



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

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE IPÊS AMAZÔNICOS (*Tabebuia incana* A.
H. GENTRY E *Tabebuia serratifolia* (VAHL) G. NICHOLSON) E
DEFINIÇÃO DE PERFIL CROMATOGRÁFICO DE AMOSTRA
COMERCIAL**

RENATA DUARTE LIMA

MANAUS

2018

RENATA DUARTE LIMA

ESTUDO FITOQUÍMICO DE IPÊS AMAZÔNICOS (*Tabebuia incana* A. H. GENTRY E *Tabebuia serratifolia* (VAHL) G. NICHOLSON) E DEFINIÇÃO DE PERFIL CROMATOGRÁFICO DE AMOSTRA COMERCIAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química Orgânica na linha de Produtos Naturais e Biomoléculas.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior
Coorientador: Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães

MANAUS

2018

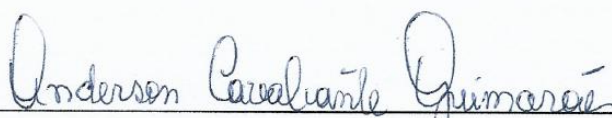
“Estudo fitoquímico de Ipês Amazônicos (*Tabebuia incana* A. H. Gentry e *Tabebuia serratifolia* (Vahl) G. Nicholson) e definição de perfil cromatográfico de amostra comercial.”

Renata Duarte Lima

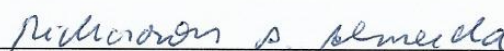
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovada em 21 de dezembro de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães
Universidade Federal do Amazonas
Coorientador



Prof. Dr. Richardson Alves Almeida
Membro Externo



Prof.^a Dr.^a Cecília Verônica Nunez
Membro INPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

Manaus, 21 de dezembro de 2018.

Ficha Catalográfica

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

L732e Lima, Renata Duarte
Estudo fitoquímico de ipês amazônicos (*Tabebuia incana* A. H. Gentry e *Tabebuia serratifolia* (Vahl) G. Nicholson) e definição de perfil cromatográfico de amostra comercial / Renata Duarte Lima. 2018
108 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Valdir Florêncio da Veiga Junior
Coorientador: Anderson Cavalcante Guimarães
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Bignoniaceae. 2. *Tabebuia*. 3. Pau d'arco. 4. Iridoides . 5. Fenilpropanoides. I. Veiga Junior, Valdir Florêncio da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Não digam palavras que fazem mal ao outro,
mas usem apenas palavras boas, que ajudem
o outro a crescer na fé e a conseguir o que
necessita....*

Efésios 4:29 (NTLH)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me permitido chegar até o fim e concluir esse enorme desafio proporcionado.

Aos meus pais que foram incansáveis em prover minha formação como pessoa, cidadã e mulher de bons princípios por meio de palavras e principalmente pelos bons exemplos.

Às minhas irmãs sempre prontas a ouvir e dar apoio em todos os momentos.

Ao Célio Matias, meu noivo e companheiro de muitos momentos, sempre presente com palavras de incentivo, disposição para ajudar e muito carinho.

Aos professores Valdir Veiga e Anderson Guimarães por todo ensinamento e orientação.

Aos meus amigos do grupo Q-Bioma, e em particular à Karen Alves e à Karen Maciel, que contribuíram com muito conhecimento e atenção de irmãos.

Aos colegas, amigos e servidores dos demais laboratórios que contribuíram durante todo o processo de análises e interpretação de resultados.

Ao Programa de Pós-graduação em Química na forma de seus servidores técnicos e docentes pelo seu trabalho em auxiliar e ensinar de forma eficiente e facilitadora.

À Secretaria de Estado de Educação e Qualidade do Ensino do Amazonas pela concessão de afastamento de função dada a mim por meio de licença para estudo.

Aos meus colegas de trabalho da E. E. Prof^a Ondina de Paula Ribeiro que me ajudaram com enorme companheirismo e compreensão.

A todos que contribuíram de alguma maneira para conclusão dessa etapa tão importante.

Resumo

A família Bignoniaceae apresenta-se como umas das mais estudadas nas últimas décadas e o gênero *Tabebuia* como o mais populoso dessa família. As árvores desse gênero são conhecidas como ipês e largamente usadas para paisagismo em várias partes do mundo e principalmente nas regiões sul e sudeste do Brasil. As cascas e folhas de pau d'arco (nome conhecido em alguns países latinos e nas regiões norte e nordeste do Brasil) são usadas como anti-inflamatório por decocção segundo a medicina popular. Em estudos realizados para a identificação dos compostos em espécies de *Tabebuia*, a presença de naftoquinonas e seus derivados foi confirmada. Outros compostos como as lignanas também são enumerados como componentes dos extratos estudados a partir de folhas e cascas de espécies de *Tabebuia*. As atividades biológicas promovidas por substâncias isoladas a partir de amostras de *Tabebuia* foram comprovadas e são usadas na produção de fármacos para tratamento anti-inflamatório e antineoplásico. Estudos para identificação de componentes de espécies de *Tabebuia* presentes na região Amazônica são pouco expressivos e têm em seu ponto principal de discussão compostos obtidos de extratos de baixa e média polaridade. Esse trabalho tem como objetivo a análise de extratos etanólicos de cascas de *T. incana*, *T. serratifolia* e amostra comercial Amazônicas para a descrição dos possíveis componentes das cascas dessas espécies.

Palavras-chave: Bignoniaceae, *Tabebuia*, pau d'arco, iridoides, fenilpropanoides.

Abstract

The Bignoniaceae family is one of the most studied in the last decades and the genus *Tabebuia* is the most populous of this family. Trees of this genus are known as ipes and widely used for landscaping in various parts of the world and mainly in the south and southeast regions of Brazil. The bark and leaves of pau d'arco (name known in some Latin countries and in the north and northeast of Brazil) are used as anti-inflammatory by decoction according to popular medicine. In studies for the identification of compounds in species of *Tabebuia*, the presence of naphthoquinones and their derivatives was confirmed. Other compounds such as lignans are also listed as components of extracts studied from leaves and bark of *Tabebuia* species. The biological activities promoted by substances isolated from samples of *Tabebuia* have been proven and are used in the production of drugs for anti-inflammatory and antineoplastic treatment. Studies to identify components of *Tabebuia* species present in the Amazon region are not very expressive and have at their main point of discussion compounds obtained from extracts of low and medium polarity. This work has the objective of analyzing the ethanolic extracts of *T. incana*, *T. serratifolia* and commercial Amazonian samples for the description of the possible shell components of these species.

Keywords: Bignoniaceae, *Tabebuia*, pau d'arco, iridoids, phenylpropanoids.

Sumário

Lista de Quadros	XII
Lista de Tabelas	XII
Lista de Figuras	XIII
Lista de Unidades, Símbolos e Abreviaturas	XIX
1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	24
2.1. Geral	24
2.2. Específicos	24
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
3.1 Família Bignoniaceae	25
3.2 Tribo Tecomeae e Gênero <i>Tabebuia</i>	26
3.3 Compostos orgânicos presentes no gênero <i>Tabebuia</i>	28
3.3.2 Fenilpropanoides	35
3.3.3 Compostos Fenólicos	37
3.3.4 Isocumarinas	39
3.3.5 Iridoides	39
3.4 Métodos Cromatográficos, Espectrométricos e Espectroscópicos	42
3.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a UV e Espectrometria de Massa (CLAE-DAD-EM)	42
3.4.2 Ressonância magnética Nuclear (RMN)	45
3.4.3 Cromatografia em Contracorrente (CCC)	45
4. METODOLOGIA	48
4.1 Material Vegetal	48
4.2 Obtenção de Extrato Etanólico	48
4.2.2 Partição da cascas de <i>T. incana</i> e <i>T. serratifolia</i>	49
4.3 Métodos Cromatográficos	49
4.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	49

4.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – DAD (CLAE - DAD).....	49
4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Espectrometria de Massas (CLAE-EM)	50
4.3.4 Cromatografia em Contracorrente de Alta Performance (CCCAP).....	51
4.3.4.1 Avaliação de sistemas por meio de CCD para separação de iridoídes e compostos glicosilados	51
4.3.4.2 Injeção no CCCAP em coluna preparativa em fase Reversa.....	54
4.3.4.2.1 Método 1: corrida em modo isocrático utilizando sistema EBWats 2 (tabela 2)	54
4.3.4.2.1 – Método 2: corrida em modo gradiente utilizando sistema EBWats 2 (tabela 2)....	56
4.3.5 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)	58
4.3.5.1 Avaliação de sistemas em CCD.....	58
4.3.5.2 Confeção da placa cromatográfica CCDP	58
4.3.5.3 Aplicação e eluição da amostra	58
4.4.1 Espectrometria de Massas (EM).....	58
4.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	60
5.1 Perfil cromatográfico dos extratos etanólicos de <i>T. incana</i> , <i>T. serratifolia</i> e amostra comercial de ipê.....	61
5.1.1 Análise em CLAE-DAD e CLAE-EM dos extratos etanólicos de <i>T. incana</i> , <i>T. serratifolia</i> e amostra comercial.	61
5.2 Análise das corridas realizadas em CCCAP e caracterização das frações obtidas em CCCAP e CCDP.....	76
5.2.1 Avaliação dos métodos de injeção e do rendimento das corridas em CCCAP	76
5.2.2 Avaliação dos sistemas de solventes e modo de injeção utilizados	77
5.2.3 Análise em CCDP das frações obtidas em CCCAP.....	77
5.3 Avaliação das amostras obtidas em CCCAP e CCDP por meio de espectros de EM e RMN	78
5.3.1 Amostra MP3.6.....	78
5.3.1.1 Espectros de EM.....	78

5.3.1.2 Espectros de RMN.....	83
5.3.2 Amostra E.....	93
5.3.2.1 Espectros de EM.....	93
5.3.2.2 Espectros de RMN.....	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

Lista de Quadros

Quadro 1: Gêneros da Tribo Tecomeae.....	27
Quadro 2: Naftoquinonas de Bignoniaceae.....	31

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tribos da família Bignoniaceae segundo a classificação de Fischer et al. (2004).....	25
Tabela 2: Sistema HEMWats e EBWats.....	52
Tabela 3: Sistemas de solventes modificados.....	53
Tabela 4: Sistemas usados a partir da terceira corrida.....	57
Tabela 5: Tempos de retenção e máximos de absorção dos extratos etanólicos de <i>T. incana</i> e <i>T. serratifolia</i> obtidos em CLAE-DAD.....	62
Tabela 6: Tempo de retenção de espectros com sinal em m/z 623 [M-H] ⁻	67
Tabela 7: Massas e rendimentos das corridas.....	75
Tabela 8: Sinais de HSQC de fenilpropanoide de MM 624 u (Warashina et al., 2006) e da amostra MP3.6.....	90
Tabela 9: Sinais de HSQC de fenilpropanoide com MM 624 u (Warashina et al., 2006) e amostra E.....	99

Lista de Figuras

Figura 1: Ipês brasileiros.....	26
Figura 2: Representantes naturais das quinonas (Silva et al., 2003).....	29
Figura 3: Estruturas de algumas naftoquinonas de Bignoniaceae (Silva, 2012).....	30
Figura 4: Derivados do lapachol (Silva et al., 2003).....	35
Figura 5: Compostos precursores do aminoácido L-fenilalanina (Dewick, 2009).....	35
Figura 6: Fenilpropanoides isolados do extrato etanólico de <i>Tecoma mollis</i> (Abdel-Mageed et al., 2012).....	36
Figura 7: Lignanais isoladas do extrato etanólico do tronco de <i>Tabebuia incana e Tabebuia serratifolia</i> (Oliveira et al., 1993; Oliveira et al., 2000).....	38
Figura 8: Estruturas básicas de cumarinas e isocumarina (Dewick, 2009; Pal et al, 2011).....	39
Figura 9: Base estrutural de iridoides (R= H ou R= glicose) (Sampaio-Santos e Kaplan, 2001; Dinda et al., 2007).....	40
Figura 10: Iridoides com atividade neuroprotetora comprovada (Tundis et al., 2008).....	40
Figura 11: Iridoides isolados de extratos polares de <i>Adenocalymna marginatum, Catalpa bignonioides e Pithecoctenium crucigerum</i> (Iwigawa et al., 1991; Poser et al., 2000; Martin et al., 2007).....	41
Figura 12: Iridoides glicosilados isolados de extratos polares de plantas dos gêneros <i>Tecoma e Tabebuia</i> (Abdel-Mageed et al., 2012; Guiso et al., 1996; Nakano et al., 1993; Poser et al., 2000; Warashina et al., 2004 e 2005).....	42
Figura 13: Esquema de um Espectrômetro de Massas adaptado de Iglesias, 2016.....	43

Figura 14: Espectro de Massas obtido em análise por CLAE-DAD-EM (fonte: análise em CLAE-DAD-EM do extrato etanólico de <i>T. incana</i> realizado para este trabalho).....	44
Figura 15: Espectro de UV-Vis obtido em análise por CLAE-DAD (fonte: análise em CLAE-DAD do extrato etanólico de <i>T. incana</i> realizado para este trabalho).....	45
Figura 16: Cromatógrafo em Contracorrente de Alta Performance usado nas análises do presente trabalho – Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química – UFAM.....	46
Figura 17: Cascas de <i>T. incana</i> coletadas na Reserva Florestal Ducke.....	48
Figura 18: Teste de separação de fases em CCD utilizando sistemas EBWats 1 e 2 reveladas em vanilina sulfúrica.....	51
Figura 19: Teste de separação de fases em CCD utilizando sistemas modificados e reveladas em vanilina sulfúrica.....	54
Figura 20: Cromatoplas das frações obtidas na primeira corrida em CCCAP e reveladas em vanilina sulfúrica: (a) frações; (b) expurgo da fase estacionária.....	55
Figura 21: Cromatoplas das frações SP obtidas na segunda corrida em CCCAP revelada em vanilina sulfúrica.....	56
Figura 22: Esquema das análises cromatográficas e espectrométricas realizadas nos extratos e frações polares de <i>T. incana</i> , <i>T. serratifolia</i> e amostra comercial.....	60
Figura 23: Cromatogramas obtidos em CLAE-DAD.....	61
Figura 24: Espectros de CLAE-DAD dos extratos etanólicos de <i>T. incana</i> e <i>T. serratifolia</i>	63
Figura 25: Espectro de CLAE-DAD do extrato etanólico de <i>T. incana</i> – pico 6 com TR 4,89 min.....	64

Figura 26: Espectro de CLAE-EM do extrato etanólico de <i>T. incana</i>	64
Figura 27: Éster de bisdeoxicinanchosídeo descrito em Warashina et al., 2005.....	65
Figura 28: Macfadienosídeo descrito em Bonini et al., 1981.....	65
Figura 29: Espectro da amostra comercial obtido em CLAE-EM com TR 4,86 min.....	65
Figura 30: Espectro do extrato etanólico de <i>T. serratifolia</i> obtido em CLAE-DAD com TR 6,44 min – pico 9.....	66
Figura 31: Espectro do extrato etanólico de <i>T. serratifolia</i> obtido em CLAE-EM com TR 6,36 min.....	66
Figura 32: Éster de bisdeoxicinanchosídeo <i>p</i> -hidroxilado descrito em Iwagawa et al., 1991.....	67
Figura 33: Éster de ajugol trimetoxilado.....	67
Figura 34: Espectro do extrato etanólico da amostra comercial obtido em CLAE-EM.....	68
Figura 35: Espectro do extrato etanólico de <i>T. incana</i> obtido em CLAE-EM.....	68
Figura 36: Espectro do extrato etanólico de <i>T. serratifolia</i> obtido em CLAE-EM.....	69
Figura 37: Estruturas moleculares de fenilpropanoides glicosilados descrito em Warashina et al., 2006.....	70
Figura 38: Espectro do extrato etanólico de <i>T. serratifolia</i> obtido em CLAE-EM.....	70
Figura 39: Espectro do extrato etanólico de <i>T. incana</i> obtido em CLAE-EM.....	71

Figura 40: Espectro da fração acetato de etila de <i>T. incana</i> obtido em CLAE-EM.....	71
Figura 41: Espectro da fração MeOH/H ₂ O de <i>T. incana</i> obtido em CLAE-EM.....	71
Figura 42: Fenilpropanoide com MM 624 u e formação de sinal em <i>m/z</i> 431 [M-H] ⁻	72
Figura 43: Espectro da fração acetato de etila de <i>T. serratifolia</i> obtido em CLAE-EM.....	72
Figura 44: Espectro da fração MeOH/H ₂ O de <i>T. serratifolia</i> obtido em CLAE-EM.....	73
Figura 45: Espectro da fração acetato de etila de <i>T. incana</i> obtido em CLAE-EM com Peak List.....	73
Figura 46: Espectro da fração MeOH/H ₂ O de <i>T. incana</i> obtido em CLAE-EM com Peak List.....	74
Figura 47: Espectro do extrato etanólico de <i>T. incana</i> obtido em CLAE-EM com Peak List.....	74
Figura 48: Espectro do extrato etanólico de <i>T. serratifolia</i> obtido em CLAE-EM com Peak List.....	75
Figura 49: Espectro do extrato etanólico da amostra comercial obtido em CLAE-EM com Peak List.....	75
Figura 50: Estruturas moleculares de fenólicos glicosilados descrito em Warashina et al., 2004 e 2006.....	76
Figura 51: Cromatoplacas das frações obtidas em CCCAP reveladas em vanilina sulfúrica.....	77

Figura 52: Cromatoplaça das frações de CCDP revelada em vanilina sulfúrica.....	78
Figura 53: Espectro de massas da amostra MP3.6.....	79
Figura 54: Espectro de massas expandido da amostra MP3.6 com sinal em m/z 687 [M-H] ⁻	79
Figura 55: Estruturas moleculares de lignanas descritas em Warashina et al., 2004.....	80
Figura 56: Estruturas moleculares de fenólicos glicosilados descritos em Warashina et al., 2005 e 2006.....	81
Figura 57: Espectro de massas expandido da amostra MP3.6 com sinal em m/z 567 [M-H] ⁻	82
Figura 58: Estrutura moleculares de feniletanoide e α -lapachona.....	82
Figura 59: Iridoídes descritos em Warashina et al., 2005.....	83
Figura 60: Espectro de massas expandido da amostra MP3.6 com sinal em m/z 485 [M-H] ⁻ e m/z 515 [M-H] ⁻	83
Figura 61: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) da amostra MP3.6.....	85
Figura 62: Mapa de correlação HSBC da amostra MP3.6.....	86
Figura 63: Mapa de correlação HMQC da amostra MP3.6.....	87
Figura 64: Estrutura de iridoíde.....	88
Figura 65: Expansão do RMN de ¹ H indicativo de H-5.....	88
Figura 66: Expansão do RMN de ¹ H indicativo de H-9.....	88
Figura 67: Expansão do RMN de ¹ H indicativo de H-1.....	89
Figura 68: Expansão do RMN de ¹ H indicativo de H-10.....	89
Figura 69: Mapa de correlação HSQC sinal para H-4.....	90
Figura 70: Mapa de correlação HMBC sinal para H-5 e 9 / H-4 e 8.....	90
Figura 71: Espectro de RMN de ¹ H com singletos indicativos de metoxilas.....	92
Figura 72: Espectro de RMN de ¹ H com sinais na região de aromáticos.....	92

Figura 73: Espectros de massas da amostra E.....	93
Figura 74: Estrutura molecular para ligação entre β - <i>D</i> -glicose e apiofuranose.....	94
Figura 75: Expansão do Mapa de correlação HSQC da amostra E com sinais na região de metoxilas.....	95
Figura 76: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da amostra E.....	96
Figura 77: Mapa de correlação HSQC da amostra E.....	97
Figura 78: Mapa de correlação HMBC da amostra E.....	98
Figura 79: Espectro de RMN de ^1H da amostra E com sinais indicativos de iridoides	99
Figura 80: Estrutura do éster de bisdeoxicinanchosídeo com identificação numérica.....	99

Lista de Unidades, Símbolos e Abreviaturas

Api	Apiose
CCCAP	Cromatografia em Contracorrente de Alta Performance
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG	Cromatografia Gasosa
IC	Ionização Química
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector Arranjo de Diodos
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
cm	Centímetro
COSY	Correlation Spectroscopy
C-18	Carbono octadecil
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
EBWats	Sistema de eluição acetato de etila: butanol: água
EI	Electron Ionization
EM	Espectrometria de Massas
ESI	Electrospray Ionization
eV	Eletrovolts
FAB	Fast Atom Bombardment
FI	Fase inferior
FR	Fase reversa
FS	Fase superior

Glc	Glicose
HEMWats	Sistema de eluição hexano: acetato de etila: metanol: água
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MALDI	Matrix- assisted laser desorption
MHz	Megahertz
MeOH-d4	Metanol deuterado
MM	Massa molecular
mm	Milímetros
FM	Fase móvel
<i>m/z</i>	Relação massa-carga
nm	Nanômetro
ppm	Parte por milhão
Ram	Ramnose
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
Rpm	Rotação por minuto
SIMS	Secondary-ion Mass Espectrometry
sin	Sinonímia
FE	Fase estacionária
SPAC2	Agrupamento das frações FE3 a FE6F obtidas em CCCAE
TMS	Tetrametilsilano

TR	Tempo de retenção
UCLAE	Ultra Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
UV-Vis	Ultravioleta- Visível
Å	Angstrom
α	Alfa
μL	Microlitro
λ_{max}	Máximo de absorção
δ	Deslocamento químico

1. INTRODUÇÃO

Produtos naturais são substâncias produzidas por plantas e animais usadas principalmente na produção de fármacos e na medicina popular. Dentre as inúmeras aplicações, destacam-se a proteção contra infecções e a ação contra agentes causadores de outras enfermidades (Oliveira et al., 1990). Muitas são as razões para a pesquisa de produtos naturais, dentre elas destacam-se a imensa diversidade biológica e o pouco conhecimento biotecnológico (Souza-Fagundes et al, 2002).

A família Bignoniaceae (pertencente à ordem Lamiales) apresenta cerca de 860 espécies distribuídas em 104 gêneros (Fisher et al., 2004). Destacando-se pela grande diversidade de classes de constituintes químicos e a presença comprovada de componentes atuantes na atividade anti-inflamatória e antitumoral (Jiménez-González et al., 2013). Fonseca et al. (2003) e Hirschmann e Papastergiou (2003) afirmam que a atividade antitumoral apresentada por diversas espécies da família Bignoniaceae está associada à presença das naftoquinonas lapachol, β -lapachona e cicoolivil. O gênero *Tabebuia* apresenta aproximadamente 100 espécies e é apontado como o mais populoso da família Bignoniaceae com espécies de grande potencial econômico no uso de sua madeira e na arborização de cidades com finalidade paisagística (Lorenzi e Matos, 2002). Seu uso na medicina tradicional é comum e reconhecido no combate à doença's infecciosas, principalmente em países da América Latina. Resultados de análises etnobotânicas e etnofarmacológicas mostram o grande potencial no tratamento de infecções e encorajam pesquisas acerca da biodiversidade do gênero (Jiménez-González et al., 2013). Seu potencial fitoquímico é intensamente estudado por meio de amostras coletadas em diversas partes da América Latina sendo no Brasil concentradas principalmente nas regiões nordeste e sudeste. Grande parte dos resultados obtidos a partir de amostras coletadas na América Latina comprovam a presença de naftoquinonas e atividade biológica em torno de tratamento antineoplásico.

As naftoquinonas naturais isoladas de espécies de Bignoniaceae, em especial a *Tabebuia*, expressam atividades biológicas e por isso vem sendo objeto de investigação para obtenção de novos fármacos mais ativos e seletivos (Silva et al., 2012), como a naftoquinona Lapachol (isolado primeiramente na *Tabebuia avellanedae*), que apresenta atividade antiparasitária, antibacteriana e antifúngica (Jiménez-González, 2013).

Quanto às espécies existentes na região Amazônica, poucos registros podem ser citados. Em Oliveira et al. (1993) são enumeradas algumas naftoquinonas isoladas (lapachol, lapachonas, furanoaftoquinonas e tecnomaquinona) e lignanas de *T. incana* A.H. Gentry coletada em Manaus. Morais et al. (2007) isolou duas furanoquinonas e cita a possível atividade biológica de amostras também coletadas em Manaus. Em Quignard et al. (2003) extratos de *T. incana* A.H. Gentry e *T. serratifolia* (Vahl) G. Nicholson coletadas em Manaus confirmaram letalidade ao microcrustáceo *Artemia franciscana*.

O potencial fitoterápico das espécies do gênero *Tabebuia* é associado principalmente aos testes realizados nas naftoquinonas isoladas por meio de extrato de baixa e média polaridade de partes distintas das árvores. Destaca-se principalmente o aplicabilidade em fármacos para tratamentos antitumorais e anti-inflamatórios de diversas espécies da família Bignoniaceae coletadas em diferentes partes do mundo. Quanto às espécies de *Tabebuia* coletadas na Amazônia, é pouco expressivo o número de trabalhos que descrevem a composição e suas atividades biológicas. Devido à diversidade de compostos isolados e analisados em espécies de *Tabebuia* coletadas em outras localidades, espera-se também grande potencial das espécies nativas. As espécies *T. incana*, *T. serratifolia* e amostra comercial, que são encontradas no entorno de Manaus, foram escolhidas para esse estudo visando identificar características estruturais nessas espécies a fim de contribuir com o conhecimento acerca desse gênero tão explorado em outras partes do mundo.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Descrever o perfil químico de ipê amazônico (*Tabebuia incana* A. H. Gentry e *T. serratifolia* (Vahl G. Nicholson), comparando com amostra comercial

2.2. Específicos

- Analisar extratos etanólicos das cascas por CLAE-DAD e CLAE-EM, comparando os perfis cromatográficos.
- Analisar os padrões de fragmentação por Espectrometria de Massas.
- Realizar o fracionamento de extrato por Cromatografia em Contracorrente de Alta Performance direcionado para iridoides e fenilpropanoides.
- Identificar as substâncias por técnicas de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Família Bignoniaceae

A família Bignoniaceae (pertencente à ordem Lamiales) apresenta cerca de 860 espécies distribuídas em 104 gêneros (Fischer et al., 2004). Grande parte das espécies é encontrada em regiões tropicais da África (paleotropicalis) e América Latina (neotropicais) e algumas poucas espécies em regiões temperadas (Gentry e Cook, 1984; Gentry, 1992).

Segundo Fischer et al. (2004), baseado nas informações descritas por Gentry (1980), os gêneros da família Bignoniaceae estão distribuídos em sete tribos. Essas tribos apresentam espécies na forma de árvores, arbustos e lianas, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Tribos da família Bignoniaceae segundo a classificação de Fischer et al (2004).

Tribos	Características
Bignonieae	Predominantemente lianas e arbustos
Coleeae	Árvores e arbustos
Crescentieae	Árvores e arbustos
Eccremocarpeae	Forma de trepadeiras
Oroxyleae	Arbustos ou árvores
Tecomeae	Arbustos ou árvores (que podem atingir até 30 metros de altura) e raramente lianas.
Tourrettieae	Forma de trepadeiras

Fonte: Adaptada de Fisher et al., (2004); Gentry e Cook (1984)

No Brasil são encontradas aproximadamente 33 gêneros e 406 espécies, distribuídas nas tribos Bignonieae, Crescentieae e Tecomeae com (Lohmann, 2015; Von Poser et al., 2000). As espécies brasileiras são comumente encontradas na região Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Lohmann, 2015; Lohmann).

Dentre os compostos presentes nas espécies da família Bignoniaceae, é muito comum a identificação de naftoquinonas e estruturas derivadas do Lapachol (prenilnaftoquinona). Os compostos naftoquinônicos apresentam atividade anti-inflamatória, antimalárica e antitumoral, que reforça o uso popular das cascas de espécies dessa família por comunidades latino-americanas no tratamento de tumores e malária. Também é comum a presença de quinonas, lignanas, flavonoides, fenilpropanoides e iridoides em espécies dessa família (Maorong et al., 2013; Morais et al., 2007; Nakano et al., 1993; Oliveira et al., 1990; Von Poser et al., 2000; Warashina et al., 2004).

Economicamente, as Bignoniaceae são utilizadas em atividades paisagísticas, devido ao belo efeito visual (figura 1), e na extração de madeira, devido à alta resistência e à durabilidade. A utilização das espécies arbóreas em áreas subtropicais concentra-se na ornamentação de cidades e na utilização da madeira na confecção de embarcações e móveis e na construção civil (Fisher et al., 2004).



Tabebuia avellanedae

Tabebuia chrysotricha

Tabebuia roseoalba

Figura 1: Ipês brasileiros (*Tabebuia avellanedae* - Ferreira (2010); *Tabebuia chrysotricha* - Prochnow (2010); *Tabebuia roseoalba* – Camillo (2015))

3.2 Tribo Tecomeae e Gênero *Tabebuia*

A tribo Tecomeae está dividida em 44 gêneros (Quadro 1) e apresenta o maior número de espécies arbóreas da família Bignoniaceae (Fisher et al., 2004).

Quadro 1: Gêneros da tribo Tecomeae

<i>Argylia</i>	<i>Dinklagedoxa</i>	<i>Neosepicaea</i>	<i>Romeroa</i>
<i>Astianthus</i>	<i>Dolichandrone</i>	<i>Newbouldia</i>	<i>Santisukia</i>
<i>Campsidium</i>	<i>Ekmanianthe</i>	<i>Pajanelia</i>	<i>Sparattosperma</i>
<i>Camphis</i>	<i>Fernandoa</i>	<i>Pandorea</i>	<i>Spathodea</i>
<i>Catalpa</i>	<i>Godmania</i>	<i>Paratecoma</i>	<i>Spirotecoma</i>
<i>Catophractes</i>	<i>Haplophragma</i>	<i>Pauldopia</i>	<i>Stereospermum</i>
<i>Chilopsis</i>	<i>Heterophragma</i>	<i>Perianthomega</i>	<i>Tabebuia</i>
<i>Cybistax</i>	<i>Incarvillea</i>	<i>Perichlaena</i>	<i>Tecoma</i>
<i>Delostoma</i>	<i>Jacaranda</i>	<i>Podranea</i>	<i>Tecomanthe</i>
<i>Deplanchea</i>	<i>Lamiodendron</i>	<i>Radermachera</i>	<i>Tecomella</i>
<i>Digomphia</i>	<i>Markhamia</i>	<i>Rhigozum</i>	<i>Zeyheria</i>

Fonte: Adaptada de Fisher et al (2004); Gentry e Cook (1984)

Alguns gêneros arbóreos são exclusivamente nativos de regiões neotropicais: *Cybistax*, *Delostoma*, *Digomphia*, *Ekmanianthe*, *Godmania*, *Jacaranda*, *Paratecoma*, *Romeroa*, *Tabebuia*, *Tecoma* (sensu stricto) e *Zeyheria* (Dos Santos e Miller, 1992).

A tribo Tecomeae é a segunda mais populosa da família Bignoniaceae. Suas espécies compõem cerca de 34% de Bignoniaceae presentes na América, sendo estas distribuídas em aproximadamente 20 gêneros. No Brasil, há ocorrência de apenas 9 desses 20 gêneros, sendo *Jacaranda* e *Tabebuia* os que apresentam maior número de espécies (Lohmann e Pirani, 1996).

O gênero *Tabebuia* compreende um grupo de plantas neotropicais com cerca de 100 espécies. Essas espécies podem ser encontradas desde o sudoeste dos Estados Unidos até o norte da Argentina e Chile (Dos Santos, 2017). No Brasil, são encontrados exemplares na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal que estão distribuídas em

aproximadamente 40 espécies de plantas arbóreas conhecidas como ipês (Dos Santos, 2017; Lohmann, 2015).

Segundo Grose e Olmstead (2007b), desde a criação do gênero *Tabebuia* por De Candolle em 1838 (para abrigar plantas conhecidas como ipês), ocorreram várias modificações na distribuição das espécies desse gênero. Essas modificações aconteceram após novas informações sobre a variabilidade morfológica na tribo Tecomeae, seguidas de novas subdivisões na tribo e redistribuição de espécies entre os gêneros.

Segundo Dos Santos (2017), em Matos (1970) foi proposta a distribuição de algumas espécies do gênero *Tabebuia* para os gêneros *Handroanthus* e *Roseodendron*. No entanto, para a comunidade científica, a classificação mais aceita é a permanência das espécies de ipês no gênero *Tabebuia*. Dos Santos (2017) cita também que, o gênero *Handroanthus* foi especialmente criado para alocar espécies de ipês brasileiros.

As espécies *Tabebuia incana* (sin *Handroanthus incanus* (A.H. Gentry) S.O. Grose) e *Tabebuia serratifolia* (sin *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O. Grose) (Tropicos, 2018) são facilmente encontradas no Brasil e conhecidas como ipês amarelos (Oliveira e Lemos, 2000; Oliveira et al., 1993). Na Amazônia brasileira, as espécies são conhecidas como pau d'arco e o chá das cascas é usado no tratamento de inflamações, malária, doenças de pele e renais por comunidades ribeirinhas (Silva et al., 1977; Silva et al., 2012).

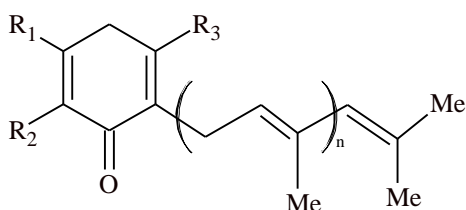
A popularidade dos ipês e a larga aplicação na medicina popular, faz com que espécies de *Tabebuia* sejam comumente citadas em publicações que descrevem sua composição, potencial terapêutico, econômico entre outros.

3.3 Compostos orgânicos presentes no gênero *Tabebuia*

3.3.1 Quinonas

As quinonas são metabólitos secundários que apresentam ampla variedade de representantes naturais. Algumas quinonas, como as ubiquinonas e as plastoquinonas (figura 2)

participam de importantes etapas da cadeia respiratória e na fotossíntese de alguns seres vivos. As quinonas atuam no processo de produção de energia como agentes transportadores de elétrons, e por isso têm chamado a atenção de pesquisadores para o seu potencial quimioterápico (Gautam et al, 2015).



$R_1 = R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{Me}$, $n = 9$ (ubiquinona)
 $R_1 = R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{H}$, $n = 9$ (plastoquinona)

Figura 2: Representantes naturais das quinonas (Silva et al., 2003)

Algumas pesquisas têm mostrado a participação de quinonas em um processo chamado apoptose (suicídio celular). Essa participação estimula estudos na química medicinal para definição de estratégias no combate às neoplasias, principalmente àquelas relacionadas ao câncer de próstata (Silva et al., 2003).

Estudos envolvendo espécies da família Bignoniaceae e do gênero *Tabebuia* mostram a existência de várias quinonas na composição dessas espécies. As naftoquinonas são as quinonas encontradas em maior quantidade nas espécies de *Tabebuia*, incluindo *T. incana* e *T. serratifolia* (Oliveira et al., 1990). As naftoquinonas são derivadas do naftaleno (Lucas et al., 2014), classificadas como metabólitos secundários e produzidas por algas, fungos, plantas e animais (Thomson, 1991). Esses compostos estão presentes na vitamina K e fazem parte do processo de coagulação sanguínea (Silva et al., 2003).

Segundo Silva et al (2012), as naftoquinonas da família Bignoniaceae apresentam atividades biológicas comprovadas e algumas espécies brasileiras de *Tabebuia*, possuem naftoquinonas em sua composição. A partir do seu uso popular das espécies brasileiras de

Tabebuia, as naftoquinonas foram analisadas e suas atividades biológicas são mostradas no quadro 2 (Oliveira et al., 1990).

Dentre as naftoquinonas naturais, destaca-se o lapachol, uma naftoquinona prenilada que pode ser considerada um dos principais representantes do grupo de quinonas em *Tabebuia*. O lapachol é o ponto de partida para compostos piranonaftoquinoidal do tipo α -lapachona e β -lapachona (figura 3) que apresentam várias atividades biológicas (Silva et al., 2003). A β -lapachona apresenta, in vitro, atividade contra células dos cânceres de pulmão, mama, colorretal, próstata, do melanoma e da leucemia e é uma das poucas orto-quinonas naturais e dotada de ação anticancerígena. (Neves et al., 2007).

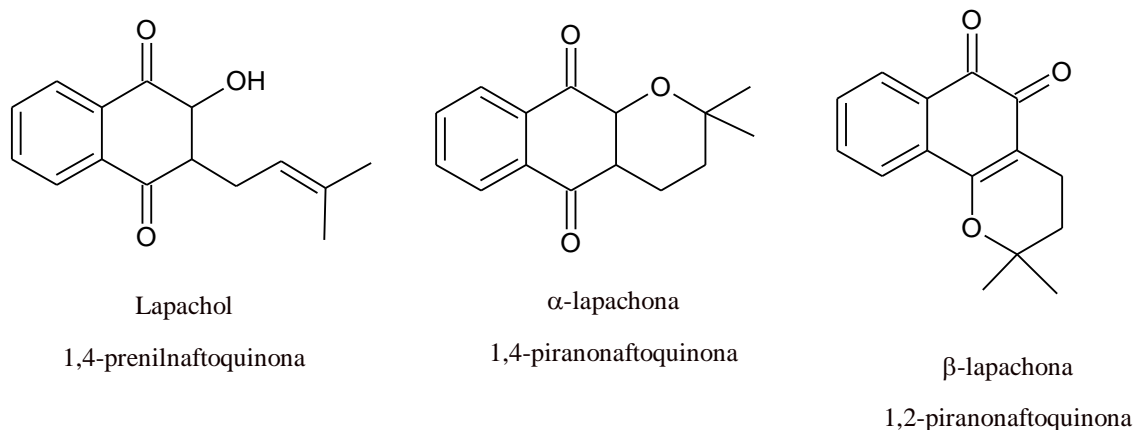


Figura 3: Estruturas de algumas naftoquinonas de Bignoniaceae (Silva, 2012)

Quadro 2: Naftoquinonas de Bignoniaceae

Espécie	Substância isolada	Atividade biológica
<p><i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlmann. (sin. <i>Tecoma peroba</i> Record e <i>Paratecoma iandra</i> Kuhlmann.)</p>	<p>Cerne: Lapachol; Lomatiol; diidro-iso-α-lapachona; α-etilfurano-1,4-naftoquinona; β-metilpirano-1,4-naftoquinona (Thomson, 1971)</p>	<p>Lapachol: antitumoral (Oliveira, 1990)</p>
<p><i>Handroanthus impetiginosus</i> Mart. ex DC.) Mattos (sin. <i>Tabebuia avellaneda</i> Lorentz ex Griseb.)</p>	<p>Cerne: 2-metil-3-(γ, γ-dimetilal)-1,4-naftoquinona; lapachol; desoxilapachol; α- e β-lapachonas; diidro-α-lapachona; cloroidrolapachol; β-xiloidona (Lima, 1962; Thomson, 1971) lapachenol; 2-acetil-furanonaftoquinona; 2-hidróxi-etil-furanonaftoquinona; 8-hidróxi-2-acetil-furanonaftoquinona; 8-hidróxi-2-hidróxi-etil-furanonaftoquinona; 2-etil-furanonaftoquinona; 2-isopropil-furanonaftoquinona; 2,3-diidro-2-(2-</p>	<p>β-lapachonas: antibacteriana contra bactérias Gram-positivas <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> e Gram-negativa <i>Brucella</i> sp (Lima, 1962)</p> <p>Cloroidrolapachol: antibacteriana contra a bactéria Gram-negativa <i>Brucella</i> (Lima, 1962)</p>

Quadro 2: continuação

	<p>metiletenil) furanonaftoquinonas (Burnet, 1967; Steinert, 1996)</p> <p>Casca interna do Tronco: diidro-α-lapachona; lapachol; 8-hidróxi-2-acetil-furanonaftoquinona; 2-acetil-5-hidróxi-furanonaftoquinona; (-)-5-hidróxi e (+)-8-hidróxi-2-(hidroxietil) furanonaftoquinonas (Wagner, 1989)</p> <p>Madeira: 5-hidróxi e 8-hidróxi-2-2'hidróxiisopropil)-furanonaftoquinona; 2,3-diidro-5-hidróxi-2-(1'-metiletenil)-furanonaftoquinona e derivados diidrofuranos correspondentes (Oliveira, 1990)</p>	<p>α-lapachonas e diidro-α-lapachona: antibacteriana contra <i>S. aureus</i> (Machado, 2003)</p> <p>Lapachol e α- e β-lapachonas: tripanocida (Pinto, 2009)</p>
--	---	--

Quadro 2: continuação

<p><i>Handroanthus barbatus</i> (E. Mey.) Mattos [sin. <i>Tabebuia barbata</i> (E.Mey) Sandwith.]</p>	<p>Lapachol; 2-acetil furanonaftoquinonas; 2-acetyl-5-hidroxi e 2-acetil-8-hidroxi-furanonaftoquinona; (+)-8-hidroxi-2-(1--hidroxietil) furanonaftoquinonas (Saizarbitoria, 1997)</p>	<p>Atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais A-549 (adenocarcinoma de pulmão humano) e HT-29 (carcinoma de colón humano) com exceção lapachol (Saizarbitoria, 1997)</p>
<p><i>Handroanthus lapacho</i> (K. Sehum.) S.O. Grose [sin. <i>Tabebuia flavescens</i> (Velloso) Griseb.]</p>	<p>Lapachol</p>	<p>Lapachol: antimalárico, esquistossomicida, antiviral, anti-inflamatório e antitumoral (Fonseca, 2003; Hussain, 2007)</p>
<p><i>Handroanthus heptaphylla</i> (Vell.) Mattos [sin. <i>Tabebuia heptaphylla</i> (Vell.) Toledo e <i>Tecoma ipe</i> Mart.] <i>Handroanthus impetiginosa</i> (Mart. ex DC.) Mattos [sin. <i>Tabebuia</i> <i>impetiginosa</i> (Mart. ex DC.) Standl.]</p>	<p>Lapachol; lapachenol e derivados α-lapachona; desidro- α-lapachona; desidroiso- α-lapachona; stenocarpoquinona A e B; rinacantina A; avicequinona A (Hirschmann, 2003) Casca: 2-acetil furanonaftoquinonas; desidro-α-lapachona; lapachol; 2-(1-hidroxietil)-furanonaftoquinonas; 5 (ou 8)-hidroxi-2-(1-</p>	<p>Lapachol e derivados: moluscicida, tripanocida, antifúngica e antibacteriana, neoplásica; antibacteriana (gênero <i>Brucella</i>); ativa contra <i>Plasmodium</i> (Hirschmann, 2003; Ferreira, 1996) Lapachol: Anticâncer (Thomson, 1971); β-lapachona; 2-acetil-furanonaftoquinona; 8-hidroxi-2-acetil</p>

Quadro 2: continuação

	hidroxietil)-furanonaftoquinona (Girard,1988); β -lapachona (Muller, 1999); 5-hidroxi- e 8-hidroxi-2-(1-hidroxietil) furanonaftoquinonas; 2-(1-hidroxietil)- furanonaftoquinonas (Koyama, 2000)	furanonaftoquinona: atividade antipsoríase (Muller, 1999)
<i>Handroanthus serratifolius</i> (Vahl) S.O. Grose [sin. <i>Tabebuia serratifolia</i> (Vahl) G. Nicholson e <i>Tecoma araliácea</i> (Cham.) DC.]	Tronco: Lapachol; α -etilfurano-1,4-naftoquinona; desidro- α -lapachona; α -lapachona; tecomaquinona I; desidroiso- α -lapachona (Tessier, 1988; Oliveira, 1990)	Lapachol: antifúngica, antitumoral (Hussian, 2007, Thomson, 1971)
<i>Handroanthus heptaphylla</i> (Vell.) Mattos (sin. <i>Tecoma ipe</i> Mart.)	5--hidróxi-2-(1-hidroxietil)-furanonaftoquinona; 8--hidróxi-2-(1-hidroxietil)-furanonaftoquinona	Furanonaftoquinonas: antimicrobiana em bactérias Gram positivas, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Helicobacter pylori</i> antifúngica, incluindo espécies patogênicas (Nagata, 1998)

Fonte: Silva et al., 2012

A síntese de outros derivados do lapachol como a xiloidona e l-aza-antraquinona (figura 4), mostra o dinamismo dessa molécula quanto às atividades biológicas. A xiloidona pode ocorrer como artefato de origem fotoquímica, durante o isolamento do lapachol, apresenta atividade antimicrobiana (Lucas et al., 2014; Oliveira et al., 1990; Silva et al., 2003).

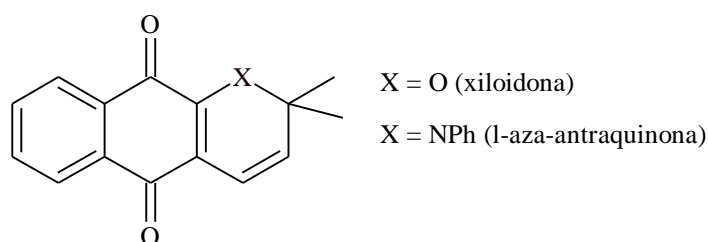


Figura 4: Derivados do lapachol (Silva et al., 2003)

3.3.2 Fenilpropanoides

São compostos aromáticos oriundos de desaminação da cadeia lateral da L-fenilalanina, com produção de ácido cinâmico (Figura 5), em microrganismos e plantas por meio de reações enzimáticas (Dewick, 2009).

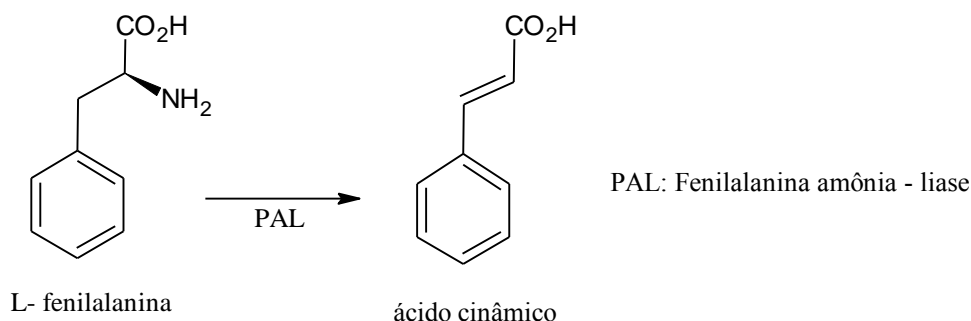
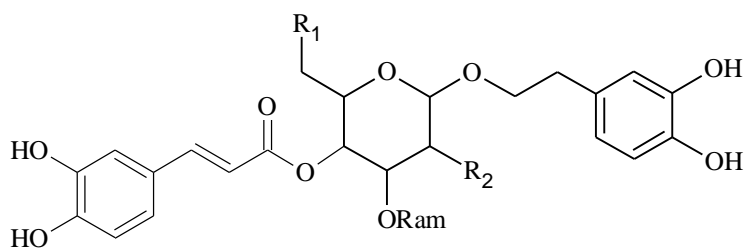


Figura 5: Compostos precursores do aminoácido L-fenilalanina (Dewick, 2009)

Os fenilpropanoides (e seus derivados) podem ser usados nas plantas como pigmentos de flores, antibióticos (presentes nas fitoalexinas), protetores contra radiação UV, repelentes, entre outras aplicações. Estão presentes na forma de dímeros, como as lignanas, e polímeros, como ligninas, usados na estrutura e suporte das plantas (componentes da parede celular) (Hahlbrock e Scheel, 1989). Também participam na resposta das plantas quanto à variação de luz, fornecimento de minerais e combate às pragas e ferimentos (Vogt, 2010; Dewick, 2009).

Na família Bignoniaceae, os fenilpropanoides foram identificados e descritos em extratos polares. Em Abdel-Mageed et al. (2012) são descritos sete fenilpropanoides no extrato etanólico das cascas do caule de *Tecoma mollis*: acteosídeo (verbascosídeo); 6'-O-acetil-verbascosídeo, isoacteosídeo (isoverbascosídeo), verperctosídeo B (crassosídeo); luteosídeo A, luteosídeo B e tocomosídeo (figura 6). Esses compostos foram testados e apresentaram atividade antileishmania, antibacteriana e antioxidante. Em Maorong et al. (2013), foram isolados seis isômeros do extrato aquoso das cascas de *Tabebuia avellanadae* com atividade antioxidante. Em Warashina et al. (2006), são descritos cinco fenilpropanoides glicosilados isolados do extrato metanólico das cascas de *T. impetiginosa*.



Acteosídeo (verbascosídeo): $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{OH}$

6'-O-acetil-verbascosídeo: $R_1 = \text{OCOMe}$; $R_2 = \text{OH}$

Vespectosídeo B: $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{OGlc}$

Tocomolosídeo: $R_1 = \text{OCOMe}$; $R_2 = \text{OGlc}$

Luteosídeo A: $R_1 = \text{OCOMe}$; $R_2 = \text{OApi}$

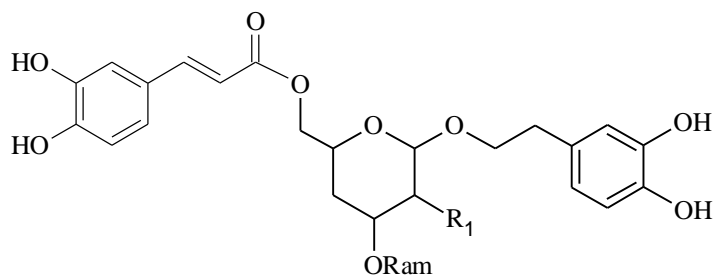


Figura 6: Fenilpropanoides isolados do extrato etanólico de *Tecoma mollis* (Abdel-Mageed et al., 2012)

Algumas lignanas foram descritas em Oliveira et al. (1993), como componentes do extrato etanólico do tronco de *Tabebuia incana*. Essas lignanas apresentaram as mesmas características espectroscópicas de cicloolivil e cicloolivil acetinado (figura 7). Já em Oliveira

et al. (2000), foram identificadas as lignanas olivil e epi-cicloolivil (figura 7) no extrato etanólico do tronco de *Tabebuia serratifolia*. Nas publicações de Warashina et al. (2005 e 2006), foram descritos dois grupos de lignanas glicosiladas, um dos grupos é composto por balanofonina e o outro composto por secoisolariciresinol (figura 7). Essas moléculas foram isoladas do extrato etanólico das cascas de *T. impetiginosa*.

3.3.3 Compostos Fenólicos

Podem ser classificados como compostos fenólicos os ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos, hidroxicinâmicos e seus derivados), flavonoides, lignanas, estilbenos e taninos condensados e hidrolisáveis. A origem desses compostos é basicamente vegetal e são encontrados em diferentes partes de plantas. Apresentam potencial antioxidante, que inibe ou retarda a oxidação nos alimentos e no corpo (Amarowicz e Shahidi, 2017).

A ocorrência de compostos fenólicos na família Bignoniaceae está muitas vezes associada à moléculas glicosiladas. Em Abreu et al. (2014) são descritos sete fenólicos glicosilados isolados de folhas de *T. argentea* e pecíolos de *Catalpa bignonioides*. Em Warashina et al. (2004 e 2006) são descritos alguns fenólicos glicosilados com estruturas metoxiladas e, principalmente, ésteres metoxilados. Dentre esses fenólicos está Osmanthusídeo (figura 7).

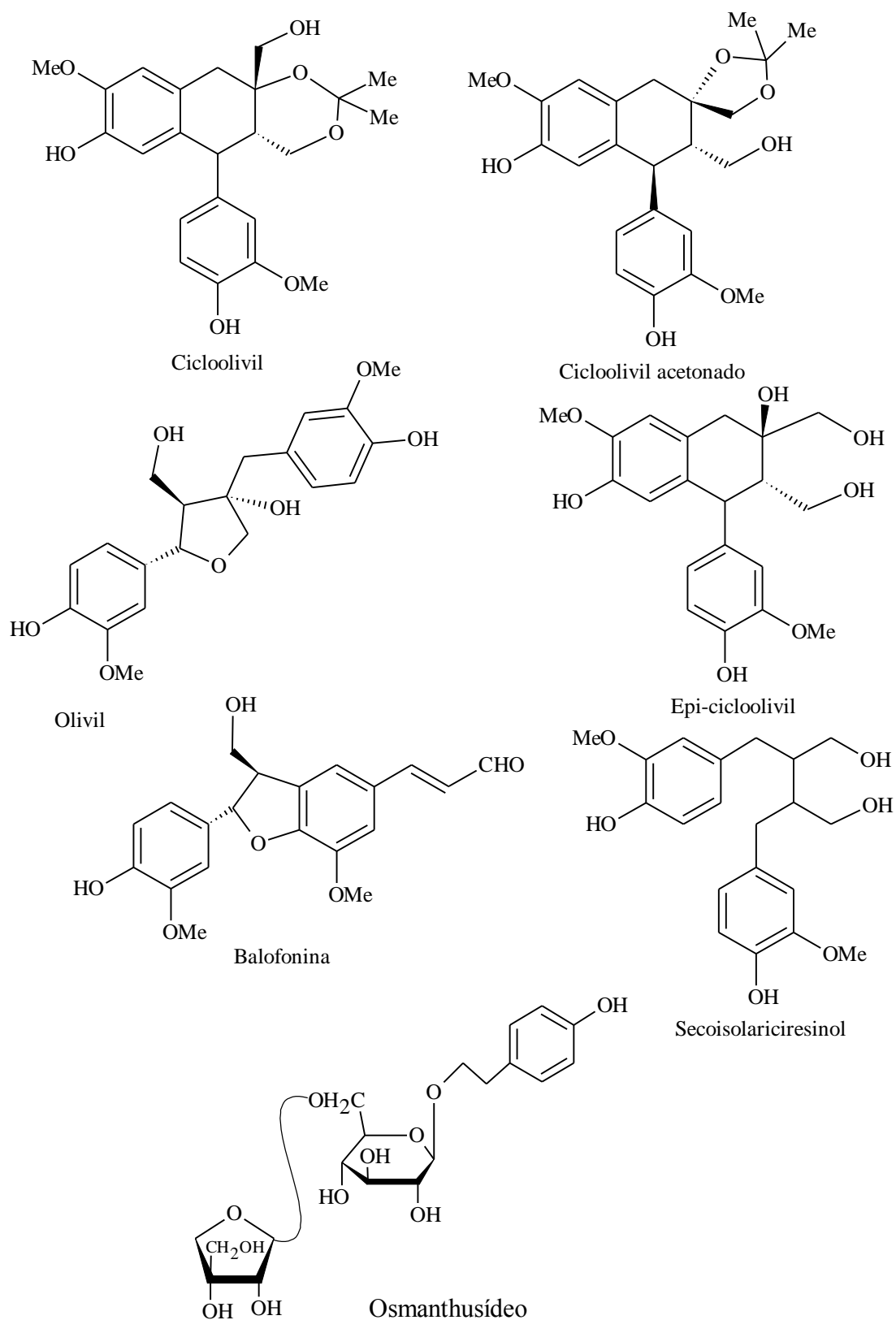


Figura 7: Lignanas isoladas do extrato etanólico do tronco de *Tabebuia incana* e *Tabebuia serratifolia* (Oliveira et al., 1993; Oliveira et al., 2000)

3.3.4 Isocumarinas

As isocumarinas apresentam cadeia de nove carbonos, com um anel lactônico invertido quando comparado à estrutura das cumarinas (figura 8) (Monfardini, 2016). As cumarinas são estruturas derivadas da hidroxilação do ácido cinâmico para produção do ácido o-cinâmico e posterior formação de anel lactônico (Dewick, 2009). As isocumarinas podem ser intermediários na síntese de compostos heterocíclicos e carbocíclicos como, isocarboestirilos e isoquinolinas, além apresentarem atividade antifúngica e antibacteriana (Pal et al., 2011).

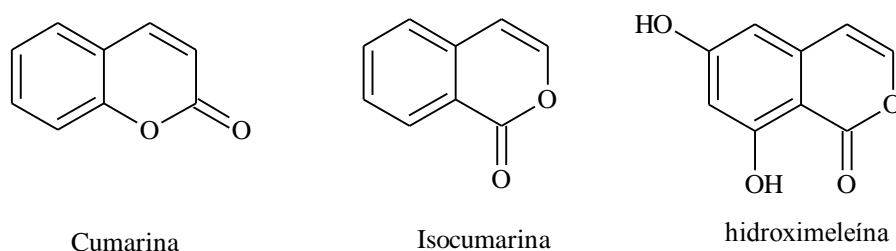


Figura 8: Estruturas básicas de cumarinas e isocumarina (Dewick, 2009; Pal et al, 2011)

Nas cascas de *Tabebuia impetiginosa* são citadas isocumarinas hidroxiladas e glicosiladas, com estrutura molecular básica identificada como hidroximeleína (Warashina et al., 2006).

3.3.5 Iridoides

Iridoides são compostos monoterpênicos formados a partir de reações de oxidação, redução e ciclização do geraniol. Esses compostos têm como estrutura básica o iridano (ou 1-isopropil-2,3-dimetilciclopentano) (figura 9), que fundido a um heterociclo oxigenado de seis membros (figura 9), dá origem à estrutura dos iridoides (Dewick, 2009; Sampaio-Santos e Kaplan, 2001).

A porção pentagonal do iridoide pode sofrer clivagem oxidativa e apresentar uma nova estrutura classificada como secoiridoide. Na porção hexagonal, a clivagem oxidativa pode produzir outros derivados (figura 9). No processo de biossíntese é comum a glicosilação por

meio de reações de O-glicosilação e produção de iridoides glicosilados (Dewick, 2009; Dinda et al., 2007; Sampaio-Santos e Kaplan, 2001).

Os iridoides são naturalmente encontrados em plantas medicinais usadas como agente antitérmico, hipotensivo, sedativo, antitussígeno e na forma de emplastos no tratamento de ferimentos e distúrbios da pele. Esses iridoides apresentam, comprovadamente, atividade neuroprotetora, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante e anti-hepatotóxica.

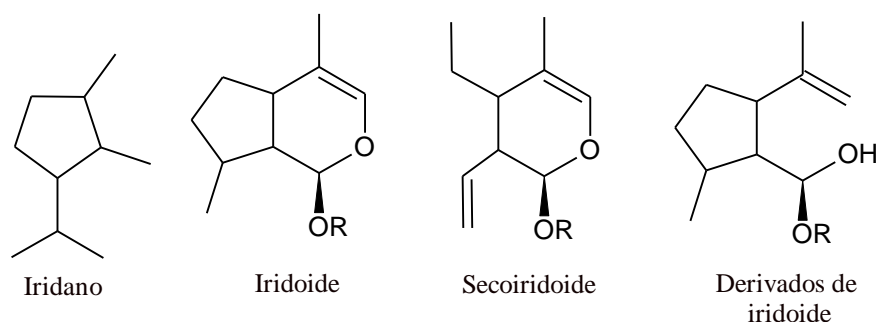


Figura 9: Base estrutural de iridoides (R= H ou R= glicose) (Sampaio-Santos e Kaplan, 2001; Dinda et al., 2007)

A atividade neuroprotetora foi identificada nos iridoides catalpol, geniposídeo e gardenosídeo (figura 10), isolados em plantas da família Scrophulariaceae e Rubiaceae. A atividade neuroprotetora acontece por meio da inibição e retardo da deterioração de tecido neurológico, causada por estresse oxidativo e fatores relacionados ao envelhecimento (Tundis et al., 2008).

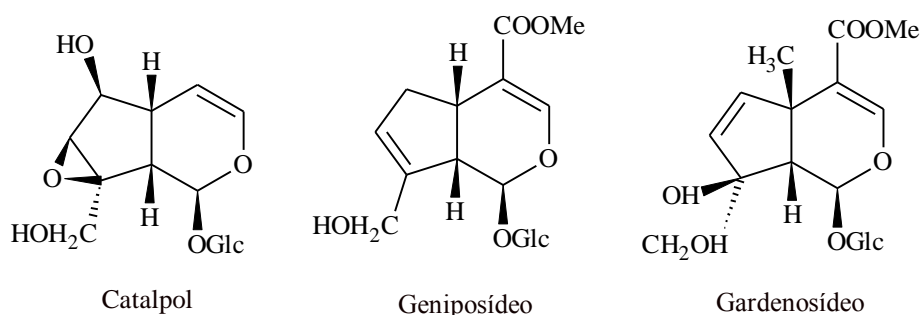


Figura 10: Iridoides com atividade neuroprotetora comprovada (Tundis et al., 2008)

Alguns estudos indicam a existência de iridoides em plantas da família Bignoniaceae. Em Martin et al. (2007), são descritos iridoides glicosilados isolados do extrato metanólico das

cascas do caule de *Pithecoctenium crucigerum*. Um desses iridoides é o theviridosídeo (figura 11), descrito como um iridoide glicosilado e carbonilado em C-4. Em Iwagawa et al. (1991), nove iridoides glicosilados foram isolados do extrato metanólico das raízes de *Catalpa bignonioides*: cinco iridoides inéditos, catalposídeo (figura 11), amphicosídeo, 6-O-veratril e minecosídeo. Em Poser et al. (2000) foram descritos os iridoides glicosilados theviridosídeo, ipolamiídeo e strictolósídeo (Figura 11) obtidos a partir do extrato etanólico de *Adenocalymna marginatum*.

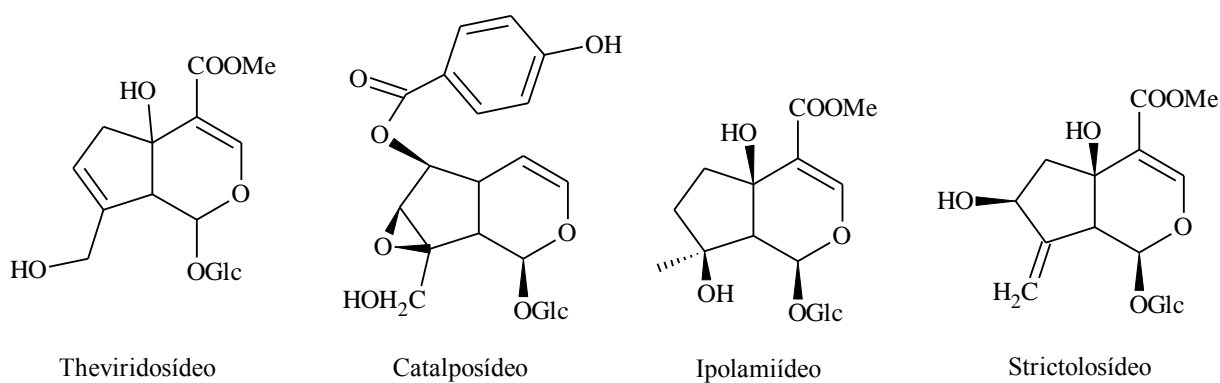


Figura 11: Iridoides isolados de extratos polares de *Adenocalymna marginatum*, *Catalpa bignonioides* e *Pithecoctenium crucigerum* (Iwigawa et al., 1991; Poser et al., 2000; Martin et al., 2007)

Segundo Poser et al. (2000), a classificação de iridoides da família Bignoniaceae para os gêneros *Tecoma* e *Tabebuia* tornou-se mais clara após a publicação de Gentry (1992), que traz uma revisão quanto à separação taxonômica dessa família. A partir da publicação de Gentry (1992), os iridoides glicosilados descarboxilados em C-4 foram reclassificados como membros do gênero *Tabebuia*, enquanto os iridoides glicosilados e formilados em C-4 passaram a ser característicos de iridoides do gênero *Tecoma*.

Os gêneros *Tecoma* e *Tabebuia* são citados em publicações que descrevem a presença de iridoides glicosilados em extratos polares. Em Guiso et al. (1996), são descritos cinco moléculas isoladas do extrato etanólico das folhas de *Tecoma capensis*: tecomosídeo (figura 12) e quatro derivados acilados. Em Abdel-Mageed et al. (2012), ixosídeo (figura 12) foi

isolado do extrato etanólico das cascas do caule de *Tecoma mollis*. Em Nakano et al. (1993), são descritos ajugol (figura 12) e três ésteres de ajugol metoxilados e hidroxilados, isolados do extrato metanólico das cascas de *Tabebuia avellanae*. Em Poser et al (2000), o composto 6-O-p-hidroxibenzoil-6-epi-aucubina (figura 12) foi identificado no extrato etanólico das folhas de *Tabebuia heptaphylla*, *Tabebuia chrysotricha* e *Tabebuia alba*. Em Warashina et al (2004 e 2005) são descritos vários compostos acilados derivados de cinanchosídeo (figura 12), catalpol (figura 10) e crescentina (figura 12), isolados do extrato metanólico da casca *Tabebuia impetiginosa*.

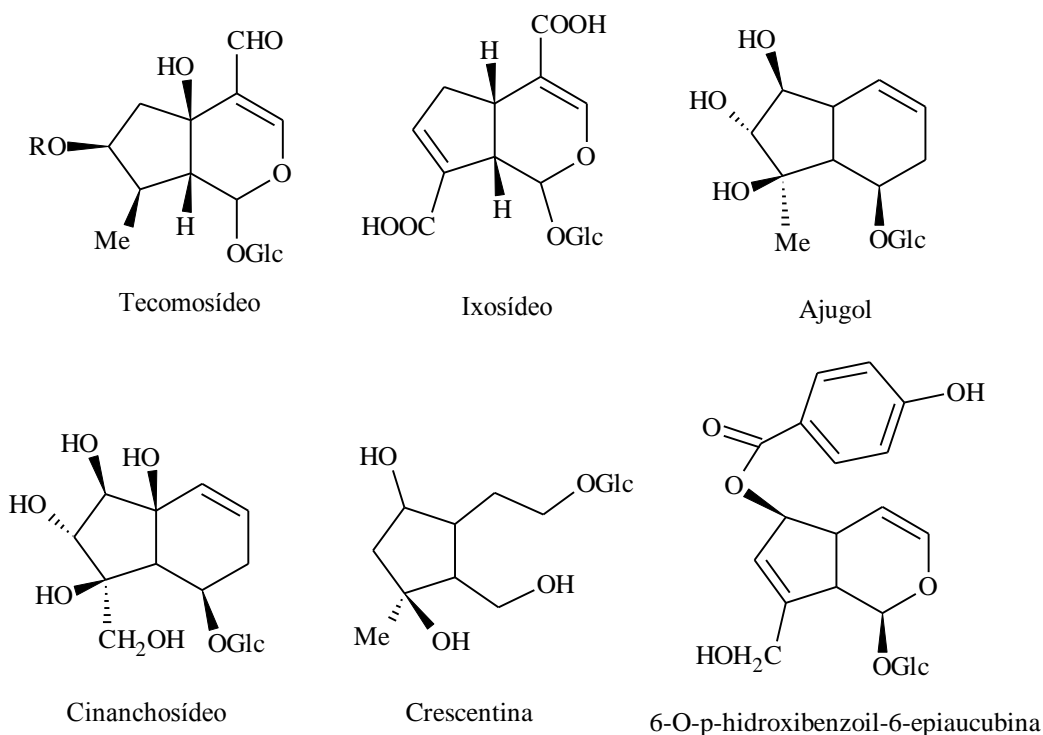


Figura 12: Iridoides glicosilados isolados de extratos polares de plantas dos gêneros *Tecoma* e *Tabebuia* (Abdel-Mageed et al., 2012; Guiso et al., 1996; Nakano et al., 1993; Poser et al., 2000; Warashina et al., 2004 e 2005)

3.4 Métodos Cromatográficos, Espectrométricos e Espectroscópicos

3.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a UV e Espectrometria de Massa (CLAE-DAD-EM)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação largamente utilizada em laboratórios químicos, farmacêuticos, bioquímicos e outros. Trata-se

da separação dos componentes de uma mistura, por meio da introdução da amostra em uma coluna recheada com material sólido adsorvente (fase estacionária) e a passagem de eluente (fase móvel) sob alta pressão. O equipamento pode ser totalmente automatizado e realizar as separações em pouco minutos, com alta resolução e eficiência (Collins et al., 2014)

O desenvolvimento da CLAE aconteceu com o aperfeiçoamento do tamanho das partículas adsorventes que formam a fase estacionária. Hoje, existem partículas com tamanho inferior a $2\mu\text{m}$, que caracterizam o uso da cromatografia líquida de ultra eficiência (UCLAE). Aparelhos de CLAE, UCLAE e Cromatografia Gasosa (CG) acoplados a espectrômetros de massas e detectores de UV são amplamente utilizados para identificação de moléculas. O acoplamento de duas ou mais técnicas recebe o nome de hifenção (Pacheco et al., 2015).

Em um conceito simples, a Espectrometria de Massas (EM) consiste na ionização de uma amostra, seguida da separação de íons de acordo com a relação massa/carga (m/z) e, por último, o registro da m/z em um espectro (Silverstein et al., 2012).

O espectrômetro de massas é basicamente formado por: sistema de introdução da amostra, fonte de ionização, analisador de massas e detector (figura 13) (Iglesias, 2016)

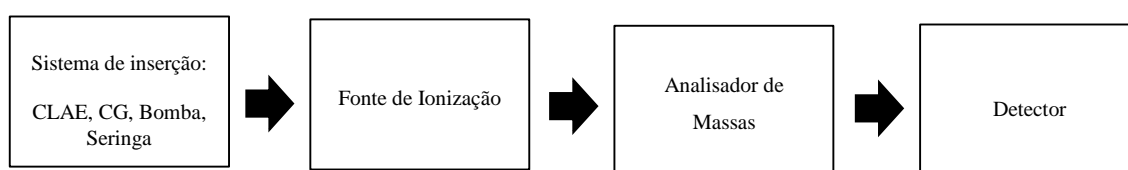


Figura 13: Esquema de um Espectrômetro de Massas adaptado de Iglesias, 2016.

A fontes de ionização têm a função de converter as moléculas da amostra em íons gasosos e, em alguns equipamentos, podem ser facilmente substituídas. A ionização pode acontecer em modo positivo ou negativo, com produção de íons moleculares, protonação ou desprotonação (Iglesias, 2016). As métodos de ionização podem ser: Ionização por Elétrons (EI - Electron Ionization), Ionização Química (IC), Ionização por Dessorção (que utiliza as técnicas de MALDI - Matrix-assisted laser desorption), bombardeamento de átomos (FAB - Fast Atom

Bombardment) e Espectrometria de massa de íon secundário (SIMS – Secondary Ion Mass Spectrometry)) e Ionização por eletrospray (ESI – Eletrospray Ionization) (Pavia et al, 2015). A fonte mais comum acoplada a CLAE é a Eletrospray (ESI), onde o amostra é ionizada ao atravessar um capilar metálico e receber a voltagem. A ESI é indicada para análise de compostos com média e alta polaridade e altos pesos moleculares (Iglesias, 2016).

Os Analisadores de massas são responsáveis por separar os íons de acordo com as suas m/z . Os tipos de analisadores podem ser classificados como: Analisador de massa de setor magnético, Analisador de massa de foco duplo e Analisador de massa quadrupolar. Os Detectores tem a função de converter o feixe de íons em sinal elétrico, posteriormente processado pelo sistema de dados do computador de aquisição e repassados na forma de espectros (figura 14) (Pavia et al., 2015; Iglesias, 2016).

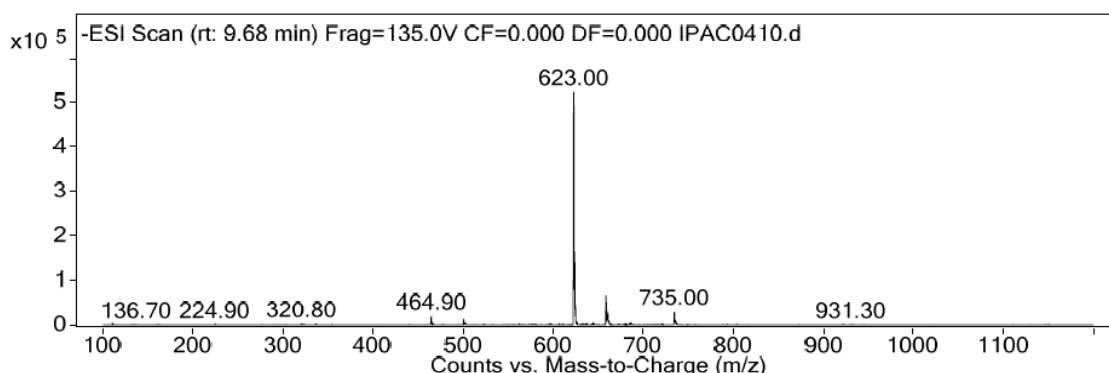


Figura 14: Espectro de Massas obtido em análise por CLAE-DAD-EM (fonte: análise em

CLAE-DAD-EM do extrato etanólico de *T. incana* realizado para este trabalho)

Outro detector comumente acoplado a CLAE é o Detector de Arranjo de diodos (DAD). A utilização da radiação na faixa de UV-Vis fornece informações sobre os compostos, que associadas a outras tecnologias, auxiliam na identificação de moléculas. A substituição detectores UV-Vis convencionais pelo DAD permite a análise simultânea em vários comprimentos de onda no forma de espectros (figura 15). O uso de DAD tem aplicabilidade na detecção de compostos que absorvem luz na região do UV-Vis (Furey e Moriarty, 2011; Vorst et al., 2005).

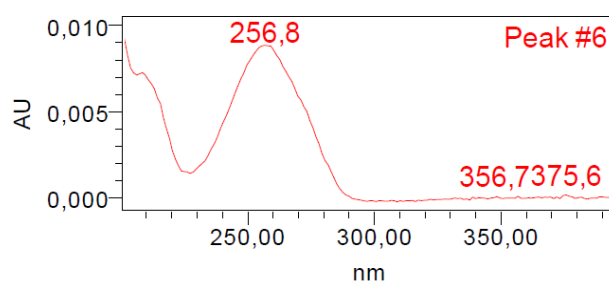


Figura 15: Espectro de UV-Vis obtido em análise por CLAE-DAD (fonte: análise em CLAE-DAD do extrato etanólico de *T. incana* realizado para este trabalho)

3.4.2 Ressonância magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear é uma técnica em que, uma amostra absorve radiação eletromagnética, quando exposta a um campo magnético na região de radiofrequência. A absorção é registrada em gráficos (espectros) da frequência dos picos e suas intensidades, segundo as características de alguns nuclear da amostra (Silverstein et al., 2012).

O primeiro equipamento comercial de RMN data de 1953, portando ímãs ou eletroímãs com frequência até 100 MHz. Hoje, são comuns equipamentos de 300 a 600 MHz, que utilizam magnetos supercondutores e proporcionam maior resolução. A obtenção de espectros atualmente é o método pulsado com Transformada de Fourier. O solventes devem ser deuterados, sendo o clorofórmio o mais comum (CDCl_3) (Pavia et al., 2015; Silverstein et al., 2012).

As análises podem ser realizadas por métodos unidimensionais, com espectros obtidos dos núcleos de ^1H e ^{13}C , e bidimensionais mais comuns, com espectros de COSY (acoplamento ^1H - ^1H), HSQC (correlação ^1H - ^{13}C , diretamente acoplados), HMBC (acoplamento ^1H - ^{13}C , com acoplamento de longa distância 3-4J) (Pavia et al., 2015; Silverstein et al., 2012).

3.4.3 Cromatografia em Contracorrente (CCC)

A cromatografia em contracorrente é um método de separação, extração ou purificação de um soluto, utilizando partição e centrifugação (Berthod, 1991). Podem ser utilizados sistemas binários, terciários ou quaternários (ou com mais componentes) de solventes

imiscíveis. A separação dos componentes do soluto entre as fases (chamadas de fase móvel e estacionária) acontece segundo o coeficiente de partição (Hostettmann e Marston, 1990).

Nos cromatógrafos em contracorrente atuais, o campo centrífugo é aplicado para manter a fase estacionária dentro da coluna (bobinas tubulares abertas) enquanto a fase móvel é empurrada através dela (Berthod et al, 2005). O método de separação por CCC pode ser aplicado desde a escala de miligramas até gramas de soluto (Hostettmann e Marston, 1990). Hoje, os equipamentos são dotados de sistemas de centrifugação de alta velocidade (figura 16) e podem ser empregados facilmente em pesquisas de produtos naturais e também na indústria. (Leitão, 2005).



Figura 16: Cromatógrafo em Contracorrente de Alta Performance usado nas análises do presente trabalho – Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química - UFAM

Para a definição de sistemas de solventes para CCC observa-se critérios importantes como a polaridade da amostra, solubilidade e capacidade de formar complexos. A escolha das fases é semelhante a escolha de eluentes e coluna para CLAE. O sistema de solventes escolhido deve assegurar que os componentes da amostra apresentem boa distribuição entre as fases (Foucault e Chevolut, 1998). Para uma separação mais efetiva, é necessário que o quociente entre a concentração das fases seja próximo de 1. O quociente de partição próximo de zero indica que a amostra é solúvel apenas em uma das fases e que não ocorrerá uma separação satisfatória (Sutherland e Fisher, 2009).

A cromatografia em contracorrente pode ser aplicada como um método que proporciona economia de recursos financeiros. As análises dispensam a pré-purificação da amostra, o uso de solventes de alta pureza e permitem o uso de água destilada em sistemas aquosos. A principal vantagem do método é a recuperação total da amostra (por não utilizar sistema de adsorção). As colunas são confeccionadas em teflon ou aço inox e apresentam grande durabilidade. O uso de sistemas líquidos dificulta a inutilização das colunas por retenção de resíduos. O método apresenta boa resolução, reprodutibilidade e recuperação da atividade biológica em fracionamentos guiados por testes biológicos. A técnica pode ser empregada para sistemas aquosos e não aquosos e particularmente para substâncias polares e lábeis (Leitão, 2005).

4. METODOLOGIA

4.1 Material Vegetal

As cascas utilizadas nas análises foram obtidas de localidades diferentes. As cascas de *T. incana* (figura 17) e *T. serratifolia* foram coletadas em Manaus na Reserva Florestal Ducke em março de 2016 e as cascas de ipê (amostra comercial) foram obtidas diretamente do extrativista que as coletou no município de Manaquiri no Amazonas. A amostra comercial seria encaminhada à feiras de produtos naturais em Manaus para comercialização.

As cascas permaneceram na estufa durante dois dias em temperatura em torno de 40 °C. Em seguida foram processadas separadamente em moinho de facas e armazenadas em sacolas de papel para posterior processo de extração por maceração.



Figura 17: Cascas de *T. incana* coletadas na Reserva Florestal Ducke

4.2 Obtenção de Extrato Etanólico

Parte do material vegetal moído de cada espécie (*T. incana* = 1300 g, *T. serratifolia* = 1200 g e amostra comercial = 20 g) foi colocado em erlenmeyers separados. Ao erlenmeyer foi adicionado etanol até que o material vegetal ficasse submerso no solvente. O material vegetal permaneceu no solvente por 24 h, com agitação manual eventual e foi filtrado em papel filtro após esse período. No mesmo erlenmeyer com o mesmo material vegetal foi colocada outra porção de etanol até que o material vegetal ficasse novamente submerso. Após 48 h foi realizado o mesmo processo de filtração. No mesmo erlenmeyer com o mesmo material vegetal foi

colocado outra porção de etanol por 72 h e filtrada. O material extraído após 24, 48 e 72 h foi agrupado e concentrado por meio rota-evaporação.

4.2.2 Partição da cascas de *T. incana* e *T. serratifolia*

Apenas 1 g do extrato etanólico de *T. incana* foi pesado, solubilizado em 10 mL de MeOH / H₂O (8:2) e transferido para um funil de separação. Ao funil foi adicionado 25 mL de hexano e após a partição líquido-líquido foi retirada a fração hexano e o procedimento repetido seis vezes. Logo em seguida foi adicionado 25 mL de clorofórmio no funil, após a partição líquido-líquido foi retirada a fração clorofórmio e o procedimento repetido dez vezes. Ao mesmo funil foi adicionado 25 mL de acetato de etila e retiradas as frações após duas repetições. A seguir a fração metanol/água foi retirada do funil. Todas as frações foram concentradas. O mesmo procedimento foi realizado com extrato etanólico de *T. serratifolia*.

4.3 Métodos Cromatográficos

4.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Foram utilizadas cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60, indicador de fluorescência F₂₅₄ da marca Merck. Os extratos etanólicos foram aplicados nas placas cromatográficas de sílica Gel 60 F254 em banda. Para avaliação da presença de compostos glicosilados, foram utilizadas como fase móvel, soluções com acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água em proporções variadas (Wagner, 2001). As cromatoplasmas foram reveladas em radiação ultravioleta (254 nm e 365 nm) e vanilina sulfúrica.

4.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – DAD (CLAE - DAD)

Os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos de *T. incana* e *T. serratifolia* foram obtidos em cromatógrafo Waters Alliance 2695 Separations Module, com bomba quaternária e autoinjetores, detector PDA Waters 2996, coluna de C-18 LiChroCART[®] (125 mm x 4,5 mm, 5 µm), detecção UV_{220-400 nm}. Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia – UFMG. Processador EMPOWER.

De cada extrato foram pesados 10 mg e solubilizados em 1 mL de MeOH. Em seguida, foi feita a dissolução usando ultrassom por 20 minutos e centrifugação a 10 000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e analisado nas seguintes condições cromatográficas: eluição em gradiente com H₂O + 0,1% ácido fosfórico (A), acetonitrila (ACN) + 0,1% ácido fosfórico (B), compreendendo um período de eluição linear (5 – 95% ACN de 0 a 60 min), mantendo-se, a seguir, um curto período de eluição isocrática (95% ACN de 60 a 65 min) e retornando à condição de eluição inicial 65 a 70 min (5% ACN). Após o fim de cada corrida, houve um intervalo de 10 min para a nova corrida cromatográfica, a fim de retornar às condições iniciais de gradiente. As análises aconteceram com volume de injeção de amostra 10 µL, fluxo de 1 mL/min e mantendo-se o forno da coluna a 40 °C. As leituras foram feitas em detector de UV-DAD nos comprimentos de onda de 220-400 nm, registrando-se cromatogramas nos comprimentos de onda de 220, 280 e 350 nm. Solventes grau HPLC (Tedia Company Inc., Ohio, EUA) e água Milli-Q.

4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

O extrato etanólico das cascas de *T. incana*, *T. serratifolia* e amostra comercial e as frações acetato de etila e metano/água de *T. incana*, *T. serratifolia* obtidas por meio da partição foram analisadas em UCLAE-EM. O equipamento é identificado como Ultra CLAE-DAD Agilent 1290 Infinity com bomba quaternária G4204A e injetor automático G4226A, coluna Zorbax Eclipse XDC C18 (4,6 mm x 150 mm; 5 µm) acoplado a Espectrômetro de Massas Triplo Quadrupolo G6460C (Agilent) com fonte de ionização por eletrospray (AJS ESI) (Agilent) em modo negativo e na faixa de scan 100 a 1200 Da. Laboratório de Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UFPA. Processador MassHunter Workstation versão B.07.00.

De cada extrato e fração, foi retirado 1 mg e solubilizado em 1 mL de MeOH. Posteriormente, esses extratos e frações foram centrifugados a 14.000 rpm durante 15 minutos

e o sobrenadante analisado nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel MeOH / H₂O (ácido acético 0,8%, pH=3) em composição isocrática MeOH / H₂O (45:55) por 20 minutos, injeção de 4 µL com fluxo de 0,3 mL/min. Solventes de grau HPLC e água Milli-Q.

4.3.4 Cromatografia em Contracorrente de Alta Performance (CCCAP)

4.3.4.1 Avaliação de sistemas por meio de CCD para separação de iridoídes e compostos glicosilados

Para as análises em CCCAP foi selecionado apenas o extrato etanólico de *T. incana*. O extrato foi inicialmente testado nos sistemas HEMWats (hexano: acetato de etila: metanol: água) e EBWats (acetato de etila: butanol: água) mostrados na tabela 2. Segundo Leitão et al (2012), o sistema EBWats é indicado para separação de compostos glicosilados. Em bancada, 4 mg extrato foi colocado em frasco vial e solubilizado em 1 mL dos sistemas EBWats 1 e 2 (tabela 2), nos sistemas HEMWats 6, 17 e 28 (tabela 2). Após agitação e estabilização das fases inferior (FI) e superior (FS), estas foram separadas e alíquota de 20 µL de cada fase foi aplicada em placas de sílica gel 60. A placa com FI e FS dos sistemas HEMWats 6, 17 e 28 foram eluídas com fase móvel CHCl₃: AcOEt: ac. acético (30:80:10). As fases dos sistemas EBWats 1 e 2 foram eluídas com fase móvel AcOEt: BuOH: H₂O (77: 13: 10) (Wagner, 2001). Todas as placas foram reveladas com solução de vanilina sulfúrica e radiação 254 nm e 365 nm.

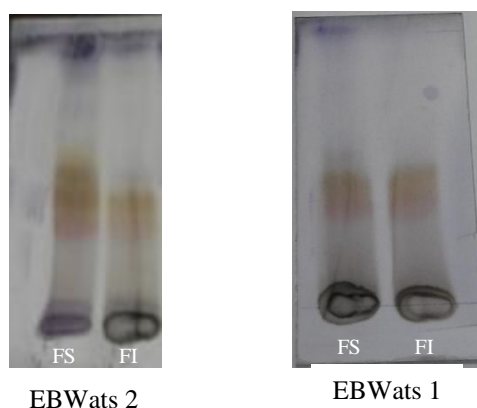


Figura 18: Teste de separação de fases em CCD utilizando sistemas EBWats 1 e 2 e reveladas em de vanilina sulfúrica

Tabela 2: Sistema HEMWats e EBWats

Sistemas	Polaridade	Hexano	Acetato de etila	Metanol	Butanol	Água
1		0	0	0	5	5
2		0	1	0	4	5
3		0	2	0	3	5
4		0	3	0	2	5
5		0	4	0	1	5
6		0	1	0	0	5
7		1	1	1	0	1
8		1	19	1	0	19
9		1	9	1	0	9
10		1	6	1	0	6
11		1	5	1	0	5
12		1	4	1	0	4
13		2	3	2	0	3
14		1	5	1	0	5
15		2	2	2	0	2
16		5	3	5	0	3
17		1	6	1	0	6
18		6	1	6	0	1
19		3	5	3	0	5
20		2	2	2	0	2
21		5	1	5	0	1
22		3	2	3	0	2
23		4	1	4	0	1



Maior Polaridade



Menor Polaridade

Tabela 2: continuação

Sistemas	Polaridade	Hexano	Acetato de etila	Metanol	Butanol	Água
24		5	1	5	0	1
25		6	1	6	0	1
26		9	1	9	0	1
27		19	1	19	0	1
28		1	0	1	0	0

Fonte: Garrard (2005)

O extrato etanólico de *T. incana* também foi testado em sistemas modificados mostrados na tabela 3.

Tabela 3: sistemas de solventes modificados

Sistemas	Hexano	Acetato de etila	Metanol	Butanol	Água
EBWats 2 acrescido de metanol	0	1	100 µL	4	5
EBWats 2 acrescido de metanol	0	1	200 µL	4	5
EBWats 2 acrescido de metanol	0	1	300 µL	4	5
EBWats A	0	0,5	0	4,5	5
BA 1	0	0	0	6	4
BA 2	0	0	0	1	4

Fonte própria

Os sistemas HEMWats 6, 17, 28 (tabela 2) e os sistemas modificados BA 1 e 2 (tabela 3) não apresentaram distribuição satisfatória das fases e por isso não serão utilizados nas corridas em CCCAP.

Nas eluições com fases obtidas em sistemas modificados, apenas o sistema EBWats acrescido de 200 µL de MeOH (tabela 3) mostrou formação de fases satisfatória (figura 19).

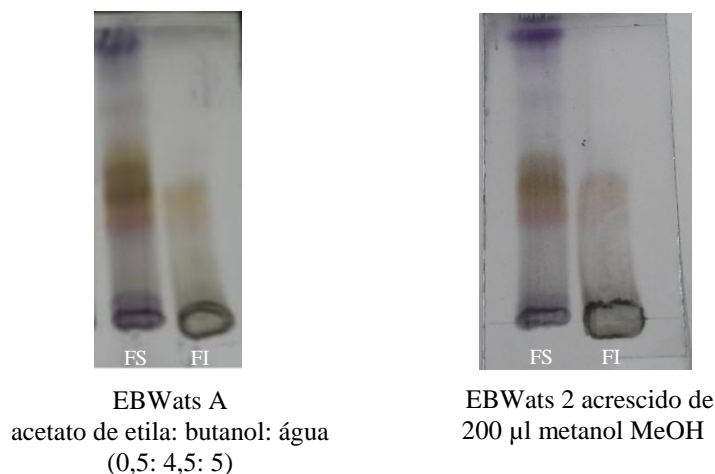


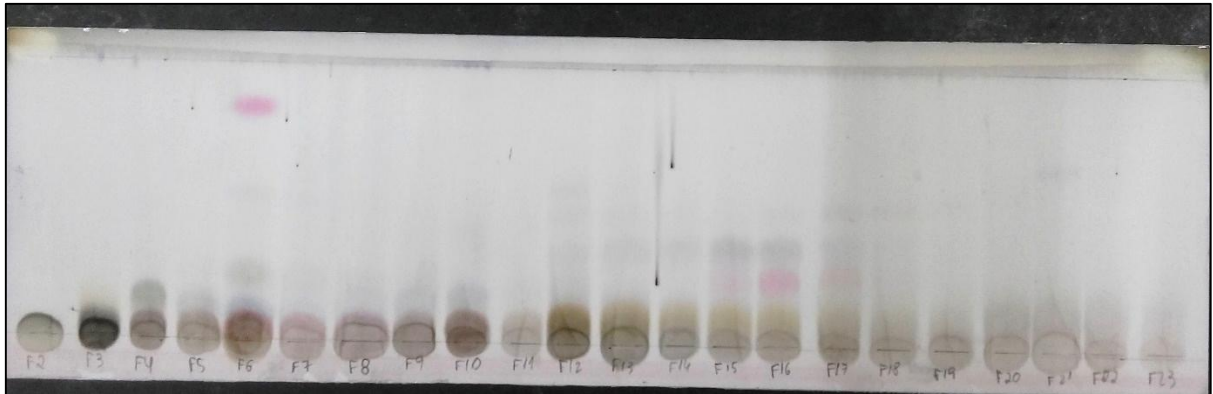
Figura 19: Teste de separação de fases em CCD utilizando sistemas modificados e reveladas em vanilina sulfúrica

A partir da separação das fases observadas por meio de CCD dos sistemas EBWats 1e 2 (figura 18) e EBWats A (figura 19), verificou-se boa separação dos componentes e por isso esse sistemas serão utilizados nas corridas em CCCAP.

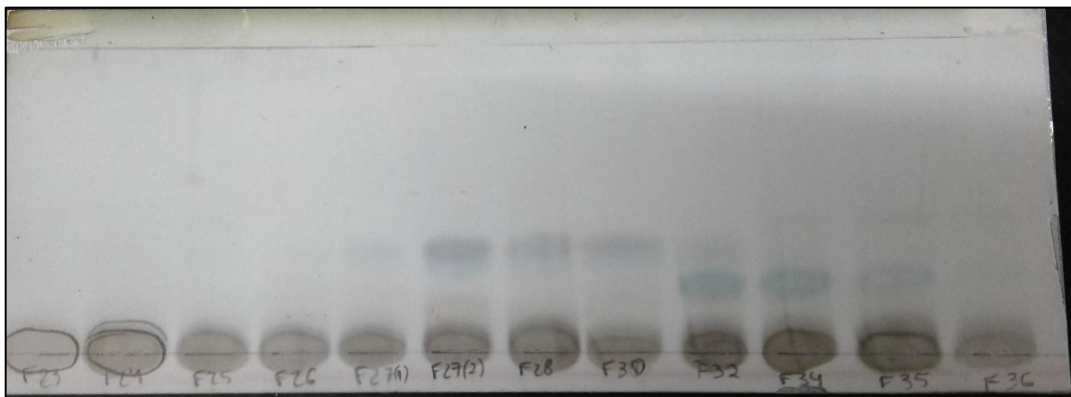
4.3.4.2 Injeção no CCCAP em coluna preparativa em fase Reversa

4.3.4.2.1 Método 1: corrida em modo isocrático utilizando sistema EBWats 2 (tabela 2)

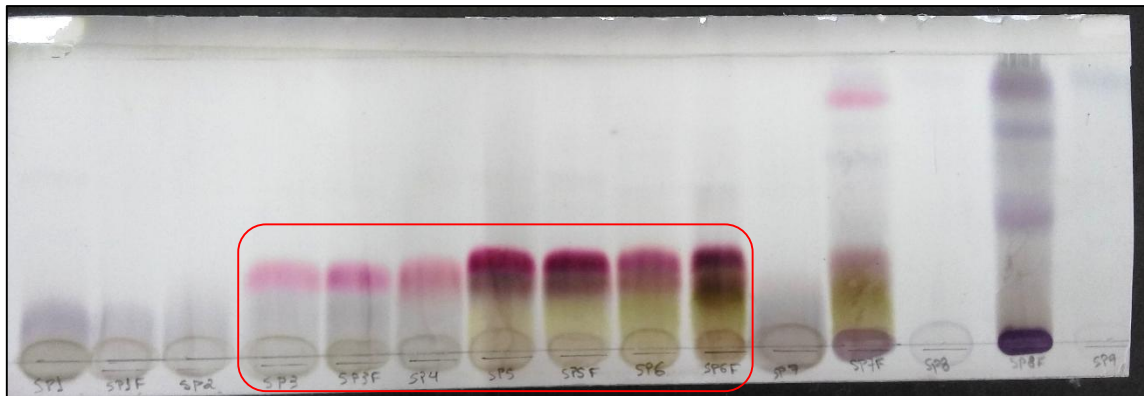
Na primeira corrida, pesaram-se 500 mg de extrato etanólico de *T. incana* que foram diluído em 6 mL de fase superior e fase inferior na proporção de 1:1 (v/v) do sistema EBWats 2 (tabela 2). Na coluna preparativa foi injetado 240 mL (duas vezes o volume da coluna preparativa) de fase superior (fase menos do polar do sistema EBWats 2) seguido da injeção da fase inferior (fase mais do polar do sistema EBWats 2). Após estabilização das fases na coluna, injetou-se 6 mL da amostra diluída. O fluxo de injeção foi de 3 mL/min em fase reversa (FR). Foram coletas 49 frações sendo, 33 frações diluídas em fase móvel (F1 a F33) e 16 frações de diluídas em fase estacionária (SP1 a SP9) obtidas durante o expurgo da coluna. O expurgo da coluna (limpeza da coluna) foi realizado com a injeção de metanol na coluna para retirada de toda a fase estacionária. As frações foram concentradas e o perfil observado por meio de CCD (figura 20).



(a)



(a)



(b)

Figura 20: Cromatoplas das frações obtidas na primeira corrida em CCCAP e reveladas em vanilina sulfúrica: (a) frações; (b) expurgo da fase estacionária.

As frações SP3 a SP6F (destacadas na figura 20) foram aplicadas em Cromatografia de Camada Delgada Preparativa (CCDP).

4.3.4.2.1 – Método 2: corrida em modo gradiente utilizando sistema EBWats 2 (tabela 2)

Para segunda corrida, pesaram-se 500 mg de extrato etanólico de *T. incana*, que foram diluído em 6 mL de fase superior e fase inferior na proporção de 1:1 (v/v) do sistema EBWats 2 (tabela 2). Após a injeção na coluna preparativa da fase superior, seguida de injeção da fase inferior e estabilização das fases, injetou-se 6 mL da amostra diluída na coluna. O fluxo de injeção foi de 6 mL/min. Foram utilizadas três fases móveis (fase inferior) em ordem crescente de polaridade: sistema EBWats 2 (tabela 2) (MP1), sistema modificado EBWats A (tabela 3) (MP2) e sistema EBWats 1 (tabela 2) (MP3). Foram coletadas 77 frações sendo, 54 frações com fase móvel (18 frações de cada sistema) e 23 frações de expurgo da fase estacionária (SP1 a SP23). As frações foram concentradas e o perfil observado por meio de CCD reveladas com vanilina sulfúrica e radiação 254 nm e 365 nm (figura 21).

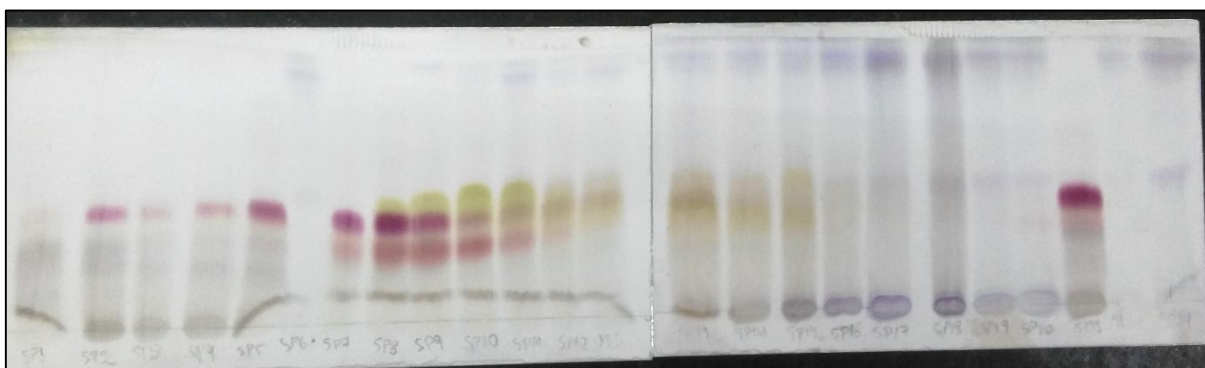


Figura 21: Cromatoplas das frações SP obtidas segunda na corrida em CCCAP revelada em vanilina sulfúrica.

A seguir, foram realizadas mais quatro corridas, utilizando-se os sistemas de solventes EBWats 1 e 2 (tabela 2), EBWats A (tabela 3) e quantidades diferentes de massa de amostra. A ordem de injeção das fases foi mantida a partir da 4ª corrida como é mostrado na tabela 4.

Tabela 4: Sistemas usados a partir da terceira corrida

Corrida	Massa de amostra	Fase	AcOEt :	BuOH :	H ₂ O
3 ^a Corrida	500 mg	SP	1	4	5
		MP1		1	1
		MP2	0,5	4,5	5
		MP3	1	4	5
4 ^a Corrida	384 mg	SP		1	1
		MP1		1	1
		MP2	0,5	4,5	5
		MP3	1	4	5
5 ^a Corrida	500 mg	SP		1	1
		MP1		1	1
		MP2	0,5	4,5	5
		MP3	1	4	5
6 ^a Corrida	570 mg	SP		1	1
		MP1		1	1
		MP2	0,5	4,5	5
		MP3	1	4	5

Após 6 injeções, foram coletadas 109 frações. Todas as frações foram observadas por meio de CCD e reveladas com vanilina sulfúrica e radiação 254 nm e 365 nm. Algumas cromatoplacas foram revelados com Anisaldeído.

4.3.5 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)

4.3.5.1 Avaliação de sistemas em CCD

As frações SP3 a SP6F (totalizando 7 frações) foram aplicadas em cromatoplasmas de sílica gel 60 ativadas e não ativadas, para observação do perfil de separação. As cromatoplasmas foram eluídas em sistemas binários e terciários, em diferentes proporções de CHCl_3 , AcOEt, MeOH e H_2O . Os reveladores utilizados foram vanilina sulfúrica e radiação 254 e 365 nm. As eluições aconteceram em duas sequências: placas ativadas eluídas de uma a três vezes e placas não ativadas eluídas de uma a três vezes. Após as eluições e análise do perfil em CCD as frações SP3 a SP6F foram agrupadas totalizando 41 mg e o agrupamento nomeado SPAC2.

4.3.5.2 Confeção da placa cromatográfica CCDP

Pesaram-se 30 g de sílica gel para CCD (com Gypsum, UV 254, 5-15 μm , 60 Å) da marca Sorbent Technologies que foi solubilizada em 75 mL de H_2O destilada. Após agitação contínua por alguns minutos, a mistura foi depositada em um placa de vidro (20 cm x 20 cm), devidamente lavada e seca. A deposição da sílica sobre a placa de vidro, deve ser homogeneizada e acontecer do centro para as extremidades. A placa permaneceu no laboratório em temperatura ambiente por três dias para secar.

4.3.5.3 Aplicação e eluição da amostra

A amostra SPAC2 foi solubilizado em 4 mL de MeOH e aplicada na placa preparativa não ativada. A placa foi eluída três vezes no sistema CHCl_3 : AcOEt: MeOH (2: 40: 4) e entre cada eluição, o processo de separação foi acompanhado por revelação em radiação 254 e 365 nm. As frações foram retiradas da placa, extraídas com MeOH por meio de ultrassom e filtradas.

4.4.1 Espectrometria de Massas (EM)

As frações obtidas em CCCAP foram analisadas em espectrômetro *ion trap* LCQ Fleet™ Thermo Scientific em ESI (modo positivo e negativo) com injeção por inserção direta, fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ e varredura entre 100 e 1000 m/z . As amostras foram pesadas e

solubilizadas em MeOH grau HPLC até a concentração de 1 mg/mL. Em seguida, foi transferida alíquota de 20 µL para microtubo e avolumada para 1 mL com MeOH grau HPLC. Laboratório de Espectrometria de Massas - UFAM. Processador Xcalibu 2.0 Thermo Fisher Scientific.

4.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As frações obtidas em CCCAP foram analisadas em espectrômetro Bruker Advance II HD 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C . As amostras foram solubilizadas em MeOH- d_4 e Tetrametilsilano (TMS) foi usado como padrão de referência. Solvente da marca Cambridge Isotope Laboratories. Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear na Central - UFAM. Processador ACD/Labs versão 12.00.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os extratos etanólicos das cascas e frações polares de *T. incana*, *T. serratifolia* e amostra comercial foram analisados por CLAE-DAD. Em CLAE-EM foram analisados os extratos etanólicos das três amostras e as frações acetato de etila e metanol/água de *T. incana* e *T. serratifolia* obtidas por meio de partição. Apenas o extrato etanólico das cascas de *T. incana* foi analisado em CCCAP (figura 22).

Os espectros de massas apresentaram íons correspondentes a massas moleculares (MM) de iridoides, fenilpropanoides, lignanas e fenólicos glicosilados isolados de outras espécies de *Tabebuia* e Bignoniaceae.

Dentre os sinais destacam-se iridoides na forma de éster de ajugol (figura 33) e ésteres de bisdeoxicinanchosídeo (figuras 27 e 32). Quanto aos fenilpropanoides, foram identificados sinais que podem corresponder a 2 ésteres aromáticos glicosilados (figura 37). Na classe das lignanas foram observadas duas estruturas com esqueleto secoisolariciresinol ligadas à porção éster aromática metoxilada (figura 55). Nos íons relativos a fenólicos glicosilados, há destaque para molécula formada por éteres aromáticos metoxilados (figura 32).

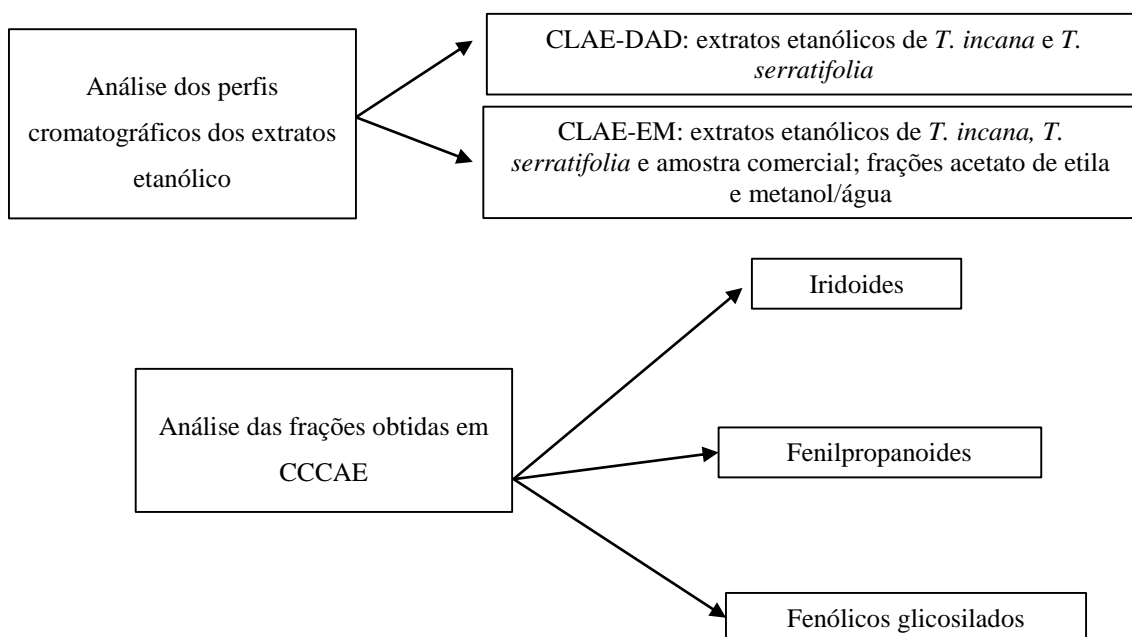
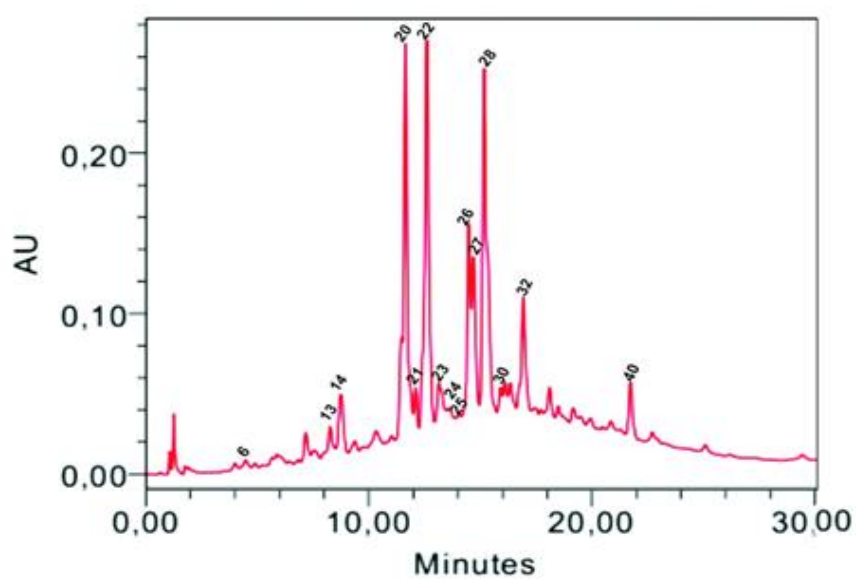


Figura 22: Esquema das análises cromatográficas e espectrométricas realizadas nos extratos e frações polares de *T. incana*, *T. serratifolia* e amostra comercial

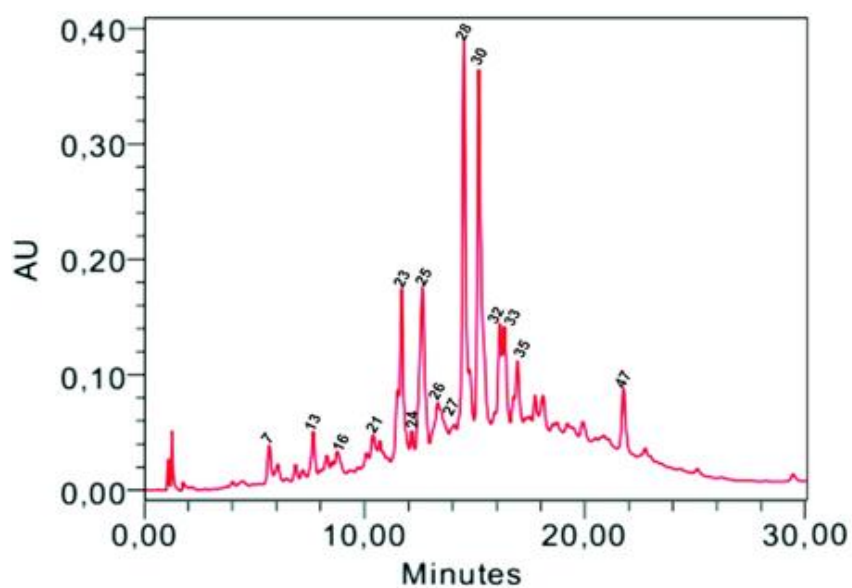
5.1 Perfil cromatográfico dos extratos etanólicos de *T. incana*, *T. serratifolia* e amostra comercial de ipê.

5.1.1 Análise em CLAE-DAD e CLAE-EM dos extratos etanólicos de *T. incana*, *T. serratifolia* e amostra comercial.

Os extratos etanólicos de *T. incana* e *T. serratifolia* foram analisados em CLAE-DAD e apresentaram os cromatogramas mostrados na figura 23. Os cromatogramas possuem perfis muito semelhantes no tempo de retenção, entretanto intensidades diferentes.



T. incana



T. serratifolia

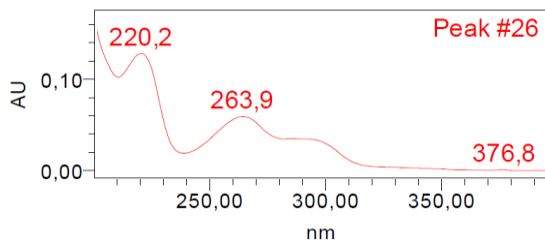
Figura 23: Cromatogramas obtidos em CLAE-DAD

Nos dois cromatogramas há maior concentração de sinais entre 10 e 22 minutos. Todos os sinais foram analisados por meio do UV-Vis e apresentaram bandas de absorção entre 200 e 380 nm. Ao comparar o perfil das duas espécies, foram observados 5 sinais com tempos de retenção (TR) (aproximadamente entre 14, 15, 16, 17 e 22 minutos) e máximos de absorção (λ_{\max}) semelhantes (tabela 5).

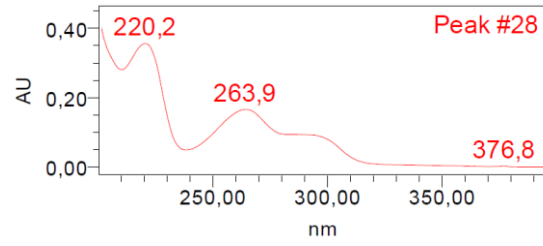
Segundo Pavia et al. (2015), espectros de UV com duas ou três bandas e λ_{\max} acima de 200 nm, são característicos de compostos aromáticos. Também é observado que a faixa de absorção entre 250 e 290 nm pode ser indicativa de derivados de benzoíla ligados à hidroxila, metoxila ou grupo alquila em posições *orto*, *meta* ou *para*. Observa-se que nos espectros de CLAE-DAD dos extratos etanólicos de *T. incana* e *T. serratifolia*, são registradas bandas de absorção que podem indicar a presença de compostos aromáticos derivados de benzoíla (figura 24).

Tabela 5: Tempos de retenção e máximos de absorção dos extratos etanólicos de *T. incana* e *T. serratifolia* obtidos em CALE-DAD.

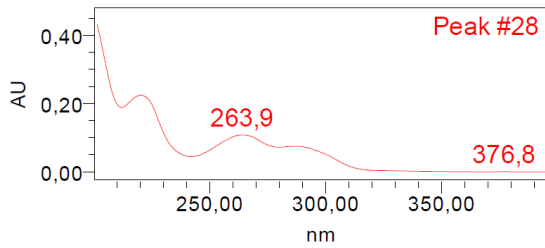
<i>T. incana</i>			<i>T. serratifolia</i>		
Pico	Tempo de retenção (min)	λ_{\max} (nm)	Pico	Tempo de retenção (min)	λ_{\max} (nm)
26	14,485	220,2; 263,9; 376,8	28	14,508	220,2; 263,9; 376,8
28	15,164	263,9; 376,8	30	15,189	263,9; 376,8
30	16,102	201,4; 263,9; 291,1	32	16,137	202,6; 263,9; 291,1
32	16,925	263,9; 376,8	35	16,941	265,0; 376,8
40	21,728	263,9; 292,3; 375,6	47	21,756	263,9; 376,8



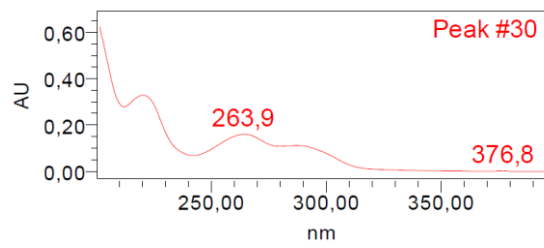
Espectro do pico 26 *T. incana*



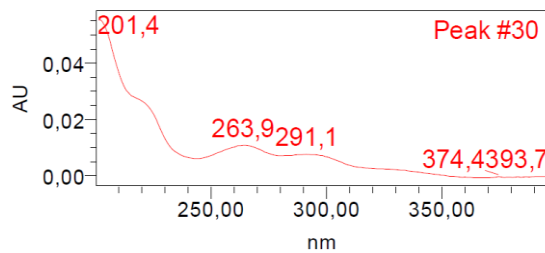
Espectro do pico 28 *T. serratifolia*



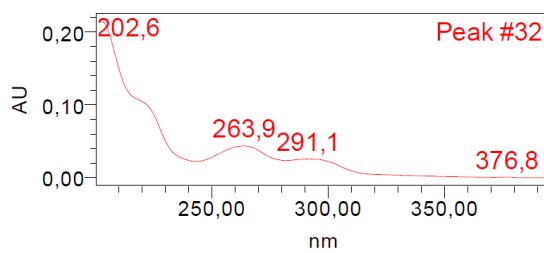
Espectro do pico 28 *T. incana*



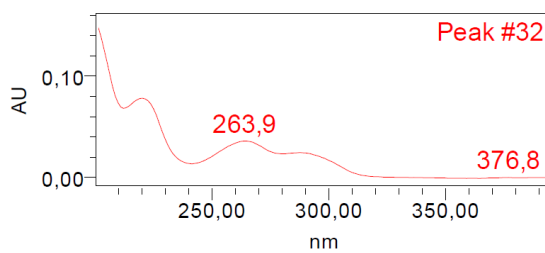
Espectro do pico 30 *T. serratifolia*



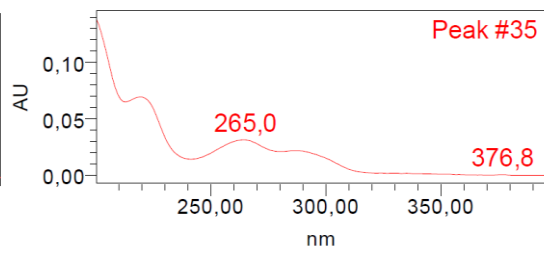
Espectro do pico 30 *T. incana*



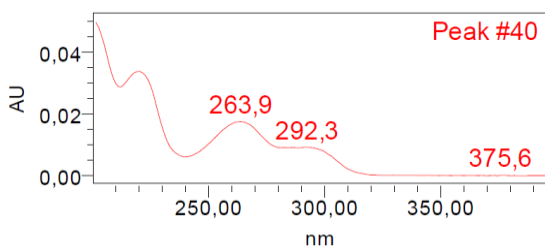
Espectro do pico 32 *T. serratifolia*



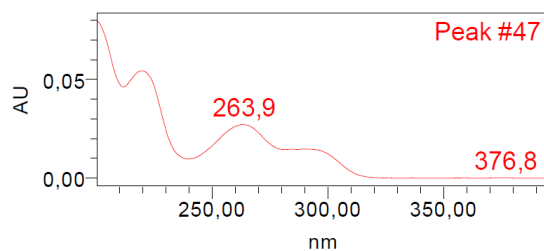
Espectro do pico 32 *T. incana*



Espectro do pico 35 *T. serratifolia*



Espectro do pico 40 *T. incana*



Espectro do pico 47 *T. serratifolia*

Figura 24: Espectros de CLAE-DAD dos extratos etanólicos de *T. incana* e *T. serratifolia*

No cromatograma do extrato de *T. incana* obtido em CLAE-DAD, observou-se o pico 6 com TR em torno de 4,89 min (figura 23). No espectro de UV observou-se bandas de absorção com λ_{max} em 256 nm e TR de 4,89 min (figura 25) que podem indicar a presença de compostos aromáticos. No espectro obtidos por CLAE-EM, foi registrado o pico com TR de 4,78 min com sinal em 497 u (figura 26). Segundo Warashina et al. (2005), do extrato metanólico das cascas de *T. impetiginosa* foi isolado iridoide glicosilado de MM 498 u e identificado como um éster de bisdeoxicinanchosídeo (6-*O*-(4-metóxi-benzoil)-5,7-bisdeoxicinanchosideo), devido à presença de esqueleto iridano e porção benzoíla *para*-metoxilada (figura 27). Ao associar as características de absorção do pico 6 no espectro de CLAE-DAD (figura 25) e o registro de sinal m/z 497 $[\text{M-H}]^-$ no espectro de CLAE-EM de *T. incana* (figura 26), pode-se supor que o sinal m/z 497, pode ser um íon com características estruturais semelhantes ao éster de bisdeoxicinanchosídeo com MM 498 u isolado das cascas de *T. impetiginosa* (figura 27).

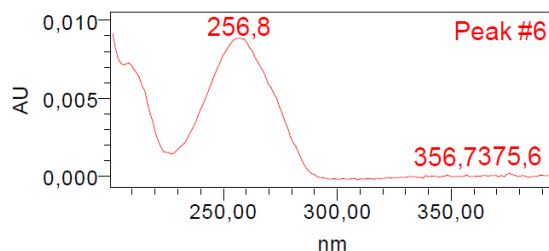


Figura 25: Espectro de CLAE-DAD do extrato de *T. incana* – pico 6 com TR 4,89 min

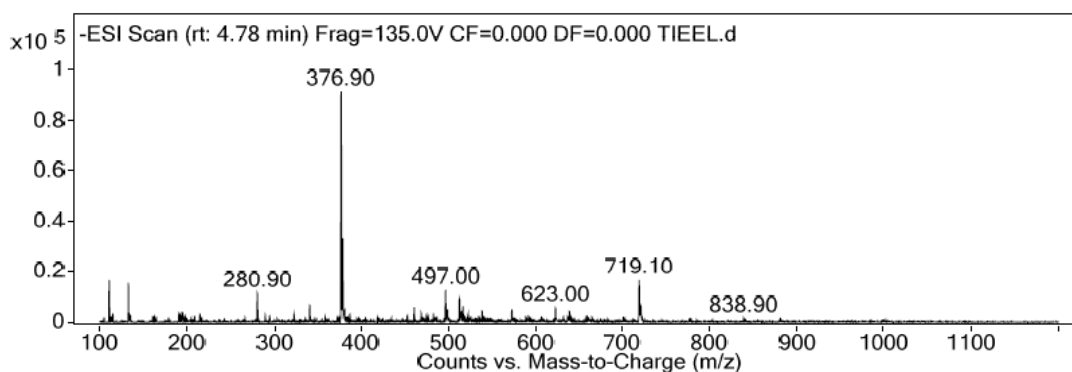


Figura 26: Espectro de CLAE-EM do extrato etanólico de *T. incana*

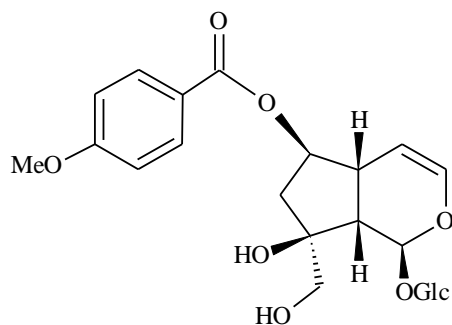


Figura 27: Éster de bisdeoxycinanchosídeo descrito em Warashina et al., 2005

Outro sinal observado no espectro do extrato etanólico de *T. incana* na figura 26, é o sinal m/z 377 $[M-H]^-$ que pode estar relacionado a iridoide isolado de Bignoniaceae. Esse íon ser resultado da ionização de um iridoide glicosilado, com hidroxilação em C-5, nomeado macfadienosídeo (figura 28), isolado a partir do extrato etanólico das folhas de *Macfadyena cynanchoides* (Bignoniaceae) e descrito por Bonini et al. (1981).

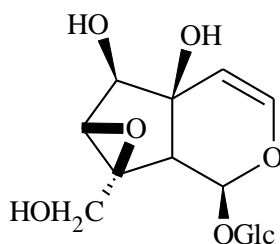


Figura 28: Macfadienosídeo descrito em Bonini et al., 1981

Na análise do extrato etanólico da amostra comercial em CLAE-EM o sinal em m/z 377 $[M-H]^-$ foi observado em espectro com TR 4,86 min (figura 29). Assim como sugerido para o extrato de *T. incana*, o sinal em m/z 377 do extrato da amostra comercial também pode ser considerado resultado da ionização do iridoide macfadienosídeo (figura 28).

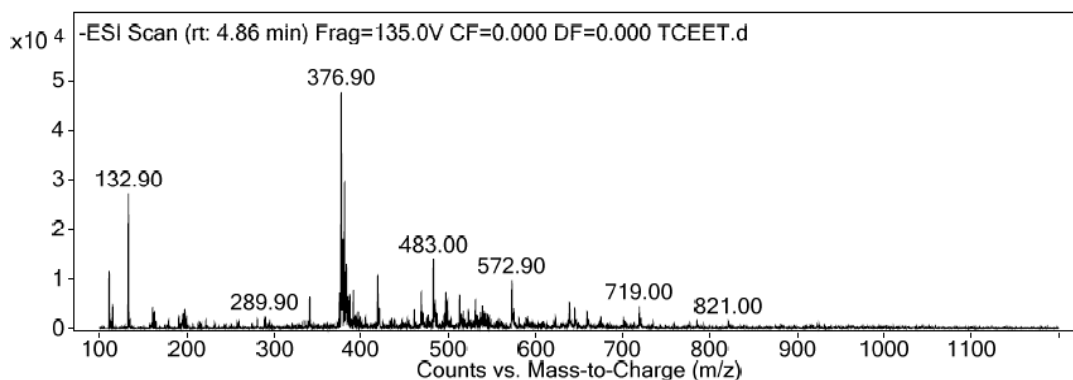


Figura 29: Espectro da amostra comercial obtido em CLAE-EM com TR 4,86 min

Para o extrato etanólico de *T. serratifolia* foi observado sinal em m/z 483 $[M-H]^-$ no espectro de CLAE-EM com TR 6,36 min (figura 31). A análise em CLAE-DAD desse mesmo extrato mostrou pico com bandas de absorção (figura 30 – peak #9) características de compostos benzoílicos substituídos (Pavia et al., 2015) registrado com TR 6,44 min. Comparando com as moléculas descritas em Iwagawa et al. (1991) e isoladas do extrato metanólico das raízes de *Catalpa bignonioides* (Bignoniaceae), observou-se iridoide com MM 484 u (figura 32) com características benzofílicas e identificado como um éster deoxicinanchosídeo (*p*-hidróxi-benzoil-5,7-bisdeoxicinanchosídeo). É possível que o íon em m/z 483 presente no extrato etanólico de *T. serratifolia* seja resultado da ionização do iridoide de MM 484 u isolado raízes de *Catalpa bignonioides*. O mesmo sinal m/z 483 foi mostrado no espectro CLAE-EM do extrato da amostra comercial (figura 29).

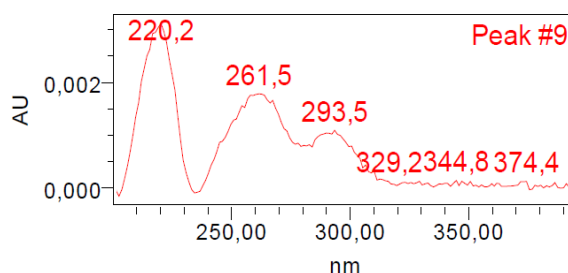


Figura 30: Espectro do extrato etanólico de *T. serratifolia* obtido em CLAE-DAD com TR 6,44 min – pico 9

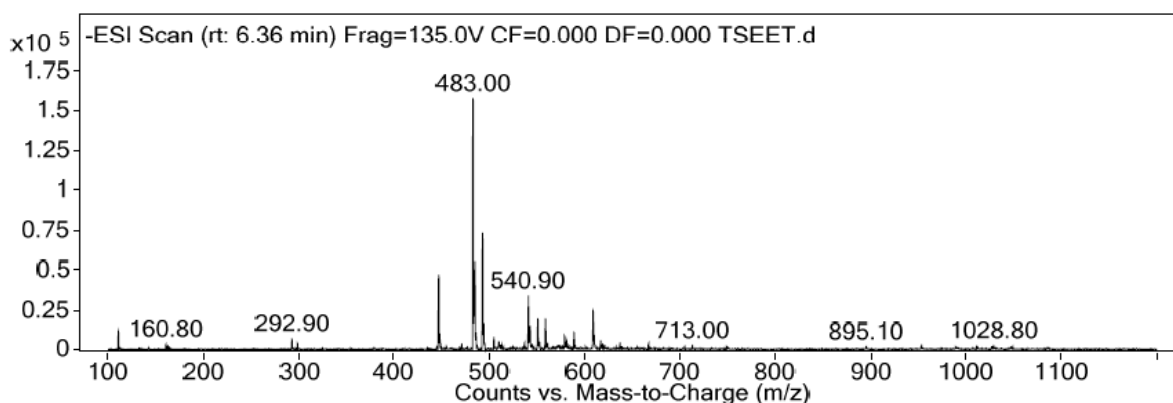


Figura 31: Espectro do extrato etanólico de *T. serratifolia* obtido em CLAE-EM com TR 6,36 min

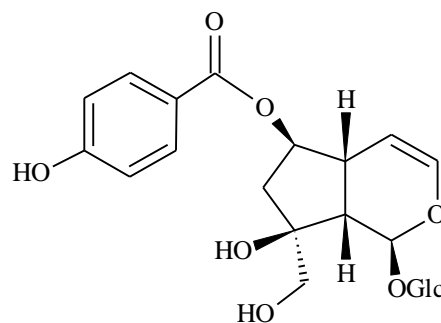


Figura 32: Éster de bisdeoxycinanchosídeo *p*-hidroxilado descrito em Iwagawa et al., 1991

Outro sinal que pode ser resultado da ionização de iridoide presente no extrato de *T. serratifolia* é o sinal em m/z 541 $[M-H]^-$ (figura 31). As características estruturais desse íon podem ser associadas às características do iridoide glicosilado de MM 542 u e classificado com éster de ajugol isolado do extrato metanólico das cascas de *T. impetiginosa* descrito em Warashina et al. (2004). Esse éster apresenta estrutura molecular com porção benzoíla substituída com metoxilas nas posições 3, 4 e 5 (3,4,5-trimetoxi-benzoil-ajugol) (figura 33). A partir dessas observações é possível sugerir que o íon m/z 541 pode ser o fragmento do éster de ajugol descrito em Warashina et al (2004).

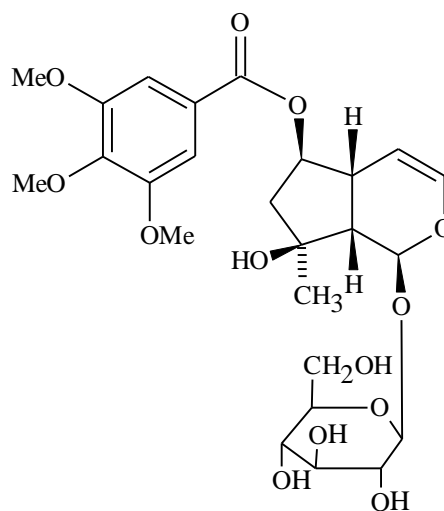


Figura 33: Éster de ajugol trimetoxilado

Nos espectros de CLAE-EM, foram registrados outros sinais que podem ser fragmentos de moléculas glicosiladas com estruturas diferentes do esqueleto iridano. Esse é o caso do sinal em m/z 623 (figura 37) observado nos espectros dos extratos etanólicos e frações acetato de

etila e MeOH/H₂O de *T. incana* e *T. serratifolia* e extrato bruto da amostra comercial. Os espectros apresentaram tempo de retenção entre 7 e 9 min (tabela 6; figuras 34, 35 e 36).

Tabela 6: Tempo de retenção de espectros com sinal em m/z 623 [M-H]⁻

<i>T. incana</i>	<i>T. serratifolia</i>	Amostra comercial
7,40 min	7,44 min	7,24 min
7,87 min	7,80 min	7,87 min
9,34 min	9,36 min	9,38 min
9,51 min	9,57 min	9,62 min

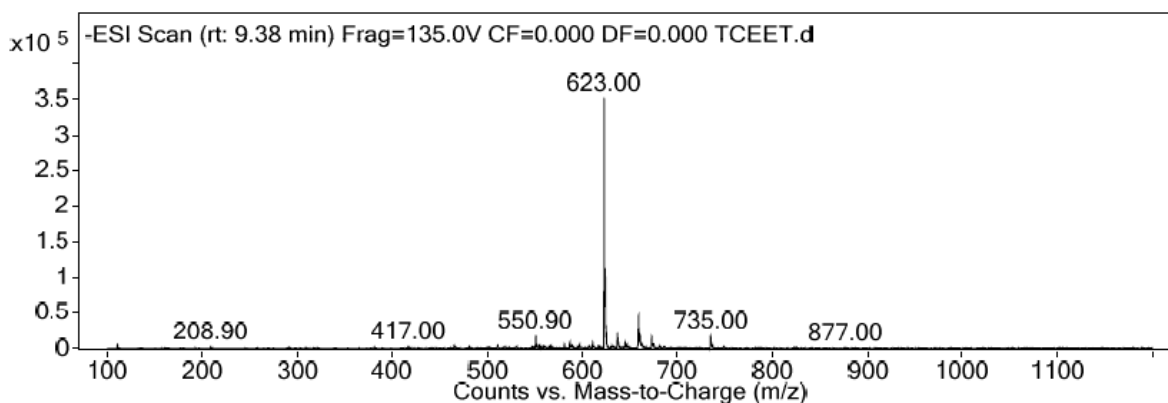


Figura 34: Espectro do extrato etanólico da amostra comercial obtido em CLAE-EM

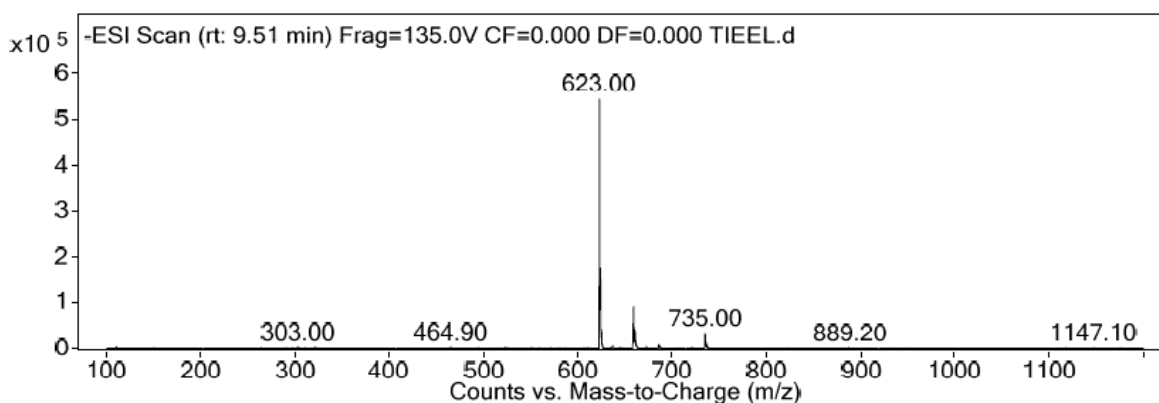


Figura 35: Espectro do extrato etanólico de *T. incana* obtido em CLAE-EM

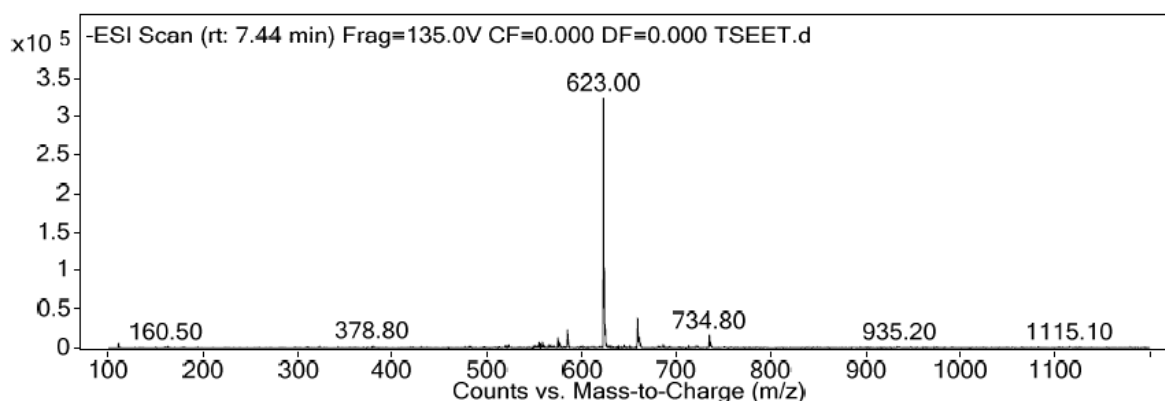
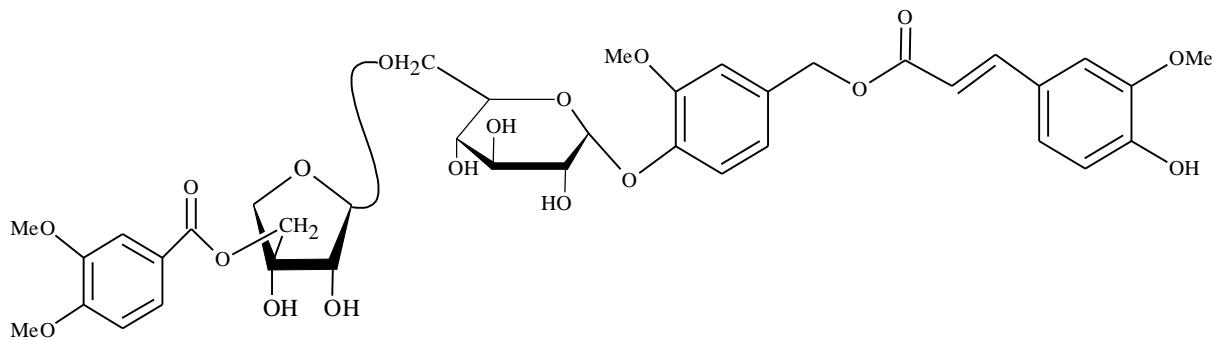
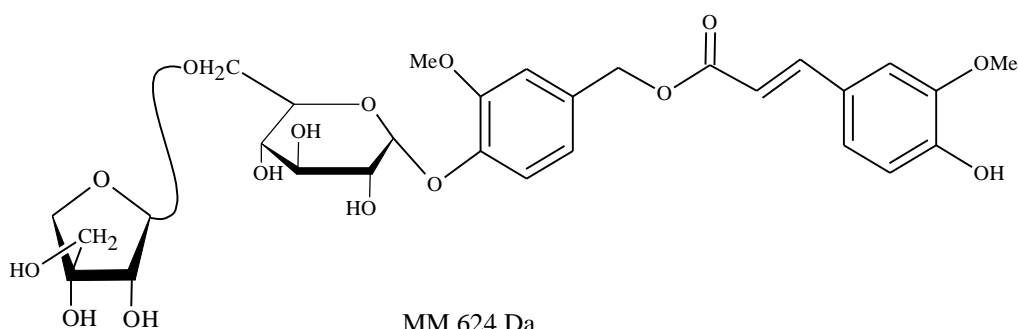


Figura 36: Espectro do extrato etanólico de *T. serratifolia* obtido em CLAE-EM

Segundo Warashina et al. (2006), do extrato metanólico das cascas de *T. impetiginosa*, foi isolado um fenilpropanoide glicosilado com MM 788 Da (figura 37). A partir da hidrólise alcalina dessa molécula foi obtido outro fenilpropanoide de MM 624 Da (figura 37). A semelhança nas estruturas moleculares desses dois fenilpropanoides descritos em Warashina et al. (2006) permite sugerir que a partir da ionização da molécula com MM 788 Da é possível obter íon m/z 623. Não foi possível detectar sinais de íon que poderiam ser relacionado a ionização da molécula de MM 788 Da nos espectros de CLAE-EM. É válido sugerir que o sinal em m/z 623 encontrados nos espectros de extratos e frações das amostras analisadas seja resultado da ionização do fenilpropanoide de MM 624 Da descrito por Warashina et al. (2006) (figura 37).



MM 788 Da



MM 624 Da

Figura 37: Estruturas moleculares de fenilpropanoides glicosilados descrito em Warashina et al., 2006

O sinal em m/z 431 $[M-H]^-$ foi observado nos espectros do extrato etanólico de *T. incana* e *T. serratifolia* (figuras 38 e 39) e nas frações acetato de etila e MeOH/H₂O de *T. incana*. (figuras 40 e 41). A ionização do fenilpropanoide de MM 624 Da com perda da porção feruloíla pode produzir estrutura molecular compatível com sinal m/z 431 (figura 42).

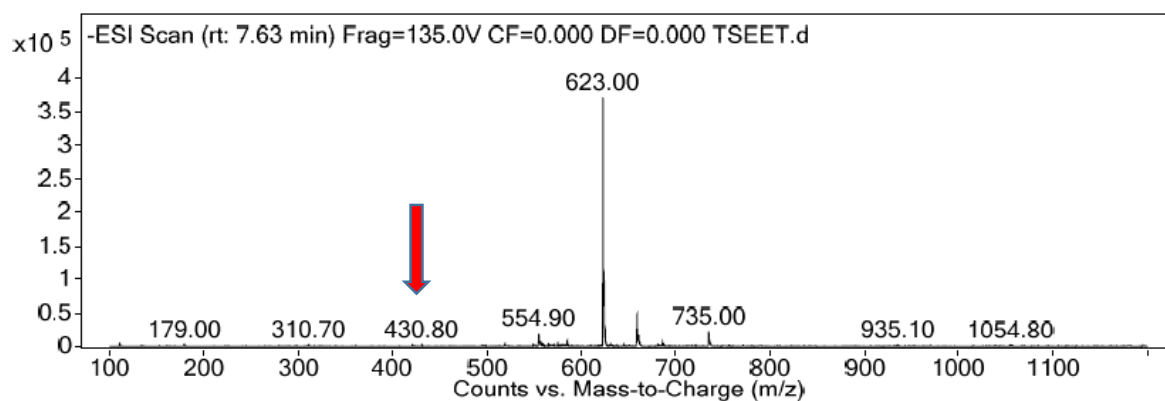


Figura 38: Espectro do extrato etanólico de *T. serratifolia* obtido em CLAE-EM

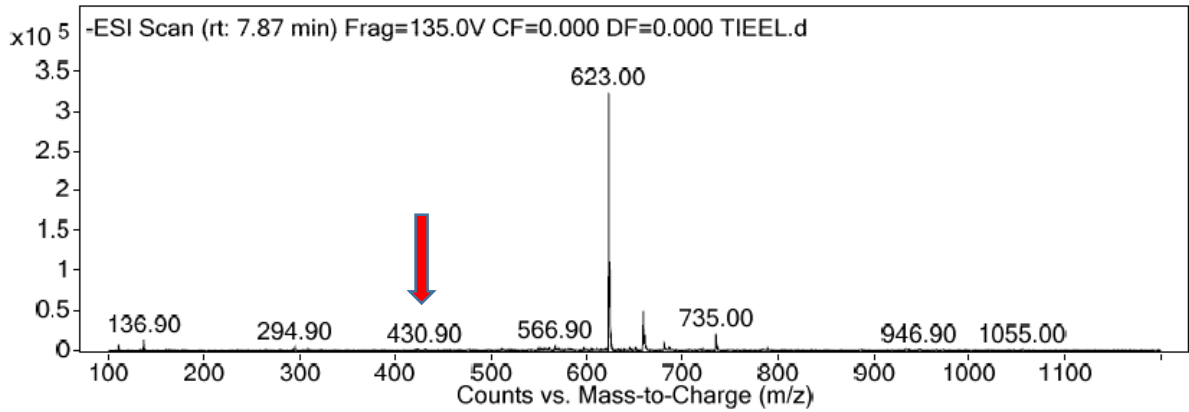


Figura 39: Espectro do extrato etanólico de *T. incana* obtido em CLAE-EM

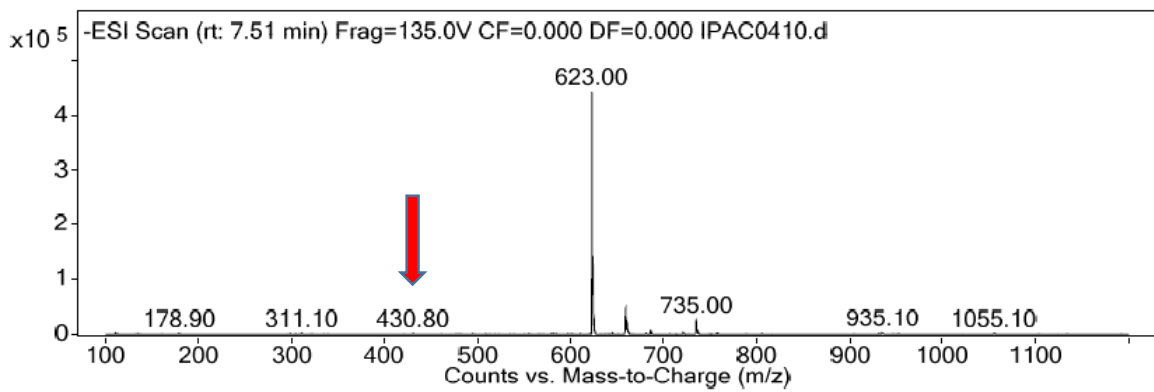


Figura 40: Espectro da fração acetato de etila de *T. incana* obtido em CLAE-EM

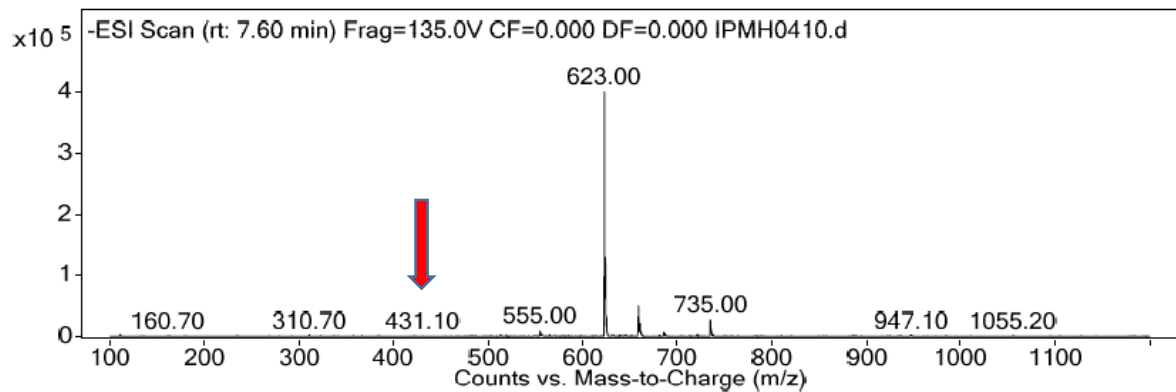


Figura 41: Espectro da fração MeOH/H₂O de *T. incana* obtido em CLAE-EM

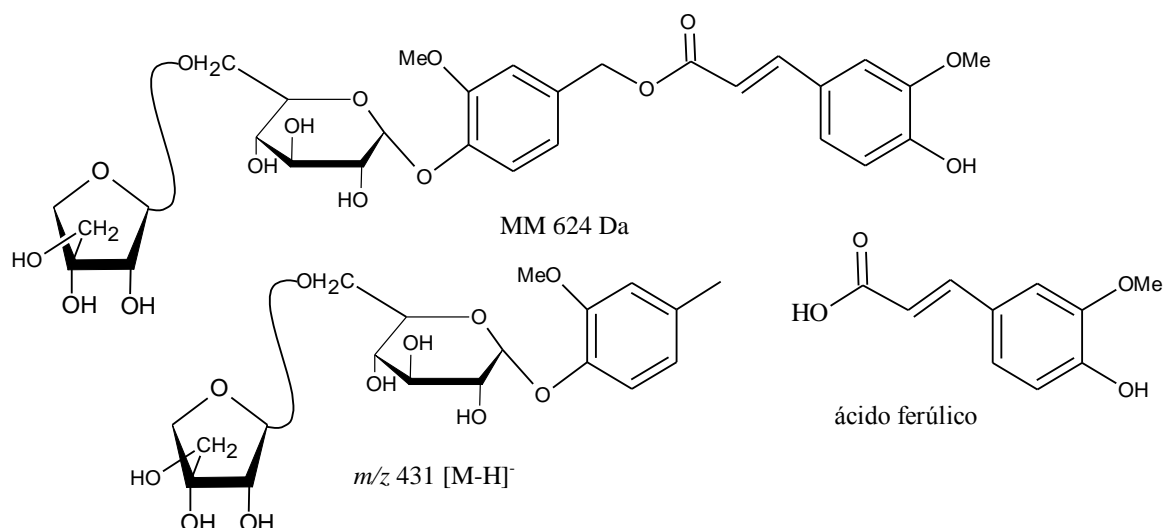


Figura 42: Fenilpropanoide com MM 624 u e formação de sinal em m/z 431]M-H]⁻

Os sinais m/z 477 [M-H]⁻ e m/z 567 [M-H]⁻ são observados nos espectros dos extratos etanólicos e frações acetato de etila e MeOH/H₂O de *T. incana* e *T. serratifolia* (figura 43 a 48) e extrato bruto da amostra comercial (figura 49). Esses sinais podem ser íons dos fenólicos glicosilados MM 478 Da (figura 50; 3,4,5-trimetóxi-fenil 1-*O*-β-D-apiofuranosil-(1→6)- β-D-glicopiranoose) e MM 568 Da (figura 50; 3,4-dimetóxi-fenil 1-*O*-β-D-[5-*O*-(4-metóxi-benzoil)]-apiofuranosil-(1→6)- β-D-glicopiranoose) descritos, respectivamente, em Warashina et al. (2006) e Warashina et al. (2004). Esses fenólicos apresentam estruturas moleculares com *D*-glicose e apiofuranose ligados a benzoíla *para* hidroxilada e aromático metoxilado. Nos espectros das frações acetato de etila de *T. serratifolia* e *T. incana* (figura 43 e 45), MeOH/H₂O de *T. serratifolia* (figura 44) e extratos brutos de *T. serratifolia* e amostra comercial (figura 48 e 49) observa-se sinal em m/z 1135 [M-H]⁻ que pode ser resultado de dimerização.

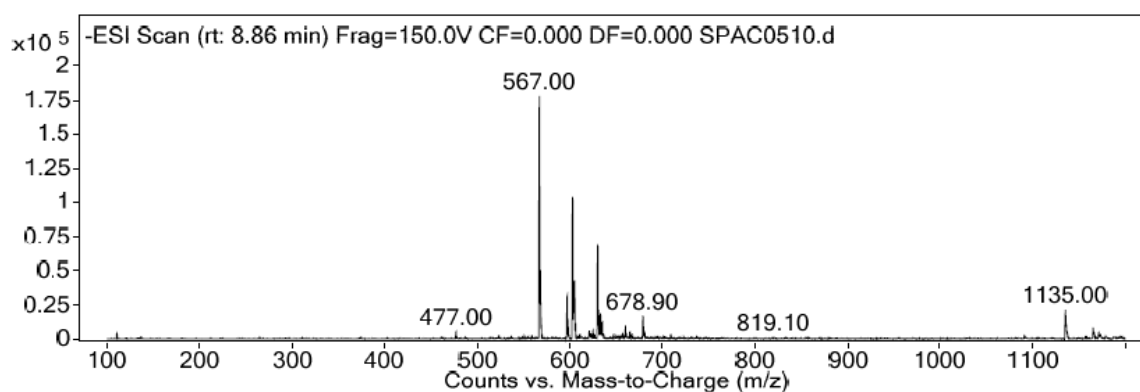


Figura 43: Espectro da fração acetato de etila de *T. serratifolia* obtido em CLAE-EM

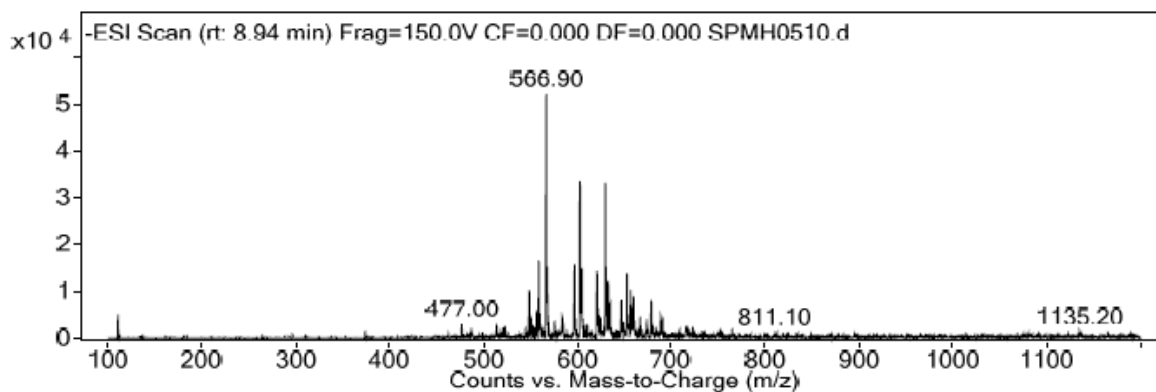
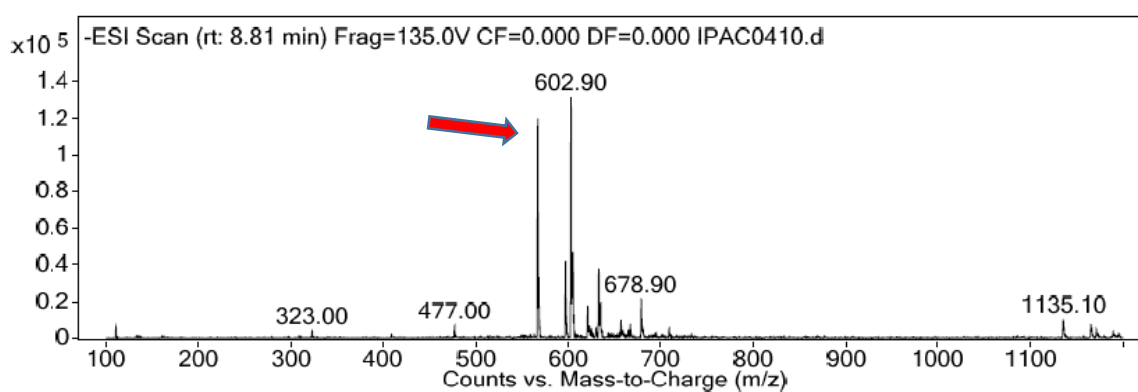


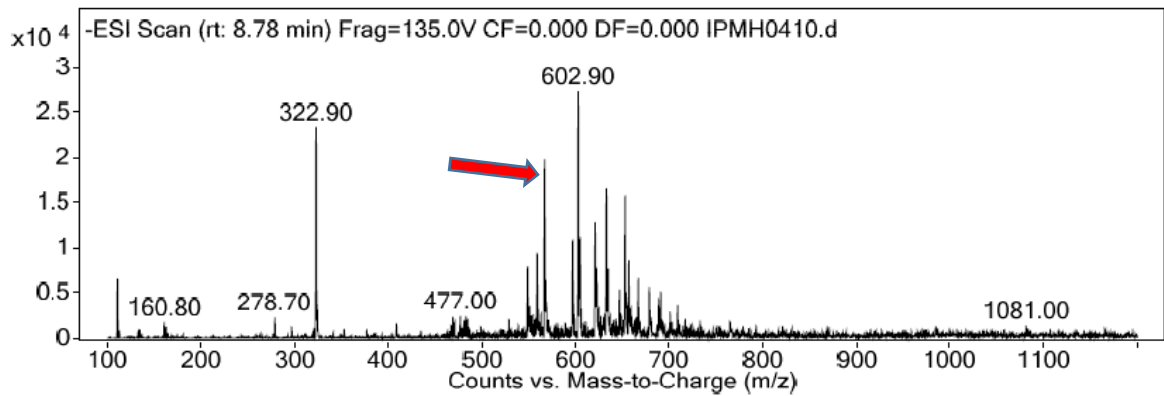
Figura 44: Espectro da fração MeOH/H₂O de *T. serratifolia* obtido em CLAE-EM



Peak List

<i>m/z</i>	<i>z</i>	Abund
567		119852.43
567.9	1	33418.3
596.9	1	42139.38
602.9	1	131687.98
603.9	1	37163.12
604.9	1	46955.84
621	1	17604.06
632.9	1	37896.22
635		19717.5
678.9	1	21222.7

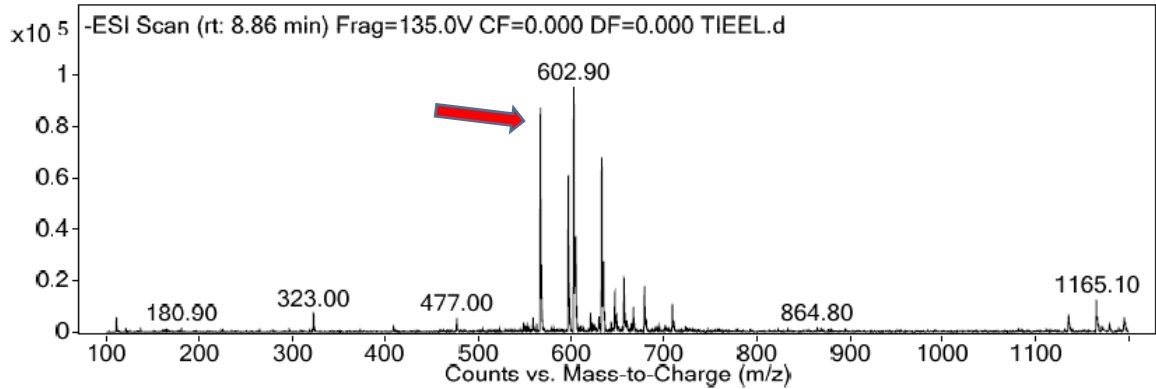
Figura 45: Espectro da fração acetato de etila de *T. incana* obtido em CLAE-EM com Peak List



Peak List

m/z	z	Abund
322.9	1	23407.52
558.9	1	9458.12
567	1	19836.92
596.9		10791.08
602.9		27370.3
604.9	1	11222.18
620.9		12871.32
632.9	1	16617.76
653.1		15827.74
656.9		8622.38

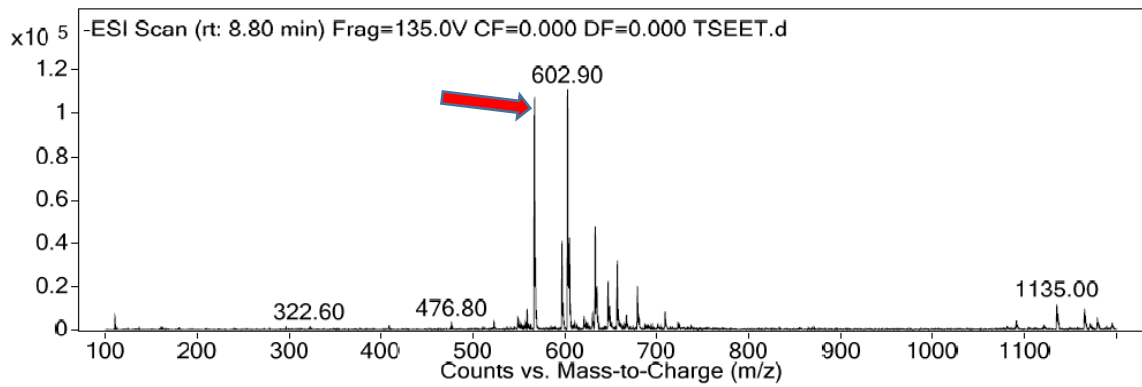
Figura 46: Espectro da fração MeOH/H₂O de *T. incana* obtido em CLAE-EM com Peak List



Peak List

m/z	z	Abund
566.9		87096.61
568		26187.56
596.9	1	61113.72
602.9	1	95261.09
603.9	1	29460.04
604.9	1	37298.62
632.9	1	67950.73
633.9	1	21005.32
635	1	27362.24
656.8		20772.18

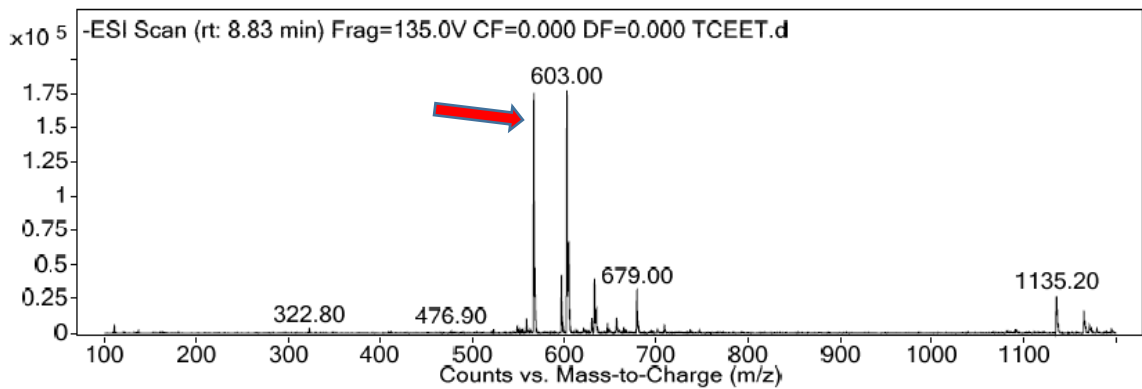
Figura 47: Espectro do extrato etanólico de *T. incana* obtido em CLAE-EM com Peak List



Peak List

<i>m/z</i>	<i>z</i>	Abund
567		107446.23
567.9		33289.9
597	1	40916.78
602.9		110987.95
604		32700.58
604.9	1	42445.86

Figura 48: Espectro do extrato etanólico de *T. serratifolia* obtido em CLAE-EM com Peak List



Peak List

<i>m/z</i>	<i>z</i>	Abund
566.9		175409.81
568		47997.76
596.9		42640.24
603		177114.5
603.9		44830.34
604.9		67121.83
632.9	1	39801.94
679		31185.04
1135.2		27125.3
1136.1	1	17687.24

Figura 49: Espectro do extrato etanólico da amostra comercial obtido em CLAE-EM com Peak List

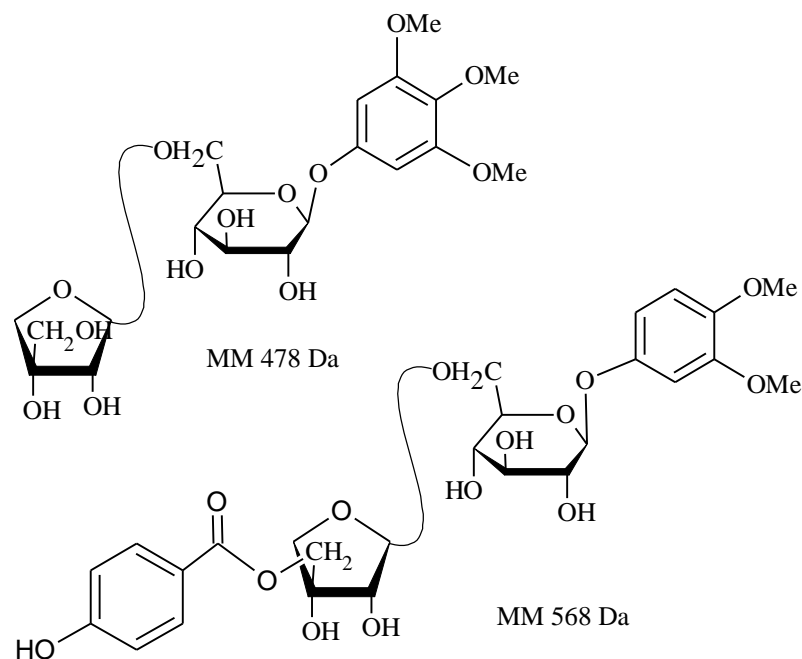


Figura 50: Estruturas moleculares de fenólicos glicosilados descrito em Warashina et al., 2004 e 2006

5.2 Análise das corridas realizadas em CCCAP e caracterização das frações obtidas em CCCAP e CCDP

5.2.1 Avaliação dos métodos de injeção e do rendimento das corridas em CCCAP

Nas 6 injeções de extrato etanólico de *T. incana* em CCCAP, foram utilizados 2954,0 mg de extrato. Após todas as injeções foram obtidos 2391,3 mg de frações entre fase móvel e expurgo da fase estacionária, totalizando rendimento de 80,94% (tabela 7).

Tabela 7: Massas e rendimentos das corridas

Corrida	Amostra (mg)	Frações (mg)	Rendimento (%)
1 ^a	500	465,7	93,14
2 ^a	500	332,6	66,52
3 ^a	500	486,2	97,24
4 ^a	384	339,5	88,41
5 ^a	500	311,1	62,22
6 ^a	570	456,2	80,03

5.2.2 Avaliação dos sistemas de solventes e modo de injeção utilizados

Após a análise dos espectros obtidos em CLAE-EM, a escolha dos sistemas de solventes e métodos de injeção a serem utilizados nas corridas em CCCAP foi direcionada para a separação de compostos glicosilados em especial iridoides. Segundo Leitão e Costa (2012), sistemas com proporções variadas de acetato de etila, butanol e água são os mais utilizados para isolamento de compostos glicosilados e com alta polaridade.

As injeções realizadas em modo gradiente (a partir da 3ª até a 6ª corrida) proporcionaram 109 frações. Algumas dessas frações apresentaram características semelhantes, como Rf em torno de 0,55 e coloração vermelho escuro (figura 51). Na 3ª corrida, também se observou a fração MP3.6, que foi enviada para análise em EM (figura 53) e RMN (figuras 61, 62 e 63).

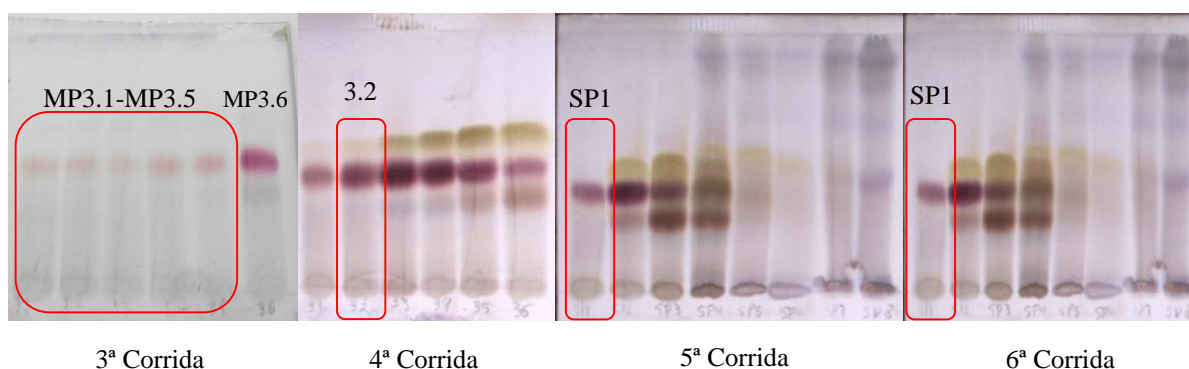


Figura 51: Cromatoplas das frações obtidas em CCCAP reveladas em vanilina sulfúrica

5.2.3 Análise em CCDP das frações obtidas em CCCAP

Após a aplicação da amostra SPAC2 e eluição na cromatoplasca de CCDP, foram obtidas 10 frações que totalizaram 38,7 mg. O rendimento foi calculado em 92,58%.

Durante os testes de sistemas de eluição realizados por meio de CCD, observou-se as cromatoplascas não ativadas apresentaram melhor separação dos componentes da amostra SPAC2 e por esse motivo optou-se por realizar a eluição em CCDP em cromatoplascas não ativada. Essa característica de separação mais efetiva em cromatoplasca não ativada, ou seja cromatoplasca com maior quantidade de água, pode ser um indicativo da presença de componentes de alta polaridade no amostra SPAC2.

O perfil das frações foi observado em cromatoplacas de sílica gel 60 reveladas com vanilina sulfúrica (figura 52). As frações B, C e E apresentaram Rf entre 0,4 e 0,5 e coloração avermelhada (figura 52). A amostras E foi encaminhada para análise em EM e RMN.

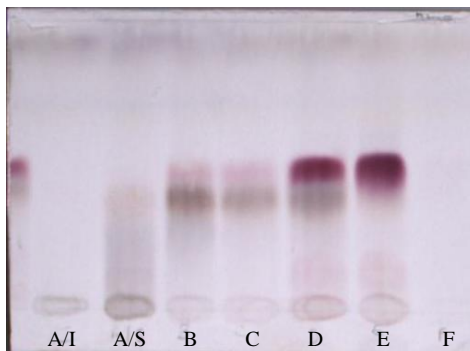


Figura 52: Cromatoplaca das frações de CCDP revelada em vanilina sulfúrica

5.3 Avaliação das amostras obtidas em CCCAP e CCDP por meio de espectros de EM e RMN

5.3.1 Amostra MP3.6

5.3.1.1 Espectros de EM

A amostra MP3.6 foi obtida na 3ª corrida realizada em CCCAP, coletada na terceira fase móvel (sistema EBWats 2 – tabela 2) e submetida à análise em EM com ionização por ESI.

Assim como nos espectros de CLAE-EM, o espectro da amostra MP3.6 (figura 53) apresentou íon em m/z 623 $[M-H]^-$ que pode ser resultado da ionização de fenilpropanoide com MM 624 Da (figura 37). Segundo descrito em Warashina et al. (2006), esse fenilpropanoide é produto da hidrólise alcalina de fenilpropanoide de MM 788 Da (figura 37). No espectro da figura 53 é observado sinal em m/z 787 que pode ser ion obtidos da molécula de MM 788 Da. É possível indicar que os sinais em m/z 623 e m/z 787 sejam íons de 788 Da, assim como não se descarta a presença de molécula com MM 624 Da na amostra MP3.6. Para o sinal em m/z 647 $[M-H]^-$ (figura 53) indica-se que esse pode ser resultado da ionização do ácido trigaloilquínico que possuem MM 648 Da.

O sinal em m/z 657 $[M-H]^-$ (figura 53) pode ser resultado da ionização de lignana glicosilada de MM 658 Da (4-metóxi-benzoil 4- O - β -D-glicopiranosose secoisolariciresinol) descrita em Warashina, et al. (2004). O sinal em m/z 687 observado em expansão do espectro da amostra MP3.6 (figura 54) pode ser íon de lignana de MM 688 Da (3,4-dimetóxi-benzoil 4- O - β -D-glicopiranosose secoisolariciresinol) também descrita em Warashina, et al. (2004). Essas lignanas foram isoladas do extrato metanólico das cascas de *T. impetiginosa* e suas estruturas moleculares apresentam porção secoisolariciresinol e porção éster aromática metoxilada (figura 55). Pode-se sugerir que os íons em m/z 657 e m/z 687 sejam resultados da ionização da molécula com MM 688 Da (figura 55), como também espera-se a presença da lignana de MM 658 Da (figura 55).

3_6 #10 RT: 0,18 AV: 1 NL: 3,13E3
T: ITMS - c ESI Full ms [150,00-1000,00]

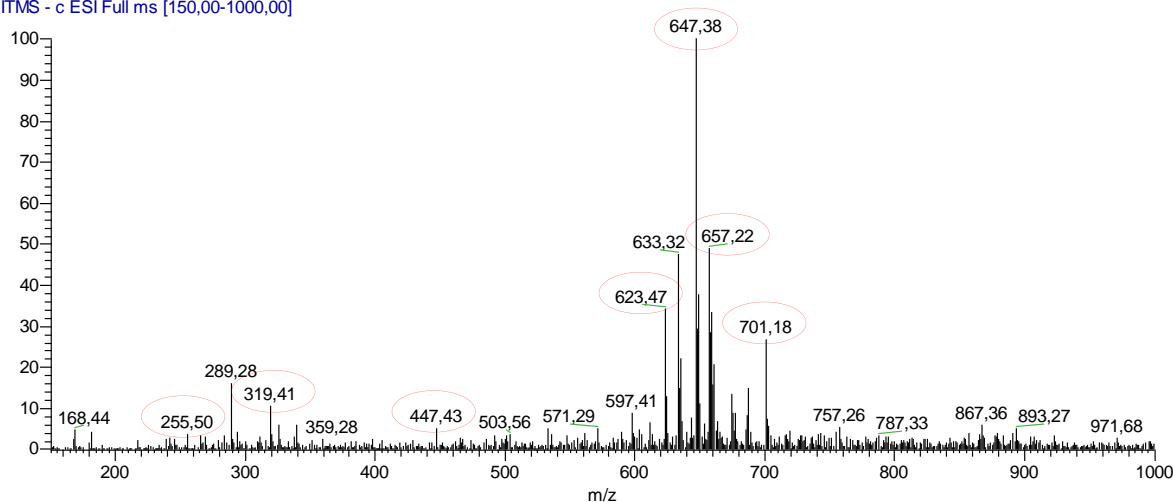


Figura 53: Espectro de massas da amostra MP3.6

3_6 #10 RT: 0,18 AV: 1 NL: 8,33E2
T: ITMS - c ESI Full ms [150,00-1000,00]

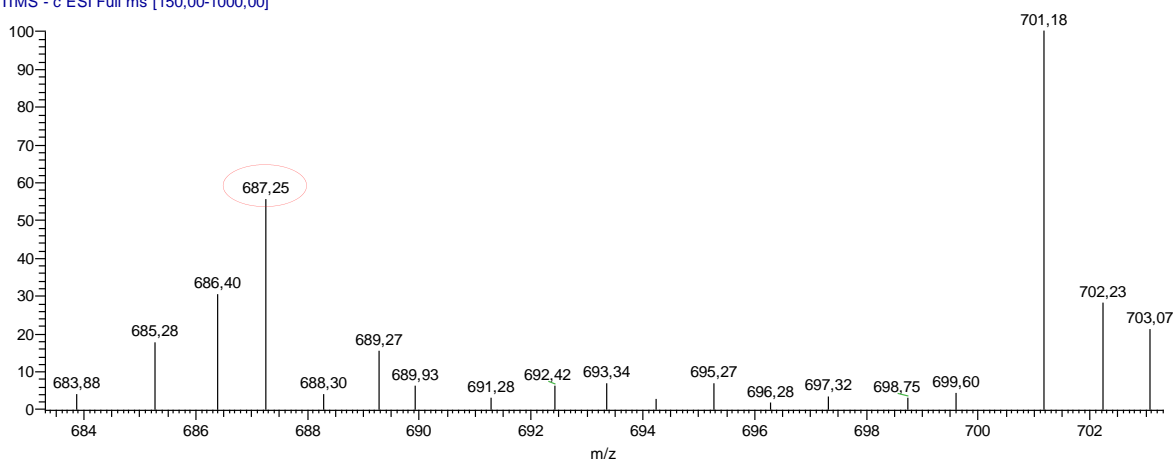


Figura 54: Espectro de massas expandido da amostra MP3.6 com sinal em m/z 687 $[M-H]^-$

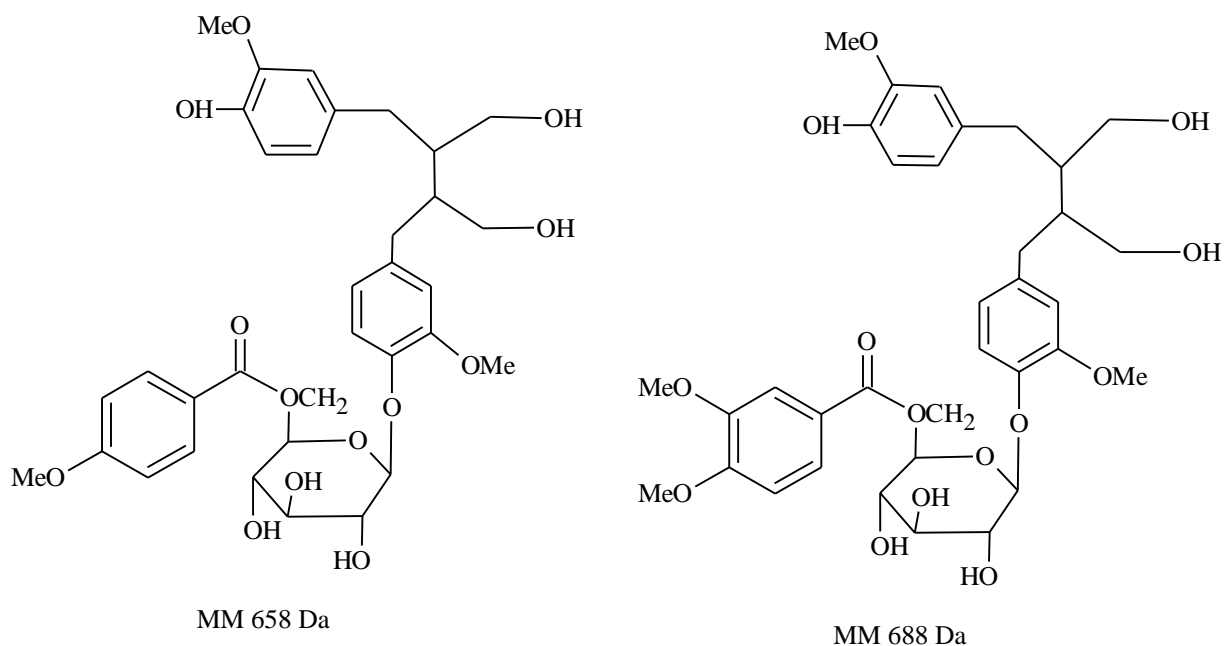


Figura 55: Estruturas moleculares de lignanas descritas em Warashina et al., 2004

Os íons em m/z 447 $[M-H]^-$ e m/z 701 $[M-H]^-$ (figura 53) podem ser resultado da ionização de fenólicos glicosilados de MM 448 e 702 Da descritos em Warashina et al. (2005 e 2006). Segundo Warashina et al. (2006), do extrato metanólico das cascas de *T. impetiginosa* foi isolado fenólico glicosilado de MM 702 Da (4-[[4-metóxi-benzoil) oximetil]-2-metóxi-fenil 1-*O*- β -D[5-*O*-(4-hidróxi-benzoil)]-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopirranose) (figura 56). A molécula com MM 448 Da (4-hidróxi-metil-2-metóxi-fenil 1-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopirranose) (figura 56) é descrita em Warashina et al. (2005) como um fenólico glicosilado isolado das cascas de *T. impetiginosa*. A estrutura molecular descrita para o fenólico de MM 702 Da permite indicar ionização com perda de ésteres aromáticos e obtenção dos sinais em m/z 447 e m/z 567 Da (figuras 53 e 57). As estruturas moleculares esperadas após a ionização são compatíveis com fenólicos glicosilados de MM 448 e 568 Da (568 Da - Warashina et al. (2006)) (figura 56). Em Warashina et al. (2006) é descrito outro fenólico glicosilado de MM 732 Da (4-[[3,4-dimetóxi-benzoil)oxi]metil]-2-metóxi-fenil 1-*O*- β -D[5-*O*-94-hidróxi-benzoil0]-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopirranose) que difere da molécula com MM 702 Da apenas na porção benzoíla dimetoxilada (figura 56).

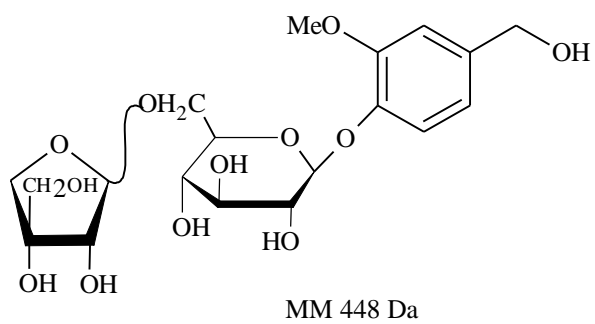
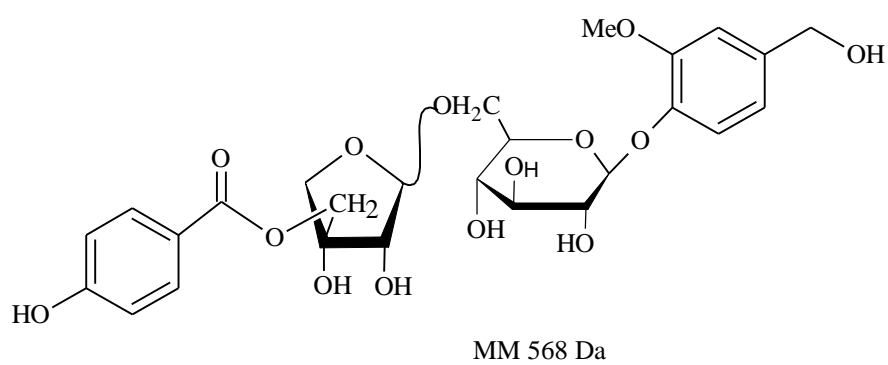
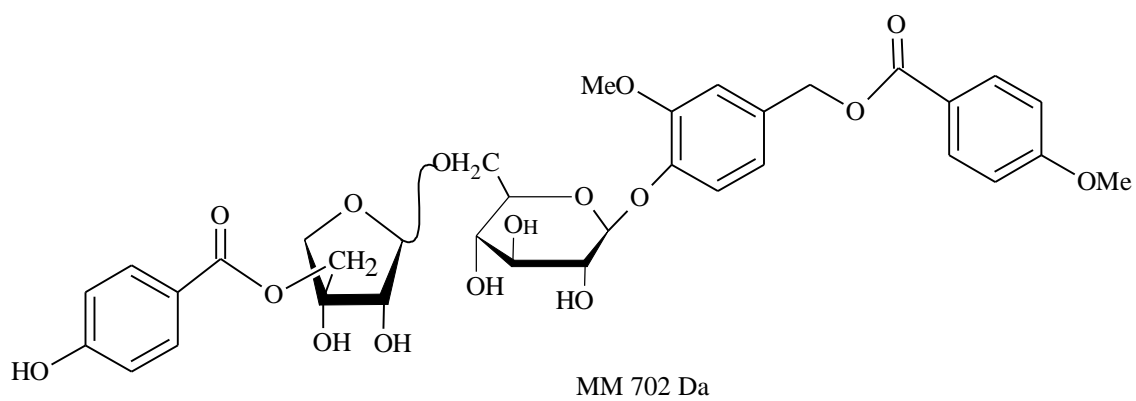
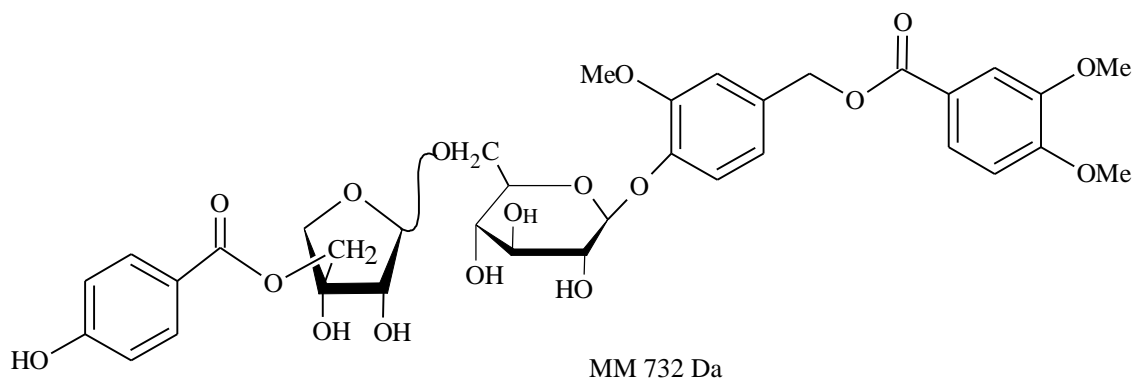


Figura 56: Estruturas moleculares de fenólicos glicosilados descritos em Warashina et al., 2005 e 2006

3_6 #10 RT: 0,18 AV: 1 NL: 1,57E2
T: ITMS - c ESI Full ms [150,00-1000,00]

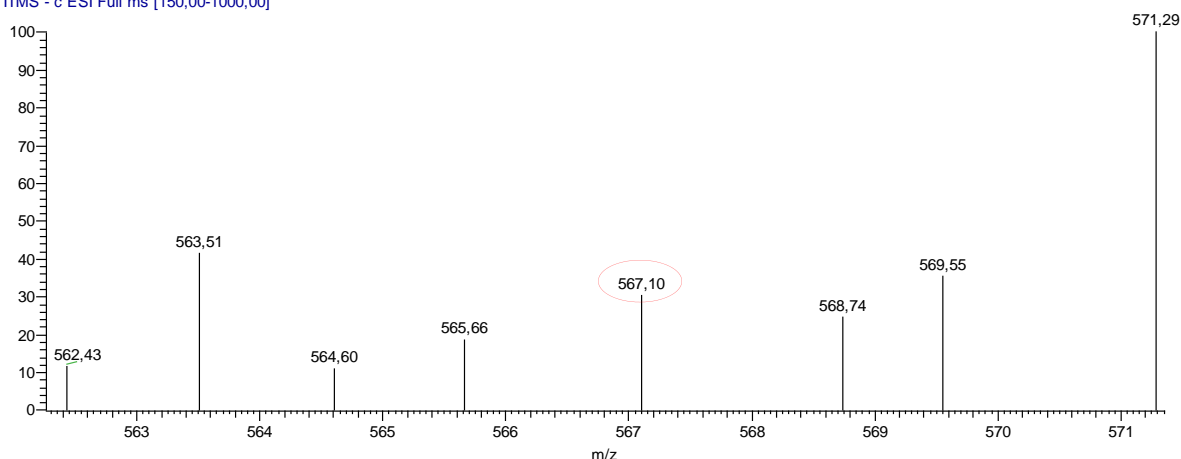


Figura 57: Espectro de massas expandido da amostra MP3.6 com sinal em m/z 567 $[M-H]^-$

O sinal em m/z 319 $[M-H]^-$ (figura 53) pode corresponder a íon obtido da molécula com MM 320 Da descrita em Guiso et al. (1996). Segundo os autores, do extrato etanólico das flores de *Tecoma capensis* foi isolado feniletanoide glicosilado Rengiosídeo B (figura 58).

O íon em m/z 255 $[M-H]^-$ (figura 53) pode ser resultado da ionização de uma *para*-furanonaftoquinona descrita em Sichaem et al. (2012). Segundo os autores, a partir extrato acetona das raízes de *T. rosea*, foi isolada furanonaftoquinona de MM 256 Da (2-(1'-metil-etil)-5-hidróxi-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona) (figura 58). Sua estrutura foi identificada como derivado da α -lapachona hidroxilada (5-hidróxi-desidro-iso- α -lapachona) (figura 58). As furanonaftoquinonas são estruturas facilmente encontradas nos extratos hexano ou acetato de etila de espécies de *Tabebuia* e Bignoniaceae.

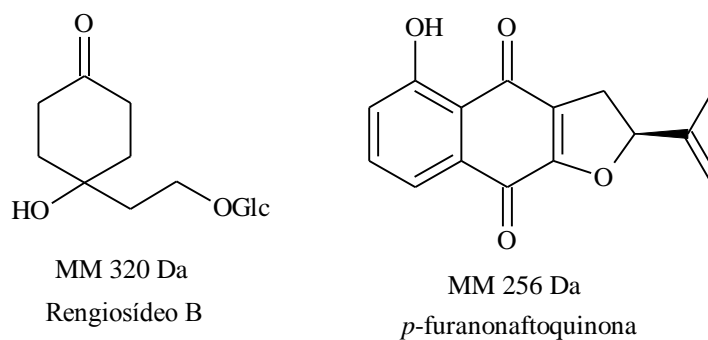


Figura 58: Estrutura moleculares de feniletanoide e α -lapachona

O íon em m/z 515 $[M-H]^-$ (figura 60) pode ser o fragmento de um iridoide de MM 516 Da (6-*O*-(3,4-dimetóxi-benzoil)-crescentina IV 3-*O*- β -D-glicopiranosídeo) (figura 59), assim como o íon em m/z 485 $[M-H]^-$ pode ser resultado da ionização de um iridoide de MM 486 Da (6-*O*-(4-dimetóxi-benzoil)-crescentina IV 3-*O*- β -D-glicopiranosídeo) (figura 59) observados em expansão do espectro (figura 60). Segundo Warashina et al. (2005), esses dois iridoídes têm estruturas moleculares formadas por crescentina IV (figura 59) e diferenciam-se apenas pela quantidade de metoxilas presentes em suas porções ésteres aromáticos metoxilados (figura 59).

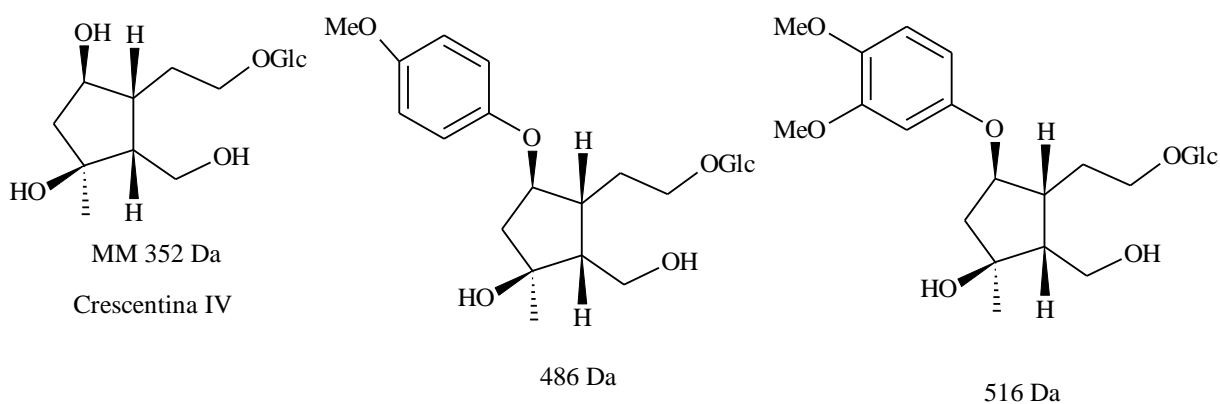


Figura 59: Iridoídes descritos em Warashina et al., 2005

3_6 #10 RT: 0,18 AV: 1 NL: 1,17E2
T: ITMS - c ESI Full ms [150,00-1000,00]

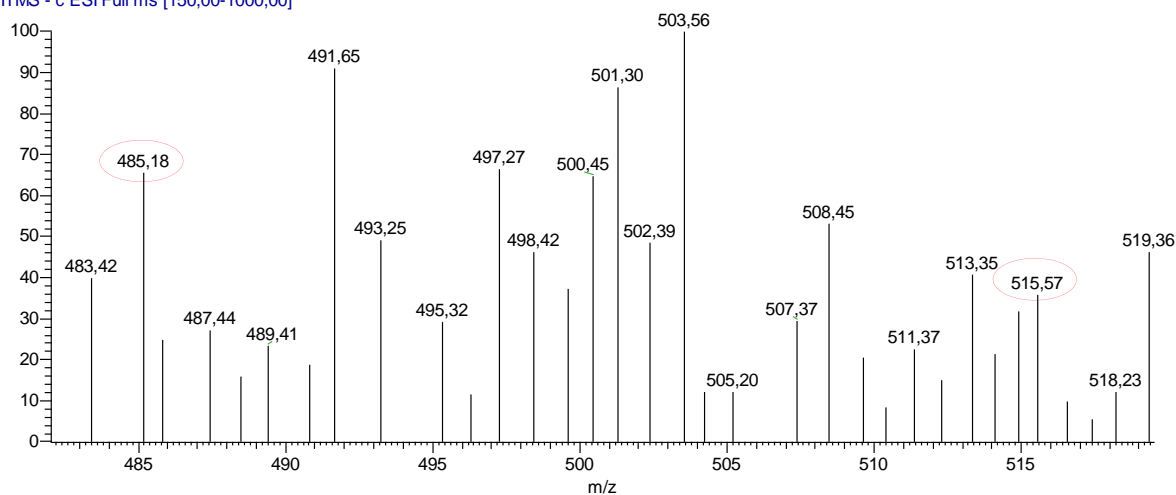


Figura 60: Espectro de massas expandido da amostra MP3.6 com sinal em m/z 485 $[M-H]^-$ e m/z 515 $[M-H]^-$

5.3.1.2 Espectros de RMN

A amostra também foi submetida à espectrometria de RMN com análise dos núcleos 1H (figura 61) e acoplamentos heteronucleares HSQC (figura 62) e HMBC (figura 63).

Para iridoides observa-se sinais no espectro de RMN ^1H (figura 65) característico de H-5 (figura 64). Segundo Warashina et al. (2004) para esse hidrogênio espera-se multipletos. Para H-9 (figura 64) sugere-se dois sinais duplos entre 3,554 e 3,534 ppm com $J= 9,79$ e $0,98$ Hz (figura 66). Para H-1 (figura 64) é indicado sinal em 5,01 ppm (figura 67). Os sinais entre 1,407 a 1,160 ppm (s) (figura 68) podem ser característicos de metilas presentes em ajugol (H-10 - figura 64). No espectro de HSQC observa-se sinal 5,02 ppm (5,02 /110,75 ppm) correlacionado com H-4 (figuras 64 e 69). O sinal 3,9/56,56 ppm presente em HMBC (figura 70) é compatível com H-5 e 9 (figura 64) e o sinal em 5,02/75,12 ppm é compatível para H-4 e 8 (figura 64). Esses sinais são semelhantes a sinais descritos iridoides isolados das cascas de *T. impetiginosa* relatados em Warashina et al. (2004 e 2005) e Iwagawa et al. (1991).

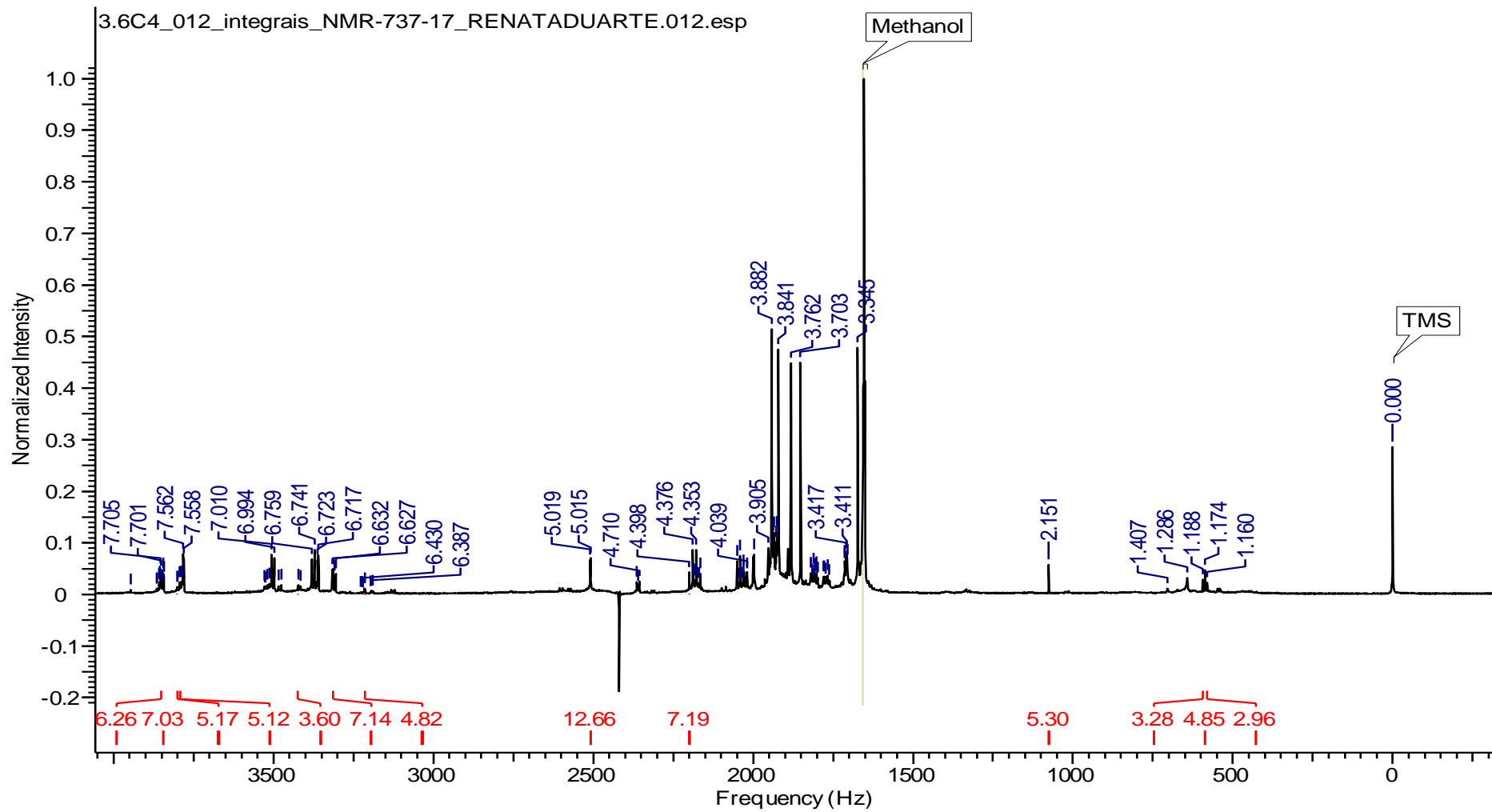


Figura 61: Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra MP3.6

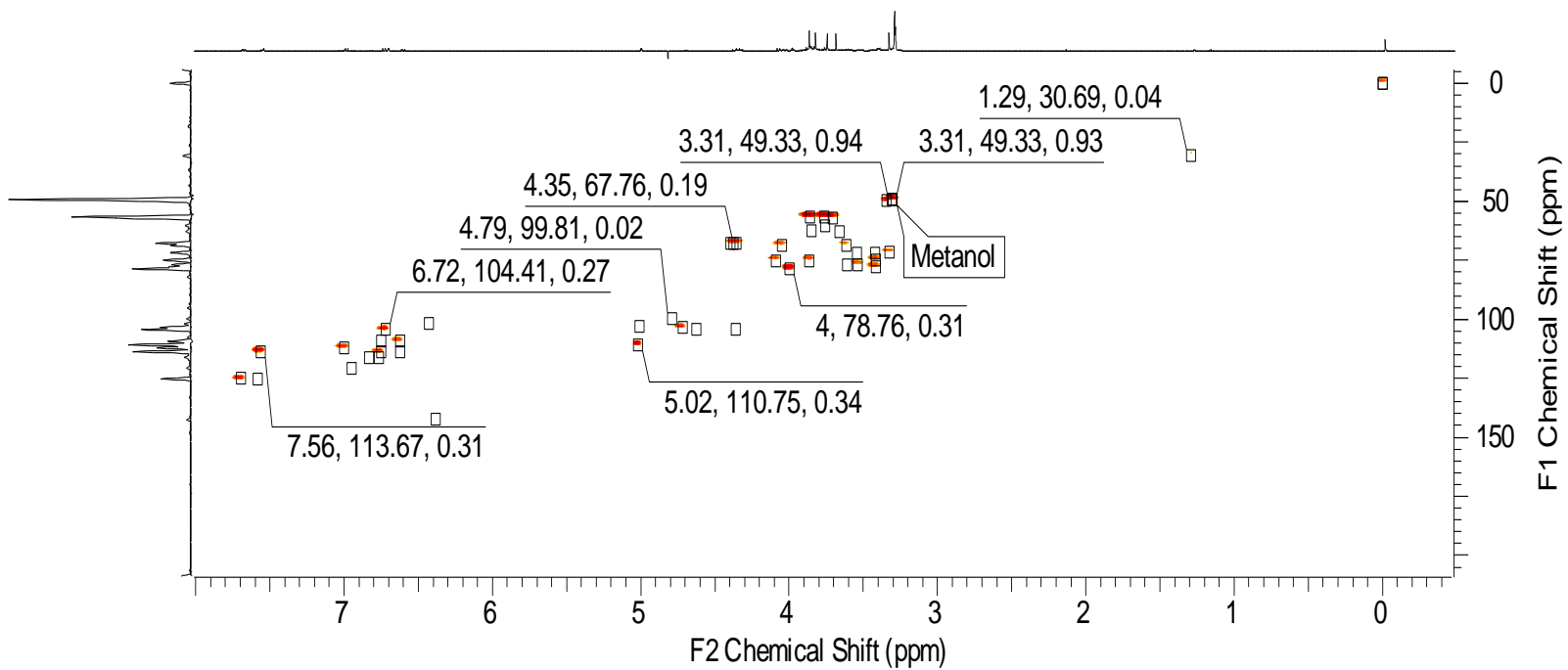


Figura 62: Mapa de correlação HSBC da amostra MP3.6

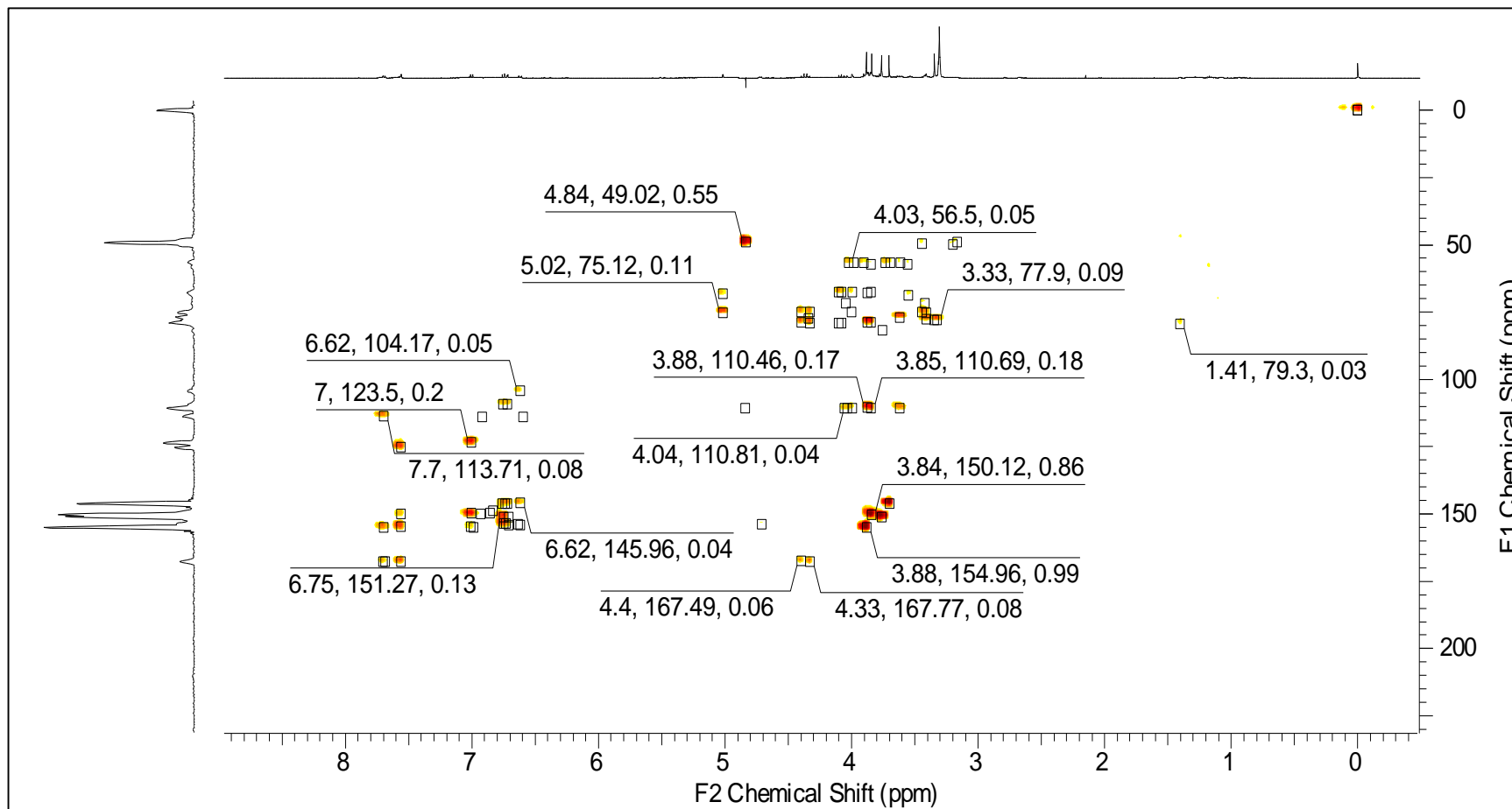


Figura 63: Mapa de correlação HMQC da amostra MP3.6

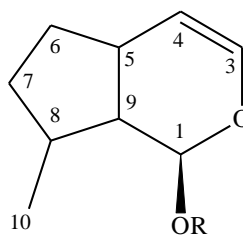


Figura 64: Estrutura de iridoide

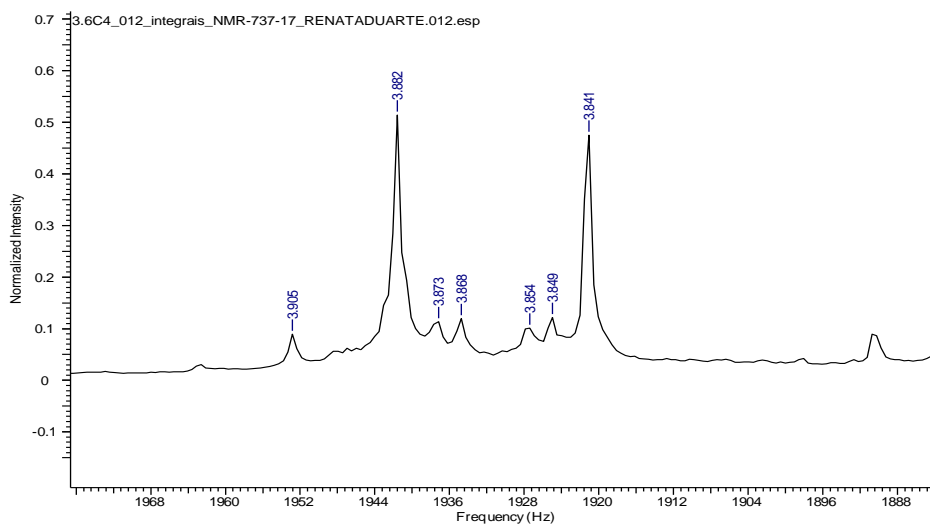


Figura 65: Expansão do RMN de ¹H indicativo de H-5

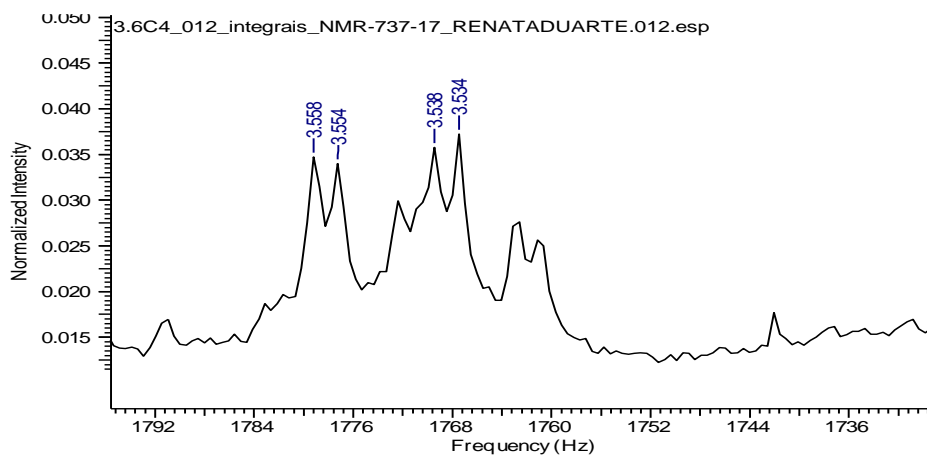


Figura 66: Expansão do RMN de ¹H indicativo de H-9

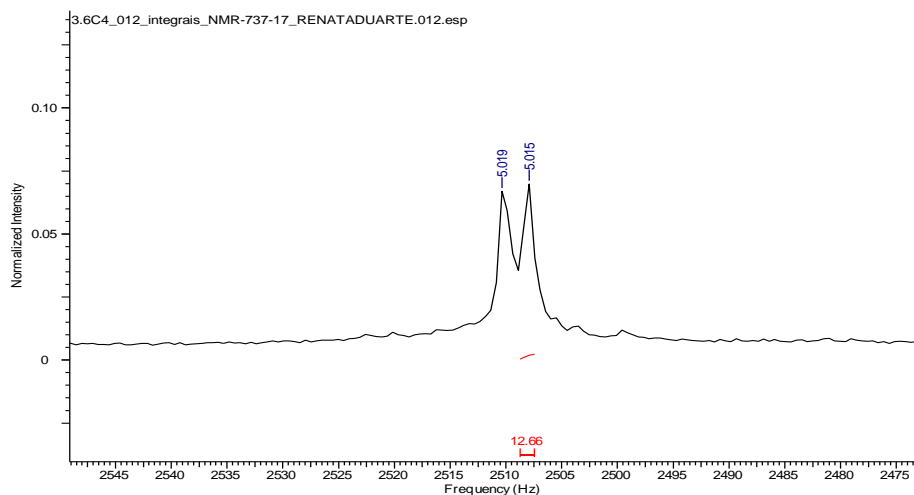


Figura 67: Expansão do RMN de ^1H indicativo de H-1

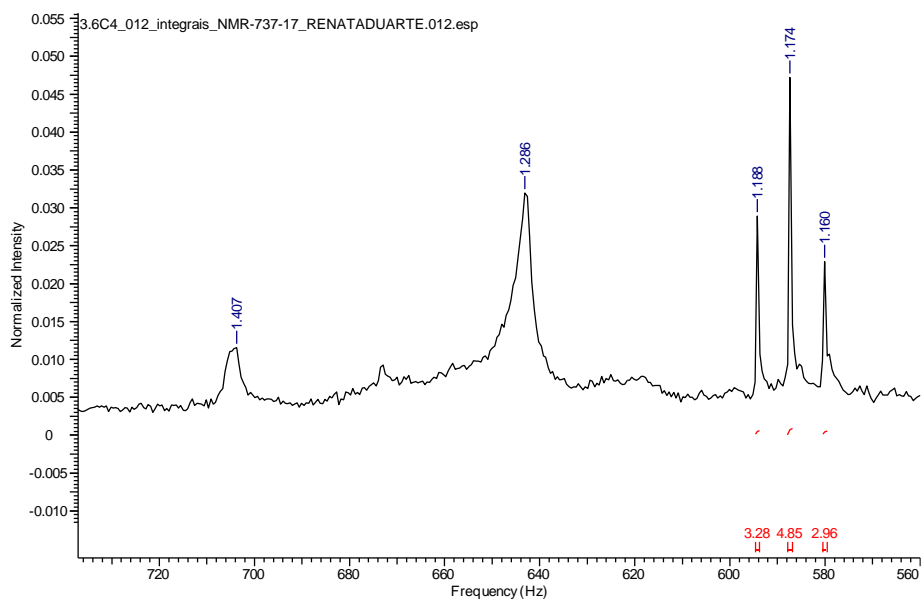


Figura 68: Expansão do RMN de ^1H indicativo de H-10

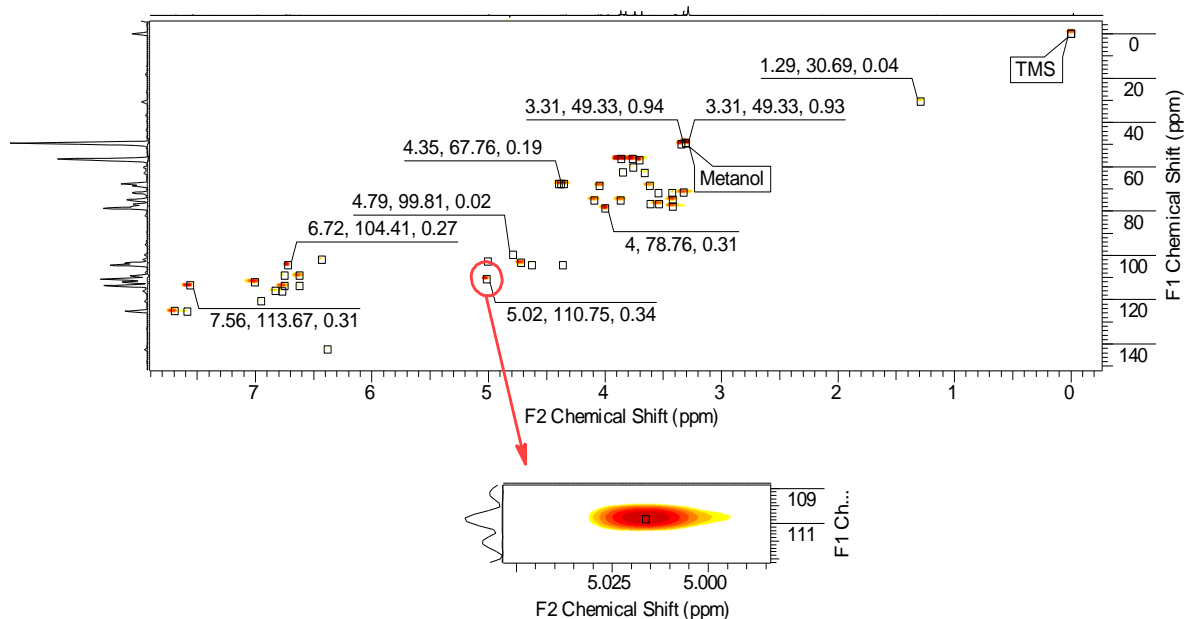


Figura 69: Mapa de correlação HSQC sinal para H-4

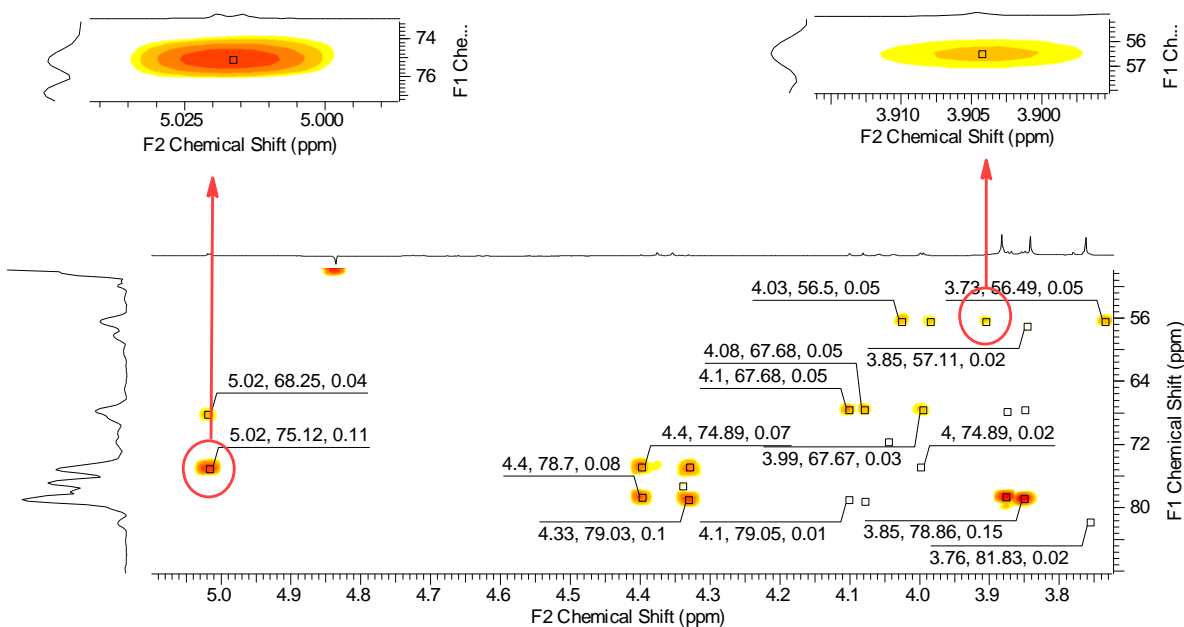


Figura 70: Mapa de correlação HMBC sinal para H-5 e 9 / H-4 e 8

Em HSQC foram observados sinais indicativos de apiofuranose e glicose (tabela 8). Em HMBC a correlação 4,05/110,81 nos permite sugerir ligação 1→6 (apiofuranose → glicose) presente em fenólicos glicosilados (figura 50) e fenilpropanoides (figura 37). Esses sinais são compatíveis com os descritos em Warashina et al. (2006).

Tabela 8: Sinais de HSQC de fenilpropanoide de MM 624 u (Warashina et al.,2006) e da amostra MP3.6.

Fenilpropanoide 624 Da		Amostra MP3.6 (HSQC)
Warashina et al. (2006)		
β -D-glicose		
	$^1\text{H} / ^{13}\text{C}$	$^1\text{H} / ^{13}\text{C}$
(1)	4,83 / 102,8 ppm	(1) 4,72 / 103,45 ppm
(2)	3,5 / 74,9 ppm	(2) 3,54 / 76,99 ppm
(3)	3,44 / 78,0 ppm	(3) 3,42 / 77,09 ppm
(4)	4,0 / 71,9 ppm	(4) 4,04 / 71,68 ppm
(5)	3,57 / 77,0 ppm	(5) 3,54 / 76,99 ppm
(6)	3,60 e 4,04 / 69,0 ppm	(6) 3,61 e 4,05 / 68,56 ppm
β -D-apiofuranose		
	$^1\text{H} / ^{13}\text{C}$	$^1\text{H} / ^{13}\text{C}$
(1)	5,0 / 111,0 ppm	(1) 5,02 / 110,75 ppm
(2)	4,0 / 78,70 ppm	(2) 4,0 / 78,76 ppm
(4)	3,86 / 75,10 ppm	(4) 3,86 / 75,17 ppm
(5)	4,02 / 67,60 ppm	(5) 4,05 / 68,56 ppm

Os sinais 3,762 e 3,703 ppm (s) (figura 71) podem indicar metoxilas presentes nas porções éster aromáticas de iridoide (figuras 27, 32, 33 e 59), fenilpropanoides (figura 37) e fenólicos glicosilados (figura 50) e lignanas (figura 55). A região entre 7,729 e 7,558 ppm pode corresponder aos aromáticos ligados a metoxilas (figura 72).

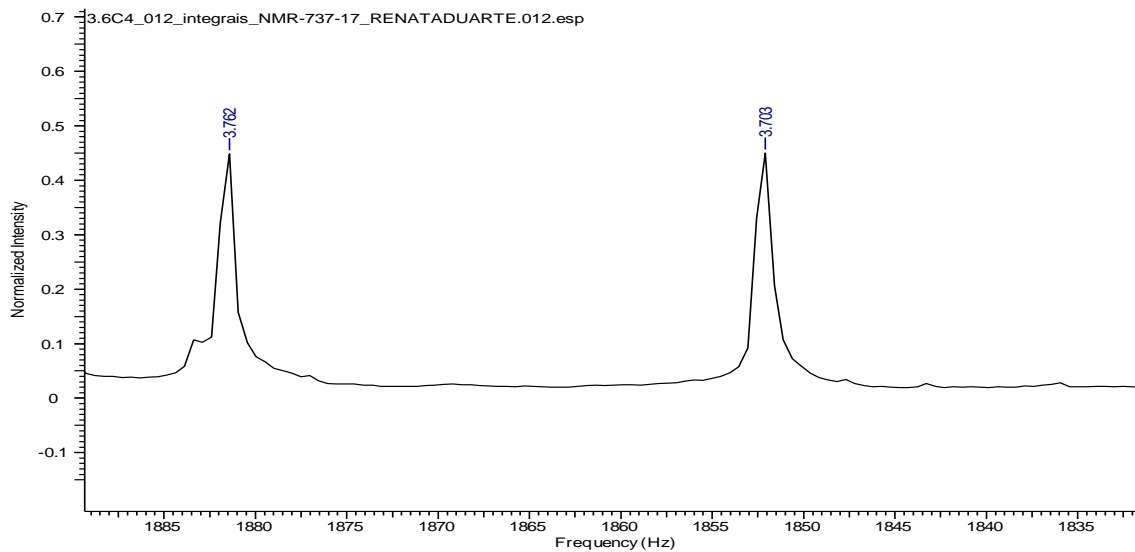


Figura 71: Espectro de RMN de ^1H com singletos indicativos de metoxilas

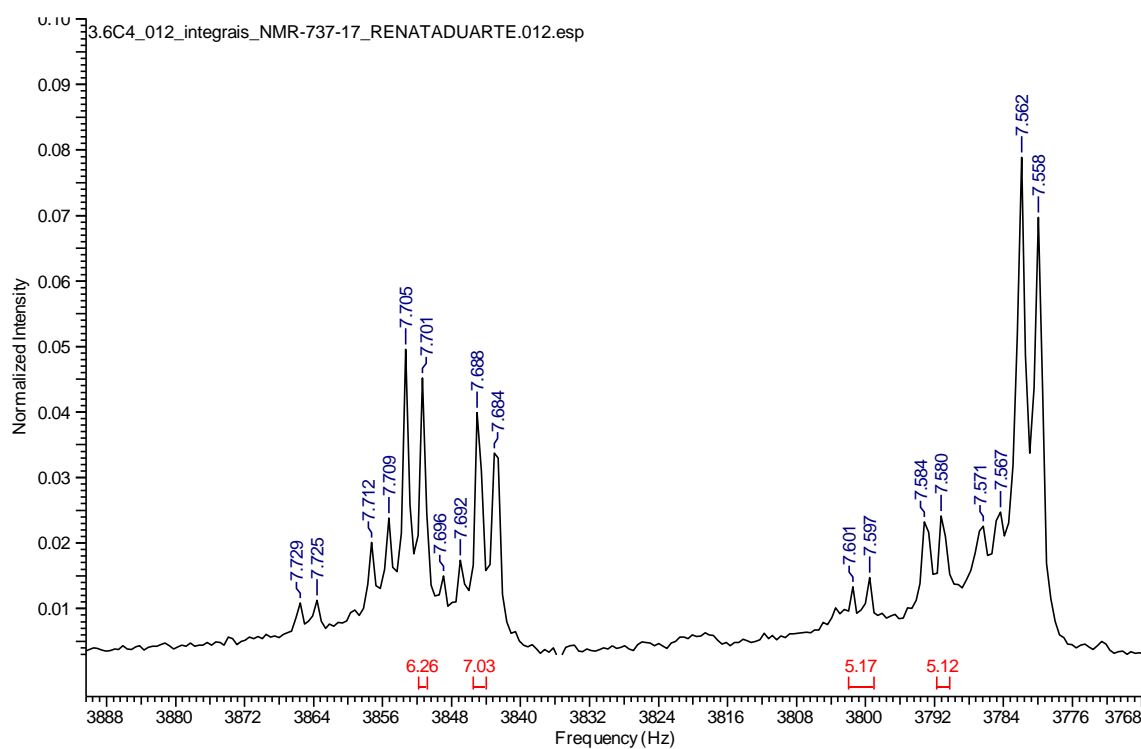


Figura 72: Espectro de RMN de ^1H com sinais na região de aromáticos

5.3.2 Amostra E

5.3.2.1 Espectros de EM

A amostra E foi submetida à análise em EM com ionização por ESI e seu espectro (figura 73) mostra sinais observados também na amostra MP3.6. Um desses sinais é o sinal em m/z 647 [M-H]⁻ que pode ser resultado da ionização do ácido trigaloilquínico que possuem MM 648 Da. Os sinais m/z 447 [M-H]⁻, 567 [M-H]⁻, 701 [M-H]⁻ e 731 [M-H]⁻ são registrados em intensidade muito menor que os sinais da amostra MP 3.6 e permanecem com a mesma proposta de fragmentação para os fenólicos glicosilados de MM 448, 568, 702 e 732 Da (figura 57). A mesma observação de baixa intensidade para os picos com sinais em m/z 351 [M-H]⁻, 485 [M-H]⁻ e 515 [M-H]⁻ referentes ao iridoide crescentina IV e seus ésteres (figura 59).

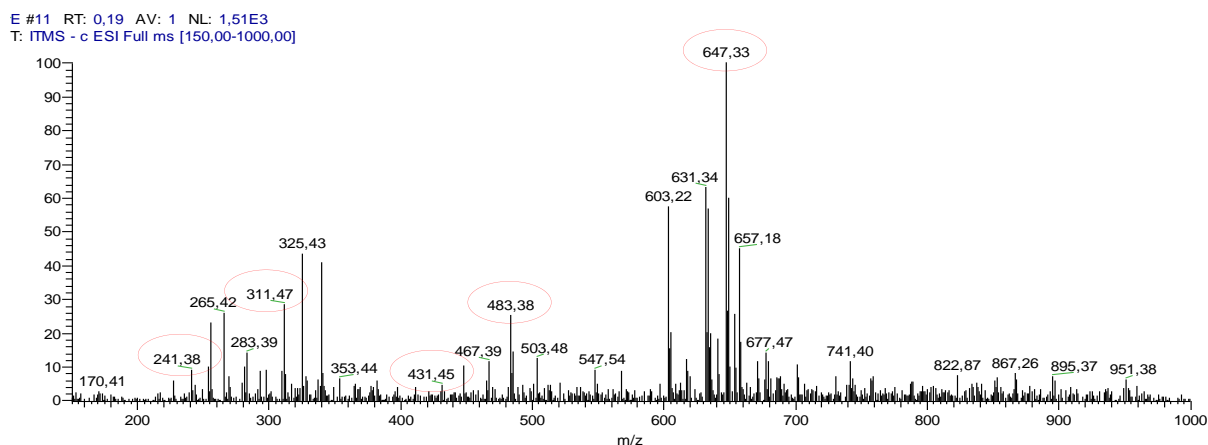


Figura 73: Espectros de massas da amostra E

Alguns sinais tiveram maior destaque no espectro da amostra E. Um deles é o sinal m/z 431[M-H]⁻ que também foi registrado nos espectros de CLAE-EM dos extratos de *T. incana* e *T. serratifolia* e frações acetato de etila e MeOH/H₂O de *T. incana* (figuras 38 a 41). Esse sinal foi indicado como resultado da ionização do fenilpropanoide de MM 624 Da juntamente com porção feruloíla (figura 42).

Quanto aos iridoides, observou-se o sinal em m/z 483 [M-H]⁻ (figura 73) como íon obtido de éster de bisdeoxicinanchosídeo com MM 484 Da (figura 27). Esse mesmo sinal foi

observado nos espectros de CLAE-EM dos extratos da amostra comercial e *T. serratifolia* (figuras 29 e 31).

O sinal em m/z 311 $[M-H]^-$ (figura 73) pode indicar íon diglicosídeo β -D-glicose e apiofuranose obtida da ionização de molécula com MM 312 Da (figura 74) presente nas estruturas de fenilpropanoides de MM 624 e 788 Da (figura 37), sinal em m/z 431 (figura 42) e fenólicos glicosilados de MM 478 e 568 Da (figura 50) e 732, 702, 568 e 448 Da (figura 56).

O sinal em m/z 241 $[M-H]^-$ (figura 73) sugere a presença de isômeros naftoquinonas lapachol, α -lapachona e β -lapachona (MM 242 Da) (figura 3) comumente encontrados em *Tabebuia*. Trata-se de isômeros com estruturas moleculares bastante diferenciadas e frequentemente isoladas a partir da extração com hexano e acetato de etila (Oliveira et al., 1993).

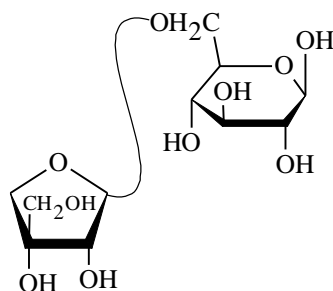


Figura 74: Estrutura molecular para ligação entre β -D-glicose e apiofuranose

5.3.2.2 Espectros de RMN

A amostra foi submetida à espectrometria de RMN com análise dos núcleos de 1H (figura 76) e acoplamentos heteronucleares HSQC (figura 77) e HMBC (figura 78).

O espectro de RMN 1H (figura 77) da amostra E apresenta sinais na região dos aromáticos e metoxilas. O perfil do espectro de RMN amostra E apresenta maior concentração de sinais quando comparado à amostra MP3.6. Essa diferença entre os perfis pode ser atribuída à técnica cromatográfica utilizada para obtenção das amostras. A amostra MP3.6 é fração obtida em CCCAP enquanto amostra E é oriunda de CCDP.

No mapa de correlação HSQC observa-se os sinais 3,76 a 3,84 ppm acoplados a 56,42 ppm (figura 75). Esse sinal pode corresponder a éster de bisdeoxicinanchosídeo (H-9 – figura 80), assim como os sinais duplos 6,63 e 6,62 ppm (dd 1,22 Hz; 6,37 ppm) (figura 79) podem indicar H-3 (figura 80) descritos em Iwagawa et al. (1991). O sinal 1,29/30,72 (figura 77) ppm pode indicar metoxila presente em ajugol e descrita em Nakano et al. (1993).

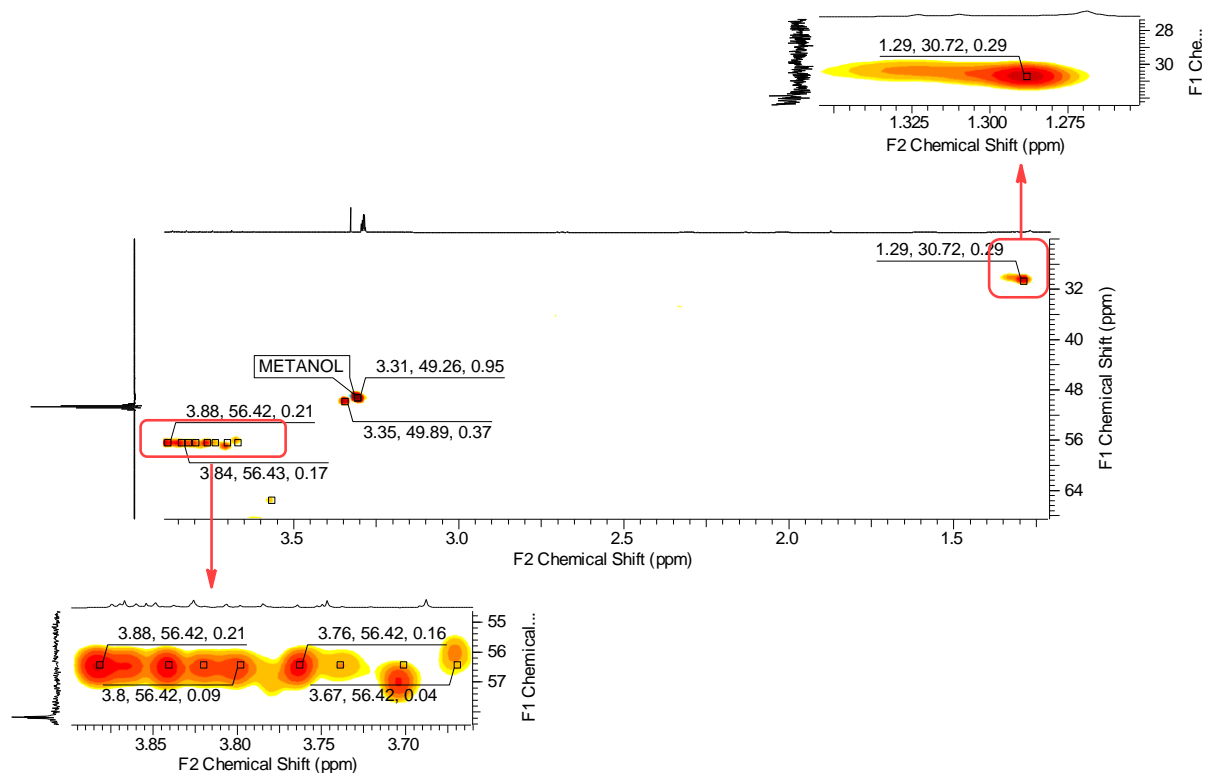


Figura 75: Expansão do Mapa de correlação HSQC da amostra E com sinais na região de metoxilas

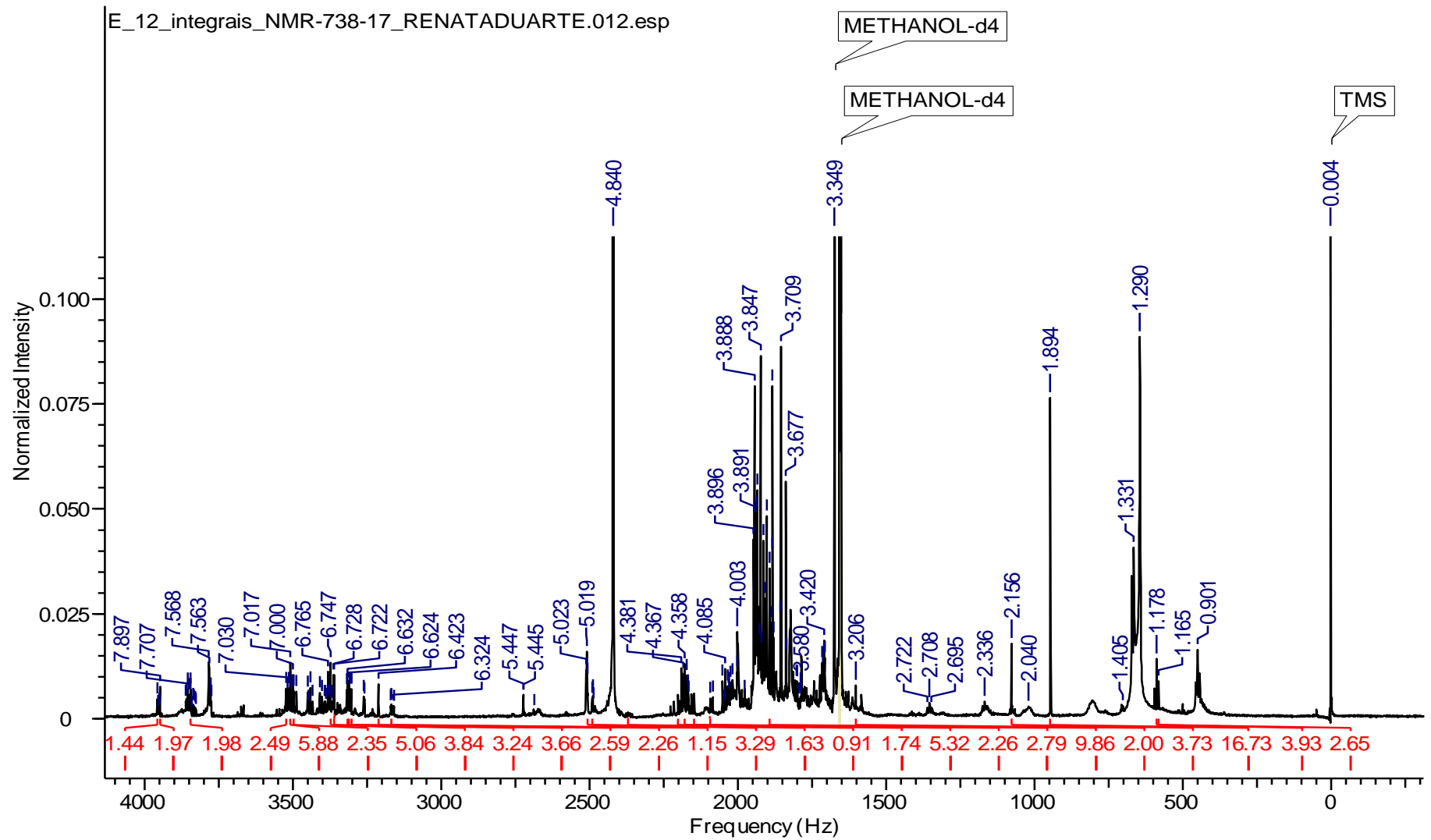


Figura 76: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da amostra E

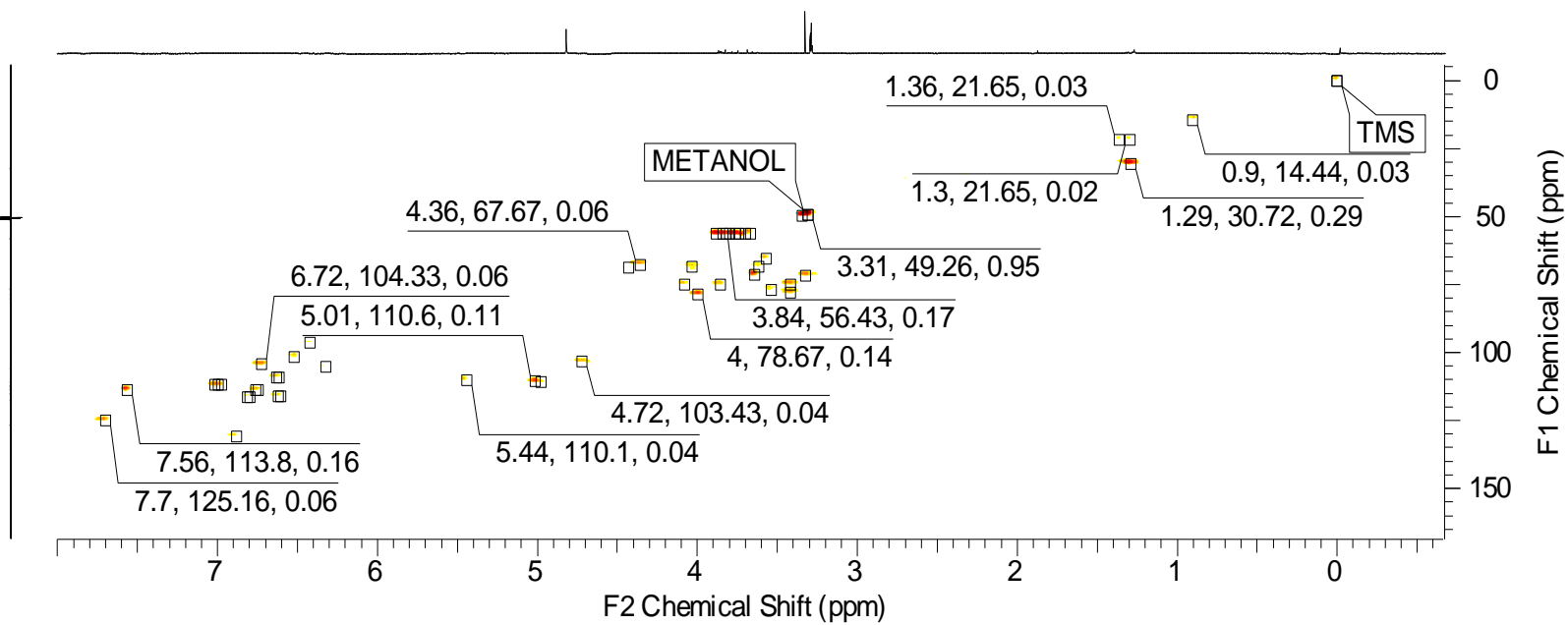


Figura 77: Mapa de correlação HSQC da amostra E

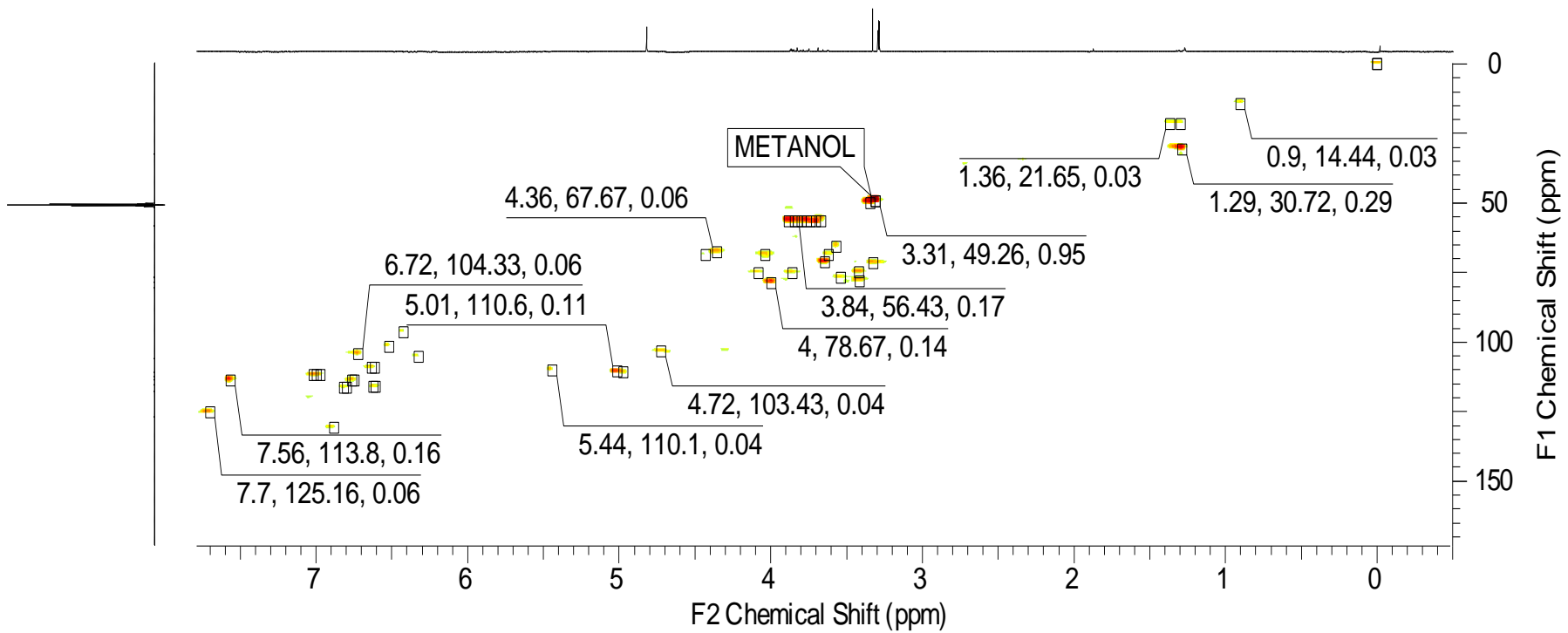


Figura 78: Mapa de correlação HMBC da amostra E

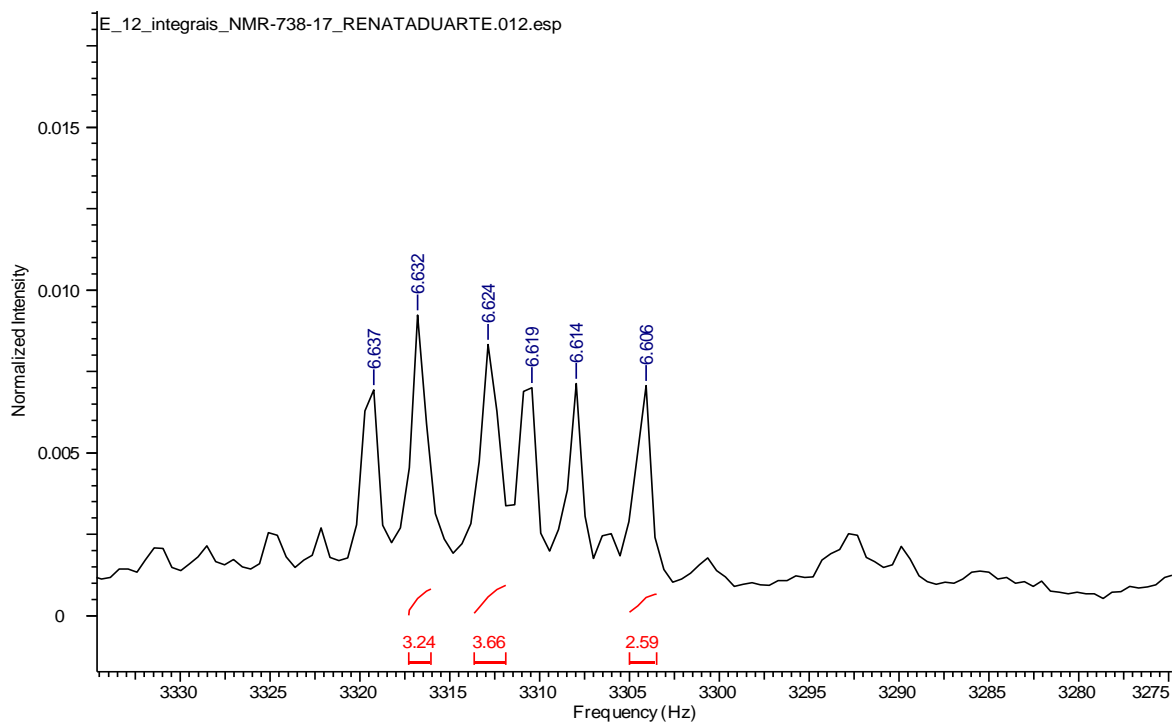


Figura 79: Espectro de RMN de ^1H da amostra E com sinais indicativos de iridoides

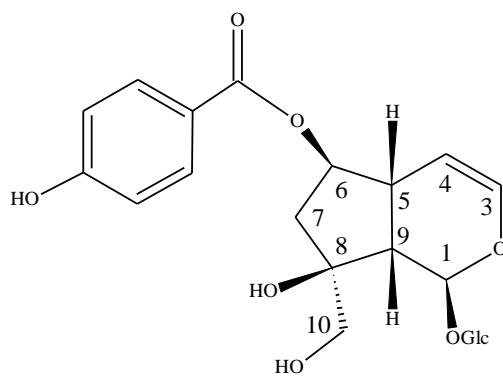


Figura 80: Estrutura do éster de bisdeoxicinanchosídeo com identificação numérica

Em HSQC há sinais indicativos de apiofuranose e glicose similares aos sinais de fenilpropanoide de MM 624 Da (Warashina et al. (2006) (tabela 9).

Tabela 9: Sinais de HSQC de fenilpropanoide com MM 624 u (Warashina et al., 2006) e amostra E.

Fenilpropanoide 624 Da		Amostra E (HSQC)
Warashina et al. (2006)		
β -D-glicose		
$^1\text{H} / ^{13}\text{C}$		$^1\text{H} / ^{13}\text{C}$
(1) 4,83 / 102,8 ppm		(1) 4,72 / 103,43 ppm
(2) 3,5 / 74,9 ppm		(2) 3,54 / 76,96 ppm
(3) 3,44 / 78,0 ppm		(3) 3,42 / 78,08 ppm
(4) 4,0 / 71,9 ppm		(4) 4,0 / 78,67 ppm
(5) 3,57 / 77,0 ppm		---
(6) 3,60 e 4,04 / 69,0 ppm		(6) 3,62 e 4,03 / 68,56
β -D-apiofuranose		
$^1\text{H} / ^{13}\text{C}$		$^1\text{H} / ^{13}\text{C}$
(1) 5,0 / 111,0 ppm		(1) 5,01 / 110,6 ppm
(2) 4,0 / 78,70 ppm		(2) 4,0 / 78,67 ppm
(4) 3,86 / 75,10 ppm		(4) 3,86 / 75,12 ppm
(5) 4,02 / 67,60 ppm		(5) 4,06 / 68,55 ppm

6. CONCLUSÃO

O uso de cromatografia em contracorrente proporcionou uma técnica de separação direcionada à iridoides com aproveitamento acima de 80% da amostra injetada. Os solventes utilizados permitem grande economia devido a dispensação de solventes grau HPLC. A análise das frações mostrou que trata-se de uma técnica que pode proporcionar a purificação e o isolamento de substâncias partir do uso de materiais mais econômicos e de acesso mais facilitado.

O estudo do perfil cromatográfico das espécies *T. incana*, *T. serratifolia* e amostra comercial permitiu verificar a semelhança em relação à presença de constituintes com características indicativas de iridoides, fenilpropanoides, lignanas e fenólicos glicosilados nos extratos e frações utilizados.

O padrão de ionização observado nos espectros desses mesmos extratos e frações mostra íons que podem ser oriundos de moléculas isoladas e identificadas em outras espécies da *Tabebuia* como iridoides, fenilpropanoides, lignanas e fenólicos glicosilados.

Dentre os fenilpropanoides, duas estruturas são descritas na literatura das espécies *T. avellanadae* e *T. impetiginosa* com massas moleculares que podem ser associadas a íons presentes nos espectros de EM. O perfil de ionização com sinais que podem ser compatíveis com fenilpropanoides permite sugerir a presença dessa classe nas amostras analisadas.

Para os iridoides foi possível indicar a presença de moléculas com estruturas indicativas de ajugol, bisdeoxicinanchosídeo, crescentina IV e macfadienosídeo. As massas moleculares dos iridoides sugeridos por meio dos espectros de EM e sinais de RMN demonstram que essa classe pode fazer parte da composição das amostras analisadas.

Quanto aos fenólicos glicosilados foi possível associar os sinais identificados nos espectros de EM com moléculas isoladas em outra espécie de Bignoniaceae. O perfil de

ionização apresentou sinais que puderam ser facilmente relacionados a ácidos benzoílicos sugeridos por meio de sinais registrados no espectros de RMN.

O utilização de *Tabebuia* amazônicas para descrição da composição e perfis de extratos polares é inédito tanto no que diz respeito às espécies selecionadas quanto à utilização de Cromatografia em Contracorrente. A identificação de componentes por meio de extratos polares partiu da necessidade de informações quanto às espécies nativas. Devido à similaridade entre os perfis cromatográficos e espectrométricos dos extratos de *T. incana*, *T. serratifolia* e amostra comercial, bem como a similaridade entre as frações polares analisadas pode-se intuir que a composição das cascas dessas espécies apresentam compostos pertencentes às classes de metabólitos elencadas durante todo esse trabalho. Os extratos das cascas de *T. incana*, *T. serratifolia* e amostra comercial têm potencial para produção de iridoides, fenilpropanoides e fenólicos glicosilados e com isso podem facilmente ser utilizados em futuros trabalhos para o isolamento desses metabólitos e aprofundamento das informações sobre essas espécies.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAGEED, W.M.; BACKHEET, E.Y.; KHLIFA, A.A.; IBRANHEIM, Z.Z.; ROSS, S.A. Antiparasitic antioxidant phenylpropanoids and iridoid glycosides from *Tecoma mollis*. *Fitoterapia*, v. 83, p. 500–507, 2012.

ABREU, M. B.; TEMRAZ, A.; VASSALLO, A.; BRACA, A.; TOMMASI, N. Phenolic glycosides from *Tabebuia argentea* and *Catalpa bignonioides*. *Phytochemistry Letters*, v. 7, p. 85–88, 2014.

AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of broad bean seed extract and its phenolic composition. *Journal of Functional Foods*, vol. 38, p. 656–662. 2017.

AWALE, S.; KAWAKAMI, T.; TEZUKA, Y.; UEDA, J.; TANAKA, K.; KADOTA, S. Nitric Oxide (NO) Production Inhibitory Constituents of *Tabebuia avellanedae* from Brazil. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 53, n. 6, p. 710-713, 2002.

BERTHOD, A. Practical approach to high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography*, vol. 550, p. 677-693. 1991.

BERTHOD, A.; HASSOUN, M.; RUIZ-ANGEL, M. J. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 383, p. 327–340. 2005.

BONINI, C.; DAVINI, E.; IAVARONE, C.; *Cynanchoside*, a *Highly Oxygenated* Iridoid Glucoside from *Macfadyena Cynanchoside*. *Phytochemistry, Great Britain*, v. 20, n. 7, p. 1587-1590, 1981.

CAMILLO, J. Ipê-branco (*Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith). Disponível em: <http://www.aplantadavez.com.br/2015/09/ipe-branco-tabebuia-roseoalba-ridl.html>. Acessado em: 06 de novembro de 2018.

CHEN, X. KONG, L.; SU, X.; FU, H.; NI, J.; ZHAO, R.; ZOU, H.; Separation and identification of compounds in *Rhizoma chuanxiong* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1040, p. 169-178, 2004.

COLLINS, C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Editora UNICAMP. Campinas-São Paulo. 5ª reimpressão. 2014.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3ed. Inglaterra. John Wiley & Sons, 2009.

DINDA, B., DEBNATH, S., HARIGAYA, Y.: "Naturally Occurring Iridoids. A Review, Part 1. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 55, n. 2, p. 159-222, 2007.

DOS SANTOS, G.; MILLER, R. B. Wood anatomy of Tecomeae. Bignoniaceae-Part II (Tribe Tecomeae). *Flora Neotropica, New York Botanical, Monograph 25*, n. II, p. 336-358, 1992.

DOS SANTOS, S. R.; A atual classificação do antigo gênero *Tabebuia* (Bignoniaceae), sob o ponto de vista da anatomia da madeira. *Balduinia*, n. 58, p.10-24, 2017.

ESPIRITO-SANTO, F.S.; SILVA-CASTRO, M. M.; RAPINI, A. 2012a. Flora da Bahia: Bignoniaceae 2 – Aliança *Tabebuia*. Sitientibus série Ciências Biológicas, v. 13, 2014.

FELICIO, J.; LINS, A.P.; SIMONI, I.C.; GONÇALVES, C.R.; 1994. Constituents of *Cybistax antisiphylitica*. *Fitoterapia*, v. 65, p. 281-282, 1994.

FERREIA, H. Ipê Roxo. Disponível em: <http://humbertoferreiratga.blogspot.com.br/2010/09/ipe-roxo.html>. Acessado em: 16 de abril de 2018.

FISCHER, E.; THEISEN, I.; LOHMANN, L.G. Bignoniaceae. *In*: KUBTIZKI, K; KADEREIT, J. W. **The families and genera of vascular plants**, v. 7, 2004. p. 9-98.

FONSECA, S.G.C.; BRGA, R.M.C.; SANTANA, D.P. Lapachol – química, farmacologia e métodos de dosagem. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 84, n. 1, p. 9-16. 2003.

FOUCAULT, A.P.; CHEVOLOT, L. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *Journal of Chromatography A*, vol. 808, p. 3–22. 1998.

FUREY, A.; MORIARTY, M. In defence of dependability and reliability: LC–UV/DAD. *Pharmaceutical Methods*, v. 2, n. 4, p. 209–210, 2011.

GARRARD, I. J. Simple Approach to the Development of a CCC Solvent Selection Protocol Suitable for Automation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 28, p. 1923-1935, DOI: 10.1081/JLC-200063571. 2005.

GAUTAM, B.P.S.; DANI R.K.; PRASAD, R.L.; SRIVASTAVA, M.; YADAV, R.A.; GONDWAL, M. Synthesis, Characterization, Single Crystal Structural Studies, Antibacterial Activity and DFT Investigations of 2-Chloro-5-Ethoxy-3,6-Bis(Methylamino)-1,4-Benzoquinone. *Pharmaceutica Analytical Acta*, 9 ed., v. 6, 2015.

Gentry, A.H. Bignoniaceae Part I: Tribe Crescentieae and Tourrettieae. *Flora Neotropica*, The New York Botanical Garden, vol. 25, n. 1, p. 1-117. 1980.

GENTRY, A.H.; COOK, K.: *Martinella* (Bignoniaceae): A widely used eye medicine of South America. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 11, p. 337-343, 1984.

GENTRY, A.H.: Bignoniaceae * Part II (Tribe Tecomeae). *Flora Neotropica*, The New York Botanical Garden, New York, Monograph 25, 13 ed, 1992.

GROSE, S. O.; OLMSTEAD, R. G. Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* s.l. (Bignoniaceae). *Systematic Botany*, v. 32, n. 3, p. 660-670, 2007b.

GUIISO, M.; MARRA, C.; PICCIONI, F.; NICOLETTI, M. Iridoid and Phenylpropanoids glicosilados de *Tecoma capensis*. *Phytochemistry*, vol. 45, n. 1, p. 193-194. 1997.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism. Plant Molecular Biology. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v. 40, p. 347–69, 1989.

HIRSCHMANN, S. G.; PAPASTERGIOU, F. Naphthoquinone Derivatives and Lignans from the Paraguayan Crude Drug “Tayí Pyta” (*Tabebuia heptaphylla*, Bignoniaceae). Zeitschrift für Naturforschung C, v. 58, ed. 7-8, p. 495–501. 2003.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Liquid-liquid partition chromatography in natural product isolation. Analytica Chimica Acta, vol. 236, p. 63-76. 1990.

IGLESIAS, A. H. Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida Espectrometria de Massas. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/minicursos/introducao%20ao%20acoplamento%20cromatografia%20liquida%20-%20espectrometria%20de%20massas.pdf>>. 2016. Acesso em: 10 junho de 2018.

IWAGAWA, T.; HAMADA, T.; KUROGI, S.; HASE, T.; OKUBO, T.; KIMT, M. Iridoids from *Catalpa bignonioides*. Phytochemistry, v. 30, n. 12, p. 4057 – 4060, 1991.

IWAMOTO, K.; FUKUDA, Y.; TOKIKURA, C.; NODA, M.; YAMAMOTO, A.; YAMAMOTO, M.; YAMASHITA, M.; ZAIMA, N.; IIDA, A.; MORIYAMA, T. The anti-obesity effect of Taheebo (*Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb) extract in ovariectomized mice and the identification of a potential anti-obesity compound. , v. 478, p. 1136-1140, 2016.

JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, F.; VELOZA, L. A.; SEÚLVER-ARIAS, J. C. Anti-infectious activity in plants of the genus *Tabebuia*. Universitas Scientiarum. v. 18, n. 3, p. 257-267, 2013.

KANCHANAPOOM T.; KASAI R.; YAMASAKI K. Iridoid and phenolic glycosides from *Morinda coreia*. Phytochemistry, v. 59, p. 551-556, 2002.

KAPOOR, S. K.; KOHLI, J. M.; ZAMAN, A. Amphicome I. A new bitter glycoside from *Amphicome emodi* Lindl. Tetrahedron Letters, 30 ed., v. 12, p. 2839-2840, 1971.

LEITÃO, G. G. Uso da Cromatografia Contracorrente na obtenção de padrões de origem Vegetal. Revista Fitos, vol. 1, n. 2. 2005.

LEITÃO, G. G.; COSTA, F. N. Strategies of Solvent System Selection for the Isolation of Natural Products by Countercurrent Chromatography. Journal of Separation Science, v. 33, p. 336-347, 2012.

LOHMANN, L. G.; PIRANI, J. R. Tecomeae (Bignoniaceae) da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais e Bahia, Brasil. Acta Botanica Brasilica, v.10, n. 1, p. 103-138, 1996.

LOHMANN, L. G. Bignoniaceae In Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB112305>>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2018.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa. São Paulo. 2002.

LUCAS, N. C.; FERREIRA, A. B. B.; NETTO-FERREIRA, J. C. Fotoquímica da naftoquinonas. Revista Virtual de Química, v. 7, n. 1, p. 403-463, 2014.

MATTOS, J.R. *Handroanthus*: um novo gênero para os “ipês” do Brasil. Loefgrenia, n. 50, p. 1-4, 1970.

MAORONG, S.; OHTA, T.; TAKANO, F.; JIN, S. Bioactive phenylpropanoids glycosides from *Tabebuia avellanedae*. Molecules, v. 18, p. 7336-7345, 2013.

MARTIN, F.; HAY, L. C.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Iridoids glycosides from the stems of *Pithecoctenium crucigerum*. Phytochemistry, v. 68, p. 1307-1311, 2007.

MORAIS, S. K. R.; SILVA, S. G.; PORTELA, C. N.; NUNOMURA, S. M.; Quignard, E. L. J.; Pohlit, A. M. Bioactive dihydroxyfuranonaphthoquinones from the bark of *Tabebuia incana* A.H. Gentry (Bignoniaceae) and HPLC analysis of comercial pau d’arco and certified *T. incana* bark infusions. Acta Amazonica, v. 37, n. 1, p. 99 – 102, 2007.

NAKANO, K.; MARUYAMA, K.; MURAKAMI, K.; TAKAISHI, Y.; TOMIMATSU, T. Iridoids from *Tabebuia avellanedae*. Phytochemistry, v. 32, p. 371 – 373, 1993.

NEVES, P. A. Síntese, caracterização e estudo da atividade farmacológica de novas 2-hidróxi-3-alquilaminonaftoquinonas e seus complexos metálicos. 2007. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal Fluminense. Niterói. 2007.

OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; MIARAGLIA, M. C. M.; MESQUITA, A. A. L. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de bignoniáceas brasileiras. *Química Nova*, v. 13, n. 4, p. 302, 1990.

OLIVEIRA, M. F.; LEMOS, T. L. G. Lignanas de *Tabebuia serratifolia*. In: 23ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas. 2000. Resumos [...]Rio de Janeiro: Biblioteca da Comissão Nacional de Energia Nuclear, 2000, p. 86.

OLIVEIRA, A. B. O.; RASLAN, D. S.; OLIVEIRA, G. G.; MAIA, J. G. S. Lignans and naphthoquinones from *Tabebuia incana*. Phytochemistry, v. 34, n. 5, p. 1409-1412, 1993.

OLMSTEAD, R. G.; ZJHRA, M. L.; LOHMANN, L. G.; GROSE, S. O.; ECKERT, A. J. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. American Journal of Botany, v. 96, n. 9, p. 1731–1743, 2009.

PACHECO, S.; BORGUINI, R. G.; SANTIAGO, M. C. P. A.; NASCIMENTO, L. S. M.; GODOY, R. L. O. História da Cromatografia Líquida. Revista Virtual de Química, vol. 7, n. 4, p. 1225-1271. 2015.

PAL, S.; CHATARE, V.; PAL, M. Isocoumarin and Its Derivatives: An Overview on their Synthesis and Applications. Current Organic Chemistry, vol. 15, n. 5, p. 782-800. 2011.

PAVIA, L. D.; LAMPMAN, M. G.; KRIZ, S. G., VYVYAN, R. J. Introdução à Espectroscopia. Tradução da 4 ed. Norte-americana, São Paulo, 2015.

POSER, G. L.; SCHRIPEMA, J.; HENRIQUES, A. T.; JENSEN, S. R. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 28, p. 351-366. 2000.

PROCHNOW, M. Ipê Amarelo. A cor dourada do Brasil. Disponível em: <http://apremavi.org.br/ipe-amarelo-a-cor-dourada-do-brasil/>. Acessado em: 06 de novembro de 2018.

QUIGNARD, E. L. J.; POHLIT, A. M.; NUNOMURA, S. M.; PINTO, A. C. S.; SANTOS, E. V. M.; MORAIS, S. K. R.; ALECRIM, A. M.; PEDROSO, A. C. S.; CYRINO, B. R. B.; MELO, C. S.; FINNEY, E. K.; GOMES, E. O.; SOUZA, K. S.; OLIVEIRA, L. C. P.; DON, L. C.; SILVA, L. F. R.; QUEIROZ, M. M. A.; HENRIQUE, M. C.; SANTOS, M.; PINTO, P. S.; SILVA, S. G. Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp. *Acta Amazonica*, vol. 33. n.1, p. 93-104. 2003.

SAMPAIO-SANTOS, M. I.; KAPLAN, M. A. B. Biosynthesis Significance of Iridoids in Chemosystematics. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 12, n. 2, p. 144-153, 2001.

SICHAEM, J.; KAENNAKAM, S.; SIRIPONG, P.; TIP-PYANG, S. Tabebuialdehydes A–C, cyclopentene dialdehyde derivatives from the roots of *Tabebuia rosea*. *Fitoterapia*, vol. 83, p. 1456–1459. 2012.

SILVA, A. M. P.; PAIVA, S. R.; FIGUEREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Atividade Biológica de Naftoquinonas de Espécies de Bignoniaceae. *Revista Fitos*, v. 7, n. 4, 2012.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na Beta-Lapachona e derivados. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 407-416. 2003.

SILVA, M.F.; LISBOA, P. L. B.; LISBOA, R. C. L. Nomes Vulgares de Plantas Amazônicas. Belém, INPA/CNPq, p. 222. 1977.

SILVERSTEIN, M. R.; WEBSTER, X. F.; KIEMLE, J. D. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 7 ed., LTC, 2012.

SOARES, A. O.; TIEPP, C.; GARCEZ, W. S.; GRACEZ, F. R. Iridoides e Triterpenos das cascas do caule de *Tabebuia Caraiba* (Bignoniaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29. Chemistry is energy: changes the life and keeps the environment, Águas de Lindóia, 2006.

SOUZA-FAGUNDES, E. M.; QUEIROZ, A. B. R.; FILHO, O. A. M.; GAZZINELLI, G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L. Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 97, n. 8, p. 1207-1212. 2002.

SUTHERLAND, I. A.; FISHER, D. Role of counter-current chromatography in the modernization of Chinese herbal medicines. *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, p. 740–753. 2009.

THOMSON, R. H. Distribution of naturally occurring quinones. *Pharmaceutish Weekblad Scientific*, v. 3, n. 2, p. 70–73. 1991.

TROPICOS. *Tabebuia incana* A.H. Gentry. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/3701434>. Acessado em: 07 de abril de 2018.

TROPICOS. *Tabebuia serratifolia* (Vahl) G. Nicholson. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/3701053>. Acessado em: 06 de abril de 2018.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F.; STATTI, G.A.; MENICHINI, F. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. Bentham Science, v. 8, p. 399–420, 2008.

VON POSER, G. L.; SCHRIPSEMA, J.; HENRIQUES, A. T.; JENSEN, S. R. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 28, p. 351-366, 2000.

VOGT, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, v. 3, n. 1, p. 2–20, 2010.

VORST, O. F.; DE VOS, C. H. R.; LOMMEN, A.; STAPS, R. V.; VISSER, R. G. F.; BINO, R. J.; HALL, R. D. A non-directed approach to the differential analysis of multiple LC/MS-derived metabolic profiles. *Metabolomics*, v. 1, p. 169–180, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2 ed., 2001.

WARASHINA, T.; NAGATANI, Y.; NORO, T. Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry*, vol. 65, p. 2003–2011. 2004.

WARASHINA, T.; NAGATANI, Y.; NORO, T. Further constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry*, vol. 66, p. 589–597. 2005.

WARASHINA, T.; NAGATANI, Y.; NORO, T. Constituents from the Bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 54, n. 1, p. 14-20. 2006.