



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**NOVOS ALQUENIL BENZOFURANOS E PERFIL DE ÁCIDOS  
GRAXOS PRESENTES NAS SEMENTES E FOLHAS DE *Tapirira*  
*guianensis* (ANACARDIACEAE)**

**ELIEZER PEREIRA DA SILVA**

Salvador-BA  
2011

**ELIEZER PEREIRA DA SILVA**

**NOVOS ALQUENIL BENZOFURANOS E PERFIL DE ÁCIDOS  
GRAXOS PRESENTES NAS SEMENTES E FOLHAS DE *Tapirira  
guianensis* (ANACARDIACEAE)**

Dissertação submetida ao colegiado do  
Programa de Pós-Graduação em Química da  
UFBA para obtenção do título de mestre  
em Química Orgânica

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Jorge Maurício David**

Salvador-BA  
2011

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo.

Aos meus pais, Evandro (*in memoriam*) e Lairdes, pelo exemplo de amor, bondade e honestidade.

Aos meus irmãos e irmãs por todo amor e apoio para realização desse trabalho.

A Dani, por seu amor, amizade e por todo apoio.

Ao Professor Dr. Jorge Mauricio David, pela orientação constante, pelo apoio e incentivo na elaboração desse trabalho e pela amizade sincera.

A Professora Dra. Juceni Pereira David pela amizade sincera, pela orientação valiosa durante os meus primeiros passos como aluno de iniciação científica (IC). Além disso, pelo incentivo e apoio na realização desse trabalho e concessão do seu laboratório para realização de diversos trabalhos experimentais.

Ao Professor Dr. Edson de Souza Bento da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) pelo registro dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e bidimensionais (HMBC e HMQC).

Ao Sandro agradeço imensamente pela amizade, por todo apoio e pelas análises em CG-EM.

Aos professores do programa de Pós-Graduação pelos valiosos ensinamentos.

Aos funcionários do Instituto de Química.

Aos colegas de laboratório Bruno, Clayton, Luciano, Jéferson, Érika, José Candido, Raul, Darlan, Marcelo, André, Paty, Roberta, Larissa, Bel, Hugo, Silvana, Mariluze pela ótima convivência e amizade.

Ao CNPq e Capes pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

Lista de Figuras .....	viii
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Quadros .....	xi
Lista de Esquemas.....	xi
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos .....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
<b>1.Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Produtos naturais.....	1
1.2 A família Anacardiaceae.....	4
1.3 O gênero <i>Tapirira</i> .....	10
1.4 Aspectos gerais de <i>Tapirira guianensis</i> Aubl.....	12
<b>2.Objetivos.....</b>	<b>20</b>
2.1 Gerais.....	20
2.2 Específicos.....	20
<b>3. Parte Experimental.....</b>	<b>21</b>
3.1 Local.....	21
3.2 Coleta da espécie <i>Tapirira guianensis</i> .....	21
3.3 Materiais e métodos.....	21
3.4 Preparação dos extratos.....	23
3.4.1 Obtenção da fase diclorometano do extrato hexânico das sementes de <i>Tapirira guianensis</i> .....	23

3.4.2 Obtenção do extrato hexânico das folhas de <i>Tapirira guianensis</i> para avaliação do perfil de ácidos graxos.....	24
3.4.3 Obtenção do extrato hexânico das sementes de <i>Tapirira guianensis</i> para avaliação do perfil de ácidos graxos.....	26
3.5 Fracionamento da fase diclorometano do extrato hexânico das sementes de <i>T. guianensis</i> .....	27
3.6 Reações de derivatização.....	29
3.6.1 Reação de transesterificação.....	29
3.6.2 Reação de tioalquilação.....	30
3.7 Avaliação do perfil de ácidos graxos presentes nas folhas e sementes de <i>T.guianensis</i> .....	31
3.7.1 Perfil de ácidos graxos presentes na fase hexânica das folhas de <i>T.guianensis</i> .....	31
3.7.2 Perfil de ácidos graxos presentes na fase hexânica das sementes de <i>T.guianensis</i> .....	31
3.8 Bioensaio de letalidade para larvas de <i>Artemia salina</i> .....	32
3.9 Avaliação da Atividade Alelopática das fases diclorometano (TGDF e TGDS).....	33
<b>4. Discussão dos resultados</b> .....	<b>34</b>
4.1 Substâncias isoladas de <i>T. guianensis</i> .....	34
4.2 Dados físicos e espectroscópicos das substâncias isoladas.....	35
4.3 Identificação e Determinação Estrutural.....	36
4.3.1 Hidrobenzofuranóides.....	36
4.3.1.2 Elucidação estrutural das substâncias <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> .....	37
4.3.2 Fitoesteróides.....	55
4.3.2.1 Elucidação estrutural da substância <b>S4</b> .....	56

4.4 Perfil de ácidos graxos presentes nas fases hexânicas das folhas e sementes de <i>T. guianensis</i> .....	61
4.4.1 Rendimento de óleo extraído dos extratos hexânicos.....	61
4.4.2 Identificação dos ésteres metílicos presentes na fase hexânica das folhas.....	62
4.4.3 Identificação dos ésteres metílicos presentes na fase hexânica das sementes de <i>T. guianensis</i> .....	63
4.5 Avaliação da atividade citotóxica das fases diclorometano das folhas e sementes de <i>T. guianensis</i> .....	65
4.6 Avaliação da Atividade Alelopática das fases diclorometano (TGDF e TGDS).....	66
<b>5. Considerações finais</b> .....	<b>69</b>
<b>6. Referências bibliográficas</b> .....	<b>71</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Exemplo de quimioterápicos de origem vegetal de interesse da indústria farmacêutica.....	3
<b>Figura 2.</b> Distribuição das espécies da família Anacardiaceae no mundo.....	5
<b>Figura 3.</b> Frutos da mangueira e do cajueiro.....	6
<b>Figura 4.</b> Estrutura da Mangiferina.....	7
<b>Figura 5.</b> Principais constituintes do LCC.....	8
<b>Figura 6.</b> Frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> .....	9
<b>Figura 7.</b> Fotografia da <i>Tapirira guianensis</i> .....	13
<b>Figura 8.</b> Compostos isolados das sementes de <i>T. guianensis</i> .....	14
<b>Figura 9.</b> Procedimento experimental de obtenção da fase diclorometano do extrato hexânico das sementes de <i>T. guianensis</i> .....	24
<b>Figura 10.</b> Fluxograma de obtenção dos extratos hexânicos das folhas de <i>Tapirira guianensis</i> .....	25
<b>Figura 11.</b> Fluxograma de obtenção dos extratos orgânicos das sementes de <i>Tapirira guianensis</i> .....	26
<b>Figura 12.</b> Fluxograma de obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos presentes nas fases hexânicas .....	30
<b>Figura 13.</b> Estrutura básica de hidrobenzofuranóides.....	37
<b>Figura 14.</b> Espectro de infravermelho das substâncias <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> .....	38
<b>Figura 15.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> [400 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ <sub>H</sub> (ppm)].....	40
<b>Figura 16.</b> Ampliação (δ <sub>H</sub> 4,5-5,50) do espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> [400 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ <sub>H</sub> (ppm)].....	41
<b>Figura 17.</b> Ampliação (δ <sub>H</sub> 6,0-7,50) do espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> [400 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ <sub>H</sub> (ppm)].....	41
<b>Figura 18.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C de <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ (ppm)]....	42
<b>Figura 19.</b> Correlações observadas no HMBC para <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> .....	43

<b>Figura 20.</b> Espectro de HMQC de <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , (ppm)].....	44
<b>Figura 21.</b> Ampliação ( $\delta_C$ 14-40/ $\delta_H$ 0,9-3,4) Espectro de HMQC de <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , (ppm)].....	45
<b>Figura 22.</b> Ampliação ( $\delta_C$ 60-140/ $\delta_H$ 4,5-7,3) Espectro de HMQC de <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , (ppm)].....	45
<b>Figura 23.</b> Espectro de HMBC de <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , (ppm)].....	46
<b>Figura 24.</b> Ampliação ( $\delta_C$ 14-160/ $\delta_H$ 0,9-3,5) Espectro de HMBC de <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , (ppm)].....	46
<b>Figura 25.</b> Ampliação ( $\delta_C$ 30-160/ $\delta_H$ 6,0-6,8) Espectro de HMBC de <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , (ppm)] .....	47
<b>Figura 26.</b> Possíveis estruturas que representariam <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> .....	48
<b>Figura 27.</b> Espectro de massas (EM-ESI) de <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> .....	50
<b>Figura 28.</b> Compostos hidroquinônicos isolados das sementes de <i>T. guianensis</i> .....	54
<b>Figura 29.</b> Anel ciclopentanoperidrofenantrênico.....	55
<b>Figura 30.</b> Espectro de infravermelho da substância <b>S4</b> .....	57
<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância <b>S4</b> [(300 MHz), CDCl <sub>3</sub> ].....	58
<b>Figura 32.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância <b>S4</b> [(75 MHz), CDCl <sub>3</sub> ].....	59
<b>Figura 33.</b> Espectro de massas da substância <b>S4</b> .....	59
<b>Figura 34.</b> Cromatograma da fase hexânica transesterificada das folhas de <i>T. guianensis</i> .....	62
<b>Figura 35.</b> Cromatograma da fase hexânica transesterificada das sementes de <i>T. guianensis</i> .....	64
<b>Figura 36.</b> Efeitos alelopáticos da fase TGDF sobre a germinação das sementes de alface ( <i>Lactuca sativa</i> L.).....	68
<b>Figura 37.</b> Efeitos alelopáticos da fase TGDS sobre a germinação das sementes de alface ( <i>Lactuca sativa</i> L.).....	68
<b>Figura 38.</b> Efeitos inibitórios das amostras TGDF e TGDS sobre a germinação de sementes de alface ( <i>Lactuca sativa</i> L.).....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Massas dos extratos e fases orgânicas das folhas de <i>Tapirira guianensis</i> .....	25
<b>Tabela 2.</b> Massas dos extratos e fases orgânicas das sementes de <i>Tapirira guianensis</i> .....	27
<b>Tabela 3.</b> Frações obtidas da CC da fase <b>TGDS</b> .....	27
<b>Tabela 4.</b> Frações obtidas da CC da fração <b>TGDS-4</b> .....	28
<b>Tabela 5.</b> Frações obtidas da CC da fração <b>TGDS-4-8</b> .....	29
<b>Tabela 6.</b> Incrementos de deslocamentos químicos dos átomos de carbono do benzeno (ppm a partir do benzeno em 128,5 ppm).....	48
<b>Tabela 7.</b> Deslocamentos químicos calculados para átomos do anel aromático das estruturas 1 e 2 propostas.....	49
<b>Tabela 8.</b> Dados espectrais de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz) RMN <sup>13</sup> C (75 MHz), HMBC de <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> [CDCl <sub>3</sub> , δ (ppm)].....	52
<b>Tabela 9.</b> Dados do espectro de RMN de <sup>13</sup> C [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ (ppm)] da Substância <b>S4</b> e valores da literatura.....	60
<b>Tabela 10.</b> Composição em ácidos graxos isolado das folhas de <i>T. guianensis</i> .....	63
<b>Tabela 11.</b> Composição em ácidos isolado das sementes de <i>T. guianensis</i> .....	65
<b>Tabela 12.</b> Resultado dos testes de toxicidade sobre <i>Artemia Salina</i> , relativo as fases diclorometano das folhas e sementes de <i>T. guianensis</i> .....	66
<b>Tabela 13.</b> Efeito alelopático das fases (TGDF e TGDS) em diferentes concentrações na germinação de sementes de alface.....	67

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Compostos isolados das cascas de <i>T. guianensis</i> .....	14
<b>Quadro 2.</b> Novos hidrobenzofuranóides isolados das folhas de <i>T. guianensis</i> .....	17
<b>Quadro 3.</b> Substâncias isoladas das folhas de <i>T. guianensis</i> .....	18
<b>Quadro 4.</b> Compostos isolados das folhas de <i>T. guianensis</i> .....	19
<b>Quadro 5.</b> Substâncias isoladas das sementes de <i>T. guianensis</i> .....	35

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Derivatização para elucidação da posição da ligação dupla das substâncias <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> .....	51
<b>Esquema 2.</b> Fragmentação responsável pela atribuição do posicionamento da ligação dupla das substâncias <b>S1</b> , <b>S2</b> e <b>S3</b> .....	51
<b>Esquema 3.</b> Proposta biossintética para os diidrobenzofuranóides isolados de <i>T. guianensis</i> .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CG	Cromatografia gasosa
d	Dubleto
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dubleto
EM	Espectrometria de massas
FHF	Fase hexânica das folhas
FHiF	Fase hidrometanólica das folhas
FHS	Fase hexânica das sementes
FHiS	Fase hidrometanólica das sementes
GPPN	Grupo de pesquisa de produtos naturais
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HMBC	Heteronuclear multi bond correlation
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplado ao Espectrômetro de Massas
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	Razão massa:carga
OMe	Metoxíla
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono
s	Singleto
t	Tripleto
UV	Ultravioleta

## RESUMO

A família Anacardiaceae é encontrada predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais, com algumas espécies também sendo encontradas em regiões temperadas. Essa família é composta por cerca de 76 gêneros e 600 espécies. O gênero *Tapirira* é composto de aproximadamente 32 espécies, sendo encontrados a partir do México, difundindo-se por toda América do Sul. *Tapirira guianensis* Aubl., é uma espécie arbórea que mede de 8 a 14 metros de altura, podendo ser encontrada em todo território brasileiro, principalmente em terrenos úmidos, em quase todas as formações vegetais. O presente trabalho teve como objetivos realizar o isolamento e a elucidação estrutural de substâncias presentes na fase diclorometânica das sementes de *Tapirira guianensis*, avaliar o perfil de ácidos graxos presentes nos extratos hexânicos das folhas e das sementes desta espécie, avaliar a atividade citotóxica das fases diclorometânicas das folhas (TGDF) e sementes (TGDS), além de avaliar os efeitos alelopáticos de TGDF e TGDS sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). Utilizando-se métodos cromatográficos usuais, além do  $\beta$ -sitosterol, foram isolados da fase diclorometânica três novos diidrobenzofuranóides alquilados: 2-[(10'*Z*)-dodec-10'-enil]-diidro-1-benzofuran-5-ol, 2-[(10'*Z*)-tridec-10'-enil]-diidro-1-benzofuran-5-ol e 2-[(10'*Z*)-pentadec-10'-enil]-diidro-1-benzofuran-5-ol. As estruturas das substâncias isoladas foram elucidadas através da análise dos dados obtidos pelos espectros no IV, de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , além de técnicas bidimensionais (HMBC e HMQC). No estudo do perfil de ácidos graxos do óleo presente na fase hexânica das folhas de *T. guianensis* obteve-se como componente majoritário o ácido palmítico ( $24.71 \pm 2,48\%$ ), enquanto que, no estudo do perfil de ácidos graxos do óleo presente na fase hexânica das sementes apresentou como componente majoritário o ácido linoleico ( $29.88 \pm 0,39\%$ ). Nos ensaios de atividade citotóxica frente à *Artemia salina*, as fases diclorometânicas da folhas e das sementes de *T. guianensis* apresentaram  $\text{DL}_{50}$  de  $523,38 \mu\text{g/mL}$  e  $2124,4 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Sendo assim, a fase diclorometano das folhas foi considerada medianamente ativa podendo apresentar atividade anti-tumoral. Enquanto que a fase diclorometano das sementes foi considerada inativa, visto que apresentou  $\text{DL}_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ . Na avaliação da atividade citotóxica da mistura das substâncias (S1, S2 e S3) frente à *Artemia salina* pode-se constatar que essa mistura é considerada medianamente ativa, por apresentar  $\text{DL}_{50} = 174,06 \mu\text{g/mL}$ . Na avaliação dos efeitos alelopáticos das fases diclorometânicas das folhas e das sementes de *T. guianensis* (TGDF e TGDS) sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) pode-se constatar que ambas apresentaram baixa capacidade de inibição de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.).

Palavras-chave: *Tapirira guianensis*, Anacardiaceae, diidrobenzofuranóides

## ABSTRACT

The family Anacardiaceae is predominantly found in tropical and subtropical regions, with some species also being found in temperate regions. This family is composed of about 76 genera and 600 species. The *Tapirira* genus consists by about 32 species, found from Mexico, spreading across South America. *Tapirira guianensis* Aubl. is a tree that measures about 8 to 14 meters tall and can be found throughout Brazil, especially in humid soils in almost all vegetation. This work aimed to perform the isolation and structural elucidation of substances presents in dichloromethane phase from seeds *Tapirira guianensis*, evaluation of profile of fatty acids in the leaves and seeds extract of this specie, besides the evaluation of cytotoxic activity of dichloromethane phases from leaves (TGDF) and seeds (TGDS), besides evaluating the allelopathic effects of TGDF and TGDS on the germination of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Using usual chromatographic methods, beyond the  $\beta$ -sitosterol, were isolated from the dichloromethane phase three new diidrobenzofuranóides alkyl: 2 - [(10'Z)-Dodeca-10'-enil]-dihydro-1-benzofuran-5-ol, 2 - [(10'Z)-Tridec-10'-enil]-dihydro-1-benzofuran-5-ol and 2 - [(10'Z)-pentadec-10'-enil]-dihydro-1-benzofuran-5-ol. The structures of the isolated compounds were elucidated through analysis of data obtained by IR spectra,  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$ , and bidimensional techniques (HMBC and HMQC). In the study of fatty acid profiles in the oil of hexane phase of the leaves of *Tapirira guianensis* was obtained palmitic acid as major component ( $24.71 \pm 2.48\%$ ), while in the study of fatty acid profile of the oil in the hexane phase from the seeds showed major component as linoleic acid ( $29.88 \pm 0.39\%$ ). In trials of cytotoxic activity against the *Artemia salina*, the dichloromethane phases of leaves and seeds of *T. guianensis* presented  $\text{DL}_{50}=523.38 \mu\text{g/mL}$  and  $2124.4 \mu\text{g/mL}$  respectively. Thus, the dichloromethane phase of the leaves were considered moderately active and may have anti-tumor activity. While the seeds of dichloromethane phase was considered inactive, presenting  $\text{LD}_{50}> 1000 \mu\text{g/mL}$ . In assessing the cytotoxic activity of the mixture of substances (S1, S2 and S3) on *Artemia salina* can be seen that this mixture is considered moderately active, presenting  $\text{DL}_{50} = 174,06 \mu\text{g/mL}$ . In the evaluation of allelopathic effects of dichloromethane phases of leaves and seeds of *T. guianensis* (TGDF and TGDS) on the germination of lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.), can be seen that both showed low capacity to inhibit germination of lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.).

**Keywords:** *Tapirira guianensis*, Anacardiaceae, diidrobenzofuranóides

## **1. Introdução**

### **1.1 Produtos naturais**

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade, tendo seu início provavelmente na pré-história. No início da década de 1990, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou que entre 65 e 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais, como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (AKERELE, 1993).

A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações oriental e ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS, BOLZANI & BARREIROS, 2006).

No Brasil, o uso de plantas medicinais teve origem relacionada com a cultura dos índios que habitavam o país. Em seguida, sofreu influência dos colonizadores e de outros povos que vieram mais tarde (CARTER; KOEHN, 2005; SCHENKEL; GOSMAN; PETROVICK, 2002; BALUNAS, DOUGLAS KINGHORN, 2005).

Com a chegada dos portugueses ao país, houve uma exposição as doenças endêmicas e diante da escassez de medicamentos, recorreram aos remédios indígenas como as ervas nativas. Os estrangeiros também contribuíram para o incremento do arsenal terapêutico de origem vegetal disponível, trazendo ao país espécies vegetais nativas de seus países de origem. Assim, a diversidade de plantas utilizadas hoje na terapêutica, encontra-se difundida entre a população desde o processo de colonização, tornando-se

válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (SERAFIN, 2006).

A natureza, de forma geral, tem produzido grande parte das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos da natureza, os vegetais e os microorganismos são os que mais têm contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos, representando um extraordinário reservatório de novas moléculas (MOREIRA, 2009).

Os vegetais produzem, estimulados por fatores externos (competição, predadores, polinizadores e mudanças ambientais), uma variedade de compostos orgânicos que não apresentam função direta no seu crescimento. Esses compostos são conhecidos como metabólicos secundários (metabólitos especiais) ou ainda produtos naturais. Em contrapartida, substâncias consideradas essenciais ao desenvolvimento estrutural da planta como carboidratos, proteínas, nucleotídeos, ácidos orgânicos e fitoesteróis são chamadas de metabólicos primários (STROHL, 2000).

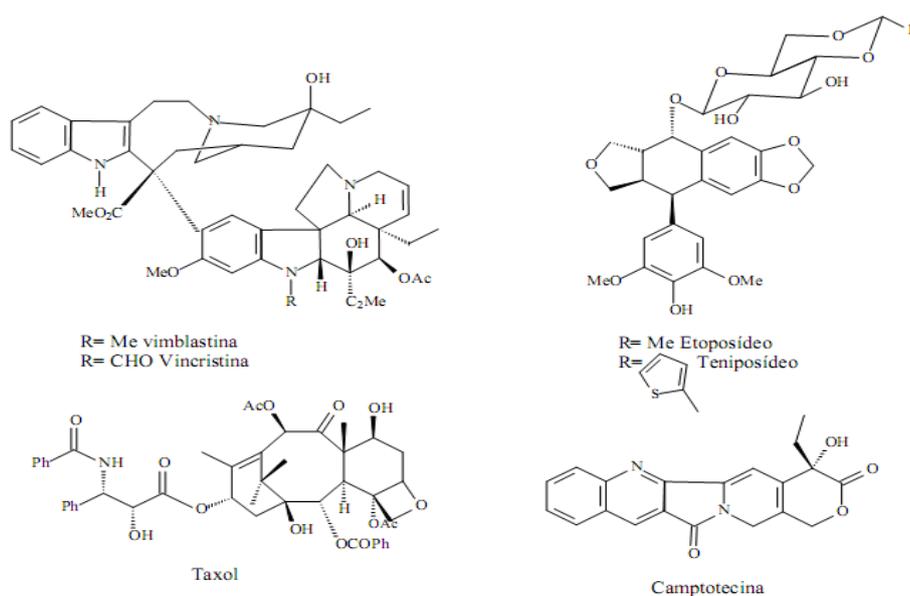
Estima-se que dois terços da diversidade biológica mundial esteja nas zonas tropicais, distribuída principalmente nos países em desenvolvimento. Cerca de 37 % desta encontra-se na América tropical, que contém cerca de 90 mil espécies de fanerógamas, representadas no Brasil por aproximadamente 60 mil espécies (VIEIRA; MARTINS, 2000, p. 14). A biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão, visto que o país detém a maior diversidade genética vegetal do mundo (NODARI; GUERRA, 2000, p. 13).

Apenas 8 % das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais; destas, 590 plantas foram registradas no Ministério da Saúde para sua comercialização (NODARI; GUERRA, 2000, p. 12).

As atividades biológicas dos produtos naturais de origem vegetal são descobertas inicialmente com bases folclóricas populares e só mais tarde é que se tem o desenvolvimento de pesquisas com embasamento científico, podendo citar com exemplo a efedrina, um agente antiasmático isolado da *Ephedra sínica* (LEE, 2004).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, etc, tem sido objeto de estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais e muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

A partir da pesquisa em Química de Produtos Naturais tem sido possível encontrar novos modelos estruturais e substâncias ativas eficazes, o que tem contribuído muito para a pesquisa e obtenção de novos medicamentos. Dentre estes destacam-se vimblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), podofilotoxina e análogos etoposídeo (VP-16-213; Vepeside®), teniposídeo (VM-26; VUMON®), bem como o taxol (Paclitaxel; Taxol®) e camptotecina (Figura 1). Estas substâncias são exemplos que têm incentivado a indústria farmacêutica na busca de novas substâncias bioativas de origem vegetal. Este interesse é voltado principalmente às moléculas com estruturas complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por meio de processo sintético de custo racional (CORREIA, 2005).



Fonte: (CORREIA, 2005)

**Figura 1.** Exemplo de quimioterápicos de origem vegetal de interesse da indústria farmacêutica.

Estas substâncias obtiveram uma participação expressiva num mercado que movimenta cerca de 50 bilhões de dólares anualmente e reativou o interesse desta indústria pelos medicamentos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional. A constatação desse fato é a semi-síntese comercial do taxol (PINTO *et al.* 2002). Atualmente, nenhum agente quimioterápico de ocorrência natural tem se mostrado tão eficaz no tratamento de câncer como o Taxol®, hoje conhecido como paclitaxel, que é inclusive reconhecido como uma das mais importantes drogas usadas no tratamento do câncer de mama e ovário (KINGSTON, 2005).

Exemplos como este evidenciam a potencialidade de diversas espécies de origem vegetal em fornecer substâncias bioativas. Nesse sentido, o Brasil não deve abdicar de sua vocação para os produtos naturais, visto que possui a maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta e é detentor da maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta (MOREIRA, 2009).

## 1.2 A família Anacardiaceae

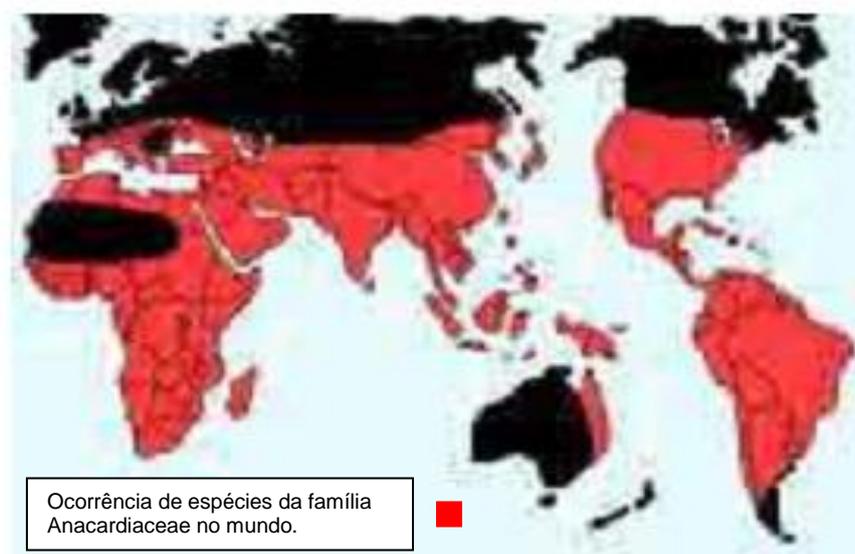
Anacardiaceae é uma família botânica que pertence ao reino Plantae, divisão das Angiospermas, classe Dicotyledoneas, subclasse Rosidae, ordem Sapindales.

Segundo dados da literatura (VOGL e MITCHELL, 1996) a família Anacardiaceae é composta por cerca de 76 gêneros e 600 espécies. Porém, de acordo com informações disponíveis na internet no endereço (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Anacardiaceae>) registra que a família é constituída por 70 gêneros que são mencionados a seguir: *Actinocheita*, *Anacardium*, *Androtium*, *Antrocaryon*, *Apterokarpus*, *Astronium*, *Baronia*, *Bonetiella*, *Bouea*, *Buchanania*, *Camptosperma*, *Cardenasiodendron*, *Choerospondias*, *Comocladia*, *Cotinus*, *Cyrtocarpa*, *Dracontomelon*, *Drimycarpus*, *Ebandoua*, *Euleria*, *Euroschinus*, *Faguetia*, *Fegimanra*, *Gluta*, *Haematostaphis*, *Haplorhus*, *Harpephyllum*, *Heeria*, *Holigarna*, *Koordersiodendron*, *Lannea*, *Laurophyllum*,

*Lithraea, Loxopterigium, Loxostylis, Mangifera, Mauria, Melanochyla, Metopium, Micronychia, Montagueia, Mosquitoxylum, Myracrodruon, Nothopegia, Ochotereneae, Operculicarya, Ozoroa, Pachycormus, Parishia, Pegia, Pentaspadon, Pistacia (pistachi), Pleiogynium, Poupartia, Protorhus, Pseudoprotorhus, Pseudosmodingium, Pseudospondias, Rhodosphaera, Rhus, Schinopsis, Schinus, Sclerocarya, Semecarpus, Smodingium, Solenocarpus, Sorindeia, Spondias, Swintonia, Tapirira, Thyrsodium, Toxicodendron, Trichoscypha.*

Os gêneros da família Anacardiaceae são subdivididos em cinco tribos: Anacardieae, Dobineae, Rhoeeae, Semecarpeae e Spondiadeae (CORREIA, DAVID & DAVID, 2006).

A distribuição das espécies da família Anacardiaceae ocorrem em uma extensa área global, sendo principalmente encontrada em regiões tropicais e subtropicais com algumas espécies também sendo encontradas em regiões temperadas (SILVA, CHINALIA & PAIVA, 2008) (Figura 2, p. 5).



Fonte: (MOREIRA, 2009)

**Figura 2.** Distribuição das espécies da família Anacardiaceae no mundo.

Algumas espécies da família Anacardiaceae são muito populares e são conhecidas em todo mundo, seja pela sua importância econômica e/ou pelo uso terapêutico. Podem ser citados como exemplo, a mangueira (*Mangifera indica* L.)

e o cajueiro (*Anacardium Occidentale* L.) que são espécies que apresentam grande importância econômica em virtude do amplo aproveitamento dos seus frutos (Figura 3, p. 6).



Fonte: (MOREIRA, 2009)

**Figura 3.** Frutos da mangueira e do cajueiro.

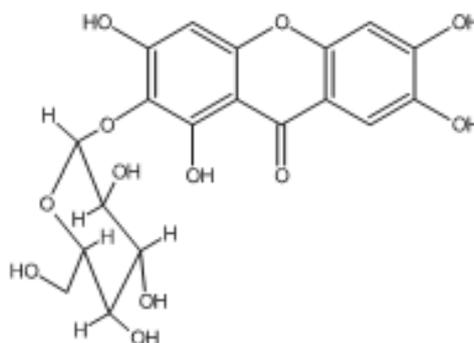
A mangueira (*Mangifera indica* L.), é uma árvore frutífera, nativa do sul e do sudeste asiáticos desde o leste da Índia até as Filipinas, e introduzida com sucesso no Brasil, em Angola, em Moçambique e em outros países tropicais. Os frutos (mangas) da mangueira (*Mangifera indica* L.) possuem um elevado valor comercial, principalmente em países de clima tropical como o Brasil, sendo um produto consumido pelo mercado interno e também é um produto de exportação. Os frutos (mangas) da mangueira (*Mangifera indica* L.) ocupam o quinto lugar entre os frutos tropicais comercializados no mercado internacional (GALAN, 1993).

Além da importância econômica da mangicultura e do largo consumo de sua fruta, a mangueira possui uso medicinal para tratamento de uma ampla variedade de enfermidades, não só no Brasil como em várias partes do mundo. Na Índia, as sementes são tradicionalmente indicadas para tratar a diarreia (SAIRAM *et al.*, 2003). A resina, extraída do caule, é empregada medicinalmente contra disenteria e sífilis (PIO-CORRÊA, 1974).

Estudos farmacológicos recentes demonstraram que extratos da mangueira possuem atividades antiviral, antibacteriana, analgésica, antiinflamatória (GARRIDO *et al.*, 2004; OJEWOLE, 2005; PARDO-ANDREU *et*

*al.*, 2008;), imunomodulatória (MAKARE *et al.*, 2001). Além disso, seu extrato hidroalcoólico exibiu propriedade antidiarreica (SAIRAM, 2003).

Mangiferina (1, 3, 6, 7 tetrahidroxixantona 2-glicopiranosídeo) é uma xantona com propriedades antioxidantes que já foi isolada em várias partes da *M. indica* (Figura 4, p. 7), como por exemplo folhas, frutos, casca do caule, cerne e raízes (MAKARE *et al.* 2001).



Fonte: (CORREIA, DAVID & DAVID 2006)

**Figura 4.** Estrutura da Mangiferina

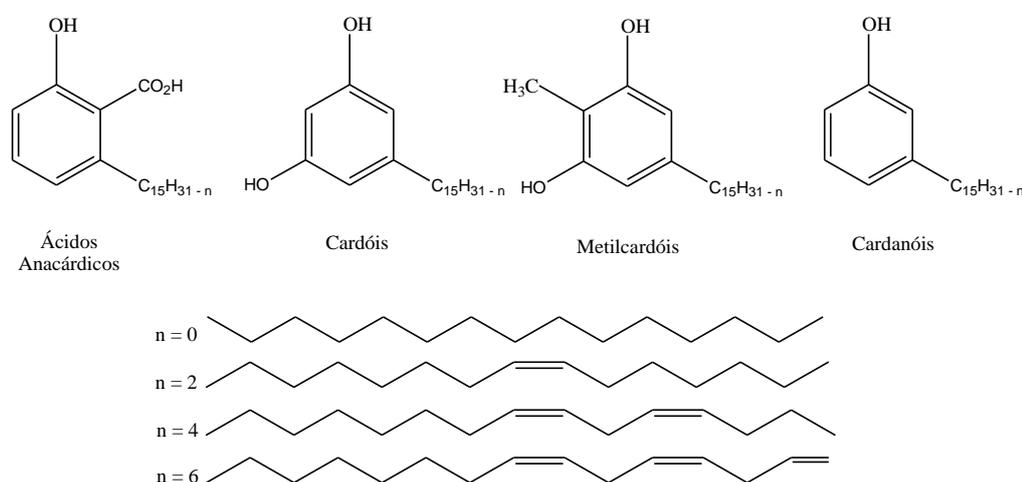
Estudos realizados com extratos aquosos das cascas do caule de uma variedade selecionada de *M. indica*, resultaram em uma formulação farmacêutica cujo nome fantasia é VIMANG®, o qual já foi demonstrado exercer atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. O componente predominante nesse extrato é a mangiferina (10%). (MOREIRA, 2009). Este fitoterápico de origem cubana tem sido utilizado para diversas enfermidades, tais como lupus eritematoso, a asma, desordens do sistema urinário e da próstata, a psoríase entre outros e é considerado um sucesso comercial da indústria farmacêutica daquele país.

Além da mangiferina, foram isolados de *M. indica* compostos fenólicos simples com comprovada atividade antioxidante, tais como ácido hidróxi-benzóico, galatos de alquila, ésteres do ácido benzóico, além dos flavonóides catequina e *epi*-catequina, e de seu látex foram identificados compostos conhecidos como lipídios fenólicos (CORREIA, DAVID & DAVID, 2006).

O cajueiro (*Anacardium Occidentale* L.) é uma árvore originária do norte e nordeste do Brasil, mas foi introduzido na África e na Índia. Seu fruto é popularmente conhecida como castanha de caju. Prologando-se ao fruto, existe

um pedúnculo (seu pseudofruto) maior, macio, também comestível, de cor alaranjada ou avermelhada; é geralmente confundido como fruto.

O cajueiro, além de ser muito conhecido pelo sabor e valor nutricional de suas amêndoas e pendúculos (pseudofruto), é uma cultura de grande importância sócio-econômica para o Brasil. A amêndoa e o líquido extraído da casca da castanha de caju (LCC) são produtos que são exportados para outros países. Os ácidos anacárdicos, juntamente com os alquilresorcinóis, constituem cerca de 90% da composição do LCC (Figura 5, p. 8) e apresentam propriedades tóxicas e irritantes (CORREIA, DAVID & DAVID, 2006).



**Figura 5.** Principais constituintes do LCC

Os princípios ativos presentes na bebida produzida do pedúnculo (seu pseudofruto), demonstraram atividade antitumoral, além disso, vários autores têm relatado que o ácido anacárdico presente no extrato da fruta, possui atividade antibacteriana, atividade moluscicida e citotóxica (COSTA, 2006).

Outro exemplo de espécie da família Anacardiaceae comercializada no Brasil é a *Schinus terebinthifolius*, conhecida popularmente como aroeira ou aroeira-vermelha. É uma espécie que apresenta ampla distribuição geográfica e plasticidade ecológica (LORENZI, 1998). É uma árvore de rara beleza, principalmente quando brotam seus frutos, o que a torna apreciada para cultivo como planta ornamental (Figura 6, p. 9). Contudo, os frutos de *Schinus*

*terebinthifolius* não devem ser consumidos, uma vez que sua ingestão pode provocar intoxicação com vômitos e diarreia, inflamação das mucosas e irritação gástrica. Apesar disto, seus frutos secos são empregados para falsificação da pimenta do reino, uma vez que possui odor parecido (CARDOSO, 2007).

A madeira da espécie *Schinus terebinthifolius* têm diversas aplicações, uma vez que são madeiras resistentes e de grande durabilidade. São amplamente usadas para vigamento de construções, postes, estacas e outras aplicações que necessitem de madeira dura e pesada.



Fonte: (CARDOSO, 2007)

**Figura 6.** Frutos de *Schinus terebinthifolius*

São também importantes outras espécies da família Anacardiaceae pertencentes aos gêneros *Astronium*, *Schinopsis* e *Tapirira*, pelo fornecimento de madeira amplamente utilizadas na construção, do gênero *Rhus* por sua resina e dos gêneros *Schinus* e *Schinopsis* pelos pigmentos (CORREIA, 1999).

Além das espécies economicamente importantes, a família Anacardiaceae é bastante conhecida por apresentar algumas espécies consideradas venenosas. Cerca de 25% dos gêneros dessa família são conhecidos por possuírem espécies reconhecidas como tóxicas e causadoras de dermatite de contato severa. De modo geral, as espécies venenosas desta família estão restritas às tribos Anacardieae, Rhoeeae e Semecarpeae (CORREIA, *et al* 2008). Presume-se que a principal função dos metabólitos secundários dessas espécies é atuar como defensivo contra ataques de vertebrados e insetos herbívoros.

A dermatite de contato provocada por algumas espécies dessa família é atribuída principalmente a compostos fenólicos e catecólicos ou a mistura destas

substâncias, denominados lipídios fenólicos. Estas substâncias podem estar presentes em diferentes partes do material vegetal, ocorrendo principalmente em espécies do gênero *Rhus*. Nos últimos anos, a origem dos lipídios fenólicos e derivados também foi objeto de investigação; além disso, espécies da família Anacardiaceae têm se mostrado bastante promissoras na busca de substâncias bioativas (CORREIA, DAVID & DAVID, 2006).

Do ponto de vista químico, os gêneros mais estudados nesta família são *Mangifera*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Anacardium*, *Spondias*, *Lannea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira* e *Melanorrhoea*. *Mangifera*, *Rhus* e *Anacardium* destacam-se pelo número de investigações relativas à composição química de suas espécies e atividades biológicas de seus extratos e metabólitos. Os estudos destas espécies possibilitaram verificar a ocorrência de flavonóides, terpenos, esteróides, xantonas e, principalmente, dos lipídios fenólicos e derivados. Destaca-se que, entre os flavonóides, os biflavonóides são os mais freqüentes (CORREIA, DAVID & DAVID, 2006).

Deste modo, fica evidente o interesse em estudar a família Anacardiaceae. Espécies dessa família têm se mostrado bastante promissoras na busca de novos metabólitos bioativas.

### 1.3 O gênero *Tapirira*

O gênero *Tapirira* é um dos 76 gêneros que pertencem à família Anacardiaceae. Com relação ao número de espécies do gênero, na literatura existe discrepância quanto as espécies identificadas. Segundo DAVID *et al* (1998) o gênero *Tapirira* é composto de aproximadamente 15 espécies. Porém ROUMY, V. *et al* (2009) afirmam que são aproximadamente 35 espécies. De acordo com informações disponíveis na internet [([http://zipcodezoo.com/Plants/T/Tapirira\\_brenesii/](http://zipcodezoo.com/Plants/T/Tapirira_brenesii/)), (<http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Tapirira&commonname=>)] o gênero *Tapirira* é composto de aproximadamente 32 espécies que são mencionados a seguir: *Tapirira bethanniana* J.D. Mitch, *T. bijuga* Hook. f. ex Marchand, *T. brenesii* Standl., *T. caffra* Marchand, *T. chagrensis* Pittier, *T. chimalapana* T.Wendt & J.D.Mitchell., *T. clarnoensis* Manchester, *T. cyrtocarpa*

Benth. & Hook.f. ex Hemsl., *T. discolor* Marchand, *T. dunstervilleorum* Steyererm., *T. durhamii* Miranda, *T. edulis* Brandegeee, *T. extensa* (Wall.) Hook. f. ex Marchand, *T. fanshawei* Sandwith, *T. guianensis* Aubl., *T. hirsuta* Hu, *T. humilis* Marchand, *T. macrophylla* Lundell, *T. marchandii* Engl., *T. mexicana* Marchand, *T. myriantha* Triana & Planch., *T. obtusa* (Benth.) J.D. Mitch., *T. pao-pombo* Marchand, *T. pearcei* Rusby, *T. peckoltiana* Engl., *T. pilosa* Sprague, *T. purpusii* Brandegeee, *T. retusa* Ducke, *T. rubrinervis* Barfod, *T. velutina* Marchand, *T. velutinifolia* (Cowan) L.Marcano Berti, *T. wodier* Marchand.

Com relação à distribuição das espécies do gênero *Tapirira* no mundo, essas podem ser encontradas desde o México até a América do Sul, apresentando-se como árvores ou arbustos (STANDLEY, P. C. & STEYERMARK, J. A., 1949).

A literatura reporta que a quantidade de espécies identificadas do gênero *Tapirira* no Brasil, resume-se a somente quatro espécies; *Tapirira guianensis* Aubl., *T. obtusa* (Benth.) J.D.Mitch., *T. pilosa* Sprague e *T. retusa* Ducke (FORZZA, *et al* 2010). Dentre elas *T. guianensis* é a espécie mais comum.

A distribuição geográfica no Brasil de *T. guianensis* Aubl., acontece em várias regiões do Brasil. No Norte (Pará, Amazonas, Tocantins, Acre, Rondônia), Nordeste (Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) e na região Sul (Paraná, Santa Catarina) (SILVA-LUZ, C.L. & PIRANI, J.R., 2010).

A espécie *T. obtusa* (Benth.) J.D.Mitch. é uma espécie de origem nativa, não endêmica do Brasil, conhecida popularmente por pau-pombo, pode ser encontrada nas regiões Norte (Amazonas, Tocantins, Acre), Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul) e no Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) (SILVA-LUZ, C.L. & PIRANI, J.R., 2010).

A espécie *Tapirira pilosa* Sprague, tem distribuição geográfica no Brasil restrita à região Norte (Amazonas). É uma espécie de origem nativa, não endêmica do Brasil (SILVA-LUZ, C.L. & PIRANI, J.R., 2010).

Com relação a espécie *Tapirira retusa* Ducke, também, é uma espécie de origem nativa, não endêmica do Brasil. Também só pode ser encontrada na região Norte (Pará, Amazonas, Acre) (SILVA-LUZ, C.L. & PIRANI, J.R., 2010).

Diante do universo de espécies do gênero *Tapirira*, pode-se dizer que são encontrados poucos relatos na literatura sobre estudos fitoquímicos e de avaliação da atividade biológica de espécies desse gênero. É reportado na literatura que a primeira espécie do gênero *Tapirira* estudada do ponto de vista fitoquímico, foi a espécie *T. guianensis*. Este estudo foi realizado por DAVID, J. M. *et al* (1998) e reportou a composição química, bem como a atividade biológica dos metabólitos presentes nas sementes da *T. guianensis*. Em continuidade a esse trabalho, foram realizados estudos fitoquímicos das cascas de *T. guianensis* e de *T. obtusa* (CORREIA, 1999). Nestas duas espécies foram isoladas substâncias com atividades anticancerígenas bastante pronunciadas.

#### **1.4 Aspectos gerais de *Tapirira guianensis* Aubl.**

*Tapirira guianensis* Aubl., é uma espécie arbórea que mede de 8 a 14 metros de altura, com tronco curto de 40 a 60 centímetros de diâmetro (Figura 7, p.13). Essa espécie pode ser encontrada em todo território brasileiro, principalmente em terrenos úmidos, em quase todas as formações vegetais. Floresce durante os meses de agosto-dezembro, sendo que, seus frutos amadurecem a partir de janeiro, prolongando até março (LORENZI, 2002).

Dois aspectos peculiares são observados nessa espécie, seus frutos são muito procurados por pássaros, insetos e, mamíferos e suas folhas, quando verdes, são conhecidas por serem venenosas (CORREIA, 1999).

Sua madeira é considerada leve, macia ao corte, rija, possui superfície uniforme, textura fina a média, de baixa resistência ao ataque de organismos xilófagos (cupins ou térmitas) (LORENZI, 1992). A madeira, por ser fácil de trabalhar, é muito empregada na confecção de brinquedos, compensados, embalagens e caixotaria leve, móveis comuns, entalhes, saltos para calçados, cabos de vassouras, etc. Além disso, a árvore pode ser empregada com sucesso nos reflorestamentos heterogêneos de áreas degradadas de preservação

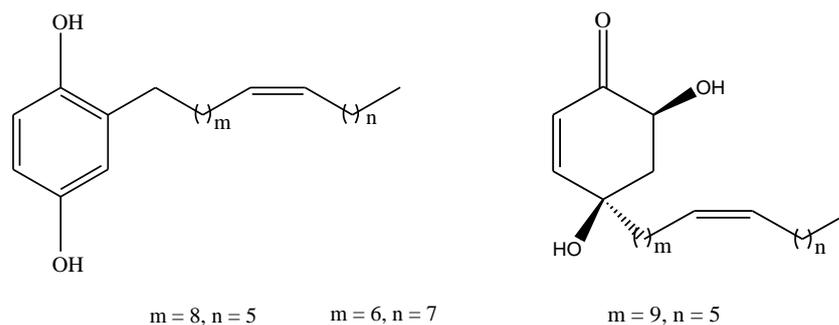
permanente, principalmente de locais úmidos, graças à tolerância a esse ambiente e à produção de frutos altamente procurados pela fauna em geral.

A espécie *T. guianensis* é conhecida popularmente por “pau-pombo”, e suas cascas e folhas são utilizadas na medicina popular contra lepra, diarreia e sífilis (DAVID *et al*, 1998).



**Figura 7:** Fotografia da *Tapirira guianensis*

Do ponto de vista fitoquímico, o primeiro relato na literatura a respeito da fitoquímica da espécie *T. guianensis* foi realizado por DAVID, J. M. *et al* (1998) quando reportou a composição química, bem como a atividade biológica dos metabólitos presentes nas sementes dessa espécie. Do fracionamento do extrato metanólico das sementes foram isolados dois compostos citotóxicos (Figura 8, p. 14).

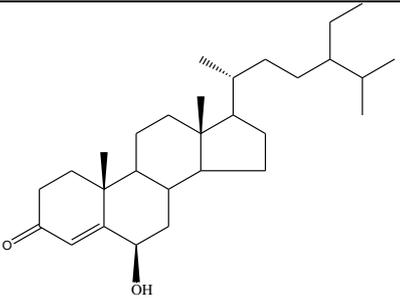
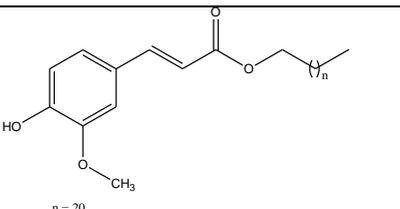
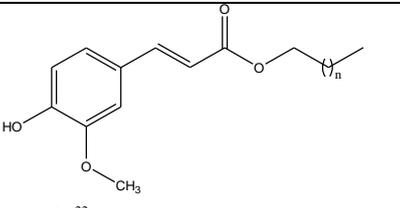
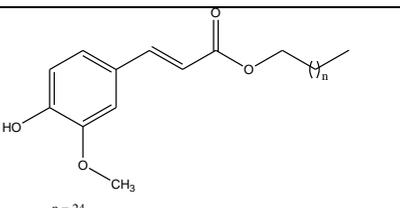
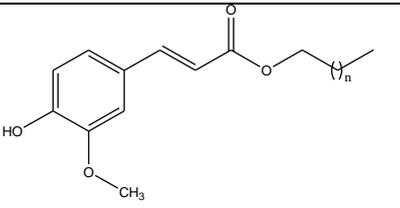
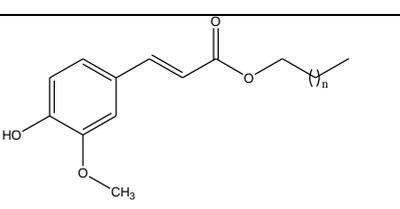
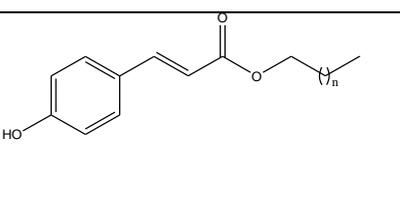


**Figura 8.** Compostos isolados das sementes de *T. guianensis*

A relatos na literatura sobre o isolamento e elucidação de estrutural de metabólitos secundários das cascas de *T. guianensis*. Dos extratos hexânicos e clorofórmico foram isolados dez substâncias já conhecidas:  $\beta$ -sitosterol, estigmast-4-en-3-ona, estgmast-4-en-3-one-6- $\beta$ -ol, 3- $\beta$ -O- $\beta$ -glicopiranositosterol, além de mistura de cinco ésteres derivados do ácido ferúlico e um éster derivado do ácido *p*-cumárico (CORREIA, 2003), Quadro 1.

**Quadro 1.** Compostos isolados das cascas de *T. guianensis*

Nome da substância	Estrutura	Fase extrativa
<i><math>\beta</math>-sitosterol</i>		<i>Clorofórmica</i>
<i>3<math>\beta</math>-O-<math>\beta</math>-D-glu copiranosil-sitosterol</i>		<i>Hexânica</i>
<i>Estigmast-4-en-3-ona</i>		<i>Hexânica</i>

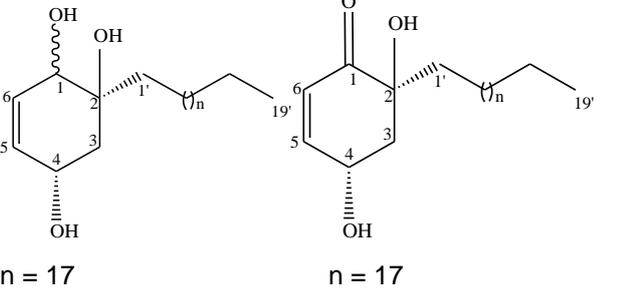
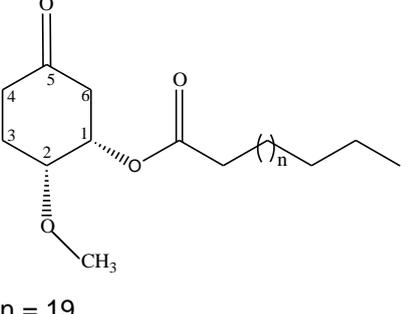
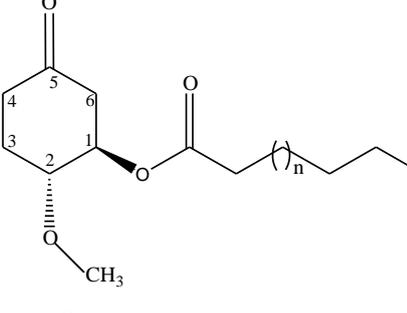
<i>Estigmast-4-en-6<math>\beta</math>-ol-3-ona</i>		<i>Clorofórmica</i>
<i>Ferulato de dodecosila</i>	 <p>n = 20</p>	<i>Hexânica</i>
<i>Ferulato de tetracosila</i>	 <p>n = 22</p>	<i>Hexânica</i>
<i>Ferulato de hexacosila</i>	 <p>n = 24</p>	<i>Hexânica</i>
<i>Ferulato de octacosila</i>	 <p>n = 26</p>	<i>Hexânica</i>
<i>Ferulato de triacontila</i>	 <p>n = 28</p>	<i>Hexânica</i>
<i>p-Cumarato de nonadecila</i>	 <p>n = 17</p>	<i>Clorofórmica</i>

A literatura também reporta sobre o estudo fitoquímico das folhas de espécimens de *T. guianensis* coletadas na Mata Atlântica e Campo Rupestre baiano. Nesse trabalho foram isolados e identificados da fase metanólica do extrato hexânico uma série de novos hidrobenzofuranóides (Quadro 2). Além dessas substâncias, foram isolados da fase hexânica do extrato metanólico, em mistura o (2*S*, 4*S*)-2-nonadecilciclo-hex-5-eno-1,2,4-triol e (4*S*,6*S*)-6-nonadecil-4,6-di-hidroxíciclo-hex-2-en-1-ona. Do mesmo extrato também foram isolados e proposto a estrutura de dois componentes epiméricos o tetracosanoato de (1*R*,2*R*)-2-metoxi-5-oxociclo-hexila e o tetracosanoato de (1*S*, 2*R*)-2-metoxi-5-oxociclo-hexila (Quadro 3). Além disso, desse mesmo extrato foram isolados e identificados terpenóides comuns, livres e esterificados com ácidos graxos (CORREIA, 2005), Quadro 4.

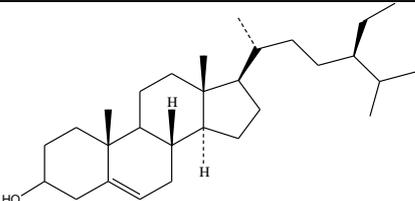
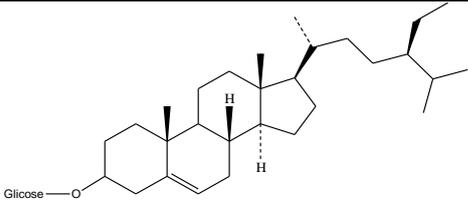
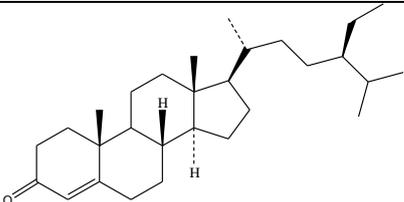
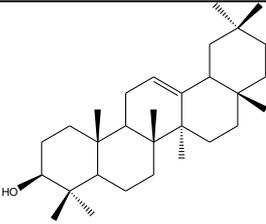
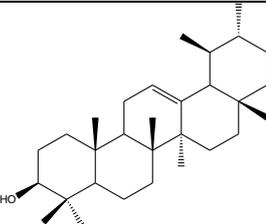
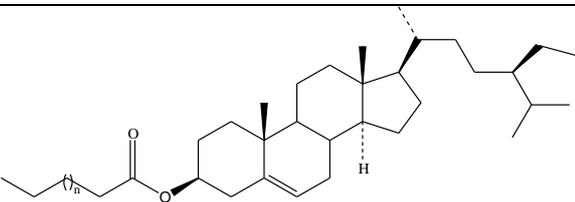
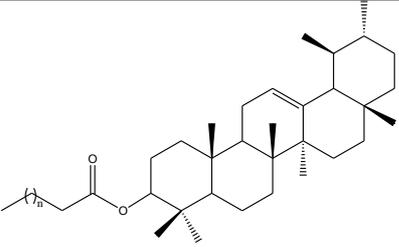
**Quadro 2.** Novos hidrobenzofuranóides isolados das folhas de *T. guianensis*

Nome da substância	Estrutura
(2 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>aR</i> )-2-[8' <i>Z</i> ]-pentadec-8'-enil]-hexa-hidro-1-benzofurano-3 <i>a</i> ,5,6,7 <i>a</i> -tetrol	
(2 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>aR</i> )-2-[8' <i>Z</i> ]-pentadec-8'-enil]-7 <i>a</i> -metoxi-hexa-hidro-1-benzofurano-3 <i>a</i> ,5,6(4 <i>H</i> )-triol	
(2 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>aS</i> )-2-[8' <i>Z</i> ]-pentadec-8'-enil]-6,7 <i>a</i> -dimetoxi-hexa-hidro-1-benzofurano-3 <i>a</i> ,5(4 <i>H</i> )-diol	
2 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>aS</i> )-2-[8' <i>Z</i> ]-pentadec-8'-enil]-hexa-hidro-1-benzofurano-3 <i>a</i> ,5,6,7 <i>a</i> -tetrol	
(2 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>aS</i> )-2-[heptadecil]-hexa-hidro-1-benzofurano-3 <i>a</i> ,5,6,7 <i>a</i> -tetrol	
3 <i>a</i> ,7 <i>a</i> -di-hidroxi-2-[(8' <i>Z</i> )-heineicosan-8'-enil]-2,3,3 <i>a</i> ,7 <i>a</i> -tetra-hidro-1-benzofuran-5(4 <i>H</i> )-ona	

**Quadro 3.** Substâncias isolados das folhas de *T. guianensis*

Nome da substância	Estrutura
Mistura de (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> )-2-nonadecilciclo-hex-5-eno-1,2,4-triol e (4 <i>S</i> ,6 <i>S</i> )-6-nonadecil-4,6-dihidroxi-ciclo-hex-2-en-1-ona	 <p><math>n = 17</math> <math>n = 17</math></p>
Tetracosanoato de (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> )-2-metoxi-5-oxociclo-hexila	 <p><math>n = 19</math></p>
Tetracosanoato de (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )-2-metoxi-5-oxociclo-hexila	 <p><math>n = 19</math></p>

**Quadro 4.** Compostos isolados das folhas de *T. guianensis*

Nome da substância	Estrutura
Sitosterol	
Sitosterol glicosilado	
Sitostenona	
β-amirina	
α-amirina	
Alcanoatos de sitosterila (em mistura)	
Alcanoatos de α-amirina	 <p data-bbox="911 1973 1187 2007">n=1, n=15, n=17, n=19</p>

## 2. Objetivos

### 2.1 Gerais

Este trabalho tem como objetivos gerais:

- ❖ Isolar novos constituintes químicos presentes nas sementes da espécie *Tapirira guianensis*;
- ❖ Contribuir para o conhecimento químico e taxonômico das espécies da família Anacardiaceae presentes no estado da Bahia.

### 2.2 Específicos

- ❖ Isolar, através de métodos cromatográficos, os constituintes químicos provenientes do metabolismo secundário presentes na fase diclorometânica das sementes de *Tapirira guianensis*;
- ❖ Determinar as estruturas das substâncias isoladas através de métodos espectrométricos como RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  mono e bidimensionais (HMBC e HMQC), além de IV e, comparação com dados da literatura;
- ❖ Avaliar o perfil de ácidos graxos presentes nos extratos hexânicos das folhas e das sementes de *Tapirira guianensis*;
- ❖ Avaliar atividade citotóxica das fases diclorometânicas das folhas e sementes de *Tapirira guianensis* através do bioensaio de letalidade sobre *Artemia salina*;
- ❖ Avaliar atividade alelopática das fases diclorometânicas das folhas e sementes de *Tapirira guianensis* através do bioensaio de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.).

### **3. Parte experimental**

#### **3.1 Local**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Produtos Naturais (GPPN) situado no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia com apoio do Laboratório de Produtos Naturais (LPPN) localizado na Faculdade de Farmácia.

#### **3.2 Coleta da espécie *Tapirira guianensis***

As folhas da espécie *Tapirira guianensis* foram coletados no dia 28 de julho de 2009 no Campus de Ondina da Universidade Federal da Bahia, na cidade de Salvador-BA. A coleta foi realizada numa região localizada nas proximidades do Instituto de Química. Enquanto que as sementes da espécie *Tapirira guianensis* foram coletados no dia 05 de fevereiro de 2010 no Campus de Ondina da Universidade Federal da Bahia, na cidade de Salvador-BA. A coleta foi feita numa região localizada nas proximidades do Instituto de Biologia.

#### **3.3 Materiais e métodos**

As folhas e as sementes foram secas previamente em estufa sob ventilação com temperatura de cerca 40°C. Em seguida foram moídas em liquidificador e submetidas a extração com solventes orgânicos.

Os solventes empregados no preparo dos extratos, nas eluições das cromatografias em placa e coluna (hexano, metanol, clorofórmio, acetato de etila e diclorometano) foram de grau analítico da marca Quimex. Os solventes foram evaporados à pressão reduzida utilizando-se evaporador rotatório da marca LABOROTA 4000.

Nos processos de separação por CC os adsorventes utilizados como fase estacionária foram gel de sílica 60, com diâmetro de partícula entre 0,063-0,200 nm e sílica Flash com diâmetro de partícula entre 0,040-0,063 mm, ambas de

procedência da Acros Organics. Nas CCDC foram utilizadas placas pré-preparadas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> da Merck. As placas de CCDC foram reveladas com luz UV (254/365 nm), vapores de iodo e/ou reagente de Liebermann-Burchard.

O reagente de Liebermann-Burchard foi preparado a partir da adição cuidadosa da mistura de 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e 10 mL de anidrido acético à 50 mL de etanol resfriado em banho de gelo. No procedimento de revelação, a placa eluída foi borrifada com esse reagente e posteriormente aquecida em placa de aquecimento a 100°C. O resultado positivo para esteróides e triterpenos constitui na coloração azul ou rósea nas manchas eluídas.

Os espectros na região do Infravermelho foram obtidos num espectrofotômetro SHIMADZU modelo IRAFFINITY-1. Para obtenção de espectros no IV em filme, as amostras foram solubilizadas em clorofórmio. Enquanto que, em pastilha, foi empregado KBr seco da MERCK. As pastilhas foram preparadas na concentração de aproximadamente 1% de amostra.

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) e de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz), bem como os espectros bidimensionais foram obtidos em espectrômetro VARIAN GEMINI 2000 e num Bruker Advance. Na obtenção foram utilizados solventes deuterados como CDCl<sub>3</sub>.

Os espectros de massas das substâncias isoladas foram registrados no LC-MS da SHIMADZU, MODELO LCMS 2010 com inserção direta, modo SCAN, faixa *m/z* 50-500, modo negativo.

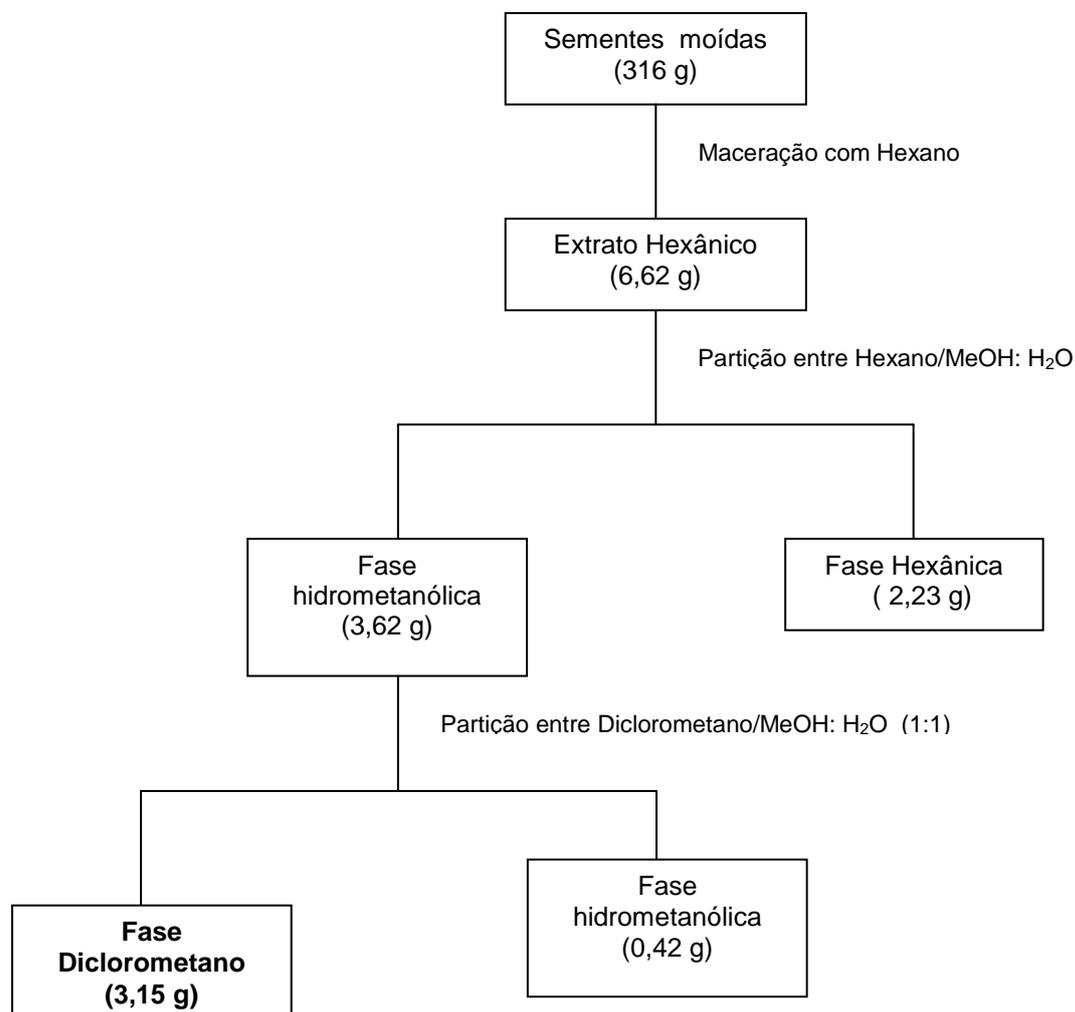
As análises por Cromatografia gasosa (CG) para separação e identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes nos extratos hexânicos das folhas e das sementes de *T. guianensis* foram realizadas num equipamento SHIMADZU (GC MS-QP2010 Plus).

### **3.4 Preparação dos extratos**

#### **3.4.1 Obtenção da fase diclorometano do extrato hexânico das sementes de *Tapirira guianensis***

As sementes coletadas foram submetidos previamente a secagem em estufa com ventilação por 48 horas a 40°C. Em seguida, os frutos foram moídos em liquidificador, pesados tendo como massa 316 g, sendo posteriormente submetido a processo de maceração com hexano por três vezes consecutivas e com intervalo de 48 horas. O filtrado obtido em cada etapa foi reunido e concentrado sob pressão reduzida em rota evaporador fornecendo o extrato hexânico que foi pesado obtendo massa de 6,62 g.

Em seguida, o extrato hexânico obtido foi particionado com metanol/água (95:5) para obtenção das fases hexânica e hidrometanólica, que foram concentradas e pesadas. Para obtenção da fase diclorometano, a fase hidrometanólica foi solubilizada em metanol/água (1:1) e particionada com diclorometano, resultando na fase diclorometano. O procedimento experimental empregado encontra-se ilustrado a seguir na Figura 9.



**Figura 9.** Procedimento experimental de obtenção da fase diclorometano do extrato hexânico das sementes de *T. guianensis*.

### 3.4.2 Obtenção do extrato hexânico das folhas de *Tapirira guianensis* para avaliação do perfil de ácidos graxos

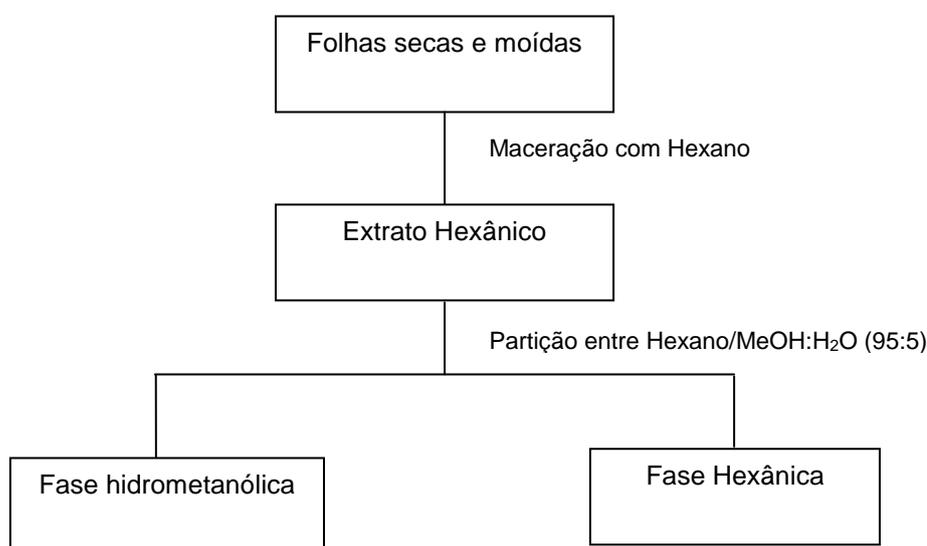
As folhas de *Tapirira guianensis* foram secas em estufa de ar circulante a 40°C e após secagem as folhas foram moídas em liquidificador. As folhas moídas foram devidamente pesadas (Tabela 1), sendo em seguida submetida a processo de maceração com hexano por três vezes consecutivas e com intervalo de 48h. A

fase hexânica líquida obtida foi concentrada sob pressão reduzida em rota evaporador fornecendo o extrato hexânico.

Em seguida, o extrato hexânico foi particionado com metanol/água (95:5) para obtenção das fases hexânicas e hidrometanólicas, que foram concentradas e devidamente pesadas.

As massas dos extratos e fases orgânicas obtidos encontram-se registradas na Tabela 1.

O procedimento experimental de obtenção dos extratos/fases encontra-se ilustrado na Figura 10.



**Figura 10.** Fluxograma de obtenção dos extratos hexânicos das folhas de *Tapirira guianensis*

**Tabela 1.** Massas dos extratos e fases orgânicas das folhas de *Tapirira guianensis*

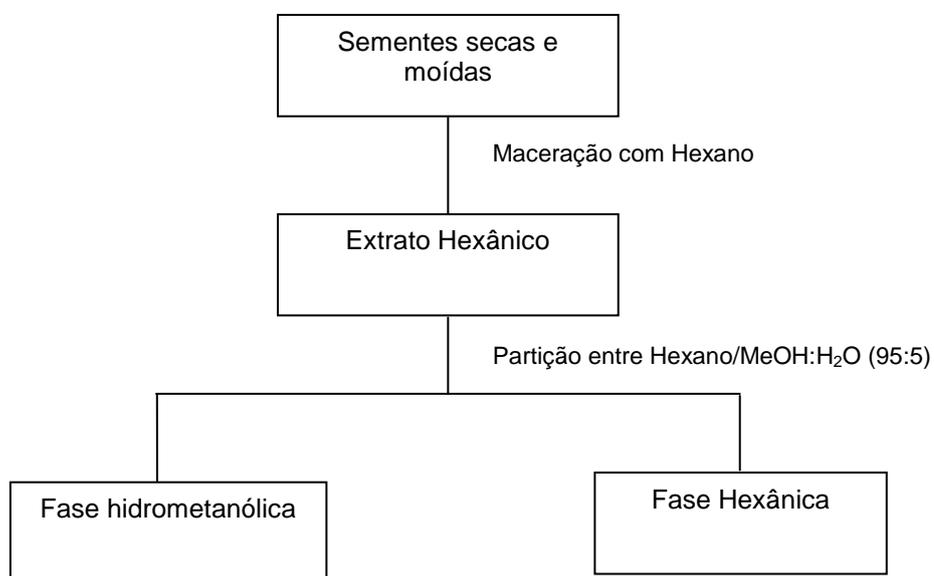
Material	Massas
Folhas secas e moídas	35,08 g
Extrato hexânico (EHF)	1,19 g
Fase hexânica (FHF)	0,71 g
Fase hidrometanólica (FHiF)	0,40 g

### 3.4.3 Obtenção do extrato hexânico das sementes de *Tapirira guianensis* para avaliação do perfil de ácidos graxos

As sementes de *Tapirira guianensis* foram secas em estufa de ar circulante a 40°C e após secagem as sementes foram moídas em liquidificador. As sementes trituradas foram devidamente pesadas. Posteriormente as sementes trituradas foram submetidas a processo de maceração com hexano por três vezes consecutivas e com intervalo de 48h. A fase hexânica líquida obtida foi concentrada sob pressão reduzida em rota evaporador fornecendo o extrato hexânico.

Em seguida, o extrato hexânico foi particionado com metanol/água (95:5) para obtenção das fases hexânica e hidrometanólica, que foram concentradas e pesadas (Tabela 2).

O procedimento experimental de obtenção dos extratos e fases encontra-se ilustrado na Figura 11.



**Figura 11.** Fluxograma de obtenção dos extratos orgânicos das sementes de *Tapirira guianensis*

**Tabela 2.** Massas dos extratos e fases orgânicas das sementes de *Tapirira guianensis*

<b>Material</b>	<b>Massas</b>
Sementes secas e moídas	10,05 g
Extrato hexânico (EHS)	1,20 g
Fase hexânica (FHS)	1,01 g
Fase hidrometanólica (FHiS)	0,19 g

### 3.5 Fracionamento da fase diclorometano do extrato hexânico das sementes de *T. guianensis*

A fase diclorometano do extrato hexânico (TGDS) com massa de 3,15 g foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 60 utilizando como fase móvel uma mistura de diclorometano (DCM) e metanol (CH<sub>3</sub>OH) em gradiente crescente de polaridade. As 19 frações obtidas neste procedimento foram monitoradas por CCDC, utilizando como reveladores, irradiação por luz UV nos comprimentos de onda de 245nm e 365nm e iodo. Após esse monitoramento por CCDC, as frações foram agrupadas como mostra a Tabela 3.

**Tabela 3.** Frações obtidas da CC da fase TGDS

<b>(código)</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Eluente aplicado</b>	<b>Proporção (%)</b>
TGDS-1	1-2	DCM	100
TGDS-2	3	DCM	100
TGDS-3	4	DCM	100
TGDS-4	5-10	DCM	100
TGDS-5	11	DCM	100
TGDS-6	12	DCM	100
TGDS-7	13-14	DCM / CH <sub>3</sub> OH	95:5
TGDS-8	15	DCM / CH <sub>3</sub> OH	95:5
TGDS-9	16	DCM / CH <sub>3</sub> OH	95:5
TGDS-10	17	DCM / CH <sub>3</sub> OH	90:10
TGDS-11	18	DCM / CH <sub>3</sub> OH	50:50
TGDS-12	19	CH <sub>3</sub> OH	100

### Purificação da fração TGDS-4

A fração TGDS-4 (158,3 mg) foi submetida a CC empregando sílica Flash como fase estacionária e como fase móvel foi utilizado mistura de DCM/CH<sub>3</sub>OH em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 15 frações que foram agrupadas em 11 novas frações com base na análise da CCDC (Tabela 4), utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e o reagente de Lieberman-Burchard. Desse procedimento foi possível isolar da fração TGDS-4-7 a mistura de três substâncias **S1**, **S2** e **S3**. Além disso, da fração TGDS-4-10 foi isolado a substância **S4**.

**Tabela 4.** Frações obtidas da CC da fração TGDS-4

<b>(código)</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Eluente aplicado</b>	<b>Proporção (%)</b>
TGDS-4-1	1	DCM	100
TGDS-4-2	2	DCM	100
TGDS-4-3	3	DCM	100
TGDS-4-4	4-6	DCM	100
TGDS-4-5	7	DCM	100
TGDS-4-6	8-9	DCM	100
TGDS-4-7	10	DCM	100
TGDS-4-8	11-12	DCM / CH <sub>3</sub> OH	95:5
TGDS-4-9	13	DCM / CH <sub>3</sub> OH	50:50
TGDS-4-10	14	DCM / CH <sub>3</sub> OH	50:50
TGDS-4-11	15	CH <sub>3</sub> OH	100

### Purificação da fração TGDS-4-8

Essa fração (27,5 mg) foi submetida a cromatografia por exclusão, empregando-se SEPHADEX-LH 20 como fase estacionária e como eluentes a mistura de DCM/ CH<sub>3</sub>OH (50:50). Foram coletadas 7 frações de 20 mL que foram agrupadas em 6 novas frações com base na CCDC (Tabela 5). A sub-fração TGDS-4-8-6 (8,7 mg) apresentou semelhança com a fração TGDS-4-7. Essa semelhança pode ser observada através da análise dos cromatogramas obtidos por meio CCDC, sendo posteriormente confirmada pela análise dos espectros de RMN (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C), que a sub-fração TGDS-4-8-6 era formada também pela mistura das três substâncias **S1**, **S2** e **S3** isoladas da fração TGDS-4-7.

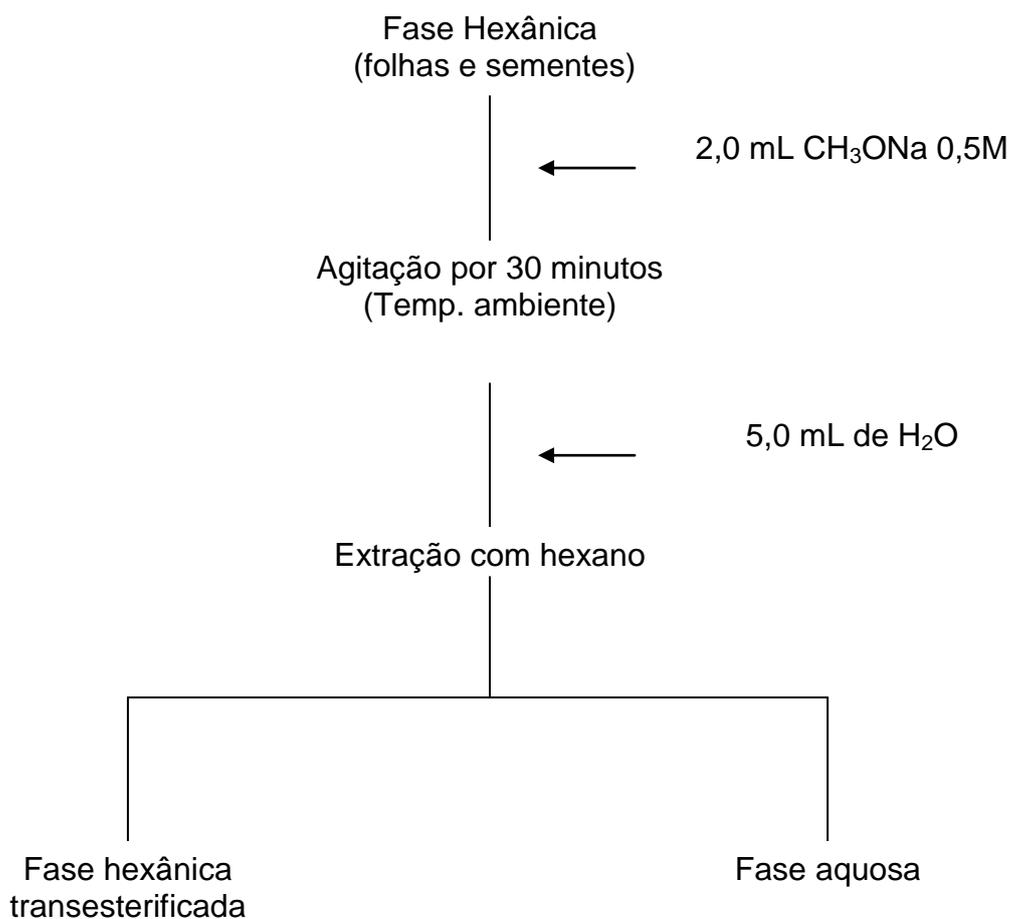
**Tabela 5.** Frações obtidas da CC da fração **TGDS-4-8**

<b>(código)</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Eluente aplicado</b>	<b>Proporção (%)</b>
TGDS-4-8-1	1	DCM / CH <sub>3</sub> OH	50:50
TGDS-4-8-2	2	DCM / CH <sub>3</sub> OH	50:50
TGDS-4-8-3	3	DCM / CH <sub>3</sub> OH	50:50
TGDS-4-8-4	4	DCM / CH <sub>3</sub> OH	50:50
TGDS-4-8-5	5	DCM / CH <sub>3</sub> OH	50:50
TGDS-4-8-6	6-7	DCM / CH <sub>3</sub> OH	50:50

### 3.6 Reações de derivatização

#### 3.6.1 Reação de transesterificação

O procedimento empregado na obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos presentes nas fases hexânicas das folhas e das sementes consistiu no tratamento de 25,0 mg de cada fase hexânica com solução de metóxido de sódio (0,5 M) em metanol (2,0 mL). O isolamento dos ésteres metílicos foi realizado após adição de água destilada à mistura reacional, seguido de extração líquido-líquido com hexano (CORREIA, 2005). O fluxograma desse procedimento encontra-se ilustrado na Figura 12.



**Figura 12.** Fluxograma de obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos presentes nas fases hexânicas

### 3.6.2 Reação de tioalquilação

As substâncias contendo cadeia alquílica insaturada foram submetidas à reação de adição com dissulfeto de dimetila, utilizando iodo resublimado como catalisador. O procedimento utilizado consistiu em tratar 3,0 mg da amostra com 1,0 mL do dissulfeto de dimetila seguido da adição de 100  $\mu\text{L}$  de solução de iodo (6 mg/1000  $\mu\text{L}$ ). O sistema foi purgado com nitrogênio e mantido fechado sob agitação magnética por 24-48 h em temperatura ambiente, tratando-se em seguida o sistema com 1 mL de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 5%. Posteriormente a mistura binária foi separada em funil de separação, e o solvente foi eliminado à pressão reduzida em evaporador rotatório (CORREIA, 2005).

### **3.7 Avaliação do perfil de ácidos graxos presentes nas folhas e sementes de *T.guianensis***

#### **3.7.1 Perfil de ácidos graxos presentes na fase hexânica das folhas de *T.guianensis***

A fase hexânica (FHF) das folhas da espécie *T. guianensis* foram submetidas a reações de transesterificação, através da metodologia descrita no item **3.6.1**. Esse procedimento de obtenção da fase Hexânica transesterificada foi realizado em triplicata.

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes em cada fase hexânica transesterificada foram analisados através de injeção de 1 mL da fase orgânica em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) da Shimadzu modelo QP2010, equipado com coluna Rtx®-1 MS (Crossbond® 100% dimetil polisiloxano) de 30 m de comprimento, com 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. As condições de operação foram: temperatura programada da coluna de 80 °C por 2 min, taxa de aquecimento 10 °C min<sup>-1</sup> até 140 °C com taxa de aquecimento 3°C min<sup>-1</sup> até 200 °C mantida por 10 min, com taxa de aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup> até 230°C, com taxa de aquecimento de 20 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C mantida por 0,83 min; temperatura do injetor: 280 °C; temperatura da interface: 260 °C; hélio foi empregado como gás de arraste, com fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas operando na forma *scan*; voltagem do filamento de 70 eV; voltagem do detector de 1,3 KV; analisador do tipo quadrupolo. Os ésteres metílicos foram identificados através de comparação com os espectros de massas das bibliotecas NIST 147 e WILEY 8.

#### **3.7.2 Perfil de ácidos graxos presentes na fase hexânica das sementes de *T.guianensis***

A fase hexânica (FHS) das sementes da espécie *T. guianensis* foram submetidas a reações de transesterificação, através da metodologia descrita no

item **3.6.1**. Esse procedimento de obtenção da fase hexânica transesterifica foi realizado em triplicata.

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes em cada fase hexânica transesterificada foram analisados através de injeção de 1 mL da fase orgânica em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) da Shimadzu modelo QP2010, equipado coluna Rtx®-1 MS (Crossbond® 100% dimetil polisiloxano) de 30 m de comprimento, com 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. As condições de operação foram: temperatura programada da coluna de 100 °C por 2 min, taxa de aquecimento 10 °C min<sup>-1</sup> até 140 °C com taxa de aquecimento 5°C min<sup>-1</sup> até 180 °C mantida por 15 min, com taxa de aquecimento de 3°C min<sup>-1</sup> até 230°C, com taxa de aquecimento de 20 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C mantida por 0,83 min; temperatura do injetor: 280 °C; temperatura da interface: 260 °C; hélio foi empregado como gás de arraste, com fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas operando na forma *scan*; voltagem do filamento de 70 eV; voltagem do detector de 1,3 KV; analisador do tipo quadrupolo. Os ésteres metílicos foram identificados através de comparação com os espectros de massas das bibliotecas NIST 147 e WILEY 8.

### **3.8 Bioensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina***

O ensaio de toxicidade sobre as larvas de *Artemia Salina* LEACH foi realizado de acordo com a metodologia utilizada por DAVID, J. P. *et al.*, 2001. Foram preparadas 4 soluções clorofórmicas com concentrações de ( 50, 100, 500 e 700 µg/mL) das fases diclorometano do extrato hexânico das folhas e das sementes de *T. guianensis* (TGDF e TGDS) e 3 soluções clorofórmicas de (50, 75 e 100 µg/mL) da mistura das substâncias **S1**, **S2** e **S3**. Essas soluções foram adicionadas em frascos tipo "snap". O solvente utilizado foi eliminado com auxílio de pistola de aquecimento. Todos os experimentos, inclusive os de controle foram realizados em triplicata.

Os cistos de *Artemia salina* foram eclodidos em um aquário retangular, utilizando-se solução salina 3,8 g/L obtida de acordo com as especificações do

fabricante. O sistema foi aerado com bomba específica. O aquário foi construído com uma divisão interna de acrílico contendo vários orifícios, produzindo dois compartimentos não equivalentes em tamanho. Os cistos foram adicionados no compartimento menor, previamente escurecido utilizando-se papel alumínio. O compartimento maior foi externamente iluminado com lâmpada 60W, de modo a atrair os náuplios para este compartimento, após a eclosão. Os cistos foram incubados por 48 horas em temperatura ambiente.

Após 48 horas foram transferidos 10 náuplios para cada frasco, utilizando pipeta Pasteur esterilizada e, o volume dos frascos completados até 5 mL com água do mar artificial. As amostras bem como os controles foram mantidos sob iluminação por mais 24 horas e o número de náuplios sobreviventes foram determinados com auxílio de uma lupa. A larva era considerada morta caso não exibisse movimentos durante 10 segundos de observação. Os dados obtidos foram processados e os valores de  $DL_{50}$  foram calculados usando o método de probit.

### **3.9 Avaliação da Atividade Alelopática das fases diclorometano (TGDF e TGDS)**

As avaliações dos efeitos alelopáticos das fases diclorometano das folhas e das sementes de *T. guianensis* (TGDF e TGDS) foram realizadas frente à germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.).

**Bioensaios de germinação:** Foram desenvolvidos em câmaras de germinação, em condições controladas para temperatura de 25 °C. A germinação foi monitorada em período de sete dias, envolvendo contagens diárias e eliminação daquelas sementes germinadas. Consideraram-se sementes germinadas aquelas que exibiam extensão radicular igual ou superior a 2,00 mm (Duram & Tortosa, 1985; Juntilla, 1976).

Cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro, forrada com uma folha de papel-filtro qualitativo, recebeu 10 sementes.

**Procedimentos para realização dos bioensaios de germinação:** Para a análise da atividade alelopática das duas fases (TGDF e TGDS), estabeleceram-se as concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 g L<sup>-1</sup>, tendo como eluente o metanol. Cada placa de Petri recebeu 3,0 mL da solução, deixando-se evaporar o solvente, adicionando, em seguida, o mesmo volume de água destilada, mantendo, dessa forma, a concentração original. Em seguida foi depositado em cada placa de petri, dez sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) em três repetições para cada concentração das amostras (TGDF e TGDS). As soluções foram adicionadas apenas uma vez, no início do experimento, sendo adicionado, a partir de então, apenas água destilada, sempre que se fazia necessário.

Para tratamento controle da germinação utilizou-se água destilada sob as mesmas condições. Para verificação da germinação, procedeu-se fazendo leitura diária durante sete dias com retirada das sementes germinadas.

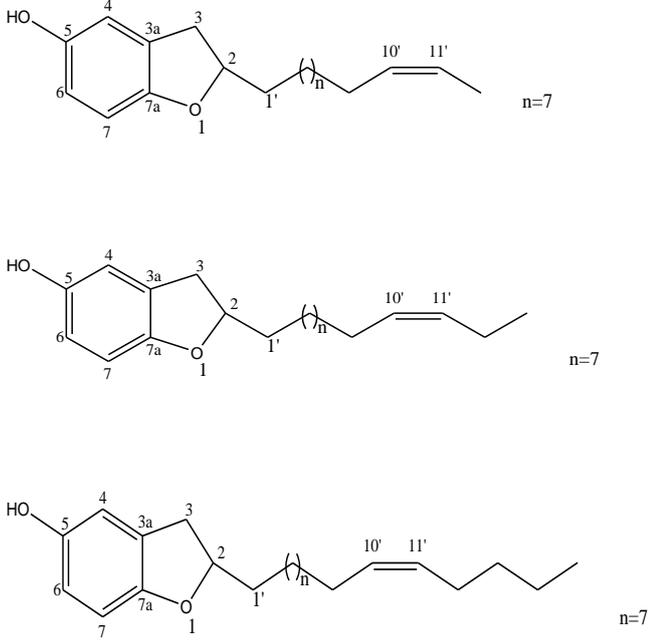
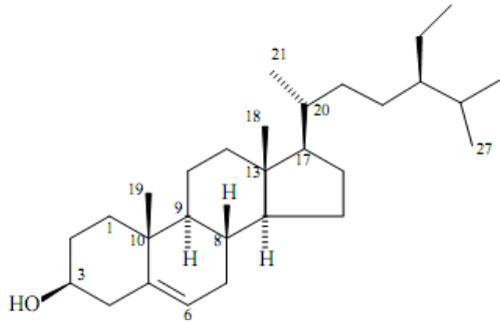
No final de 7 dias, calculou-se a média aritmética das sementes germinadas de cada amostra, que após, juntamente com a média das sementes germinadas no tratamento controle, calculou-se o percentual de inibição de cada amostra na germinação das sementes.

## **4. Discussão dos resultados**

### **4.1 Substâncias isoladas de *T. guianensis***

No Quadro 5 estão apresentadas as substâncias isoladas da fase diclorometano das sementes de *T. guianensis*.

**Quadro 5.** Substâncias isoladas das sementes de *T. guianensis*

NOME	ESTRUTURA
<p>Em mistura:</p> <p><b>S1</b> = 2-[(10'<i>Z</i>)-dodec-10'-enil]-dihidro-1-benzofuran-5-ol</p> <p><b>S2</b> = 2-[(10'<i>Z</i>)-tridec-10'-enil]-dihidro-1-benzofuran-5-ol</p> <p><b>S3</b> = 2-[(10'<i>Z</i>)-pentadec-10'-enil]-dihidro-1-benzofuran-5-ol</p>	
<p><b>S4</b> = <math>\beta</math>-sitosterol</p>	

#### 4.2 Dados físicos e espectroscópicos das substâncias isoladas

❖ **Mistura das substâncias S1, S2 e S3:**

**S1** = 2-[(10'*Z*)-dodec-10'-enil]-dihidro-1-benzofuran-5-ol

**FM:** C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>. Óleo viscoso.  $[\alpha]_D^{25} +13^\circ$  (c.1,5; CH<sub>3</sub>OH)

**S2** = 2-[(10'*Z*)-tridec-10'-enil]-dihidro-1-benzofuran-5-ol

**FM:** C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>. Óleo viscoso.  $[\alpha]^{25}_D +13^\circ$  (c.1,5; CH<sub>3</sub>OH)

**S3** = 2-[(10'*Z*)-pentadec-10'-enil]-dihidro-1-benzofuran-5-ol

**FM:** C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>. Óleo viscoso.  $[\alpha]^{25}_D +13^\circ$  (c.1,5; CH<sub>3</sub>OH)

**-IV<sub>vmax</sub> filme (cm<sup>-1</sup>):** 3347; 3005; 2919; 2850; 1492; 1468; 1199; 862; 814

**-RMN <sup>1</sup>H:** Tabela 8, p. 52.

**-RMN <sup>13</sup>C:** Tabela 8, p. 52.

❖ **Substância S4:** (24R)-24-etilcolest-5-en-3β-ol (β-sitosterol).

**FM:** C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O. Sólido branco.

**-IV<sub>vmax</sub> filme (cm<sup>-1</sup>):** 3432; 2959; 1466; 1383; 1062

**-RMN <sup>13</sup>C:** Tabela 9, p. 60.

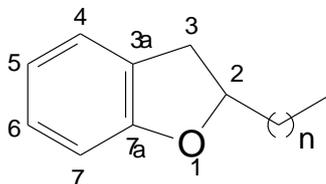
### 4.3 Identificação e Determinação Estrutural

A identificação das substâncias isoladas foi feita através das análises espectroscópicas tais como, espectroscopia na região do infravermelho (IV); de ressonância magnética nuclear (RMN) uni e bidimensional e espectrometria de massas (EM).

#### 4.3.1 Hidrobenzofuranóides

Os hidrobenzofuranoídes alquilados podem ser considerados uma nova classe de metabólitos secundários. A formação destes compostos pode está relacionada aos lipídios fenólicos presentes nas sementes de *T. guianensis* (CORREIA, 2005).

Os hidrobenzofuranóides alquilados são compostos heterocíclicos que apresentam como estrutura básica um anel aromático fundido ao anel furano ligado a uma cadeia alquílica (Figura 13).

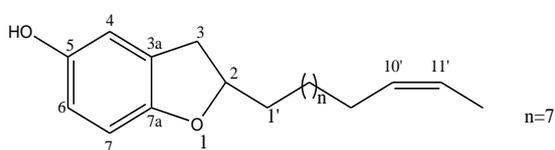


**Figura 13.** Estrutura básica de hidrobenzofuranóides

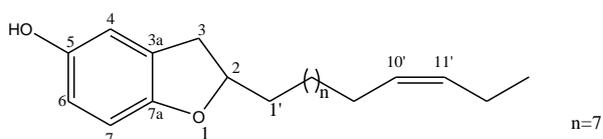
O estudo químico das sementes de *T. guianensis* revelou a presença de uma mistura de três diidrobenzofuranóides.

#### 4.3.1.2 Elucidação estrutural das substâncias S1, S2 e S3

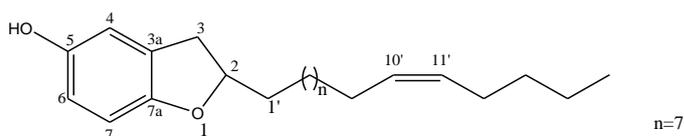
##### S1



##### S2



##### S3

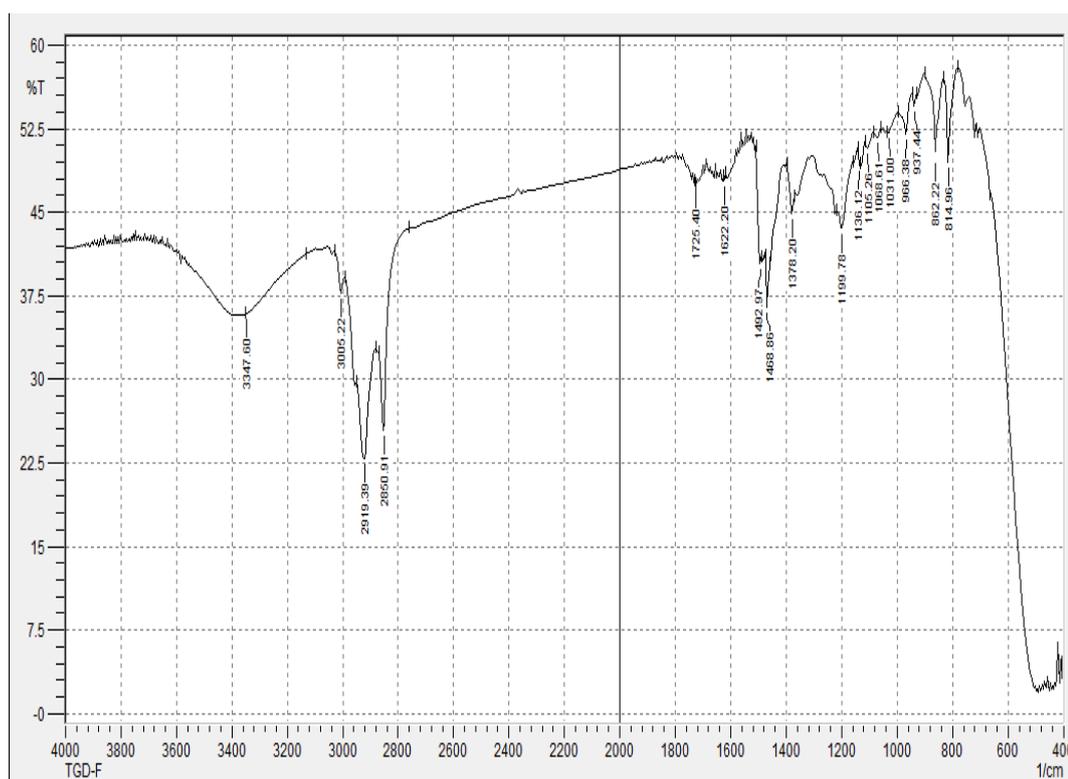


A mistura das três substâncias **S1**, **S2** e **S3** foi obtida da fração TGD-4-7 apresentando-se como um óleo viscoso com uma coloração castanho

avermelhado. A fração TGD-4-7 quando analisada por CCDC apresentou comportamento cromatográfico como se fosse uma única substância.

A determinação estrutural da mistura das três substâncias foi estabelecida através da análise dos dados obtidos no infravermelho (IV), RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , de correlação HMQC e HMBC, aliados aos dados do espectro de massas.

O espectro no IV apresentou bandas características de vibrações de deformação axial do O-H fenólico em  $3347\text{ cm}^{-1}$ , vibrações de deformação axial de C-H de aromático em  $3005\text{ cm}^{-1}$ , vibrações de deformação axial de C-H em  $2919$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ , vibrações de deformação axial das ligações C=C do anel aromático em  $1492$  e  $1468\text{ cm}^{-1}$ , vibração de deformação axial de C-O em  $1199\text{ cm}^{-1}$ , vibrações de deformação angular fora do plano de C-H em  $862$  e  $814\text{ cm}^{-1}$ , referentes a anel aromático trissubstituído, entre outras (Figura 14, p. 38).



**Figura 14.** Espectro de infravermelho das substâncias **S1**, **S2** e **S3**.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 15 e 17, p. 40-41) revelou a natureza aromática da mistura das três substâncias isoladas pela presença de

sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos. As integrações dos hidrogênios nesta região indicavam a presença de três hidrogênios. Isso pode ser constatado pela presença de um singlete largo em  $\delta$  6,68 integrando para um hidrogênio e de dois dubletos na região de  $\delta$  6,61 e  $\delta$  6,57 integrando para um hidrogênio cada. Consequentemente, esse perfil do espectro na região de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos sugeria, a existência de um anel aromático trissubstituído.

Neste espectro (Figuras 15-16, p. 40-41) pôde-se constatar a presença de um sinal em  $\delta$  5,36, integrando para dois hidrogênios. Este sinal é característico de hidrogênios olefínicos de ácidos graxos insaturados com uma configuração Z entre eles. Esses dados juntamente com os sinais de hidrogênios entre  $\delta$  0,91-2,03 sugeriam a presença de uma cadeia alquenílica ligada ao anel aromático derivada de um ácido graxo insaturado. A presença de um tripleto em  $\delta$  0,91 foi indicativo de uma metila terminal na cadeia alquílica.

Além disso, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  pôde-se também constatar a presença de um multipletto em  $\delta$  4,74 referente ao hidrogênio oximetínico (Figuras 15 e 16, p. 40-41; Tabela 8, p. 52).

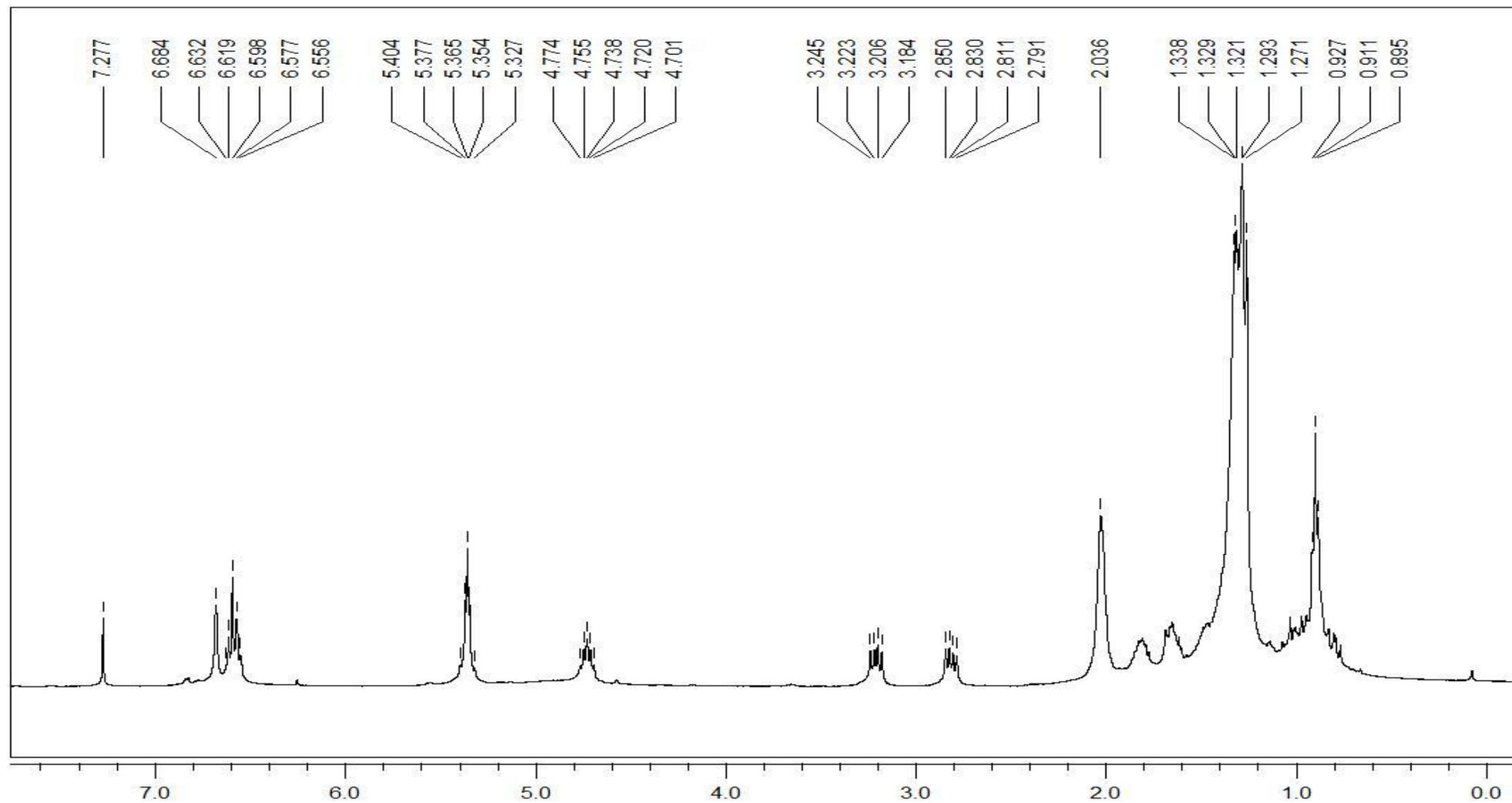
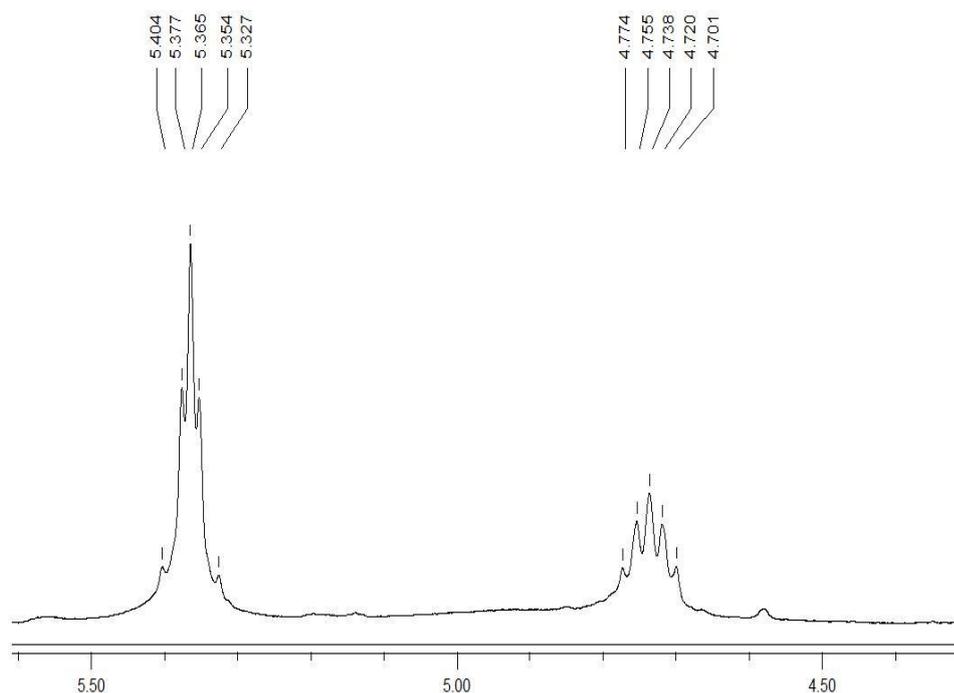
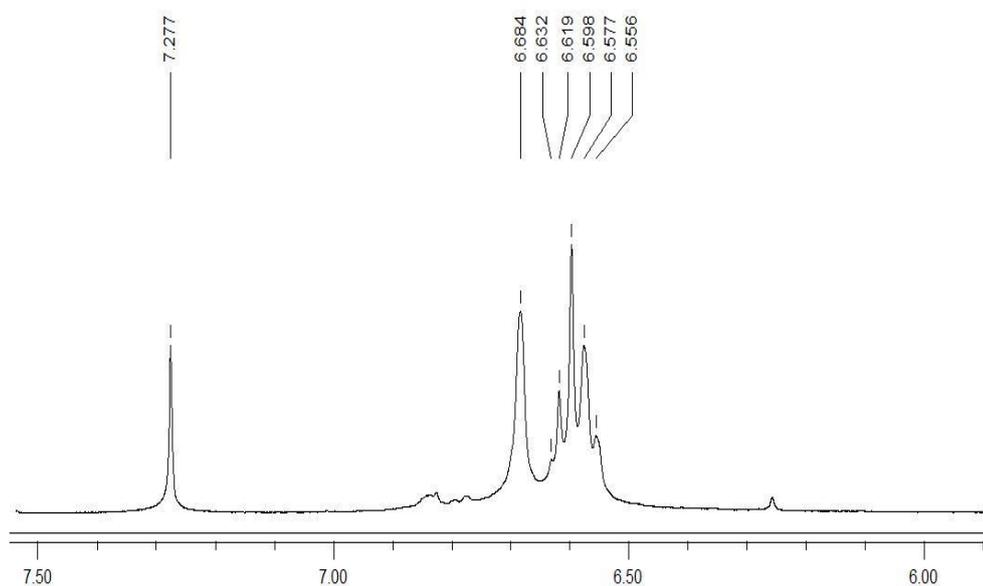


Figura 15. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **S1**, **S2** e **S3** [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{H}}$  (ppm)]



**Figura 16.** Ampliação ( $\delta_H$  4,5-5,50) do espectro de RMN  $^1H$  de **S1**, **S2** e **S3** [400 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta_H$  (ppm)]



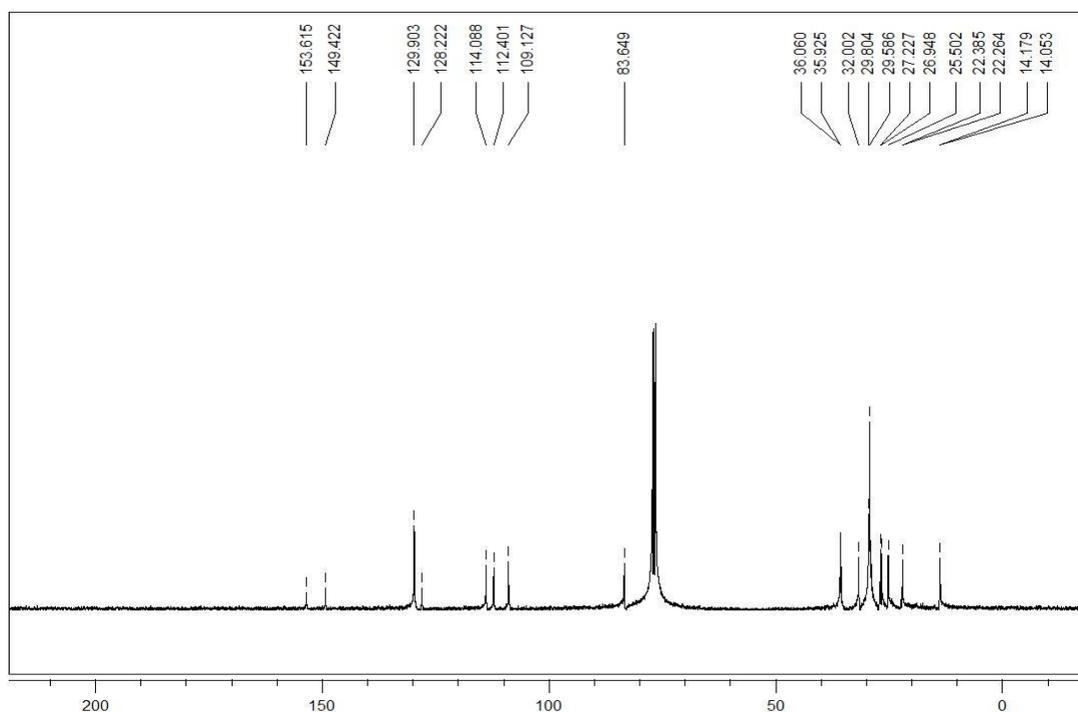
**Figura 17.** Ampliação ( $\delta_H$  6,0-7,50) do espectro de RMN  $^1H$  de **S1**, **S2** e **S3** [400 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta_H$  (ppm)]

A análise do espectro de RMN  $^{13}C$  (Figura 18, p. 42) confirmou a presença de um anel aromático trissubstituído, através dos sinais relativos a três carbonos

não hidrogenados na região de aromáticos em  $\delta$  153,62 (C-7a),  $\delta$  149,42 (C-5) e  $\delta$  128,22 (3a). Pelos valores apresentados, dentre esses três carbonos não hidrogenados, dois são carbonos oxigenados com deslocamento químico em  $\delta$  153,62 (C-7a) e  $\delta$  149,42 (C-5) respectivamente. Esses dados permitiram confirmar a presença de uma hidroxila fenólica, visto que no espectro de IV foi constatado a presença de uma banda de vibração de deformação axial de O-H fenólico em  $3347\text{ cm}^{-1}$  (Figura 14, p. 38).

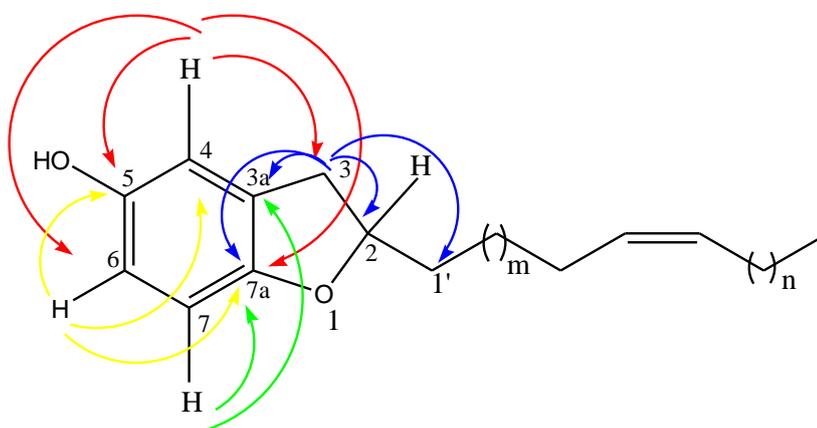
Além disso, no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  foi verificada a presença de carbono oximetínico C-2 com deslocamento químico em  $\delta$  83,65. Os demais sinais registrados (Tabela 8, p. 52) corroboraram com as informações obtidas do espectro de RMN  $^1\text{H}$ .

A estereoquímica da olefina pode ser confirmada através dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  uma vez que os deslocamentos químicos dos carbonos alílicos ( $\delta$  27,23 e  $\delta$  26,95) são indicativos da presença de um Z-alceno. Caso a ligação dupla fosse E, esses carbonos estariam desprotegidos de cerca de 4-6 ppm (BREITMAIER; VOELTER, 1987).



**Figura 18.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **S1**, **S2** e **S3** [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]

O espectro HMQC (Figuras 20, 21 e 22, p. 44-45) permitiu identificar os hidrogênios ligados aos respectivos carbonos e, a partir do espectro de HMBC (Figuras 23, 24 e 25, p. 46-47) foi possível concluir sobre a conectividade dos carbonos. Dentre as correlações mais importantes observadas neste espectro, puderam ser destacadas as correlações dos hidrogênios metilênicos H-3 ( $\delta$  2,83;  $\delta$  3,22) com os carbonos do anel aromático; C-4 ( $\delta$  112,40) hidrogenado, C-3a ( $\delta$  128,22) não hidrogenado e C-7a ( $\delta$  153,62) oxigenado não hidrogenado. Além dessas correlações, foi observado também correlações dos hidrogênios metilênicos H-3 ( $\delta$  2,83;  $\delta$  3,22) com o carbono oximetínico C-2 ( $\delta$  83,65). Desta forma, considerando-se as correlações envolvendo os hidrogênios metilênicos H-3 ( $\delta$  2,83;  $\delta$  3,22) com os carbonos C-3a ( $\delta$  128,22), C-7a ( $\delta$  153,62) oxigenado e o carbono oximetínico C-2 ( $\delta$  83,65), pôde-se sugerir que o carbono C-7a ( $\delta$  153,62) oxigenado estaria compartilhando o oxigênio com o carbono oximetínico C-2 ( $\delta$  83,65) levando a formação de um anel na junção do anel aromático. Na Tabela 8 (p. 52) encontram-se descritas todas as correlações observadas no HMBC. A Figura 19 (p. 43), sumariza as correlações a duas e três ligações observadas no espectro de HMBC.



**Figura 19.** Correlações observadas no HMBC para **S1**, **S2** e **S3**

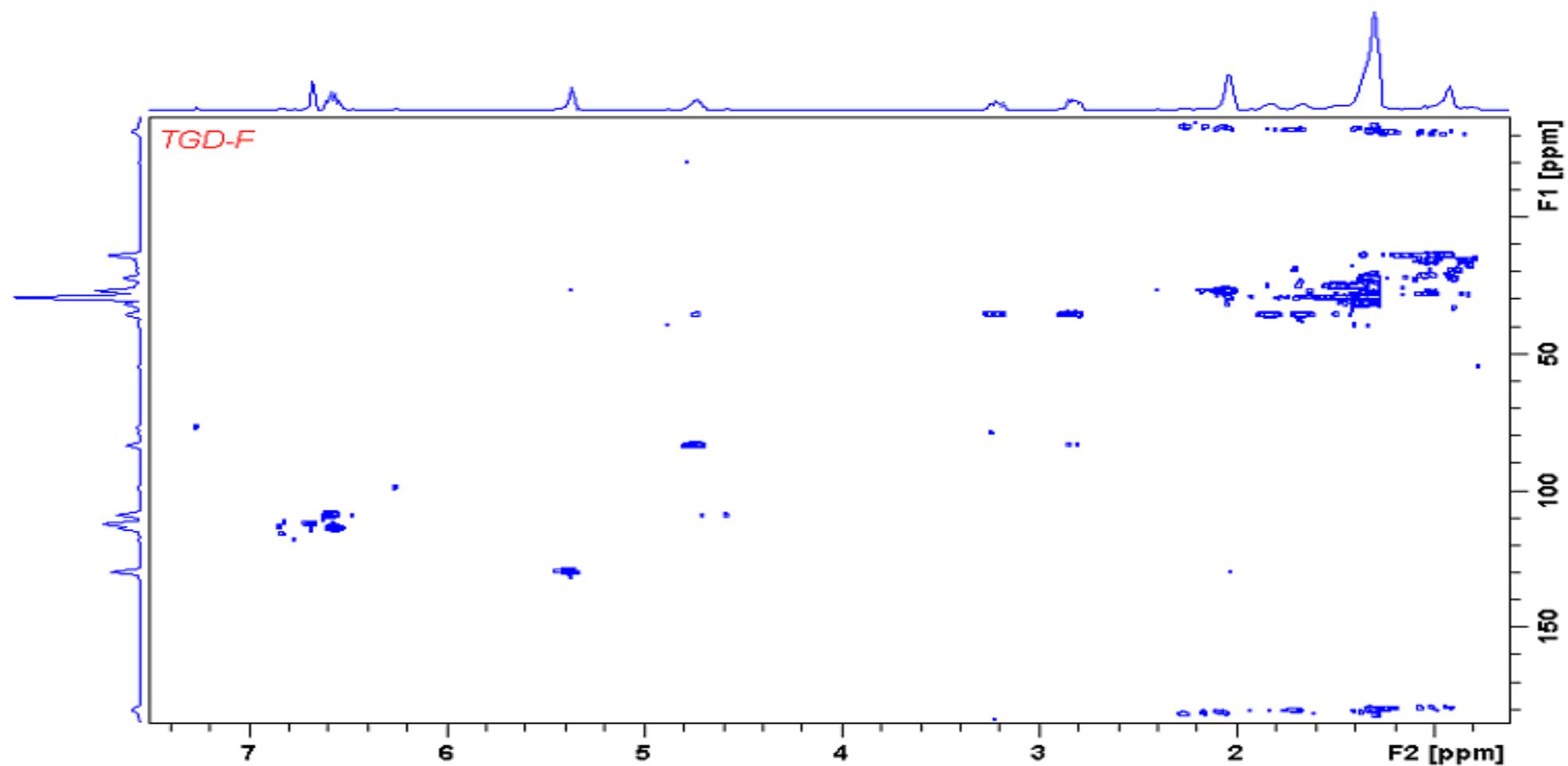
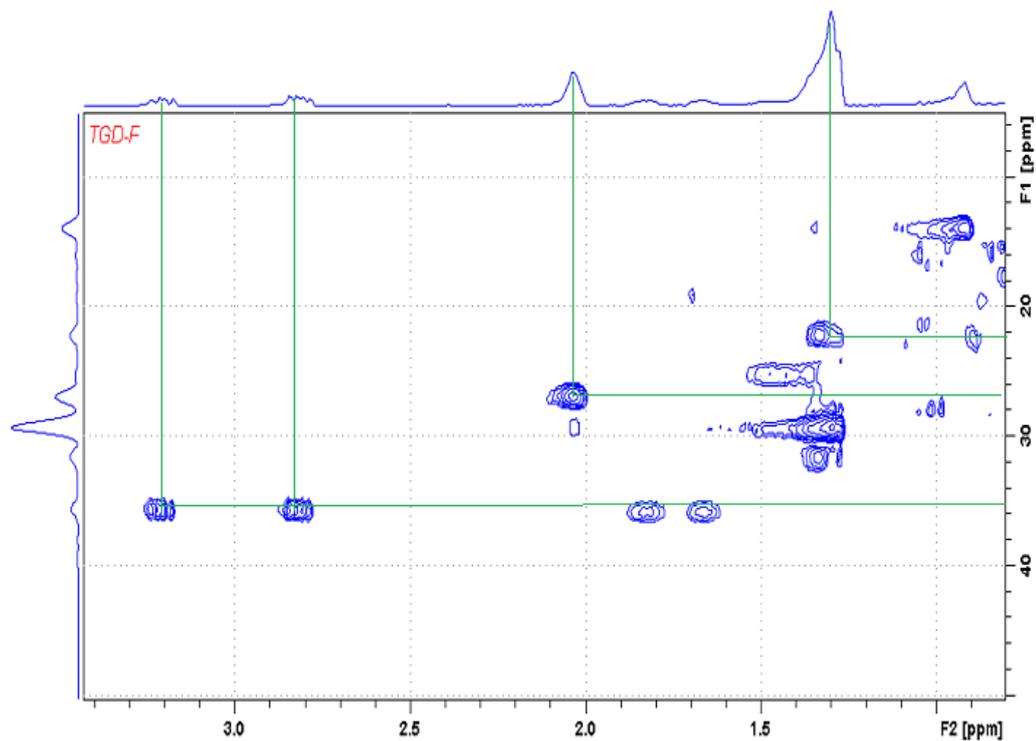
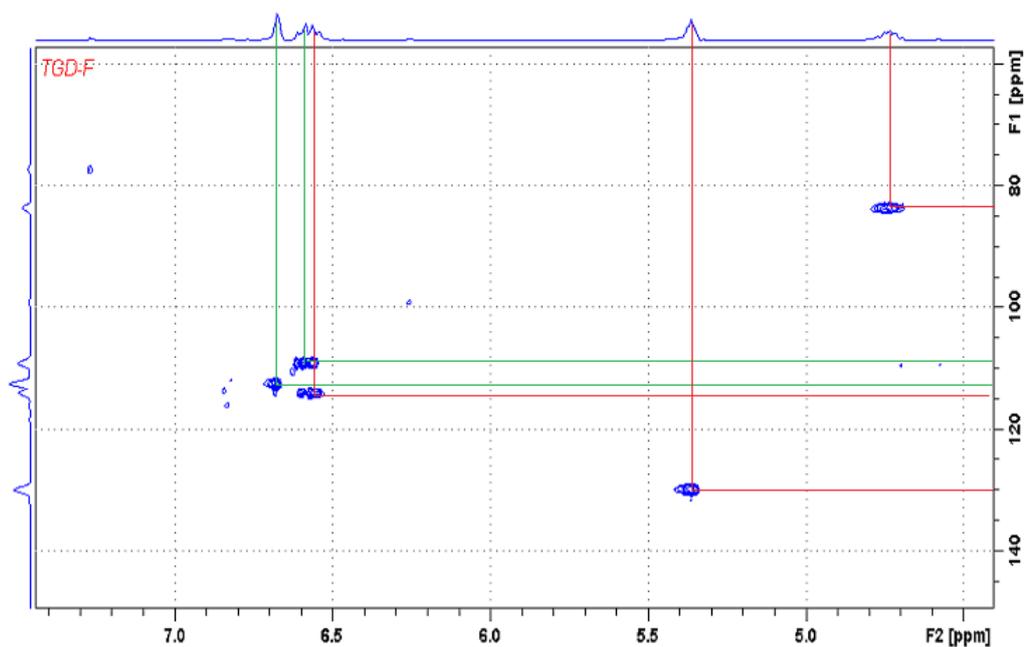


Figura 20. Espectro de HMQC de **S1**, **S2** e **S3** [75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, (ppm)]



**Figura 21.** Ampliação ( $\delta_C$  14-40/ $\delta_H$  0,9-3,4) Espectro de HMQC de **S1**, **S2** e **S3** [75 MHz,  $CDCl_3$ , (ppm)]



**Figura 22.** Ampliação ( $\delta_C$  60-140/ $\delta_H$  4,5-7,3) Espectro de HMQC de **S1**, **S2** e **S3** [75 MHz,  $CDCl_3$ , (ppm)]

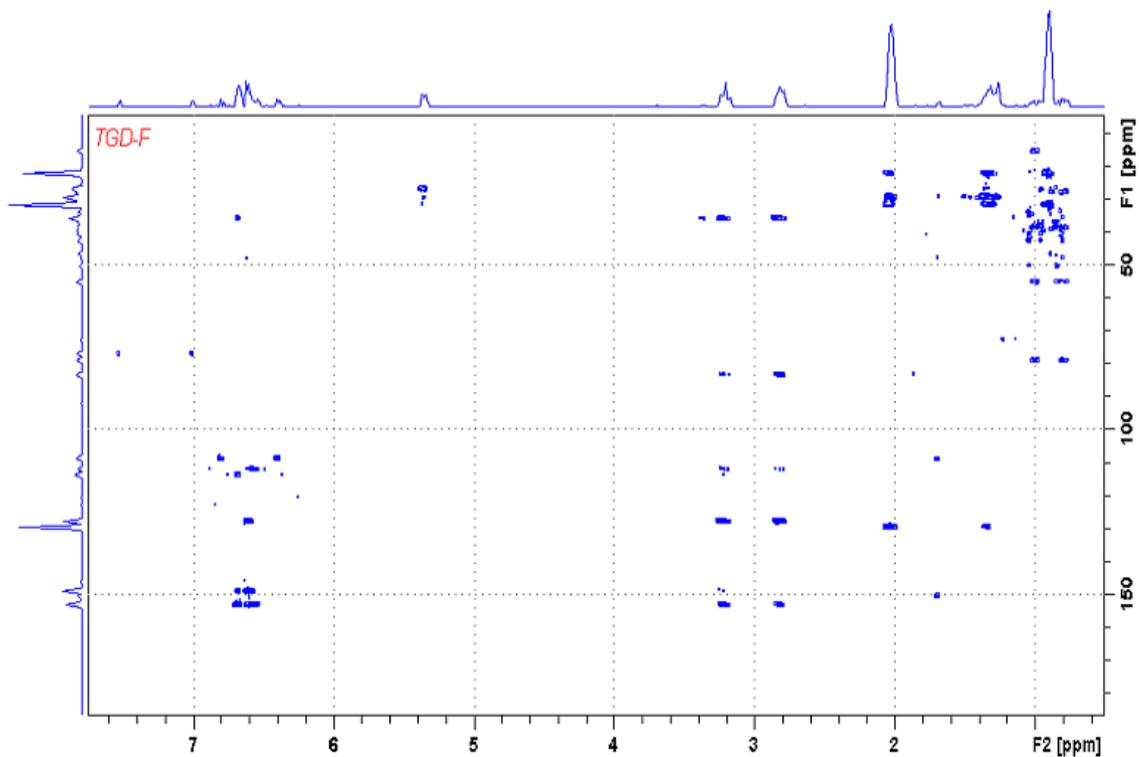


Figura 23. Espectro de HMBC de **S1**, **S2** e **S3** [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , (ppm)]

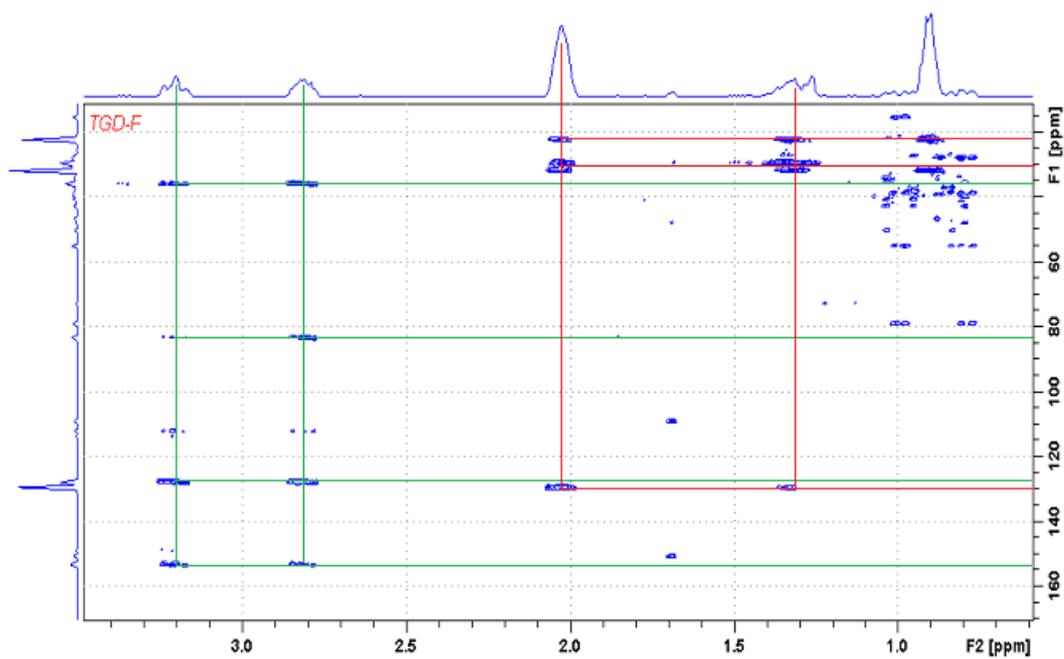
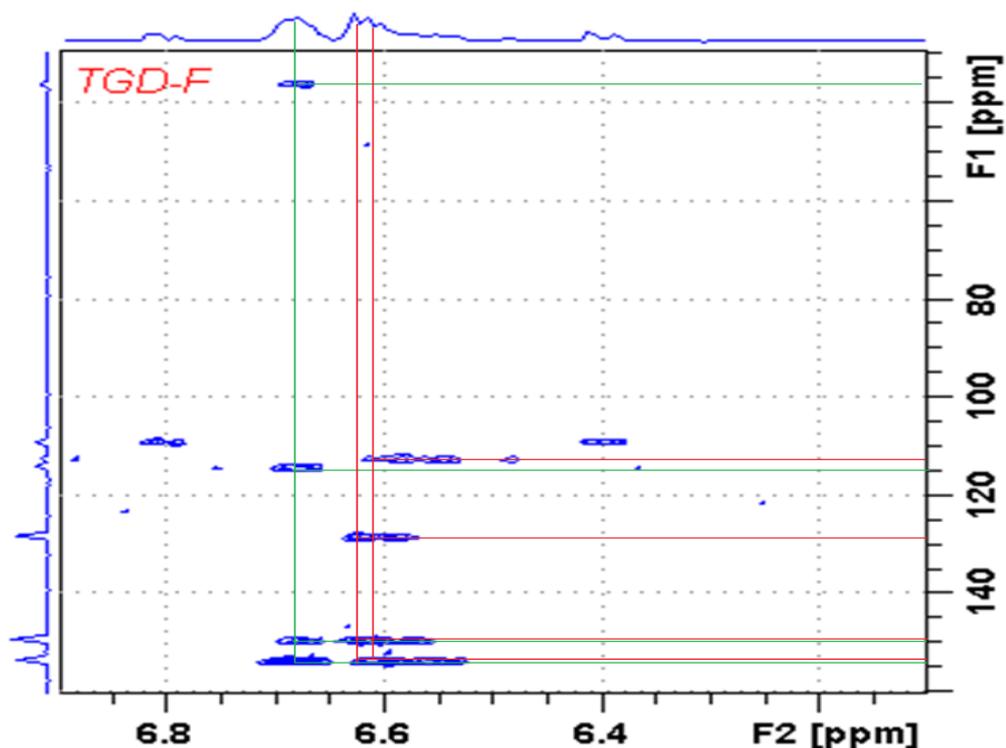


Figura 24. Ampliação ( $\delta_C$  14-160/ $\delta_H$  0,9-3,5) Espectro de HMBC de **S1**, **S2** e **S3** [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , (ppm)]



**Figura 25.** Ampliação ( $\delta_C$  30-160/ $\delta_H$  6,0-6,8) Espectro de HMBC de **S1**, **S2** e **S3** [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , (ppm)]

A correta localização do carbono do anel aromático em que a hidroxila fenólica estava conectada foi realizada através da comparação entre os valores observados e também por cálculos empíricos de deslocamento químico para os átomos de carbono do anel aromático, visto que, a análise dos dados registrados pelo espectro de HMBC não pode determinar a localização do grupo.

Diante do perfil do espectro de RMN  $^1\text{H}$  em que pôde ser constatado a presença de um singlete em  $\delta$  6,68 integrando para um hidrogênio e de dois dubletos na região de  $\delta$  6,61 e  $\delta$  6,57 integrando para um hidrogênio cada, sugerindo a existência de anel aromático trissubstituído, induziu a duas possibilidades de localização da hidroxila no anel aromático da estrutura (Proposta 1 e Proposta 2). Sendo assim, a hidroxila fenólica poderia estar localizada no carbono C-5 ou no carbono C-6. Nesse sentido foi possível estabelecer duas propostas estruturais para as substâncias **S1**, **S2** e **S3** (Figura 26):



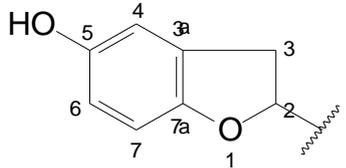
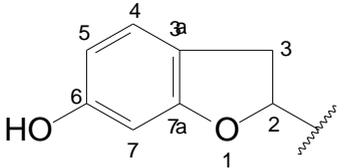
**Figura 26.** Possíveis estruturas que representariam **S1**, **S2** e **S3**.

Foram realizados cálculos empíricos de deslocamentos químicos para os átomos de carbono do anel aromático variando a posição de conectividade da hidroxila entre o carbono C-5 e carbono C-6 (Tabela 7, p. 49). A base de cálculo estabelecida foi a equação  $\delta = 128,5 + A$  (SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X., 2007), donde o valor 128,5 é equivalente ao  $\delta$  dos átomos de carbono do anel benzênico e **A** representa a somatória dos incrementos citados na Tabela 6 (p. 48).

**Tabela 6.** Incrementos de deslocamentos químicos dos átomos de carbono do benzeno (ppm a partir do benzeno em 128,5 ppm)

Substituinte	Incrementos			
	A1	A2	A3	A4
-OH	26,6	-12,7	1,6	-7,3
-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	15,6	-0,5	0,0	-2,9
-OCH <sub>3</sub>	31,4	-14,4	1,0	-7,7
-H	0,0	0,0	0,0	0,0

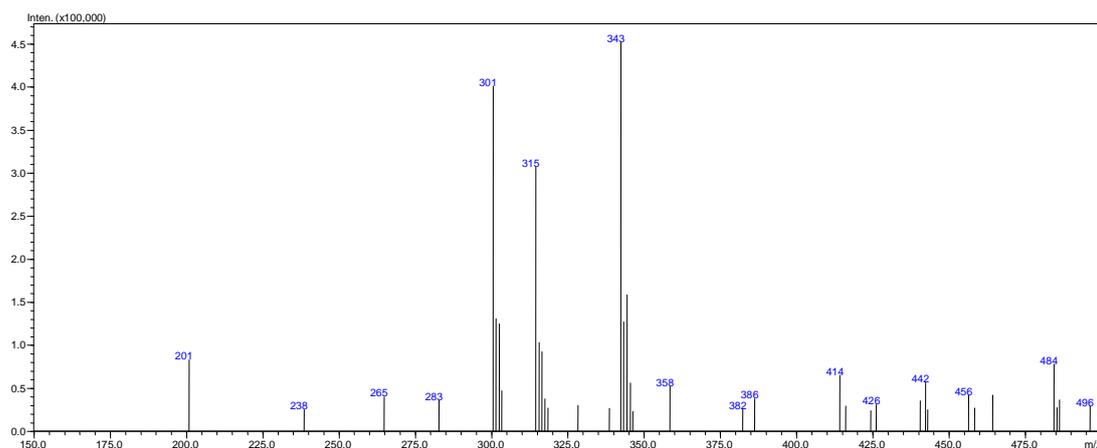
**Tabela 7.** Deslocamentos químicos calculados para átomos do anel aromático das estruturas 1 e 2 propostas

Posição	$\delta$ Calculado	
	Proposta 1	Proposta 2
		
3a	131,3 (C)	122,4 (C)
4	116,3 (CH)	130,6 (CH)
5	147,4 (C)	108,1 (CH)
6	114,2 (CH)	153,5 (C)
7	115,7 (CH)	101,4 (CH)
7a	152,1 (C)	161,0 (C)

Assim, comparando os valores dos cálculos teóricos de deslocamentos químicos dos carbonos do anel aromático das duas propostas (**1** e **2**) com os valores observados dos carbonos aromáticos pode-se sugerir que os deslocamentos químicos dos carbonos do anel aromático da proposta **1** se aproximam dos valores dos deslocamentos químicos dos carbonos do anel aromático observado (Tabela 8, p. 52), principalmente dos carbonos oxigenados. Nesse sentido, pôde-se sugerir que o grupo hidroxila encontra-se conectado no carbono C-5 das estruturas das substâncias **S1**, **S2** e **S3**.

A indicação que a fração TGD-4-7 era composta por uma mistura de três substâncias adveio da presença no espectro de massas de três íons *pseudo*-moleculares [M-1]. O EM-ESI registrado em modo negativo apresentou íons *pseudo*-moleculares [M-1] em  $m/z$  301, 315 e 343 (Figura 27, p. 50).

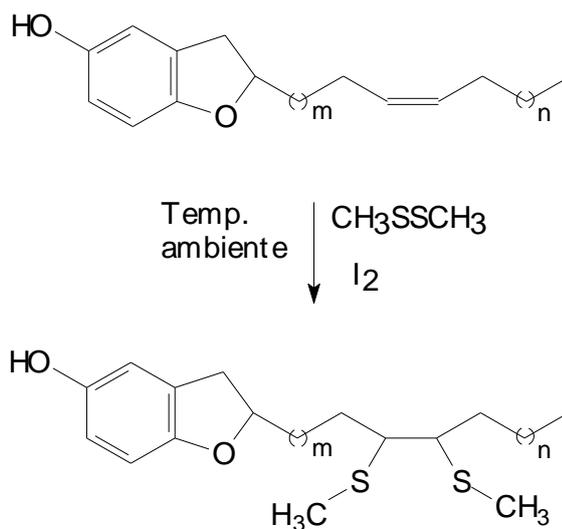
Estes dados aliados a dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e de IV permitiram propor as fórmulas moleculares  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$ ,  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$  e  $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_2$  para as três substâncias.



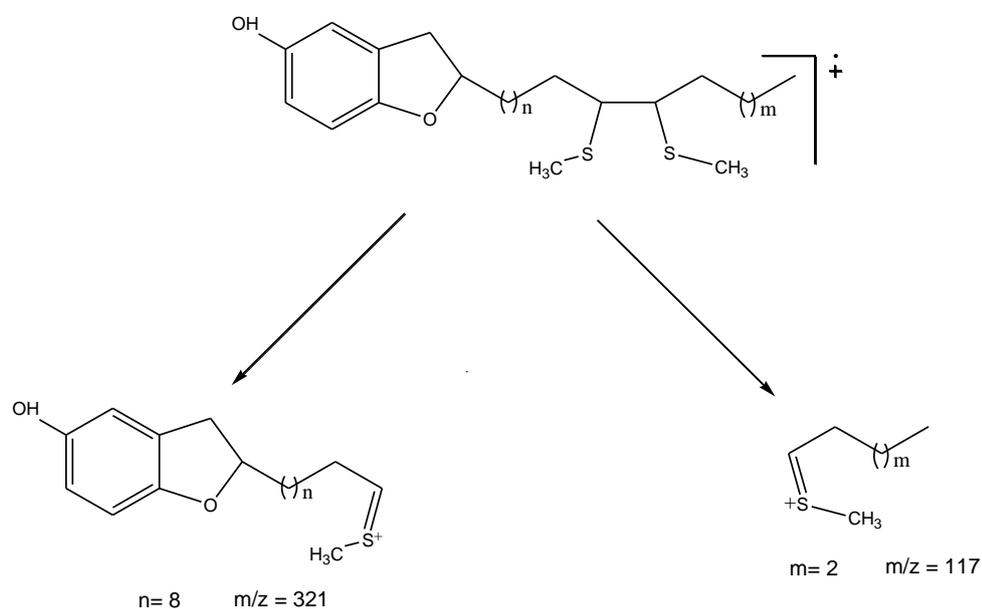
**Figura 27.** Espectro de massas (EM-ESI) de **S1**, **S2** e **S3**

Esses resultados sugeriram a presença de três cadeias alquênlicas contendo 12, 13 e 15 átomos de carbonos cada uma.

A localização da ligação dupla *Z* das substâncias **S1**, **S2** e **S3** foi estabelecida a partir da análise do EM do derivado  $\alpha,\beta$ -*bis*-(tiometílico) sintetizado através da reação da mistura das substâncias **S1**, **S2** e **S3** com disulfeto de dimetila (Esquema 1, p. 51). O espectro de massas revelou o fragmento em  $m/z$  321 ( $C_{19}H_{29}O_2S$ ) o que permitiu sugerir a posição da ligação dupla nas três cadeias alquílicas entre os carbonos C10' e C11' (Esquema 2, p. 51). Diante destes resultados **S1**, **S2** e **S3** foram identificados como sendo, respectivamente, 2-[(10'*Z*)-dodec-10'-enil]-diidro-1-benzofuran-5-ol, 2-[(10'*Z*)-tridec-10'-enil]-diidro-1-benzofuran-5-ol e 2-[(10'*Z*)-pentadec-10'-enil]-diidro-1-benzofuran-5-ol.



**Esquema 1.** Derivatização para elucidação da posição da ligação dupla das substâncias **S1**, **S2** e **S3**.



**Esquema 2.** Fragmentação responsável pela atribuição do posicionamento da ligação dupla das substâncias **S1**, **S2** e **S3**.

**Tabela 8.** Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz), HMBC de **S1**, **S2** e **S3** [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]

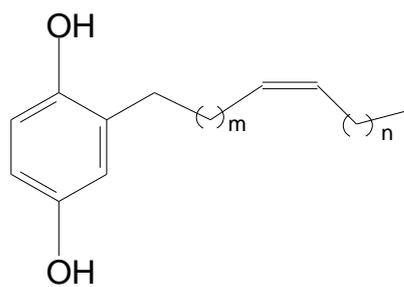
POSIÇÃO	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ [ mult. $J$ (Hz)]	HMBC
2	83,65	4,74 (m)	
3	36,06	3,22 (dd; 8,8; 8,8) 2,83 (dd; 8,0; 8,0)	153,62; 128,22; 83,65; 35,93
3a	128,22	-	-
4	112,40	6,68 (s)	153,62; 149,42; 114,09; 36,06
5	149,42	-	-
6	114,09	6,58 (d; 8,4)	153,62; 149,42; 112,40;
7	109,13	6,62 (d; 8,4)	153,62; 149,42; 128,22
7a	156,62	-	-
1'	35,93	1,82 (m) 1,63 (m)	-
2'-8'	29,80-29,59	1,32 (m)	
9'	26,95	2,04 (m)	129,89
10'	129,90	5,36 (m)	27,23
11'	129,89	5,36 (m)	26,95
12'	27,23	2,04 (m)	129,90
13'	32,00	1,32 (m)	
14'	22,38	1,32 (m)	
15'	14,18	0,91 (t; 6,4)	22,38; 32,00

Sabe-se que substâncias isoladas de partes do material vegetal durante o processo de purificação podem sofrer reações químicas e levar a formação de artefatos. No entanto, para a fração TGD-4-7 que contém a mistura das substâncias **S1**, **S2** e **S3**, pode constatar que essas substâncias não se tratam de artefatos, visto que essas substâncias são opticamente ativas, apresentando uma rotação específica de  $[\alpha]^{25}_D +13^\circ$  (c.1,5; CH<sub>3</sub>OH). Caso essas substâncias fossem artefatos, ou seja, fossem produzidas por reações químicas durante o processo de purificação, essas substâncias seriam uma mistura racêmica. Sendo assim, uma mistura racêmica não provoca rotação líquida da luz polarizada no plano, resultando em nenhuma atividade ótica líquida.

Em estudos que já foram realizados em diferentes partes da espécie *T. guianensis*, possibilitou isolar uma série de compostos aromáticos. Nesse sentido, provavelmente a rota biossintética que leva a formação desses novos diidrobenzofuranóides isolados das sementes de espécie *T. guianensis*, sejam derivados dos lipídios fenólicos. Os lipídios fenólicos e derivados são definidos como produtos naturais não-isoprênicos, que apresentam em sua estrutura grupos aromáticos e alifáticos e exibem ambos os comportamentos, hidrofílico e lipofílico. Normalmente são caracterizados pela presença de grupo fenol ligado a uma cadeia alquílica com número ímpar de carbono (CORREIA, DAVID & DAVID, 2006).

No estudo fitoquímico do extrato metanólico das sementes de *T. guianensis* realizado por DAVID, J. M. *et al* (1998) foram isolados dois compostos hidroquinônicos (Figura 28, p. 54). Baseado nesses estudos pode supor que provavelmente derivados de compostos hidroquinônicos estejam relacionados com a rota biossintética que leva a formação dos novos diidrobenzofuranóides isolados das sementes de espécie *T. guianensis*.

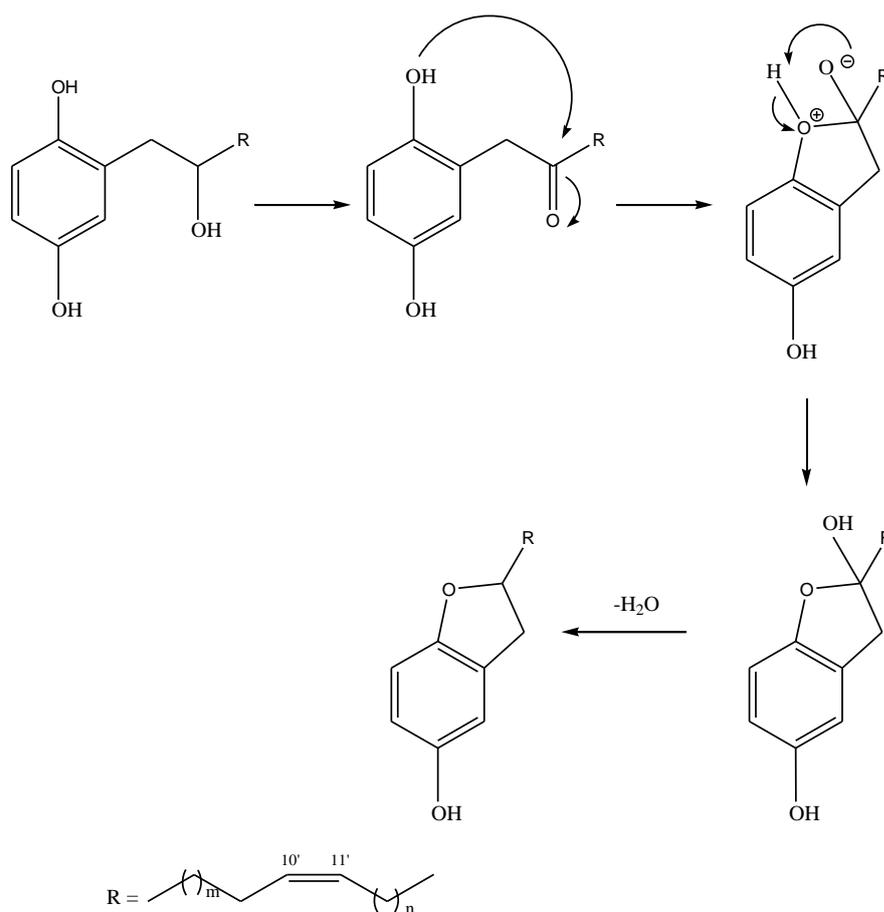
Uma proposta biossintética para a formação da mistura das substâncias **S1**, **S2** e **S3** está ilustrada no Esquema 3. Os compostos hidroquinônicos apresentando hidroxilação na posição 2' podem ser os precursores dos novos diidrobenzofuranóides. Apesar de não haver relatos na literatura sobre o isolamento desses compostos, a oxidação na posição 2' é bastante frequente nos lipídeos fenólicos (KOZUBEK, A; TYMAN, J. H. P., 1999).



$$1. m = 8, n = 5$$

$$3. m = 6, n = 7$$

**Figura 28.** Compostos hidroquinônicos isolados das sementes de *T. guianensis*



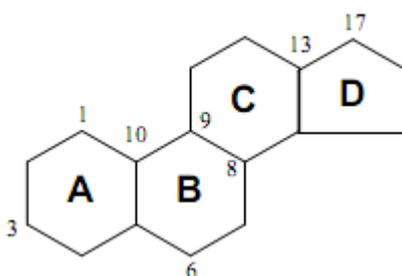
**Esquema 3.** Proposta biossintética para os diidrobenzofuranóides isolados de *T. guianensis*.

### 4.3.2 Fitoesteróides

As frações de lipídios obtidas dos vegetais e dos animais contêm um grupo importante de compostos conhecidos como esteróides. Os esteróides são compostos importantes não só por fazerem parte da composição das membranas biológicas ou por serem precursores da biossíntese de hormônios esteroidais, mas também pelas demais atividades biológicas atribuídas a estes, tais como: antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica, e mais recentemente como protetor de tumores no cólon intestinal e inibidor da promoção e indução de células tumorais (OVESNA *et al.*, 2004).

Os esteróides extraídos de espécies vegetais são conhecidos como fitoesteróides. São álcoois constituídos por 28 ou 29 átomos de carbono, de estruturas semelhantes ao colesterol, que encontram-se presentes nos organismos dos animais (AWAD & FINK, 2000).

O núcleo fundamental das substâncias esteroidais é constituído pelo anel ciclopentanoperidrofenantrênico (Figura 29) ligado a dois grupamentos metila nas posições C-10 e C-13, e a cadeia lateral na posição C-17 apresenta número de átomos de carbono variável entre dois e oito. A nomenclatura esterol é aplicada especificamente para alcoóis que apresentam o referido núcleo fundamental, para tanto, praticamente todos os fitoesteróides apresenta um grupamento hidroxila na posição C-3 (ROBINSON, 1991).

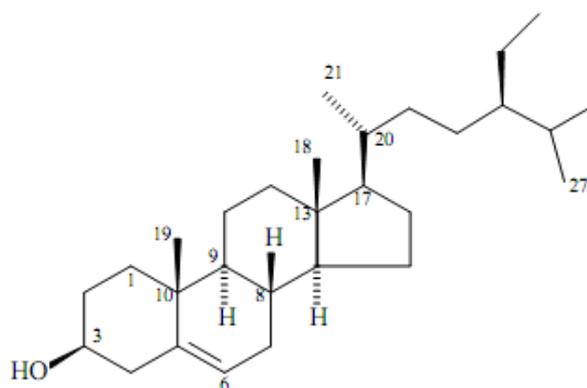


**Figura 29.** Anel ciclopentanoperidrofenantrênico

Os fitoesteróides podem ocorrer no estado livre, como ésteres ou glicosídeos. No estudo fitoquímico das sementes da espécie *T. guianensis* a

presença dessa classe de compostos foi verificada com o predomínio do  $\beta$ -sitosterol.

#### 4.3.2.1 Elucidação estrutural da substância S4

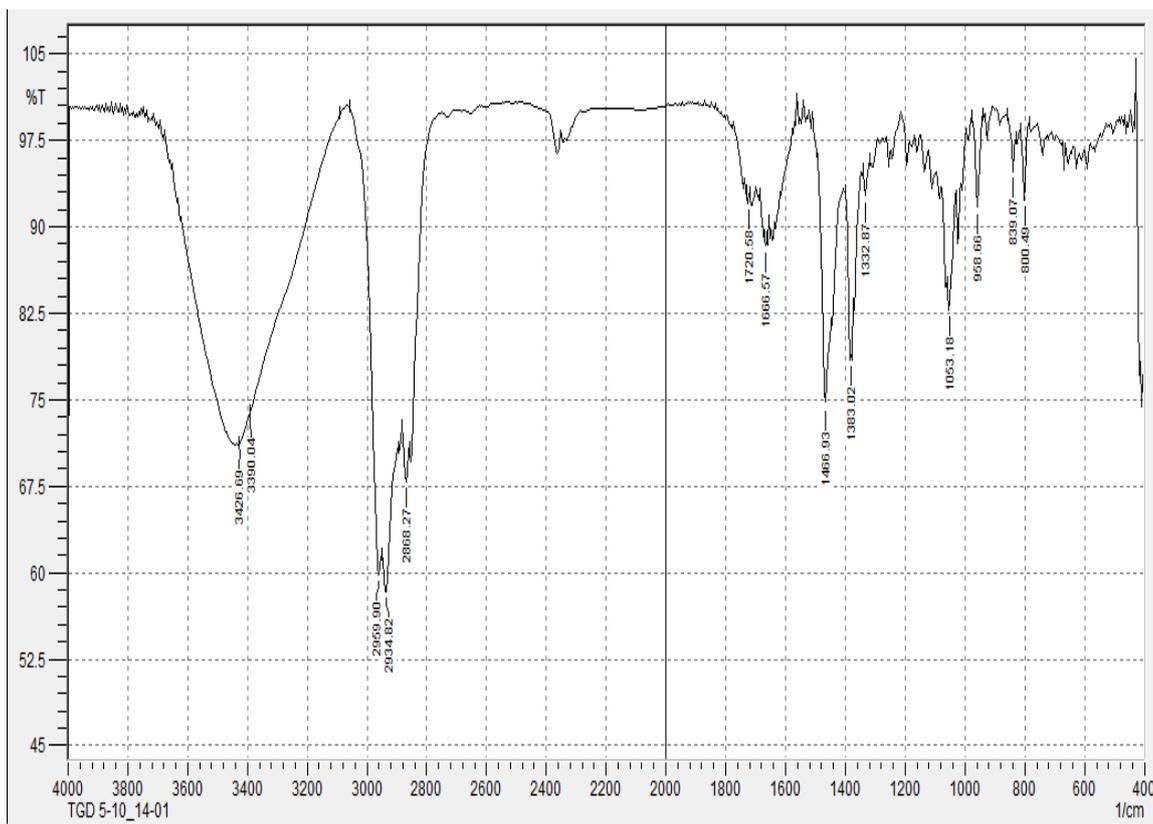


**S4**  $\beta$ -sitosterol

A substância **S4** presente na fração TGD-4-10 como sólido branco cristalino após eluição em CCDC e revelação com reagente de Liebermann-Burchard apresentou uma coloração rósea indicativo de triterpeno ou esteróide.

A identificação desta substância foi baseada nos dados obtidos no infravermelho (IV), RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , aliados aos dados do espectro de massas.

O espectro no infravermelho (Figura 30, p. 57) exibiu bandas de absorções referentes a deformações axiais de O-H na região de  $3432\text{ cm}^{-1}$ ; absorção intensa na faixa de  $2959\text{ cm}^{-1}$  referente a estiramento de grupo CH. As absorções na região de  $1466$ ,  $1383$  e  $1062\text{ cm}^{-1}$  representam, respectivamente, deformações angulares de  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  e deformação axial de C-O.



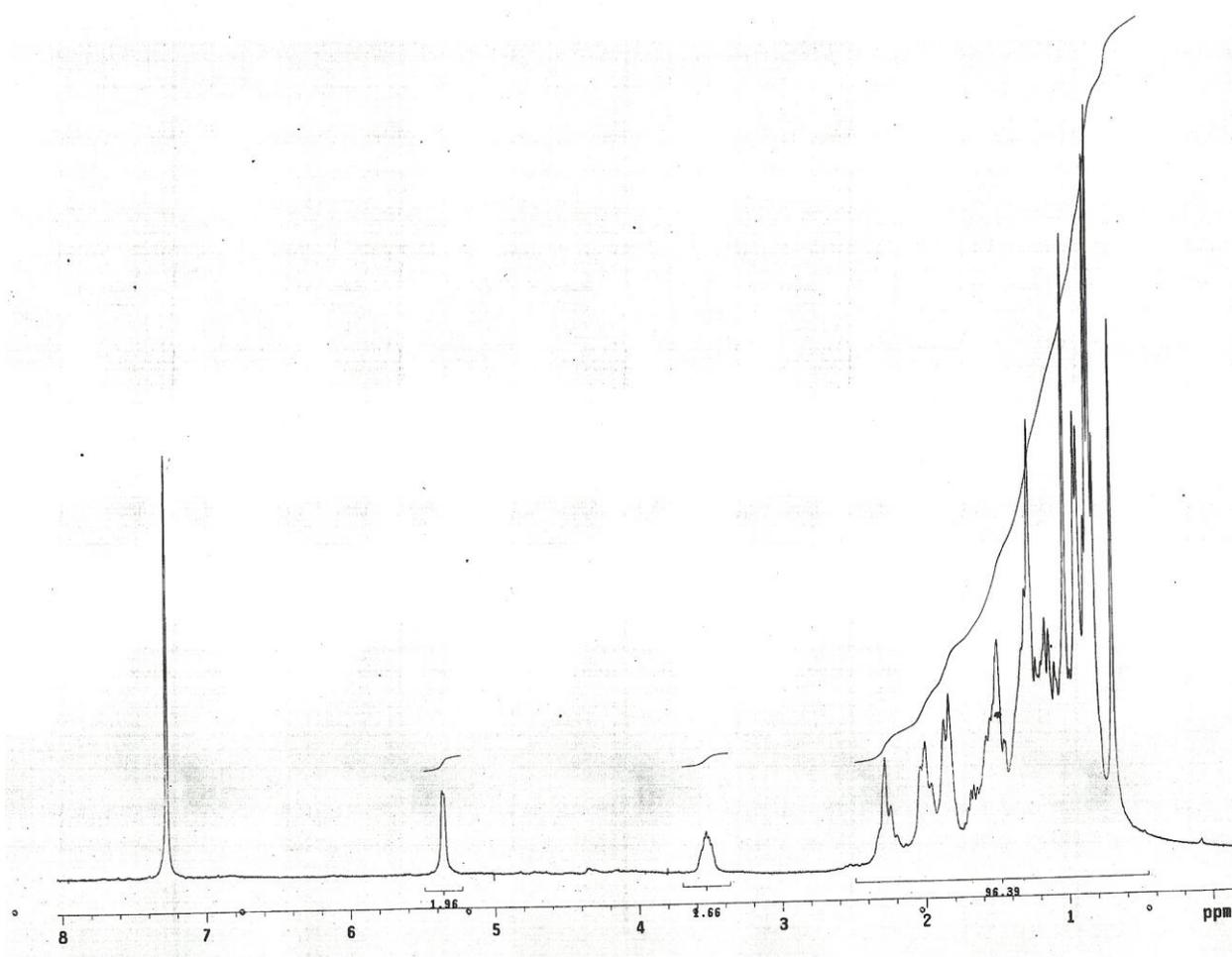
**Figura 30.** Espectro de infravermelho da substância **S4**.

Análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 31, p. 58) indicou vários sinais na região entre  $\delta$  0,67 e 1,00 correspondendo aos grupos metílicos (C-18, C-19, C-21, C-26, C-27 e C-29). As principais evidências do espectro de RMN  $^1\text{H}$  indicativas dessa estrutura foram a presença de um multipletto em  $\delta$  3,52 correspondente ao hidrogênio oximetínico e um dupletto em  $\delta$  5,33 correspondente ao hidrogênio olefínico H-6. Estes dados foram corroborados pelos sinais de carbono oximetínico em  $\delta$  71,79 (CH) e de carbonos olefínicos em  $\delta$  140,73 (C não hidrogenado) e  $\delta$  121,71 (CH), observados nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 32, p. 59).

O espectro de massas (Figura 33, p. 59) da substância **S4** apresentou íon molecular em  $m/z$  414. Este valor é característico do íon molecular da substância  $\beta$ -sitosterol.

A comparação dos dados obtidos, especialmente o espectro de RMN de

$^{13}\text{C}$ , com dados obtidos da literatura (GRECA, MÔNACO & PREVITERA, 1990; CARDOSO, 2007) (Tabela 9, p. 60) permitiram a identificação inequívoca da substância **S4** como sendo o  $\beta$ -sitosterol.



**Figura 31.** Espectro de RMN $^1\text{H}$  da substância **S4** [(300 MHz),  $\text{CDCl}_3$ ].

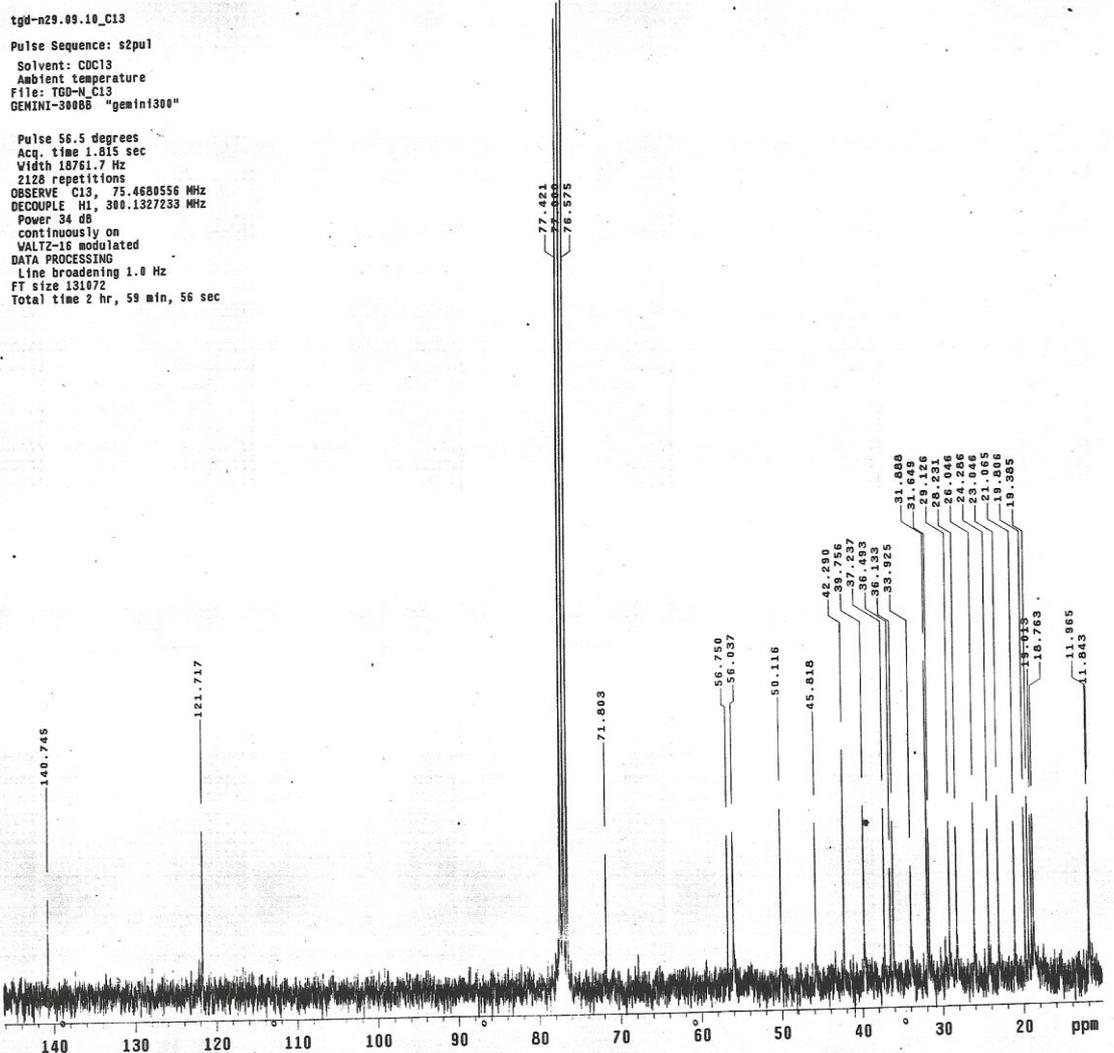


Figura 32. Espectro de RMN<sup>13</sup>C da substância **S4** [(75 MHz), CDCl<sub>3</sub>].

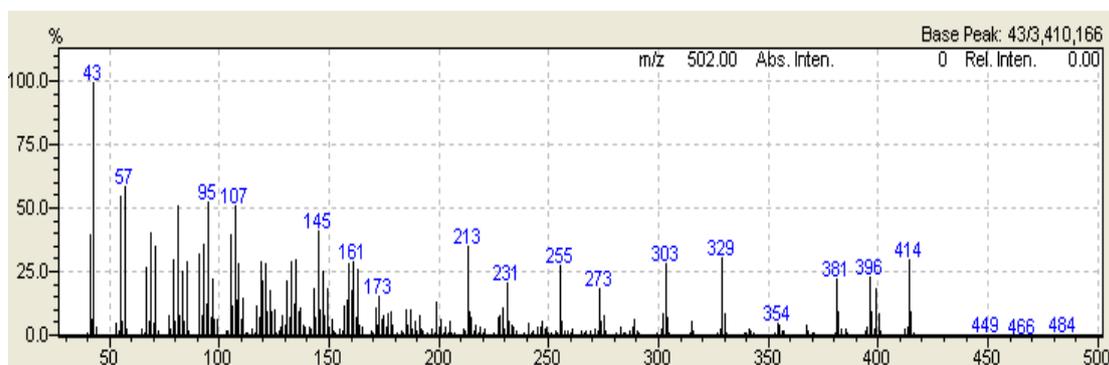


Figura 33. Espectro de massas da substância **S4**.

**Tabela 9.** Dados do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da Substância **S4** e valores da literatura

Posição	$\delta$	
	Substância S4	$\beta$ -sitosterol*
1	37,21	37,33
2	31,62	31,63
3	71,79	71,73
4	42,25	42,20
5	140,73	140,71
6	121,71	121,63
7	31,87	31,96
8	31,87	31,81
9	50,10	51,13
10	36,47	36,43
11	21,05	21,09
12	39,74	39,79
13	42,25	42,37
14	56,73	56,75
15	24,27	24,15
16	28,22	25,25
17	56,02	56,02
18	11,83	11,84
19	19,37	19,46
20	36,12	36,07
21	18,74	18,68
22	33,90	33,95
23	26,02	26,10

24	45,79	45,82
25	29,10	29,15
26	19,37	19,77
27	19,79	19,21
28	23,03	23,13
29	11,83	11,04

\*GRECA, MÔNACO & PREVITERA, 1990

#### 4.4 Perfil de ácidos graxos presentes nas fases hexânicas das folhas e sementes de *T. guianensis*

##### 4.4.1 Rendimento de óleo extraído dos extratos hexânicos

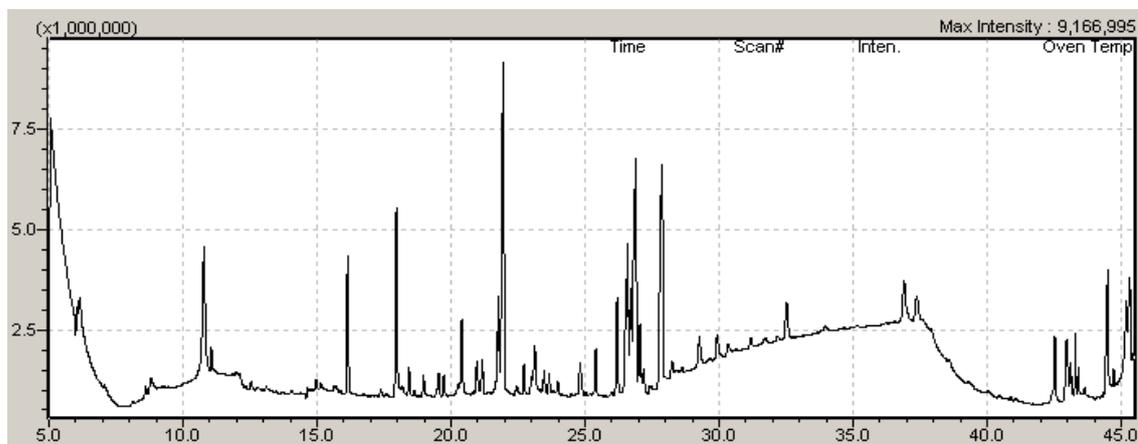
O rendimento de óleo extraído após processo de partições dos extratos hexânicos das folhas e das sementes de *T. guianensis* foram obtidos pela expressão:

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa da fase/extrato bruto}) \times 100$$

O rendimento obtido de óleo extraído do extrato hexânico das folhas foi de  $62,21 \pm 1,47$  %. Enquanto que o rendimento obtido de óleo extraído do extrato hexânico das sementes foi de  $84,17 \pm 0,07$  %. Pode-se verificar que foi extraído uma maior quantidade de óleo do extrato hexânico das sementes quando comparado a extração de óleo do extrato hexânico das folhas. Esse rendimento maior apresentado de óleo extraído das sementes já era esperado, visto que, as sementes possuem uma maior quantidade de óleo quando comparados com as folhas. Portanto as sementes desta espécie pode ser uma boa fonte de ácidos graxos.

#### 4.4.2 Identificação dos ésteres metílicos presentes na fase hexânica das folhas de *T. guianensis*

Após derivatização dos triglicerídeos presentes na fase hexânica das folhas por meio da reação de transesterificação e obtenção dos ésteres metílicos correspondentes, estes foram analisados por CG-EM. As análises foram realizadas em triplicata. No cromatograma (Figura 34) foram registrados sete picos majoritários com diferentes tempos de retenção, e cada um deles originou um espectro de massas cujos respectivos íons moleculares em  $m/z$  242,  $m/z$  270,  $m/z$  270,  $m/z$  294,  $m/z$  292,  $m/z$  296 e  $m/z$  298 fragmentos são correspondentes ao tetradecanoato de metila, 14-metil pentadecanoato de metila, hexadecanoato de metila, 9,12-octadecadienoato de metila, 9, 12, 15-octadecatrienoato de metila, 9-octadecenoato de metila e ao octadecanoato de metila respectivamente.



**Figura 34.** Cromatograma da fase hexânica transesterificada das folhas de *T. guianensis*

Estes resultados permitem sugerir que a maioria dos compostos presentes na fase hexânica transesterificada, encontram-se esterificados com ácidos graxos, principalmente com os seguintes ácidos: ácido mirístico (ácido tetradecanóico), ácido isopalmítico (ácido 14-metil-pentadecanóico), ácido palmítico (ácido hexadecanóico), ácido linoléico (ácido 9, 12-octadecadienóico), ácido alfa-linolênico (ácido 9,12,15-octadecatrienóico), ácido oléico (ácido 9-octadecanóico) e ácido esteárico (ácido octadecanóico) (Tabela 10).

Vale ressaltar que a identificação dos ésteres metílicos foi realizada através da comparação dos espectros de massas obtidos com os das bibliotecas NIST 147 e WILEY 8 com similaridade maior que 90% para maioria dos compostos, com exceções dos compostos; 14-metil pentadecanoato de metila e do 9,12,15-octadecatrienoato de metila, cujas similaridades foram de 87% respectivamente. Assim, admite-se que a provável composição dos triglicerídeos presentes na fase hexânica das folhas de *T. guianensis* sejam da mistura destes ésteres.

**Tabela 10.** Composição em ácidos graxos isolado das folhas de *T. guianensis*

<b>Ácido graxo</b>	<b>Tempo de retenção</b>	<b>% ± DP</b>
Mirístico, 14:0	16.147	9.22 ± 0,63
Isopalmítico, (i-16:0)	21.763	5.48 ± 0,01
Palmítico, 16:0	21.949	24.71 ± 2,48
Linoléico, 18:2 (9c, 12c)	26.585	12,26 ± 0,50
Alfa-linolênico, 18:3 (9c,12c,15c)	26.703	3.53 ± 0,38
Oléico, 18:1 (9c)	26.891	20.25 ± 1,25
Esteárico, 18:0	27.865	24.53 ± 1,06
Ácidos graxos saturados	-	57,14
Ácidos graxos insaturados	-	42,86
Total identificado	-	100

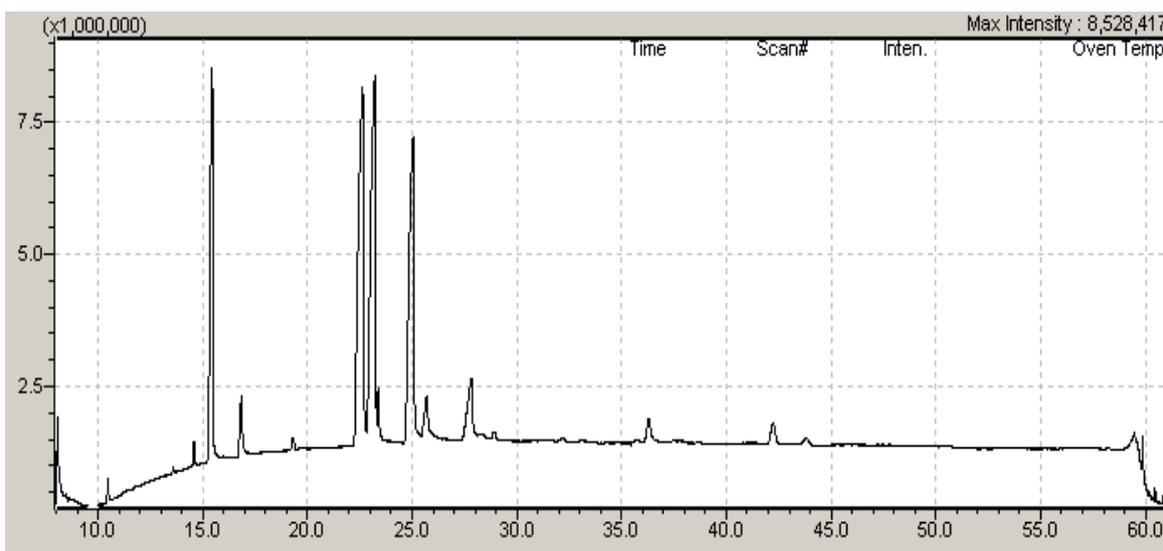
DP: desvio padrão

Desta forma, o óleo presente na fase hexânica das folhas de *T. guianensis* apresentou como componente majoritário o ácido palmítico (24.71 ± 2,48 %). Os ácidos graxos saturados e insaturados somaram 57,14 e 42,86%, respectivamente.

#### **4.4.3 Identificação dos ésteres metílicos presentes na fase hexânica das sementes de *T. guianensis***

Após derivatização do triglicerídeo presentes na fase hexânica das sementes por meio da reação de transesterificação e obtenção dos ésteres metílicos correspondentes, estes foram analisados por CG-EM. As análises foram realizadas em triplicata. No cromatograma (Figura 35) foram registrados quatro

picos majoritários com diferentes tempos de retenção, e cada um deles originou um espectro de massas cujos respectivos íons moleculares em  $m/z$  270,  $m/z$  294,  $m/z$  296 e  $m/z$  298 fragmentos são correspondentes ao hexadecanoato de metila, 9,12-octadecadienoato de metila, 12-octadecenoato de metila e ao octadecanoato de metila, respectivamente.



**Figura 35.** Cromatograma da fase hexânica transesterificada das sementes de *T. guianensis*

Estes resultados permitem sugerir que os compostos presentes na fase hexânica das sementes encontram-se esterificados, principalmente com os seguintes ácidos: ácido palmítico (hexadecanóico), ácido linoléico (9,12-octadecadienóico), ácido 12-octadecenóico e o ácido esteárico (octadecanóico) (Tabela 11).

Vale ressaltar que a identificação dos ésteres metílicos foi realizada através da comparação dos espectros de massas obtidos com os das bibliotecas NIST 147 e WILEY 8 com similaridade de 90%, 87%, 88% e 87% para o hexadecanoato de metila, 9,12-octadecadienoato de metila, 12-octadecenoato de metila e ao octadecanoato de metila, respectivamente.

Assim, admite-se que a provável composição dos triglicerídeos isolados das sementes de *T. guianensis* seja da mistura destes ésteres.

**Tabela 11.** Composição em ácidos isolado das sementes de *T. guianensis*

Ácido graxo	Tempo de retenção	% ± DP
Palmítico, 16:0	15.443	17.64 ± 0,75
Linoléico, 18:2 (9c, 12c)	22.632	29.88 ± 0,39
Octadecenóico, 18:2 (12c)	23.215	27.99 ± 1,08
Esteárico, (18:0)	25.036	24.49 ± 1,06
Ácidos graxos saturados	-	50,00
Ácidos graxos insaturados	-	50,00
Total identificado	-	100

DP: desvio padrão

Desta forma, o óleo presente na fase hexânica das sementes apresentou como componente majoritário o ácido linoléico (29.88 ± 0,39%). Os ácidos graxos saturados e insaturados somaram 50,00 e 50,00%, respectivamente.

#### 4.5 Avaliação da atividade citotóxica das fases diclorometano das folhas e sementes de *T. guianensis*

O ensaio sobre *Artemia Salina* Leach é um método simples, barato e eficiente de determinação de toxicidade aguda de substâncias. A tabela 12 apresenta os resultados de toxicidade para as fases diclorometano das folhas e sementes de *T. guianensis* (TGDF e TGDS) e da mistura das substâncias **S1**, **S2** e **S3**. De acordo com a literatura (ANDERSON *et al.*, 1991) a substância que apresentar  $DL_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$  é comparável com a camptotecina e sulfato de vincristina, sendo considerada muito ativa e, aquela que apresentar  $DL_{50} \geq 100 \mu\text{g/mL}$ , no intervalo entre 100 e 900  $\mu\text{g/mL}$ , comparável ao ácido hipúrico é considerada medianamente ativa. Enquanto que é considerada inativa a substância que apresentar  $LD_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ .

A fase diclorometano das folhas (TGDF) apresentou  $DL_{50} = 523,38 \mu\text{g/mL}$ , enquanto que a fase diclorometano das sementes (TGDS) apresentou  $DL_{50} = 2124,4 \mu\text{g/mL}$ . Enquanto que a mistura das substâncias (S1, S2 e S3), apresentou  $DL_{50} = 174,06$ . Sendo assim, a fase diclorometano das folhas (TGDF) e a mistura das substâncias (S1, S2 e S3) são consideradas

medianamente ativas podendo apresentar atividade anti- tumoral (DOLABELA, 1997). Já a fase diclorometano das sementes (TGDS) é considerada inativa, visto que apresentou  $DL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 12.** Resultado dos testes de toxicidade sobre *Artemia Salina*, relativo as fases diclorometano das folhas e sementes de *T. guianensis*

<b>Fases/Mistura das substâncias S1, S2 e S3</b>	<b><math>DL_{50} \mu\text{g/mL}</math></b>
TGDF	523,38
TGDS	2124,4
S1, S2 e S3	174,06

#### **4.6 Avaliação da Atividade Alelopática das fases diclorometano (TGDF e TGDS)**

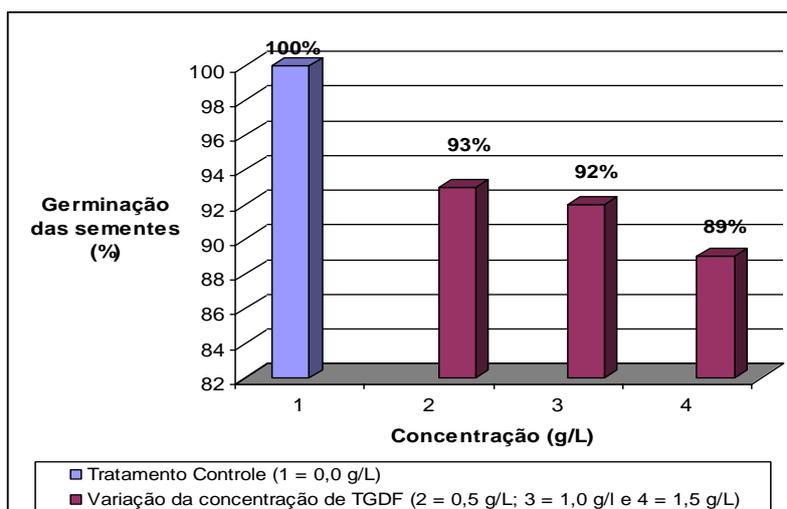
Ao final de 168 h, a germinabilidade das sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidos à ação das amostras (TGDF e TGDS) em diferentes concentrações mostrou pouca diferença significativa em relação ao tratamento controle (Tabela. 13).

**Tabela 13.** Efeito alelopático das fases (TGDF e TGDS) em diferentes concentrações na germinação de sementes de alface

Amostras	Tempo (h)/Média de sementes germinadas							Total de sementes germinadas
	24	48	72	96	120	144	168	
<b>Tratamento Controle</b>	5	4	1	0,0	0,0	0,0	0,0	10
<b>TGDF (0,5 g/L)</b>	2,3	5,7	*	1,0	0,3	*	*	9,3
<b>TGDF (1,0 g/L)</b>	2,0	3,3	1,7	1,3	0,3	0,6	*	9,2
<b>TGDF (1,5 g/L)</b>	1,3	5,3	1,0	1,0	0,3	*	*	8,9
<b>TGDS (0,5 g/L)</b>	3,6	5,0	0,3	0,3	*	*	0,6	9,8
<b>TGDS (1,0 g/L)</b>	4,0	2,6	2,3	0,6	0,3	0,0	0,0	9,8
<b>TGDS (1,5 g/L)</b>	4,6	3,3	1,0	0,3	0,3	0,0	0,0	9,5

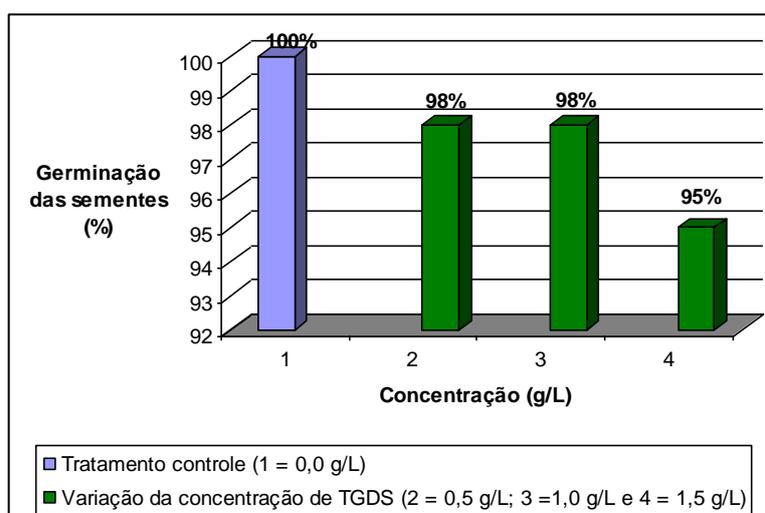
\* Não houve germinação de sementes nesse intervalo de tempo.

Comparando o bioensaio da amostra TGDF em diferentes concentrações e ao tratamento controle, verificou-se pequena interferência significativa no processo de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). Apesar disso, pode-se observar uma pequena tendência em inibir a germinação das sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), na medida em que houve o aumento da concentração da amostra. A amostra TGDF (1,5 g/L) de maior concentração apresentou uma maior capacidade de inibição de germinação quando comparadas com de menores concentrações (Figura 36).



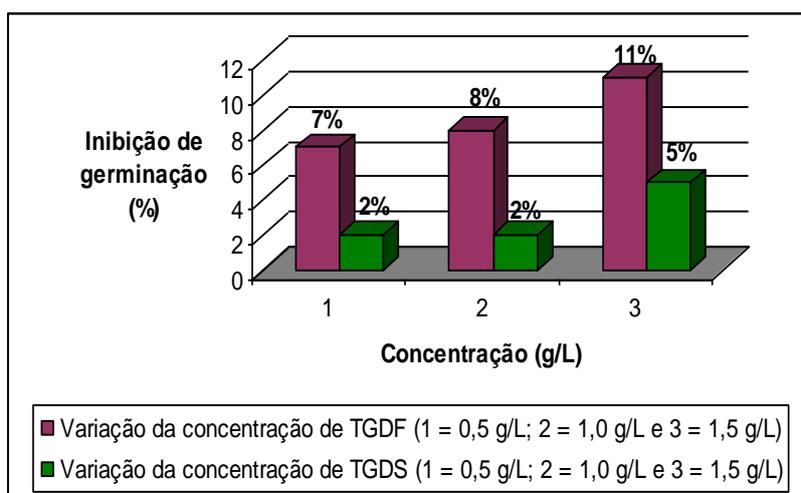
**Figura 36.** Efeitos alelopáticos da fase TGDF sobre a germinação das sementes de alface (*Lactuca sativa* L.)

A análise dos efeitos alelopáticos das amostras TGDS em diferentes concentrações (0,5; 1,0 e 1,5 g/L) sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) indicou também que houve baixa capacidade de inibição da germinação das sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). Comparando os tratamentos de bioensaios nas concentrações de 0,5 g/L, 1,0 g/L e 1,5 g/L da amostra TGDS ao tratamento controle, pode-se verificar que essas fases não apresentaram significativa redução da porcentagem de germinação das sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) (Figura 37).



**Figura 37.** Efeitos alelopáticos da fase TGDS sobre a germinação das sementes de alface (*Lactuca sativa* L.)

Pode-se constatar que tanto a fase diclorometano das folhas (TGDF) como a fase diclorometano das sementes (TGDS) de *T. guianensis*, apresentou baixa capacidade de inibição de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). No entanto, a fase TGDF quando comparada com a fase (TGDS) nas diferentes concentrações, apresentou uma maior capacidade de inibição de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) (Figura 38).



**Figura 38.** Efeitos inibitórios das amostras TGDF e TGDS sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.)

## 5. Considerações finais

Este trabalho contribuiu para o conhecimento da composição química da espécie *T. guianensis*. O fracionamento da fase diclorometano das sementes de *T. guianensis* levou a identificação de uma mistura de três novos dihidrobenzofuranóides alquilados: 2-[(10'*Z*)-dodec-10'-enil]-diidro-1-benzofuran-5-ol, 2-[(10'*Z*)-tridec-10'-enil]-diidro-1-benzofuran-5-ol e 2-[(10'*Z*)-pentadec-10'-enil]-diidro-1-benzofuran-5-ol, além disso, foi isolado um fitoesteróide já conhecido, o  $\beta$ -sitosterol.

O rendimento obtido de óleo extraído após processo de partição do extrato hexânico das folhas de *T. guianensis* para avaliação do perfil de ácidos graxos foi

de  $62,21 \pm 1,47$  %. Enquanto que, o rendimento obtido de óleo das sementes de *T. guianensis* para avaliação do perfil de ácidos graxos foi de  $84,17 \pm 0,07$  %.

No estudo do perfil de ácidos graxos do óleo presente na fase hexânica das folhas de *T. guianensis* apresentou como componente majoritário o ácido palmítico ( $24,71 \pm 2,48$  %). Os ácidos graxos saturados e insaturados somaram 57,14 e 42,86%, respectivamente.

Enquanto que, no estudo do perfil de ácidos graxos do óleo presente na fase hexânica das sementes apresentou como componente majoritário o ácido linoléico ( $29,88 \pm 0,39$ %). Os ácidos graxos saturados e insaturados somaram 50,00 e 50,00%, respectivamente.

Na avaliação da atividade citotóxica das fases diclorometânicas da folhas e das sementes de *T. guianensis* (TGDF e TGDS) frente à *Artemia salina* pode-se constatar que a fase diclorometano das folhas (TGDF) por apresentar  $DL_{50} = 523,38 \mu\text{g/mL}$ , foi considerada medianamente ativa podendo apresentar atividade anti-tumoral. Enquanto que, a fase diclorometano das sementes (TGDS) por apresentar  $DL_{50} = 2124,4 \mu\text{g/mL}$  foi considerada inativa, visto que apresentou  $DL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ . Na avaliação da atividade citotóxica da mistura das substâncias (S1, S2 e S3) frente à *Artemia salina* pode-se constatar que essa mistura é considerada medianamente ativa, por apresentar  $DL_{50} = 174,06 \mu\text{g/mL}$ .

No estudo do efeito alelopáticos das fases diclorometânicas da folhas e das sementes de *T. guianensis* (TGDF e TGDS) sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), pode-se constatar que tanto a fase diclorometano das folhas (TGDF) como a fase diclorometano das sementes (TGDS) de *T. guianensis*, apresentaram baixa capacidade de inibição de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.).

## 6. Referências bibliográficas

ADEGAS, F.S.; VOLL, E.; PRETE, C.E.C. Embebição e germinação de sementes de piçãopreto (*Bidens pilosa*). **Planta Daninha**, v.21, n.1., p. 21-25, 2003.

ANDERSON, J. E.; GOETZ, C. M.; MCLAUGHLIN, J. L.; SUFFNESS, M.; **Phytochemical. Anal.** 1991, 2, 107.

AKERELE, O. Summary of who guidelines for the assessment of herbal medicines. **HerbalGram**, v. 28, p. 13-20, 1993.

AWAD, A. B.; FINK, C. S. Phytosterols as anticancer dietary components: evidenceand mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v. 130, n.9, p. 2127-2130, 2000.

BALUNAS, M. J.; DOUGLAS KINGHORN, A. D. Drug Discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431- 441, 2005.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. **Carbon-13 NMR spectroscopy: High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry**. New York, NY: 3.ed. 1987. 513 p.

CARDOSO, M. P. **Estudo Fitoquímico do Caule de *Schinopsos Brasiliensis* Engl. (Anacardeaceae)**. 2007. 227 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

CARTER, G. T.; KOHEN, F. E. The evolving role of natural products in drug discovery. **Drug Discovery**, v.4, p. 203 - 220, 2005.

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

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAIS, L. E. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica**. Petrópolis, RJ: Ed. Vozes, 1998.

CORREIA, S. de J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; Constituintes das cascas de *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae). **Química Nova**. v. 26, n.1, p. 36-38, 2003.

CORREIA, S. de J. **Estudo Químico das cascas de duas espécies de *Tapirira* (Anacardiaceae)**. 1999. 140 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1999.

CORREIA, S. de J. **Flavanóides, Terpenóides e novos Hidrobenzofuranóides Bioativos das Folhas de *Tapirira guianensis***. 2005. 308 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

CORREIA, S. de J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; Metabólitos Secundários de Espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**. v. 29, n.6, p. 1287-1300, 2006.

CORREIA, S. de J.; DAVID, J. M.; SILVA, E. S.; DAVID, J. P.; LOPES, L. M. X.; GUEDES, M. L. S.; Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das Folhas de *Tapirira guianensis*. **Química nova**. v.31, p. 1- 4, 2008.

COSTA, P. M. **Avaliação do potencial antitumoral dos hidrobenzofuranóides isolados das folhas de *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae)**. 2006. 126 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2006.

DAVID, J. M.; CHÁVEZ, J. P.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. Two New Cytotoxic Compounds from *Tapirira guianensis*. **Journal of Natural Products**., v. 61, n.2, p. 287-289, 1998.

DAVID, J. P.; SILVA, E. F. da; MOURA, D. L. de; GUEDES, M. L. S.; ASSUNÇÃO, R. de J.; DAVID, J. M. Lignan e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**. v. 24, p. 730-733, 2001.

DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SENATORE F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry**, v.61, n. 5, p. 573-578, 2002.

Disponível na internet <[http://zipcodezoo.com/Plants/T/Tapirira\\_brenesii/](http://zipcodezoo.com/Plants/T/Tapirira_brenesii/)> Acesso em: 04 de novembro de 2010.

Disponível na internet

<<http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Tapirira&commonname=>>

Acesso em: 04 de novembro de 2010.

DOLABELA, M. F. **Triagem *in vitro* para atividade antitumoral e anti *Trypanossoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. 1997. 130p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DURAM, J. M.; TORTOSA, M. E. The effect of mechanical and scarification on germination of charlock (*Sinapsis arvensis* L.) seeds. **Seed Science Technology**, v.13, n.1, p.155-163, 1985.

FERNANDES, M. M. **Biologia reprodutiva de *Tapirira guianensis* Aubl. (ANACARDIACEAE), na Amazônia Oriental**. 2006. 76 f. Dissertação (Mestrado em Botânica Tropical) – Universidade Federal Rural do Amazônia, 2006.

FORZZA, R. C. & *et al.* 2010 **Lista de espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>> Acesso em: 24 de novembro de 2010.

GALAN, V. The situations of mango culture in the world. **Acta Horticulture**, v. 241, p.31-41, 1993.

GARRIDO, G.; GONZALEZ, D.; LEMUS, Y.; GARCIA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; DELGADO, R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANGÆ). **Pharmacological Research**, v. 50, p. 143 - 149, 2004.

GRECA, M. D.; MONACO, P.; PREVITERA, L. Stigmasterols from *Typha Latzfolza*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 6, p.1430-1435, 1990.

JUNTILA, O. Seed and embryo germination in *S. vulgaris* and *S. reflexa* as affected by temperature during seed development. **Plant Physiology.**, v. 29, p. 264-268, 1976.

KINGSTON, D. G. I. **Anticancer agents from natural products**, In: Taxol and its analogs. Taylor e Francis group. p. 89 – 90, 2005.

KOZUBEK, A.; TYMAN, J. H. P. Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. **Chemical Reviews**. 1999, 99,1.

LEE, K. H. Current developments in the Discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 273 – 283, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2ª ed. Nova Odessa, São Paulo: Ed. Plantarum, 1998.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultura de plantas arbóreas nativas do Brasil. 1a.ed., Nova Odessa, São Paulo: Ed. Plantarum, 1992.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4a.ed., Nova Odessa, São Paulo: Ed. Plantarum, 2002.

MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 78, p. 133-137, 2001.

MOREIRA, B. O. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hexânico e diclorometânico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae)**. 2009. 127 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2000, 2. ed., p. 11-24.

OJEWOLE, J. A. O. Antiinflammatory, analgesic and hypoglycemic effects of *Mangifera indica* Linn. (Anacardiaceae) stem-bark aqueous extract. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, Barcelona, v. 27, p. 547 - 554, 2005.

OVESNA, Z.; VACHALKOVA, A.; HORVATHOVA, K. Taraxasterol and beta-sitosterol: New naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects. **Neoplasma**, v. 51, n.6, p. 407-414, 2004.

PARDO-ANDREU, G. L.; BARRIOS, M.F.; CURTI, C.; HERNÁNDEZ, I.; MERINO, N.; LEMUS, Y.; MARTINEZ, I.; RIANO, A.; DELGADO, R. Protective effects of *Mangifera indica* L extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rat serum and liver. **Pharmacological Research**, London, v. 57, p. 79-86, 2008.

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

PIO-CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1974. p. 87, 88. v. 5.

ROBINSON, T. **The Organic Constituents of Higher Plants**. 6 ed. Massachusetts : Cordus Press. p. 151-153. 1991.

ROUMY, V.; FABRE, N.; PORTELA, B.; BOURDY, G.; ACEBEY, L.; VIGORC, C.; VALENTIN, A.; MOULIS, C. Four anti-protozoal and anti-bacterial compounds from *Tapirira guianensis*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 305, 2009.

SAIRAM, K.; HEMALATHA, S.; KUMAR, A.; SRINIVASAN, T.; GANESH, J.; SHANKAR, M.; VENKATARAMAN, S. Evaluation of anti-diarrhoeal activity in seed extracts of *Mangifera indica*. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 84, p.11-15, 2003.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P. R.: Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos in: SIMÕES, C. M. SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4 ed., Porto alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 301–330, 2002.

SERAFIN, C. **Estudo da composição químicas e das propriedades biológicas das partes aéreas de *Plinia glomerata***. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado), Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

STANDLEY, P.C. & STEYERMARK, J.A. Anacardiaceae. (Eds), **Flora of Guatemala** - Part VI. Fieldiana, Bot. 24(6): p. 177-195, 1949.

STROHL, W. R. The role os natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 39-41, 2000.

SILVA, O. N.; CHINALIA L. A.; PAIVA, J. A. de. Caracterização histoquímica dos folíolos de *Spondias tuberosa* arruda (Anacardiaceae lindl.). **Revista Caatinga**. v.21, n.3, p.62-68, 2008.

SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R. Anacardiaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB004408>> Acesso em: 05 de novembro de 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Tradução de Paula Fernandes de Aguiar e Ricardo Bicca de Alencastro. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 488 p.

TYMAN, J. H. P. Non-isoprenoid long chain phenols. **Chemical Society Reviews.**, v. 8, p. 499, 1979.

WALTERS, D.; CRAIG, R. e MUMMA, R. O. Fatty acid incorporation in the biosynthesis of anacardic acids or Geraniums. **Phytochemistry**, n. 6, p. 1815, 1990.

VIEIRA, R. F., MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 3, n.1, p.13-36, 2000.

VIEGAS Jr., C.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v. 29, n.2, p.326-337, 2006.

VOGL, O.; MITCHELL, J. D. Oriental lacquer. 11. Botany and chemistry of the active components of poisonous Anacardiaceae. **J. M. S. - Pure and Applied Chemistry**. A33, p. 1581-1599, 1996.