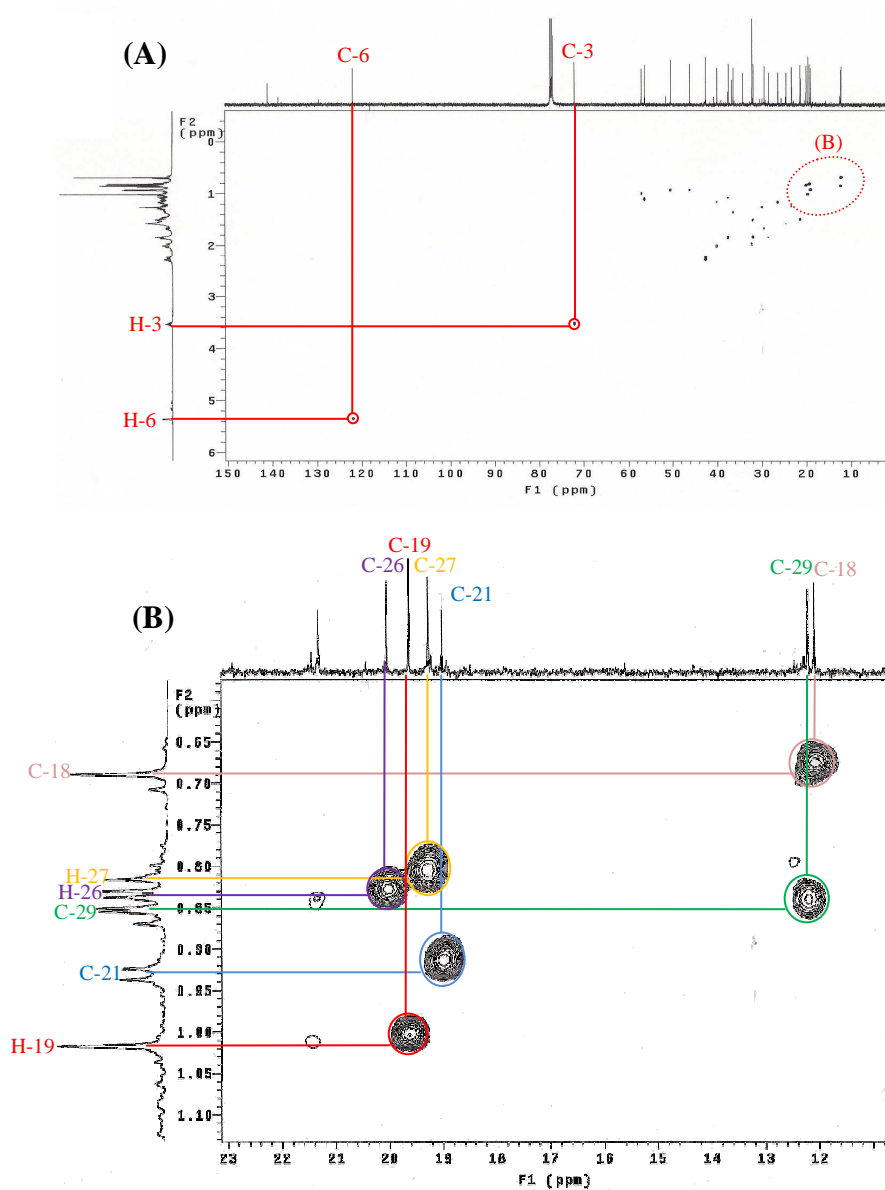


Figura 93. Mapa de contornos HSQC (125 MHz, CDCl_3) de f4-PP2-HCd (A); (B) Expansão na região entre δ_{C} 23-11 ppm e δ_{H} 0,60-1,10 ppm

Os valores obtidos nos RMN ^1H e ^{13}C e HSQC, juntamente com a comparação com os dados da literatura (PATRA *et al.*, 2010; WRIGHT *et al.*, 1978; FACUNDO *et al.*, 2008), levaram a identificação da fração f4-PP2-HCd como sendo uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol (Figura 94).

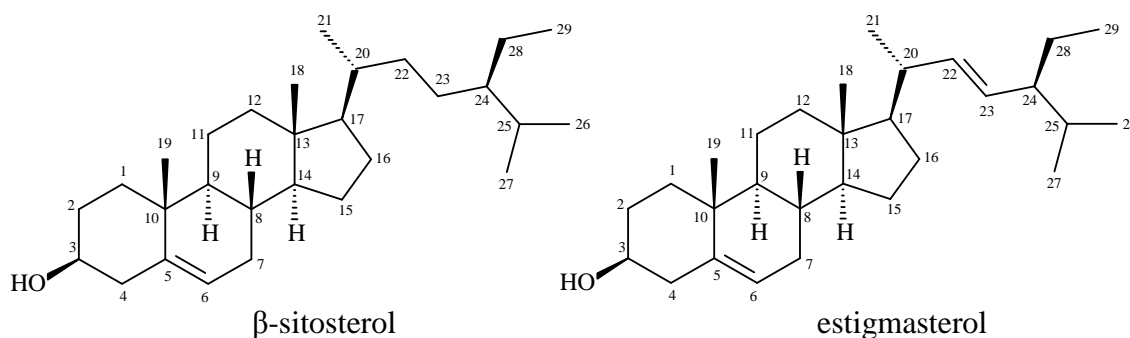


Figura 94. Estruturas do β -sitosterol e do estigmasterol

O que difere os dois esteróis é a ligação dupla entre os carbonos C-22 e C-23 da cadeia lateral. Por tanto, a presença do estigmasterol (em menor proporção) na mistura foi sugerida pelos duplos dubletos em δ_{H} 5,02 (dd, $J=8,5$ e $15,5$) e δ_{H} 5,152 (dd, $J=8,5$ e $15,5$) atribuídos aos hidrogênios H-22 e H-23, respectivamente. A constante de acoplamento $J=8,5$ é característica de ligação *trans*. Além da presença de dois sinais de menor intensidade no RMN ^{13}C em δ_{CH} 138,53 (C-22), δ_{CH} 129,50 (C-23) referentes aos dois carbonos metínicos da cadeia lateral.

Tabela 24. Dados de RMN ^1H (500 MHz em CDCl_3) da mistura de estigmasterol e β -sitosterol (δ em ppm).

H	Mistura δ_{H} (mult., J em Hz) ^{exp.}	Estigmasterol (δ_{H}) ^{lit.}		β -sitosterol (δ_{H}) ^{lit.}	
		Rubinstein <i>et al.</i> , 1976 ²	Facundo <i>et al.</i> , 2008 ²	Rubinstein <i>et al.</i> , 1976 ²	Facundo <i>et al.</i> , 2008 ²
3	3,52 (m)	n.r.	3,51 (m)	n.r.	3,51 (m)
6	5,35 (d, J=5,5)	n.r.	5,12 (d)	n.r.	5,36 (d)
18	0,68 (s)	0,69 (s)	0,69 (s)	0,68 (s)	0,68 (s)
19	1,01 (s)	1,02 (s)	1,02 (s)	1,01 (s)	1,02 (s)
21	0,92 (d, J=7)	1,02 (d, J=6,5 Hz)	1,03 (s)	0,92 (d, J=6,5 Hz)	0,93 (s)
22	5,02 (dd, J=8,5 e 15,5)	n.r.	5,22-4,95 (m)	-	-
23	5,15 (dd, J=8,5 e 15)	n.r.	5,22-4,95 (m)	-	-
26	0,82(d,largo)	0,84 (d, J=6,8 Hz)	0,86 (s)	0,83 (d, J=6,8 Hz)	0,83 (s)
27	0,81(s)	0,79 (d, J=6,8 Hz)	0,81 (s)	0,81 (d, J=6,8 Hz)	0,80 (s)
28	-	-	-	-	-
29	0,84(d,largo)	0,80 (t, J=7,2Hz)	0,83 (s)	0,84 (t, J=7,2 Hz)	0,81(s)

Exp.: experimental; **lit.:** literatura; (¹) 220 MHz; (²) frequência não informada.

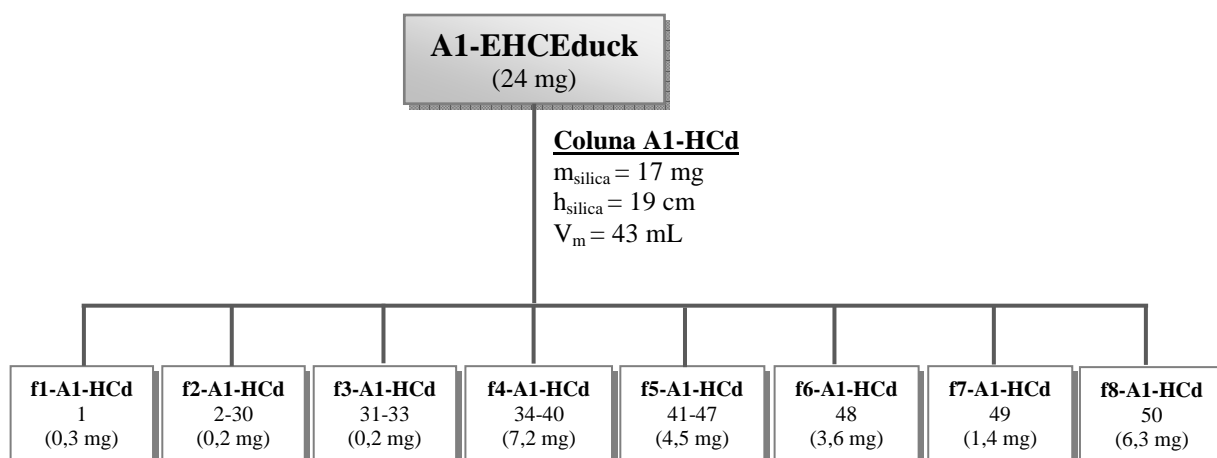
Tabela 25. Dados de RMN ^{13}C e DEPT (125 MHz em CDCl_3) da mistura de estigmasterol e β -sitosterol (δ em ppm)

C	Mult.	Mistura (δ_{C}) ^{exp}	Estigmasterol (δ_{C}) ^{lit}	β -sitosterol (δ_{C}) ^{lit}
1	CH ₂	37,50	37,31	37,31
2	CH ₂	31,91	31,69	31,57
3	CH	72,05	71,81	71,69
4	CH ₂	42,55	42,30	42,25
5	C	141,00	140,79	140,76
6	CH	121,94	121,60	121,59
7	CH ₂	32,15	31,97	31,92
8	CH	32,15	31,97	31,92
9	CH	50,37	50,27	50,17
10	C	36,74	36,58	36,51
11	CH ₂	21,32	21,13	21,11
12	CH ₂	39,93	39,77	39,81
13	C	42,55	42,35	42,33
14	CH	57,01	56,91	56,79
15	CH ₂	24,54	24,39	24,32
16	CH ₂	28,47	28,96	28,26
17	CH	56,31	56,06	56,11
18	CH ₃	12,09	12,07	11,87
19	CH ₃	19,62	19,42	19,40
20	CH	36,38/40,70	40,54	36,17
21	CH ₃	19,012	21,11	18,82
22	CH _x	34,20(CH ₂)/138,53(CH)	138,37	33,95
23	CH _x	26,35(CH ₂)/129,5(CH)	129,32	26,13
24	CH	46,09/51,47	51,29	45,85
25	CH	29,41	31,94	29,18
26	CH ₃	20,04	21,26	19,84
27	CH ₃	19,27	19,02	19,07
28	CH ₂	23,31/25,63	25,44	23,09
29	CH ₃	12,21	12,27	12,32

Exp.: experimental; **Lit:** literatura (WRIGHT *et al.*, 1978, 25 MHz em CDCl_3)

5.6.1.3.2. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO A1-EHCEduck

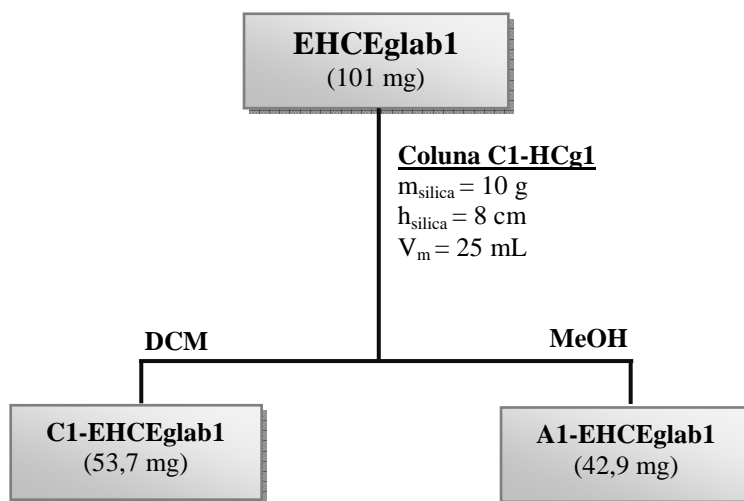
A fração A1-EHCEduck, oriunda do pré-fracionamento do extrato hexânico das cascas de *E. dukeana* (pág. 151), corresponde a fração dos ácidos graxos e diterpênico. Então com o objetivo de isolar os ácido diterpênico, uma porção (24 mg) dessa fração foi re-fracionada em coluna cromatográfica ($\varnothing = 1,5$ cm) de sílica gel (70-230 mesh). Usou-se hexano como eluente aumentando gradativamente a polaridade com acréscimo de AcOEt, nas seguintes proporções: 0, 5, 10, 15, 20, 50, 100%. Recolheu-se 50 frações e após análise em CCD, as frações foram reunidas em 8 frações, conforme mostrado no Esquema 7. As massas das frações obtidas também estão mostradas nesse esquema. O fracionamento, entretanto, não se mostrou eficiente, provocando o espalhamento da amostra. Então, optou-se por esterificar a fração com maior quantidade de material, f4-A1-HCd. Nesta fração foram detectados 4 ácidos graxos: ácido hexadecanóico (5,6%), ácido tetracosanóico (22 %), ácido hexacosanóico (66,6%) e um ácido graxo não identificado (5,8%). Os espectros de massas e a proposta de fragmentação dos ácidos identificados estão expostos na Seção 5.6.1.2.1 (página 131).



Esquema 7. Fracionamento da fração ácida A1-EHCEduck

5.6.1.4. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO EHCEglab1

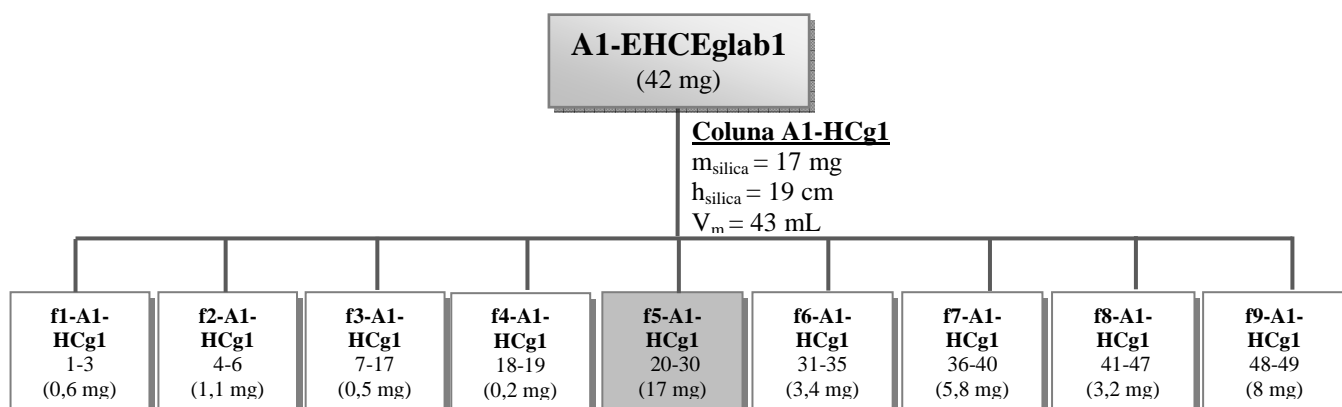
Com o extrato obtido em hexano das cascas de *E. glabriflora* da 1^o coleta (EHCEglab1) realizou-se o mesmo procedimento de separação dos ácidos. Então, uma porção (101 mg) do extrato EHCEglab1 foi pré-fracionado em coluna ($\phi = 1,5$ cm) com sílica gel (70-230 mesh) impregnada com KOH. Foram coletadas duas frações, uma de 85 mL de DCM e outra de 60 mL de MeOH. Após a evaporação do excesso de solvente da fração coleta em MeOH, ela foi acidificada e particionada com DCM (ver detalhes do procedimento no item 4.1.3 dos materiais e métodos, pág. 69). Apenas a fração ácida (A1-EHCEglab1) foi escolhida para prosseguir o trabalho (pág.166). As massas das frações obtidas estão mostradas no Esquema 8.



Esquema 8. Fracionamento do extrato EHCEglab1

5.6.1.4.1. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO A1-EHCEglab1

Optou-se em realizar um fracionamento com a fração ácida A1-EHCEglab1 (42 mg) para se tentar separar o ácido diterpênico dos outros ácidos, uma vez que no EHCEglab, o ácido diterpênico estava em maior proporção como detectado na análise em CG-DIC. Então uma porção da fração contendo os ácidos foi refractionada utilizando-se coluna cromatográfica ($\phi = 1,5$ cm) de sílica gel (70-230 mesh). Usou-se Hex/AcOEt como eluente nas proporções de 5, 10, 15, 20, 50, 100% desse último. As massas das frações obtidas estão mostradas no Esquema 9.

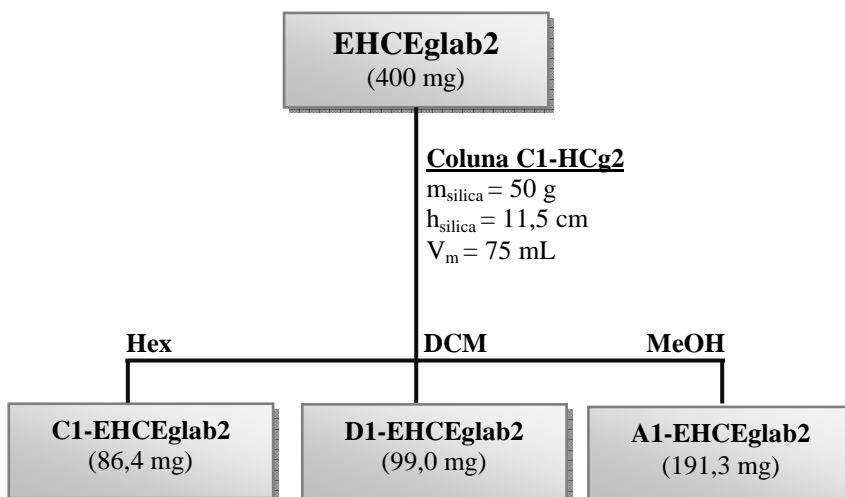


Esquema 9. Fracionamento da fração ácida A1-EHCEglab1

Após análise em CCD, as frações foram reunidas conforme a semelhança de seus perfis, resultando em 9 subfrações. A fração f5-A1-HCg1 foi escolhida para a esterificação. Após a derivatização dessa fração foi possível a detecção de 7 ácidos, sendo 6 ácido graxos: ácido hexadecanóico (34,8%), ácido octadecanóico (4,1%), um ácido graxo não identificado (3,9%), ácido docosanóico (3,2%), ácido tetracosanóico (6,8%), ácido hexacosanóico (16,7%); e um ácido diterpênico: o ácido 3-hidroxi-labda-7,13-dieno-15-óico (30,6%). Os espectros de massas e a proposta de fragmentação dos ácidos identificados estão expostos na Seção 5.6.1.2.1 (página 131).

5.6.1.5. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO EHCEglab2

Uma porção (400 mg) do extrato obtido em hexano das cascas da *E. glabriflora* da segunda coleta (EHCEglab2) foi pré-fracionado em coluna ($\varnothing = 2,5$ cm) com sílica gel (70-230 mesh) impregnada com KOH, para separação dos ácidos. Foram utilizados Hex (375 mL), de DCM (1000 mL) e MeOH (900 mL) como eluente. As massas das frações obtidas estão mostradas no Esquema 10.



Esquema 10. Pré-fracionamento do extrato EHCEglab2

A fração ácida (A1-EHCEglab2) não foi fracionada como realizado com os extratos anteriores, pois esses fracionamentos não se mostraram eficientes, optou-se por apenas esterificar essa fração. Após a derivatização foram detectados 7 ácidos, sendo 3 ácido graxos: ácido hexadecanóico (16,2 %), ácido octadecenóico (7,5 %) e um ácido graxo não identificado (7,6 %); e 4 ácidos diterpênicos: o ácido 3-clerodeno-15-óico (39,9 %), um isômero do ácido 3-clerodeno-15-óico (4,6 %), ácido catívico (5,5 %) e o ácido 3-hidroxi-

labda-7,13-dieno-15-óico (18,6 %). Os espectros de massas e as propostas de fragmentações dos ácidos identificados estão expostos na Seção 5.6.1.2.1 (página 131).

5.6.2. EXTRATOS DAS CASCAS OBTIDOS EM ACETATO DE ETILA

5.6.2.1. AVALIAÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS POR CCD

Os extratos das cascas obtidos em acetato de etila foram solubilizados em MeOH e o melhor sistema de eluente foi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 4:1. A Figura 95 mostra as cromatoplasmas reveladas em luz UV-254 nm (1), sulfato cérico (2), vanilina sulfúrica (3), FeCl_3 (4) e AlCl_3 (5).

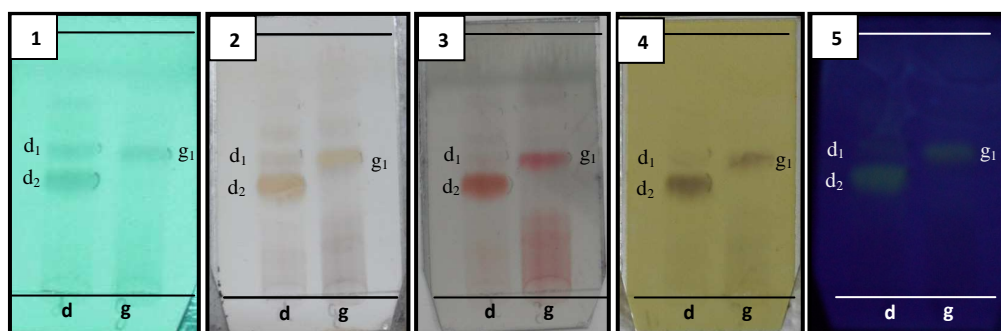


Figura 95. CCD comparativa dos extratos das cascas de *E. duckeana* (**d**) e *E. glabriflora* (**g**) obtidos em hexano e reveladas em luz UV-254nm (1) e soluções de sulfato cérico (2), vanilina sulfúrica (3), Cloreto férrico (4) e AlCl_3 (5). Eluente: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 4:1.
d: *E. duckeana* e **g:** *E. glabriflora*

Os extratos apresentaram substâncias majoritárias diferentes, como pode-se observar nas cromatoplasmas reveladas em sulfato cérico (2), vanilina (3) e solução de FeCl_3 (4) na Figura 95. A substância majoritária no EACEduck (**d**₂) apresentou R_f 0,41 e a majoritária em EACEglab (**g**₁) possui R_f 0,54. Pode-se observar também que a substância majoritária do EACEglab (**g**₁) também está presente, porém em menor concentração, no EACEduck (**d**₁) como mostrado na Figura 95-1 e 95-2, ambas absorvem na luz UV-254 nm. A substância

majoritária do EACEduck (**d**₂) não está presente, ou pelo menos em concentração significativa, no extrato EACEglab. As cromatoplasmas também foram reveladas com solução de FeCl₃, onde ocorreu o aparecimento de manchas marrons propondo que as substâncias sejam compostos fenólicos e a revelação com solução de AlCl₃ sugeriu que esses compostos fenólicos sejam flavonóides (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007), o que está de acordo com uma das classes de substâncias isoladas do gênero *Eperua* (GOURNELIS *et al.*, 1986; ROYER *et al.*, 2010).

5.6.2.2. FRACIONAMENTO DO EXTRATO EACEglab2

Uma porção (5 g) do extrato das cascas de *E. glabriflora* da 2^o coleta (EACEglab2) foi pré-fracionado em coluna ($\phi=3,5\text{cm}$) com sílica gel 70-230 mesh ($m=120\text{ mg}$). Utilizou-se Hex, AcOEt e MeOH como eluente, em proporções crescentes como mostrado na Tabela 26. Foram coletadas 10 frações de 250 mL cada. As massas das frações obtidas estão mostradas na Tabela 26.

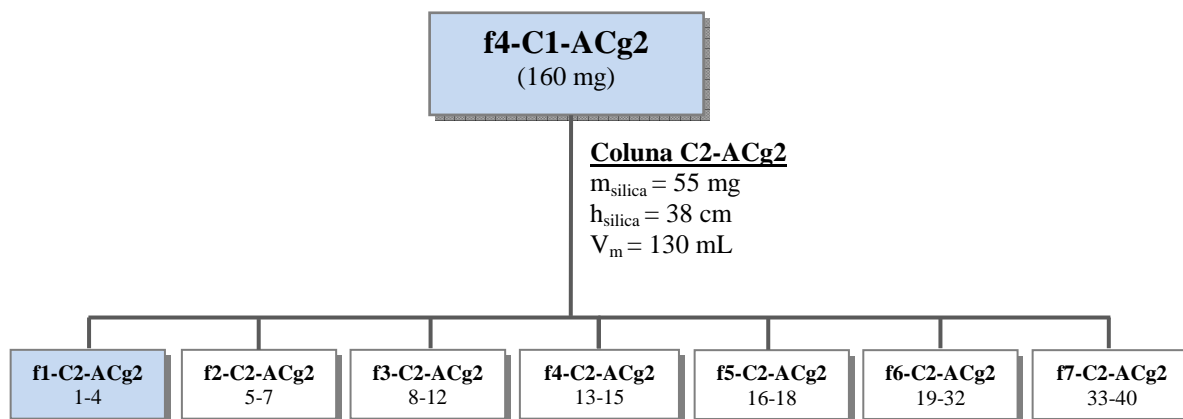
Tabela 26. Eluentes e massas das frações da coluna C1-ACg2

Eluente	Frações	Massa (mg)
Hex 100%	f1-C1-ACg2	3,0
Hex/AcOEt 15%	f2-C1-ACg2	95,6
Hex/AcOEt 50%	f3-C1-ACg2	138,3
AcOEt 100%	f4-C1-ACg2	293,4
AcOEt/MeOH 5%	f5-C1-ACg2	1.335
AcOEt/MeOH 15%	f6-C1-ACg2	900,7
AcOEt/MeOH 30%	f7-C1-ACg2	831,1
AcOEt/MeOH 50%	f8-C1-ACg2	134,6
MeOH 100%	f9-C1-ACg2	1.034
MeOH 100%	f10-C1-ACg2	2,5

Três das frações obtidas no pré-fracionamento do extrato EACEglab2 foram selecionados para a continuação dos fracionamentos: f4-C1-ACg2; f5-C1-ACg2 e f6-C1-ACg2.

5.6.2.2.1. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO f4-C1-ACg2

Uma porção (160 mg) da fração f4-C1-ACg2, oriunda do pré-fracionamento do extrato bruto EACEglab2, foi submetida à fracionamento em coluna ($\varnothing=2$ cm) com sílica *flash* (230-400 mesh). Utilizou-se $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}/\text{acetona}$ 3:2:2 como eluente. Foram coletadas 40 frações de 5 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e reunidas em 7 frações, conforme a semelhança de seus perfis (Esquema 11). A fração f1-C2-ACg2 foi a selecionada para uma purificação em CCDP, por apresentar duas manchas com boa separação em CCD.



Esquema 11. Fracionamento da fração f4-C1-ACg2

5.6.2.2. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO f1-C2-ACg2

A fração f1-C2-ACg2 (9,2 mg) foi purificada através de CCDP. O eluente utilizado foi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5:1. Foram obtidas 2 frações: f1-PP4-ACg2 (R_f 0,88) e f2-PP4-ACg2 (R_f 0,82). As duas frações foram analisadas por CLAE-UV.

5.6.2.2.3. FRAÇÃO f1-PP4-ACg2

A fração f1-PP4-ACg2 ($m = 4,3$ mg) apresentou apenas um pico com tempo de retenção (t_r) 17,11 minutos quando eluída com o gradiente 1 (Materiais e Métodos, pág. 73) em CLAE-UV, no modo de varredura (200 a 600 nm).

O espectro de UV da substância com t_r 17,11 min apresentou um perfil característico de flavonóides, com dois máximos de absorvância 219 nm e 293 nm (Figura 96-B).

O espectro de massas (Figura 96-C) do mesmo pico sugeriu que a substância apresenta massa molecular de 476 u.m.a., pois análise foi realizada em modo negativo ($475[\text{M-H}]^-$).

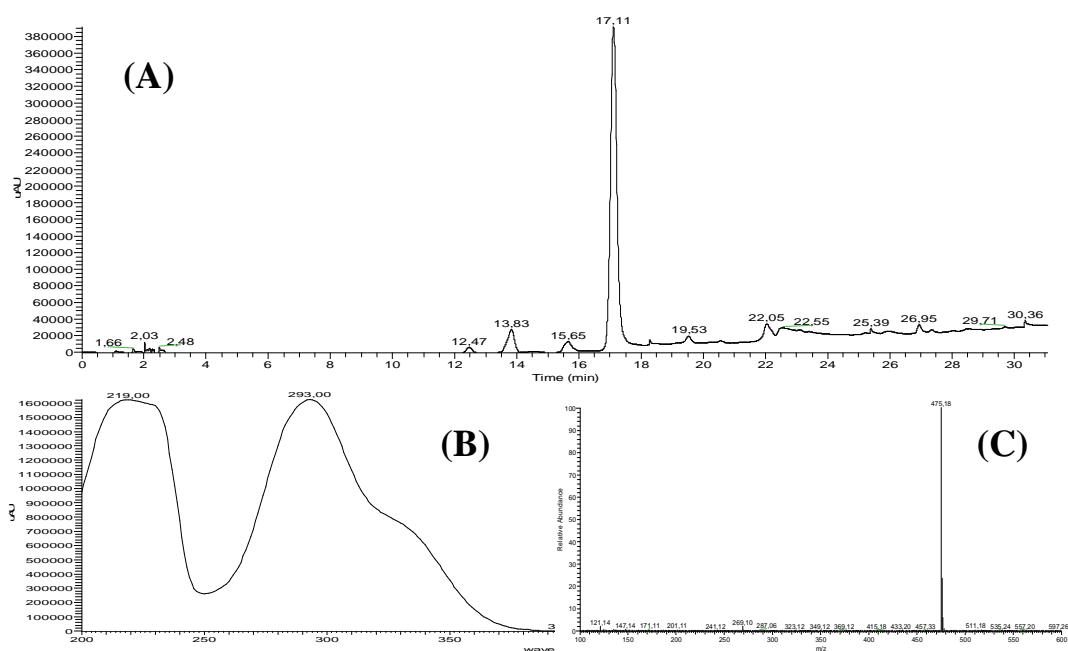


Figura 96. Cromatograma obtido por CLAE (A), espectro de UV (B) e EM (C) da fração f1-PP4-ACg2.

A análise do espectro de RMN ^1H (Figura 97) revelou 4 sinais de hidrogênios aromáticos: δ_{H} 7,37 (d, 2H, $J=9\text{Hz}$) e δ_{H} 6,85 (d, 2H, $J=9\text{Hz}$) que mantêm uma relação *orto* entre si, e δ_{H} 5,93 (d, 1H, $J=2\text{Hz}$) e δ_{H} 5,90 (d, 1H, $J=2\text{Hz}$) que mantêm uma relação *meta* entre si, esses sinais referem-se aos anéis B e A, respectivamente (Figura 98). De modo geral, os hidrogênios do anel B aparecem em regiões mais desblindadas que os hidrogênios do anel A.

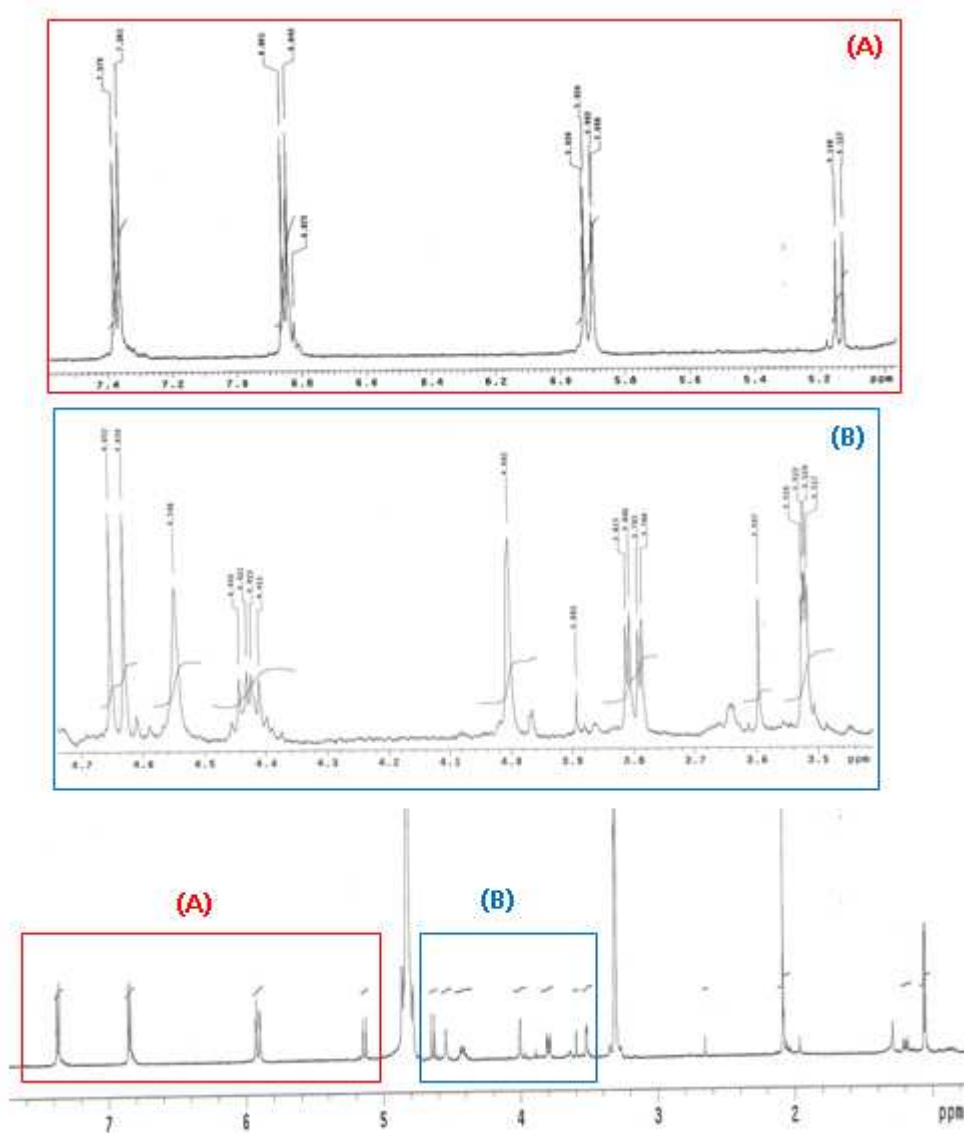


Figura 97. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração f1-PP4-ACg2. Ampliações das regiões entre δ_{H} 7,3-5,1 ppm (A) e δ_{H} 4,7-3,4 ppm (B)

Os substituintes R não foram identificados, porém supõe-se que o anel B seja *para* dissustituído, o que justificaria a simetria dos hidrogênios do anel B (H-2'/H-6' e H-3'/H-5'). Além disso, supõe-se que a molécula seja um glicosídeo, devido a presença do singlete largo em δ_H 4,0 ppm que pode ser de hidrogênio anomérico, além de outros sinais, como δ_H 4,43 (dd, $J=6$ e 10 Hz), δ_H 3,80 (dd, $J=3,5$ e 10 Hz) e δ_H 1,06 (d, $J=6$ Hz). A elucidação da molécula não pode ser finalizada, pois não foi possível a realização dos outros espectros necessários para prosseguir a identificação.

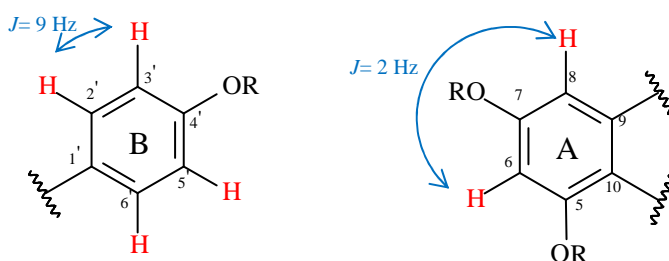


Figura 98. Suposições da estrutura do flavonóide da fração f1-PP4-ACg2

5.6.2.2.4. FRAÇÃO f2-PP4-ACg2

A fração f2-PP4-ACg2 ($m= 7,0$ mg) apresentou-se como uma mistura quando eluída com o gradiente 1 (Materiais e Métodos, pág. 73) em CLAE-UV, no modo de varredura -200 a 600 nm (Figura 99). Por a fração apresentar-se como uma mistura e devido a pequena quantidade de massa, optou-se por interromper o trabalho com essa fração.

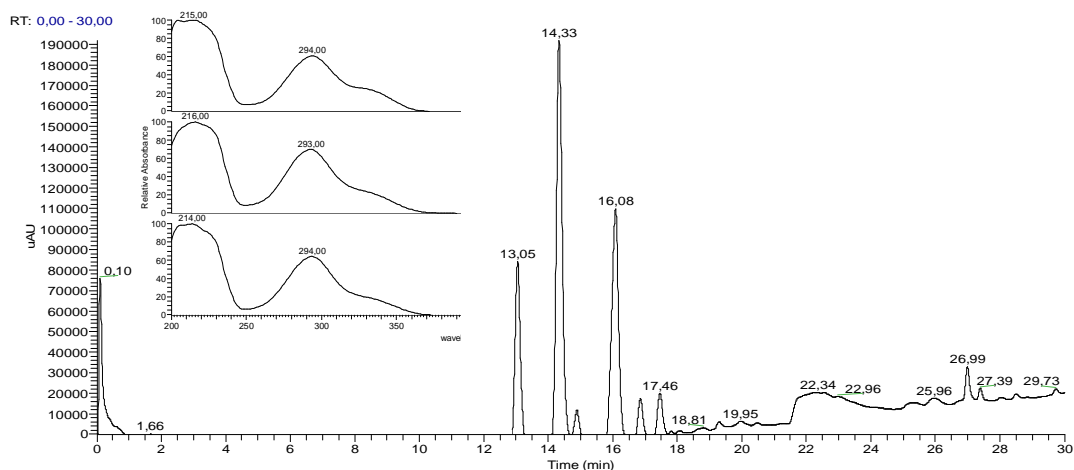
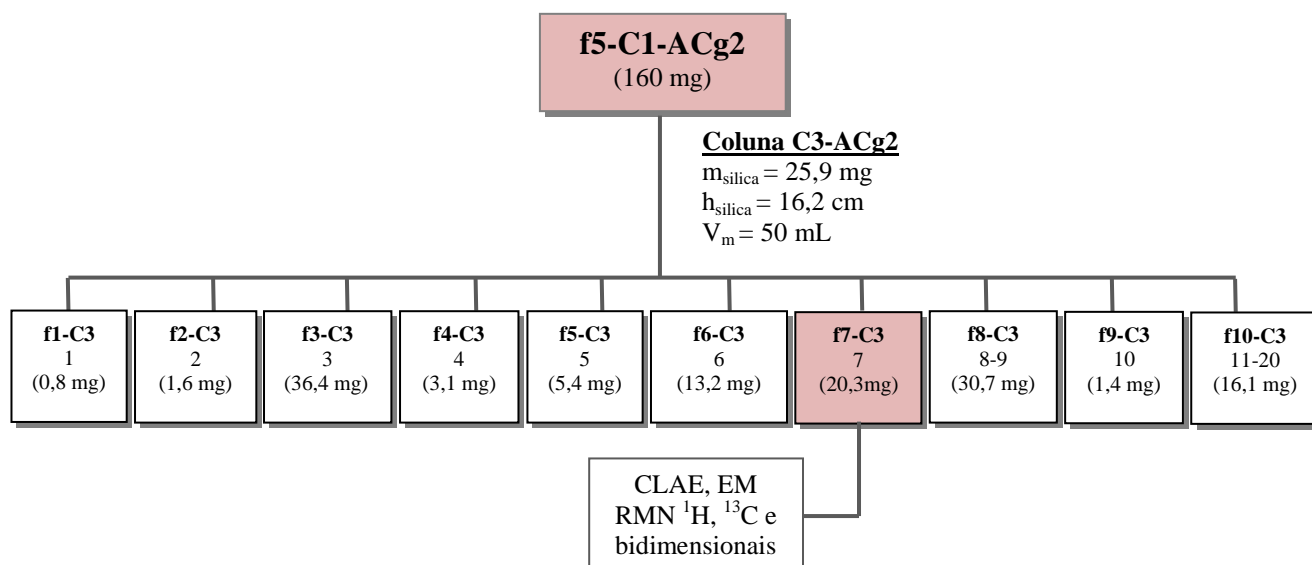


Figura 99. Cromatograma obtido por CLAE (A), espectro de UV (B) fração f2-PP4-ACg2

5.6.2.2.5.. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO f5-C1-ACg2

Uma porção (160 mg) da fração f5-C1-ACg2 (oriunda do pré-fracionamento do extrato bruto EACEglab2) foi fracionada em coluna ($\phi=2$ cm) com sílica *flash* (230-400 mesh) utilizando como eluente CHCl_3 /acetona/MeOH 9:2:2. Obteu-se 20 frações de 10 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com seus perfis resultando em 10 frações, como mostrado no Esquema 12. A massa da fração utilizado no fracionamento e das frações obtidas, assim como os dados do pré-fracionamento, estão mostrados no esquema 12. A fração f7-C3-ACg2 apresentou-se como apenas uma mancha em CCD, por esse motivo foi avaliada por CLAE-UV, EM, RMN ^1H e ^{13}C e bidimensionais (pág. 173).



Esquema 12. Fracionamento da fração f5-C1-ACg2

5.6.2.2.6. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA FRAÇÃO f7-C3-ACg2

A fração f7-C3-ACglab caracterizou-se como um sólido amorfo de coloração marrom, solúvel completamente em metanol. Em CCD, essa fração apresentou-se como uma mancha de R_f 0,36, quando eluída em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5:1. Quando revelada com sulfato cérico apresentou coloração amarelada, em solução de FeCl_3 apresentou coloração marrom (característico de compostos fenólicos), podendo se tratar de um flavonóide, pois apresentou fluorescência quando em UV-365 nm após revelação com solução de AlCl_3 , revelador usado na detecção de flavonóides (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007).

A análise por CLAE-UV/DAD revelou um pico intenso com tempo de retenção 17,75 minutos, quando a fração foi analisada com o gradiente 2 (pág. 73). O espectro de UV da substância com tempo de retenção 17,75 minutos apresentou dois máximos de absorção, 219 nm e 293 nm, característico de flavonóides. O cromatograma e o espectro de UV estão apresentados na Figura 100.

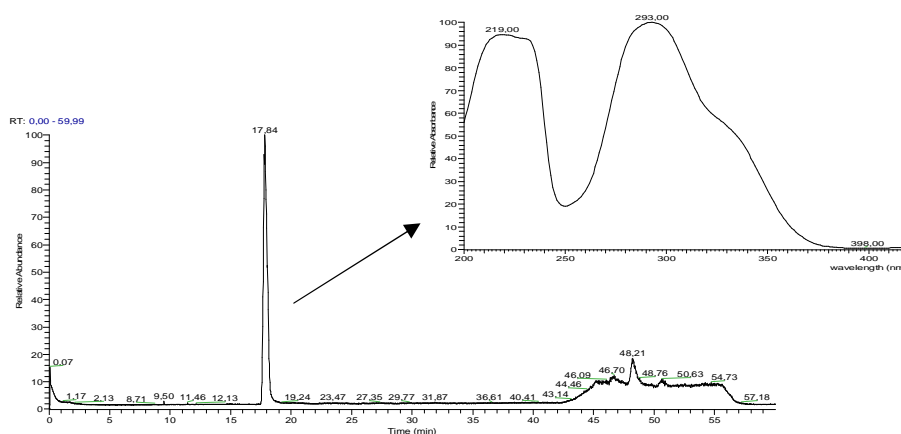


Figura 100. Cromatograma obtido por CLAE e espectro de UV da substância com tempo de retenção 17,75 min da fração f7-C3-ACglab, realizada com o eluente 2

O espectro de massas por *eletronspray* de alta resolução (Figura 101) possibilitou a determinação da massa molecular da substância com tempo de retenção 17,75 minutos como sendo 434 u.m.a., uma vez que análise foi realizada no modo negativo ($433 [M-H]^-$). A fragmentação do íon de m/z 433 proporcionou novos fragmentos de m/z 287, 269 e 259, por exemplo. A primeira perda significativa de massa correspondeu a 146 u.m.a., uma perda relativamente alta, sugerindo uma perda de uma unidade de açúcar, podendo, então a molécula ser um glicosídeo. Com base nessa suposição, a parte aglicona da substância teria uma massa molecular de 287 u.m.a.

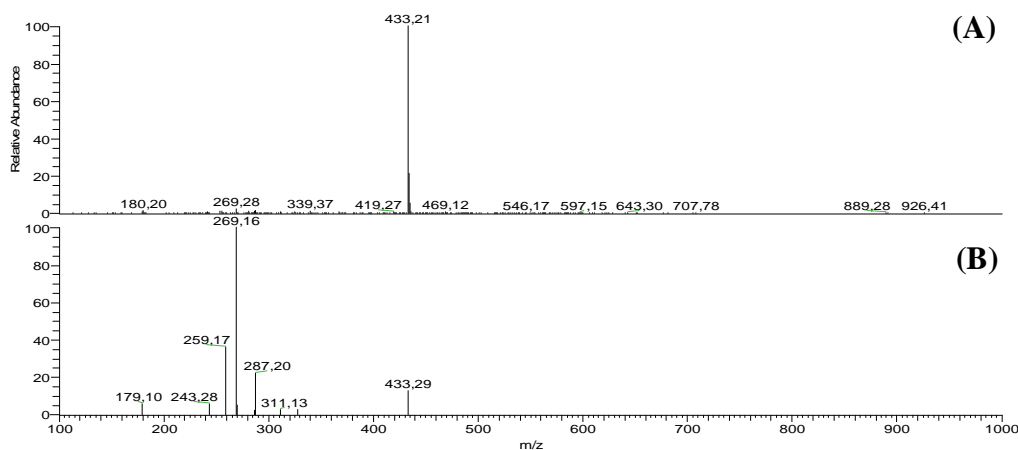


Figura 101. Espectros de massas (EM-ESI) da substância com tempo de retenção 17,75 minutos (A). EM/EM do fragmento de m/z 433 (B)

O espectro de RMN ^1H (Figura 102) apresentou 4 sinais que absorvem na região de hidrogênios aromáticos (marcado em azul na Figura 102). Esses sinais correspondem a dois dubletos em δ_{H} 7,12 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2'/H-6') e δ_{H} 6,69 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3'/H-5'), com J característico de acoplamento de hidrogênios na posição *orto*, atribuídos ao anel B (1,4-dissubstituído) e dois dubletos com sinais em δ_{H} 5,83 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6) e 5,79 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8) com J característico de acoplamento de hidrogênios na posição *meta*, atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, referentes ao anel A (5,7,9,10-tetrassubstituído).

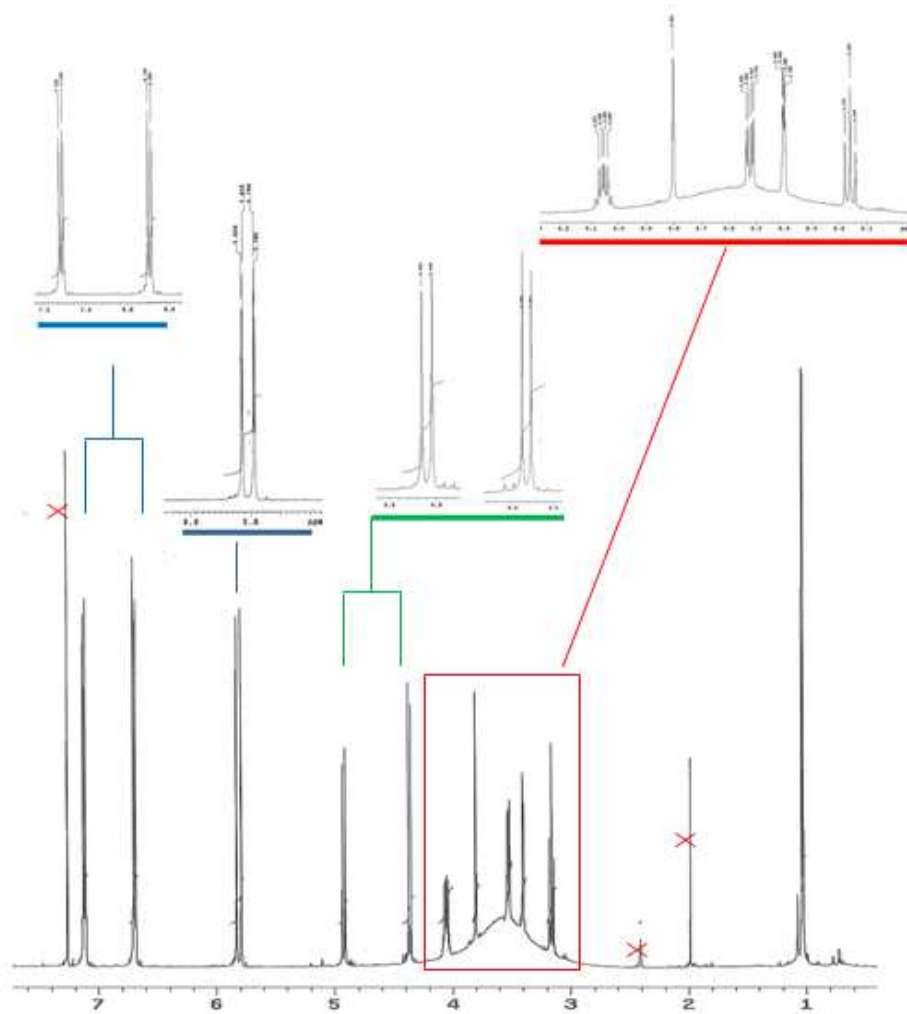


Figura 102. Ampliações do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra f7-C3-ACglab em CDCl_3 (e DMSO-d_6).

O espectro de RMN de ^1H apresentou também um par de dubletos em δ_{H} 4,92 (1H, d, $J = 11$ Hz) e 4,36 (1H, d, $J = 11$ Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-3, respectivamente (marcado em verde na Figura 102). A constante de acoplamento apresentada por estes dubletos ($J=11$ Hz) sugere configuração relativa *trans* de H-2 e H-3, o que determina a principal característica do esqueleto do flavanonol (SILVA *et al.*, 2007).

A presença de uma unidade de açúcar pôde ser deduzida a partir dos sinais entre δ_{H} 4,1 e δ 3,1 (marcado em vermelho na Figura 102). Observou-se a presença de um duplo dubleto, com aspecto de multipletto, em δ_{H} 4,05 (dd, $J=6,5$ e $J=9,5$, H-5'') seguido de um singletto largo em δ_{H} 3,80 (s) atribuído ao hidrogênio anomérico H-1'', dois duplo dubleto em δ_{H} 3,52 (dd, $J=3,0$ e $J=9,2$, H-3'') e δ_{H} 3,40 (dd, $J=1,5$ e $J=3,5$, H-2'') seguido de um triplete em δ_{H} 3,16 (t, H-4''). Pôde-se observar também um sinal blindado com desdobramento de dubleto em δ_{H} 1,03 (d, $J=6,0$, H-6''), característico de metila de unidade de ramnose. Os dados de RMN ^1H permitiram caracterizar a unidade monosídica como sendo uma ramnose (XU *et al.*, 2005).

Em alguns trabalhos, como o realizado por Regasini e colaboradores (2008), a configuração relativa da unidade do açúcar é determinada pelas constantes de acoplamento entre H-1'' e H-2''. Valores próximos a 1,5 Hz indicam configuração α , enquanto que valores próximos a 7-9 Hz indicam a configuração β . Deste modo, estabeleceu-se a configuração α para a unidade de ramnose, pois apesar do H-1'' apresentar-se como um singletto largo, o H-2'' apresentou $J=1,5$ HZ.

O espectro mostrou uma interação intramolecular, ligação de hidrogênio, do grupo hidroxil no sinal a δ_{H} 11,9 ppm

Os sinais em δ_{H} 7,26 (s) e δ_{H} 2,41(m) são referentes aos solventes deuterados CDCl_3 e DMSO-d_6 , respectivamente e o sinal em 1,98(s) é referente a um contaminando não identificado do solvente. Segundo o manual da Bruker, o deslocamento de δ_{H} 2 ppm pode ser

atribuído ao ácido acético D₄, acetona D₅, acetonitrila D₃ ou tolueno D₈, comuns em solventes deuterados.

O mapa de contornos [¹H-¹H]-COSY (Figura 103) mostra a vizinhança entre esses hidrogênios. As interações mostradas para a parte aglicona da molécula foram as ocorrida entre os hidrogênios H-2 e H-3 [$\delta_{\text{H-2}}/\delta_{\text{H-3}}$ 4,92/4,36] do anel C (mostrada em azul na Figura 103-A) e os hidrogênios equivalentes H-2'/H-6' e H-3'/H-5' [$\delta_{\text{H-2'}/\delta_{\text{H-3'}}$ 7,12/6,69] do anel B (mostrada em vermelho na Figura 103-B). Para a parte do glicosídeo, várias interações foram observadas, as principais interações foram entre hidrogênio H-5'' e H-4'' (mostrada em vermelho na Figura 103-A); H-3'' e H-4'' (mostrada em verde na Figura 103-A) e H-6'' e H-5'' (não mostrada na ampliação). As demais interações estão listadas na Tabela 27.

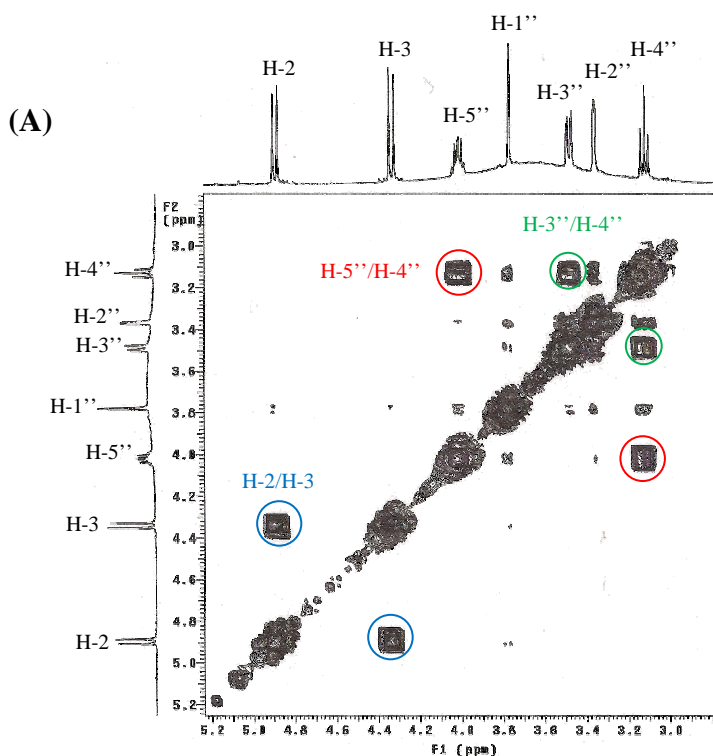


Figura 103. Mapa de contornos ¹H-¹H COSY (500 MHz, CDCl₃ e DMSO-d₆) da fração f7-C3-ACg. (A) Ampliação da região entre δ_{H} 5,2-2,0 ppm e (B) δ_{H} 7,6-6,1 ppm

Continuação da Figura 1003

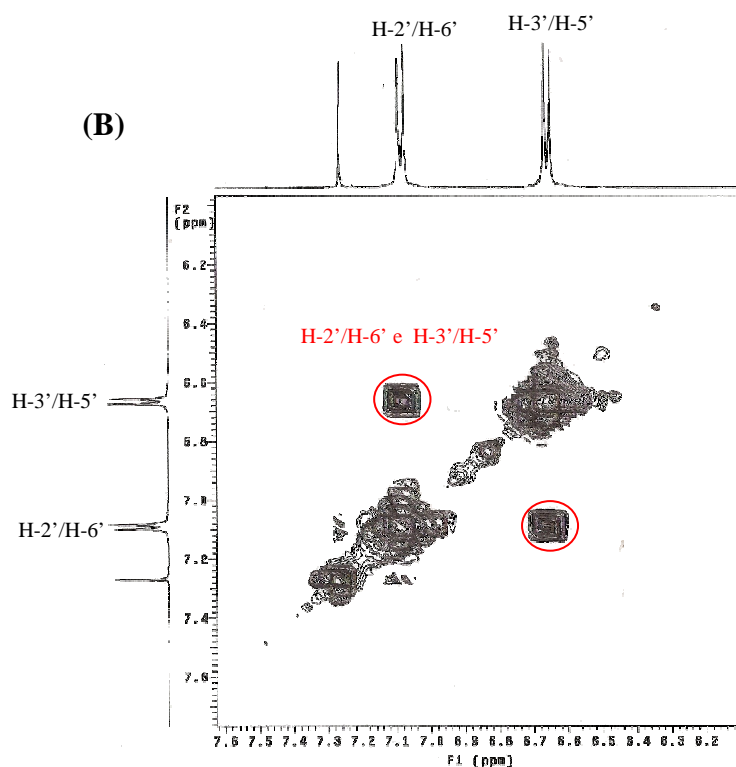


Figura 103. Mapa de contornos ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CDCl_3 e DMSO-d_6) da fração f7-C3-ACg. (A) Ampliação da região entre δ_{H} 5,2-2,0 ppm e (B) δ_{H} 7,6-6,1 ppm

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 104, Tabela 28) e DEPT 135° apresentaram 7 sinais de carbonos quaternários δ_{C} 193,83 (C=O), δ_{C} 163,65 (C-5), δ_{C} 166,67 (C-7), δ_{C} 161,96 (C-9), δ_{C} 100,94 (C-10), δ_{C} 126,29 (C-1') e δ_{C} 157,65 (C-4'); 2 sinais de carbonos metínicos saturados δ_{CH} 81,88 (C-2) e δ_{CH} 76,20 (C-3); 4 sinais de carbonos metínicos pertencentes a sistema aromático δ_{CH} 96,39 (C-6), δ_{CH} 95,16 (C-8), δ_{CH} 128,11 (C-2', 6') e δ_{CH} 115,33 (C-3',5'); 5 sinais remanescentes de carbonos atribuídos à unidade de açúcar δ_{CH} 99,77 (C-1''), δ_{CH} 70,95 (C-2''), δ_{CH} 69,64 (C-3''), δ_{CH} 72,32 (C-4''), e δ_{CH} 68,39 (C-5'') e 1 sinal referente ao carbono metílico δ_{CH_3} 17,08 atribuído ao C-6'', confirmando a unidade glicosídica como sendo uma ramnose (SILVA *et al.*, 2007)

Os sinais em δ_C 77,00 (triplete) e δ_C 39,51 (septeto) referem-se à mistura de solventes utilizados para a solubilização da amostra, $CDCl_3$ e $DMSO-d_6$, respectivamente (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

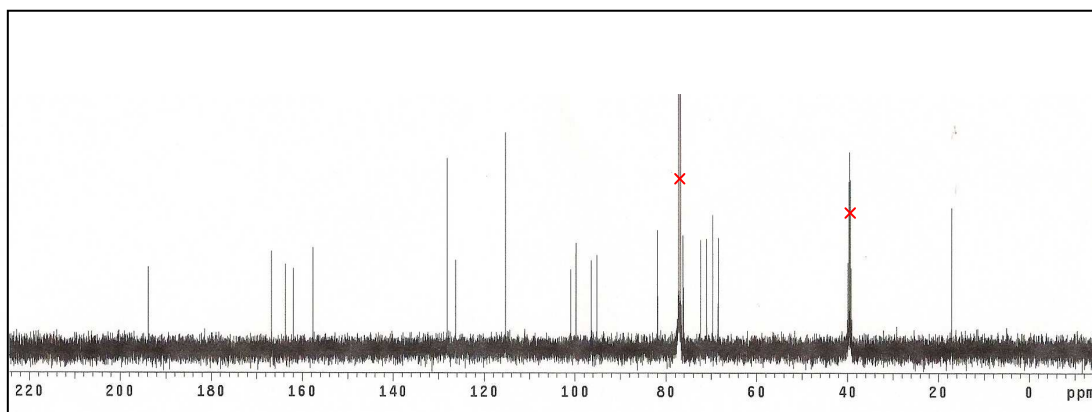


Figura 104. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$ e $DMSO-D_6$) da amostra f7-C3-ACglab.

Pelo mapa de contornos HSQC (Figura 105) puderam ser estabelecidas as correlações diretas dos carbonos metínicos da porção aglicona: C-2 [δ_H/δ_C 4,92/81,88], C-3 [δ_H/δ_C 4,36/76,20], C6 [δ_H/δ_C 5,83/96,39], C-8 [δ_H/δ_C 5,79/95,16], C2'-6' [δ_H/δ_C 7,12/128,11] e C3'-5' [δ_H/δ_C 6,69/115,33] e dos carbonos metínicos e metílico (C-6'') da porção açúcar: C1'' [δ_H/δ_C 3,80/99,77], C-2'' [δ_H/δ_C 3,40/70,95], C-3'' [δ_H/δ_C 3,52/69,64], C-4'' [δ_H/δ_C 3,16/72,32], C-5'' [δ_H/δ_C 4,05/68,39] e C-6'' [δ_H/δ_C 1,03/17,08].

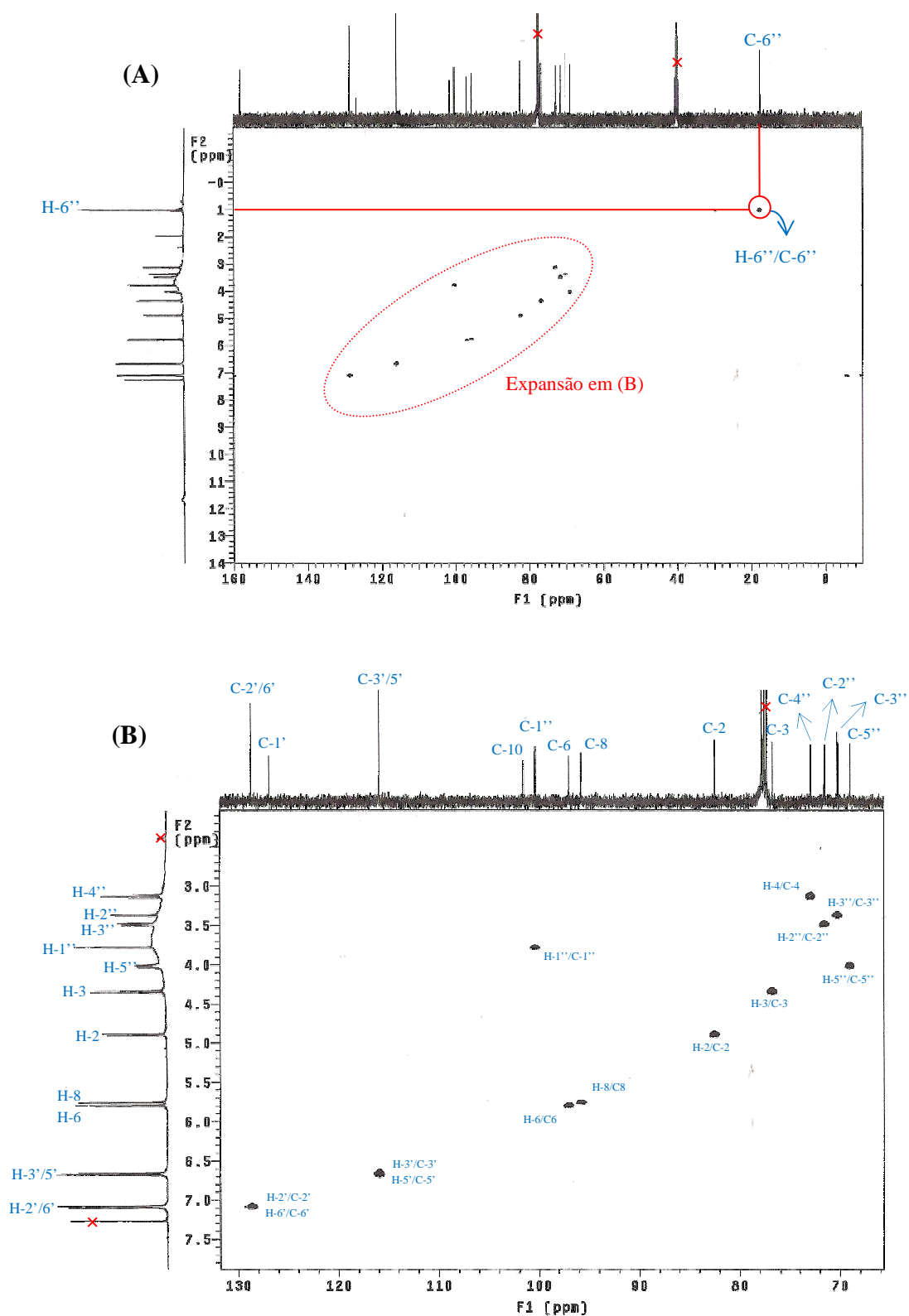


Figura 105. Mapa de contornos HSQC (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-D}_6$) de f7-C3-ACglab (A); Expansão na região entre $\delta_{\text{C}} 132$ -74 ppm e $\delta_{\text{H}} 2,0$ -8,3 ppm (B)

Pelo mapa de contornos HMBC (Figura 106) pode-se confirmar a localização da unidade de rarnose na unidade aglicona do flavanonol, essa confirmação foi realizada através do acoplamento a três ligações ($^3J_{CH}$) entre o hidrogênio anomérico H-1'' (δ_H 3,80) e o carbono C-3 (δ_C 76,20), mostrado em vermelho na Figura 106. Também nesse mesmo experimento, o acoplamento a duas ligações ($^2J_{CH}$) entre o hidrogênio H-2 (δ_H 4,92) e o carbono C-3 (δ_C 76,20), assim como do C-2 com o H-3, define a estrutura do flavanonol, mostrado em azul na Figura 106. Todas as correlações observadas estão mostradas na Tabela 28.

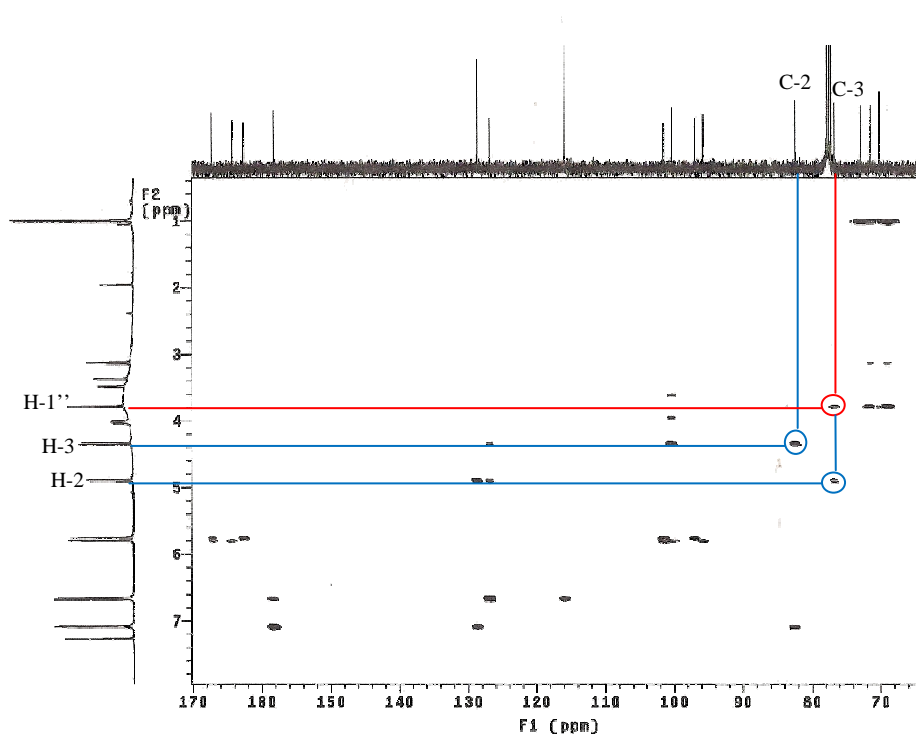


Figura 106. Expansão do mapa de contornos HMBC (125 MHz, $CDCl_3$ e $DMSO-D_6$) da fração f7-C3-ACglab

A análise dos espectros de RMN de 1H , RMN ^{13}C , os bidimensionais HSQC, HMBC e COSY (Tabela 27 e 28), EM e UV, juntamente com a comparação com os dados da literatura (LU & FOO, 1999; XU *et al.*, 2005, SILVA *et al.*, 2007), levaram a identificação da fração f7-C3-ACglab como sendo um 3-*O*-glicosil-flavanonol conhecido como engeletina.

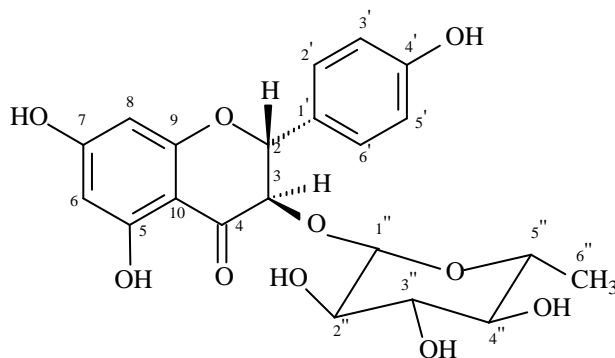


Figura 107. Estrutura da engeletina

Tabela 27. Dados de RMN ^1H e $[\text{1H-1H}]\text{-COSY}$ (500 MHz, CDCl_3 e DMSO-d_6) da fração f7-C3-ACg e engeletina (δ em ppm e J em Hz)

H	δ_{H} (mult., J em Hz) (f7-C3)	δ_{H} (mult., J em Hz) (engeletina) ¹	$[\text{1H-1H}]\text{-COSY}$
2	4,92 (d, $J=11$)	5,28 (d, $J=10,3$)	H-3
3	4,36 (d, $J=11$)	4,73 (d, $J=10,3$)	H-2
4	-	-	-
5	-	-	-
6	5,83 (d, $J=2$)	5,87 (d, $J=1,9$)	-
7	-	-	-
8	5,79 (d, $J=2,5$)	5,90 (d, $J=1,9$)	-
9	-	-	-
10	-	-	-
1'	-	-	-
2'	7,12 (d, $J=8,5$)	7,33 (d, $J=8,5$)	H-3'
3'	6,69 (d, $J=8,5$)	6,79 (d, $J=8,5$)	H-2'
4'	-	-	-
5'	6,69 (d, $J=8,5$)	6,79 (d, $J=8,5$)	H-6'
6'	7,12 (d, $J=8,5$)	7,33 (d, $J=8,5$)	H-5'
1''	3,80 (s)	3,98 (s)	H-3, H-2, H-6'', H-4'', H-2'', H-3'', H-5''
2''	3,40 (dd, $J=1,5$; $J=3,5$)	-	H-4'', H-1'', H-5''
3''	3,52 (dd, $J=3$; $J=9,2$)	-	H-4'', H-1''
4''	3,16 (t)	-	H-2'', H-3'', H-1'', H-5''
5''	4,05 (dd, $J=6,5$; $J=9,5$)	-	H-6'', H-4'', H-2'', H-1''
6''	1,03 (d, $J=6$)	1,05 (d, $J=6,2$)	H-1'', H-5''

Legenda: mult: multiplicidade; (1) LU & FOO, 1999 (75 MHz, DMSO-d_6)

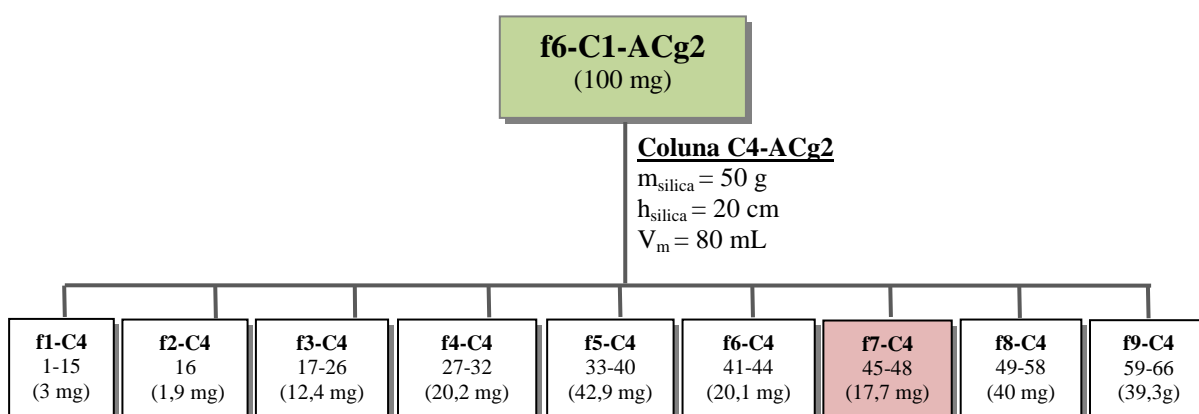
Tabela28. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 e DMSO-d_6) da fração f7-C3-ACg e engeletina (δ em ppm e J em Hz)

C	Mult.	δ_{C} (f7-C3)	δ_{C} (engeletina) ¹	HMBC ($^{2,3}J_{\text{CH}}$)
2	CH	81,88	81,28	H-3; H-2'
3	CH	76,20	75,75	H-2; H-1''
4	C	193,83	194,32	H-3; H-2
5	C	163,65	163,21	H-6
6	CH	96,39	95,97	H-8
7	C	166,67	167,28	H-6; H-8
8	CH	95,16	94,97	H-6
9	C	161,96	161,99	H-8
10	C	100,94	100,61	H-6; H-8
1'	C	126,29	126,32	H-2; H-3; H-5'
2'	CH	128,11	128,82	H-6'; H-2
3'	CH	115,33	114,96	H-5'
4'	C	157,65	157,63	H-5'; H-2'
5'	CH	115,33	114,96	H-3'
6'	CH	128,11	128,82	H-2'; H-2
1''	CH	99,77	100,10	H-3''; H-5''; H-3; H-6
2''	CH	70,95	70,20	H-4''
3''	CH	69,64	69,95	H-1''
4''	CH	72,32	71,42	H-6''
5''	CH	68,39	68,77	H-4''; H-6''; H-1''
6''	CH ₃	17,08	17,52	H-4''; H-6''

Legenda: mult: multiplicidade; (1) LU & FOO, 1999 (75 MHz, DMSO-d_6)

5.6.2.2.7. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO f6-C1-ACg2

Uma porção da fração f6-C1-ACg2 (oriunda do pré-fracionamento do extrato bruto EACEglab2, pág. 169) foi fracionada em coluna ($\phi=2,0$ cm) com sílica gel (70-230 mesh). Foram utilizados com eluente CHCl_3 e MeOH, com adição gradativa de MeOH. As proporções utilizadas foram: CHCl_3 100%, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 50%, 70%, 90% e MeOH 100%. Foram recolhidas 60 frações de 9 mL cada e 3 frações de 20 mL, totalizando 66 frações. As massas das frações obtidas, assim como os dados do fracionamento, estão mostrados no Esquema 13. A fração f7-C4-ACg2 foi a escolhida para uma purificação por CCDP.



Esquema 13. Fracionamento da fração f6-C1-ACg2

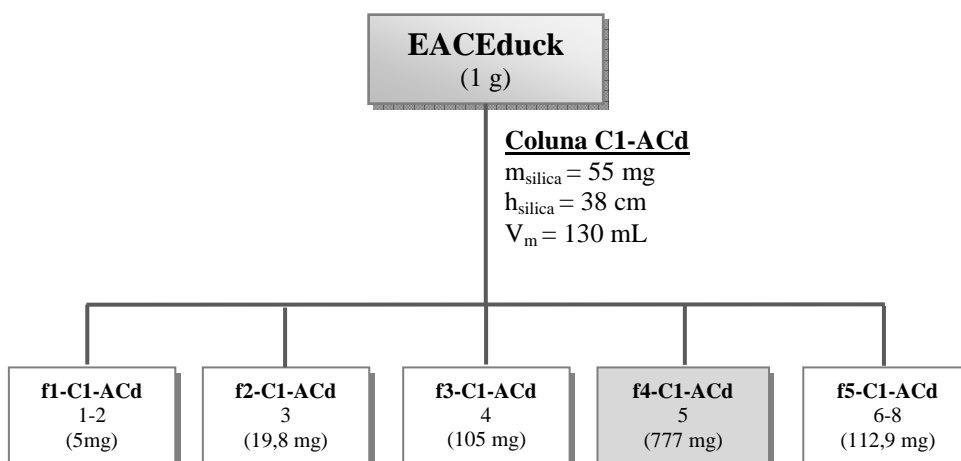
5.6.2.2.8. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO f7-C4-ACg2

A fração f7-C4-ACg2 (10 mg) foi submetida à CCDP. O eluente utilizado foi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 4:1. A placa cromatográfica foi eluída 3 vezes. A mancha de R_f 0,07 foi identificada como f1-PP3-ACg2 e foi enviada para análise em RMN ^1H , porém o espectro

revelou que tratava-se de uma mistura, então devido a pequena quantidade da amostra não pode-se continuar com o fracionamento.

5.6.2.3. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO EACEduck

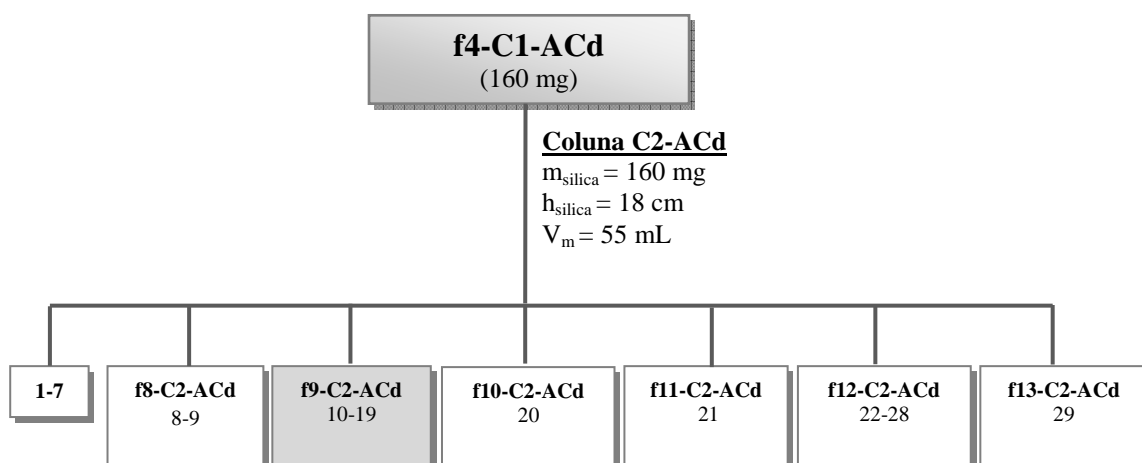
Uma porção (1 g) do extrato obtido em acetato de etila foi submetida a um pré-fracionamento por meio de coluna cromatográfica ($\phi = 2$ cm) com sílica gel (70-230 mesh). Foram utilizados como eluente Hex/AcOEt/MeOH nas proporções de Hex 100%, Hex/AcOEt 15%, 50%, AcOEt 100%, AcOEt/MeOH 15%, 30%, 50% e MeOH 100%. Recolheu-se 8 frações de 130 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e reunidas conforme a semelhança de seus perfis (Esquema 14). A fração f4-C1-ACd foi a escolhida para dar prosseguimento ao fracionamento por dois motivos: por ser a fração com maior quantidade de material e por apresentar a substância que deu origem a mancha indicada como majoritária na CCD comparativa dos extratos (Figura 95).



Esquema 14. Pré-fracionamento do EACEduck

5.6.2.3.1. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO f4-C1-ACd

A fração f4-C1-EACEduck (160 mg) foi fracionada em coluna ($\phi=2$ cm) em sílica *flash* (230-400 mesh). Foram coletadas 29 frações, as vinte primeiras frações foram coletadas em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2; as frações 21 à 28 foram coletadas em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1; e a fração 29 foi coletada em MeOH 100%. As frações foram analisadas por CCD e reunidas conforme a semelhança de seus perfis (Esquema 15). A fração f9-C2-ACd foi a que apresentou maior quantidade da substância majoritária quando analisada em CCD e aparentemente a mais fácil de purificar, então optou-se por realizar com essa fração uma placa preparativa.



Esquema 15. Fracionamento da fração f4-C1-ACd

5.6.2.3.2. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO f9-C2-ACd

A fração f9-C2-ACd foi purificada por CCDP. O eluente utilizado foi $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}/\text{acetona}$ 1:1:1. A análise cromatográfica em CCDP não obteve o mesmo perfil da apresentada em CCD. Em CCD uma mancha de R_f 0,4 era observada quando avaliada em UV-254 nm. Em CCDP apenas um rastro foi observado, então optou-se por aplicar a solução

de FeCl_3 na laterais da placa (procedimento descrito em materiais e métodos, pág. 67) para se localizar a substância, então retirou-se a área correspondente as manchas reveladas e identificou-se como f1-PP1-ACd. Essa fração foi enviada para análise em RMN ^1H , porém, mostrou-se como uma mistura revelando que outros fracionamentos seriam necessários.

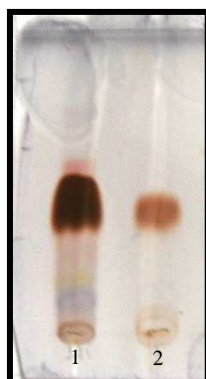


Figura 108. Resultado da purificação da fração f9-C2-ACd.
Eluente: $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}/\text{acetona}$ 1:1:1, revelador: vanilina.
(1) f9-C2-ACd e (2) f1-PP1-ACg2

5.6.3. EXTRATOS METANÓLICOS DAS CASCAS- AVALIAÇÃO POR RMN ^1H

Os extratos obtidos em metanol foram avaliados por RMN ^1H com o objetivo analisar os perfis dos extratos e buscar informações importantes sobre as classes de substâncias presentes.

Foram avaliadas principalmente três regiões: hidrogênios aromáticos; açúcar e hidrogênios metílicos, cada uma dessas regiões foi expandida. De um modo geral, os extratos apresentaram perfis semelhantes.

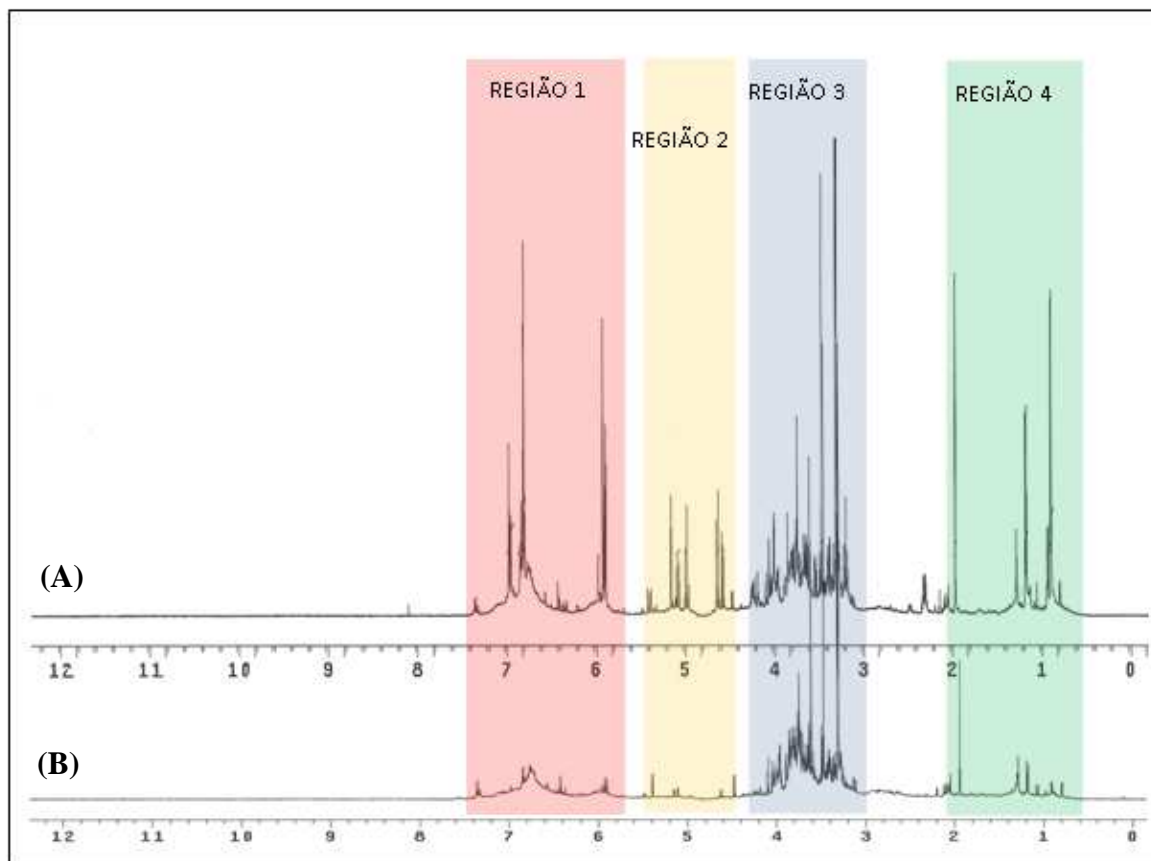


Figura 109. Espectros de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) dos extratos brutos (A) EMCEduck; (B) EMCEglab (δ em ppm).

A primeira região avaliada foi a região de hidrogênios aromáticos que corresponde à δ_{H} 7-5 ppm (SILVERSTEIN *et al.*, 2007), pois é a região onde pode-se prever a presença de flavonóides nos extratos, classe esta já isolada neste trabalho e há um trabalho na literatura que descreve o isolamento dessa classe em extratos polares de *E. falcata* (ROYER *et al.*, 2010). De fato, nessa região, os extratos possuem dubletos que podem ser de flavonóides. E ainda, as constantes de acoplamento (J) dos sinais mais blindados são $J=2-1,5$ pode-se supor que os hidrogênios mantêm posição *meta* entre si. Os hidrogênios do anel B do esqueleto básico dos flavonóides ocorrem em região mais desblindada que o anel A, pode-se supor que os sinais na região δ_{H} 7,0- 6,8 ppm podem ser de hidrogênios do anel B e os sinais em δ_{H} 6,0-5,9 ppm podem ser do anel A.

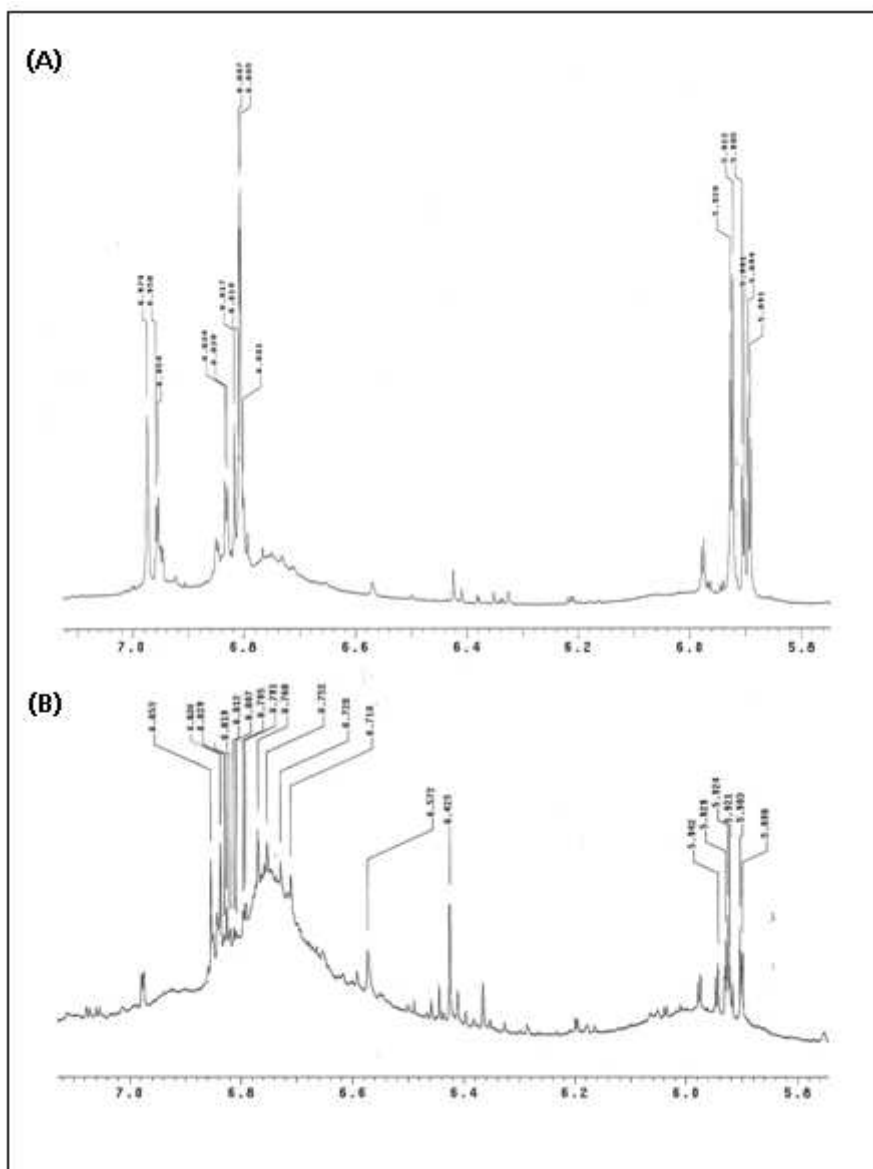


Figura 110. Ampliação da região 1 dos espectros de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) dos extratos brutos (A) EMCEduck; (B) EMCEglab (δ em ppm)

A região entre δ_{H} 5,5 e 4,4 ppm foi a que apresentou maior diferença, vários sinais estão presentes no extrato EMCEduck (A) e ausentes no EMCEglab (B), como mostrado na Figura 111. Essa região é característica de alquenos (H-C=C), indicando que o EMCEduck possui mais insaturações que o EMCEglab (B).

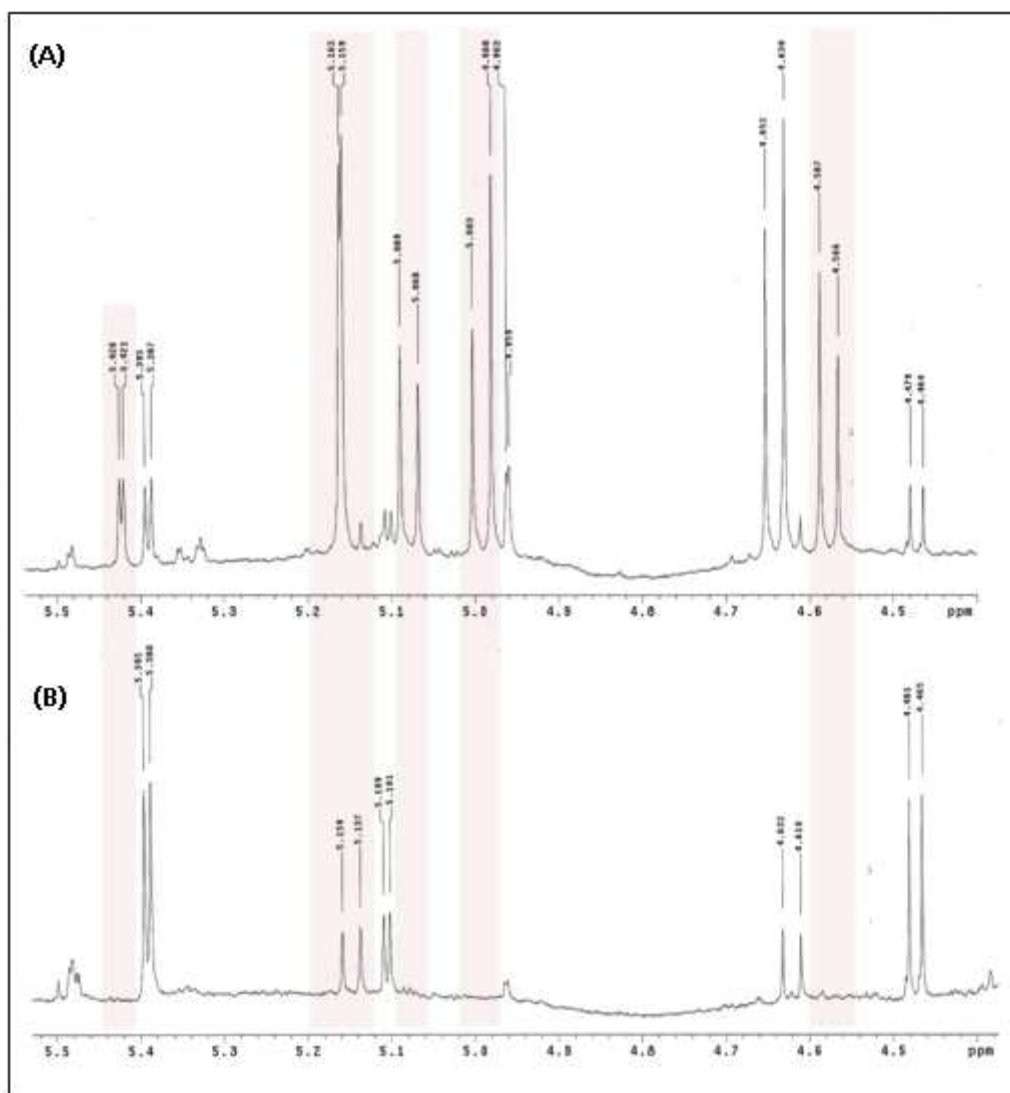


Figura 111. Ampliação da região entre δ_{H} 5,5 – 4,5 ppm dos espectros de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) dos extratos brutos (A) EMCEduck; (B) EMCEglab (δ em ppm)

Região complexa entre δ_{H} 4,1-3,3 ppm é característica de sinais de hidrogênios de açúcar. Essa região apresentou-se semelhante entre os extratos, sugerindo que ambos extratos são constituídos por moléculas glicosiladas.

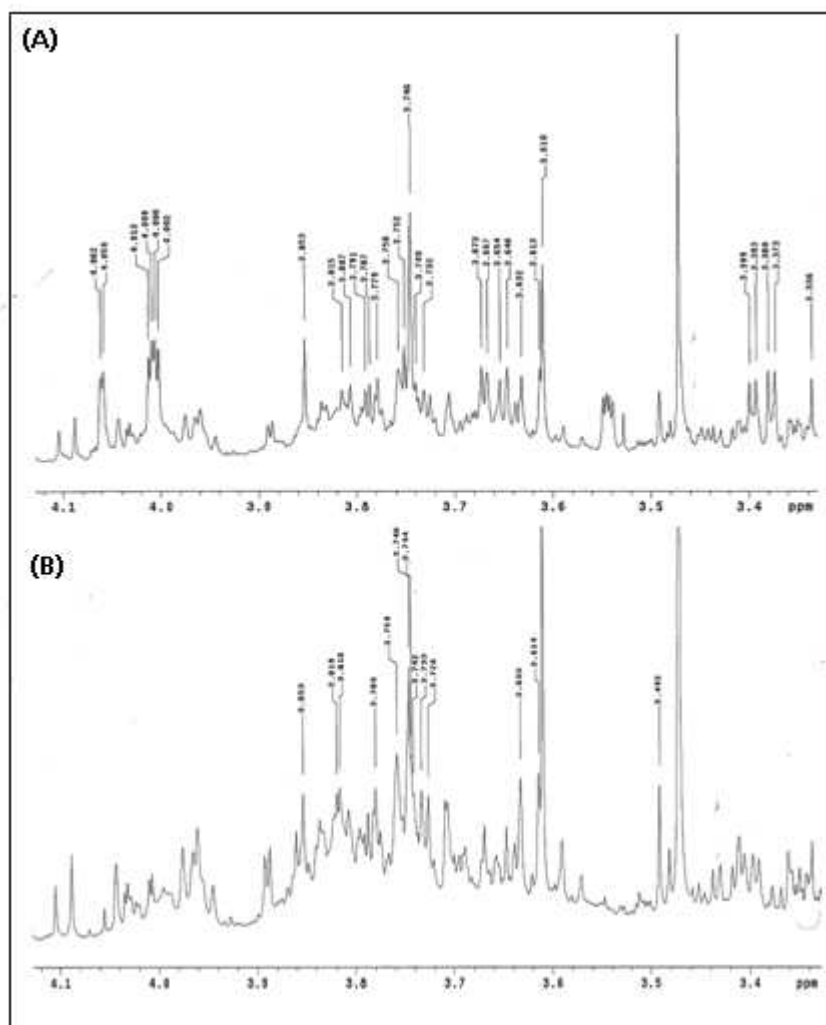


Figura 112. Ampliação da região δ_H 4,1 – 3,3 ppm dos espectros de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) dos extratos brutos (A) EMCEduck; (B) EMCEglab (δ em ppm)

A região mais blindada, δ_H 3,2-0,0 ppm é característica de hidrogênios ligados a carbonos sp^3 (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). O dubleto em δ_H 0,9 ($J=6$ Hz) pode ser de hidrogênio H-6'' do açúcar da ramnose, outro fato que indica a presença de ramnose é o sinal em δ_H 3,2 ppm (triplete), em maior proporção em EMFEduck. Há diferença também na região de 2,3 ppm, onde em (A) há um duplo dubleto que está ausente em EMFEglab.

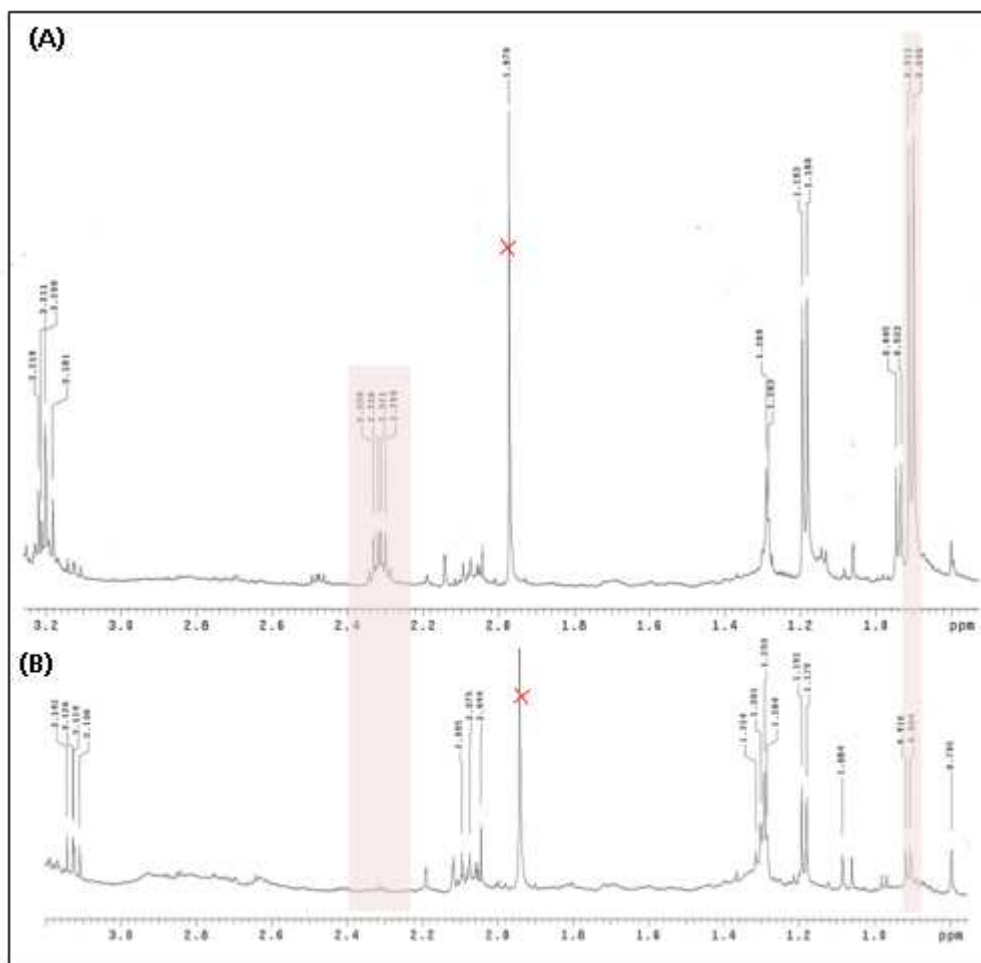


Figura 113. Ampliação da região δ_H 3,2 – 0 ppm dos espectros de RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) dos extratos brutos (A) EMCEduck; (B) EMCEglab (δ em ppm)

5.6.4. EXTRATOS DAS FOLHAS OBTIDOS EM HEXANO

5.6.4.1. AVALIAÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS POR CCD

Os extratos das folhas obtidos em hexano foram solubilizados em CHCl_3 e analisados por CCD. O melhor eluente encontrado foi Hex/ Et_2O 6:4. A Figura 114 mostra as cromatoplasmas reveladas em luz UV-254 nm (1), UV-365 nm (2), sulfato cérico (3), vanilina sulfúrica (4) e ácido sulfúrico (5).

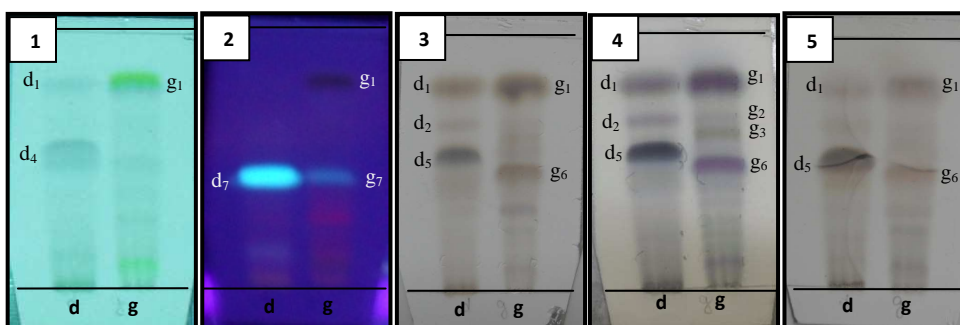


Figura 114. CCD comparativa dos extratos das folhas de *E. duckeana* (**d**) e *E. glabriflora* (**g**) obtidos em hexano e reveladas em luz UV-254 nm (1), 365 nm (2) e soluções de sulfato cérico (3), vanilina sulfúrica (4) e ácido sulfúrico (5). Eluente: Hex/ Et_2O 6:4.

Análises das cromatoplasmas no UV (254 nm e 365 nm, Figura 114-1 e 114-2, respectivamente), revelaram manchas apolares de R_f 0,79 (**d**₁ e **g**₁) em ambos os extratos, sendo que **g**₁ é composta por duas manchas muito próximas, uma superior de cor amarela em 254 nm e preta em 365 nm e outra lilás (254 nm); a **d**₁ é composta apenas da mancha lilás (por isso não apresenta a mancha preta no UV-365 nm). As manchas **d**₁ e **g**₁ puderam ser observadas nas cromatoplasmas reveladas em sulfato cérico (3), vanilina (4) e ácido sulfúrico (5). Foram observadas também manchas fluorescentes (UV-365 nm, Figura 114-2) de R_f 0,40 identificadas como **d**₇ e **g**₇ (menor quantidade). É interessante observar que a mancha **d**₇ não é

a mesma que absorvem no UV-254 nm, esta é um pouco mais apolar e R_f 0,54 (**d**₄). A absorção de luz UV indica que nos extratos há substâncias com grupos cromóforos (HOSTETTMANN *et al.*, 2008).

As cromatoplacas reveladas em sulfato cérico (**3**) e vanilina sulfúrica (**4**) apresentaram manchas bem definidas e distintas entre os extratos. O EHFEduck (**d**) apresentou a mancha **d**₂ de R_f 0,64 (Figura 114-3 e 114-4) presente em menor proporção em **g**₂ (observada apenas quando revelada em vanilina, Figura 114-4) e **d**₅ de R_f 0,55 de coloração roxa, Figura 114-4 (provavelmente co-eluída com a mancha **d**₄, observada no UV-254 nm). No EHFEGlab (Figura 114-4) foi observado a mancha **g**₃ (R_f 0,60) de coloração amarela e a mancha **g**₆ (R_f 0,47) de coloração roxa, essas duas manchas estão ausentes em EHFEduck. Coloração roxa em vanilina é indicativo de terpenos (WAGNER & BLADT, 1995).

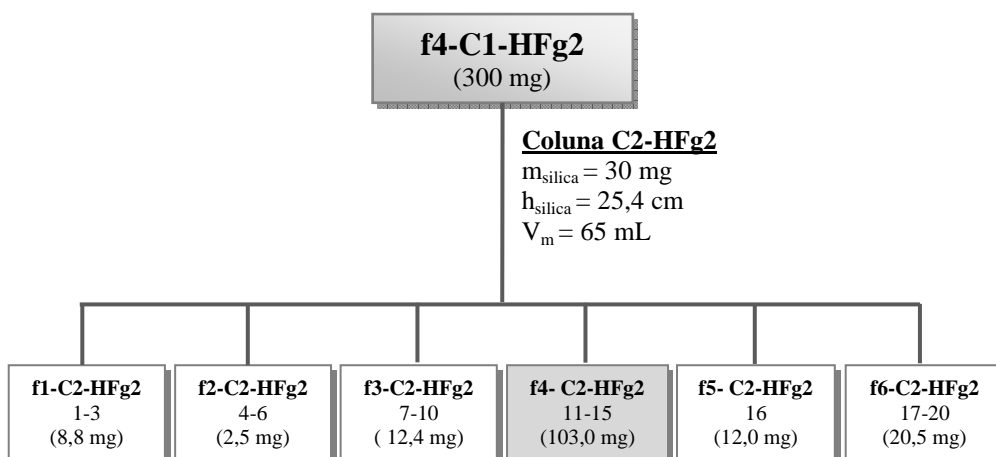
5.6.4.2. PRÉ- FRACIONAMENTO DO EXTRATO EHFEGlab2

Uma porção (4 g) do extrato obtido em hexano das folhas da *E. glabriflora* (EHFEGlab) foi pré-fracionado em coluna ($\varnothing=3,5$ cm) com sílica gel (70-230 mesh). Utilizou-se Hex, Et₂O, AcOEt, MeOH como eluentes nas proporções expressas na tabela abaixo. Foram coletadas 13 frações de 220 mL cada, sendo que as frações f2 e f11 foram divididas em duas frações de 110 mL cada, por apresentarem coloração diferenciada na eluição.

Tabela 29. Eluentes e massas das frações coletadas no fracionamento do extrato obtido em hexano das folhas de *E. glabriflora* (EHFEglab)

Frações	Eluente	Massa (mg)
f1-C1-HFg2	Hex 100%	800
f2-C1- HFg2	Hex/Et ₂ O 10%	(a) 321 (b) 161
f3-C1- HFg2	Hex/ Et ₂ O 20%	442
f4-C1- HFg2	Hex/ Et ₂ O 30%	899
f5-C1- HFg2	Hex/ Et ₂ O 40%	275
f6-C1- HFg2	Hex/ Et ₂ O 50%	150
f7-C1- HFg2	Hex/ Et ₂ O 70%	165
f8-C1- HFg2	Et ₂ O 100%	45,5
f9-C1- HFg2	Et ₂ O/AcOEt 20%	36,1
f10-C1- HFg2	Et ₂ O/AcOEt 50%	23,5
f11-C1- HFg2	AcOEt 100%	(a) 15,4 (b) 13,5
f12-C1- HFg2	AcOEt/MeOH 20%	52,5
f13-C1- HFg2	MeOH 100%	30,6

A fração f1-C1-HFg2, eluída em hexano, apresentou aspecto oleoso, podendo se tratar de uma mistura de sesquiterpenos. A fração f4-C1-HFg2 foi escolhida para dar prosseguimento ao processo cromatográfico por apresentar uma mancha majoritária de R_f 0,51 (quando eluída em Hex/CHCl₃/AcOEt 4:8:1) e por ser a fração com maior massa. Então, uma parte (300 mg) da fração f4-C1-HFg2 foi submetida à coluna (ø=2,0 cm) com sílica gel (70-230 mesh), utilizando Hex/CHCl₃/AcOEt 4:8:1 como eluente. Foram coletadas 20 frações de 9 mL cada (Esquema 16).



Esquema 16. Fracionamento da fração ácida f4-C1-HFg2

A fração f4-C2-HFg2 foi purificada por CCDP. O eluente utilizado foi Hex/CHCl₃/acetona 7:2:0,5. A placa foi revelada em luz UV-254 e 365 nm e com vanilina sulfúrica. A mancha de R_f 0,21 foi identificada como f3-PP1-HFg2 e analisada por RMN ¹H, porém essa fração apresentou-se como uma mistura e não pode ser identificada.

5.6.5. EXTRATOS DAS FOLHAS OBTIDOS EM ACETATO DE ETILA

5.6.5.1. AVALIAÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS POR CCD

Os extratos das folhas obtidos em acetato de etila foram solubilizados com uma mistura de AcOEt e MeOH e analisadas por CCD. O melhor eluente foi Hex/CHCl₃/MeOH 2:3:0,5. A Figura 115 mostra as cromatoplas no visível (1) após eluição e reveladas em luz UV-254 nm (2), UV-365 nm (3), sulfato cérico (3), vanilina sulfúrica (4) e ácido sulfúrico (5).

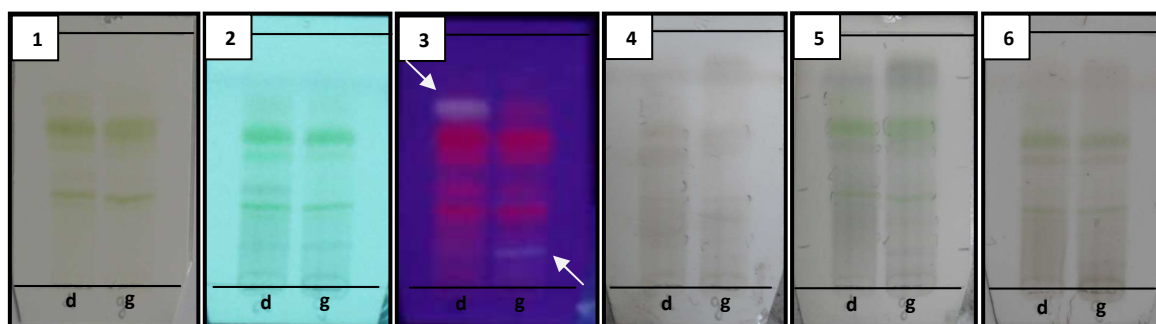


Figura 115. CCD comparativa dos extratos das folhas de *E. duckeana* (**d**) e *E. glabriflora* (**g**) obtidos em acetato de etila. Antes da revelação (1) e reveladas em luz UV-254nm (2), 365nm (3) e soluções de sulfato cérico (4), vanilina sulfúrica (5) e ácido sulfúrico (6). Eluente: Hex/CHCl₃/MeOH 2:3:0,5.

De modo geral, os extratos não apresentaram diferenças significativas quando avaliados seus perfis em CCD, sendo que o acompanhamento foi melhor realizado por revelação em luz UV (254- 365 nm), pois os reveladores, apesar de universais, não foram eficientes.

Em vanilina sulfúrica, ambos os extratos apresentaram rastros cinzas e 2 manchas verdes de R_f s: 0,62 e 0,49. Na luz UV-365 nm, as únicas diferenças observadas foram as manchas: fluorescente azul de R_f 0,72, presente em **d** e ausente em **g** e a mancha mais polar de R_f 0,20, presente em **g** e ausente em **d** (mostradas por setas na Figura 115-3). Segundo Wagner e Bladt (1995), cores vermelhas em UV-365 nm é indicativo de clorofila. Não foi realizado fracionamento desses extratos, apenas uma comparação por CCD.

5.6.6. EXTRATOS METANÓLICOS DAS FOLHAS: AVALIAÇÃO POR RMN ¹H

Os extratos obtidos em metanol foram avaliados por RMN ¹H com o objetivo analisar os perfis dos extratos e buscar informações importantes sobre as classes de substâncias presentes.

A principal informação obtida no espectro de RMN ^1H é que não há hidrogênios na região entre δ_{H} 7,0-5,5 ppm, característica de aromáticos (região1-Figura 116) nos extratos metanólicos das folhas de ambas espécies de eperuas, o que nos leva a afirmar que não há flavonóides nas folhas.

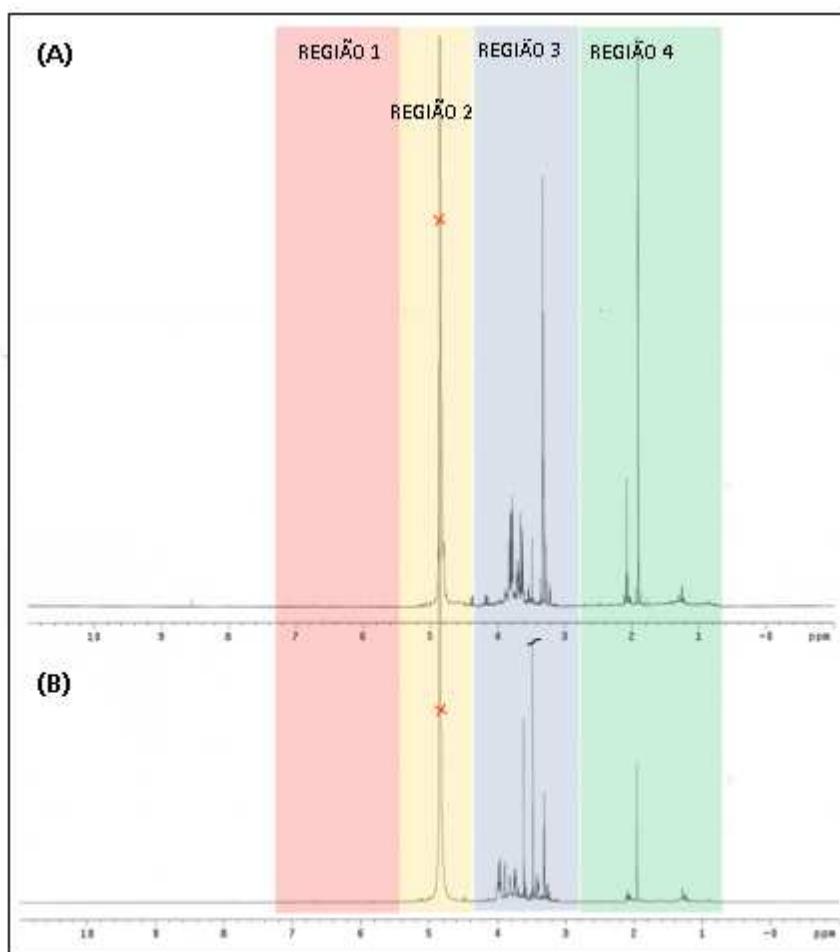


Figura 116. Espectros de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) dos extratos brutos (A) EMCEduck; (B) EMCEglab (δ em ppm)

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Como resultado do estudo fitoquímico e das atividades biológicas realizadas com os extratos e óleos essenciais das espécies *Eperua duckeana* e *Eperua glabriflora* pode-se concluir que:

(1) Foram identificados 35 constituintes dos óleos essenciais das folhas e talos coletadas em diferentes épocas (Março/2008 e outubro/2009). Os sesquiterpenos β -cariofileno e o germacreno D foram os constituintes majoritários nos óleos da *E. duckeana* e no óleo das folhas de *E. glabriflora* coletada em março de 2008. Todos os óleos apresentaram atividade citotóxica superior a 90% contra às células tumorais de câncer de cólon (HCT-8), câncer de mama (MDA/MB-435) e câncer do sistema nervoso central (SKF-295).

(2) Foram obtidos doze extratos brutos (de cascas e folhas) das duas espécies. Nos extratos apolares das cascas foram detectadas quatorze substâncias por CG-EM, sendo estas: seis ácidos graxos: ácido hexadecanóico, ácido 9,12-octadecadienóico, ácido 9-octadecenóico, ácido octadecanóico, ácido tetracosanóico, ácido hexacosanóico; quatro diterpenos: um isômero do ácido 3-clerodeno-15-óico, o ácido 3-clerodeno-15-óico, ácido catívico, ácido 3-hidroxi-labda-7,13-dieno-15-óico; o hidrocarboneto esqualeno; a vitamina α -tocoferol; e os esteróis estigmasterol e β -sitosterol. Essas duas últimas substâncias foram isoladas em mistura e identificadas por métodos espectrométricos.

O ácido 3-clerodeno-15-óico (M^+ 306) é o constituinte majoritário do extrato hexânico das cascas de *E. glabriflora* (ca. 37%), presente também no extrato equivalente da *E. duckeana*, porém em menor concentração (ca. 7%).

O extrato das cascas de *E. glabriflora* obtido em hexano (EHECglab) apresentou significativa atividade antibacteriana contra o *Bacillus subtilis* (CIM= 62,5 μ g/mL).

(3) No extrato de média polaridade das cascas de *E. glabriflora* foi isolado o 3-*O*-glicosil-flavanonol: engeletina. A estrutura desse flavonóide foi confirmada por métodos espectrométricos (RMN ^1H e ^{13}C e bidimensionais- HSQC, COSY, HMBC). Esse mesmo flavonóide foi detectado, em menor proporção, no extrato equivalente da *E. duckeana*. Foi isolado, também do extrato das cascas obtido em acetato de etila da *E. glabriflora* outro flavonóide, este de M^+ 476 que não pode ser identificado devido a pequena quantidade de amostra.

(4) Todos os extratos foram avaliados quanto à atividade antioxidante e quatro deles (os extratos das cascas obtidos em acetato de etila e em metanol de ambas as espécies) apresentaram atividade antioxidante significativa (CI_{50} 10,5 a 17,8 $\mu\text{g/mL}$) quando comparado com o padrão quercetina.

(5) Foram realizados perfis dos extratos obtidos em hexano e acetato de etila por CCD e dos extratos metanólicos por RMN ^1H . Observou-se que os extratos obtidos em acetato de etila possuem substâncias majoritárias diferentes. E que os extratos metanólicos das cascas possuem flavonóides, diferentemente dos extratos das folhas que não os tem.

Este é o primeiro estudo fitoquímico e farmacológico realizado com as espécies *Eperua duckeana* e a *Eperua glabriflora*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. **Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry**. Allured: Card Stream IL, 2007.

AGUIAR, J.S.; COSTA, M.C.C.D.; NASCIMENTO, S.C.; SENA, K.X.F.R. **Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 3, p. 436-440, 2008.

AMUSANT, N.; MORETTI, C.; RICHARD, B.; PROST, E.; NUZILLARD, J.M.; THÉVENON, M.F. **Chemical compounds from *Eperua falcata* and *Eperua grandiflora* heartwood and their biological activities against wood destroying fungus (*Coriolus versicolor*)**. *Holz Roh Werkst*, v. 65, p. 23-28, 2007.

ARAÚJO, M.F.; VIEIRA, I.J.C.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; MATHIAS, L. **Chemical constituents from *Swartzia apetala* Raddi var. *glabra* and evaluation of their antifungal activity against *Candida* spp.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 2A, p. 366-369, 2009.

ÁVILA, D.; MEDINA, J.D. **A cis-clerodane diterpenic acid from *Eperua purpurea***. *Phytochemistry*, v. 30, n. 10, p. 3474-3475, 1991.

ÁVILA, D.; MEDINA, J.D.; DEEMING, A.J. **A new clerodane-type diterpenoid from *Eperua leucantha***. *Journal of Natural Products*, v. 55, n. 7, p. 845-850, 1992.

ÁVILA, D.; MEDINA, J.D. **Constituents of the seed pods of *Eperua purpurea***. *Journal of Natural Products*, v. 56, n. 9, p. 1586-1589, 1993.

BARATA, L.E.S. **Fitoterápicos: alternativa para o Brasil**. *Comciência* 25 (2001). Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/farmacos/farma16.htm>>. Acesso em: 20 de outubro de 2008.

BARBOSA, L.C.A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Ed. UFV, 2007.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. **Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo**. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. **Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos.** *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.** *Revista Nutrição*, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIAVATTI, M.W.; DOSSIN, D.; DESCHAMPS, F.C.; LIMA, M.P. **Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o controle de qualidade.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 2, p. 230-235, 2006.

BLAKE, S.; JONES, G. **Extractives from *Eperua falcate*. The Petrol-soluble Constituents.** *Journal of Chemical Society*, p. 430-433, 1963.

BUTLER, M.S. **Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials.** *Natural Product Reports*, v. 25, n. 3, p. 475-516, 2008.

BRAGA, W.F.; REZENDE, C.M.; ANTUNES, O.A.C.; PINTO, A.C. **Terpenoids from *Copaiba cearensis*.** *Phytochemistry*, v. 49, n.1, p. 163-264, 1998.

BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O.R.; PINHO, S.L.V.; MONTE, F.J.Q.; ROCHA, A.I. **Flavonoids from Amazonian Leguminosae.** *Phytochemistry*, v. 12, p. 1184-1186, 1973.

CALIXTO, J.B. **Biodiversidade como fonte de medicamentos.** *Ciência e Cultura*, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CAVIN, A.L.; HAY, A.E.; MARSTON, A.; EVANS, H.S.; SCOPELLITI, R.; DIALLO, D.; HOSTETTMANN, K. **Bioactive diterpenos from the fruits of *Detarium microcarpum*.** *Journal of Natural Products*, v. 69, n. 5, p. 768-773, 2006.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. **Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade.** *Química Nova*, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CERQUEIRA, F.M.; GENNARI, M.H.; AUGUSTO, O. **Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas.** *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

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 assay-guided comparison. *Plant Science*, v. 163, p. 1161-1168, 2002.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Approved standard M7-A6. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**, Pennsylvania, p. 49, 2005a.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Approved standard M27-A2. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**, Pennsylvania, p. 43, 2005b.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Approved standard M38-A. Reference method for broth microdilution test for screening of filamentous fungi**, Pennsylvania, p. 48, 2005c.

CORRÊA, A.G. **Taxol: da descoberta ao uso terapêutico.** *Química nova*, v. 15, n. 5, p. 460-467, 1995.

COWAN, R. S. **A monograph of the genus *Epeura* (Leguminosae: Caesalpinioideae).** *Smithsonian Contributions to Botany*, n. 28, p. 1-45, 1975.

CRAGG, G.M.; D.J. NEWMAN. **Plants as a source of anti-cancer agents.** *Journal of Ethnopharmacology*. v. 100, p. 72-79, 2005.

DEFILIPPS, R. A.; MAINA, S. L.; CREPIN, J. **Medicinal Plants of the Guianas.** Disponível em: <http://botany.si.edu/bdg/medicinal/Medicinal_plants_master.pdf> Acesso em: 12 de abril de 2009.

DE SANTIS, V.; MEDINA, J.D. **Crystalline racemic labda-8(20), 13-dien-15-oic acid in the trunk resin of *Eperua purpurea*.** *Journal of Natural Products*, v. 44, n. 3, p. 370-372, 1981.

DE SANTIS, V.; MEDINA, J.D. **Three new natural ketones from *Eperua purpurea*.** *Acta Científica Venezolana*, v. 38, n. 2, p. 143-147, 1987.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products.** 2. ed. Londres: John Wiley & Sons Ltd, 2001.

DIMAS, K.; DEMETZOS, C.; MARSELLOS, M.; SOTIRIADOU, R.; MALAMAS, M.; KOKKINOPOULOS, D. **Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines in vitro.** *Planta Medica*, v. 64, p. 208-211, 1998.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** 2. ed. rev. e ampl.- São Paulo: Editora UNESP, 2002.

DUARTE, M. C. T. (2006), **Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil.** Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf> . Acesso em: 28 de julho de 2010.

FACUNDO, V.A.; POLLLI, A.R.; RODRIGUES, R.V.; MILITÃO, J.S.L.T.; STABELLI, R.G.; CARDOSO, C.T. **Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K.** *Acta Amazonica*, v. 4, 733- 742, 2008.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K.. **Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E.D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S.B. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae).** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 2, p. 224-230, 2007.

FIOCRUZ_ BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas.** Disponível em: <<http://www.fiocruz.br>>. Acesso em 15 de março de 2010.

FLAKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.;SIMÕES, C.M.O. Introdução a análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. [et al.] **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFCS, 2007. (p.237)

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. **Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.

GARCIA, E.S. **Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde.** *Caderno de Saúde Pública*, v. 11, n. 3, p. 495-500, 1995.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.; BERG, C.V. **B. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil.** *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, p. 52-60, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. **Plantas Mediciniais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOURNELIS, D.; VIDAL-TESSIER, A.M.; DELAVEAU, P. **Resin of *Eperua grandiflora* (Aublet) Benth. (Caesalpiniaceae).** *Annales Pharmaceutiques Francaises*, v. 43, n. 6, p. 565-72, 1986.

GUERRA, M.R.; GALLO, C.V.M.; MENDONÇA, G.A.S. **Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes.** *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

HANSON, J.R. Diterpenoids. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B.; CHARLWOOD, B.V.; BANTHORPE, D.V. **Methods in Plants Biochemistry.** Vol. 7 (Terpenoids). Londres: Academic Press, 1991.

HANSON, J.R. **Diterpenoids.** *Natural Product Report*, v. 15, p. 93-106, 1998.

HANSON, J.R. **Diterpenoids.** *Natural Product Report*, v. 17, p. 165-174, 2000.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. **Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships.** *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 13, p. 572-584, 2002.

HENRY, F.; MOSER, P.; DANOUX, L.; AUDONNEAU, J.L.C.; PAULY, G. [França] **Preparations containing na extract of *Eperua falcata* and/or constituents of the latter.** US 2007/0003510 A1. United States Patent Application Publication, Janeiro 2007.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS-FILHO, B.P. **Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOSTETTMANN, K; GUPTA, M.P.; QUEIROS, E.F. **Handbook of strategies for the isolation of bioactive natural products.** Bogotá: Iberoamerican program of science and technology. Cytel, 2008

HU, R.; YANG, Z.; ZHANG, L. **Trace analysis of acidic pharmaceutical residues in waters with isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry via methylation derivatization.** *Talanta*, v. 85, p. 1751-1759, 2011.

INCA_ BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de câncer (INCA). **O que é o câncer?** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 03 de março de 2010.

KING, F.E.; JONES, G. **The Chemistry of extractives from hardwoods. Part XXI. The structure of Eperuic Acid.** *Journal of the Chemical Society*, p. 658-665, 1955.

KINGSTON, D.G.I. **The shape of things to come: structural and synthetic studies of taxol and related compounds.** *Phytochemistry*, v. 68, p. 1844-1854, 2007.

LARSON, R.A. **The antioxidants of higher plants.** *Phytochemistry*, v. 27, n. 4, p. 969- 978, 1988.

LIMA, V.B. 2005. **Estudo fitoquímico de Himatanthus obovatus (Muell. Arg.) Woodson (APOCYNACEAE): isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica.** Tese (Doutorado em Química)- UNICAMP, Campinas, São Paulo.

LOBO, A.M.; LOURENÇO, A.M. **Biossíntese de produtos naturais.** Lisboa: IST Press, 2007.

LU, Y.; FOO, L.Y. **The polyphenol constituents of grape pomace.** *Food Chemistry*, v. 65, p. 1-8, 1999.

LUIZE, P.S.; TIUMAN, T.S.; MORELLO, L.G.; MAZA, P.K.; NAKAMURA, T.U.; FILHO, B.P.D.; CORTEZ, D.A.G.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V. **Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 1, n. 41, p. 85-94, 2005.

LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T.; SOBRATTEE, 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, n. 18, p. 5042-5047, 2002.

MAILLO, M.A.; DE SANTIS, V.; MEDINA, J.D. **Constituents of the trunk resin of *Eperua leucantha*.** *Journal of Medicinal Plant Research*, v. 53, n. 2, p. 229-230, 1987.

MAIA, J.G.S.; ANDRADE, E.H.A. **Database of the amazon aromatic plants and their essencial oils.** *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 595-622, 2009.

MACIEL, M.A.; PINTO, A.C.; VEIGA JR., V.F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C.M.S.; NIERO, R.; CEHINEL FILHO, V. **Considerações Gerais sobre Aspectos Químicos e Biológicos de Plantas Medicinais. Fármacos e Medicamentos: Uma Abordagem Multidisciplinar.** Organizadores: Tania Mari Bellé Bresolin e Valdir Cechinel Filho. São Paulo: Santos, 2010 (pag.21)

MARTINS, L.; SILVA, M.F. In: RIBEIRO, J.E.L.S. [*et al.*]. **Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central.** Manaus: INPA, 1999.

MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental.** Fortaleza: UFC, 2001.

MEDINA, J.D.; DE SANTIS, V. **Constituents of the trunk resin of *Eperua purpurea*.** *Journal of Medicinal Plant Research*, v. 43, p. 202-206, 1981.

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

MOSSMAN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.** Approved standards M7-A5. Wayne, PA, 2000.

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, P.O.; BARBOSA-JÚNIOR, A.M.; TRINDADE, R.C. **Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NCI_ Estados Unidos. National Cancer Institute. **What is cancer?** Disponível em: <<http://www.cancer.gov>>. Acesso em 05 de fevereiro de 2010.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C.M.S.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; CECHINEL FILHO, V. **Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. Ciências químico-Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos.** Organizadores: Valdir Cechinel Filho e Tânia Mari Bellé Bresolin- Itajaí: UNIVALLI, 2003.

OLIVEIRA, A. C. 2005. **Estudo Fitoquímico de Leguminosas: Harleyodendron unifoliolatum e Holocalyx balansae: Isolamento, determinação estrutural e atividade biológica.** Tese (Doutorado em Química)- UNICAMP, Campinas: São Paulo.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E. J.H.; TREVISAN, M.T.S. **Fontes vegetais naturais de antioxidantes.** *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OMS_ Organização mundial da Saúde. **Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas.** Disponível em: <<http://www.who.int/tdr>>. Acesso em novembro 2009.

OMS_ Organização Mundial da Saúde. **Leishmaniasis.** Disponível em: <<http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/en/>>. Acesso em fevereiro 2010.

PATITUCCI, M.L.; VEIGA JR., V.F.; PINTO, A.; ZOGHBI, M.G.B.; SILVA, J.R. **Utilização de cromatografia gasosa de alta resolução na detecção de classe de terpenos em extratos brutos vegetais.** *Química nova*, v. 18, n. 3, p. 262-266, 1995.

PATRA, A.; JHA, S.; MURTHY, P.N.; MANIK, A.S. **Isolation and characterization of stigmast-5-en-3 β -ol (β -sitosterol) from the leaves of *Hygrophila spina* T. Anders.** *International Journal of Pharma Sciences and Research*, v. 1, n. 2, p. 95-100, 2010.

PAULY, G.; MORETTI, C.[França] **Use of plants extracts with anti-radical –type action.**US 6,511,684 B1. United States Patent, Janeiro 2003a.

PAULY, G.; MORETTI, C.[França] **Plants extracts with anti-radical –type action.**US 2003/0138507 A1. United States Patent, Julho 2003b.

PAULY, G.; MORETTI, C.[França] **Plants extracts with anti-radical –type action.**US 6,861,078 B2. United States Patent, March 2005.

PIETTA, P.G. **Flavonoids as Antioxidants.** *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINK, R.; HUDSON, A.; MOURIÈS, M.A.; BENDING, M. **Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery**. *Nature Reviews/ Drug Discovery*, v. 4, p. 727-740, 2005.

PINTO, A.C.; BRAGA, W.F.; REZENDE, C.M.; GARRIDO, F.M.S.; VEIGA Jr., V.F.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M.L.; ANTUNES, O.A.C. **Separation of Acid Diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by Flash Chromatography Using Potassium Hydroxide Impregnated Silica Gel**. *Journal Brazilian Chemical Society*, v. 11, n. 4, p. 355-360, 2000.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas**. *Química Nova*, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

REGASINI, L.O.; FERNANDES, D.C.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J.; CARDOSO-LOPES, E.M.; YOUNG, M.C.M.; TORRES, L.B.; VELLOSA J.C.R.; OLIVEIRA, O.M.M. **Constituintes Químicos das Flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae)**. *Química Nova*, v.31, n.4, p. 802- 806, 2008.

RICHTER, H.G.; DALLWITZ, M.J. **Commercial timbers: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval**. Version: 25th- Junho 2009. Disponível em: <<http://delta-intkey.com/wood/pt/www/caesepsp.htm>>. Acesso em dezembro de 2009.

ROSKOY, Y.R.; BISBY, F.A.; ZARUCCHI, J.L.; SCHRIRE B.D.; WHITE R.J. **International Legume Database and Information Service (ILDIS)** versão: 10.01, Maio 2007. Disponível em:< <http://www.ildis.org>>. Acesso em: 10 dezembro 2009.

ROYER, M.; STIEN, D.; BEAUCHÊNE, J.; HERBETTE, G.; MCLEAN J.P.; THIBAUT, A.; THIBAUT, B. **Extractives of the tropical wood wallaba (*Eperua falcata* Aubl.) as natural anti-swelling agents**. *Holzforschung*, v. 64, p. 211-215, 2010.

RUBINSTEIN, I.; GOAD, L.J.; CLAGUE, A.D.H.; MULHEIRN, L.J. **The 220 MHz NMR Spectra of Phytosterols**. *Phytochemistry*, v. 15, p. 195-200, 1976.

RUIZ, A. L. T.G. 2003. **Estudo fitoquímico de algumas espécies de *Eleocharis* R. Br. (Cyperaceae): isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica**. Tese (Doutorado em Química)- UNICAMP, Campinas, São Paulo.

SALAH, M.A.; BEDIR, E.; TOYANG, N.; KHAN, I.A.; HARRIES, M.D.; WEDGE, D. **Antifungal clerodane diterpenes from *Macaranga monandra* (L) Muell. et Arg. (Euphorbiaceae)**. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 51, p. 7607-7610, 2003.

SANNOMIYA, M. 2001. **Análise fitoquímica de *Platymiscium floribundum* var. *latifolium* e *Lonchocarpus Montanus*: Isolamento, determinação estrutural e atividade biológica.** Tese (Doutorado em Química) - UNICAMP, Campinas: São Paulo.

SANTOS, A.O.; NAKAMURA, T.U.; FILHO, B.P.D.; VEIGA-JUNIOR., V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. **Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 3, p. 277-281, 2008a.

SANTOS, A.O.; NAKAMURA, T.U.; FILHO, B.P.D.; VEIGA-JUNIOR., V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. **Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 120, p. 204–208, 2008b.

SHARMA, A.; BHARDWAJ, S.; MANN, A.S.; JAIN, A.; KHARYA, M.D. **Screening Methods of Antioxidant Activity: An Overview.** *Pharmacognosy Reviews*, v. 1, n. 2, p. 232-238, 2007.

SILVA, V.C.; CARVALHO, M.G.; SILVA, S.L.C. **Chemical Constituents from roots of *Andira anthelmia* (LEGUMINOSAE).** *Revista Latinoamericana de Química*, v. 35, n. 1, p. 13-19, 2007.

SILVA, S.L.; CHAAR, J.S.; FIGUEIREDO, P. M.S.; YANO, T. **Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes** *Acta Amazônia*, v. 38, n. 1, p. 107-112, 2008.

SILVA, M.F.; SOUZA, L.A.G.; CARREIRA, L.M.M. **Nomes populares das Leguminosas do Brasil.** 1. ed. Manaus: EDUA/INPA/FAPEAM, 2004.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, C. M. O. [et al.] **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFCS, 2007.

SINGH, M.; PAL, M.; SHARMA, R.P. **Biological Activity of the Labdane Diterpenes.** *Planta Medica*, v. 65, p. 2-8, 1999.

SINGH, S.B; BARRETT, J.F. **Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products.** *Biochemical pharmacology*, v. 71, p. 1006-1015, 2006.

SIQUEIRA, D.S.; PEREIRA, A.S.; NETO, F.R.A.; CABRAL, J.A.; FERREIRA, C.A.C.; SIMONEIT, B.R.T.; ELIAS, V.O. **Determinação de compostos de massa molecular alta em folhas de plantas da Amazônia.** *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 633-640, 2003.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II.** 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

SOUSA, C.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-Jr, G.M.; AYRES, M.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.; 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.

SOLER-RIVAS, C.; ESPIN, J.C.; WICHERS, H.J. **An Easy and Fast Test to Compare Total Free Radical Scavenger Capacity of Foodstuffs.** *Phytochemical Analysis*, v. 11, p. 330-338, 2000.

STILL, W. CLARK; KAHN, MICHAEL; MITRA, ABHIJIT. **Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution.** *Journal of Organic Chemistry*, v. 43, n. 11, p. 2923-2925, 1978.

SVS_ BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas** (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

SVS_ BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** – 2. ed. Atual (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

SYLVESTRE, M.; LEGAULT, J.; DUFOUR, D.; PICHETTE, A. **Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of Myrica gale L.** *Phytomedicine*, v. 12, p. 299-304, 2005.

TABART, J.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J.O.; DOMMES, J. **Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured.** *Food Chemistry*, v. 113, p. 1226-1233, 2009.

TAMAI, E.; TSUCHIYA, K.; NISHIZAWA, Y.; HANADA, M.; TOKORO, K. [Hiratsuka, Japão]. **Biologically active labdane or labdene derivatives from Cistus.** EP 1.252.888 B1. European Patent Specification, Abril 1999.

TAMAI, E.; TSUCHIYA, K.; NISHIZAWA, Y.; HANADA, M.; TOKORO, K. [Hiratsuka, Japão] **Melanin inhibiting and cell growth activating compositions containing compounds having labdane structure.** US 6.313.214 B1. United States Patent, Novembro 2001.

TSAI, P.J.; MCINTOSH, J.; PEARCE, P.; CAMDEN, B.; JORDAN, B. **Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa L.*) extract.** *Food Research International*, v. 35, p. 351-356, 2002.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D. **A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography.** *Journal of Chromatography*, v. 11, p. 463- 471, 1963.

VEIGA-JUNIOR, V.F. 1997. **Controle de qualidade de óleos de copaíba por cromatografia gasosa de alta resolução.** Dissertação de mestrado. Rio de Janeiro, UFRJ, IQ.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. **O GÊNERO *Copaifera L.*** *Química Nova*, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. **Plantas medicinais: cura segura?** *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

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. 46, p. 4113-4117, 1998.

VICENTINO, A.R.R.; MENEZES, F.S. **Atividade antioxidante de tinturas vegetais vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17 n3, 384-387, 2007.

VILLENEUVE, F.; VERGNET, A. M. **Study on flavans in a tropical essential oil “*Eperua falcata Aubl.*”.** *Actualites Botaniques*, v. 3, p. 19-24, 1988.

XU, J.; LI, X.; ZHANG, P.; LI, Z.L.; WANG, Y. **Antiinflammatory Constituents from the Roots of *Smilax bockii warb.*** *Archives of Pharmacal Research*, v. 28, n. 4, p. 395- 399, 2005.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. In: SIMÕES, C. M. O. [*et al.*] **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFCS, 2007.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval**. Version: 25th November 2009. Disponível em: <<http://delta-intkey.com>>. Acesso em: 22 dezembro de 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug Analysis. A thin layer Chromatography Atlas**. 2. ed. Alemanha: Springer, 1995.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C. **Flavonoids and Isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity**. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 36, n. 7, p. 838 – 849, 2004.

WRIGHT, J.L.C.; MCINNES, A.G.; SHIMIZU, S.; SMITH, D.G.; WALTER, J. A.; IDLER, D.; KHALIL, W. **Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy**. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 56, n. 14, p. 1898-1903, 1978.

YAMAMOTO, T.; YAMAMOTO, K. [Hiratsuka-shi, Japão] **Accelerator of collagen production**. US 2005/0004217 A1. United States Patent Application Publication, Janeiro 2005.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁ S-BARBERÁ N, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. **Flavonoids in Food and Their Health Benefits**. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 59, p. 113- 122, 2004.