



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

**Estudo químico e avaliação da atividade biológica das espécies  
*Astronium graveolens*, *Tapirira guianensis* e *Spondias mombin*  
(ANACARDIACEAE)**

**ELIEZER PEREIRA DA SILVA**

Salvador-BA  
2016

**ELIEZER PEREIRA DA SILVA**

**Estudo químico e avaliação da atividade biológica das espécies  
*Astronium graveolens*, *Tapirira guianensis* e *Spondias mombin*  
(ANACARDIACEAE)**

Tese submetida ao Colegiado de  
Pós-graduação em Química da  
UFBA como requisito parcial para o título de  
Doutor em Química Orgânica

**Orientador:** Prof. Dr. Jorge Mauricio David

Salvador-BA  
2016

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo.

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

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

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

A Professora Dra. Juceni Pereira David pela amizade, pela orientação valiosa durante os meus primeiros passos como aluno de iniciação científica (IC).

Ao Professor Dr. Clayton Queiroz Alves da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), pela colaboração na realização do teste de atividade inibidora da acetilcolinesterase.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de estudos e apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal da Bahia e aos professores do Colegiado de Pós-graduação, pelos valiosos ensinamentos.

Aos funcionários do Instituto de Química.

Aos alunos de iniciação científica Geisse e Maisa, pela colaboração na realização desse trabalho.

Aos colegas de laboratório (GPPN): Bruno, Clayton, José Candido, Raul, Darlan, André, Patricia, Larissa, Bel, Hugo, Silvana, Mariluze, Vanessa, Geisse, Maisa e Amanda pela ótima convivência e amizade.

Muito obrigado a todos que, de alguma forma, contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

## RESUMO

Este trabalho descreve o estudo fitoquímico de três espécies de plantas da família Anacardiaceae: *Astronium graveolens* Jacq., *Tapirira guianensis* Aubl. e *Spondias mombin* L. Das fases orgânicas de *A. graveolens* foram isolados o ácido gálico, galato de metila, quercitrina,  $\beta$ -sitosterol, daucosterol, além dos três dímeros de chalconas (7''\*R,8''\*S)-2',4,4',5-tetra-hidroxichalcona-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4'',4'''-tri-hidroxi-7'',8''-di-hidrochalcona, (7\*S,8\*S,7''\*S,8''\*R)-2',4,4',5,7-penta-hidroxi-7,8-di-hidrochalcona-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4'',4'''-tri-hidroxi-7'',8''-di-hidrochalcona e (7\*S,8\*R,7''\*S,8''\*S)-2',4,4',5,7-penta-hidroxi-7,8-di-hidrochalcona-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4'',4'''-tri-hidroxi-7'',8''-di-hidrochalcona. Foram ainda identificados ácidos graxos de triacilglicerídeos por CG-EM presentes em frações das fases diclorometano das folhas e dos caules de *A. graveolens*. Da fase diclorometano das folhas foram identificados em mistura cinco ácidos graxos de triacilglicerídeos (ácido mirístico, ácido palmítico, ácido linoléico, ácido  $\alpha$ -linolênico e ácido esteárico). Enquanto que da fase diclorometano do caule foram identificados em mistura seis ácidos graxos de triacilglicerídeos (ácido mirístico, ácido palmítico, ácido linoléico, ácido oleico, ácido vaccênico e o ácido esteárico). O estudo fitoquímico das fases orgânicas das flores de *T. guianensis* resultou no isolamento de três metabólitos secundários; quercetina, quercitrina e o ácido gálico. Os principais constituintes voláteis identificados nos óleos essenciais extraídos das flores de *T. guianensis* e de *S. mombin* foram de natureza terpênica. Os componentes majoritários presente no óleo essencial extraído das flores de *T. guianensis* foram os sesquiterpenos  $\alpha$ -copaeno e o (*E*)-cariofileno. Já no óleo essencial extraído das flores de *S. mombin* o componente majoritário foi o sesquiterpenoide óxido de cariofileno. Na avaliação da atividade antioxidante das fases orgânicas de *A. graveolens*, foram as fases acetato de etila das folhas e dos caules que apresentaram as melhores atividades antioxidante no teste do sequestro do radical DPPH. Já no teste do sequestro do radical DPPH das fases orgânicas das flores de *T. guianensis* foi a fase acetato de etila que apresentou considerável atividade antioxidante. No teste de letalidade da *A. salina* os resultados obtidos para as fases orgânicas de *A. graveolens*, indicaram uma elevada toxicidade das fases diclorometano das folhas e dos caules, sendo consideradas muito ativas. Já no teste de letalidade da *A. salina* para as fases orgânicas das flores de *T. guianensis*, os resultados obtidos indicaram uma moderada toxicidade das fases diclorometano, acetato de etila e butanólica. Na avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase *in vitro* das fases orgânicas de *A. graveolens*, foram as fases acetato de etila das folhas e dos caules que apresentaram as melhores atividades anticolinesterásica. Das substâncias isoladas, foram os três dímeros de chalconas que apresentaram excelentes atividade anticolinesterásica, apresentando valores de inibição próximos ao valor do padrão eserina.

**Palavras-chave:** Anacardiaceae, *Tapirira guianensis*, *Astronium graveolens*, *Spondias mombin*

## ABSTRACT

This work describes the phytochemical study of three species of Anacardiaceae family plants: *Astronium graveolens* Jacq, *Tapirira guianensis* Aubl. and *Spondias mombin* L.. From the organic phase of *A. graveolens* were isolated gallic acid, methyl gallate, quercitrin,  $\beta$ -sitosterol, daucosterol, besides the three dimeric chalcones (7' 'R \* , 8' 'S \*)2',4,4',5-tetrahydroxychalcone-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4'',4'''-trihydroxy-7'',8''-dihydrochalcone, (7\*S,8\*S,7''\*S,8''\*R)-2',4,4',5,7-pentahydroxy-7,8-dihydrochalcone-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4'',4'''-trihydroxy-7'',8''-dihydrochalcone and (7\*S,8\*R,7''\*S,8''\*S)-2',4,4',5,7-pentahydroxy-7,8-dihydrochalcone-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4'',4'''-trihydroxy-7'',8''-dihydrochalcone. They were also identified triacylglycerides of fatty acids by GC-MS present in the fractions of dichloromethane phases of leaves and stems of *A. graveolens*. The dichloromethane phase leaves were identified in mixture of triacylglycerides five fatty acids (myristic acid, palmitic acid, linoleic acid,  $\alpha$ -linolenic acid and stearic acid). While the stem dichloromethane phase was identified in mixture of triacylglycerides six fatty acids (myristic acid, palmitic acid, linoleic acid, oleic acid, vaccenic acid and stearic acid). The phytochemical study of organic phases of *T. guianensis* flowers resulted in the isolation of three secondary metabolites; quercetin, quercitrin and gallic acid. The main volatile components identified in the essential oils extracted from flowers of *T. guianensis* and *S. mombin* were terpene nature. The major compounds present in the essential oil extracted from *T. guianensis* flowers were the sesquiterpene  $\alpha$ -copaene and (*E*) -caryophyllene. In the essential oil extracted from the flowers of *S. mombin* the major component was the sesquiterpenoide caryophyllene oxide. In the evaluation of the antioxidant activity of organic phases of *A. graveolens* were phases ethyl acetate of the leaves and stems that showed the best antioxidant activities in test sequestration of DPPH radical. In the test of the DPPH radical sequestration of organic phases of *T. guianensis* flowers was the ethyl acetate phase which showed considerable antioxidant activity. In lethality test *A. salina* results obtained for the organic phase *A. graveolens*, indicated a high toxicity of dichloromethane phases of leaves and stems, and are considered very active. In the lethality test for *A. salina* organic phases *T. guianensis* flowers, the results showed a moderate toxicity phases of dichloromethane, ethyl acetate and butanol. In the evaluation of the inhibitory activity of acetylcholinesterase organic phases *A. graveolens*, were phases ethyl acetate leaves and stems which showed the best anticholinesterase activity. Of the isolated compounds were the three dimers chalcones that showed excellent anticholinesterase activity, with inhibition values close to the value of eserine standard.

**Keywords:** Anacardiaceae, *Tapirira guianensis*, *Astronium graveolens*, *Spondias mombin*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Distribuição de espécies da família Anacardiaceae no mundo.....	26
<b>Figura 2</b> - Estruturas dos biflavonoides isolados do gênero <i>Rhus</i> .....	29
<b>Figura 3</b> - Exemplos de alguns triterpenoides isolados de <i>M. indica</i> .....	31
<b>Figura 4</b> - Estrutura da mangiferina.....	31
<b>Figura 5</b> - Principais constituintes do LCC.....	33
<b>Figura 6</b> – Estruturas das três chalconas diméricas (urundeuvinas A, B e C).....	35
<b>Figura 7</b> – Fotos de <i>Astronium graveolens</i> (Aroeira).....	37
<b>Figura 8</b> – Estrutura do monoterpeneo <i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno.....	37
<b>Figura 9</b> – Substâncias isolados dos caules de <i>Astronium graveolens</i> .....	38
<b>Figura 10</b> – Fotos de <i>Tapirira guianensis</i> (pau-pombo) .....	40
<b>Figura 11</b> – Compostos isolados das sementes de <i>T. guianensis</i> .....	41
<b>Figura 12</b> – Compostos isolados do extrato hexânico das cascas de <i>T. guianensis</i> .....	42
<b>Figura 13</b> – Compostos isolados do extrato clorofórmico das cascas de <i>T. guianensis</i> .....	42
<b>Figura 14</b> – Novos hidrobenzofuranoides isolados das folhas de <i>T. guianensis</i> .....	43
<b>Figura 15</b> – Substâncias isolados em mistura das folhas de <i>T. guianensis</i> .....	44
<b>Figura 16</b> – Componentes epiméricos isoladas das folhas de <i>T. guianensis</i> .....	44
<b>Figura 17</b> – Substâncias isoladas das folhas de <i>T. guianensis</i> .....	45
<b>Figura 18</b> – Estruturas dos di-hidrobenzofuranoides alquilados das sementes de <i>T. guianensis</i> .....	45
<b>Figura 19</b> – Fotos de <i>Spondias mombin</i> (cajazeira) .....	48
<b>Figura 20</b> – Estrutura da $\beta$ -criptoxantina.....	48
<b>Figura 21</b> – Estrutura da luteína.....	48
<b>Figura 22</b> – Estruturas dos taninos elágicos (geraniina e galoilgeraniina).....	49
<b>Figura 23</b> – Estrutura do ácido 2- <i>O</i> -cafeoil-(+)-allohidroxicítrico.....	50

<b>Figura 24</b> – Estrutura do éster butílico do ácido clorogênico.....	50
<b>Figura 25</b> – Estruturas de ácidos 6-alquenil-salicílico.....	50
<b>Figura 26</b> – Estrutura do ácido 6-(8'Z, 11'Z, 14'Z – heptadecatrienil)-salicílico.....	50
<b>Figura 27</b> – Estruturas dos flavonoides isolados das folhas de <i>S. mombin</i> .....	51
<b>Figura 28</b> – Estruturas dos triterpenóides isolados das folhas de <i>S. mombin</i> .....	52
<b>Figura 29</b> – Esqueleto básico de um flavonoide (anéis A, B e C).....	52
<b>Figura 30</b> – Esqueletos básicos de flavonoides.....	53
<b>Figura 31</b> – Núcleo estrutural básico das chalconas.....	54
<b>Figura 32</b> – Exemplos de monoterpenos, fenilpropanoides e sesquiterpenos presentes nos óleos essenciais.....	56
<b>Figura 33</b> – Forma radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH.....	59
<b>Figura 34</b> – Reações químicas envolvidas no teste de atividade anticolinesterase desenvolvido por Ellman.....	62
<b>Figura 35</b> – Procedimento experimental empregado no preparo dos extratos e das fases das folhas e caules de <i>A. graveolens</i> .....	68
<b>Figura 36</b> – Procedimento experimental empregado no preparo do extrato e das fases orgânicas das flores de <i>T. guianensis</i> .....	70
<b>Figura 37</b> – Cromatograma em $\lambda = 254$ nm da subfração <b>DCAG-27-E-4</b> .....	78
<b>Figura 38</b> – Espectro no UV/VIS, obtido pelo detector SPD-M20A, da subfração <b>DCAG-27-E-4</b> .....	79
<b>Figura 39</b> – Espectro no UV/VIS, obtido pelo detector SPD-M20A, da subfração <b>DCAG-27-E-4</b> .....	79
<b>Figura 40</b> - Espectro na região do infravermelho (IV) de <b>AG1</b> .....	99
<b>Figura 41</b> - Cromatograma (CG-EM) de <b>AG1</b> transesterificada.....	100
<b>Figura 42</b> - Espectro de massas do tetradecanoato de metila (miristato de metila).....	101
<b>Figura 43</b> - Espectro de massas do hexadecanoato de metila (palmitato de metila).....	101
<b>Figura 44</b> - Espectro de massas do octadecanoato de metila (esterato de metila).....	101
<b>Figura 45</b> - Espectro de massas do <i>cis,cis</i> -9,12-octadecadienoato de metila (linoleato de metila).....	104

<b>Figura 46</b> - Espectro de massas do <i>cis,cis,cis</i> -9, 12, 15-octadecatrienoato de metila (linolenato de metila).....	104
<b>Figura 47</b> - Estruturas dos ácidos graxos que compõem os triacilglicerídeos presentes em <b>AG1</b> .....	105
<b>Figura 48</b> – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm da substância <b>AG2</b> .....	106
<b>Figura 49</b> – Espectro no UV, obtido pelo detector DAD, da substância <b>AG2</b> .....	106
<b>Figura 50</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>AG2</b> [300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	107
<b>Figura 51</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>AG2</b> [75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	108
<b>Figura 52</b> – DEPT $135^\circ$ da substância <b>AG2</b> [75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	108
<b>Figura 53</b> – Cromatograma em $\lambda = 254$ nm da substância <b>AG3</b> .....	110
<b>Figura 54</b> – Espectro no UV/VIS, obtido pelo detector SPD-M20A, de <b>AG3</b> .....	110
<b>Figura 55</b> - Espectro na região do infravermelho (IV) da substância <b>AG3</b> .....	111
<b>Figura 56</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>AG3</b> [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	112
<b>Figura 57</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>AG3</b> [125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	112
<b>Figura 58</b> – Estrutura do anel <b>A</b> da unidade <b>I</b> do dímero de chalcona.....	113
<b>Figura 59</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ampliado na região entre $\delta 6,18$ e $\delta 7,72$ da <b>AG3</b> [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	113
<b>Figura 60</b> – Espectro de HMQC da substância <b>AG3</b> [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	114
<b>Figura 61</b> – Espectro de HMBC da substância <b>AG3</b> [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	115
<b>Figura 62</b> – Ampliação na região entre $\delta 7,40$ e $\delta 8,15/ \delta 160$ e $\delta 208$ do espectro de HMBC de <b>AG3</b> [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	115
<b>Figura 63</b> - Principais correlações observadas no espectro de HMBC que permitiram posicionar a carbonila próxima ao anel <b>A</b> da unidade <b>I</b> do dímero de chalcona.....	115
<b>Figura 64</b> – Ampliação na região entre $\delta 6,30$ e $\delta 6,90$ do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>AG3</b> [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	117
<b>Figura 65</b> – Anel aromático 1,2,4,5-tetrasubstituído do anel <b>B</b> da unidade <b>I</b> do dímero de chalcona.....	117
<b>Figura 66</b> – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel <b>B</b> da unidade <b>I</b> do dímero de chalcona.....	117
<b>Figura 67</b> – Ampliação na região entre $\delta 6,95$ e $\delta 7,35$ do espectro de HMBC de <b>AG3</b> [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	118



<b>Figura 68</b> – Correlação observada no espectro de HMBC que permitiu conectar o anel <b>A</b> ao anel <b>B</b> da unidade <b>I</b> do dímero de chalcona.....	118
<b>Figura 69</b> – Ampliação na região entre $\delta$ 6,60 e $\delta$ 7,10 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>AG3</b> [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	119
<b>Figura 70</b> – Ampliação na região entre $\delta$ 6,60 e $\delta$ 7,10/ $\delta$ 115 e $\delta$ 135 do espectro de HMQC de <b>AG3</b> [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	120
<b>Figura 71</b> – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel <b>B</b> da unidade <b>II</b> do dímero de chalcona.....	120
<b>Figura 72</b> – Ampliação na região entre $\delta$ 4,60 e $\delta$ 5,7/ $\delta$ 40,0 e $\delta$ 210,0 do espectro de HMBC de <b>AG3</b> [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	120
<b>Figura 73</b> – Correlações observadas no espectro de HMBC que possibilitaram a confirmação das posições de junção das duas unidades do dímero de chalcona.....	121
<b>Figura 74</b> – Ampliação na região entre $\delta$ 6,28 e $\delta$ 7,80 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>AG3</b> [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	122
<b>Figura 75</b> – Anel aromático 1,2,4-trissubstituído do anel <b>A</b> da unidade <b>II</b> do dímero de chalcona.....	122
<b>Figura 76</b> – Ampliação na região entre $\delta$ 6,20 e $\delta$ 7,74/ $\delta$ 103,5 e $\delta$ 136,5 do espectro de HMQC de <b>AG3</b> [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	122
<b>Figura 77</b> – Ampliação na região entre $\delta$ 6,20 e $\delta$ 7,74/ $\delta$ 160,5 e $\delta$ 208,5 do espectro de HMBC de <b>AG3</b> [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	123
<b>Figura 78</b> – Correlações observadas no espectro de HMBC que possibilitaram o posicionando o anel <b>A</b> da unidade <b>II</b> na molécula.....	123
<b>Figura 79</b> – Estruturas de <b>urundeuvina A</b> e <b>shinopsona B</b> .....	124
<b>Figura 80</b> – Espectro de massas de alta resolução de <b>AG3</b> com ionização ESI no modo positivo.....	125
<b>Figura 81</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>AG4</b> [500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , $\delta$ (ppm)].....	128
<b>Figura 82</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>AG4</b> ampliado na região entre $\delta$ 3,80 e $\delta$ 5,50 [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	129
<b>Figura 83</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>AG4</b> [(125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , $\delta$ (ppm)].....	129
<b>Figura 84</b> - Espectro na região do infravermelho (IV) de <b>AG5</b> .....	131
<b>Figura 85</b> - Cromatograma (CG-EM) dos ésteres metílicos de ácidos graxos obtidos a partir da reação de transesterificação de <b>AG5</b> .....	132
<b>Figura 86</b> - Espectro de massas do tetradecanoato de metila (miristato de metila).....	133

<b>Figura 87</b> - Espectro de massas do hexadecanoato de metila (palmitato de metila).....	133
<b>Figura 88</b> - Espectro de massas do octadecanoato de metila (esterato de metila).....	133
<b>Figura 89</b> - Espectro de massas do <i>cis,cis</i> -9,12-octadecadienoato de metila (linoleato de metila).....	136
<b>Figura 90</b> - Espectro de massas do <i>cis</i> -9-octadecenoato de metila.....	136
<b>Figura 91</b> - Espectro de massas do <i>cis</i> -11-octadecenoato de metila.....	136
<b>Figura 92</b> - Estruturas dos ácidos graxos que compõem os triacilglicerídeos presentes em AG5.....	137
<b>Figura 93</b> . Espectro na região do infravermelho (IV) da substância AG6.....	138
<b>Figura 94</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de AG6 [300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ (ppm)].....	139
<b>Figura 95</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de AG6 [75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ (ppm)].....	139
<b>Figura 96</b> – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em λ = 265 nm da substância AG7.....	141
<b>Figura 97</b> – Espectro no UV, obtido pelo detector DAD, da substância AG7.....	141
<b>Figura 98</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de AG7 [300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)].....	142
<b>Figura 99</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de AG7 [75 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)].....	143
<b>Figura 100</b> – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em λ = 290 nm de AG8.....	144
<b>Figura 101</b> – Espectro no UV, obtido pelo detector DAD, da substância AG8.....	145
<b>Figura 102</b> – Espectro na região do infravermelho (IV) da substância AG8.....	145
<b>Figura 103</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de AG8 [300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)].....	146
<b>Figura 104</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de AG8 [75 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)].....	147
<b>Figura 105</b> – DEPT 135° de AG8 [75 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)].....	147
<b>Figura 106</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H ampliado na região entre δ 6,42 e δ 7,43 da AG8 [300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)].....	148
<b>Figura 107</b> – Estrutura do anel A da unidade I do dímero de chalcona.....	148
<b>Figura 108</b> – Espectro de HSQC da substância AG8 [300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)].....	149
<b>Figura 109</b> – Espectro de HMBC da substância AG8 [300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)].....	149
<b>Figura 110</b> – Ampliação na região entre δ 6,40 e δ 7,50/ δ 100,0 e δ 195,0 do espectro de HMBC de AG8 [300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)].....	150

<b>Figura 111</b> - Principais correlações observadas no espectro de HMBC, entre elas, a que permitiu posicionar a carbonila próxima ao anel <b>A</b> da unidade <b>I</b> do dímero de chalcona.....	150
<b>Figura 112</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H ampliado na região entre δ 6,28 e δ 6,88 da <b>AG8</b> [300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)].....	152
<b>Figura 113</b> – Anel aromático 1,2,4,5-tetrasubstituído do anel <b>B</b> da unidade <b>I</b> do dímero de chalcona.....	152
<b>Figura 114</b> – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel <b>B</b> da unidade <b>I</b> do dímero de chalcona.....	152
<b>Figura 115</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H ampliado na região entre δ 3,09 e δ 5,38 da <b>AG8</b> [300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)].....	153
<b>Figura 116</b> – Correlação observada no espectro de HMBC que permitiu conectar o anel <b>A</b> ao anel <b>B</b> da unidade <b>I</b> do dímero de chalcona.....	153
<b>Figura 117</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H ampliado na região entre δ 5,80 e δ 6,97 da <b>AG8</b> [300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)].....	154
<b>Figura 118</b> – Ampliação na região entre δ 6,62 e δ 6,96/ δ 116,3 e δ 131,2 do espectro de HSQC de <b>AG8</b> [300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)].....	155
<b>Figura 119</b> – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel <b>B</b> da unidade <b>II</b> do dímero de chalcona.....	155
<b>Figura 120</b> – Ampliação na região entre δ 4,40 e δ 5,38/ δ 45,0 e δ 210,0 do espectro de HMBC de <b>AG8</b> [300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)].....	155
<b>Figura 121</b> – Correlações observadas no espectro de HMBC que possibilitaram a confirmação das posições de junção das duas unidades do dímero de chalcona.....	156
<b>Figura 122</b> – Anel aromático 1,2,4-trissubstituído do anel <b>A</b> da unidade <b>II</b> do dímero de chalcona.....	156
<b>Figura 123</b> – Ampliação na região entre δ 5,81 e δ 6,75 / δ 103,4 e δ 136,5 do espectro de HSQC de <b>AG8</b> [300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)].....	157
<b>Figura 124</b> – Ampliação na região entre δ 6,09 e δ 6,75 / δ 140,0 e δ 220,0 do espectro de HMBC de <b>AG8</b> [300 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)].....	157
<b>Figura 125</b> – Correlações observadas no espectro de HMBC que possibilitaram o posicionando o anel <b>A</b> da unidade <b>II</b> na molécula.....	158
<b>Figura 126</b> – Ampliação do espectro NOESY da substância <b>AG8</b> na região de 2,5 a 8,3 ppm [500 MHz, CD <sub>3</sub> OD].....	160
<b>Figura 127</b> – Espectro de massas de alta resolução da substância <b>AG8</b> no modo negativo...	160

<b>Figura 128</b> – Estrutura da substância <b>AG8</b> .....	161
<b>Figura 129</b> – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 290$ nm de <b>AG9</b> .....	163
<b>Figura 130</b> – Espectro no UV, obtido pelo detector DAD, de <b>AG9</b> .....	164
<b>Figura 131</b> – Espectro na região do infravermelho (IV) da substância <b>AG9</b> .....	164
<b>Figura 132</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>AG9</b> [300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	165
<b>Figura 133</b> – Ampliação na região entre $\delta 6,20$ e $\delta 8,10$ do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>AG9</b> [300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	166
<b>Figura 134</b> – Ampliação na região entre $\delta 3,60$ e $\delta 5,40$ do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>AG9</b> [300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	166
<b>Figura 135</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>AG9</b> [75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	167
<b>Figura 136</b> – Ampliação na região entre $\delta 122,0$ e $\delta 170,0$ do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>AG9</b> [75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	167
<b>Figura 137</b> – Ampliação na região entre $\delta 44,0$ e $\delta 118,0$ do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>AG9</b> [75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	168
<b>Figura 138</b> – Espectro de HSQC de <b>AG9</b> [300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	169
<b>Figura 139</b> – Espectro de HMBC de <b>AG9</b> [300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	170
<b>Figura 140</b> – Estruturas das substâncias <b>AG9</b> , <b>AG8</b> e <b>Matosina</b> .....	170
<b>Figura 141</b> – Ampliação do espectro NOESY da substância ( <b>AG9</b> ) na região de 3,0 a 8,5 ppm [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ].....	172
<b>Figura 142</b> – Espectro de massas de alta resolução da substância <b>AG9</b> no modo negativo.....	173
<b>Figura 143</b> – Estrutura da substância <b>AG9</b> .....	173
<b>Figura 144</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>AG10</b> [300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	180
<b>Figura 145</b> – Ampliação na região entre $\delta 6,70$ e $\delta 7,40$ do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>AG10</b> [300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	180
<b>Figura 146</b> – Estrutura do anel <b>B</b> de <b>AG10</b> .....	181
<b>Figura 147</b> – Ampliação na região entre $\delta 6,00$ e $\delta 6,50$ do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>AG10</b> [300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	181
<b>Figura 148</b> – Estrutura do anel <b>A</b> de <b>AG10</b> .....	182
<b>Figura 149</b> – Ampliação na região entre $\delta 0,80$ e $\delta 5,60$ do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>AG10</b> [300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	182

<b>Figura 150</b> – Ampliação na região entre $\delta$ 3,20 e $\delta$ 4,36 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>AG10</b> [300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	183
<b>Figura 151</b> – Estrutura do monossacarídeo ramnose.....	183
<b>Figura 152</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>AG10</b> [75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	184
<b>Figura 153</b> – Estrutura de <b>AG10</b> [quercetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ -ramnosídeo (quercitrina)].....	184
<b>Figura 154</b> – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 290$ nm da substância <b>AG11</b> .....	186
<b>Figura 155</b> – Espectro no UV, obtido pelo detector DAD, da substância <b>AG11</b> .....	187
<b>Figura 156</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>AG11</b> [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	188
<b>Figura 157</b> – Ampliação na região entre $\delta$ 6,85 e $\delta$ 7,75 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>AG11</b> [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	188
<b>Figura 158</b> – Estrutura do anel <b>B</b> de <b>AG11</b> .....	189
<b>Figura 159</b> – Ampliação na região entre $\delta$ 6,06 e $\delta$ 6,50 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>AG11</b> [500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	189
<b>Figura 160</b> – Estrutura do anel <b>A</b> de <b>AG11</b> .....	190
<b>Figura 161</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>AG11</b> [125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	190
<b>Figura 162</b> – Ampliação na região entre $\delta$ 90,0 e $\delta$ 180,0 do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>AG11</b> [125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	191
<b>Figura 163</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da subfração <b>ATG-7-D</b> [300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	193
<b>Figura 164</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da subfração <b>ATG-7-D</b> [75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	193
<b>Figura 165</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da subfração <b>ACAG-11-G-8</b> [300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	196
<b>Figura 166</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da subfração <b>ACAG-11-G-8</b> [75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)].....	196
<b>Figura 167</b> – Cromatograma obtido da análise do óleo essencial extraído das flores de <i>T. guianensis</i> em triplicata.....	198
<b>Figura 168</b> – Estruturas dos sesquiterpenos $\alpha$ -copaeno e ( <i>E</i> )-cariofileno.....	200
<b>Figura 169</b> – Espectro massa da substância $\alpha$ -Copaeno obtido pelo CG-EM comparado com os espectros de massa da literatura (ADAMS, 1995) e do banco de dados do aparelho (WILEY 229).....	201
<b>Figura 170</b> – Espectro massa da substância ( <i>E</i> )-cariofileno obtido pelo CG-EM comparado com os espectros de massa da literatura (ADAMS, 1995) e do banco de dados do aparelho (WILEY 229).....	202

<b>Figura 171</b> – Cromatograma obtido da análise do óleo essencial extraído das flores de <i>S. mombin</i> em triplicata.....	203
<b>Figura 172</b> – Estrutura do óxido de cariofileno.....	205
<b>Figura 173</b> – Espectro massa do óxido de cariofileno obtido pelo CG-EM comparado com os espectros de massa da literatura (ADAMS, 1995) e do banco de dados do aparelho (WILEY 229).....	206
<b>Figura 174</b> – Gráfico da capacidade sequestradora de radicais livres das fases orgânicas obtidos das folhas e caule de <i>A. graveolens</i> , frente ao reagente DPPH.....	208
<b>Figura 175</b> – Gráfico da capacidade sequestradora de radicais livres das fases orgânicas obtidos das flores de <i>T. guianensis</i> , frente ao reagente DPPH.....	209
<b>Figura 176</b> - Comparação dos valores de %I inibição da AChE das fases orgânicas das folhas e do caule de <i>A. graveolens</i> e do padrão (eserina) em 25 minutos.....	212
<b>Figura 177</b> - Comparação dos valores de %I inibição da AChE das substâncias AG3, AG11 e AG12 e do padrão (eserina) em 25 minutos.....	213

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Massas das fases orgânicas obtidas pela partição dos extratos metanólicos brutos das folhas e dos caules de <i>A. graveolens</i> .....	68
<b>Tabela 2</b> – Massas das fases orgânicas obtidas pela partição do extrato metanólico brutos das flores de <i>T. guianensis</i> .....	70
<b>Tabela 3</b> – Frações obtidas da CC de <b>DFAG</b> .....	71
<b>Tabela 4</b> – Frações obtidas da CC de <b>AFAG</b> .....	72
<b>Tabela 5</b> – Subfrações obtidas da CC de <b>AFAG-18</b> .....	73
<b>Tabela 6</b> – Subfrações obtidas da CC de <b>AFAG-21</b> .....	74
<b>Tabela 7</b> – Subfrações obtidas da CC de <b>AFAG-23</b> .....	74
<b>Tabela 8</b> – Frações obtidas da CC de <b>DCAG</b> .....	76
<b>Tabela 9</b> – Frações obtidas da CC de <b>DCAG-8</b> .....	77
<b>Tabela 10</b> – Subfrações obtidas da CC de <b>DCAG-27</b> .....	77
<b>Tabela 11</b> – Subfrações obtidas da CC de <b>DCAG-27-E</b> .....	78
<b>Tabela 12</b> – Subfrações obtidas da CC de <b>DCAG-31</b> .....	80
<b>Tabela 13</b> – Frações obtidas da CC de <b>ACAG</b> .....	81
<b>Tabela 14</b> – Subfrações obtidas da CC de <b>ACAG-9</b> .....	82
<b>Tabela 15</b> – Subfrações obtidas da CC de <b>ACAG-11</b> .....	82
<b>Tabela 16</b> – Subfrações obtidas da CC de <b>ACAG-11-G</b> .....	83
<b>Tabela 17</b> – Subfrações obtidas da CC de <b>ACAG-11-G-4</b> .....	83
<b>Tabela 18</b> – Subfrações obtidas da CC de <b>ACAG-12</b> .....	84
<b>Tabela 19</b> – Subfrações obtidas da CC de <b>ACAG-12-J</b> .....	85
<b>Tabela 20</b> – Subfrações obtidas da CC de <b>ACAG-12-J-2</b> .....	85
<b>Tabela 21</b> – Frações obtidas da CC de <b>DTG</b> .....	86
<b>Tabela 22</b> – Frações obtidas da CC de <b>DTG-11</b> .....	87
<b>Tabela 23</b> – Frações obtidas da CC de <b>ATG</b> .....	87
<b>Tabela 24</b> – Frações obtidas da CC de <b>ACAG-11-G-4</b> .....	88
<b>Tabela 25</b> – Massas das amostras contendo o material vegetal (flores) das espécies <i>T. guianensis</i> e <i>S. mombin</i> para extração em triplicata.....	89
<b>Tabela 26</b> – Ésteres metílicos identificados de <b>AG1 transesterificada</b> .....	100
<b>Tabela 27</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz) e de <sup>13</sup> C (75 MHz) de <b>AG2</b> [CD <sub>3</sub> OD, δ (ppm)] e valores da literatura.....	109

<b>Tabela 28</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (125 MHz) de <b>AG3</b> em $\text{CD}_3\text{OD}$ [( $\delta$ (ppm); mult.e $J$ (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores da literatura.....	124
<b>Tabela 29</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (125 MHz) de <b>AG3</b> em $\text{CD}_3\text{OD}$ [( $\delta$ (ppm); mult.e $J$ (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores da literatura.....	126
<b>Tabela 30</b> – Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ [125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , $\delta$ (ppm)] de <b>AG4</b> e valores da literatura (CORREIA, 1999).....	130
<b>Tabela 31</b> – Ésteres metílicos identificados de <b>AG5 transesterificada</b> .....	132
<b>Tabela 32</b> – Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ [125 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] de <b>AG6</b> e valores de RMN de $^{13}\text{C}$ [75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ (ppm)] da literatura.....	140
<b>Tabela 33</b> – Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ [125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , $\delta$ (ppm)] de <b>AG7</b> e valores da literatura (CORREIA, 1999).....	143
<b>Tabela 34</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e de $^{13}\text{C}$ (75 MHz) de <b>AG8</b> em $\text{CD}_3\text{OD}$ [( $\delta$ (ppm); mult.e $J$ (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores da literatura.....	162
<b>Tabela 35</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (125 MHz) de <b>AG9</b> em $\text{CD}_3\text{OD}$ [( $\delta$ (ppm); mult.e $J$ (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores das substâncias <b>AG8</b> e <b>Matosina</b> .....	171
<b>Tabela 36</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e de $^{13}\text{C}$ (75 MHz) de <b>AG9</b> em $\text{CD}_3\text{OD}$ [( $\delta$ (ppm); mult.e $J$ (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores de <b>AG8</b> .....	174
<b>Tabela 37</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e $^{13}\text{C}$ (75 MHz) de <b>AG9</b> em $\text{CD}_3\text{OD}$ [( $\delta$ (ppm); mult.e $J$ (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores da literatura.....	175
<b>Tabela 38</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e $^{13}\text{C}$ (75 MHz) de <b>AG10</b> em $\text{CD}_3\text{OD}$ [( $\delta$ (ppm); mult.e $J$ (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores da literatura.....	185
<b>Tabela 39</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (125 MHz) de <b>AG11</b> em $\text{CD}_3\text{OD}$ [( $\delta$ (ppm); mult.e $J$ (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores da literatura.....	191
<b>Tabela 40</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e $^{13}\text{C}$ (75 MHz) de <b>AG10</b> em $\text{CD}_3\text{OD}$ [( $\delta$ (ppm); mult.e $J$ (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores da literatura.....	194
<b>Tabela 41</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e de $^{13}\text{C}$ (75 MHz) de <b>AG7</b> [ $\text{CD}_3\text{OD}$ , $\delta$ (ppm)] e valores da literatura.....	197
<b>Tabela 42</b> – Percentual dos componentes presentes no óleo essencial das flores de <i>T. guianensis</i> .....	199
<b>Tabela 43</b> – Percentual dos componentes presentes no óleo essencial das flores de <i>S. mombin</i> .....	204
<b>Tabela 44</b> – Resultados do teste de letalidade frente <i>A. salina</i> para as fases orgânicas das folhas e do caule de <i>A. graveolens</i> .....	210



<b>Tabela 45</b> – Resultados do teste de letalidade frente <i>A. salina</i> para as fases orgânicas das flores de de <i>T. guianensis</i> .....	210
<b>Tabela 46</b> – Percentual de inibição da AChE (%I) obtido para as fases orgânicas das folhas e do caule de <i>A. graveolens</i> e o padrão (eserina).....	212
<b>Tabela 47</b> – Percentual de inibição da AChE (%I) obtido para as substâncias AG3, AG8 e AG9 e o padrão (eserina).....	212

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> – Rota biossintética para formação da estrutura da chalcona.....	55
<b>Esquema 2</b> - Formação do fragmento $m/z$ 74 (rearranjo de McLafferty).....	102
<b>Esquema 3</b> - Estado intermediário proposto por SPITELLER et. al. (1966).....	102
<b>Esquema 4</b> - Formação do fragmento $m/z$ 87.....	102
<b>Esquema 5</b> - Formação do fragmento $m/z$ 143.....	102
<b>Esquema 6</b> - Formação do fragmento $m/z$ 74 (rearranjo de McLafferty).....	134
<b>Esquema 7</b> - Formação do fragmento referente ao pico $[M-32]^+$ .....	134
<b>Esquema 8</b> - Formação do fragmento referente ao pico $m/z$ 69.....	135
<b>Esquema 9</b> – Rota biossintética para formação da estrutura das chalcona isoliquiritigenina e buteína.....	176
<b>Esquema 10</b> – Proposta de rota biossintética para formação de <b>AG3</b> e <b>AG8</b> e <b>AG9</b> .....	177

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Atividade antioxidante
AChE	Acetilcolinesterase
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em coluna
CG	Cromatografia em fase gasosa
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada e espectrometria de massas
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Dubleto de dubleto
$\delta$	Deslocamento químico
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCM	Diclorometano
DEPT	Distortionless enhancement polarization transference
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EM	Espectrometria de massas
Hz	Hertz
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HMBC	<i>Heteronuclear multi bond correlation</i>
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
$\lambda$	Comprimento de onda
GPPN	Grupo de pesquisa de produtos naturais
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
RMN	Ressonância magnética nuclear

RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono
<i>s</i>	Singleto
SRL	Sequestro do radical livre DPPH
<i>t</i>	Tripleto
t <sub>R</sub>	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
Vis	Visível

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	25
2.1 Família Anacardiaceae.....	25
2.2 Gênero <i>Astronium</i> Jacq.....	33
2.2.1 Aspectos gerais da espécie <i>Astronium graveolens</i> Jacq.....	36
2.3 Gênero <i>Tapirira</i> .....	38
2.3.1 Aspectos gerais da espécie <i>Tapirira guianensis</i> Aubl.....	40
2.4 Gênero <i>Spondias</i> .....	46
2.4.1 Aspectos gerais da espécie <i>Spondias mombin</i> L.....	47
2.5 Aspectos gerais sobre flavonoides.....	52
2.5.1 Chalconas.....	53
2.6 Aspectos gerais sobre óleos essenciais.....	55
2.7 Testes de atividade biológica.....	58
2.7.1 Avaliação da atividade antioxidante.....	58
2.7.2 Teste de letalidade frente a <i>Artemia Salina</i> Leach.....	60
2.7.3 Avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase.....	60
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	63
3.1 Gerais.....	63
3.2 Específicos.....	63
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	64
4.1 Materiais, equipamentos e reagentes.....	64
4.2 Coleta das espécies .....	67
4.3 Preparo dos extratos e das fases orgânicas.....	67
4.3.1 Preparo dos extratos e das fases orgânicas das folhas e caules de <i>A. graveolens</i> Jacq...67	

4.3.2 Preparo do extrato e das fases orgânicas das flores de <i>T. guianensis</i> Aubl.....	69
4.4 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>A. graveolens</i> Jacq.....	71
4.4.1 Fracionamento da fase diclorometânica das folhas de <i>A. graveolens</i> Jacq.....	71
4.4.2 Fracionamento da fase acetato de etila das folhas de <i>A. graveolens</i> Jacq.....	71
4.4.2.1 Purificação da fração AFAG-18.....	72
4.4.2.2 Purificação da fração AFAG-21.....	73
4.4.2.3 Purificação da fração AFAG-23.....	74
4.4.3 Fracionamento da fase DCM do caule de <i>A. graveolens</i> Jacq.....	75
4.4.3.1 Purificação da fração DCAG-8.....	76
4.4.3.2 Purificação da fração DCAG-27.....	77
4.4.3.3 Purificação da fração DCAG-31.....	79
4.4.4 Fracionamento da fase acetato de etila do caule de <i>A. graveolens</i> Jacq.....	80
4.4.4.1 Purificação da fração ACAG-9.....	81
4.4.4.2 Purificação da fração ACAG-11.....	82
4.4.4.3 Purificação da fração ACAG-12.....	84
4.5. Separação e purificação dos constituintes químicos de <i>T. guianensis</i> Aubl.....	85
4.5.1. Fracionamento da fase diclorometano das flores de <i>T. guianensis</i> Aubl.....	85
4.5.1.1 Purificação da fração DTG-11.....	86
4.5.2. Fracionamento da fase acetato de etila das flores de <i>T. guianensis</i> Aubl.....	87
4.5.2.1 Purificação da fração ATG-7.....	88
4.6 Obtenção e análise dos óleos essenciais das flores das espécies <i>T. guianensis</i> Aubl. e <i>Spondias mombin</i> L.....	88
4.7 Reações de derivatização.....	91
4.7.1 Reação de transesterificação.....	91
4.8 Testes de Atividade Biológica.....	91
4.8.1 Avaliação da atividade antioxidante - Teste do sequestro do radical livre DPPH.....	91
4.8.2 Teste de letalidade frente a <i>Artemia Salina</i> Leach.....	92

4.8.3 Avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase.....	93
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>94</b>
5.1.1 Substâncias isoladas e identificadas de <i>A. graveolens</i> .....	94
5.1.2 Substâncias isoladas e identificadas das flores <i>T. guianensis</i> .....	97
5.1.3 Identificação e determinação estrutural das substâncias isoladas de <i>A. graveolens</i> .....	98
5.1.3.1 Identificação dos ácidos graxos que compõem os triacilglicerídeos presentes em <b>AG1</b> .....	98
5.1.3.2 Elucidação estrutural da substância <b>AG2</b> .....	105
5.1.3.3 Elucidação estrutural da substância <b>AG3</b> .....	109
5.1.3.4 Elucidação estrutural da substância <b>AG4</b> .....	127
5.1.3.4 Identificação dos ácidos graxos que compõem os triacilglicerídeos presentes em <b>AG5</b> .....	130
5.1.3.6 Elucidação estrutural da substância <b>AG6</b> .....	137
5.1.3.7 Elucidação estrutural da substância <b>AG7</b> .....	140
5.1.3.8 Elucidação estrutural da substância <b>AG8</b> .....	144
5.1.3.9 Elucidação estrutural da substância <b>AG9</b> .....	162
5.1.3.10 Elucidação estrutural da substância <b>AG10</b> .....	179
5.1.4 Identificação e determinação estrutural das substâncias isoladas das flores de <i>T. guianensis</i> .....	186
5.1.4.1 Elucidação estrutural da substância <b>AG11</b> .....	186
5.1.4.2 Identificação da substância <b>AG10</b> na subfração <b>ATG-7-D</b> .....	192
5.1.4.3 Identificação da substância <b>AG7</b> na subfração <b>ATG-7-F</b> .....	195
5.1.5 Identificação da composição química dos óleos essenciais das flores das espécies <i>T. guianensis</i> e <i>S. mombin</i> .....	197
5.1.5.1 Identificação dos componentes presentes no óleo essencial das flores de <i>T. guianensis</i> .....	197
5.1.5.2 Identificação dos componentes presentes no óleo essencial das flores de <i>S. mombin</i> L.....	203
5.2 Testes de atividades biológicas.....	207
5.2.1 Avaliação da atividade antioxidante - Teste do sequestro do radical livre DPPH.....	207
5.2.2 Teste de letalidade frente a <i>Artemia Salina</i> Leach.....	209
5.2.3 Avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase.....	211
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>213</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>216</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade, o homem já fazia uso de espécies vegetais com fins medicinais, sendo considerada como uma das primeiras formas de cuidado com a saúde utilizada pelo homem (FABRICANT & FAMSWORTH, 2001). As grandes civilizações antigas, como por exemplo, a Egípcia, Greco-Romana e Chinesa faziam uso de plantas com objetivo de tratar enfermidades. Dentre essas civilizações citadas, merece destaque a civilização Chinesa no que diz respeito ao uso terapêutico de espécies vegetais. Nessa civilização a medicina tradicional desenvolveu-se de forma tão significativa que até hoje muitas plantas medicinais usadas pela medicina tradicional chinesa são estudadas com o intuito de isolar os princípios ativos e descobrir suas ações farmacológicas (VIEGAS, BOLZANI & BARREIROS, 2006).

De forma geral, a maioria das substâncias orgânicas conhecidas foram produzidas pela natureza. Sendo que, dentre os diversos reinos da natureza, é o reino vegetal que tem se destacado de forma significativa como fornecedora de uma ampla diversidade de metabólitos secundários. Muitos destes metabólitos secundários possuem grande valor agregado em virtude de suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO et al., 2002).

A extraordinária variedade e complexidade das moléculas que constituem os metabólitos secundários biossintetizados pelas plantas é fruto de milhões de anos de evolução e interação dessas espécies vegetais com o meio ambiente (MONTANARI & BONZANI, 2001).

Depois da descoberta de alguns medicamentos de origem vegetal, que geram até hoje bilhões de dólares para a indústria farmacêutica, como por exemplo, os fármacos vimblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), podofilotoxina, taxol (Paclitaxel; Taxol®) entre outros, houve um aumento do interesse de algumas indústrias farmacêuticas internacionais pela busca de novas substâncias com atividade farmacológica. Esta busca foi intensificada na década de 90, principalmente nas florestas tropicais onde se concentra grande parte da biodiversidade e especialmente no Brasil, onde a grande maioria das espécies continua sem qualquer estudo químico ou biológico (PINTO et al., 2002).

O Brasil tem a flora considerada como a mais rica do mundo, possuidora de mais de 250.000 espécies de plantas superiores, quantidade que representa 15 a 20 % de toda biodiversidade mundial (BARREIRO & BOLZANI, 2009). Desse montante de 250.000 espécies de plantas superiores, apenas cerca de 10% foram avaliadas com relação às suas



características biológicas, e menos de 5 % foram submetidas a estudos fitoquímicos detalhados (FERREIRA et al., 2011). O Brasil possui uma grande extensão territorial, o que leva a uma grande variedade de climas, tipos de solo e altitudes, fornecendo um conjunto de pressões seletivas para a adaptação das plantas nestes ambientes, resultando em ampla diversidade de metabólitos secundários (BASSO et al., 2005). Apesar desse grande potencial, as espécies vegetais presentes no território brasileiro ainda são pouco estudadas do ponto de vista fitoquímico e farmacológico (SIMÕES & SHENKEL, 2002).

Diante desse cenário, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de estudos fitoquímicos e de atividades biológicas de espécies vegetais brasileiras, buscando o isolamento de novas substâncias bioativas com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, contribuindo para consolidar e inovar o setor farmacêutico nacional (PEREIRA, 2012).

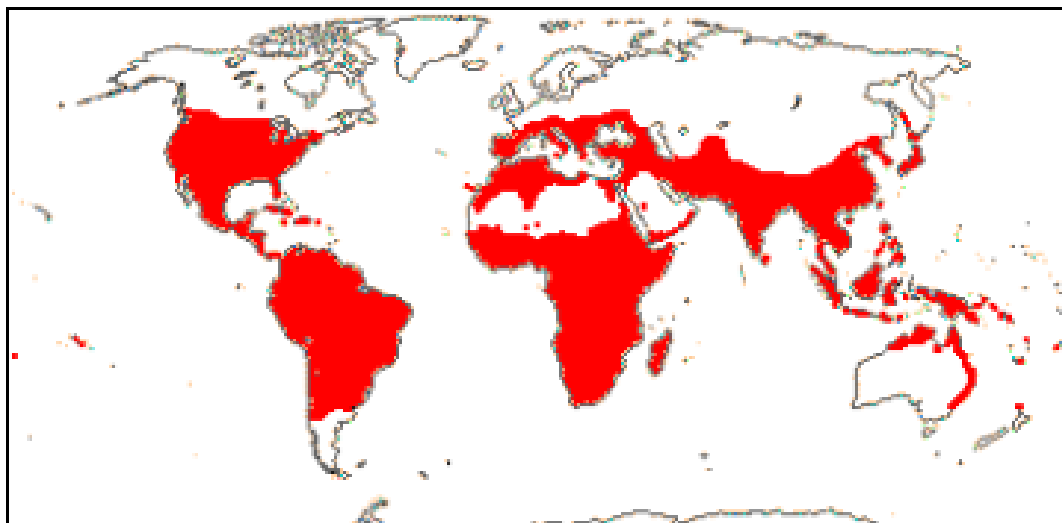
## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Família Anacardiaceae**

Anacardiaceae é uma família botânica que pertence ao reino Plantae, divisão das Angiospermas, classe Dicotiledoneas, subclasse Rosidae, ordem Sapindales. Segundo dados da literatura, a família Anacardiaceae é constituída de aproximadamente 81 gêneros e 800 espécies (MARTINELLI & MORAES, 2013). Os gêneros dessa família são subdivididos em cinco tribos: Anacardieae, Dobineae, Rhoeeae, Semecarpeae e Spondiadeae (VOGL & MITCHELL, 1996).

As espécies da família Anacardiaceae se distribuem geograficamente em uma extensa área global, sendo predominantemente encontradas em regiões tropicais e subtropicais com algumas espécies também sendo encontradas em regiões temperadas (MARTINELLI & MORAES, 2013) (Figura 1). No Brasil, a família Anacardiaceae destaca-se por apresentar 14 gêneros com 54 espécies, sendo que, 13 delas são restritas (endêmicas) ao país (SILVA-LUZ & PIRANI, 2013).

**Figura 1** - Distribuição de espécies da família Anacardiaceae no mundo



Fonte: <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/>. Acesso em: 21 de agosto de 2015

As espécies da família Anacardiaceae apresentam-se como espécies arbóreas, arbustos e algumas lianas, e têm por características de serem plantas lenhosas resiníferas com folhas simples ou compostas, que apresentam flores pouco vistosas e frutos carnosos ou secos (MARTINELLI & MORAES, 2013). No Brasil, a diversidade de espécies da família Anacardiaceae concentra-se principalmente nas regiões Norte e Sul, sendo os gêneros *Anacardium* L. e *Thyrsodium* Salzm. ex Benth. bem representados na região Norte, e o gênero *Schinus* L. o principal representante da região Sul. Já nas regiões Centro-oeste, Nordeste e Sudeste, com exceção de algumas poucas espécies endêmicas de cada região, predominam táxons amplamente distribuídos nos domínios do Cerrado e da Mata Atlântica e menos frequentemente na Caatinga. Por exemplo, gêneros como *Anacardium* L., *Thyrsodium* Salzm. ex Benth., *Astronium* Jacq. e *Spondias* L. têm representantes na Mata Atlântica e na Amazônia, com algumas espécies ocorrendo também nos Cerrados e Caatingas (MARTINELLI & MORAES, 2013).

Diversas espécies desta família possuem significativa importância econômica em virtude de serem fornecedoras de madeiras úteis, de frutos e sementes comestíveis, com expressivo valor comercial. Por exemplo, da espécie *Anacardium occidentale* L., conhecida como cajueiro, do seu fruto obtém-se a castanha de caju, que possui significativo valor comercial, sendo mundialmente conhecida. Lembrando-se que o caju propriamente dito é um pseudofruto originado do desenvolvimento do pedicelo, que também possui importância econômica, sendo comercializado *in natura* ou na forma de doces e sucos. Outras espécies de

Anacardiaceae destacam-se também, por serem fornecedoras de frutos com importância comercial. Por exemplo, da espécie *Mangifera indica* L. obtém-se a manga, de *Spondias* spp. o cajá, cajarana ou umbu-cajá, de *Spondias tuberosa* Arruda o umbu e de *Spondias purpurea* L. obtém-se frutos conhecido como seriguela (SOUZA & LORENZI 2005).

As *Shinus terebinthifolius* Raddi, *S. molle* L. e *Rhus succedanea* L. são exemplos de plantas utilizadas na ornamentação de ruas e praças das cidades. Entre as espécies de Anacardiaceae que são fornecedoras de madeiras de boa qualidade, destacam-se o gonçaval-alves (*Astronium fraxinifolium* Schott ex Spreng.), o guarita (*A. graveolens* Jacq.), a aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão), a aroeira-branca (*Lithrea molleoides* (Vell.) Engl.) e a baraúna (*Shinopsis brasiliensis* Engl.) (SOUZA & LORENZI 2005).

Além da importância econômica de várias anacardiáceas em virtude de serem fornecedoras de madeiras úteis, de frutos e sementes comestíveis, com expressivo valor comercial, como citado anteriormente, também, cabe salientar que muitas espécies da família Anacardiaceae destacam-se pelo seu uso medicinal para tratamento de uma ampla variedade de enfermidades, não só no Brasil como também em várias partes do mundo. Por exemplo, na Índia, as sementes da mangueira (*Mangifera Indica* L.) são tradicionalmente indicadas para tratar a diarreia (SAIRAM et al., 2003). Além disso, dessa mesma espécie, a resina extraída do caule é empregada medicinalmente contra disenteria e sífilis (PIO-CORRÊA, 1974). Existem também estudos na literatura que demonstraram que extratos de *M. indica* L. possuem atividade antiviral, antibacteriana, analgésica, anti-inflamatória, imunomoduladora (MAKARE, BODHANKAR & RANGARI, 2001), atividade inibitória das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase (PRASHANTH et al., 2001) e propriedades diuréticas (SCARTEZZINI & SPERONI, 2000).

Outra espécie de Anacardiaceae que se destaca pelo seu uso medicinal para tratamento de uma ampla variedade de enfermidades é a espécie *Anacardium occidentale* L.. Existem relatos na literatura demonstrando que o cajueiro (*A. occidentale* L.) tem sido usado pelos índios desde os tempos anteriores à chegada dos portugueses ao Brasil, sendo empregado pelas tribos amazônicas durante séculos no tratamento da diarreia, contra resfriados, gastrite, cólicas, tosses persistentes e afecções pulmonares. Essa espécie é rica em taninos o que lhe confere atividade adstringente, anti-inflamatória e hemostática. A decocção das cascas e a infusão das folhas são usadas como tônico, no tratamento da diabetes e anti-inflamatório (CARDOSO, 2007; DE MORAIS et al., 2005). Outras atividades biológicas atribuídas a espécie *A. occidentale* L. são extensamente reportada na literatura, sendo encontrados vários trabalhos descrevendo atividades como antifúngicas, antibacteriana, antivirais, anti-

inflamatória (AKINPELU, 2001; GONÇALVES et al. 2005; MOTA, THOMAS & BARBOSA FILHO, 1985; SCHMOURLO et al. 2005).

A família Anacardiaceae também é bastante conhecida por conta de possuir algumas espécies consideradas tóxicas. Investigações biológicas indicam que cerca de 25% dos gêneros da família Anacardiaceae são caracterizados como tóxicos e causadoras de dermatite alérgica grave. Ao que tudo indica, esse efeito tóxico de algumas espécies de Anacardiaceae se deve à presença de metabólitos secundários conhecidos como lipídios fenólicos não-isoprênicos, que são secretados da resina das plantas (CORREIA et al., 2006). Segundo Vogl & Mitchel (1996) os tipos de lipídios fenólicos não-isoprênicos responsáveis pela reação alérgica típica do contato com espécies de Anacardiaceae são lipídios catecólicos, lipídios resorcinólicos, lipídios hidroquinônicos ou a mistura destes que foram coletivamente chamados de *urushiol*. Por exemplo, esses autores relataram que os componentes ativos em espécies do gênero *Rhus* (*Toxicodendron*) eram os lipídios catecólicos (3-*n*-heptadecilcatecóis e 3-*n*-pentadecenilcatecóis). No entanto, Goetz e Lepoittevin (1999) mostraram que os componentes ativos envolvidos na dermatite alérgica em espécies do gênero *Rhus* são quinonas produzidas a partir da oxidação desses alquilcatecóis.

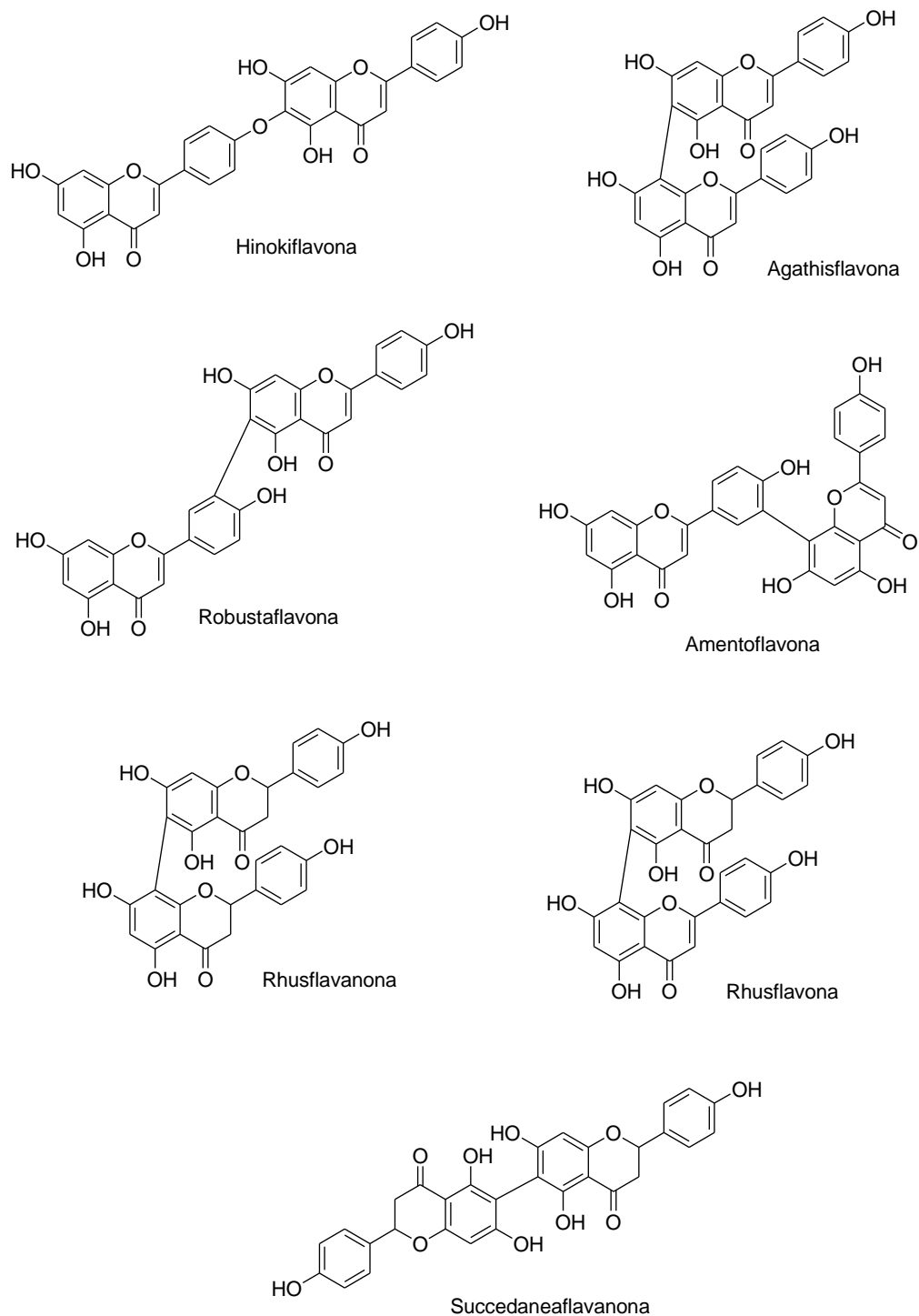
Correia (1999) relata que o ácido anacárdico (mistura de 2-carboxi-3-alkuilfenóis), cardanol (mistura de 3-alkuilfenóis) e cardol (mistura de 5-alkuilresorcinóis) são os mais prováveis causadores do efeito alérgico e irritante de *Anacardium occidentale* e de outras espécies da família Anacardiaceae. Cabe salientar que esses metabólitos secundários podem estar presentes em diferentes partes do material vegetal.

De acordo com Correia et al. (2006) os gêneros mais estudados da família Anacardiaceae do ponto de vista químico, são *Mangifera*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Anacardium*, *Spondias*, *Lanea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira* e *Melanorrhoea*. Sendo que, dentre esses gêneros citados anteriormente, os gêneros *Rhus*, *Mangifera* e *Anacardium* destacam-se pela quantidade de pesquisas relacionadas à composição química de suas espécies e atividades biológicas apresentadas de seus extratos e metabólitos secundários. Os estudos fitoquímicos dessas espécies possibilitaram verificar a presença de várias classes de metabólitos secundários, tais como, flavonoides, terpenos, esteroides, xantonas e lipídios fenólicos e derivados.

Por exemplo, o gênero *Rhus*, que é o maior da família, com cerca de 200 espécies, são ricos em flavonoides, principalmente os biflavonoides. Na Figura 2 são apresentadas as estruturas dos biflavonoides hinokiflavona, agathisflavona, robustaflavona, amentoflavona, rhusflavona, succedaneaflavanona e rhusflavona isolados da espécie *Rhus succedanea*.

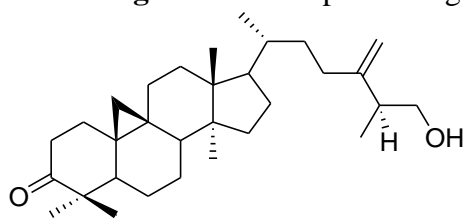
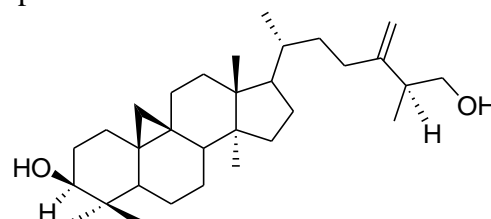
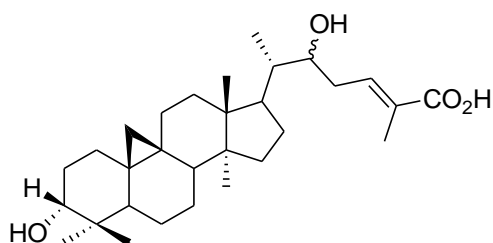
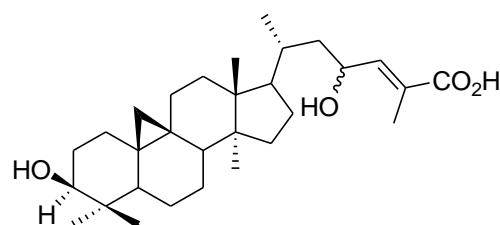
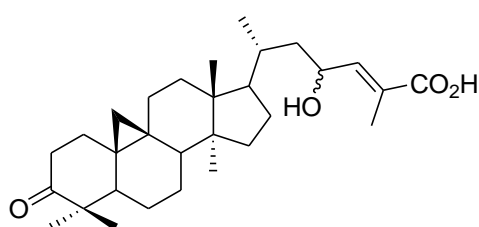
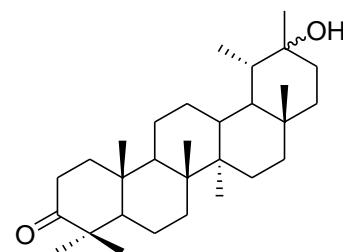
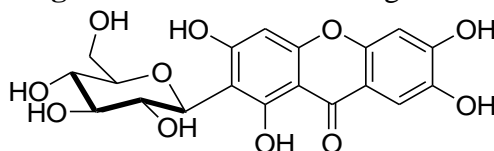
Dentre essas substâncias, destacam-se a hinokiflavona, agathisflavona e robustaflavona, pois demonstraram atuar na replicação do vírus HIV pela inibição da enzima transcriptase reversa HIV-1-RT (CORREIA et al. 2006).

**Figura 2** - Estruturas dos biflavonoides isolados do gênero *Rhus*



Diante dos estudos fitoquímicos realizados com espécies do gênero *Mangifera*, fica evidente que os terpenóides, principalmente os triterpenos, são os metabólitos mais representativos do gênero *Mangifera*. Por exemplo, Anjaneyulu et al. (1999) relatam que através de estudo fitoquímico do extrato hexânico da casca do caule da espécie *M. indica* foram isolados uma série de triterpenoides, como pode ser visto alguns exemplos na Figura 3. Mas cabe salientar que existem relatos na literatura demonstrando que da espécie *M. indica* também já foram isolados compostos fenólicos simples tais como, ácido hidroxibenzoico, galatos de alquila, ésteres do ácido benzoico, além da xantona (mangiferina) e dos flavonoides catequina e *epi*-catequina. Além disso, dessa mesma espécie, do seu látex foram identificados compostos conhecidos como lipídios fenólicos (CORREIA et al., 2006).

Dentre essas substâncias isoladas da espécie *M. indica*, destaca-se a mangiferina (1,3,6,7-tetra-hidroxixantona-2- $\beta$ -glicopiranosídeo) (Figura 4), que já foi isolada de várias partes (folhas, casca do caule, cerne e raízes) dessa espécie (MAKARE et al. 2001). Segundo Scartezzini e Speroni (2000) a porcentagem desta substância na espécie *M. indica* é de 6,9 %. Estudos realizados com extratos aquosos das cascas de uma variedade selecionada de *M. indica* deram origem a uma formulação farmacêutica com nome fantasia de Vimang<sup>®</sup>, o qual já foi demonstrado exercer atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, sendo que, o componente predominante nesse extrato é a substância mangiferina (10%) (GARRIDO et al., 2004).

**Figura 3** - Exemplos de alguns triterpenoides isolados de *M. indica*25 (*R*)-3-oxo-24-metileno cicloartano-26-ol24-metileno cicloartano-3 $\beta$ , 26-diolácido 3 $\alpha$ , 22(*R* ou *S*)-di-hidroxi cicloart-24-en-26-óicoácido 3 $\beta$ , 23(*R* ou *S*)-di-hidroxi cicloart-24-en-26-óicoácido 3-oxo-23(*R* ou *S*)-di-hidroxi cicloart-24-en-26-óico3-oxo-taraxastano-20(*R* ou *S*)-ol**Figura 4** - Estrutura da mangiferina

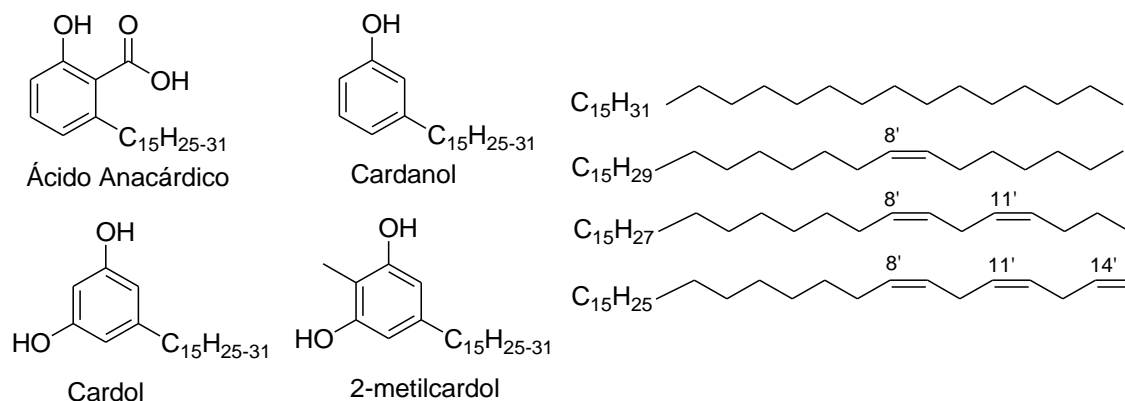
Diante dos estudos fitoquímicos realizados com espécies do gênero *Anacardium*, constata-se que o mesmo é bastante conhecido do ponto de vista químico, pela presença de metabólitos secundários conhecidos como lipídios fenólicos não-isoprênicos, principalmente, os derivados do ácido 6-álquil-salicílico, conhecidos como ácidos anacárdicos. Os ácidos anacárdicos são definidos como sendo uma mistura de ácidos 6-álquil-salicílico, onde os grupos alquílicos apresentam variações tanto no tamanho da cadeia como no grau de

insaturação das mesmas, sendo mais frequentes cadeias *mono*, *di* ou *tri*insaturadas (CORREIA et al., 2006).

Constituído de cerca de 11 espécies, o gênero *Anacardium* tem a espécie *Anacardium occidentale* L. como a representante mais conhecido do gênero. A espécie *Anacardium occidentale*, conhecida como cajueiro, é uma importante fonte de lipídios fenólicos não-isoprênicos. Os frutos dessa espécie, conhecido como castanha de caju, são amplamente aproveitados. A casca da castanha de caju é repleta de um líquido escuro, cáustico e inflamável, chamado de líquido da casca da castanha do caju (LCC) ou *cashew nut shell liquid* (CNSL) como é conhecido internacionalmente (MAZZETTO et al., 2009). De acordo com Correia et al. (2006) os ácidos anacárdicos, juntamente com os lipídios resorcinólicos constituem cerca de 90% da composição do líquido extraído da casca da castanha de caju (LCC) e apresentam propriedades tóxicas e irritantes. No entanto, no pseudofruto dessa espécie (*Anacardium occidentale*) a proporção dessas substâncias fenólicas é considerada muito baixa. Na Figura 5 estão ilustrados os principais componentes químicos do líquido da casca da castanha do caju (LCC) (MAZZETTO et al., 2009).

Aos ácidos anacárdicos são atribuídos uma série de atividades biológicas. Dentre essas atividades, destacam-se as atividades antitumoral, antiacne, antibacteriana, moluscocida e antifúngica. Além disso, quando foram testados 16 compostos fenólicos isolados da espécie *Anacardium occidentale*, dentre estes, quatro ácidos anacárdicos apresentaram considerável atividade inibitória contra as bactérias Gram-positivas *Streptococcus mutans*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Propionibacterium acnes*. Ao que tudo indica o tamanho das cadeias alquílicas desses ácidos anacárdicos tem influência significativa na atividade, visto que, quando foi comparada as atividades dos ácidos anacárdicos com as atividades do ácido salicílico, que também apresentou atividade contra a maioria dos microorganismos mencionados acima, verificou-se que as atividades dos ácidos anacárdicos foram consideravelmente maiores do que as apresentadas pelo ácido salicílico (CORREIA et al., 2006).



**Figura 5** - Principais constituintes do LCC

Em vista dos exemplos citados anteriormente, ou seja, de estudos fitoquímicos e de atividades biológicas de algumas espécies da família Anacardiaceae, fica evidente que essa família faz parte de um importante grupo de plantas, de onde seus metabólitos secundários isolados se mostram promissores como metabólitos bioativos. Por conta disso, o estudo de espécies de Anacardiaceae se justifica pela diversidade de metabólitos secundários e atividades biológicas relatadas. Sendo assim, o presente trabalho de tese de doutorado tem como objetivo estudar do ponto de vista fitoquímico as espécies *Astronium graveolens* Jacq., *Tapiriara guianensis* Aubl. e *Spondias mombin* L. que fazem parte dessa importante família.

## 2.2 Gênero *Astronium* Jacq.

O gênero *Astronium* pertencente à família Anacardiaceae, foi descrito pela primeira vez por Jacquin em 1760. Em 1968 esse gênero foi dividido em dois subgêneros, o *Euastronium*, com 10 espécies e sete variedades, e o *Myracrodruon*, com três espécies e uma variedade. No entanto, esta divisão foi aceita até o ano de 1991, quando Santin e Leitão-Filho (1991), fazendo uso de caracteres mais aceitos para delimitação genérica em Anacardiaceae, que são o tipo de fruto e de placentação, retiraram o subgênero *Myracrodruon* do gênero *Astronium* Jacq. restabelecendo o gênero *Myracrodruon* Fr. Allem.. Esses autores, relatam que apesar dos dois gêneros serem muito próximos, não podem ocupar o mesmo táxon genérico devido principalmente ao tipo de fruto que apresentam. Por exemplo, o gênero *Astronium* possui fruto tipo baga, enquanto que, o gênero *Myracrodruon* possui fruto tipo drupa, com endocarpo angulado (CARMELLO-GUERREIRO & PAOLI, 2000).

De distribuição neotropical, as espécies do gênero *Astronium* podem ser encontradas desde o México, abrangendo países da América Central e da América do Sul, indo até o

Paraguai e o norte da Argentina (SANTIN, 1989; LEITE, 2002). No Brasil ocorrem 7 (sete) espécies desse gênero, estando bem representadas em todas as regiões do país, com exceção da região sul, visto que, nessa região apenas é encontrada uma única espécie desse gênero, que é a espécie *Astronium graveolens* Jacq. (SANTIN, 1989; LUZ, 2011).

Todas as espécies do gênero *Astronium* apresentam hábito arbóreo, com frutos de cálice persistente e acrescente no fruto, que resulta em aspecto estrelado, característica essa que deu origem ao nome do gênero (SANTIN, 1991). Segundo Santin (1989) as espécies desse gênero são geralmente árvores altas, variando de 8 a 45 metros de altura. Por exemplo, a espécie *A. lecointei*, pode chegar a alcançar 45 metros de altura na Floresta Amazônica.

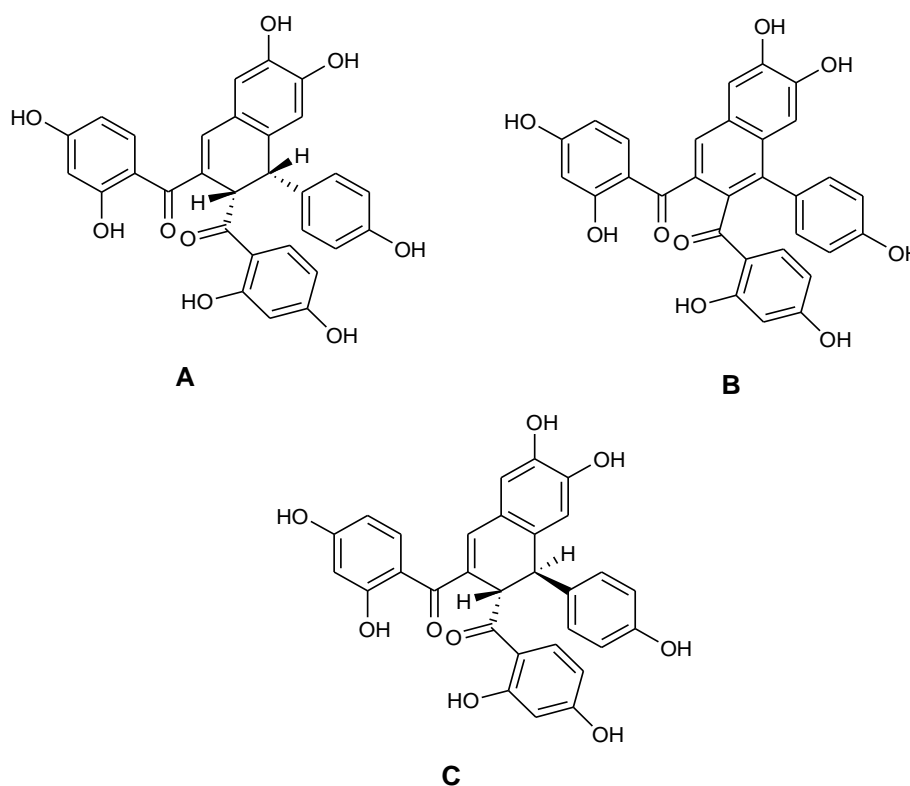
De acordo com dados da literatura (HERNÁNDEZ et al., 2014) algumas espécies do gênero *Astronium* encontradas no Brasil, como *Astronium fraxinifolium* Schott., *A. urundeuva* (Allemão) Engl. (sinonímia *Myracrodruon urundeuva* Allemão) e *A. graveolens* são utilizadas na medicina popular para tratamento de várias enfermidades. Por exemplo, várias partes da espécie *A. fraxinifolium* são tradicionalmente utilizadas para tratamentos de várias doenças. A casca dessa espécie é considerada adstringente, sendo utilizada em casos de bronquite, tuberculose pulmonar, diarreias e hemorroidas (MOURA, 2014). Por outro lado, as folhas de *A. fraxinifolium* são indicadas para tratamento de úlceras da pele por via tópica, visto que, essa parte (folhas) da espécie possui ação antisséptica. Já as raízes são utilizadas no tratamento do reumatismo (LORENZI, 1992; SALOMÃO & SILVA, 2006).

Segundo Matos (1989) a espécie *A. urundeuva* é utilizada na medicina popular para o tratamento de problemas ginecológicos e dermatológicos. Além disso, a casca e entrecasca de *A. urundeuva* são indicadas na medicina popular contra diarreias. A casca dessa espécie também é utilizada no tratamento de hemorroidas. O chá das raízes de *A. urundeuva* é empregado contra reumatismo, enquanto que o chá das folhas é utilizado no tratamento de úlceras da pele e o chá dos frutos é utilizado para aliviar dor de dente (DE SOUZA, 2012).

São também encontrados relatos relevantes na literatura sobre estudos fitoquímicos e avaliação da atividade biológica realizados com algumas espécies do gênero *Astronium*. Por exemplo, a partir de estudos fitoquímicos da espécie *A. urundeuva* foi possível isolar e identificar várias substâncias de natureza química diferentes, tais como: taninos pirogálicos, esteroides, triterpenos, saponinas e flavonoides. Além disso, o extrato dessa espécie mostrou atividade contra as larvas de *Aedes aegypti* (COSTA et al., 2007). Também existem relatos na literatura demonstrando que foram detectadas na espécie *A. urundeuva* atividades anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, neuroprotetora e efeitos no trânsito gastrintestinal (DE SOUZA, 2012).

Cabe salientar que apesar de existir relatos na literatura fazendo referência à espécie *Astronium urundeuva* como pertencente ao gênero *Astronium*, como alguns relatos citados anteriormente, é digno de nota que essa espécie já foi restabelecida no gênero *Myracrodruon* após estudos envolvendo o tipo de fruto e placenta dessa espécie (MACHADO, 2013), sendo, portanto, reconhecida atualmente como *Myracrodruon urundeuva*. Por exemplo, em um trabalho realizado por Viana et al. (2003) os autores já classificam a espécie *Astronium urundeuva* como pertencente ao gênero *Myracrodruon*, sendo, portanto, relatada como *Myracrodruon urundeuva* Allemão. Nesse trabalho os autores relatam sobre o isolamento a partir do extrato acetato de etila do caule, três chalconas diméricas que foram chamadas de urundeuvinas A, B e C (Figura 6). Segundo esses autores essas substâncias exibiram atividades analgésica e anti-inflamatória em testes realizados em camundongos.

**Figura 6** – Estruturas das três chalconas diméricas (urundeuvinas A, B e C)



Há também relatos na literatura a respeito da atividade biológica atribuída à espécie *A. balanseae*. O extrato metatólico da casca dessa espécie apresentou atividade antibacteriana em cepas ATCC de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *K. pneumoniae* (SALVAT et al., 2004).

Imai et al. (2008) relata que o extrato acetato de etila do cerne do caule da espécie *A. lecointei* exibiu potente atividade antioxidante, comparável ao do  $\alpha$ -tocoferol, um antioxidante bem conhecido. E através do estudo fitoquímico desse extrato, foram identificadas as substâncias catequina e ácido gálico.

Existem também algumas descrições na literatura a respeito de estudos fitoquímicos e avaliação de atividades biológicas atribuída a *A. graveolens* Jacq.. Essas descrições serão detalhadas a seguir, no tópico **2.2.1**.

### **2.2.1 Aspectos gerais da espécie *Astronium graveolens* Jacq.**

*Astronium graveolens* Jacq. (Anacardiaceae) (Figura 7) é uma espécie tropical de 15 a 25 m de altura, com tronco entre 40 a 60 cm de diâmetro, suas folhas são compostas e as flores são verde-amareladas (LORENZI, 2002). Essa espécie tem ampla distribuição, podendo ser encontrada desde a América Central até o Sul do Brasil (SILVA-LUZ & PIRANI 2011). No Brasil essa espécie é conhecida popularmente como aroeira, podendo ser encontrada nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul e no Paraná (LORENZI, 2002).

A espécie *A. graveolens* possui grande importância econômica devido à sua madeira ser de excelente qualidade, sendo considerada madeira nobre. Em função de sua resistência e durabilidade, sua madeira é utilizada em diversas atividades da construção civil. Além disso, sua madeira é empregada no paisagismo, em função do seu porte e beleza (LORENZI, 2002).

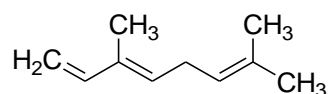
**Figura 7** – Fotos de *Astronium graveolens* (Aroeira)



Fonte: LORENZI, 2014

Dentre os estudos fitoquímicos e de atividade biológicas da espécie *A. graveolens*, descritos na literatura, podem ser citados como exemplo, os trabalhos apresentados por CHEN et al. (1984) e FILHO et al. (2002) em que relatam o potencial da atividade repelente para *Atta laevigata*, das substâncias voláteis, como, por exemplo, o monoterpeneo *trans*- $\beta$ -ocimeno [(*E*)-3,7-Dimetil-1,3,6-octatrieno] (Figura 8) provenientes dessa espécie. Em estudo realizado com o extrato etanólico das folhas da espécie *A. graveolens*, pode-se constatar que o extrato apresentou potencial alelopático, sendo assim capaz de interferir diretamente na germinabilidade, velocidade média e no tempo de germinação biomonitorada de *B. chinensis* e *L. sativa* (SILVA et al., 2010).

**Figura 8** – Estrutura do monoterpeneo *trans*- $\beta$ -ocimeno

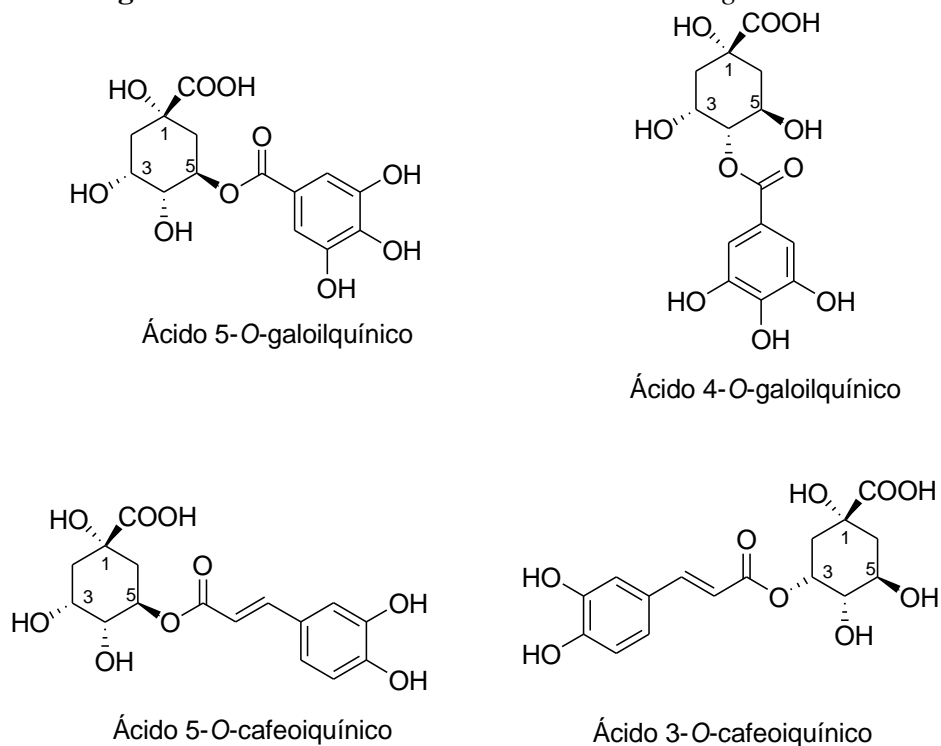


Em um outro estudo fitoquímico envolvendo a espécie *A. graveolens* realizado por Silva et al. (2009) foram isolados do extrato aquoso do caule dessa espécie os seguintes derivados fenólicos: ácido 5-*O*-galoilquínico, ácido 4-*O*-galoilquínico, ácido 3-*O*-

cafeoilquínico e o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (Figura 9). Além disso, existem relatos demonstrando que o extrato metanólico das folhas dessa espécie apresentou potente atividade antioxidante devido ao alto teor de polifenóis presentes nesse extrato (HERNÁNDEZ et al., 2014).

Em um trabalho apresentado por Hernández et al. (2013), os pesquisadores relatam sobre a caracterização química do óleo essencial extraído das partes aéreas da espécie *A. graveolens*. Nesse trabalho os autores expõem que foram identificados 26 (vinte e seis) compostos, dos quais, os mais importantes foram *trans*- $\beta$ -ocimeno (23,9%),  $\alpha$ -pineno (19,8%),  $\delta$ -3-careno (15,5%),  $\alpha$ -felandreno (12,7%), *cis*-ocimeno (6,4%),  $\alpha$ -terpineol (3,3%) e *p*-cimeno (3,2%). Além disso, os autores relatam que o óleo essencial mostrou uma forte atividade antibacteriana.

**Figura 9** – Substâncias isoladas dos caules de *A. graveolens*



### 2.3 Gênero *Tapirira*

O gênero *Tapirira* é um dos 81 gêneros que pertencem à família Anacardiaceae. Esse gênero é composto de aproximadamente 35 espécies (ROUMY, V. et al., 2009). Com relação à distribuição das espécies do gênero *Tapirira* no mundo, essas podem ser encontradas desde

o sul do 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; *T. obtusa* (Benth.) J.D.Mitch., *T. pilosa* Sprague, *T. retusa* Ducke e *T. guianensis* Aubl. (FORZZA, 2010).

A espécie *T. obtusa* 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 na região sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) (SILVA-LUZ, C.L. & PIRANI, J.R., 2010).

A espécie *T. pilosa*, sua distribuição geográfica no Brasil se dá na região norte, especificamente, no estado do Amazonas. É uma espécie de origem nativa, não endêmica do Brasil. Outra espécie que tem sua ocorrência restrita à região norte, é a espécie *T. retusa*, podendo ser encontrada nos estados do Pará, Amazonas e Acre. Trata-se de uma espécie de origem nativa, não endêmica do Brasil (SILVA-LUZ, C.L. & PIRANI, J.R., 2010).

No Brasil, *T. guianensis* pode ser encontrada em todas as regiões. Na região norte pode ser encontrada nos estados do Pará, Amazonas, Tocantins, Acre, Rondônia; no Nordeste nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe; na região Centro-Oeste nos estados do Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul; na região sudeste nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro e na região sul nos estados do Paraná, Santa Catarina (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 et al. (1998) quando 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. Com relação às outras duas espécies (*Tapirira pilosa* e *Tapirira retusa*) do gênero *Tapirira* de ocorrência no Brasil, não foram encontrados relatos na literatura a respeito de estudos fitoquímicos e de avaliação da atividade biológica.

### 2.3.1 Aspectos gerais da espécie *Tapirira guianensis* Aubl.

Dentre as quatro espécies do gênero *Tapirira* de ocorrência no Brasil, destaca-se a espécie *Tapirira guianensis* Aubl. (Figura 10), sendo considerada a espécie mais comum. Trata-se de uma espécie arbórea que mede de 8 a 14 metros de altura, com tronco curto de 40 a 60 centímetros de diâmetro. 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). 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 10** – Fotos de *Tapirira guianensis* (pau-pombo)



Fonte: LORENZI, 2014

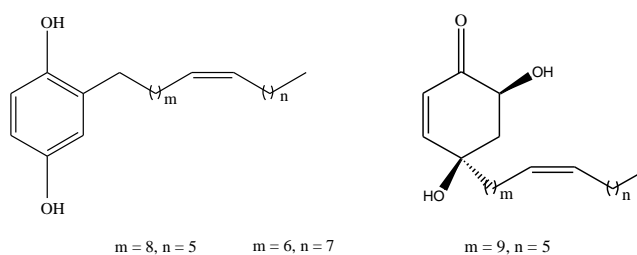
Do ponto de vista fitoquímico, o primeiro relato na literatura a respeito do estudo químico da espécie *T. guianensis* foi realizado por DAVID et al. (1998) quando reportou a composição química, bem como a atividade biológica dos metabólitos presentes nas sementes dessa espécie. Nesse trabalho DAVID et al. (1998) relataram que após o fracionamento do

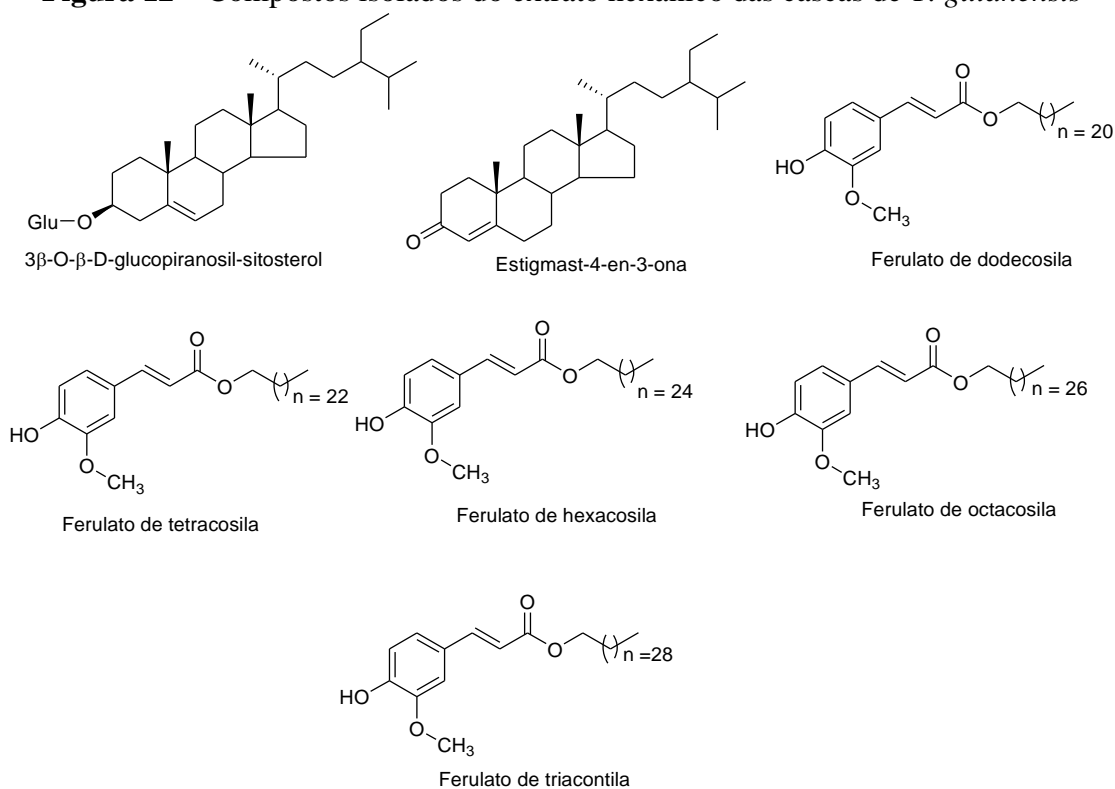
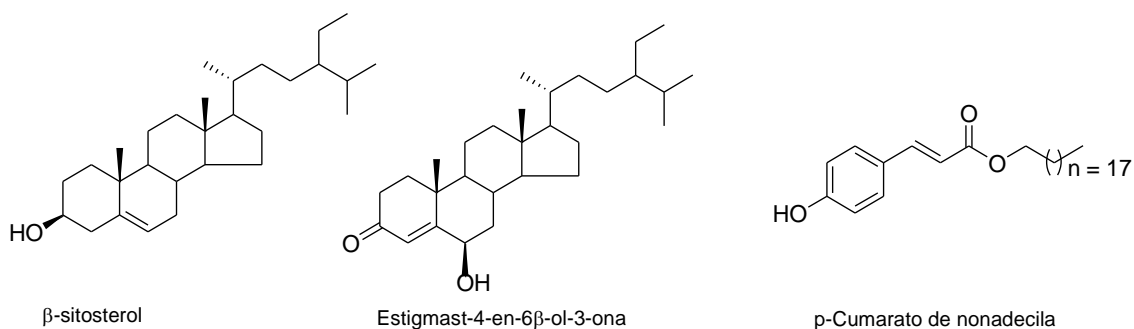


extrato metanólico das sementes de *T. guianensis* Aubl. foi possível isolar dois compostos que apresentaram atividades citotóxicas (Figura 11).

Dos extratos hexânico e clorofórmico das cascas de *T. guianensis* foram isolados dez substâncias:  $\beta$ -sitosterol, estigmast-4-en-3-ona, estigmast-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, conforme pode ser visto nas Figuras 12 e 13 (CORREIA, 2003).

**Figura 11** – Compostos isolados das sementes de *T. guianensis*



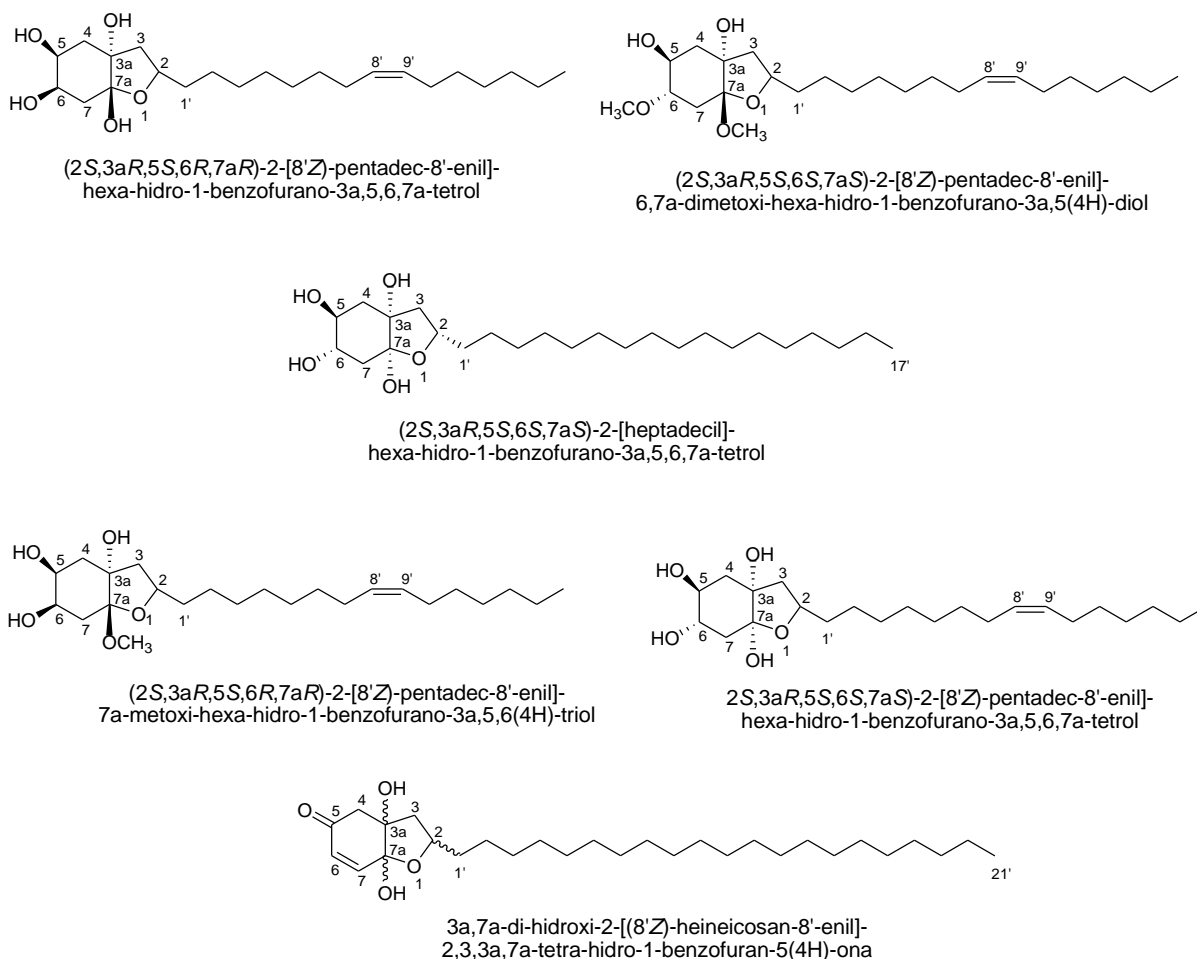
**Figura 12** – Compostos isolados do extrato hexânico das cascas de *T. guianensis***Figura 13** – Compostos isolados do extrato clorofórmico das cascas de *T. guianensis*

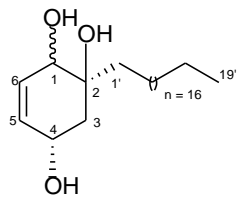
A literatura também reporta, sobre o estudo fitoquímico das folhas de espécimens de *T. guianensis* coletadas na Mata Atlântica no estado da Bahia. Nesse trabalho foram isolados e identificados uma série de novos hidrobenzofuranoides (Figura 14). Além dessas hidrobenzofuranoides, foram também isolados e identificados das folhas de *T. guianensis* as seguintes substâncias: o (2*S*,4*S*)-2-nonadecilciclo-hex-5-eno-1,2,4-triol e (4*S*,6*S*)-6-nonadecil-4,6-di-hidroxiciclo-hex-2-em-1-ona, em mistura (Figura 15), 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 (Figura 16) e os terpenoides comuns, livres e esterificados com ácidos graxos, conforme pode ser visto na Figura 17 (CORREIA, 2005).

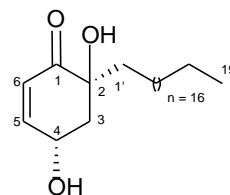
Em um estudo fitoquímico das sementes da espécie *T. guianensis* foram identificados em mistura três novos diidrobenzofuranoides alquilados: 2-[(10'*Z*)-dodec-10'-enil]-diidro-1-benzofuran-5-ol, 2-[(10'*Z*)-tridec-10'-enil]-diidro-1-benzofuran-5-ol e 2-[(10'*Z*)-pentadec-10'-enil]-diidro-1-benzofuran-5-ol (Figura 18), além disso, foi isolado e identificado o fitoesteroide já conhecido, o  $\beta$ -sitosterol (DA SILVA et al., 2012).

**Figura 14** – Novos hidrobenzofuranoides isolados das folhas de *T. guianensis*

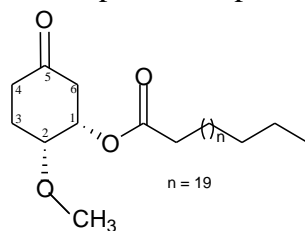


**Figura 15** – Substâncias isolados em mistura das folhas de *T. guianensis*

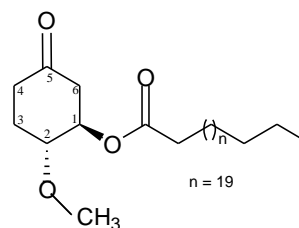
(2S,4S)-2-nonadecilciclohex-5-eno-1,2,4-triol



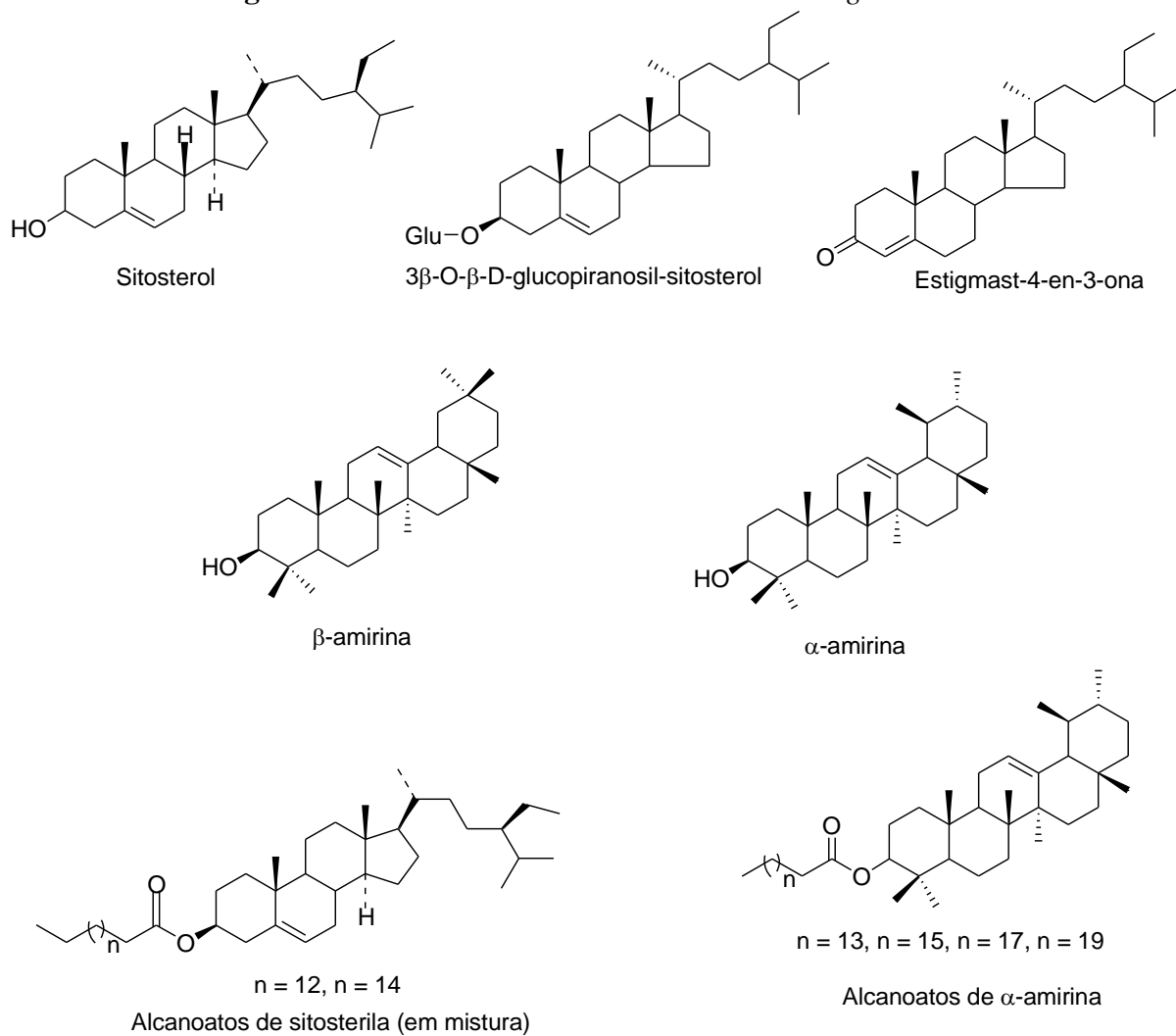
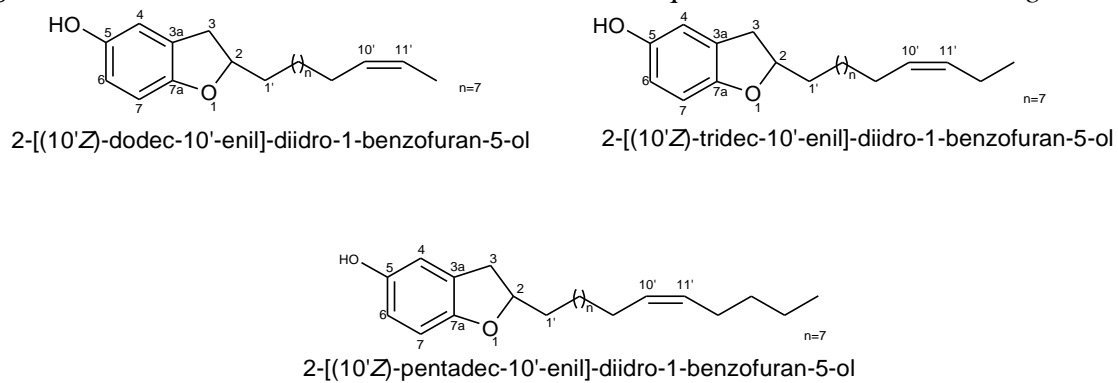
(4S,6S)-6-nonadecil-4,6-dihidroxiciclohex-2-en-1-ona

**Figura 16** – Componentes epiméricos isoladas das folhas de *T. guianensis*

Tetracosanoato de (1S,2R)-2-metoxi-5-oxociclohexila



Tetracosanoato de (1R,2R)-2-metoxi-5-oxociclohexila

**Figura 17** – Substâncias isoladas das folhas de *T. guianensis***Figura 18** – Estruturas dos di-hidrobenzofuranoides alquilados das sementes de *T. guianensis*

## 2.4 Gênero *Spondias*

O gênero *Spondias* pertencente à família Anacardiaceae é constituído de cerca de 16 espécies, que podem ser encontradas na região Neotropical e na Ásia tropical. Nas Américas, verifica-se a ocorrência de cerca de oito espécies desse gênero que vai do México ao sul do Brasil. Algumas espécies desse gênero, tais como, *Spondias mombin* L., *S. purpurea* L. e *S. dulcis* Parkinson são cultivadas pantropicalmente, ou seja, nas regiões tropicais da África, Ásia e das Américas (MITCHELL & DALY, 1998). Por exemplo, no continente Asiático ocorrem cultivos comerciais das espécies *S. mombin* e *S. purpurea*, além de outras 10 (dez) espécies nativas (BACHELIER & ENDRESS, 2009; MILLER & SCHAAL, 2005; WANNAN, 2006).

As espécies do gênero *Spondias* que merecem ser destacadas são as espécies *S. mombin*, conhecida em algumas regiões do Brasil como cajá, cajá-mirim ou taperebá; *S. purpurea*, fornecedora do fruto conhecido como ciriguela; *S. tuberosa* Arr. Câmara, que tem como fruto o umbu ou imbu; *S. dulcis*, conhecida como cajarana ou cajá-manga e duas espécies taxonomicamente indefinidas, mas sendo consideradas híbridos naturais, cajá-umbu ou umbu-cajá (*S. mombin* x *S. tuberosa*) e umbuguela (*S. tuberosa* x *S. purpurea*). Essas espécies apresentam significativa importância econômica em várias regiões do Brasil, por conta de seus frutos exibirem expressivo valor comercial. Os frutos dessas espécies são comercializados *in natura* ou processados na forma de polpas, sucos e outros produtos alimentícios. Por conta da utilização comercial destes frutos, essas espécies têm despertado interesse de vários pesquisadores, visto que, vários estudos disponíveis na literatura vêm abordando as suas características de cultivo, assim como as características físico-químicas, maturação e estabilidade, e constituintes químicos (DA SILVA et al., 2014).

Além da importância econômica de algumas espécies do gênero *Spondias*, como evidenciado anteriormente, esse gênero também possui espécies que se destacam pelo seu uso medicinal para tratamento de uma ampla variedade de enfermidades, não só no Brasil como também em várias partes do mundo. As espécies desse gênero são utilizadas na medicina tradicional, em diversas regiões do mundo, para tratamento de desordens infecciosas, e como abortivo ou tônico (DA SILVA et al., 2014). Segundo SILVA et al. (2012) as folhas da espécie híbrida umbu-cajazeira (*Spondias* sp) são frequentemente usadas pela população no tratamento de processos inflamatórios e infecciosos. Já em estudos de avaliação etnofarmacológico da espécie *S. tuberosa*, o umbuzeiro, foi possível identificar diversos usos

para tratamento de algumas patologias, tais como, diabetes, inflamações, cólicas uterinas e dores de estômago (LINS NETO et al., 2010).

#### **2.4.1 Aspectos gerais da espécie *Spondias mombin* L.**

*Spondias mombin* L. (Figura 19), conhecida como cajazeira, encontra-se dispersa nas regiões tropicais da América, África e Ásia, sendo que, no Brasil é encontrada em quase todas as regiões do país, principalmente nas regiões Norte e Nordeste (SACRAMENTO & SOUZA, 2000). Trata-se de uma árvore de médio a grande porte, frutífera com casca do tronco muito rugosa onde destacam-se pedaços grossos de súber, conhecidos pelo nome de caracas. Os frutos da espécie *S. mombin* tem dimensão pequena, apresenta forma elíptica com 3-4 cm de comprimento, de cor amarelo-alaranjada e de sabor ácido. Possui folhas compostas e apresentam flores pequenas, de cor esbranquiçada (MORTON, 1987; MATOS, 1998).

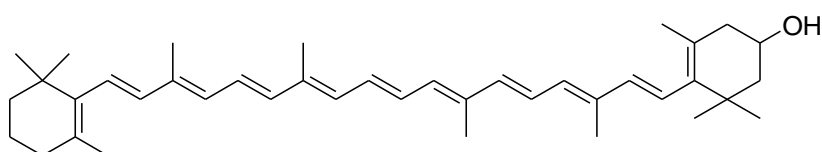
A espécie *S. mombin* apresenta significativa importância econômica em várias regiões do Brasil, por conta de seu fruto ter expressivo valor comercial. A utilização comercial da fruta cajá tem aumentado nos últimos anos, devido a sua acessibilidade e a sua disponibilidade durante todo o ano. Os frutos da cajazeira são utilizados como polpas congeladas e sucos pasteurizados. Esses frutos são ricos em carotenoides e vitamina A, contendo como principal carotenoide a  $\beta$ -criptoxantina (Figura 20), além da luteína (Figura 21) (HAMANO & MERCADANTE, 2001).

**Figura 19** – Fotos de *Spondias mombin* (cajazeira)

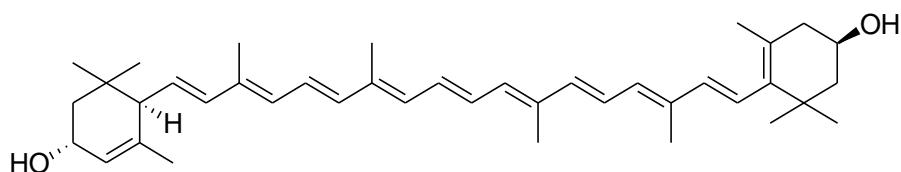


Fonte: LORENZI, 2014

**Figura 20** – Estrutura da  $\beta$ -criptoxantina



**Figura 21** – Estrutura da luteína



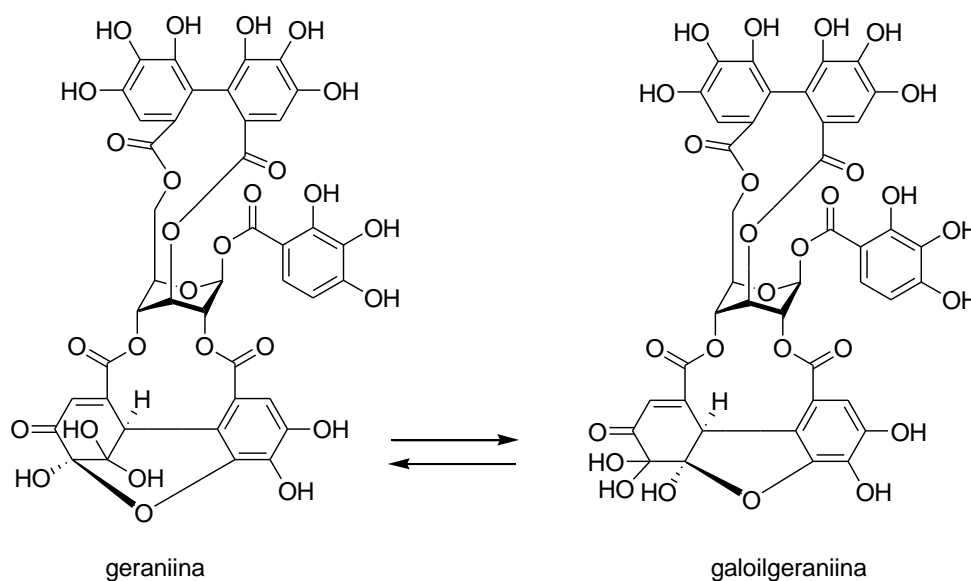
Em alguns países a espécie *S. mombin* se destaca pelo seu uso na medicina tradicional. Por exemplo, na Nigéria a decocção da casca do caule da cajazeira é utilizada para tratamento de febre tifoide (ABO, 1999), enquanto que, no México a decocção da casca do caule da cajazeira é usada para expelir cálculos na bexiga (MORTON, 1987). Na Venezuela a infusão da casca do caule é muito empregada para tratar diferentes tipos de doenças musculares

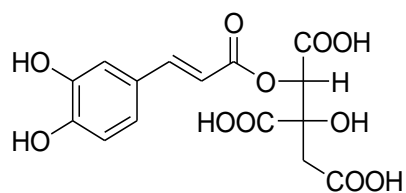
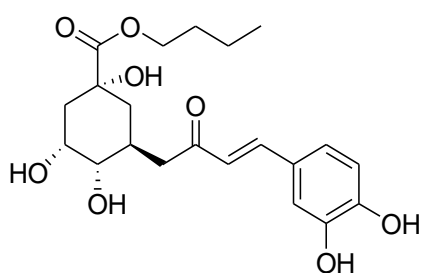
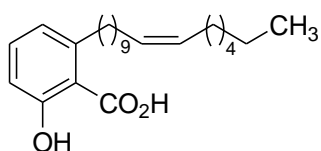
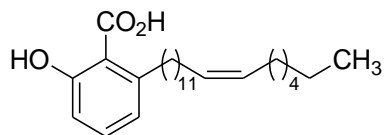
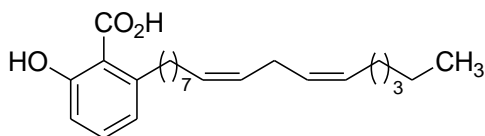
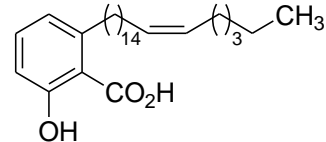
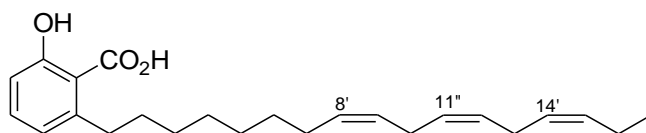


(ABAD et al., 1996). Existem também relatos demonstrando que as folhas e cascas da cajazeira são utilizadas como cicatrizantes (ANDRADE et al., 2002). Já os chás das flores e das folhas dessa espécie são indicados para aliviar a dor de estômago, várias condições inflamatórias e curas de feridas. Além disso, tem sido demonstrado que o extrato da planta possui derivados fenólicos com propriedades antioxidantes e anti-herpes, o qual tem sido formulado para uso no Brasil (AYOKA, 2006).

São encontrados alguns relatos na literatura sobre estudos fitoquímicos e avaliação da atividade biológica realizado com a espécie *S. mombin*. Por exemplo, foram isolados das folhas e caules de cajazeira, dois taninos elágicos, conhecidos como geraniina e galoilgeraniina (Figura 22), além do ácido 2-*O*-cafeoil-(+)-allohidroxicítrico (Figura 23) e o do éster butílico do ácido clorogênico (Figura 24), os quais mostraram acentuada atividade antiviral contra os vírus *Coxsackie* e *Herpes simplex* (CORTHOUT et al., 1991; CORTHOUT et al., 1992). Além destes foi isolado uma série de ácidos 6-alquenil-salicílico (Figura 25) das folhas e caules dessa espécie. Estes ácidos fenólicos apresentaram pronunciado efeito antibacteriano e moluscicida (CORTHOUT et al., 1994). Em outro estudo, o ácido 6-(8'Z, 11'Z, 14'Z – heptadecatrienil)-salicílico (Figura 26), isolado do extrato hexânico das folhas e ramos da planta apresentou propriedades inibidoras de beta-lactamases (COATES et al., 1994).

**Figura 22** – Estruturas dos taninos elágicos (geraniina e galoilgeraniina)

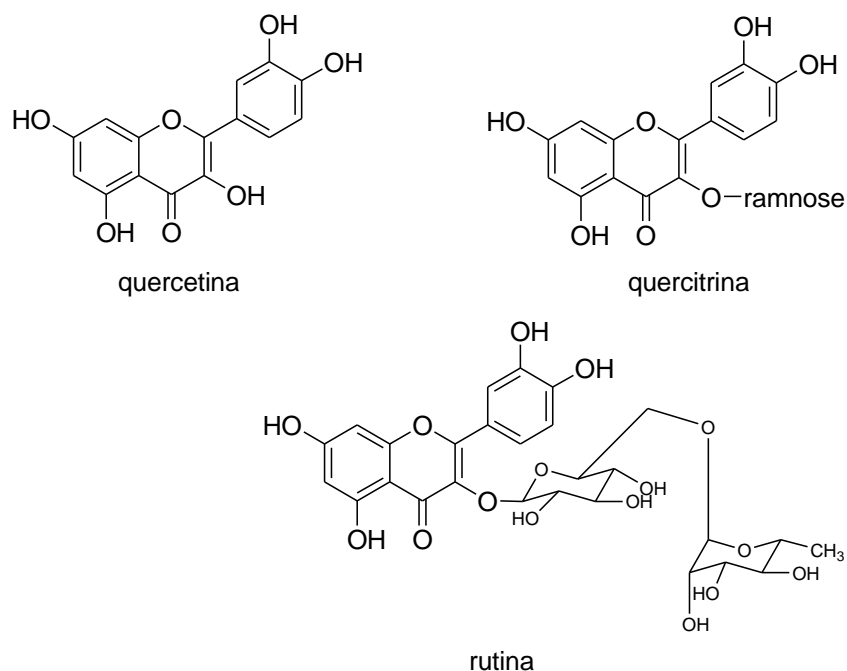


**Figura 23** – Estrutura do ácido 2-*O*-cafeoil-(+)-allo-hidroxicítrico**Figura 24** – Estrutura do éster butílico do ácido clorogênico**Figura 25** – Estruturas de ácidos 6-alquenil-salicílicoácido 6-(10'*Z*-heptadecenil)-salicílicoácido 6-(12'*Z*-nonadecenil)-salicílicoácido 6-(8'*Z*, 11'*Z*-heptadecadienil)-salicílicoácido 6-(15'*Z*-heneicosenil)-salicílico**Figura 26** – Estrutura do ácido 6-(8'*Z*, 11'*Z*, 14'*Z* – heptadecatrienil)-salicílico

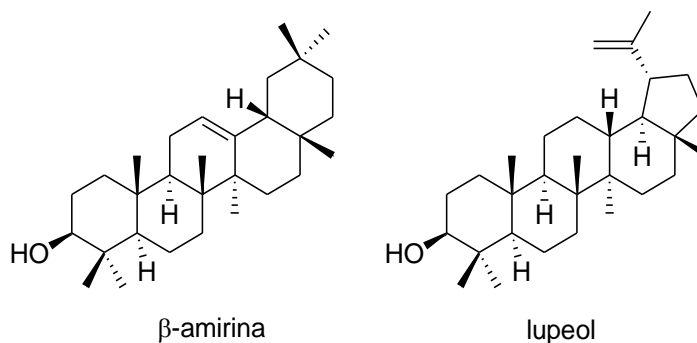
A literatura também reporta, sobre o estudo fitoquímico das folhas da espécie *S. mombin*, em que foram isolados e identificados os flavanoides quercetina, quercitrina e rutina (Figura 27), além dos triterpenoides  $\beta$ -amirina e lupeol (Figura 28) (EL FIKI, 2000).

Em um estudo realizado por Lemos et al., (1995) sobre a composição química do óleo essencial extraído das folhas de espécie *Spondias mombin* L., constatou-se que o óleo essencial é composto majoritariamente por 3-hexen-1-ol (38,07 %) e pelo  $\beta$ -cariofileno (13,73 %). Existem também relatos sobre composição química do óleo essencial extraído da casca do caule da espécie *Spondias mombin* L., onde constatou-se que os componentes majoritários desse óleo são os sesquiterpenos  $\alpha$ -copaeno (27,1 %),  $\delta$ -cadineno (11,9%),  $\alpha$ -selineno (9,4 %) e o óxido de cariofileno (8,8 %) (ANDRADE et al., 2000).

**Figura 27** – Estruturas dos flavonoides isolados das folhas de *S. mombin*



**Figura 28** – Estruturas dos triterpenoides isolados das folhas de *S. mombin*

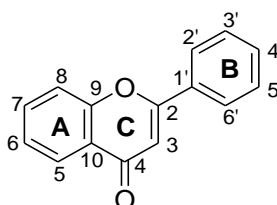


## 2.5 Aspectos gerais sobre flavonoides

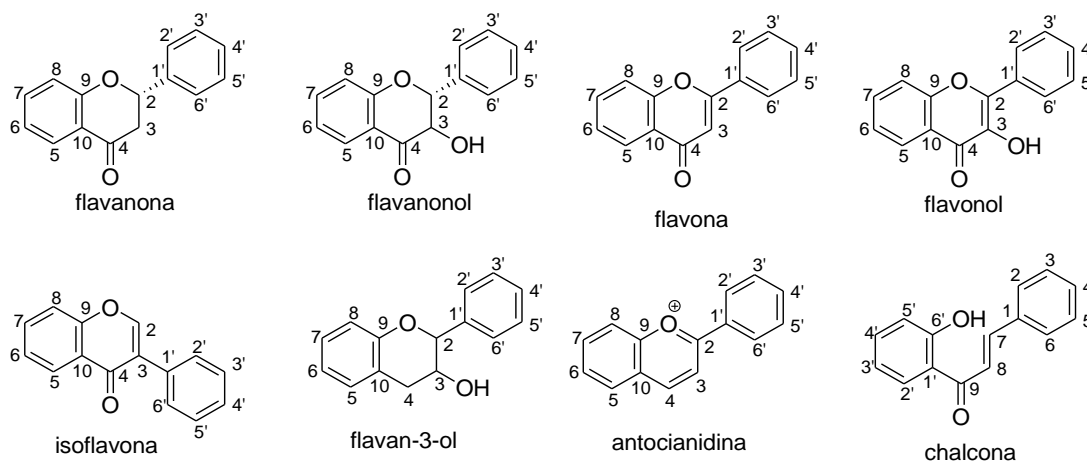
Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de metabólitos secundários é amplamente distribuída no reino vegetal. Estão presentes em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, folhas, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos (COUTINHO et al., 2009).

Os flavonoides possuem estrutura marcada pela presença de um esqueleto com 15 átomos de carbono arranjados em três anéis ( $C_6-C_3-C_6$ ) que são denominados A, B e C, conforme pode ser notado na Figura 29. As várias classes de flavanoides diferem no nível de oxidação e padrão de substituição do anel C, enquanto que os compostos individuais dentro de uma classe diferem no padrão de substituição dos anéis A e B (PIETTA, 2000).

**Figura 29** – Esqueleto básico de um flavonoide (anéis A, B e C)



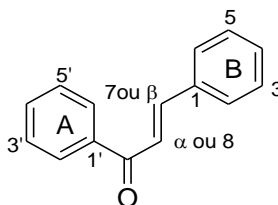
Os flavonoides podem ser encontrados como agliconas ou sob a forma de glicosídeos e/ou derivados metilados e/ou acilados. As modificações no anel central dessas substâncias conduzem à diferenciação em subclasses distintas tais como: flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-ols, antocianidinas e chalconas (COUTINHO et al., 2009). Na Figura 30 são mostradas as estruturas dos esqueletos básicos de flavonoides.

**Figura 30** – Esqueletos básicos de flavonoides

Os flavonoides apresentam significativa importância farmacológica, visto que, diversas atividades biológicas são atribuídas a essa classe de polifenóis. Entre as diversas atividades atribuídas aos flavonoides podem se citados como exemplos, a atividade antitumoral, antioxidante, antiviral, anti-inflamatória, antimicrobiana, inibição de enzima (acetilcolinesterase), dentre outras (COUTINHO et al., 2009; HARBONE & WILLIAMS, 2000; TREVISAN et al., 2006).

### 2.5.1 Chalconas

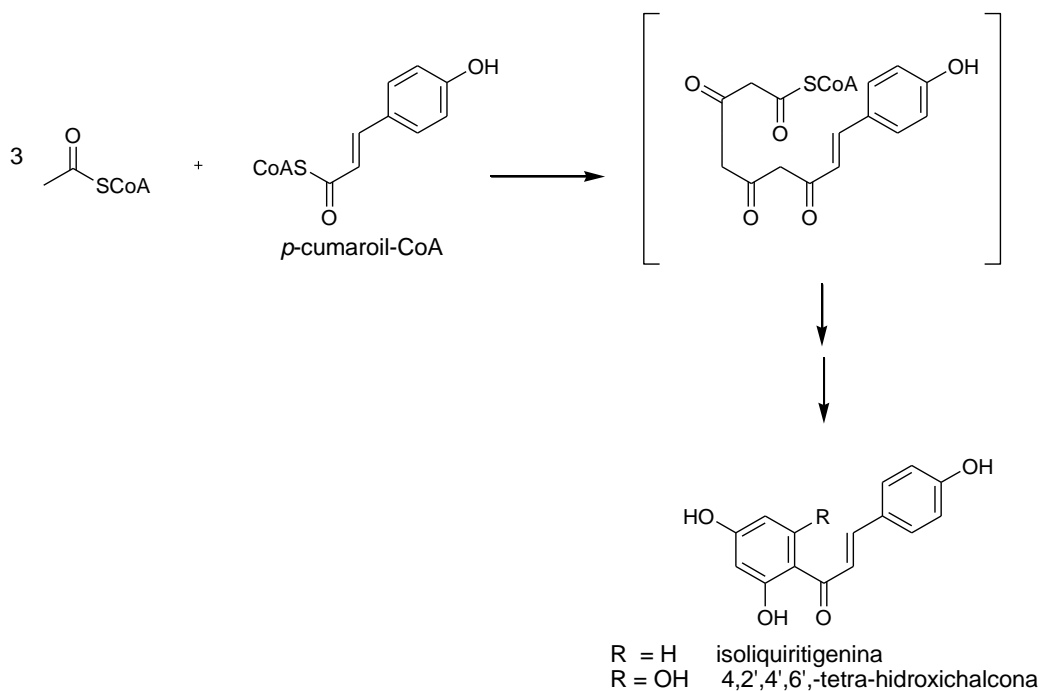
A designação chalcona é empregada para caracterizar quimicamente uma classe de substâncias que apresentam como núcleo fundamental o 1,3-diarilpropano, modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupamento cetona e/ou de um grupamento hidroxila (Figura 31) (ZACARIAS et al., 2006). Quimicamente as chalconas são também conhecidas como cetonas  $\alpha$ - $\beta$ -insaturadas e de maneira diferente à maioria dos outros tipos de flavonoides, o núcleo A das chalconas é numerado com números ordinários seguidos de uma linha ( ' ) e o núcleo B somente com números ordinários, conforme pode ser notado na Figura 31 (CHIARADIA, 2008).

**Figura 31** – Núcleo estrutural básico das chalconas

O que difere as chalconas de outros tipos de flavonoides, é que as chalconas não possuem, na sua estrutura, o anel pirânico que é formado pela adição do oxigênio à posição C-2' e seguinte ciclização com a cadeia de três átomos de carbono e o anel A, conforme pode ser visto em sua estrutura básica apresentada na Figura 31.

As chalconas são substâncias que estão presentes na natureza, podendo ser encontradas, por exemplo, nas plantas rasteiras ou arbóreas em diferentes órgãos vegetais, incluindo frutos, flores, folhas, raízes e caules. Essa classe de substâncias apresenta importante papel em sistemas ecológicos em função da pigmentação amarela que produzem, auxiliando na polinização como atraentes de insetos e/ou pássaros (BRAVO, 1998; ZUANAZZI, 2001).

As chalconas são consideradas como intermediárias essenciais na biossíntese dos flavonoides (BRAVO, 1998; MANN, 1994). A estrutura básica das chalconas, dois anéis aromáticos conectados por três átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), tem sua origem biossintética resultante da utilização de metabólitos das vias do chiquimato e do acetato. A via de degradação do aminoácido fenilalanina envolve uma série de reações catalisadas por enzimas específicas, que leva à formação do ácido *para*-cumárico na forma de coenzima A (CoA). Este, por sua vez, reage com três moléculas de malonil-CoA, em uma reação catalisada pela enzima chalcona sintase, dando origem a estrutura das chalconas, conforme pode ser observado no Esquema 1 (YUNES & FILHO, 2014). Os dois estereoisômeros das chalconas (*cis* e *trans*) são precursores comuns na biossíntese dos flavonoides e isoflavonoides nas espécies vegetais, entretanto, estudos realizados indicam que em extratos vegetais, o produto majoritário isolado é o isômero *trans*, visto que, estes são considerados mais estáveis termodinamicamente (NOWAKOWSKA et al., 2007; DHAR, 1981; NI et al., 2004).

**Esquema 1** – Rota biossintética para formação da estrutura da chalcona

Fonte: LOBO e LOURENÇO, (2007)

É muito comum nas estruturas das chalconas de origem natural a presença de substituintes localizados nos seus núcleos aromáticos, dentre os substituintes mais comuns, estão as hidroxilas, metoxilas, *O*-glicosilas, *C*-glicosilas e *C*-alquilas (CESARIN, FERREIRA & BRAZ, 2001; ZUANAZZI, 2000).

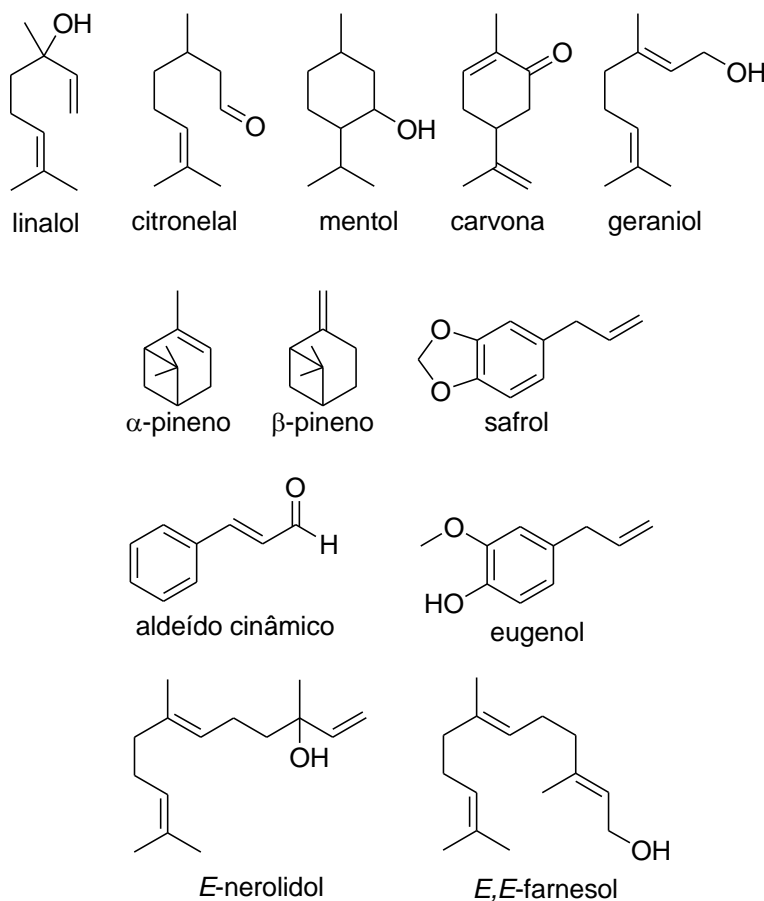
Várias atividades biológicas são atribuídas às chalconas, entre elas destacam-se algumas como, anticolinesterásica, citotóxica, quimiopreventiva, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antiviral, anticâncer, antiprotozoária, inseticida, antinociceptiva, anti-histamínica e antiulcerogênica, antifúngica, antileishmania e antimalárica (DIMMOCK et al., 1999; HASAN et al., 2005; LEBEAU et al., 2000; NI, MENG & SIROSKI, 2004; NOWAKOWSKA et al., 2007; VIANA et al. 2003).

## 2.6 Aspectos gerais sobre óleos essenciais

Os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos ou simplesmente essências, são definidos pela International Standard Organization (ISO) como produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste a vapor d'água, hidrodestilação ou outros métodos que sejam adequados para este fim).

Os óleos essenciais apresentam composição química bastante variada. Geralmente esses produtos são constituídos por complexas misturas, cujos componentes químicos predominantes são de natureza terpênica, principalmente os monoterpenos e sesquiterpenos, oriundos do metabolismo secundários das plantas (LIMA, 2003; ARAÚJO, 2005). Entende-se por terpenos ou isoprenos, os tipos químicos cuja unidade básica possui número de átomos de carbono múltiplo de cinco. Entre esses podem ser citados como exemplo, os monoterpenos ( $C_{10}$ ) formado por duas unidades de isopreno, os sesquiterpenos ( $C_{15}$ ) formado por três unidades de isopreno e diterpenos ( $C_{20}$ ) formado por quatro unidades de isopreno. Esses tipos químicos podem ser acíclicos, mono e bicíclicos, e seus produtos oxigenados são os alcóois, aldeídos, cetonas e compostos aromáticos (fenilpropanóides), especialmente fenóis e éteres. Cabe salientar que nos óleos essenciais podem também estar presentes ácidos orgânicos de baixo peso molecular e cumarinas (SIMÕES et al., 1999). Na Figura 32 estão ilustrados alguns exemplos de monoterpenos, fenilpropanóides e sesquiterpenos presentes nos óleos essenciais (KINAAK & FIUZA, 2010).

**Figura 32** – Exemplos de monoterpenos, fenilpropanóides e sesquiterpenos presentes nos óleos essenciais





Os componentes químicos dos óleos essenciais podem ser divididos de acordo com rota biossintética em duas classes. A primeira, se encontram os derivados dos terpenóides, formados pela via do ácido mevalônico-acetato, como por exemplo, os monoterpenos linalol e geraniol e os sesquiterpenos farnesol e o nerolidol; e a segunda, na qual se situam os derivados do fenilpropanoide, substâncias formadas pela via do ácido chiquímico, como por exemplo, o eugenol (STRAPAZZON, 2004; SIMÕES et al., 1999).

Os óleos essenciais podem estar presentes em diferentes órgãos das plantas, como, por exemplo, nas flores, folhas, cascas, tronco, galhos, raízes, rizomas, frutos ou em sementes. Mas cabe salientar que, apesar de diversos órgãos de uma planta poderem acumular os óleos essenciais, a composição química desses óleos podem variar de acordo com sua localização na planta (SIMÕES et al., 2000). Ou seja, os óleos essenciais extraídos das diferentes partes de uma planta, mesmo apresentando cor e aspecto semelhantes, podem ter composição química, características físico-químicas e odores bem diferentes (ROBBERS et al., 1997). Além disso, em muitas situações, mesmo sendo extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, a composição química de um óleo essencial pode apresentar variações significativas, dependendo de fatores como estágio de desenvolvimento da espécie, condições climática e de solo e além disso, a época da coleta, uma vez que, as espécies apresentam épocas específicas em que contêm maior quantidade de óleos voláteis no seu tecido, podendo esta variação ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano (REIS et al., 2003; SIMÕES & SPITZER, 1999).

Os óleos essenciais apresentam importante papel ecológico para a espécie que o produz, especialmente como inibidor de germinação de outras espécies vegetais que venham a competir pelo solo, luz e água, na proteção contra predadores e na atração de polinizadores (SIMÕES et al., 2000; FABROWSKI, 2002).

Estudos tem apontado várias propriedades medicinais que são atribuídas aos óleos essenciais. Dentre essas propriedades, destacam-se as seguintes: antiviral, antiespasmódica, analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, expectorante, relaxante, anti-séptica das vias respiratórias, larvicida, anti-inflamatória, entre outras (NASCIMENTO et al., 2007).

De acordo com Simões et al. (2000), os óleos essenciais são extraídos das plantas através de técnicas como destilação por arraste a vapor, hidrodestilação, extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, prensagem (ou expressão) a frio, entre outras. Dentre estas, a hidrodestilação é uma das técnicas mais antigas e versáteis utilizadas para extração de óleos essenciais de plantas. Nessa técnica o material vegetal a ser destilado fica em contato direto com a água, e quando a água entra em ebulição, arrasta os compostos voláteis consigo inclusive o óleo, e

quando condensa, forma uma mistura heterogênea, com duas fases, devido à diferença de polaridade e densidade entre a água e o óleo, sendo que, o óleo obtido, após ser separado da água, deve ser seco com sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anidro (SILVA et al., 2010; SIMÕES et al., 2000). Portanto, é uma técnica em que a extração do óleo essencial ocorre de forma rápida e simples e é realizada utilizando um aparelho destilador que recebe a denominação comercial de Clevenger (SANTOS et al., 2004).

Por se tratar de uma mistura de constituintes voláteis, os óleos essenciais brutos podem ser analisados diretamente pela técnica de cromatografia gasosa, sem tratamento prévio da amostra, além de uma simples diluição, permitindo não somente a análise quantitativa de seus constituintes, mas também qualitativa, quando acoplada a espectrometria de massas (YUNES & FILHO, 2014).

## **2.7 Testes de atividade biológica**

### **2.7.1 Avaliação da atividade antioxidante**

Os reagentes, oxigênio molecular e seus radicais, são considerados os mais importantes na bioquímica dos radicais livres nas células aeróbicas. O termo “espécies reativas de oxigênio” (ERO) é empregado para identificar os radicais livres contendo oxigênio, como o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o radical hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ), o radical peroxila ( $\text{ROO}\cdot$ ) e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), os quais são frequentemente gerados como subprodutos de reações biológicas ou por fatores exógenos. As “espécies reativas de oxigênio” (ERO) podem causar uma quantidade significativa de desordens celulares ao reagir com lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (ANDRADE et al., 2007).

O estresse oxidativo (EO) está relacionado a um desequilíbrio entre a taxa de produção de agentes oxidantes e sua degradação. E isso ocorre quando a produção de ERO está acelerada ou quando os mecanismos envolvidos na proteção contra as ERO encontram-se deteriorados (VICENTINO & MENEZES, 2007). Diveros fatores como a predisposição genética, fatores ambientais como radiação UV e propriedades intrínsecas específicas de grupos celulares podem acentuar o dano oxidativo ou diminuir a capacidade das células de degradar estes agentes agressores (GIASSON et al., 2002).

Nos últimos anos, tem se notado uma quantidade significativa de evidências indicando a importância dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo

envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (SOUZA et al., 2007).

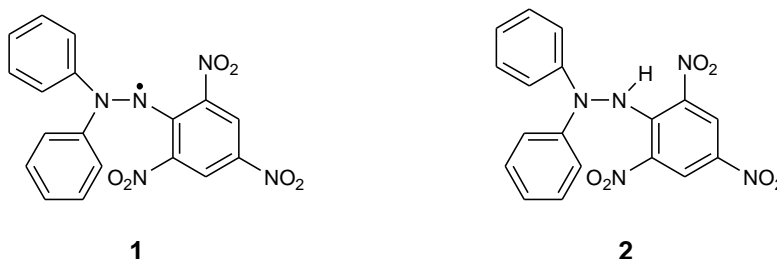
O termo antioxidantes é empregado para um grupo de substâncias que, quando estão presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, inibem ou retardam significativamente os processos oxidativos (VAYA & AVIRAM, 2001).

As espécies vegetais produzem uma grande diversidade de substâncias antioxidantes que atuam prevenindo os danos moleculares causados por ERO. Dentre os compostos de origem vegetal que apresentam propriedades antioxidantes, estão os compostos fenólicos, entres estes destacam-se os flavonoides. Os antioxidantes naturais são indicados para atenuar os efeitos deletérios do estresse oxidativo nos organismos. Estudo recentes sinalizam que vários extratos de espécies vegetais exercem ação antioxidante (NUNES et al., 2008).

Na literatura existem diversos métodos para se determinar a eficiência, de extratos ou substâncias puras, no sequestro de radicais livres. No entanto, as metodologias mais comuns para se determinar a atividade antioxidante de um modo prático, rápido e sensível são as que envolvem um radical cromóforo, simulando as ERO, sendo o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) um dos mais utilizados (ARNAO et al., 2000).

O radical de DPPH é considerado como uma espécie química estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta. Este método se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH (Figura 33), reduzindo-o a hidrazina. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido e o decaimento da absorvância é medido espectrofotometricamente (ALVES et al., 2010).

**Figura 33**– Forma radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH



### 2.7.2 Teste de letalidade frente a *Artemia Salina* Leach

Geralmente os testes de toxicidade são desenvolvidos com a finalidade de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES e FORBES, 1994). Esses testes permitem uma avaliação da toxicidade geral e, portanto, são considerados essenciais como bioensaios preliminares no estudo de substâncias com potencial atividade biológica (CAVALCANTE et al., 2000). Muitos bioensaios de toxicidade podem ser empregados para este fim, como o ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina* Leach, que foi desenvolvido para detectar substâncias bioativas presentes em extratos vegetais (MEYER et al., 1982). O microcrustáceo *Artemia salina* Leach é muito utilizado como bioindicador em ensaios de laboratório, em função da sua facilidade de manipulação e do seu baixo custo econômico (CALOW, 1993).

Por ser um teste simples e de baixo custo, o teste de letalidade em microcrustáceo *Artemia salina* Leach tem sido introduzido na rotina de muitos grupos de pesquisa envolvidos com isolamento, purificação e elucidação estrutural, já que muitos laboratórios de fitoquímica não estão preparados para a realização de ensaios biológicos mais complexos (LHULLIER; HORTA & FALKENBERG, 2006). Os cistos de *A. salina* são de baixo custo e facilmente encontrados no comércio, além disso, permanecerem viáveis por anos no estado seco (MEYER et al., 1982).

Atualmente esse microcrustáceo pode ser considerado um indicador quanto à citotoxicidade de extratos orgânicos ou substâncias puras. Esta constatação encontra-se amparada em estudos de bioensaios comparativos entre o teste de letalidade frente *A. salina* e testes *in vitro* com linhagens de células cancerígenas, realizado com diversas substâncias reconhecidamente citotóxicas (ANDERSON et al., 1991). Através desse estudo, foi possível constatar que o ensaio com *Artemia salina* Leach é tão acurado quanto os testes realizados com células cancerígenas, proporcionando assim um teste preliminar para seleção de substâncias que podem apresentar atividade anticancerígena de forma simples, barata e confiável.

### 2.7.3 Avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase

A doença de Alzheimer (DA) foi descrita originalmente pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer em 1907, depois de realizar uma autópsia em um paciente de 55 anos de

idade, morto devido a um caso de demência. Através dessa autópsia Alois Alzheimer observou uma série de anormalidades que o levaram a caracterizar esta doença (SILVA, 2009).

A doença de Alzheimer (DA) pode ser entendida como uma desordem neurodegenerativa, que afeta as regiões cerebrais associadas às funções mentais superiores, particularmente o córtex frontal e o hipocampo (JUNIOR et al., 2004). Nessa complexa e progressiva doença neurodegenerativa multifatorial, que atinge primordialmente a população idosa com mais de 65 anos de idade, são observados perda de memória, comprometimento da coordenação motora e de raciocínio, além de déficits cognitivos e demência (ADAMS et al., 2007). Dentre os multifatores de risco que podem estar associado à doença de Alzheimer (DA), destacam-se os seguintes: idade avançada, genótipo da apolipoproteína, traumatismo craniano com perda de consciência, diabetes, hipertensão, elevados níveis de colesterol e fumo. Geralmente, o paciente evolui para morte em torno de 8 a 10 anos após o início do quadro (ARAÚJO, 2010).

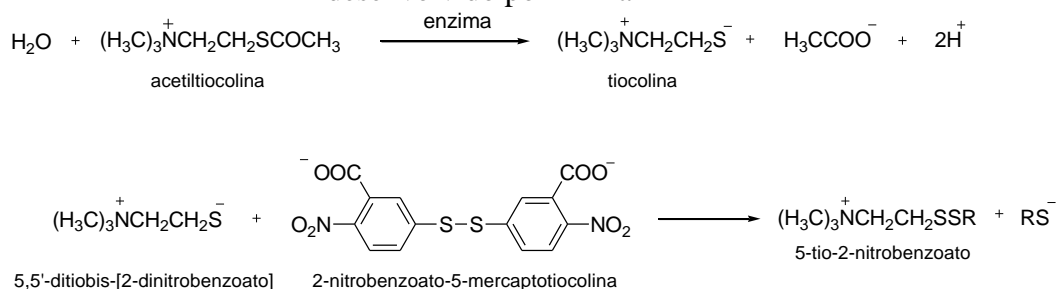
No final dos anos 1970 foi descoberto que os cérebros de pacientes com DA são deficientes em acetilcolina (ACh). A acetilcolina (ACh) é um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso central que serve para aumentar a atenção e facilitar a aprendizagem. Observou-se que muitos relatos de déficits cerebrais ligados a DA estão associados ao sistema colinérgico, resultando na criação da hipótese colinérgica que afirma que disfunções cognitivas, funcionais e comportamentais associadas com DA podem ser causadas por uma incapacidade de transmitir impulsos neurológicos em toda sinapse colinérgica (SILVA, 2009).

Várias alternativas terapêuticas foram avaliadas com objetivo de corrigir o déficit colinérgico em portadores de DA. No entanto, dentre as estratégias empregadas, a que mais se mostrou eficiente para o controle da evolução da doença, foi a que envolveu o uso de inibidores de acetilcolinesterase (AChE) (JUNIOR et al., 2004).

Atualmente os fármacos inibidores de acetilcolinesterase vêm sendo a alternativa terapêutica mais comumente utilizada por apresentarem melhores resultados no controle da doença sem, entretanto, serem capazes de impedir sua progressão em nenhum de seus níveis (JUNIOR et al., 2004). Dentre os medicamentos utilizados para este fim, pode-se citar como exemplo, o produto natural galantamina, um alcaloide anticolinesterásico, isolado de plantas da família Amaryllidaceae (GIORDANI et al., 2008), o qual está servindo de protótipo para desenvolvimento de novos fármacos anticolinesterásicos (JUNIOR et al., 2004).

A literatura reporta sobre várias formas de determinar a inibição da AChE, principalmente adaptações do método de Ellman (1961) e na reação com acetato de 1-naftil desenvolvido por Marston (2002). Nesse teste é proposto um método fotométrico de detecção da ação inibitória da enzima AChE, utilizando-se como substrato a acetiltiocolina, um análogo do substrato natural ACh sendo a atividade enzimática avaliada através do aumento da coloração amarela decorrente da hidrólise de acetiltiocolina a acetato e tiocolina. Este último, após reagir com íon 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoato] (reagente de Ellman), produz o íon colorido 5-tio-2-nitro-benzoato cuja formação pode ser medida em 405 nm em um espectrofotômetro comum (Figura 34).

**Figura 34** – Reações químicas envolvidas no teste de atividade anticolinesterase desenvolvido por Ellman



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Gerais

Os objetivos desse trabalho consistem em estudar do ponto de vista fitoquímico as espécies *A. graveolens*, *T. guianensis* e *S. mombin* pertencentes à família Anacardiaceae cultivadas no Estado da Bahia.

#### 3.2 Específicos

- Isolar, através de métodos cromatográficos, os metabólitos secundários presentes nas fases orgânicas das folhas e caules da espécie *A. Graveolens*;
- Realizar estudo fitoquímico das fases orgânicas das flores da espécie *T. guianensis*;
- Determinar as estruturas das substâncias isoladas através de técnicas espectrométricas usuais como RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e outros experimentos (DEPT, HSQC, HMBC, NOESY), além de EM, IV, CG-EM, CLAE e comparação com dados da literatura;
- Avaliar a atividade citotóxica das fases orgânicas das folhas e caules da espécie *A. Graveolens* através do bioensaio de letalidade sobre *Artemia salina* Leach;
- Avaliar a atividade citotóxica das fases orgânicas das flores de *T. guianensis* através do bioensaio de letalidade sobre *Artemia salina* Leach;
- Realizar estudo da composição química dos óleos essenciais presentes nas flores das espécies *T. guianensis* e *S. mombin* através das técnicas de hidrodestilação e CG-EM;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* das fases orgânicas das folhas e caules da espécie *A. Graveolens* através do método de sequestro do radical DPPH;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* das fases orgânicas das flores da espécie *T. guianensis* através do método de sequestro do radical DPPH;
- Avaliar a atividade inibidora da acetilcolinesterase *in vitro* das fases orgânicas das folhas e caules da espécie *A. Graveolens* e das substâncias isoladas dessa espécie.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Materiais, equipamentos e reagentes

Os solventes utilizados na preparação dos extratos, na solubilização das amostras, nas eluições em cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e cromatografia em coluna (CC) foram de grau analítico de procedência Quimex, Qhemis e Synth.

Nos procedimentos de separação por cromatografia em coluna (CC) os adsorventes utilizados como fase estacionária foram gel de sílica 60 da Akros® com diâmetro de partícula entre 0,063-0,200 nm, sílica Flash com diâmetro de partícula entre 0,040-0,063 mm, também de procedência da Acros Co e Sephadex LH-20 da Sigma para procedimentos de permeação em gel.

Nos procedimentos de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram utilizadas placas pré-preparadas de gel de sílica 60 F254 de procedência Whatman®, Fluka ou RdH Laborchemikalien GmbH & Co.

Os métodos de revelação empregados nas cromatografias em camada delgada consistiram na exposição das placas à radiação, utilizando-se, em gabinete apropriado, lâmpada ultravioleta nos comprimentos de onda de 256 e 366 nm (Spectroline - Model CM-10, Fluorescence Analysis Cabinet), vapores de iodo, solução de cloreto férrico (5% em etanol) e 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.

Para evaporação de solventes sob pressão reduzida foram utilizados evaporadores rotatórios das marcas BUCHI 461 e IKA LABORTECHNIK HB4 basic.

Os espectros na região do Infravermelho foram obtidos em um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier, modelo IRAFFINITY-1, da Shimadzu®. Para obtenção de espectros no IV em filme, as amostras foram solubilizadas em clorofórmio. Enquanto que, em pastilha, foi empregado KBr seco da MERCK.

Para determinação da temperatura de fusão das amostras (substâncias isoladas) foi empregado o aparelho modelo MQAPF-302, da Microquímica Equipamentos®.

Para determinação da pureza das substâncias isoladas foi utilizado Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Nas análises cromatográficas das frações ACAG-11-G-8,



ACAG-11-G-4-B, ACAG-11-G-4-F e DTG-11-C foi utilizado o CLAE da marca Dionex®, modelo UltiMate 3000, composto por uma bomba quaternária com degaseificador “on-line” a vácuo de quatro canais, tolerante a vazões de até 10 mL/min. Mecanismo de duplo pistão em série com deslocamento variável de 20 a 100 µL, auto-injetor, controle de temperatura da coluna e detector UV com arranjo de diodos. O equipamento foi gerenciado pelo *software* Chromeleon®.

A melhor resolução cromatográfica das análises das frações ACAG-11-G-8, ACAG-11-G-4-B, ACAG-11-G-4-F e DTG-11-C foi obtida utilizando gradiente de eluição no modo reverso, com fase móvel constituída de metanol (**B**) e água acidificada com ácido fórmico 0,2% (v/v) (**A**): 30 a 50% de **B** por 15 min, seguido de 50 a 100% de **B** de 15 a 20 min. Permanecendo nessa condição até 23 min para limpeza da coluna. O fluxo empregado na fase móvel foi de 0,8 mL min<sup>-1</sup>, o volume de injeção de 10 µL e temperatura de 30 °C. A coluna foi condicionada com o gradiente inicial de solventes por dois minutos entre cada análise. A coluna cromatográfica analítica utilizada nessas análises foi a DIONEX Acclaim® RSLC 120 C18, 5µm, 120Å, 2.1X 100mm. Os cromatogramas foram registrados com detector de arranjo de diodos em varredura de 190-400 nm e todos os perfis cromatográficos por CLAE foram obtidos em 254, 265, 290 e 330 nm.

Nas análises cromatográficas das frações AFAG-21-F, DCAG-27-E-4 e ACAG-9-D foi utilizado cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UPLC) do tipo modular Shimadzu Nexera XR, constituído de duas bombas LC-20AD<sub>XR</sub>, gradiente de alta pressão, degaseificador de fase móvel DGU-20A3, sistema de injeção automático de amostra SIL-20A<sub>XR</sub>, forno para coluna CTO-20A, detector UV/VIS com arranjo de diodos (SPD-M20A) e módulo controlador/interface CBM-20A. Esse sistema é controlado pelo software LabSolutions. A melhor resolução cromatográfica para as análises das frações AFAG-21-F, DCAG-27-E-4 e ACAG-9-D foi obtida utilizando gradiente de eluição no modo reverso, com fase móvel constituída de metanol (**B**) e água acidificada com ácido fórmico 0,2% (v/v) (**A**): 10 a 60% de **B** por 5 min, seguido de 60 a 80% de **B** de 5 a 7 min e de 80 a 100% de **B** de 7 a 12 min. Permanecendo nessa condição 100% de **B** de 12 até 15 min para limpeza da coluna. O fluxo empregado na fase móvel foi de 0,3 mL min<sup>-1</sup>, o volume de injeção de 5 µL e temperatura de 30 °C. A coluna cromatográfica analítica utilizada nessas análises foi a Shim-pack XR-ODS II (2 mm d x 75 mm).

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas foram grau HPLC (TEDIA® ou J. T. Baker®), filtrados à vácuo em membrana de nylon de 0,45 µm de porosidade. O ácido fórmico 98-100% utilizado no preparo da fase móvel foi grau analítico (Emsure®).

A água ultrapura utilizada na composição da fase móvel foi obtida em um sistema NANOpure Diamond™ (Barnstead®, Dubuque, Iowa, EUA).

Antes das análises por CLAE e UPLC todas as amostras foram filtradas em membranas de filtração millipore com poros de 0,22 µm de diâmetro (Supelco, USA).

As amostras foram pesadas em uma balança analítica (AND®, modelo HR 200).

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$ , bem como os espectros bidimensionais foram obtidos em espectrômetro de RMN Varian®, GEMINI 2000 (7,00 Tesla), operando a 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) ou no equipamento RMN DRX 500 da Bruker® (11,7 Tesla) operando a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125MHz ( $^{13}\text{C}$ ), utilizando-se  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ , (Isotech®) como solventes. O sinal de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  dos solventes foi utilizado como referência interna em relação ao TMS.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos no equipamento MICROTOF – Bruker Daltonics ionizados por ESI no modo positivo ou negativo. As análises foram realizadas na Central Analítica da USP.

As análises por CG-EM das frações DFAG-4 (**AG1**) e DCAG-3 (**AG5**), bem como, dos óleos essenciais extraídos das flores das espécies *T. guianensis* e *S. mombin* foram realizadas em equipamento QP2010SE (GC2010 Plus) da marca Shimadzu usando coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25 µm). Para as análises por CG-EM das frações DFAG-4 (**AG1**) e DCAG-3 (**AG5**) utilizou-se hélio como gás de arraste, com fluxo de 0,8 mL/min. A temperatura do injetor foi de 290 °C, temperatura inicial da coluna foi de 50 °C por 1 min, aumentando de 50 °C a 180 °C na razão de 15 °C/min, de 180 °C a 230 °C na razão de 7 °C/min e por fim de 230 °C a 250 °C na razão de 15 °C/min. A temperatura final permaneceu em 250 °C por 10 minutos. A temperatura do detector foi de 250 °C e a temperatura na interface do sistema CG-EM foi de 250 °C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas entre o intervalo de 30 a 600 Da. As condições de análises por CG-EM dos óleos essenciais extraídos das flores das espécies *T. guianensis* e *S. mombin* estão registrados no item **4.6**, página 88.

Para os testes de atividade antioxidante foi utilizado o radical DPPH de procedência Sigma-Aldrich®, e o espectrofotômetro (Cary 50 conc, Varian, Austrália). As substâncias padrão utilizadas nesses testes foram o ácido gálico (Sigma-Aldrich®, ≥ 99%) e quercetina (Sigma-Aldrich®, ≥ 95%).

As leituras das absorvâncias do teste de inibição da enzima acetilcolinesterase foram feitas em um leitor de microplacas (Biotek®), modelo EL800. Os reagentes utilizados nesse teste, iodeto de acetiltiocolina (ACTI) (≥97%), tampão fosfato 0,1 M, albumina sérica bovina

( $\geq 96\%$ ), 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB), enzima acetilcolinesterase tipo VI-S obtida de *Electroparus electricous* e eserina ( $\geq 99\%$ ) foram todos da Sigma-Aldrich®.

As partes (folhas e caules) da espécie *A. graveolens* foram submetidos a secagem em estufa (Soc. Fabbe Ltda) a 40°C com ventilação.

Os caules da espécie *A. graveolens* foram submetidos à moagem, utilizando-se moinho Thomas Wiley Laboratory Mill-Model 4.

## 4.2 Coleta das espécies

As folhas e os caules da espécie *A. graveolens* foram coletados no dia 30 de setembro de 2011 no município de Feira de Santana, Bahia. O material vegetal foi identificado pelo Prof. Dr. Flávio França, e sua exsicata foi depositada no Herbário do Laboratório de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) sob o número HUEFS 3078.

As flores da espécie *T. guianensis* foram coletadas no dia 02 de março de 2012 no Campus de Ondina da Universidade Federal da Bahia (UFBA), no município de Salvador, Bahia. A coleta foi realizada em uma região localizada nas proximidades do Instituto de Biologia. Enquanto que as flores da espécie *S. mombin* foram coletados no dia 24 de novembro de 2012 no município de Retirolândia, Bahia.

## 4.3 Preparo dos extratos e das fases orgânicas

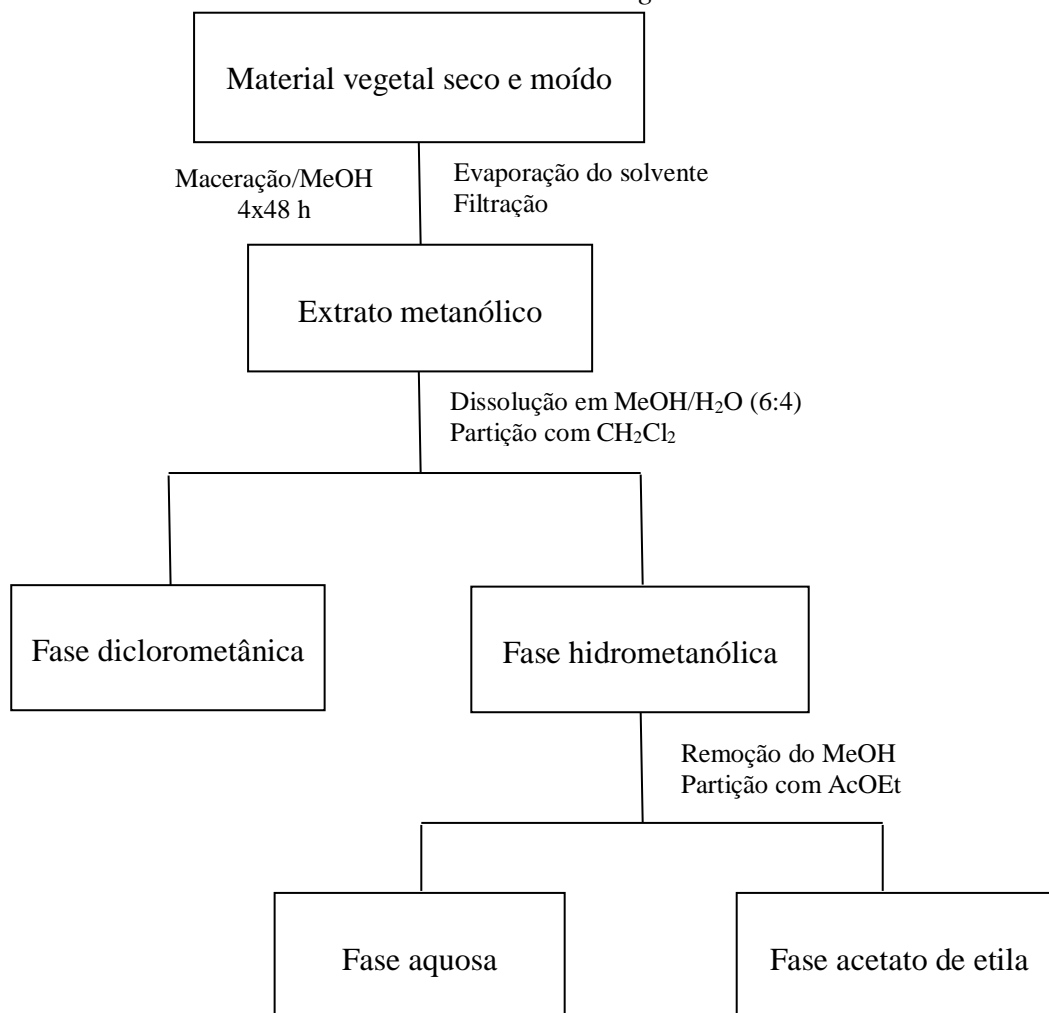
### 4.3.1 Preparo dos extratos e das fases orgânicas das folhas e caules de *A. graveolens*.

As folhas e os caules de *A. graveolens*, após serem secos em estufa a 40° C com ventilação por 48 horas, foram submetidos à moagem separadamente. O material vegetal pulverizado (1066,10 g das folhas e 1465,67 g dos caules) foram então submetidos à maceração em MeOH, separadamente, por quatro extrações consecutivas, com cerca de 48 h cada, e o filtrado obtido em cada etapa foi reunido e concentrado sob pressão reduzida, originando os extratos metanólicos das folhas (118,32 g) e dos caules (130,72 g). Esses extratos foram dissolvidos, separadamente, em MeOH/H<sub>2</sub>O (6/4) e particionado entre diclorometano, dando origem a duas fases, diclorometânica e a hidrometanólica.

A fase hidrometanólica de cada extrato foi concentrada sob pressão reduzida para eliminar o metanol, restando apenas a fase aquosa. Essa fase foi submetida à partição com acetato de etila, originando as fases AcOEt e aquosa. O procedimento realizado encontra-se

ilustrado na Figura 35. As fases orgânicas obtidas foram concentradas, rotuladas e pesadas, conforme pode ser observado na Tabela 1.

**Figura 35** – Procedimento experimental empregado no preparo dos extratos e das fases das folhas e caules de *A. graveolens*



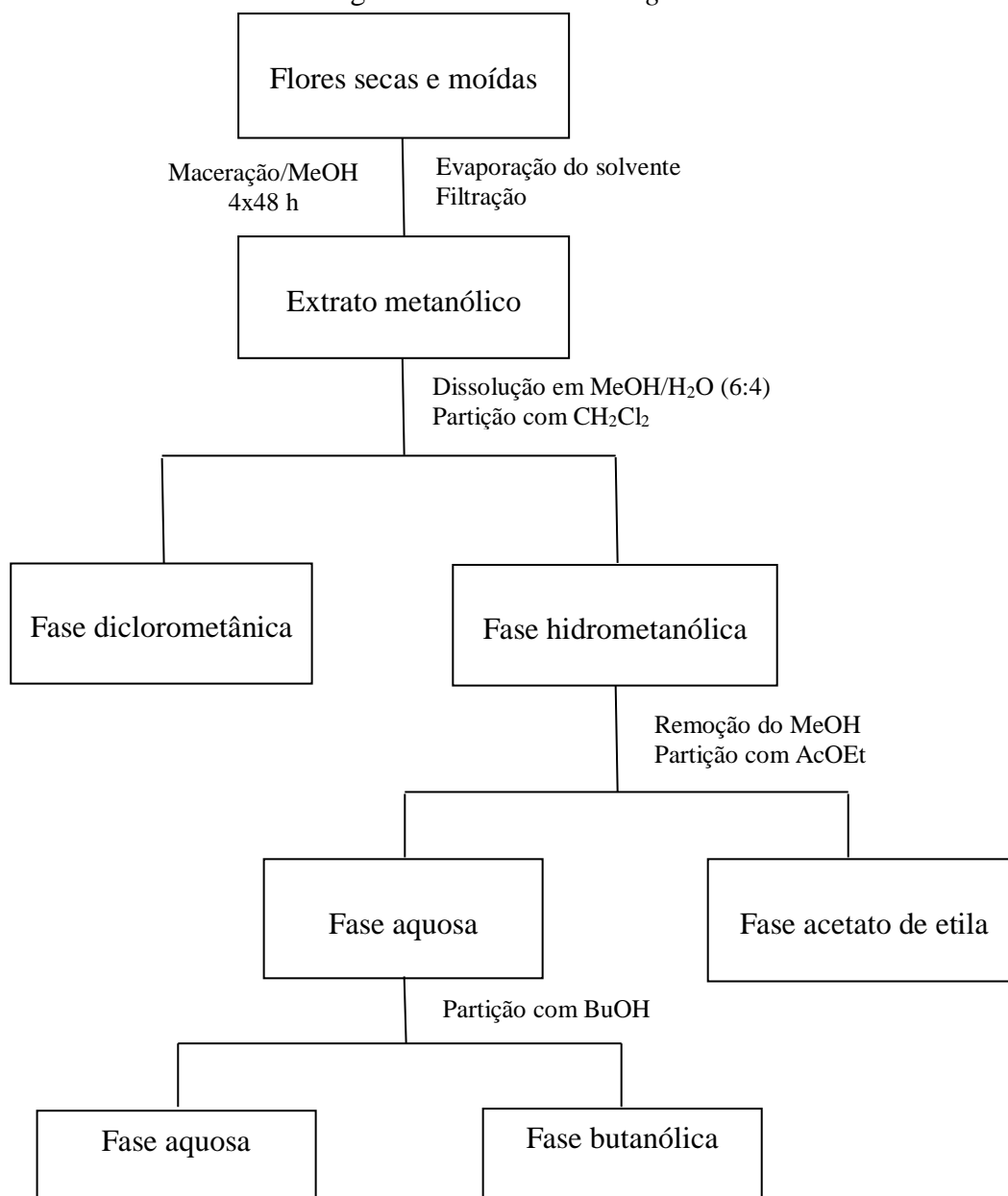
**Tabela 1** – Massas das fases orgânicas obtidas pela partição dos extratos metanólicos brutos das folhas e dos caules de *A. graveolens*

Fases Orgânicas	Massa (g)	
	Folhas	Caule
Diclorometânica	13,23	10,18
Acetato de etila	25,81	19,65

#### 4.3.2 Preparo do extrato e das fases orgânicas das flores de *T. guianensis*

As flores *T. guianensis* foram secas previamente em temperatura ambiente, sendo em seguida moídas em liquidificador. As flores trituradas foram devidamente pesadas, obtendo-se uma massa de 344,04 g. Posteriormente as flores trituradas foram submetidas a processo de maceração com metanol (MeOH) por quatro vezes consecutivas, com cerca de 48 horas para cada extração. O material vegetal extraído foi concentrado sob pressão reduzida, originando o extrato metanólico bruto das flores. O extrato metanólico bruto foi dissolvido em uma solução contendo MeOH/H<sub>2</sub>O (6/4) e particionado com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, originando as fases diclorometânica e hidrometanólica. A fase diclorometânica foi previamente concentrada em rotoevaporador, e em seguida foi devidamente pesada. A fase hidrometanólica foi concentrada sob pressão reduzida para eliminar o metanol, restando apenas a fase aquosa. Em seguida a fase aquosa foi particionada com AcOEt, originando a fase acetato de etila. Por sua vez, a fase aquosa foi particionada com butanol resultando na fase butanólica das flores de *T. guianensis*. O procedimento experimental de obtenção das fases orgânicas encontra-se ilustrado na Figura 36. As massas das fases orgânicas obtidas estão ilustradas na Tabela 2.

**Figura 36** – Procedimento experimental empregado no preparo do extrato e das fases orgânicas das flores de *T. guianensis*



**Tabela 2** – Massas das fases orgânicas obtidas pela partição do extrato metanólico brutos das flores de *T. guianensis*

Fases Orgânicas	Massa (g)
Diclorometânica	6,0
Acetato de etila	2,5
Butanólica	8,5

#### 4.4 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *A. graveolens*

##### 4.4.1 Fracionamento da fase diclorometânica das folhas de *A. graveolens*

A fase diclorometânica das folhas de *A. graveolens* (13,23 g) codificada como **DFAG** foi submetida à cromatografia em coluna (CC), utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel mistura de solventes (Hex/AcOEt e DCM/MeOH) em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 76 frações de aproximadamente 100 mL cada, as quais foram reunidas em 12 frações (Tabela 3) após análise em CCDC, utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e vapores de iodo.

**Tabela 3** – Frações obtidas da CC de **DFAG**

Código	Frações reunidas	Sistema Eluente	Massa (g)
DFAG-1	1-11	Hex/AcOEt (90:10)	0,2483
DFAG-2	12-13	Hex/AcOEt (85:15)	0,0840
DFAG-3	14	Hex/AcOEt (75:25)	0,0855
DFAG-4	15	Hex/AcOEt (60:40)	1,800
DFAG-5	16-40	Hex/AcOEt (50:50)	3,610
DFAG-6	41-44	Hex/AcOEt (50:50)	0,0537
DFAG-7	45-53	DCM/AcOEt (40:60)	0,1539
DFAG-8	54-57	DCM/AcOEt (40:60)	0,202
DFAG-9	58-65	DCM/MeOH (85:15)	0,6135
DFAG-10	66-69	DCM/MeOH (75:25)	1,115
DFAG-11	70-71	DCM/MeOH (50:50)	1,220
DFAG-12	72-76	MeOH (100%)	1,615

A fração **DFAG-4** (1,8 g) mostrou ser mistura de triacilglicerídeos (**AG1**) que foram posteriormente identificados por CG-EM.

As frações **DFAG-2**, **DFAG-3**, **DFAG-5**, **DFAG-10** e **DFAG-11** foram submetidas a procedimentos cromatográficos (cromatografia em coluna), no entanto, esses fracionamentos não resultaram em nenhuma substância pura. As demais frações da fase diclorometânica das folhas de *A. graveolens* Jacq. não foram trabalhadas.

##### 4.4.2. Fracionamento da fase acetato de etila das folhas de *A. graveolens*.

A fase acetato de etila das folhas de *A. graveolens* Jacq. (25,81 g) tendo como código **AFAG** foi submetida à purificação por CC de sílica gel 60, utilizando como fase móvel os solventes hexano e Acetato de etila em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 121

frações de aproximadamente 100 mL cada, as quais foram reunidas em 31 frações (Tabela 4) após análise em CCDC, utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e vapores de iodo.

**Tabela 4** – Frações obtidas da CC de **AFAG**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
AFAG-1	1	Hex/AcOEt (100:0)	0,0059
AFAG-2	2-4	Hex/AcOEt (90:10)	0,0523
AFAG-3	5-8	Hex/AcOEt (90:10)	0,548
AFAG-4	9-11	Hex/AcOEt (90:10)	0,2048
AFAG-5	12-17	Hex/AcOEt (90:10)	0,3783
AFAG-6	18-30	Hex/AcOEt (90:10)	0,2867
AFAG-7	31	Hex/AcOEt (90:10)	0,0273
AFAG-8	32-38	Hex/AcOEt (80:20)	0,1642
AFAG-9	39-40	Hex/AcOEt (80:20)	0,0526
AFAG-10	41-45	Hex/AcOEt (80:20)	0,0877
AFAG-11	46-49	Hex/AcOEt (80:20)	0,0727
AFAG-12	50-52	Hex/AcOEt (80:20)	0,1071
AFAG-13	53-58	Hex/AcOEt (80:20)	0,0625
AFAG-14	59-61	Hex/AcOEt (70:30)	1,0515
AFAG-15	62-63	Hex/AcOEt (70:30)	0,157
AFAG-16	64-66	Hex/AcOEt (60:40)	0,1235
AFAG-17	65-68	Hex/AcOEt (50:50)	0,1192
AFAG-18	69-74	Hex/AcOEt (40:60)	0,3583
AFAG-19	75	Hex/AcOEt (30:70)	1,3210
AFAG-20	76	Hex/AcOEt (0:100)	0,0292
AFAG-21	77-79	Hex/AcOEt (0:100)	1,9015
AFAG-22	80-81	Hex/AcOEt (0:100)	1,0510
AFAG-23	82-87	AcOEt/MeOH (90:10)	1,8815
AFAG-24	88	AcOEt/MeOH (80:20)	0,0093
AFAG-25	89-90	AcOEt/MeOH (80:20)	1,5610
AFAG-26	91	AcOEt/MeOH (80:20)	0,0205
AFAG-27	92-95	AcOEt/MeOH (70:30)	2,5810
AFAG-28	96-103	AcOEt/MeOH (60:40)	3,7915
AFAG-29	104-111	AcOEt/MeOH (50:50)	2,890
AFAG-30	112-116	AcOEt/MeOH (50:50)	1,092
AFAG-31	117-121	MeOH (100%)	0,7524

#### 4.4.2.1 Purificação da fração **AFAG-18**

A fração **AFAG-18** (358,3 mg) foi selecionada para novo fracionamento em CC, utilizando como fase estacionária sílica gel 60, e como fase móvel uma mistura de Hexano/Acetato de etila em grau crescente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas 14



frações de 100 mL cada, que foram agrupadas em 10 subfrações (Tabela 5) após análise em CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e iodo.

**Tabela 5** – Subfrações obtidas da CC de **AFAG-18**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
AFAG-18-A	1	Hex/AcOEt (90:10)	0,0210
AFAG-18-B	2	Hex/AcOEt (85:15)	0,0152
AFAG-18-C	3	Hex/AcOEt (80:20)	0,0321
AFAG-18-D	4	Hex/AcOEt (70:30)	0,0135
AFAG-18-E	5	Hex/AcOEt (60:40)	0,0123
AFAG-18-F	6	Hex/AcOEt (50:50)	0,0015
AFAG-18-G	7-8	Hex/AcOEt (40:60)	0,0782
AFAG-18-H	9	Hex/AcOEt (20:80)	0,0226
AFAG-18-I	10	Hex/AcOEt (0:100)	0,0051
AFAG-18-J	11	Hex/AcOEt (0:100)	0,0210
AFAG-18-L	12-13	MeOH (100%)	0,0251
AFAG-18-M	14	MeOH (100%)	0,0221

A subfração **AFAG-18-G** (78,2 mg) forneceu a substância **AG2**, a qual teve sua estrutura elucidada posteriormente.

#### **4.4.2.2 Purificação da fração AFAG-21**

A fração **AFAG-21** (1,90 g) foi submetida a fracionamento em CC, utilizando como fase estacionária sílica gel 60, e como fase móvel uma mistura de diclorometano/metanol em grau crescente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas 24 frações de 100 mL cada, que foram agrupadas em 15 subfrações (Tabela 6) após análise em CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e iodo.

Da subfração **AFAG-21-F** foi obtido 25 mg da substância **AG3**.

**Tabela 6** – Subfrações obtidas da CC de **AFAG-21**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
AFAG-21-A	1-7	DCM/MeOH (90:10)	0,0086
AFAG-21-B	8	DCM/MeOH (90:10)	0,0053
AFAG-21-C	9	DCM/MeOH (90:10)	0,0183
AFAG-21-D	10	DCM/MeOH (90:10)	0,0219
AFAG-21-E	11	DCM/MeOH (90:10)	0,0176
AFAG-21-F	12	DCM/MeOH (90:10)	0,025
AFAG-21-G	13-14	DCM/MeOH (90:10)	0,1159
AFAG-21-H	15-16	DCM/MeOH (80:20)	0,6927
AFAG-21-I	17-18	DCM/MeOH (80:20)	0,295
AFAG-21-J	19	DCM/MeOH (70:30)	0,0323
AFAG-21-L	20	DCM/MeOH (70:30)	0,0188
AFAG-21-M	21	DCM/MeOH (60:40)	0,0322
AFAG-21-N	22	DCM/MeOH (60:40)	0,0152
AFAG-21-O	23	DCM/MeOH (50:50)	0,0402
AFAG-21-P	24	MeOH (100%)	0,0150

#### 4.4.2.3 Purificação da fração **AFAG-23**

A fração **AFAG-23** (1,88 g) foi submetida a fracionamento em CC, tendo como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel uma mistura de diclorometano/metanol em grau crescente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas 21 frações de 100 mL cada, que foram agrupadas em 11 subfrações (Tabela 7) após análise em CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e o reagente de Lieberman-Burchard.

**Tabela 7** – Subfrações obtidas da CC de **AFAG-23**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
AFAG-23-A	1-5	DCM/MeOH (90:10)	0,0232
AFAG-23-B	6	DCM/MeOH (90:10)	0,0297
AFAG-23-C	7-9	DCM/MeOH (90:10)	0,0745
AFAG-23-D	10	DCM/MeOH (90:10)	0,1001
AFAG-23-E	11-12	DCM/MeOH (80:20)	0,1206
AFAG-23-F	13	DCM/MeOH (80:20)	0,1669
AFAG-23-G	14	DCM/MeOH (80:20)	0,1456
AFAG-23-H	15-17	DCM/MeOH (70:30)	0,3088
AFAG-23-I	18-19	DCM/MeOH (60:40)	0,1533
AFAG-23-L	20	DCM/MeOH (50:50)	0,0693
AFAG-23-M	21	MeOH (100%)	0,1151

A subfração **AFAG-23-B** forneceu 29,7 mg da substância **AG4**.

#### 4.4.3 Fracionamento da fase DCM do caule de *A. graveolens*.

A fase diclorometânica do caule de *A. graveolens* (10,18 g) codificada como **DCAG** foi submetida à purificação por CC, utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel mistura de solventes (hexano/acetato de etila e diclorometano/metanol) em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 74 frações de aproximadamente 100 mL cada, as quais foram reunidas em 36 frações (Tabela 8) após análise em CCDC, utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e vapores de iodo.

A fração **DCAG-3** com massa de 597,4 mg foi identificada como sendo uma mistura de triacilglicerídeos (**AG5**).

**Tabela 8** – Frações obtidas da CC de **DCAG**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
DCAG -1	1	Hex/AcOEt (90:10)	0,0192
DCAG-2	2-3	Hex/AcOEt (85:15)	0,0012
DCAG-3	4-8	Hex/AcOEt (80:20)	0,5974
DCAG-4	9	Hex/AcOEt (80:20)	0,1241
DCAG-5	10-11	Hex/AcOEt (80:20)	0,1195
DCAG-6	12	Hex/AcOEt (80:20)	0,1529
DCAG-7	13	Hex/AcOEt (80:20)	0,2637
DCAG-8	14	Hex/AcOEt (80:20)	0,7182
DCAG-9	15	Hex/AcOEt (80:20)	0,1531
DCAG-10	16	Hex/AcOEt (80:20)	0,0747
DCAG-11	17	Hex/AcOEt (70:30)	0,0012
DCAG-12	18	Hex/AcOEt (70:30)	0,0157
DCAG-13	19-20	Hex/AcOEt (70:30)	0,0264
DCAG-14	21-22	Hex/AcOEt (70:30)	0,0542
DCAG-15	23-24	Hex/AcOEt (70:30)	0,0597
DCAG-16	25-28	Hex/AcOEt (70:30)	0,0731
DCAG-17	29	Hex/AcOEt (70:30)	0,0242
DCAG-18	30-33	Hex/AcOEt (70:30)	0,058
DCAG-19	34-36	Hex/AcOEt (60:40)	0,0304
DCAG-20	37-38	Hex/AcOEt (70:30)	0,1008
DCAG-21	39-40	Hex/AcOEt (50:50)	0,1236
DCAG-22	41	Hex/AcOEt (50:50)	0,0409
DCAG-23	42-45	Hex/AcOEt (50:50)	0,0773
DCAG-24	46-47	Hex/AcOEt (50:50)	0,0493
DCAG-25	48-49	Hex/AcOEt (50:50)	0,0559
DCAG-26	50-51	Hex/AcOEt (50:50)	0,0869
DCAG-27	52-53	DCM/AcOEt (40:60)	0,8552
DCAG-28	54-56	DCM/AcOEt (40:60)	0,1603
DCAG-29	57-62	DCM/MeOH (85:15)	0,4647
DCAG-30	63	DCM/MeOH (85:15)	0,5098
DCAG-31	64-65	DCM/MeOH (85:15)	0,3929
DCAG-32	66-70	DCM/MeOH (70:30)	0,8597
DCAG-33	71	DCM/MeOH (70:30)	0,6783
DCAG-34	72	DCM/MeOH (60:40)	0,4396
DCAG-35	73	DCM/MeOH (50:50)	0,5531
DCAG-36	74	MeOH (100%)	1,0215

#### 4.4.3.1 Purificação da fração DCAG-8

A fração **DCAG-8** com massa de 718,2 mg foi submetida a fracionamento em CC, tendo como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel uma mistura de clorofórmio/metanol em grau crescente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas 14

frações de 100 mL cada, que foram agrupadas em 7 subfrações (Tabela 9) após análise em CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e reagente de Lieberman-Burchard.

**Tabela 9** – Frações obtidas da CC de **DCAG-8**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
<b>DCAG-8-A</b>	1-5	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,0762
<b>DCAG-8-B</b>	6-7	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,1618
<b>DCAG-8-C</b>	8	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,2085
<b>DCAG-8-D</b>	9	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (70:30)	0,0424
<b>DCAG-8-E</b>	10-11	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (60:40)	0,0364
<b>DCAG-8-F</b>	12-13	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (50:50)	0,058
<b>DCAG-8-G</b>	14	MeOH (100%)	0,1591

Após análise por CCDC e revelação com reagente de Lieberman-Burchard, a subfração **DCAG-8-C** mostrou-se pura. Essa subfração forneceu 208,5 mg da substância **AG6**.

#### 4.4.3.2 Purificação da fração **DCAG-27**

A fração **DCAG-27** com massa de 855,2 mg foi submetida a fracionamento em CC, tendo como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel uma mistura de clorofórmio/metanol em grau crescente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas 33 frações de 100 mL cada, que foram reunidas em 10 subfrações (Tabela 10) após análise em CCDC, utilizando-se como reveladas radiação por luz UV (254 e 365 nm) e vapores de iodo.

**Tabela 10** – Subfrações obtidas da CC de **DCAG-27**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
<b>DCAG-27-A</b>	1-7	CHCl <sub>3</sub> (100%)	0,0012
<b>DCAG-27-B</b>	8-13	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (98:2)	0,0152
<b>DCAG-27-C</b>	14-18	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (98:2)	0,0113
<b>DCAG-27-D</b>	19-25	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (95:5)	0,0051
<b>DCAG-27-E</b>	26	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,1335
<b>DCAG-27-F</b>	27	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (80:20)	0,0250
<b>DCAG-27-G</b>	28	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (70:40)	0,4231
<b>DCAG-27-H</b>	29	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (60:40)	0,0331
<b>DCAG-27-I</b>	30-31	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (50:50)	0,0250
<b>DCAG-27-J</b>	32-33	MeOH (100%)	0,0215

A subfração **DCAG-27-E** (133,5 mg) foi submetida a um novo fracionamento em CC, utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20 e como fase móvel MeOH. Esse

procedimento resultou em 13 subfrações de 7 mL cada que foram agrupadas em 7 subfrações após análise de CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm), vapores de iodo e solução de  $\text{FeCl}_3$  (Tabela 11).

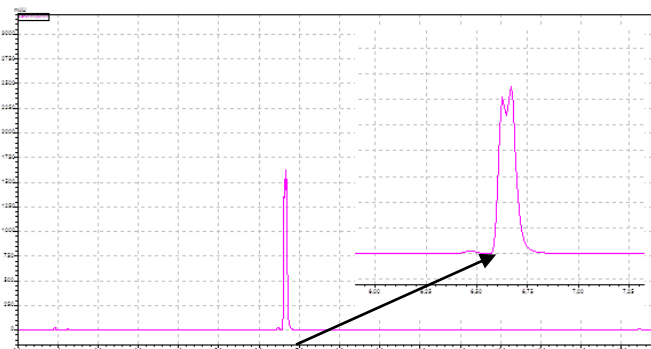
**Tabela 11** – Subfrações obtidas da CC de **DCAG-27-E**

Código	Frações reunidas	Massa (g)
<b>DCAG-27-E-1</b>	1	0,0231
<b>DCAG-27-E-2</b>	2-5	0,0211
<b>DCAG-27-E-3</b>	6	0,0407
<b>DCAG-27-E-4</b>	7	0,0241
<b>DCAG-27-E-5</b>	8	0,0074
<b>DCAG-27-E-6</b>	9-10	0,0013
<b>DCAG-27-E-7</b>	11-12	0,0012

A subfração **DCAG-27-E-4**, após análise por CCDC e revelação com solução de  $\text{FeCl}_3$ , deu indício de ser constituída de uma única substância fenólica, devido a presença de apenas uma mancha de coloração escura na cromatoplaça. No entanto, após análise por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), observou-se a presença de dois picos com tempo de retenção ( $t_R$ ) muito próximo um do outro, conforme pode ser notado no cromatograma (Figura 37), confirmando que a subfração **DCAG-27-E-4** é composta por mistura de duas substâncias de natureza química bastante semelhantes uma da outra. Essa semelhança química pode ser justificada pelo perfil dos espectros no UV/Vis desses dois picos correspondentes a essas duas substâncias, que podem ser observados nas Figuras 38 e 39.

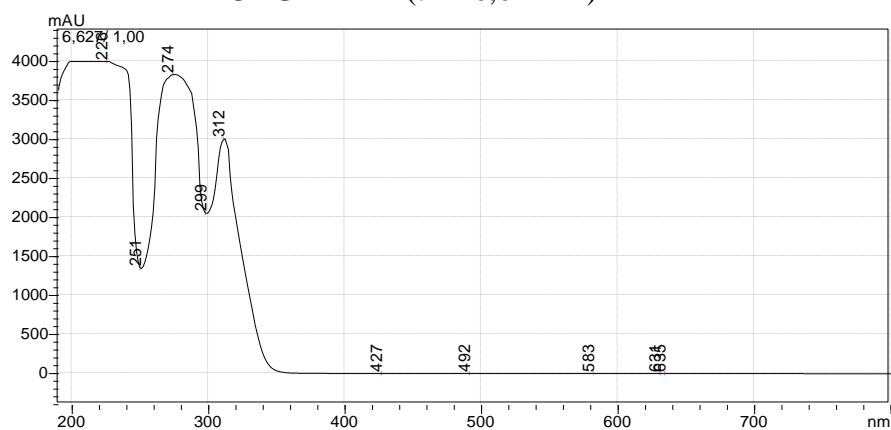
Cabe salientetar que a subfração **DCAG-27-E-4** encontra-se em fase de elucidação estrutural.

**Figura 37** – Cromatograma em  $\lambda = 254$  nm da subfração **DCAG-27-E-4**\*

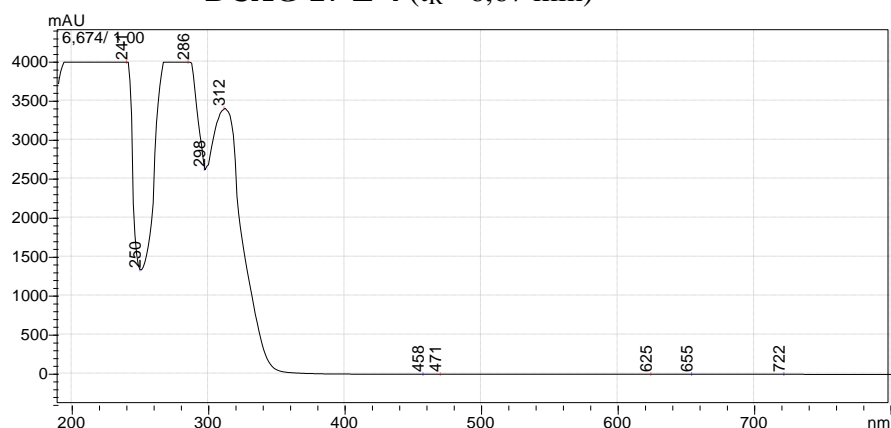


\* Condições cromatográficas ver item 4.1, página 65. Tempos de retenções ( $t_R$ ) dos picos de **DCAG-27-E-4** = 6,62 e 6,67 min.

**Figura 38** – Espectro no UV/VIS, obtido pelo detector SPD-M20A, da subfração **DCAG-27-E-4** ( $t_R = 6,62$  min)



**Figura 39** – Espectro no UV/VIS, obtido pelo detector SPD-M20A, da subfração **DCAG-27-E-4** ( $t_R = 6,67$  min)



#### 4.4.3.3 Purificação da fração **DCAG-31**

A fração **DCAG-31** (392,9 mg) foi submetida a fracionamento em CC, tendo como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel uma mistura de clorofórmio/metanol em grau crescente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas 21 frações de 100 mL cada, que foram agrupadas em 11 subfrações (Tabela 12) após análise em CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm), iodo e reagente de Lieberman-Burchard.

A subfração **DCAG-31-B** forneceu 68,4 mg da substância **AG4**.

**Tabela 12** – Subfrações obtidas da CC de **DCAG-31**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
<b>DCAG-31-A</b>	1-3	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (98:2)	0,0068
<b>DCAG-31-B</b>	4	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (95:5)	0,0684
<b>DCAG-31-C</b>	5-6	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (95:5)	0,0789
<b>DCAG-31-D</b>	7	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (80:20)	0,0025
<b>DCAG-31-E</b>	8-10	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (80:20)	0,0591
<b>DCAG-31-F</b>	11-13	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (70:30)	0,0245
<b>DCAG-31-G</b>	14-15	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (70:30)	0,0087
<b>DCAG-31-H</b>	16-17	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (70:30)	0,0112
<b>DCAG-31-I</b>	18-19	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (60:40)	0,0035
<b>DCAG-31-J</b>	20	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (50:50)	0,0060
<b>DCAG-31-M</b>	21	MeOH (100%)	0,0050

#### 4.4.4 Fracionamento da fase acetato de etila do caule de *A. graveolens*.

A fase acetato de etila do caule de *A. graveolens* (19,65 g) tendo como código **ACAG** foi submetida à CC, utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel mistura de solventes (hexano/acetato de etila) em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 75 frações de aproximadamente 100 mL cada, as quais foram reunidas em 28 frações (Tabela 13) após análise em CCDC, utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e vapores de iodo.

A fração **ACAG-5** (28,4 mg) forneceu a substância a **AG2**.



**Tabela 13** – Frações obtidas da CC de ACAG

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
<b>ACAG-1</b>	1	Hex/AcOEt (60:40)	0,0032
<b>ACAG-2</b>	2-3	Hex/AcOEt (60:40)	0,0263
<b>ACAG-3</b>	4-5	Hex/AcOEt (50:50)	0,0273
<b>ACAG-4</b>	6-8	Hex/AcOEt (40:60)	0,0282
<b>ACAG-5</b>	9	Hex/AcOEt (40:60)	0,0284
<b>ACAG-6</b>	10	Hex/AcOEt (40:60)	0,0294
<b>ACAG-7</b>	11	Hex/AcOEt (40:60)	0,0283
<b>ACAG-8</b>	12	Hex/AcOEt (40:60)	0,0476
<b>ACAG-9</b>	13	Hex/AcOEt (30:70)	0,7628
<b>ACAG-10</b>	14	Hex/AcOEt (30:70)	0,2092
<b>ACAG-11</b>	15-18	Hex/AcOEt (20:80)	1,1401
<b>ACAG-12</b>	19-20	Hex/AcOEt (00:100)	2,4805
<b>ACAG-13</b>	21-23	Hex/AcOEt (00:100)	4,1802
<b>ACAG-14</b>	24	Hex/AcOEt (00:100)	1,0101
<b>ACAG-15</b>	25-26	Hex/AcOEt (00:100)	0,3196
<b>ACAG-16</b>	27-30	Hex/AcOEt (00:100)	0,6392
<b>ACAG-17</b>	31-34	Hex/AcOEt (00:100)	0,4453
<b>ACAG-18</b>	35-36	AcOEt/MeOH (90:10)	2,0305
<b>ACAG-19</b>	37-38	AcOEt/MeOH (90:10)	0,5044
<b>ACAG-20</b>	39-40	AcOEt/MeOH (90:10)	0,3517
<b>ACAG-21</b>	41-45	AcOEt/MeOH (90:10)	0,8995
<b>ACAG-22</b>	46	AcOEt/MeOH (90:10)	0,0312
<b>ACAG-23</b>	47-48	AcOEt/MeOH (90:10)	0,1059
<b>ACAG-24</b>	49-54	AcOEt/MeOH (80:20)	0,2492
<b>ACAG-25</b>	55-61	AcOEt/MeOH (70:30)	0,4369
<b>ACAG-26</b>	62-67	AcOEt/MeOH (60:40)	0,4975
<b>ACAG-27</b>	68-73	AcOEt/MeOH (50:50)	0,3201
<b>ACAG-28</b>	74-75	MeOH (100%)	0,1551

#### 4.4.4.1 Purificação da fração ACAG-9

A fração **ACAG-9** com massa de 762,8 mg foi submetida a fracionamento em CC, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel uma mistura de clorofórmio/metanol em grau crescente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas 17 frações de 100 mL cada, sendo que, após análise em CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e iodo, foram agrupadas em 11 subfrações conforme pode ser visto na Tabela 14.

**Tabela 14** – Subfrações obtidas da CC de **ACAG-9**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
<b>ACAG-9-A</b>	1-4	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,0079
<b>ACAG-9-B</b>	5-7	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,0597
<b>ACAG-9-C</b>	8	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,1093
<b>ACAG-9-D</b>	9	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,1251
<b>ACAG-9-E</b>	10	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (85:15)	0,0584
<b>ACAG-9-F</b>	11	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (85:15)	0,1176
<b>ACAG-9-G</b>	12-13	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (80:20)	0,2199
<b>ACAG-9-H</b>	14	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (70:30)	0,0174
<b>ACAG-9-I</b>	15	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (60:40)	0,0123
<b>ACAG-9-J</b>	16	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (50:50)	0,0133
<b>ACAG-9-L</b>	17	MeOH (100%)	0,0092

A subfração **ACAG-9-D** com massa de 125,1 mg forneceu a substância **AG3**.

#### 4.4.4.2 Purificação da fração **ACAG-11**

A fração **ACAG-11** com massa de 1,14 g foi submetida a fracionamento em CC, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel uma mistura de clorofórmio/metanol em grau crescente de polaridade. Através desse procedimento foram obtidas 22 frações de 100 mL cada, sendo que, após análise em CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e iodo, foram agrupadas em 14 subfrações conforme pode ser visto na Tabela 15.

**Tabela 15** – Subfrações obtidas da CC de **ACAG-11**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
<b>ACAG -11-A</b>	1-5	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (99:1)	0,0076
<b>ACAG -11-B</b>	06	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (95:5)	0,0046
<b>ACAG -11-C</b>	7-8	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,0092
<b>ACAG -11-D</b>	9	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,0365
<b>ACAG -11-E</b>	10	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,0189
<b>ACAG -11-F</b>	11	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,01688
<b>ACAG -11-G</b>	12	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,4966
<b>ACAG -11-H</b>	13	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,0036
<b>ACAG -11-I</b>	14-15	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (80:20)	0,2501
<b>ACAG -11-J</b>	16	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,0123
<b>ACAG -11-L</b>	17-19	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (70:30)	0,0306
<b>ACAG -11-M</b>	20	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (60:40)	0,0037
<b>ACAG -11-N</b>	21	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (50:50)	0,0071
<b>ACAG -11-O</b>	22	MeOH (100%)	0,0025

A subfração **ACAG -11-G** (496,6 mg) foi submetida à purificação em CC, utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel a mistura de solventes (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) em grau crescente de polaridade. Desse procedimento foram obtidas 11 novas subfrações de 100 mL cada, que foram agrupadas em 9 subfrações após análise de CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e vapores de iodo (Tabela 16).

**Tabela 16** – Subfrações obtidas da CC de **ACAG-11-G**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
<b>ACAG -11-G-1</b>	1-2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (95:5)	0,0201
<b>ACAG -11-G-2</b>	3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90:10)	0,0031
<b>ACAG -11-G-3</b>	4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90:10)	0,0669
<b>ACAG -11-G-4</b>	5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90:10)	0,2703
<b>ACAG -11-G-5</b>	6	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90:10)	0,0718
<b>ACAG -11-G-6</b>	7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (70:30)	0,0037
<b>ACAG -11-G-7</b>	8	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (60:40)	0,006
<b>ACAG -11-G-8</b>	9	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (50:50)	0,0154
<b>ACAG -11-G-9</b>	10-11	MeOH (100%)	0,026

A subfração **ACAG-11-G-8** forneceu 15,4 mg da substância **AG7**. A subfração **ACAG-11-G-4** (270,3 mg) foi submetida a um novo fracionamento em CC, utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20 e como fase móvel MeOH, resultando em 15 subfrações de 7 mL cada que foram agrupadas em 9 subfrações após análise de CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e vapores de iodo (Tabela 17).

**Tabela 17** – Subfrações obtidas da CC de **ACAG-11-G-4**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Massa (g)</b>
<b>ACAG-11-G-4-A</b>	1	0,0098
<b>ACAG-11-G-4-B</b>	2-5	0,1892
<b>ACAG-11-G-4-C</b>	6	0,0105
<b>ACAG-11-G-4-D</b>	7	0,0091
<b>ACAG-11-G-4-E</b>	8	0,0089
<b>ACAG-11-G-4-F</b>	9-10	0,0219
<b>ACAG-11-G-4-G</b>	11-12	0,0097
<b>ACAG-11-G-4-H</b>	13-14	0,0050

As subfrações **ACAG-11-G-4-B** (189,2 mg) e **ACAG-11-G-4-F** (21,9 mg) forneceram as substâncias **AG8** e **AG9**, respectivamente.

#### 4.4.4.3 Purificação da fração ACAG-12

A fração **ACAG-12** (2,48 g) foi submetida a purificação por CC, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel uma mistura de clorofórmio/metanol em grau crescente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas 32 frações de 100 mL cada, sendo que, após análise em CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e iodo, foram agrupadas em 17 subfrações conforme pode ser visto na Tabela 18.

**Tabela 18** – Subfrações obtidas da CC de **ACAG-12**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
<b>ACAG -12-A</b>	1-3	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,0543
<b>ACAG -12-B</b>	4-5	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,0632
<b>ACAG -12-C</b>	6-7	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,0918
<b>ACAG -12-D</b>	8	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (85:15)	0,0025
<b>ACAG -12-E</b>	9	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (85:15)	0,0038
<b>ACAG -12-F</b>	10	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (85:15)	0,0458
<b>ACAG -12-G</b>	11	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (85:15)	0,0138
<b>ACAG -12-H</b>	12	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (85:15)	0,0818
<b>ACAG -12-I</b>	13-14	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (80:20)	0,5524
<b>ACAG -12-J</b>	15-18	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90:10)	0,5353
<b>ACAG -12-L</b>	19	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (70:30)	0,0235
<b>ACAG -12-M</b>	20	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (70:30)	0,0105
<b>ACAG -12-N</b>	21-23	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (70:30)	0,0614
<b>ACAG -12-O</b>	24-25	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (70:30)	0,0192
<b>ACAG -12-P</b>	26-29	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (60:40)	0,039
<b>ACAG -12-Q</b>	30-31	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (50:50)	0,0531
<b>ACAG -12-R</b>	32-34	MeOH (100%)	0,0963

A subfração **ACAG-12-J** (535,3 mg) foi submetida a um novo fracionamento em CC, utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel utilizou-se clorofórmio/metanol em grau crescente de polaridade, resultando em 11 subfrações de 100 mL cada que foram agrupadas em 8 subfrações após análise de CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e vapores de iodo (Tabela 19).

**Tabela 19** – Subfrações obtidas da CC de **ACAG-12-J**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
<b>ACAG-12-J-1</b>	1	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (80:20)	0,0025
<b>ACAG-12-J-2</b>	2-3	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (80:20)	0,4459
<b>ACAG-12-J-3</b>	4	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (80:20)	0,0265
<b>ACAG-12-J-4</b>	5	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (80:20)	0,0067
<b>ACAG-12-J-5</b>	6	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (70:30)	0,0052
<b>ACAG-12-J-6</b>	7-8	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (60:40)	0,007
<b>ACAG-12-J-7</b>	9-10	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (50:50)	0,0132
<b>ACAG-12-J-8</b>	11	MeOH (100%)	0,0080

A subfração **ACAG-12-J-2** (445,9 mg) foi submetida a um novo fracionamento em CC, utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20 e como fase móvel MeOH, resultando em 19 subfrações de 7 mL cada que foram agrupadas em 9 subfrações após análise de CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e vapores de iodo (Tabela 20).

Da subfração **ACAG-12-J-2-A** foi obtido 31,3 mg da substância **AG10**.

**Tabela 20** – Subfrações obtidas da CC de **ACAG-12-J-2**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Massa (g)</b>
<b>ACAG-12-J-2-A</b>	1	0,0313
<b>ACAG-12-J-2-B</b>	2	0,0682
<b>ACAG-12-J-2-C</b>	3	0,1259
<b>ACAG-12-J-2-D</b>	4	0,0569
<b>ACAG-12-J-2-E</b>	5	0,0681
<b>ACAG-12-J-2-F</b>	6	0,0411
<b>ACAG-12-J-2-G</b>	7-8	0,0158
<b>ACAG-12-J-2-H</b>	9-11	0,0053
<b>ACAG-12-J-2-I</b>	12-19	0,0085

#### **4.5. Separação e purificação dos constituintes químicos de *T. guianensis*.**

##### **4.5.1. Fracionamento da fase diclorometano das flores de *T. guianensis*.**

A fase diclorometânica das flores de *T. guianensis* (6 g) codificada como **DTG** foi submetida a CC, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel a mistura dos solventes diclorometano e metanol em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 37 frações de aproximadamente 100 mL cada, as quais foram reunidas em 20 frações (Tabela 21) após análise em CCDC, utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e vapores de iodo.

**Tabela 21** – Frações obtidas da CC de **DTG**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
DTG-1	1-2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (100:0)	0,1465
DTG-2	3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (98:2)	0,6455
DTG-3	4-5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (98:2)	0,0871
DTG-4	6-7	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (98:2)	0,0686
DTG-5	8	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (98:2)	0,1156
DTG-6	9	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (98:2)	0,992
DTG-7	10-12	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (95:5)	0,1814
DTG-8	13	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (95:5)	0,1516
DTG-9	14-16	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90:10)	0,4028
DTG-10	17	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (80:20)	0,2194
DTG-11	18	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (80:20)	0,4795
DTG-12	19	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (80:20)	0,0057
DTG-13	20	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (80:20)	0,7187
DTG-14	21	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (80:20)	0,0267
DTG-15	22-23	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (80:20)	0,4801
DTG-16	24-27	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (80:20)	0,3438
DTG-17	28-29	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (70:30)	0,0416
DTG-18	30-32	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (60:40)	0,1447
DTG-19	33-34	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (50:50)	0,0627
DTG-20	35-37	MeOH (100%)	0,1789

As frações **DTG-5**, **DTG-8**, **DTG-11**, **DTG-13** e **DTG-15** foram submetidas a procedimentos cromatográficos (cromatografia em coluna), no entanto, somente o procedimento cromatográfico de **DTG-11** (ver item 4.5.1.1) levou ao isolamento de substância pura. As demais frações da fase diclorometânica das flores de *T. guianensis* não foram trabalhadas.

#### 4.5.1.1 Purificação da fração **DTG-11**

A fração **DTG-11** (479,5 mg) foi submetida a purificação por CC, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel mistura de hexano/acetato de etila em grau crescente de polaridade. Desta coluna foram recolhidas 16 frações de 100 mL cada, sendo que, após análise por CCDC e revelação em UV (254 e 365 nm) e iodo, foram agrupadas em 10 subfrações conforme pode ser visto na Tabela 22.

A subfração **DTG-11-C** forneceu 10 mg da substância **AG11**.

**Tabela 22** – Frações obtidas da CC de **DTG-11**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
<b>DTG-11-A</b>	1	Hex/AcOEt (80:20)	0,0086
<b>DTG-11-B</b>	2-4	Hex/AcOEt (60:40)	0,0249
<b>DTG-11-C</b>	5	Hex/AcOEt (60:40)	0,010
<b>DTG-11-D</b>	6-8	Hex/AcOEt (60:40)	0,0233
<b>DTG-11-E</b>	9	Hex/AcOEt (50:50)	0,0035
<b>DTG-11-F</b>	10	Hex/AcOEt (40:60)	0,0546
<b>DTG-11-G</b>	11	Hex/AcOEt (0:100)	0,0151
<b>DTG-11-H</b>	12-13	AcOEt/MeOH (80:20)	0,0198
<b>DTG-11-I</b>	14	AcOEt/MeOH (50:50)	0,0325
<b>DTG-11-J</b>	15-16	MeOH (100%)	0,0206

#### 4.5.2 Fracionamento da fase acetato de etila das flores de *T. guianensis*.

A fase acetato de etila das flores de *T. guianensis* Aubl. (2,5 g) codificada como **ATG** foi submetida a CC, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel a mistura dos solventes diclorometano e metanol em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 44 frações de aproximadamente 100 mL cada, as quais foram reunidas em 16 frações (Tabela 23) após análise em CCDC, utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e vapores de iodo.

**Tabela 23** – Frações obtidas da CC de **ATG**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Sistema Eluente</b>	<b>Massa (g)</b>
ATG-1	1-4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (100:0)	0,0188
ATG-2	5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (95:5)	0,0329
ATG-3	6	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90:10)	0,0856
ATG-4	7-8	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90:10)	0,0906
ATG-5	9-11	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90:10)	0,0968
ATG-6	12	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90:10)	0,0648
ATG-7	13	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90:10)	0,2039
ATG-8	14	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90:10)	0,0783
ATG-9	15	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90:10)	0,0529
ATG-10	16	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90:10)	0,0414
ATG-11	17-20	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90:10)	0,1322
ATG-12	21-22	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (80:20)	0,0865
ATG-13	23-26	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (70:30)	0,2879
ATG-14	27-37	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (60:40)	0,3972
ATG-15	38-40	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (50:50)	0,0761
ATG-16	41-44	MeOH (100%)	0,1166

A fração **ATG-4** com massa de 90,6 mg após monitoramento por CCDC mostrou-se pura. Após análise por RMN de  $^1\text{H}$  dessa fração verificou-se tratar da mesma substância (**TG1**) que foi isolada da subfração **DTG-11-C** (10 mg) da fase diclorometano das flores de *T. guianensis*.

As frações **ATG-5**, **ATG-7** e **ATG-11** foram submetidas a procedimentos cromatográficos (cromatografia em coluna), no entanto, somente o procedimento cromatográfico de **ATG-7** (ver item 4.5.2.1) levou ao isolamento de substâncias puras. As demais frações da fase acetato de etila das flores de *T. guianensis* não foram trabalhadas.

#### 4.5.2.1 Purificação da fração ATG-7

A fração **ATG-7** (203,9 mg) foi submetida a um novo fracionamento em CC, utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20 e como fase móvel MeOH, resultando em 17 subfrações de 7 mL cada, que foram agrupadas em 8 subfrações após análise de CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e vapores de iodo (Tabela 24).

**Tabela 24** – Frações obtidas da CC de **ACAG-11-G-4**

<b>Código</b>	<b>Frações reunidas</b>	<b>Massa (g)</b>
<b>ATG-7-A</b>	1-4	0,0489
<b>ATG-7-B</b>	5-6	0,0181
<b>ATG-7-C</b>	7	0,0179
<b>ATG-7-D</b>	8	0,0201
<b>ATG-7-E</b>	9	0,0306
<b>ATG-7-F</b>	10	0,0250
<b>ATG-7-G</b>	11-13	0,0153
<b>ATG-7-H</b>	14-17	0,0160

As subfrações **ATG-7-D** (20,1 mg) e **ATG-7-F** (25,0 mg) forneceram as substâncias codificadas como **AG10** e **AG7**, respectivamente.

#### 4.6 Obtenção e análise dos óleos essenciais das flores das espécies *T. guianensis* e *S. mombin*

As flores das espécies *T. guianensis* e *S. mombin* depois de coletadas foram cuidadosamente separadas, divididas em três amostras para cada espécie, sendo que, cada amostra continha aproximadamente 300 g (Tabela 25) de material vegetal (flores), visando a



extração em triplicata. Em seguida essas amostras contendo o material vegetal foram acondicionados sob refrigeração (-20°C) antes do processo de extração.

**Tabela 25** – Massas das amostras contendo o material vegetal (flores) das espécies *T. guianensis* e *S. mombin* para extração em triplicata

Massas do material vegetal (flores) de <i>T. guianensis</i>		Massas do material vegetal (flores) de <i>S. mombin</i>	
Amostra 1	300,01 g	Amostra 1	300,00 g
Amostra 2	300,85 g	Amostra 2	300,04 g
Amostra 3	300,05 g	Amostra 3	300,90 g

Os óleos essenciais presentes nas três amostras das flores de cada espécie foram obtidos por hidrodestilação, utilizando uma aparelhagem tipo Clevenger adaptada, por um período de 3 (três) horas para cada extração. Devido à diferença de densidade, os óleos foram separados da água, secos com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e armazenados em frascos selados, sob baixa temperatura antes de serem analisados.

Os rendimentos dos óleos extraídos foram calculados a partir da massa do óleo fresco extraído e a massa das flores de cada amostra antes da extração, aplicando a expressão a seguir.

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do óleo extraído}/\text{massa das flores antes da extração}) \times 100$$

Os óleos obtidos de cada espécie foram analisados em triplicata por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM), utilizando aparelho QP2010SE (GC2010 Plus) da marca Shimadzu usando coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25 µm) e hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 250 °C, temperatura inicial da coluna de 60 °C por 3 min, aumentando de 60 °C a 240 °C na razão de 3 °C/min. A temperatura final permaneceu em 240 °C por 3 minutos. A temperatura do detector foi de 250 °C e a temperatura na interface do sistema CG-EM foi de 250 °C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas entre o intervalo de 35 a 500 Da.

As análises dos óleos essenciais extraídos das flores das espécies *T. guianensis* e *S. mombin* iniciou-se pela injeção em triplicata desses óleos no CG-EM. Posteriormente, injetou-se uma mistura padrão de hidrocarbonetos lineares (C9-C24) da

marca Sigma-Aldrich em triplicata no CG-EM para posterior identificação das substâncias, a partir do cálculo do índice de retenção (IR), sob as mesmas condições de análise que foram utilizados nas análises dos óleos essenciais. Em seguida, foram encontrados os tempos de retenção dos picos observados nos cromatogramas obtidos das análises dos óleos essenciais das duas espécies. Obteve-se a média dos tempos das replicatas, e aplicou-se a equação de Vandendool e Kratz (VANDENDOOL & KRATZ, 1963) para calcular o índice de retenção (IR) para cada substância detectada.

A equação de Vandendool e Kratz considera o tempo de retenção de cada substância, e os tempos de retenção e os números de carbono dos hidrocarbonetos injetados no CG, como demonstrado na equação a seguir:

$$IR = 100.N. (t_x - t_{n-1}) / (t_n - t_{n-1}) + 100. C_{n-1}$$

Onde:

IR = índice de retenção

$N = C_n - C_{n-1}$

$C_n$  = número de carbonos do hidrocarboneto que elui após a substância analisada

$C_{n-1}$  = número de carbonos do hidrocarboneto que elui antes da substância analisada

$t_x$  = tempo de retenção da substância analisada

$t_n$  = tempo de retenção do hidrocarboneto que elui após a substância analisada

$t_{n-1}$  = tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes da substância analisada

Sendo assim, através desses cálculos, determinou-se o índice de retenção (IR) para cada pico. Cabe salientar que cada substância foi identificada com base na comparação do seu índice de retenção (IR) com os disponíveis na literatura (ADAMS, 1995), seguida pela comparação do fragmentograma de padrões das massas relatados na literatura (ADAMS, 1995), bem como pela comparação direta das sugestões dos espectros de massas disponíveis no banco de dados do aparelho (WILEY 229), contemplando apenas as similaridades entre os fragmentogramas.

## 4.7 Reações de derivatização

### 4.7.1 Reação de transesterificação

As frações DFAG-4 (**AG1**) e DCAG-3 (**AG5**) foram submetidas a reação de transesterificação utilizando-se metóxido de sódio metanólico ( $\text{NaOCH}_3/\text{metanol}$ ), seguida de trifluoreto de boro metanólico ( $\text{BF}_3/\text{metanol}$ ), de acordo a metodologia adaptada de Christie et al. (2001). O protocolo detalhado dessa reação é mostrado a seguir:

Foi pesado 75 mg de cada amostra em um tubo de vidro apropriado para reação, sendo em seguida adicionado a este tubo de reação 4,5 mL da solução de metóxido de sódio (0,5 M) em metanol. A mistura reacional foi mantida sobre agitação em banho maria ( $100^\circ\text{C}$ ) por 15 minutos. Após esse período, foi adicionado 7,2 mL da solução de  $\text{BF}_3/\text{MeOH}$  (10% de  $\text{BF}_3$  em metanol) ao meio reacional, sendo novamente mantido sobre agitação em banho maria ( $100^\circ\text{C}$ ) por 45 minutos. Em seguida foi adicionado 10 mL de solução saturada de  $\text{NaCl}$  à mistura, seguida de agitação. A mistura foi transferida para um funil de separação para separação da fase orgânica da fase aquosa, utilizando hexano (3 x 5mL). Após a fase orgânica ser separada, está foi filtrada em sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e, o hexano foi evaporado em rotaevaporador. Os produtos obtidos, ou seja, as frações DFAG-4 (**AG1**) e DCAG-3 (**AG5**) transesterificadas foram submetidas a análise por CG-EM.

## 4.8 Testes de Atividade Biológica

### 4.8.1 Avaliação da atividade antioxidante - Teste do sequestro do radical livre DPPH

A determinação da atividade antioxidante (AA) foi medida em função da atividade de sequestro do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH $\cdot$ ). Neste método, avalia-se a habilidade da amostra testada de sequestrar o radical livre estável DPPH $\cdot$  (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e está baseado no descoramento de uma solução composta pelo radical estável, de cor violeta, quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). De acordo com a metodologia de Sousa et al. (2007) com pequenas adaptações, o ensaio do DPPH $\cdot$  foi realizado com as fases orgânicas, sendo preparada uma solução metanólica de DPPH $\cdot$  (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e soluções com as fases orgânicas (entre 20 a 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em MeOH. As medidas das absorvâncias das misturas reacionais (300  $\mu\text{L}$  da solução das fases ou do padrão ou de metanol, para o controle, e 2,7 mL da solução

estoque de DPPH•), foram realizadas a 515 nm, imediatamente e após 30 minutos de incubação da reação à temperatura ambiente, protegida de luz, em espectrofotômetro. Neste ensaio, utilizou-se ácido gálico e a quercetina como padrões, nas mesmas concentrações das fases. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

O percentual de sequestro do radical livre DPPH• (%SRL), foi calculado como:

$$\% \text{ SRL} = [(A_C - A_A) / A_C] \times 100$$

Onde:

$A_C$  é a absorvância final do controle

$A_A$  é a absorvância da amostra no tempo final.

Os valores obtidos foram plotados em um gráfico de percentual de sequestro do radical livre DPPH• (%SRL) *versus* concentração da amostra.

#### **4.8.2 Teste de letalidade frente a *Artemia Salina* Leach**

O teste de letalidade utilizado foi adaptado da metodologia descrita por David et al. (2001). Os ovos de *Artemia salina* (Miramar®) e o sal marinho (Ocean Water - Alcon) foram adquiridos em comércio local. Os ovos de *A. salina* foram eclodidos em um aquário retangular, utilizando-se água do mar artificial preparada de acordo com as especificações do fabricante, dissolvendo-se 3,83 g do sal por litro de solução. 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 ovos 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 crustáceos para este local, após a eclosão. Os ovos foram incubados por 48 horas em temperatura ambiente.

As amostras das fases orgânicas das espécies *A. graveolens* e *T. guianensis* foram preparadas a partir de uma solução estoque de 1000 µg/mL, preparada pela dissolução de 30 mg das fases em 30 mL de solução salina artificial com 2 gotas de Tween 80 e 3 gotas de DMSO, para auxiliar na solubilização das fases, com esse objetivo também foram utilizados ultrassom e agitação em Vórtex. A partir da solução estoque foram obtidas, por diluições, soluções das fases orgânicas nas concentrações de 400, 300, 200, 150, 100 e 50 µg/mL. O

preparo do controle negativo seguiu a mesma metodologia do preparo da solução mais concentrada (400 µg/mL), sem a presença de qualquer uma das fases orgânicas.

Após 48 horas de incubação, 10 crustáceos foram transferidos, com um auxílio de uma pipeta Pasteur, para frascos tipo "snap" contendo 5 mL das soluções das fases nas concentrações previamente determinadas ou da solução controle. Essas amostras foram mantidas sob iluminação à temperatura ambiente por 24 horas e, após esse período, o número de *nauplios* sobreviventes foram determinados com auxílio de uma lupa. A larva foi considerada morta caso não exibisse movimentos durante 10 segundos de observação. Todos os experimentos, inclusive os de controle foram realizados em triplicata.

Os resultados obtidos foram processados e os valores de DL<sub>50</sub> apresentando 95% de confiança, foram calculados usando o método de probit de análise, através do *programa Polo-PC (LeOra Software, 1987)*.

#### **4.8.3 Avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase**

A quantificação da atividade inibidora da acetilcolinesterase das fases orgânicas da espécie *A. graveolens* e das substâncias puras foi realizada usando leitor de microplaca de 96 poços, baseado no método de Ellman et al. (1961) e Atta-ur-Rahman et al. (2001).

As soluções das fases orgânicas foram preparadas pesando 5 mg de cada fase e dissolvendo em 5 mL de metanol grau HPLC com agitação em Vórtex, obtendo uma concentração de 1 mg/mL. Para as substâncias puras foram preparadas soluções com concentração de 500 µmol L<sup>-1</sup>, e como controle positivo a eserina ((-)-fisiostigmina) na mesma concentração das substâncias puras.

Para a realização do teste, foram adicionados nos poços das microplacas, em triplicata, 140 µL de tampão fosfato (0,1 M) pH 7,5 com 0,1% de albumina sérica bovina, 20 µL da amostra, do padrão ou metanol, no caso do branco, e 20 µL da enzima acetilcolinesterase (AChE) 0,5 U/mL. Após 15 minutos de incubação à 37°C, foi adicionado 10 µL de ácido 5-5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) 10mM, 10 µL de iodeto de acetiltiocolina (ACTI) 15 mM, sendo, em seguida, realizada a leitura em 405 nm no tempo 0 e de 10 em 10 minutos até os 60 minutos. O percentual de inibição foi obtido através da equação:

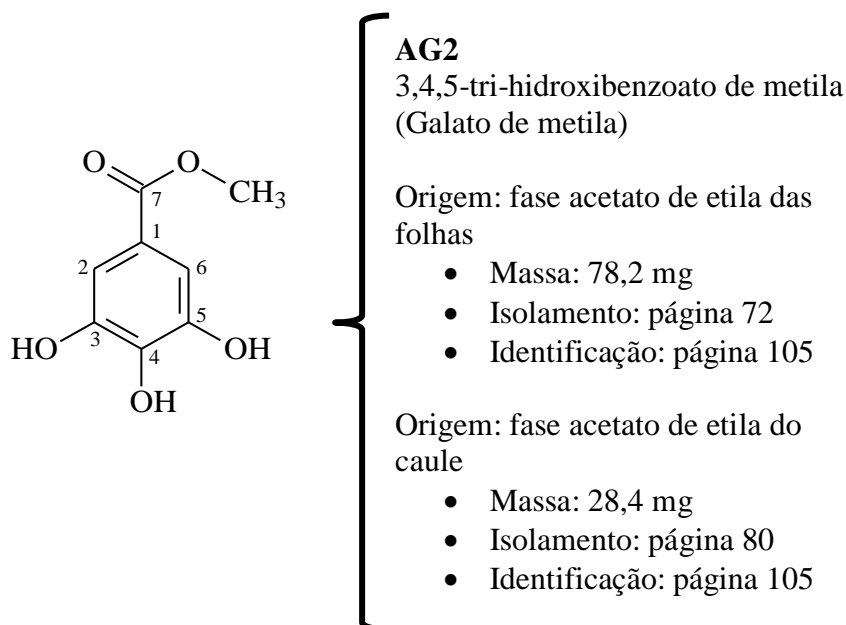
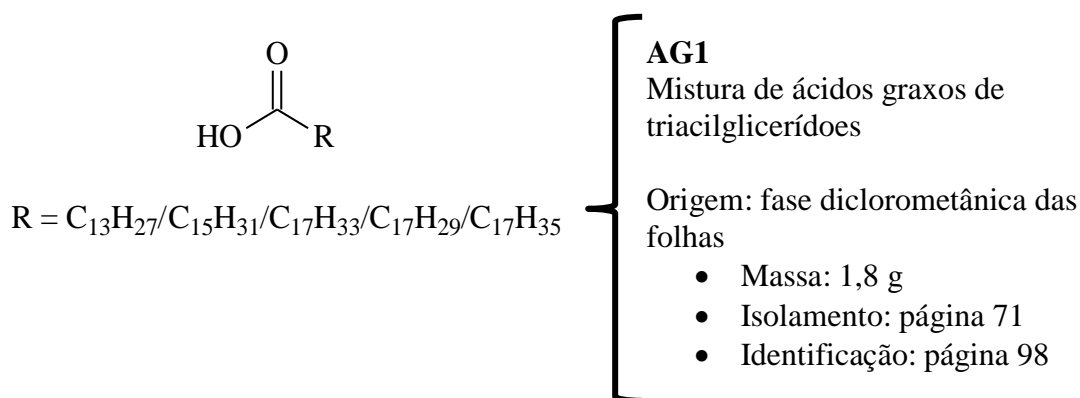
$$\% I = \frac{(AChE - AChI) \times 100}{AChE}$$

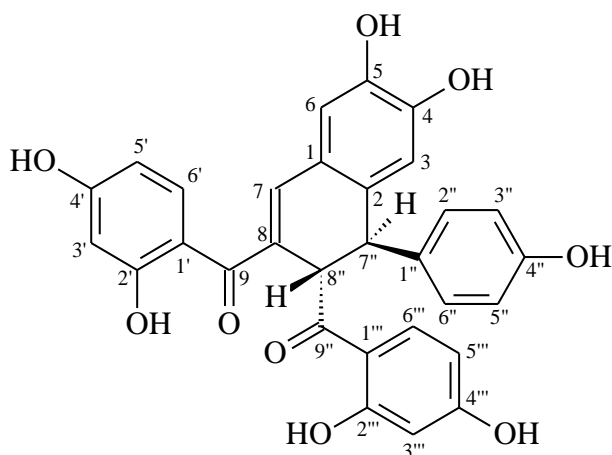
Onde AChI representa a atividade obtida na presença do inibidor e AChE na ausência do inibidor.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1.1 Substâncias isoladas e identificadas de *A. graveolens*

O estudo fitoquímico das folhas e dos caules da espécie *A. graveolens* possibilitou o isolamento e identificação das substâncias descritas a seguir:



**AG3**

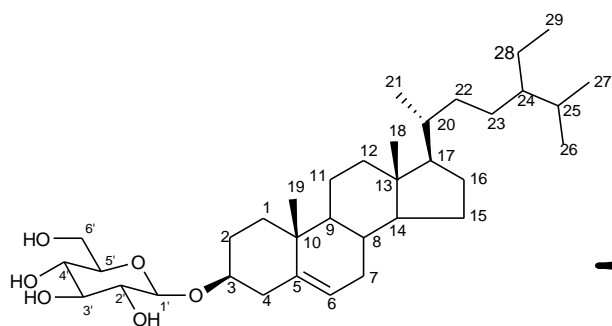
(7''\*R, 8''\*S) 2',4,4',5-tetra-hidrochalcona-(2→7'',8→8'')-2''',4''',4'''-tri-hidroxi-7'',8''-di-hidrochalcona

Origem: fase acetato de etila das folhas

- Massa: 25 mg
- Isolamento: página 73
- Identificação: página 109

Origem: fase acetato de etila do caule

- Massa: 125,1 mg
- Isolamento: página 82
- Identificação: página 109

**AG4**

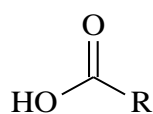
3β-O-β-glicopiranosilsterol (Daucosterol)

Origem: fase acetato de etila das folhas

- Massa: 29,7 mg
- Isolamento: página 74
- Identificação: página 127

Origem: fase diclorometânica do caule

- Massa: 68,4 mg
- Isolamento: página 79
- Identificação: página 127



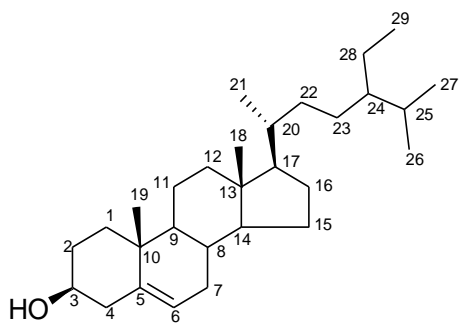
R = C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>/C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>/C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>/C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>/C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>/C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>

**AG5**

Mistura de ácidos graxos de triacilglicerídeos

Origem: fase diclorometânica do caule

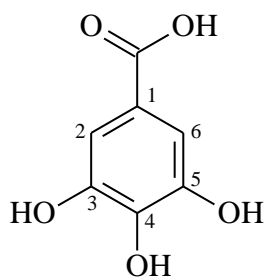
- Massa: 597,4 mg
- Isolamento: página 75
- Identificação: página 130



**AG6**  
β-sitosterol

Origem: fase diclorometânica do caule

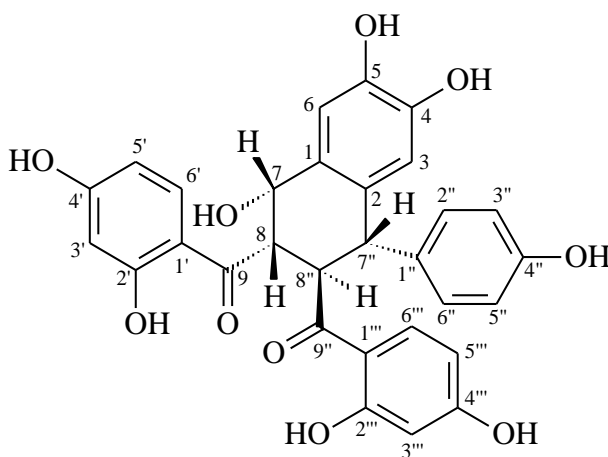
- Massa: 208,5 mg
- Isolamento: página 76
- Identificação: página 137



**AG7**  
Ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico  
(Ácido gálico)

Origem: fase acetato de etila do caule

- Massa: 15,4 mg
- Isolamento: página 82
- Identificação: página 140

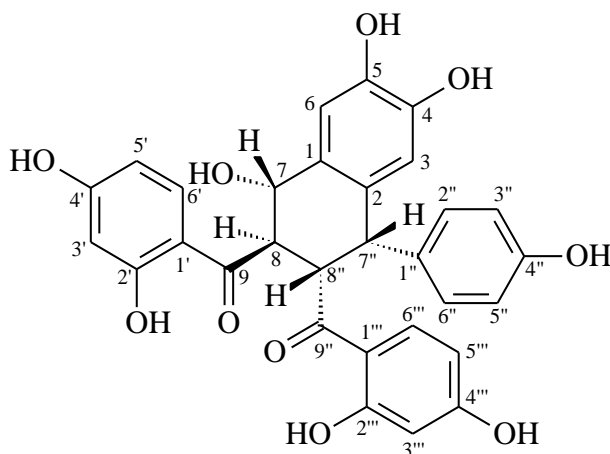


**AG8**  
(7\*S,8\*S,7''\*S,8''\*R)-2',4,4',5,7-penta-hidroxi-7,8-di-hidrochalcona-(2→7'',8→8'')-2''',4'',4'''-tri-hidroxi-7'',8''-di-hidrochalcona

Origem: fase acetato de etila do caule

- Massa: 189,2 mg
- Isolamento: página 83
- Identificação: página 144

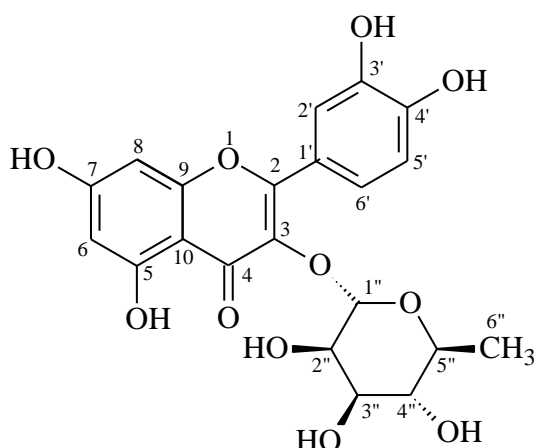


**AG9**

(7\*S,8\*R,7''\*S,8''\*S)-2',4,4',5,7-penta-hidroxi-7,8-di-hidrochalcona-(2→7'',8→8'')-2''',4'',4'''-tri-hidroxi-7'',8''-di-hidrochalcona

Origem: fase acetato de etila do caule

- Massa: 21,9 mg
- Isolamento: página 83
- Identificação: página 163

**AG10**

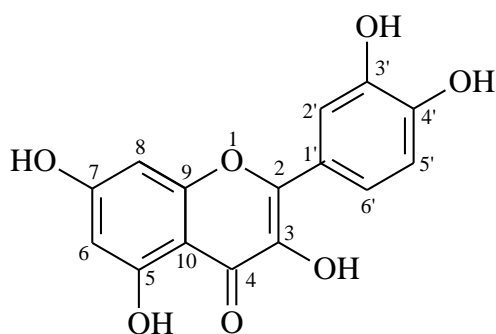
3-O-α-ramnopiranosil-5,7,3',4'-tetra-hidroxi-flavona (quercitrina)

Origem: fase acetato de etila do caule

- Massa: 31,3 mg
- Isolamento: página 84
- Identificação: página 179

### 5.1.2 Substâncias isoladas e identificadas das flores *T. guianensis*

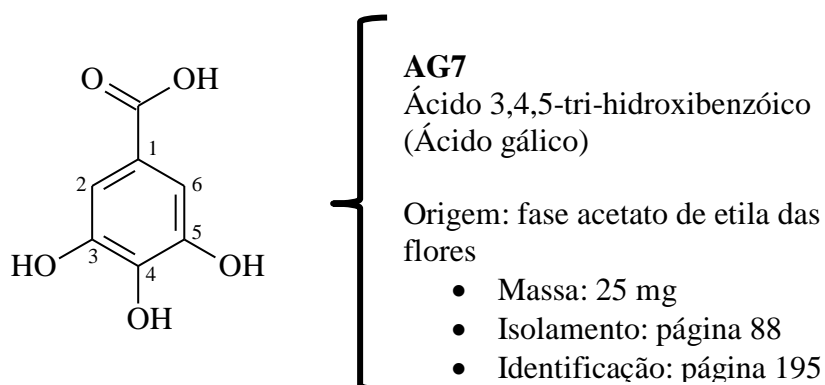
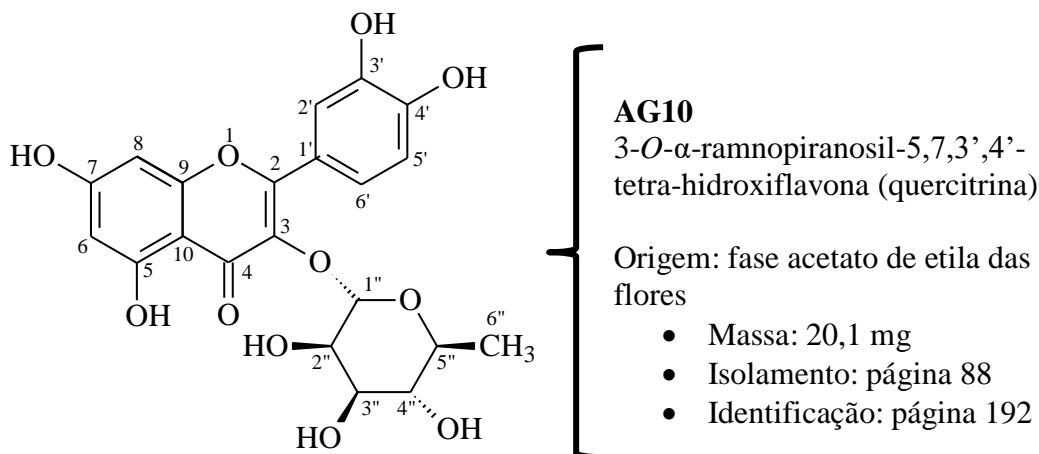
O estudo fitoquímico das flores da espécie *T. guianensis* possibilitou o isolamento e a identificação das substâncias descritas a seguir:

**AG11**

3,3',4',5,7 – penta-hidroxi-flavona (quercetina)

Origem: fase diclorometânica das flores

- Massa: 10 mg
- Isolamento: página 86
- Identificação: página 186

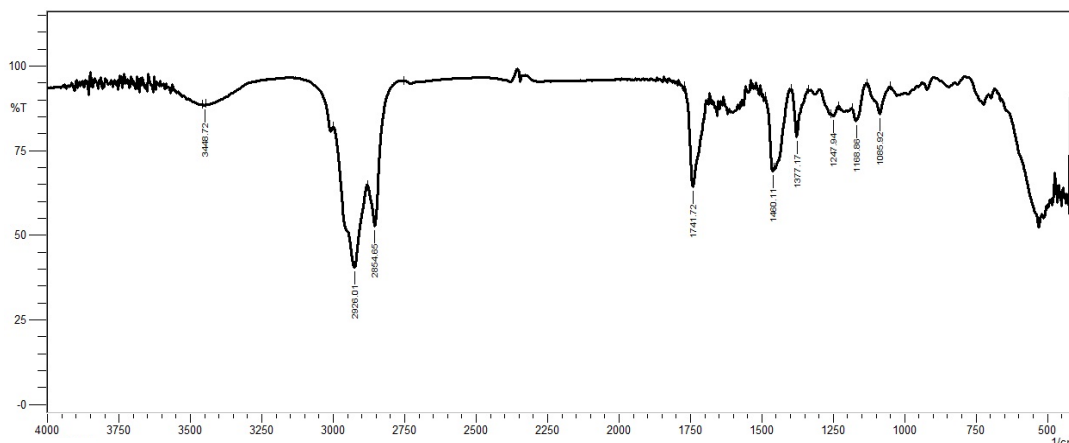


### 5.1.3 Identificação e determinação estrutural das substâncias isoladas de *A. graveolens*

#### 5.1.3.1 Identificação dos ácidos graxos que compõem os triacilglicerídeos presentes em AG1

A mistura de triacilglicerídeos (**AG1**) foi obtida da fração **DFAG-4** (1,8 g) das folhas de *A. graveolens*, conforme procedimento descrito no item 4.4.1, página 71. A mistura de triacilglicerídeos (**AG1**) apresentou-se na forma de óleo de coloração esverdeada. O espectro na região do infravermelho (IV) (Figura 40) de **AG1** apresentou banda de absorção em 1741  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento da ligação C=O do grupo carbonila de éster, banda de absorção em 3030  $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento C $\text{sp}^2$ -H e bandas de absorção em 2926 e 2854  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas aos estiramentos das ligações C $\text{sp}^3$ -H. Além disso, foram observadas bandas de absorção em 1480 e 1377  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas as deformações angulares das ligações C-H.

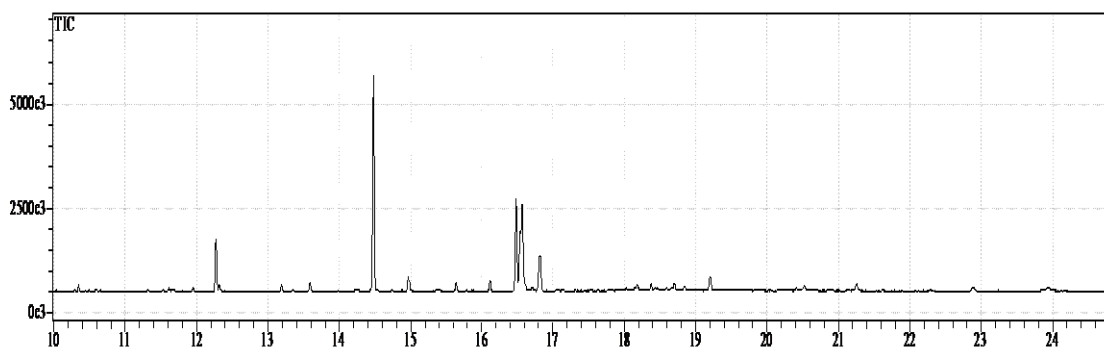
**Figura 40** - Espectro na região do infravermelho (IV) de **AG1**\*



\* Espectro obtido em filme de clorofórmio

Diante da possibilidade de **AG1** tratar-se de mistura de triacilglicerídeos, em virtude das bandas características apresentadas no espectro de IV (Figura 40), essa mistura foi submetida a análise por CG-EM. Entretanto, antes de **AG1** ser submetida a análise por CG-EM, está foi submetida à reação de transesterificação, visando obtenção de ésteres alquílicos de ácidos graxos. O protocolo utilizado nessa reação está registrado no item 4.7.1, da página 91.

Após derivatização de **AG1** por meio da reação de transesterificação e obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos correspondentes, estes foram analisados por CG-EM. No cromatograma (Figura 41) foram registrados cinco picos majoritários com diferentes tempos de retenção, e cada um deles originou um espectro de massas cujos respectivos íons moleculares principais em  $m/z$  242,  $m/z$  270,  $m/z$  294,  $m/z$  292 e  $m/z$  298 correspondem ao tetradecanoato de metila (miristato de metila), hexadecanoato de metila (palmitato de metila), 9,12-octadecadienoato de metila (linoleato de metila), 9, 12, 15-octadecatrienoato de metila (linolenato de metila) e ao octadecanoato de metila (esterato de metila), respectivamente (Tabela 26).

**Figura 41 - Cromatograma (CG-EM) de AG1 transesterificada\***

\* Condições cromatográficas ver item 4.1, página 65

**Tabela 26 – Ésteres metílicos identificados de AG1 transesterificada**

N° C: N° C=C	t <sub>R</sub> (min.)*	Relação massa/carga (m/z)	% Área	Ésteres Metílicos
C15:0	12,275	242	8,10	Miristato de metila
C17:0	14,480	270	41,48	Palmitato de metila
C19:2	16,475	294	16,37	Linoleato de metila
C19:3	16,565	292	22,62	Linolenato de metila
C19:0	16,810	298	11,42	Esterato de metila

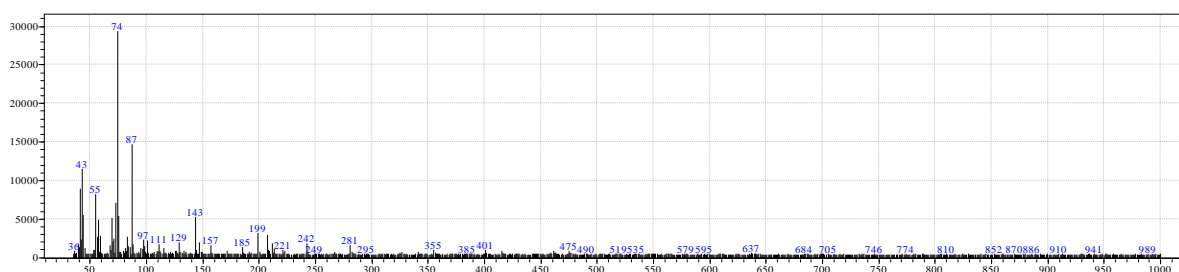
\*t<sub>R</sub> = Tempo de Retenção

A análise dos espectros de massas (Figuras 42, 43 e 44) das substâncias tetradecanoato de metila (miristato de metila), hexadecanoato de metila (palmitato de metila) e octadecanoato de metila (esterato de metila) evidenciaram a presença de um pico de alta intensidade correspondente a  $m/z$  74 (pico base), sendo atribuído ao rearranjo de McLafferty, conforme pode ser visto no Esquema 2. Foram também observados nesses três espectros de massas (Figuras 42, 43 e 44), a presença de alguns picos entre os picos  $m/z$  74 e o pico de íon molecular, correspondentes à série homóloga:  $[\text{CH}_2=(\text{CH}_2)_m\text{COHOCH}_3]^+$ .

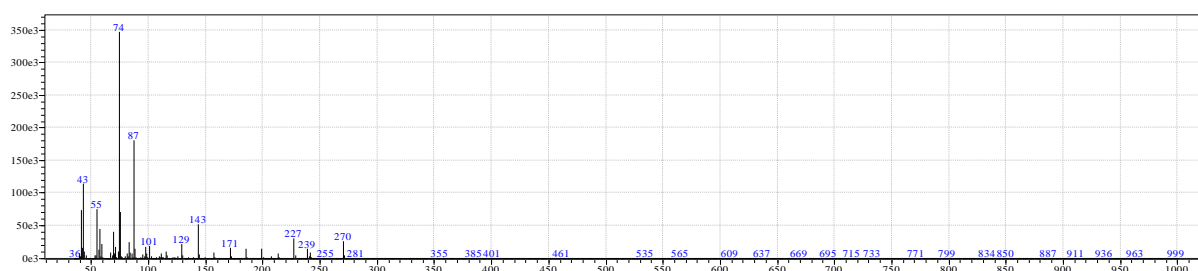
De acordo com Spiteller et. al. (1966 apud GIESE, 2005), os íons responsáveis por essa série homóloga:  $[\text{CH}_2=(\text{CH}_2)_m\text{COHOCH}_3]^+$ , são formados a partir de um rearranjo intermediário mostrado no Esquema 3, que é resultante da transferência do hidrogênio do carbono da posição 5 para o oxigênio carbonílico, sendo que o mesmo pode acontecer com o hidrogênio do carbono da posição 6. Dentre os picos de íons que representam essa série homóloga  $[\text{CH}_2=(\text{CH}_2)_m\text{COHOCH}_3]^+$  que foram exibidos nos espectros de massas (Figuras 42, 43 e 44) destacam-se os íons em  $m/z$  87 e  $m/z$  143. Como pode ser visto no Esquema 4, a transferência do hidrogênio do carbono da posição 2 (C2) para o carbono da posição 6 (C6),

seguido da quebra da ligação entre C3-C4, fornece o fragmento  $m/z$  87. A quebra homolítica da ligação entre C7-C8 dá origem ao pico  $m/z$  143, como pode ser verificado no Esquema 5. Além disso, os espectros de massas (Figuras 42, 43 e 44) também mostraram a presença dos picos em  $m/z$  43 e 57 que são correspondentes às fragmentações da porção alquila desses ésteres. Esses dados aliados à presença do pico do íon molecular e do pico  $[M-31]^+$ , que é referente a perda do grupo metoxila, corroboraram para a identificação desses três ésteres metílicos de cadeias alquílicas saturadas. A comparação desses espectros de massas (Figuras 42, 43 e 44) com espectros de massas existentes no banco de dados do aparelho (WILEY 229) apresentou um grau de similaridade acima de 90%, o que ratificou a identificação desses três ésteres metílicos de cadeia alquila saturada.

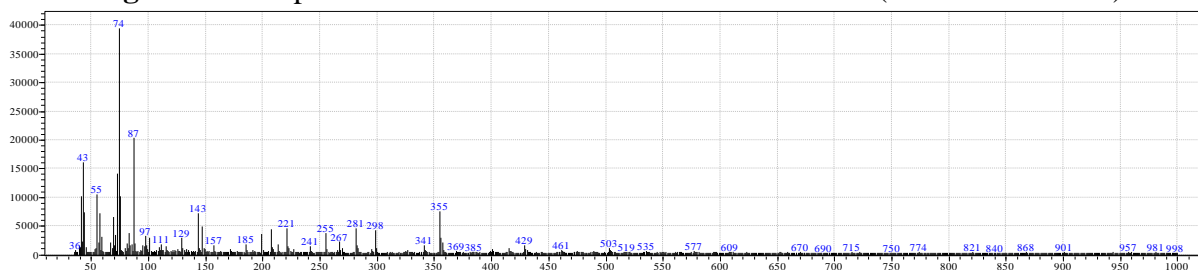
**Figura 42 -** Espectro de massas do tetradecanoato de metila (miristato de metila)

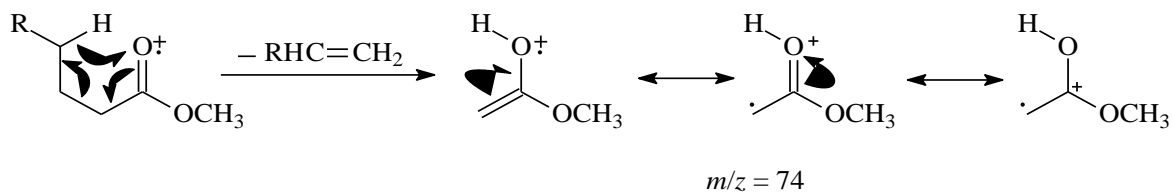
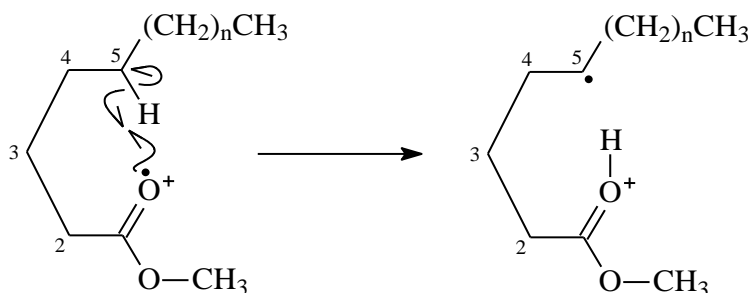
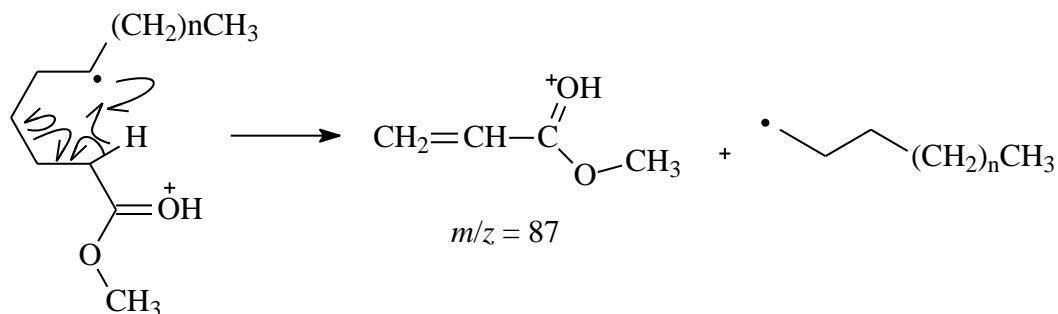
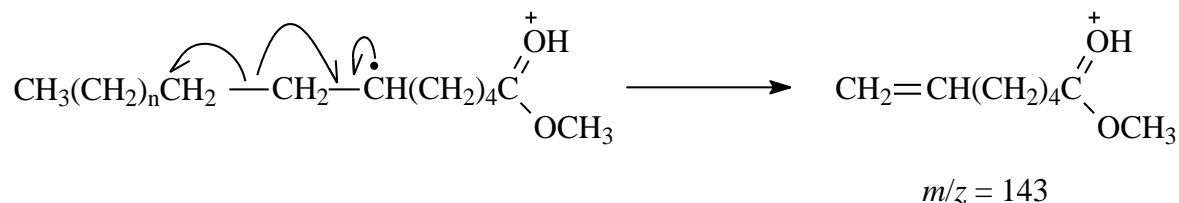


**Figura 43 -** Espectro de massas do hexadecanoato de metila (palmitato de metila)



**Figura 44 -** Espectro de massas do octadecanoato de metila (esterato de metila)



**Esquema 2 -** Formação do fragmento  $m/z$  74 (rearranjo de McLafferty)**Esquema 3 -** Estado intermediário proposto por SPITELLER et. al. (1966)**Esquema 4 -** Formação do fragmento  $m/z$  87**Esquema 5 -** Formação do fragmento  $m/z$  143

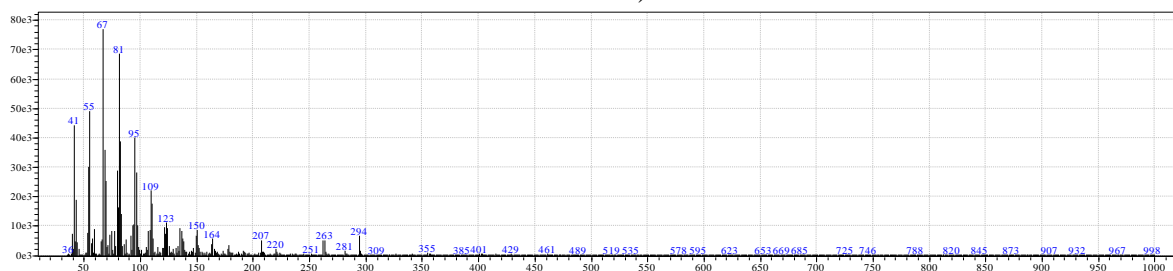
Os espectros de massas (Figuras 45 e 46) das substâncias 9,12-octadecadienoato de metila (linoleato de metila) e 9, 12, 15-octadecatrienoato de metila (linolenato de metila) apresentaram perfis muito semelhantes, com picos intensos e característicos na região de menor massa. No entanto, através da observação de alguns fragmentos característicos nesses espectros, bem como, a diferença nos valores dos picos dos íons moleculares foi possível

distinguir o espectro do éster di-insaturado do espectro do éster tri-insaturado. De acordo com MJOS (2004) os ésteres metílicos di-insaturados apresentam picos de íons correspondentes à série homóloga com fórmula  $[C_nH_{2n-3}]^+$ , e geralmente o íon  $m/z$  67 ( $n = 5$ ) é o pico base no espectro. Por outro lado, a série homóloga com fórmula  $[C_nH_{2n-5}]^+$  é dominante em ésteres metílicos poli-insaturados com três ou mais ligações duplas e, geralmente o íon  $m/z$  79 ( $n = 6$ ) é o pico base.

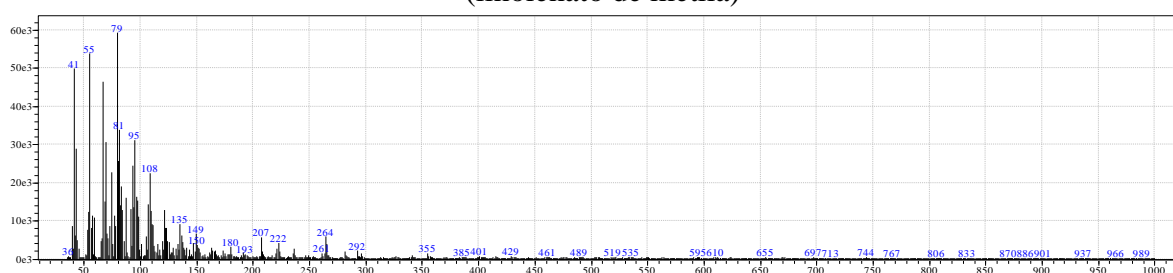
No espectro de massa (Figura 45) do 9,12-octadecadienoato de metila (linoleato de metila) foi observado a presença do pico base em  $m/z$  67 juntamente com os picos em  $m/z$  81,  $m/z$  95 e  $m/z$  123 atribuíveis a fragmentos hidrocarbônicos de fórmula  $[C_nH_{2n-3}]^+$  resultantes de clivagens alilílica. Além disso, foi observado o pico do íon molecular em  $m/z$  294 e o pico  $[M-31]^+$  em  $m/z$  263, referente a perda do grupo metoxila. Cabe salientar que a análise do espectro de massas (Figura 45) não forneceu evidências de íons que pudessem elucidar as posições das duas insaturações presentes no linoleato de metila. Essa ausência de informação a respeito das posições das insaturações na cadeia carbônica já era esperado, visto que, sabe-se que a ligação dupla em uma cadeia longa de um éster ao ser deslocalizada com o impacto de elétrons, impede que a espectrometria de massas possa fornecer informações quanto a posição original da insaturação. Apesar disso, a estrutura do *cis,cis*-9,12-octadecadienoato de metila (linoleato de metila) foi confirmada após comparação de seu espectro de massas com o espectro do *cis,cis*-9,12-octadecadienoato de metila (linoleato de metila) presente na biblioteca de espectros (WILEY 229) do aparelho, que apresentou similaridade de 96%.

O espectro de massa (Figura 46) da substância 9, 12, 15-octadecatrienoato de metila (linolenato de metila) apresentou o pico base em  $m/z$  79 juntamente com os picos em  $m/z$  135 e 149 correspondentes a fragmentos hidrocarbônicos de fórmula  $[C_nH_{2n-5}]^+$  resultantes de clivagens alilílica. Os picos intensos em  $m/z$  41, 55, 81 e 95 foram atribuídos a fragmentação sucessiva da ligação C-C da porção alquila desse éster. Além disso, foi observado nesse espectro a presença do pico do íon molecular em  $m/z$  292 e o pico  $[M-31]^+$  em  $m/z$  261, referente a perda do grupo metoxila. Cabe salientar que a análise desses espectros não forneceu evidências de íons que pudessem elucidar as posições das três ligações duplas presentes no linolenato de metila. A estrutura do *cis,cis,cis*-9, 12, 15-octadecatrienoato de metila (linolenato de metila) foi confirmada após comparação de seu espectro de massa com o espectro de massa do *cis,cis,cis*-9, 12, 15-octadecatrienoato de metila presente na biblioteca de espectros (WILEY 229) do aparelho, que apresentou similaridade de 89%.

**Figura 45** - Espectro de massas do *cis,cis*-9,12-octadecadienoato de metila (linoleato de metila)



**Figura 46** - Espectro de massas do *cis,cis,cis*-9, 12, 15-octadecatrienoato de metila (linolenato de metila)

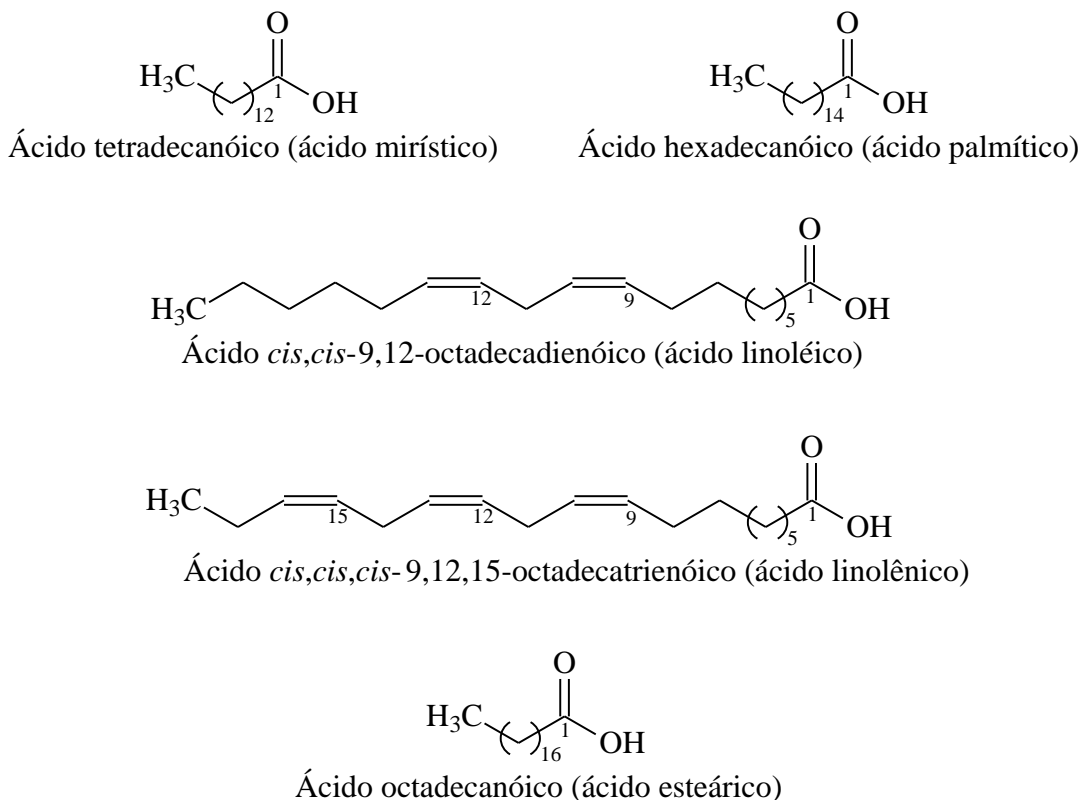


Estes resultados permitem sugerir que os ésteres metílicos presentes em **AG1** encontram-se esterificados com os seguintes ácidos graxos: ácido mirístico (ácido tetradecanóico), ácido palmítico (ácido hexadecanóico), ácido linoléico (ácido 9, 12-octadecadienóico), ácido  $\alpha$ -linolênico (ácido *cis,cis,cis*-9,12,15-octadecatrienóico) e ácido esteárico (ácido octadecanóico) (Figura 47).

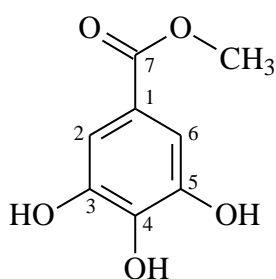
Sendo assim, admite-se que os principais ácidos graxos que compõem a mistura de triacilglicerídeos presentes em **AG1** são o ácido mirístico (ácido tetradecanóico), ácido palmítico (ácido hexadecanóico), ácido linoléico (ácido 9, 12-octadecadienóico), ácido  $\alpha$ -linolênico (ácido *cis,cis,cis*-9,12,15-octadecatrienóico) e ácido esteárico (ácido octadecanóico) (Figura 47).



**Figura 47** - Estruturas dos ácidos graxos que compõem os triacilglicerídeos presentes em **AG1**



### 5.1.3.2 Elucidação estrutural da substância **AG2**

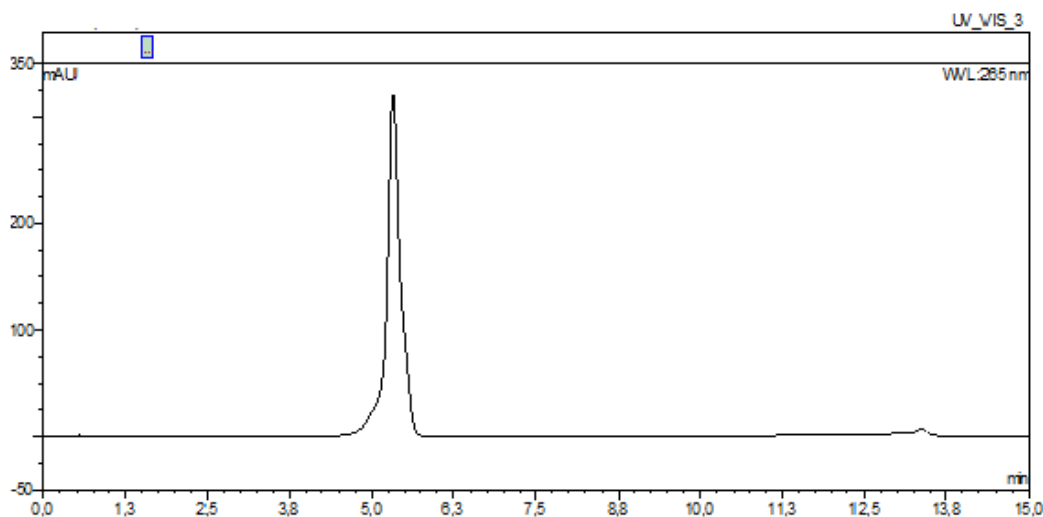


**AG2 (galato de metila)**

A substância codificada como **AG2** foi isolada das fases acetato de etila das folhas e dos caules de *A. graveolens* [obtida da fração AFAG-18-G (78,2 mg), conforme mencionado no item 4.4.2.1 página 72 e da fração ACAG-5 (28,4 mg), conforme mencionado no item 4.4.4, página 80]. A substância **AG2** apresentou-se como um sólido branco, solúvel nos solventes acetona e metanol. A análise por CCDC, revelada com solução de  $\text{FeCl}_3$ , sugeriu tratar-se de uma substância fenólica devido à coloração escura na cromatoplaca.

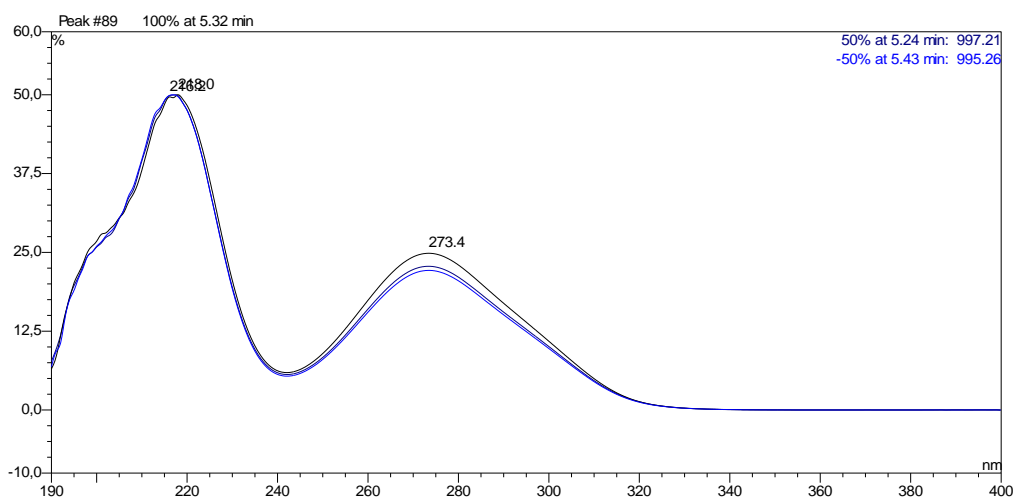
Após análise por CLAE-DAD, observou-se a presença de um único pico no cromatograma (Figura 48), confirmando que a fração AFAG-18-G era composta por uma única substância. O espectro no UV/Vis do pico (Figura 49) revelou  $\lambda_{\text{máx}}$  em 248 e 273 nm, sugerindo tratar-se realmente de uma substância fenólica.

**Figura 48** – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em  $\lambda = 265$  nm da substância **AG2**\*



\* Condições cromatográficas ver item 4.1, página 65, tempo de eluição de **AG2** = 5,32 min.

**Figura 49** – Espectro no UV, obtido pelo detector DAD, da substância **AG2**



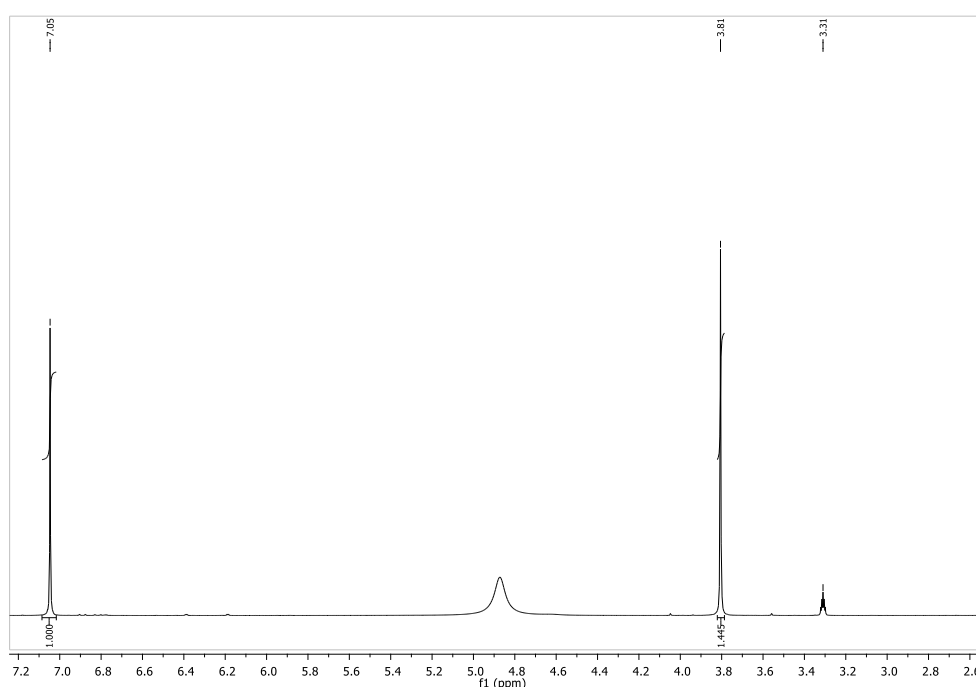
A proposta estrutural para a substância **AG2**, foi obtida pelo conjunto de informações fornecido por RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135°, comparados com dados da literatura.

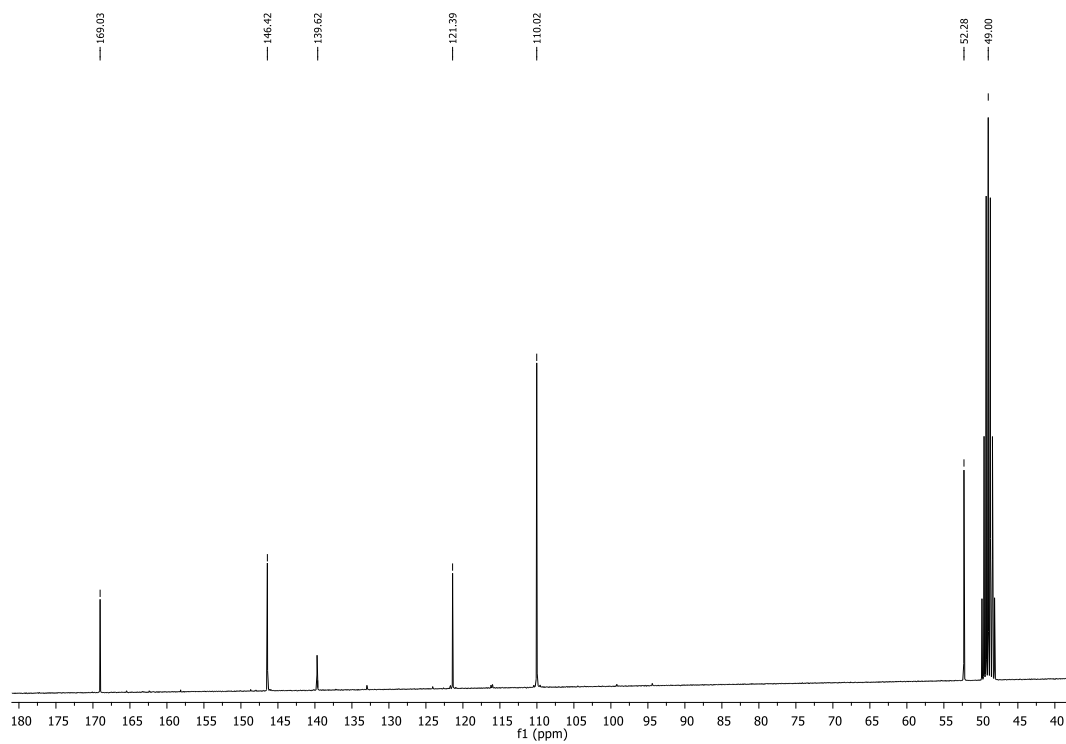
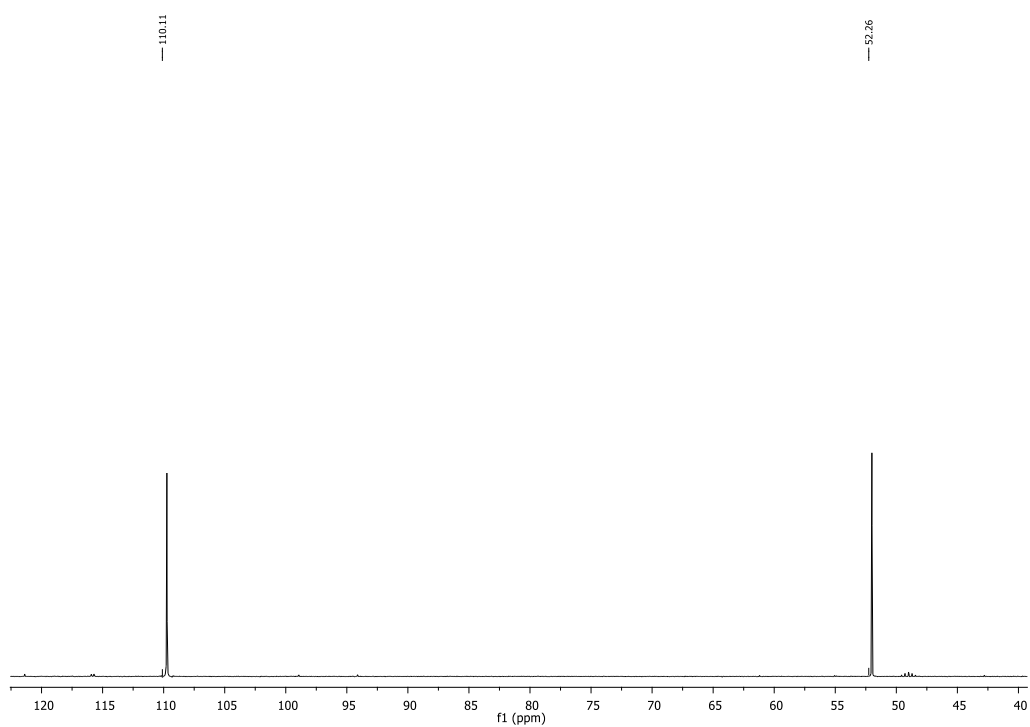
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **AG2** (Figura 50) apresentou um singleto em  $\delta$  7,05 (2H), característico de hidrogênios ligados a anel aromático (H-2 e H-6), além de um singleto em  $\delta$  3,81 (3H), sinal típico de hidrogênios de grupo metoxila ligado a  $\text{C}_{sp^2}$ .

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **AG2** (Figura 51) pode ser verificado a presença de seis sinais, entre eles um sinal em  $\delta$  169,03 de carbono não hydrogenado, referente ao carbono acila, três sinais de carbonos não hydrogenados, um sinal de carbono metínico, e um sinal de carbono metoxílico. O sinal em  $\delta$  146,42, referente a dois carbonos oxigenados, foi atribuído aos carbonos C-3 e C-5, o sinal em  $\delta$  139,62 foi atribuído ao C-4 e o sinal em  $\delta$  121,39 ao C-1, o sinal em  $\delta$  110,02 (2C) foi atribuído aos carbonos C-2 e C-6 e o  $\delta$  52,28 é compatível com o deslocamento químico de carbono metoxílico de éster. A ausência de sinais de carbonos metílenos pode ser confirmada através da análise do espectro de DEPT 135° (Figura 52).

Através da comparação dos dados espectroscópicos obtidos (espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ ) com os dados descritos na literatura (ALVES, 2007) foi possível confirmar a estrutura da substância **AG2** como sendo o 3,4,5- trihidroxibenzoato de metila, mais conhecido como galato de metila (Tabela 27).

**Figura 50** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **AG2** [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



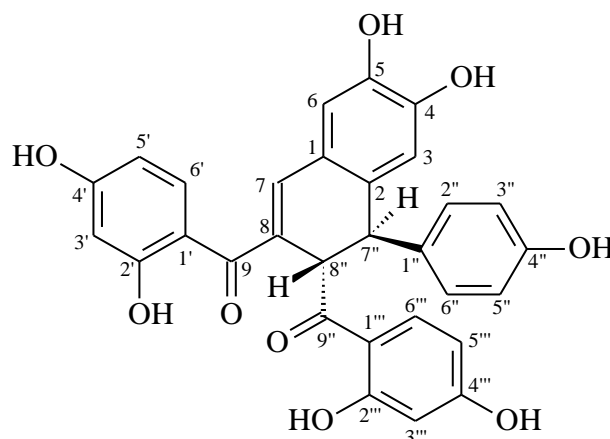
**Figura 51** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **AG2** [75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]**Figura 52** – DEPT 135° da substância **AG2** [75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]

**Tabela 27** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de **AG2** [ $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)] e valores da literatura

Posição	AG2		Galato de Metila*	
	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	121,39	-	121,31
2	7,05 (s)	110,02	7,05 (s)	110,03
3	-	146,42	-	146,34
4	-	139,62	-	139,67
5	-	146,42	-	146,34
6	7,05 (s)	110,02	7,05 (s)	110,03
7	-	169,03	-	169,06
OCH <sub>3</sub>	3,81 (s)	52,28	3,79 (s)	52,39

\*ALVES, 2007.

### 5.1.3.3 Elucidação estrutural da substância AG3

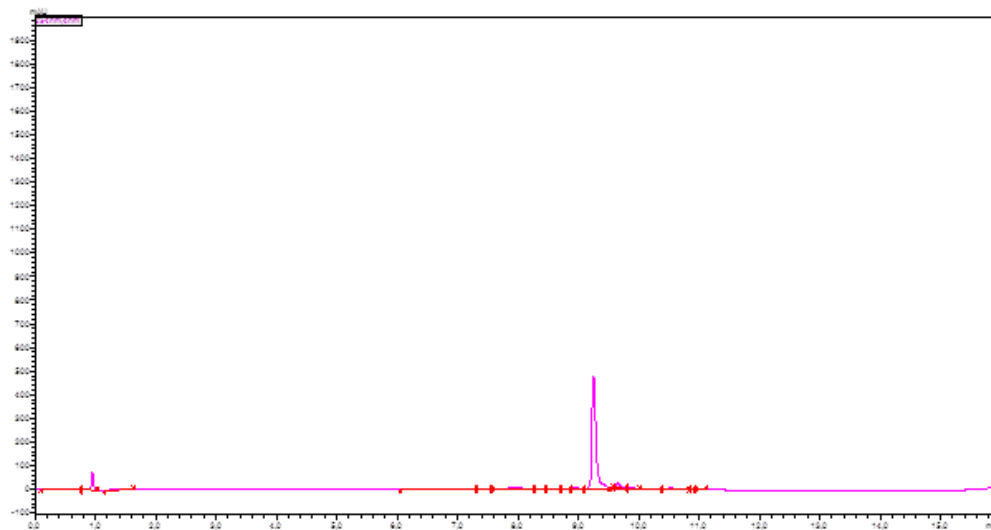


**AG3**

A substância **AG3** foi isolada das fases acetato de etila das folhas e dos caules de *A. graveolens* [obtida da subfração AFAG-21-F (25 mg) conforme item 4.4.2.2, página 73 e da subfração ACAG-9-D (125,1 mg), conforme item 4.4.4.1, página 82]. A substância **AG3** apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em metanol, apresentando uma temperatura de fusão de 198,7-203,4 °C. Após análise por CCDC e revelação com solução de  $\text{FeCl}_3$ , a subfração AFAG-21-F mostrou-se ser constituída de uma substância fenólica devido a coloração azul na cromatoplaça. Após análise por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), observou-se a presença de um único pico no cromatograma (Figura 53),

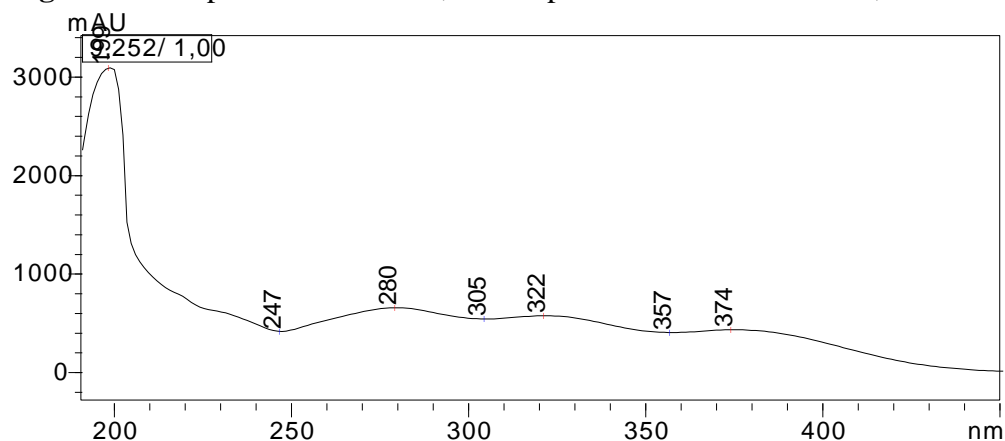
confirmando que a fração AFAG-21-F era composta por uma única substância. O espectro no UV/Vis do pico dessa substância pode ser observado na Figura 54.

**Figura 53** – Cromatograma em  $\lambda = 254$  nm da substância **AG3**\*



\* Condições cromatográficas ver item 4.1, página 65. Tempo de retenção (tR) de **AG3** = 9,42 min.

**Figura 54** – Espectro no UV/VIS, obtido pelo detector SPD-M20A, de **AG3**

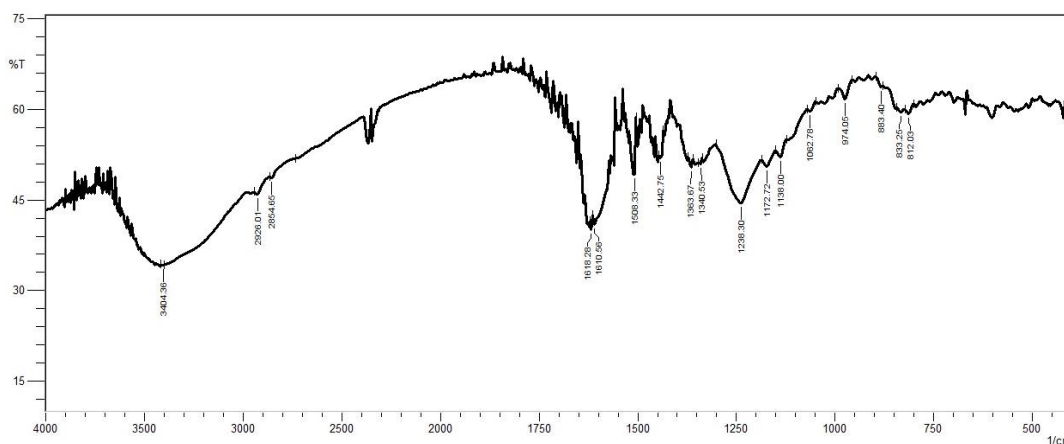


A elucidação estrutural da substância **AG3** foi baseada na análise do conjunto de dados obtidos dos espectros no IV, RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT  $135^\circ$ , HMQC, HMBC e EM de alta resolução e comparação com dados descritos na literatura (BANDEIRA, MATOS e BRAZ-FILHO, 2003; MOREIRA, 2014) (Tabelas 28 e 29).

O espectro no IV da substância **AG3** (Figura 55) mostrou, entre outras, banda larga em  $3404,4\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento da ligação O-H, banda em  $1618,3\text{ cm}^{-1}$  referente a

estiramento axial de ligação C=O conjugada, além de bandas em 1508,3, 1442,8 e 1363,7  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento da ligação C=C.

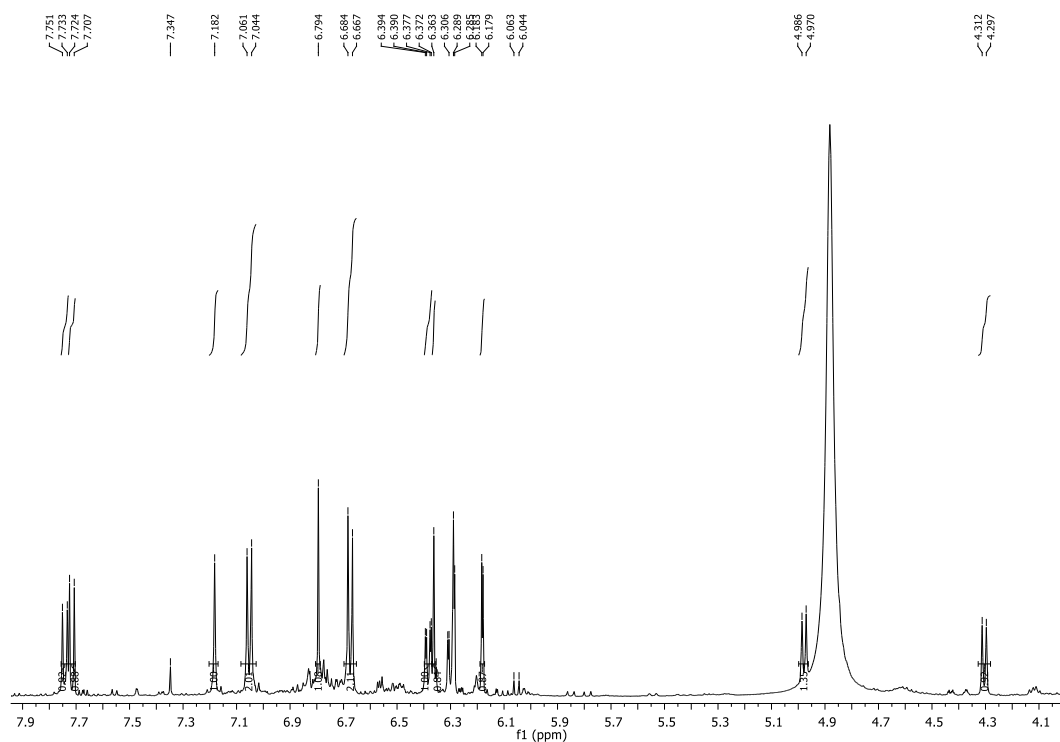
**Figura 55** - Espectro na região do infravermelho (IV) da substância **AG3**\*



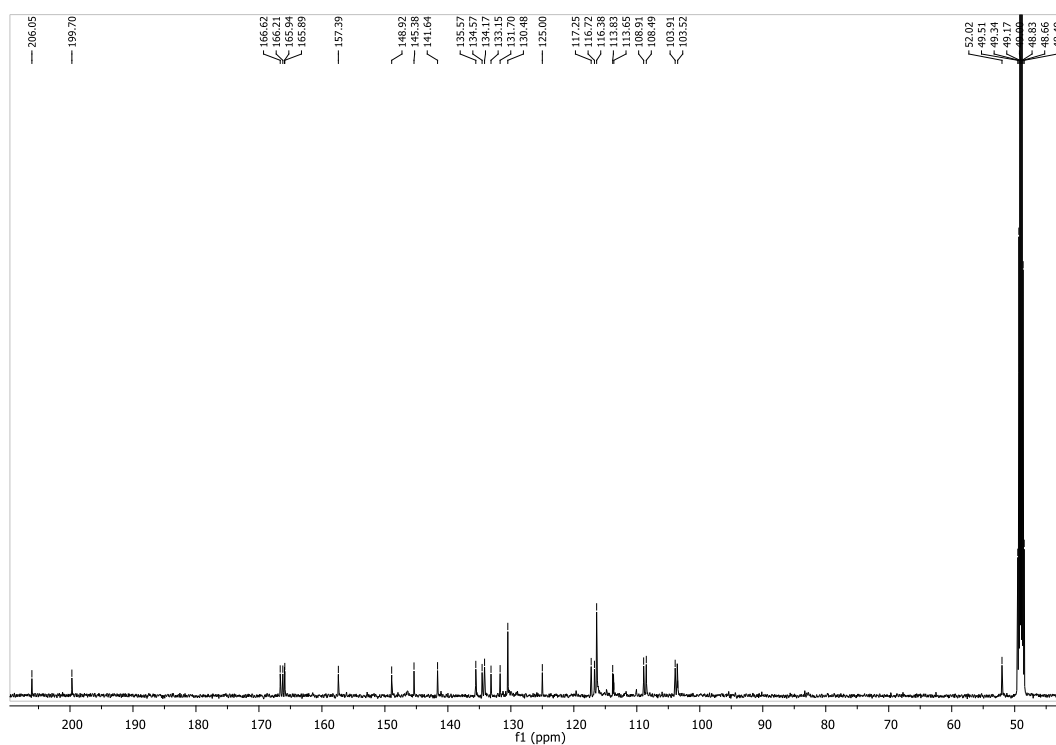
\*Espectro obtido em pastilha de KBr

De modo geral o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 56) da substância **AG3** exibiu sinais na região compreendida entre  $\delta 4,30$  e  $\delta 7,74$ , sendo que, a maior parte dos sinais estava presente entre  $\delta 6,18$  e  $\delta 7,74$ , região de sinais característicos de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **AG3** foram registrados sinais para 30 carbonos, sendo que 15 deles carbonos metínicos e 15 carbonos não-hidrogenados. Dentre os sinais referentes aos carbonos não-hidrogenados, os sinais em  $\delta 199,7$  e  $\delta 206,1$  são característicos de carbonila (Figura 57).

**Figura 56** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **AG3** [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 57** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **AG3** [125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]

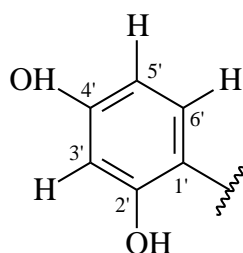


Na análise minuciosa do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **AG3**, pode-se observar na região de hidrogênios ligados a aromáticos, a presença de um duplo dubleto em  $\delta$  6,38 ( $J =$

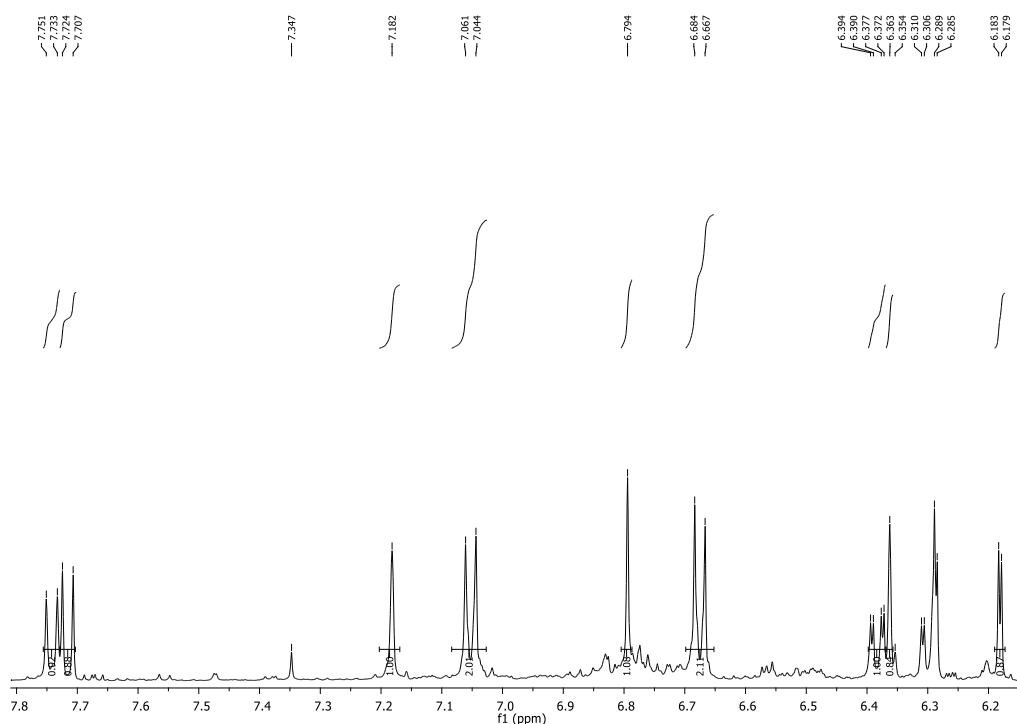


2,0 e 8,5 Hz) e um duplete em  $\delta$  6,18 ( $J = 2,0$  Hz), referentes aos hidrogênios H-5' e H-3'. A constante de acoplamento de 2,0 Hz observada em ambos dupletos indicou o acoplamento *meta* do H-5' com o H-3'. Além disso, observou-se acoplamento em *orto* do H-5' com o hidrogênio H-6' que se apresenta como um duplete em  $\delta$  7,72 ( $J = 8,5$  Hz). Esses sinais permitem caracterizar os hidrogênios do anel A da unidade I do dímero de chalcona (Figura 58). Os picos e multiplicidades referentes a desses acoplamentos podem ser visualizados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ampliado (Figura 59).

**Figura 58** – Estrutura do anel A da unidade I do dímero de chalcona



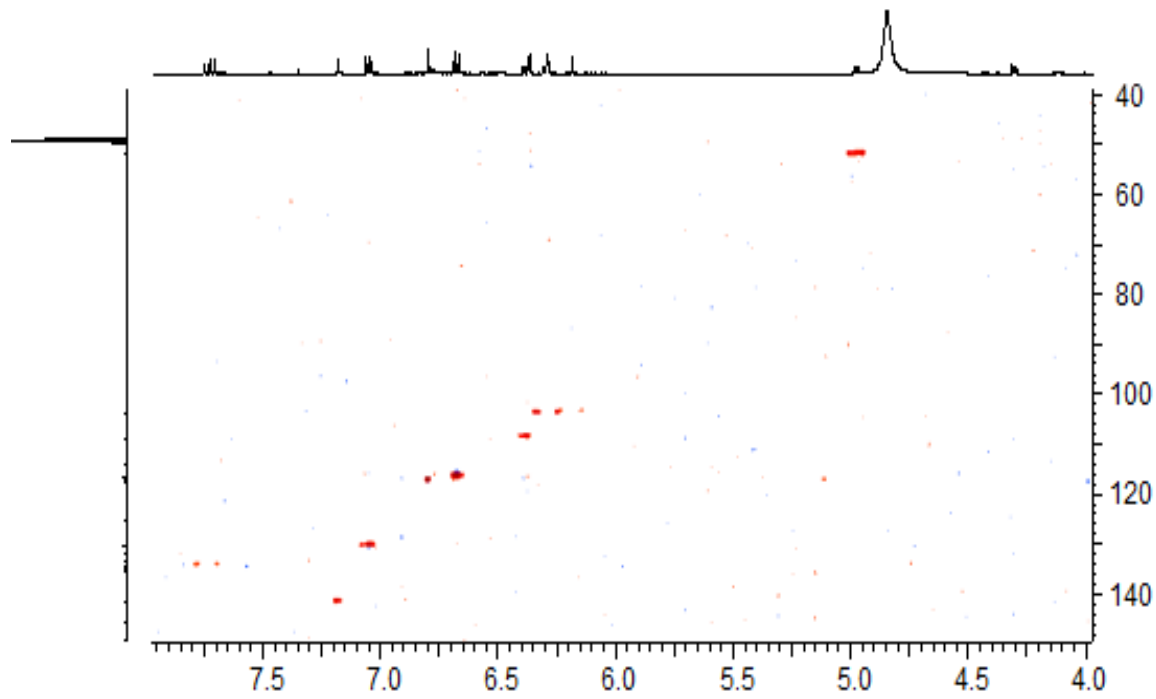
**Figura 59** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ampliado na região entre  $\delta$  6,18 e  $\delta$  7,72 da AG3 [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



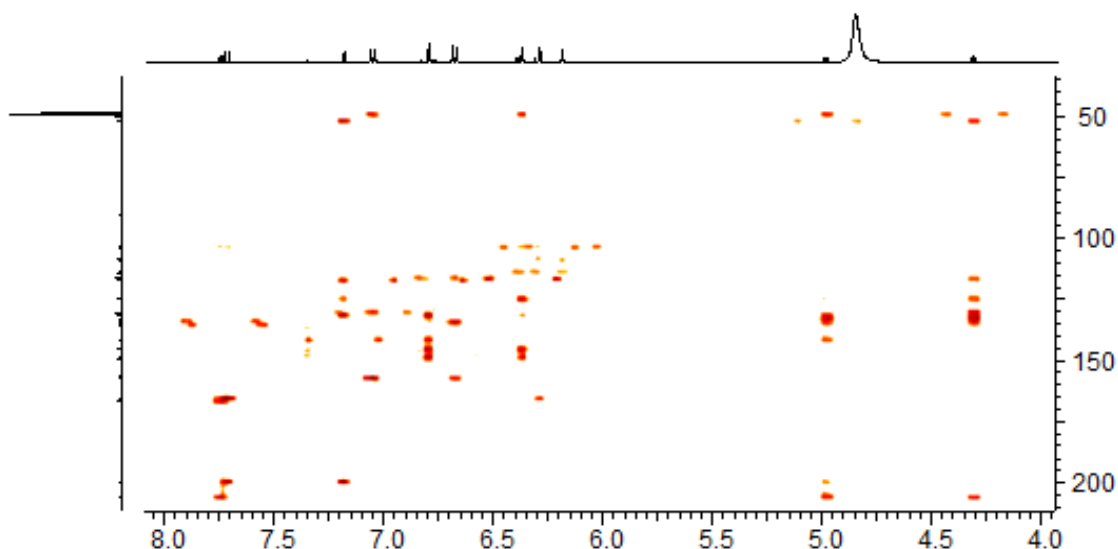
Através das informações obtidas dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Figuras 56 e 57), bem como, das correlações observadas nos espectros bidimensionais (HMQC e HMBC),

ilustrados nas Figuras 60 e 61, foi possível atribuir valores de deslocamento químico para os carbonos pertencentes ao anel **A** da unidade **I** do dímero de chalcona e estabelecer algumas correlações importantes para elucidação da estrutura. Foi verificado através da análise do espectro de HMQC (Figura 60) correlação do sinal do hidrogênio H-5' ( $\delta$  6,38) com o sinal em  $\delta$  108,5, referente ao carbono C-5'. Além disso, nesse mesmo espectro, foi observado correlações dos hidrogênios em  $\delta$  6,18 e  $\delta$  7,72 com os carbonos em  $\delta$  103,5 (C-3') e  $\delta$  135,6 (C-6'), respectivamente. Por outro lado, essa região no espectro de HMBC (Figuras 61 e 62), apresentou apenas duas correlações do H-6' ( $\delta$  7,72) com o carbono em  $\delta$  166,2 (C-4') e o carbono do grupo C=O em  $\delta$  199,7 (C-9). Essas atribuições foram importantes para o posicionamento de uma carbonila ligada ao anel **A** da unidade **I**. Cabe salientar que as atribuições dos valores de deslocamento químico para os carbonos C-1' e C-2' foram realizadas por comparação com dados da literatura (BANDEIRA, MATOS e BRAZ-FILHO, 2003; MOREIRA, 2014), após a atribuição de todos os outros carbonos. As correlações observadas no espectro de HMBC estão demonstradas na Figura 63.

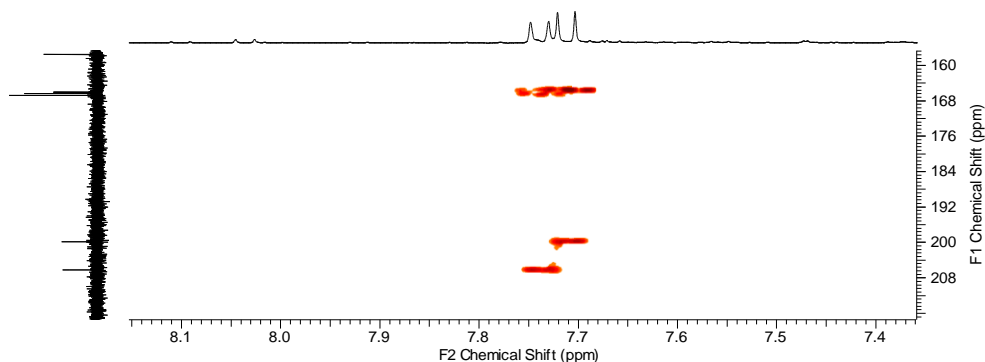
**Figura 60** – Espectro de HMQC da substância **AG3** [500 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm)]



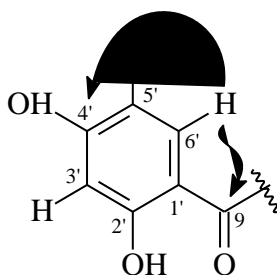
**Figura 61** – Espectro de HMBC da substância **AG3** [500 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 62** – Ampliação na região entre  $\delta$  7,40 e  $\delta$  8,15/  $\delta$  160 e  $\delta$  208 do espectro de HMBC de **AG3** [500 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 63** - Principais correlações observadas no espectro de HMBC que permitiram posicionar a carbonila próxima ao anel **A** da unidade **I** do dímero de chalcona

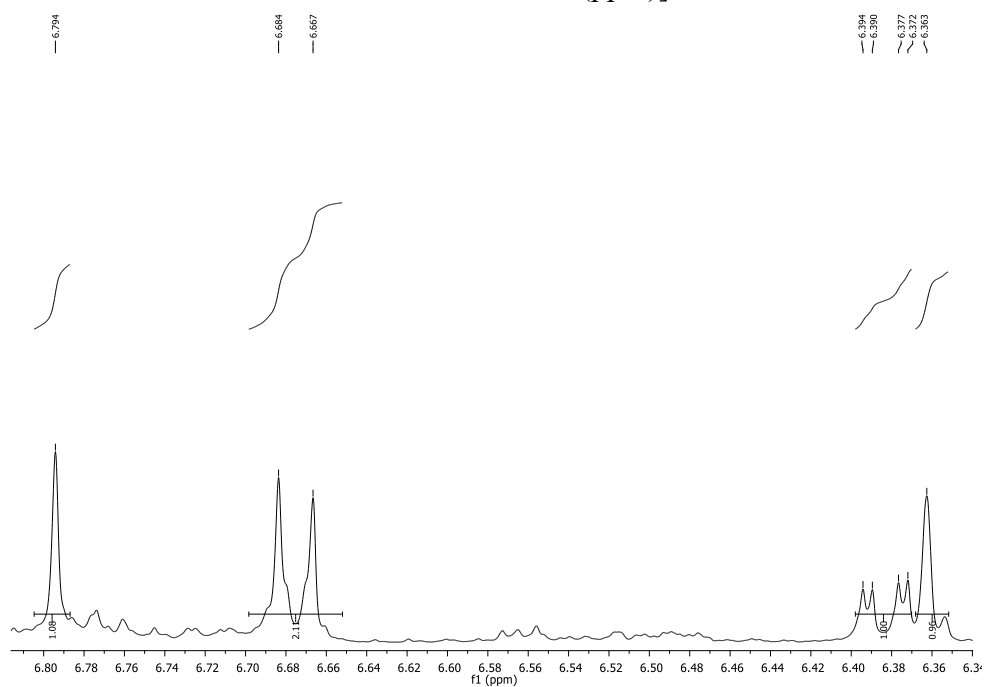


No espectro de RMN de <sup>1</sup>H ampliado de **AG3** ( Figura 64), pode-se observar também a presença de dois singletos referentes a hidrogênios ligados a carbonos aromáticos em  $\delta$  6,36 e  $\delta$  6,79, integrando para um hidrogênio cada, correspondentes aos hidrogênios H-3 e H-6, respectivamente, de anel aromático 1,2,4,5-tetrasubstituído (Figura 65), sendo este atribuído

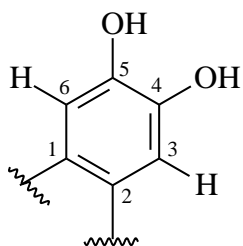
ao anel **B** da unidade **I** do dímero de chalcona. Através das correlações observadas nos espectros bidimensionais (HMQC e HMBC), ilustrados nas Figuras 60 e 61, foi possível atribuir valores de deslocamento químico para os carbonos referente ao anel **B** da unidade **I** do dímero e estabelecer algumas conectividades. Foi verificado através da análise do espectro de HMQC (Figura 60) correlação do sinal do hidrogênio em  $\delta$  6,79 (H-6) com o sinal do carbono em  $\delta$  117,3 (C-6). Cabe salientar que nessa região do espectro de HMQC não foi possível observar correlação entre o hidrogênio H-3 e o carbono em  $\delta$  116,72 (C-3), sendo este atribuído por comparação com a literatura (BANDEIRA, MATOS e BRAZ-FILHO, 2003; MOREIRA, 2014). Por outro lado, a análise do espectro de HMBC (Figura 61) possibilitou a observação de correlação entre o sinal em  $\delta$  6,36 (H-3) com os sinais em  $\delta$  125,  $\delta$  145,4 e  $\delta$  148,9, referentes aos carbonos C-1, C-5 e C-4, respectivamente. Além disso, foi observado nesse mesmo espectro correlação a três ligações ( ${}^3J_{C,H}$ ) entre o H-3 e o carbono em 49,5 (C-7"). Ainda no espectro de HMBC foi observado correlação entre o sinal do singlete em  $\delta$  6,79 (H-6) com os sinais em  $\delta$  131,7,  $\delta$  145,4,  $\delta$  148,9 e  $\delta$  141,6, referentes aos carbonos C-2, C-5, C-4 e C-7, respectivamente. Essas correlações podem ser melhor visualizadas na Figura 66.

O espectro de HMQC (Figura 60) mostrou correlação entre o hidrogênio em 7,18 (H-7) e o carbono em 141,6 (C-7). Além disso, o espectro de HMBC (Figuras 61 e 67) mostrou acoplamento heteronuclear a longa distância ( ${}^3J_{C,H}$ ) entre o hidrogênio em  $\delta$  7,18 (H-7) e o carbono carbonílico em  $\delta$  199,7 (C-9). Cabe salientar que a observação dessa correlação permitiu conectar o anel **A** com o anel **B** da unidade **I** do dímero de chalcona (Figura 68).

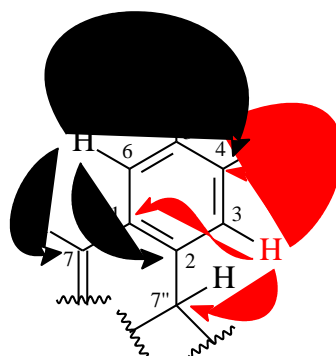
**Figura 64** – Ampliação na região entre  $\delta$  6,30 e  $\delta$  6,90 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **AG3** [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



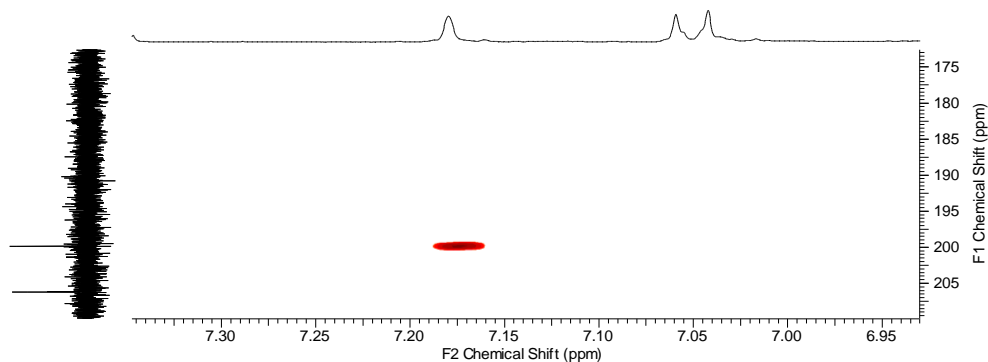
**Figura 65** – Anel aromático 1,2,4,5-tetrasubstituído do anel **B** da unidade **I** do dímero de chalcona



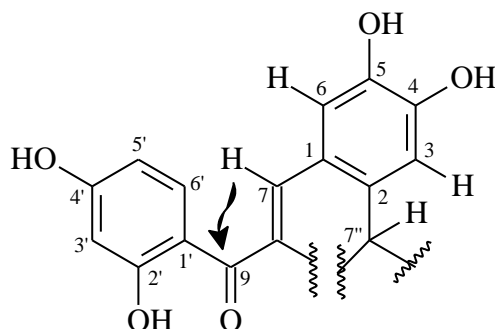
**Figura 66** – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel **B** da unidade **I** do dímero de chalcona



**Figura 67** – Ampliação na região entre  $\delta$  6,95 e  $\delta$  7,35 do espectro de HMBC de **AG3** [500 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 68** – Correlação observada no espectro de HMBC que permitiu conectar o anel **A** ao anel **B** da unidade **I** do dímero de chalcona

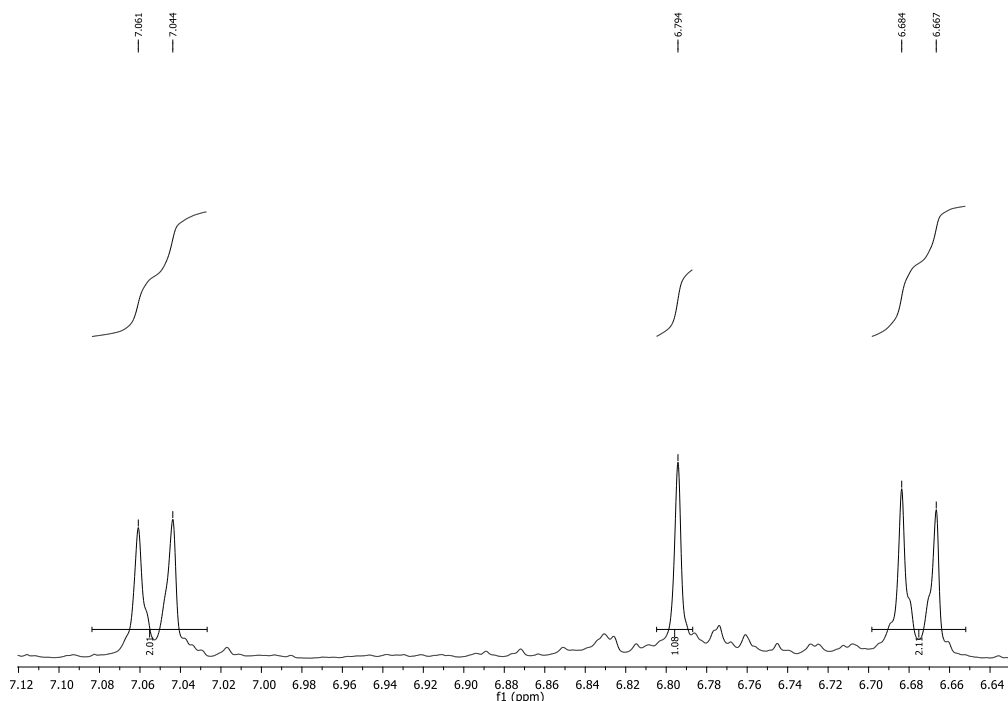


A unidade II do dímero pode ser identificada através da análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H na região ampliada, correspondente a faixa de  $\delta$  6,60 a  $\delta$  7,10 (Figura 69). Os dois dupletos registrados em  $\delta$  7,05 ( $J = 8,5$  Hz) e  $\delta$  6,68 ( $J = 8,5$  Hz), integrando para dois hidrogênios cada, puderam ser atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos 2'',6'' e 3'',5'', respectivamente, característicos de anel aromático 1,4-dissubstituído. Estes sinais podem ser atribuídos ao anel **B** da unidade **II** do dímero de chalcona. Através da análise do espectro de HMQC (Figuras 60 e 70), foi possível observar as correlações do duplete em  $\delta$  7,05 com os carbonos C-2'' e 6'' ( $\delta$  130,5) e do duplete em  $\delta$  6,68 com os carbonos C-3'',5'' ( $\delta$  116,4). A análise do espectro de HMBC (Figura 61), permitiu verificar a existência de correlações a três ligações ( $^3J_{C,H}$ ) entre os hidrogênios H-2'',6'' e o carbono em  $\delta$  49,5 (C-7''), além disso, foi verificado correlação a três ligações ( $^3J_{C,H}$ ) entre os hidrogênios H-3'',5'' e o carbono em  $\delta$  134,17 (C-1''). Cabe salientar que através desse acoplamento a longa distância entre os hidrogênios H-2'',6'' e o carbono  $\delta$  49,5 (C-7'') ( $^3J_{C,H} - H-2'',6'' \rightarrow C-7''$ ), foi possível localizar o anel **B** da unidade **II** conectado ao anel **B** da unidade **I**. O espectro de HMBC

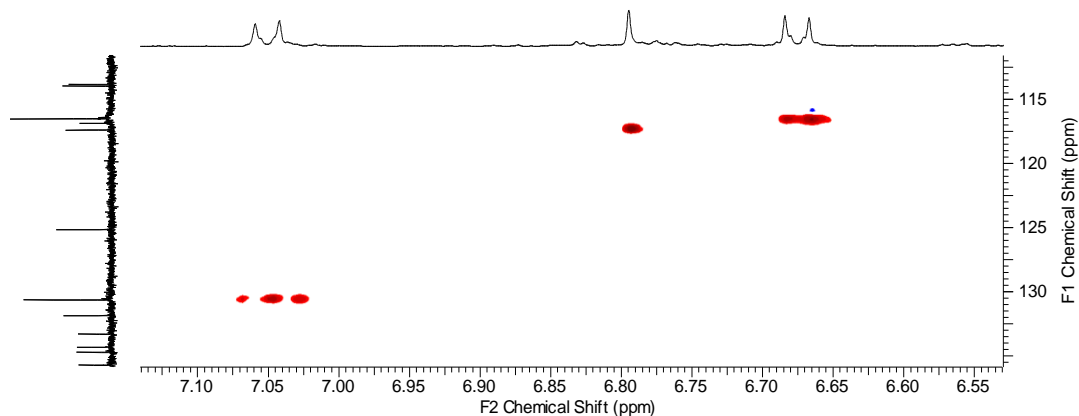
(Figura 61) também revelou acoplamento ( $^2J_{C,H}$ ) entre o dubleto referente ao H-7'' em  $\delta$  4,30 com o carbono C-1'' ( $\delta$  134,2). Todas essas correlações podem ser melhor observadas na Figura 71.

Além dessas correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 61) foi também verificada outras correlações que permitiram confirmar a existência de acoplamento ( $^2J_{C,H}$ ) entre H-7'' e o carbono C-8'' ( $\delta$  52,02), acoplamento ( $^3J_{C,H}$ ) entre H-7'' e a carbonila C-9'' ( $\delta$  206,0) e os acoplamentos a três ligações ( $^3J_{C,H}$ ) entre o H-7 ( $\delta$  7,18) e os carbonos C-8'' ( $\delta$  52,02) e C-2 ( $\delta$  131,7). Nesse mesmo espectro foi observado acoplamento a duas ligações ( $^2J_{C,H}$ ) entre o H-8'' ( $\delta$  4,98) e os carbonos C-7'' ( $\delta$  49,51), C-8 ( $\delta$  133,2) e C-9'' ( $\delta$  206,0; C=O). Cabe salientar que através dessas correlações observadas no espectro de HMBC ampliado da Figura 72, foi possível localizar uma carbonila diretamente ligada ao C-8''. Essas correlações podem ser melhor visualizadas na Figura 73.

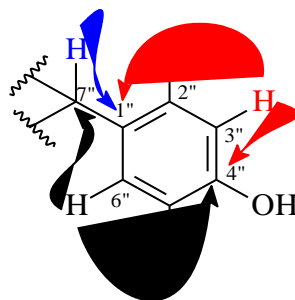
**Figura 69** – Ampliação na região entre  $\delta$  6,60 e  $\delta$  7,10 do espectro de RMN de  $^1H$  de AG3 [500 MHz,  $CD_3OD$ ,  $\delta$  (ppm)]



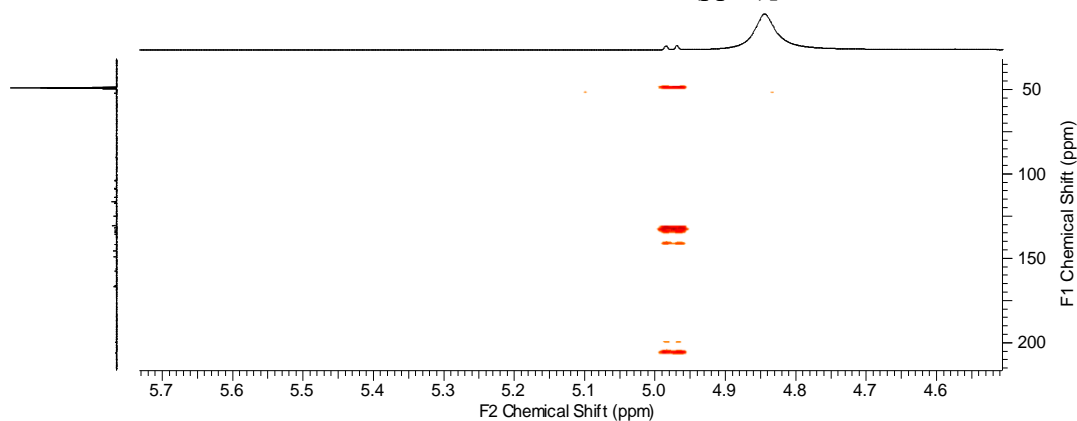
**Figura 70** – Ampliação na região entre  $\delta$  6,60 e  $\delta$  7,10/  $\delta$  115 e  $\delta$  135 do espectro de HMQC de AG3 [500 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 71** – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel **B** da unidade **II** do dímero de chalcona

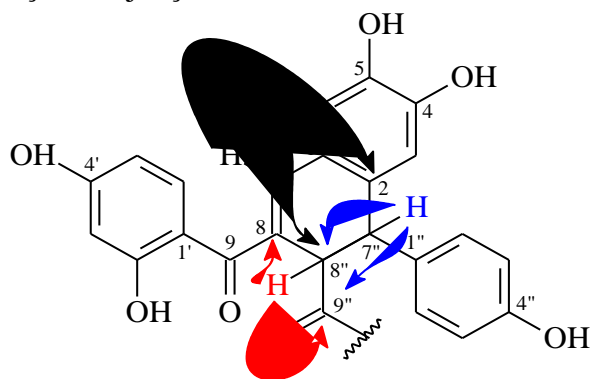


**Figura 72** – Ampliação na região entre  $\delta$  4,60 e  $\delta$  5,7/  $\delta$  40,0 e  $\delta$  210,0 do espectro de HMBC de AG3 [500 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm)]





**Figura 73** – Correlações observadas no espectro de HMBC que possibilitaram a confirmação das posições de junção das duas unidades do dímero de chalcona

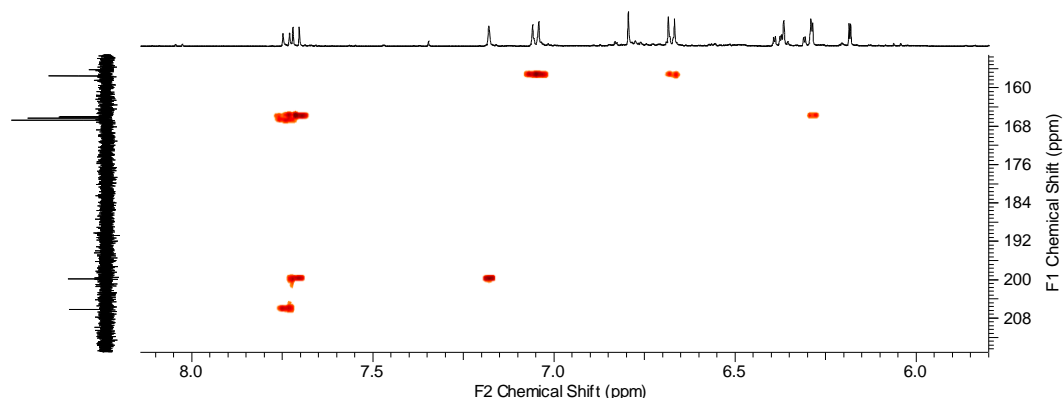


A identificação completa pode ser finalizada através da análise detalhada dos sinais de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 74) em  $\delta$  6,28 (*d*,  $J = 2,0$  Hz), 6,30 (*dd*,  $J = 9,0$  e 2,0 Hz) e 7,74 (*d*,  $J = 9,0$  Hz), todos sinais integrando para um hidrogênio cada. Estes hidrogênios foram identificados como sendo aqueles ligados no C-3''', C-5''' e C-6''', respectivamente. A constante de acoplamento de 2,0 Hz observada em ambos dubletos indicou o acoplamento *meta* do H-3''' com o H-5''. Além disso, observou-se acoplamento em *orto* do H-5''' com um dublete em  $\delta$  7,74 referente ao hidrogênio H-6'''. Esses sinais remetem aos hidrogênios de anel aromático 1,2,4-trissubstituído, sendo atribuído ao anel **A** da unidade **II** do dímero de chalcona (Figura 75). O espectro de HMQC (Figura 76) permitiu correlacionar os hidrogênios em  $\delta$  6,28 e  $\delta$  6,30 com os carbonos em  $\delta$  103,9 (C-3''') e  $\delta$  108,9 (C-5'''), respectivamente. Cabe salientar que o espectro de HMQC não se mostrou esclarecedor quanto a conectividade do H-6''' (7,74) com o carbono em 134,6 (C-6'''), sendo este, atribuído de acordo com dados da literatura (BANDEIRA, MATOS e BRAZ-FILHO, 2003; MOREIRA, 2014).

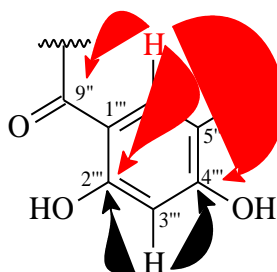
Através da análise do espectro de HMBC, mostrado de forma ampliada na Figura 77, foi possível estabelecer correlações que permitiram atribuir os outros carbonos do anel **A** da unidade **II**. Foram observados correlações a duas ligações ( $^2J_{\text{C,H}}$ ) entre o hidrogênio H-3''' ( $\delta$  6,28) com os carbonos C-2''' ( $\delta$  165,8) e C-4''' ( $\delta$  165,9), bem como, correlações a três ligações ( $^3J_{\text{C,H}}$ ) entre o hidrogênio H-6''' ( $\delta$  7,74) com os carbonos C-2''' ( $\delta$  165,8) e C-4''' ( $\delta$  165,9). Além disso, nesse mesmo espectro foi evidenciado a correlação a três ligações ( $^3J_{\text{C,H}}$ ) entre o H-6''' e carbono do grupo C=O em  $\delta$  206,0 (C-9'''), posicionando o anel **A** da unidade **II** na molécula. Essas correlações observadas no espectro de HMBC estão ilustradas na Figura 78.



**Figura 77** – Ampliação na região entre  $\delta$  6,20 e  $\delta$  7,74/  $\delta$  160,5 e  $\delta$  208,5 do espectro de HMBC de **AG3** [500 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 78** – Correlações observadas no espectro de HMBC que possibilitaram o posicionando o anel A da unidade **II** na molécula

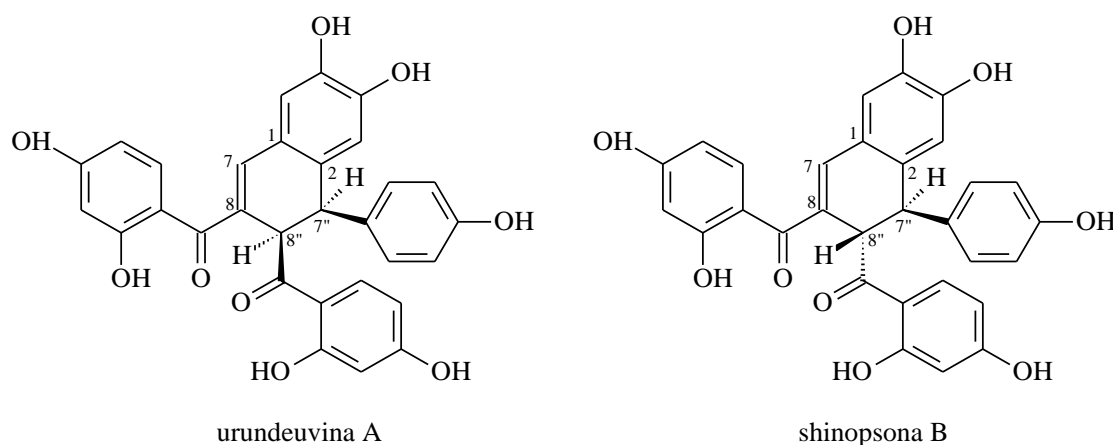


Desta forma, após análise minuciosa dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, bem como, das correlações observadas nos espectros bidimensionais (HMQC e HMBC), foi possível identificar a substância **AG3** como sendo 2',4,4',5-tetrahidroxichalcona-(2→7'',8→8'')-2''',4'',4'''-trihidroxi-7'',8''-dihidrochalcona. Sendo que, a determinação da configuração relativa dos centros estereogênicos dos carbonos C-7'' e C-8'' foi realizada através da comparação com os dados da literatura (BANDEIRA, MATOS e BRAZ-FILHO, 2003; MOREIRA, 2014). Na comparação dos deslocamentos químicos e das constantes de acoplamentos de **AG3** com os valores apresentados pelas substâncias **shinopsona B** (relação *trans* entre H-7'' e H-8'') e **urundeuvina A** (relação *cis* entre H-7'' e H-8'') (Figura 79), pode-se verificar que os valores de deslocamento químico e das constantes de acoplamentos de **AG3** são compatíveis com os valores encontrados para a substância **shinopsona B** (Tabela 28). Portanto, a comparação com dados da literatura (BANDEIRA, MATOS e BRAZ-FILHO, 2003; MOREIRA, 2014) indicou a relação *trans* entre os hidrogênios H-7'' e H-8'' da substância **AG3**. Sendo assim, a substância **AG3** foi identificada como sendo (7''\*R, 8''\*S) 2',4,4',5-tetrahidroxichalcona-(2→7'',8→8'')-2''',4'',4'''-trihidroxi-7'',8''-dihidrochalcona.

Na Tabela 29 são apresentados todos os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , bem como, das correlações observadas nos espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **AG3**, sendo comparada com os valores apresentados de deslocamento químico de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e das correlações observadas de HMQC e HMBC pela substância **shinopsona B** (MOREIRA, 2014).

Com o objetivo de confirmar a massa molecular e por consequência a fórmula molecular da substância **AG3**, foi realizado o experimento de massas de alta resolução no modo positivo. O espectro de massas de alta resolução no modo positivo (HRESIMS) (Figura 80) apresentou o íon *pseudo* molecular em  $m/z$  527,1333  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Através desse resultado foi confirmado a massa molecular que corresponde à fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{O}_9$  (calculado para 527,1342).

**Figura 79** – Estruturas de **urundevina A** e **shinopsona B**

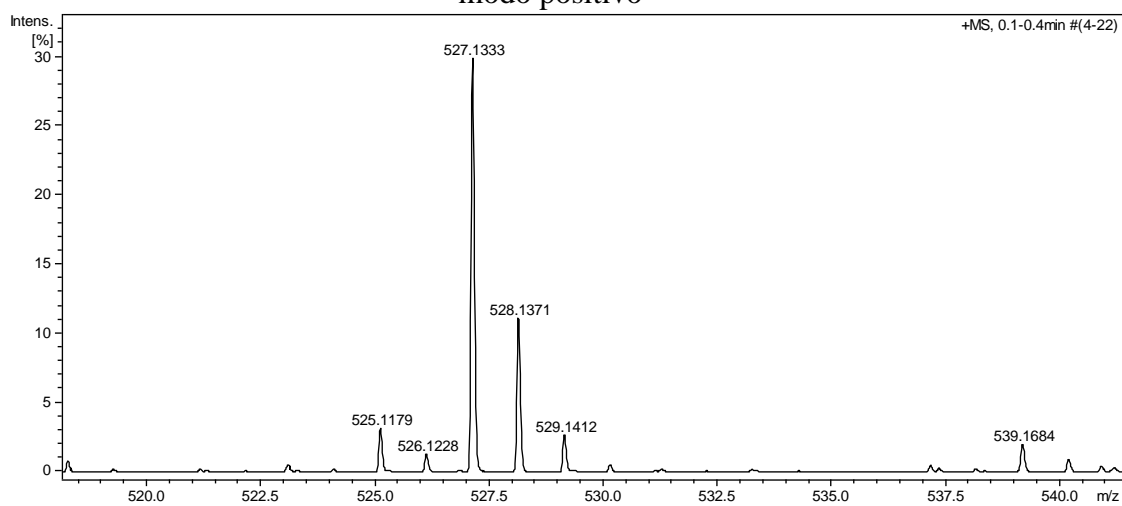


**Tabela 28** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de **AG3** em  $\text{CD}_3\text{OD}$  [( $\delta$  (ppm); mult.e  $J$  (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores da literatura\*<sup>#</sup>

Posição	AG3		urundevina A*		shinopsona B <sup>#</sup>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	125,0	-	124,85	-	125,2	-
2	131,7	-	131,40	-	131,9	-
7	141,6	7,18 (s)	141,65	7,34 (s)	141,7	7,18 (s)
8	133,2	-	124,85	-	133,3	-
7''	49,5	4,30 (d, 7,8)	48,39	4,40 (d, 6,1)	49,5	4,31 (d, 7,7)
8''	52,0	4,98 (d, 7,8)	51,12	5,01 (d, 6,1)	52,2	4,98 (d, 7,7)

\* BANDEIRA, MATOS e BRAZ-FILHO, 2003; # MOREIRA, 2014. Dados obtidos para **urundevina A** **shinopsona B** utilizando  $\text{CD}_3\text{OD}$  como solvente

**Figura 80** – Espectro de massas de alta resolução de **AG3** com ionização ESI no modo positivo

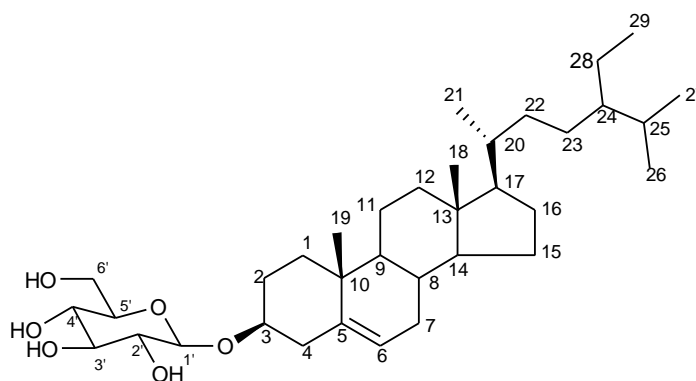


**Tabela 29** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de **AG3** em  $\text{CD}_3\text{OD}$  [( $\delta$  (ppm); mult.e  $J$  (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores da literatura\*

C	AG3			shinopsona B*		
	HSQC		HMBC	HSQC		HMBC
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^{2,3}J_{\text{C,H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^{2,3}J_{\text{C,H}}$
1	125,0	-	H-7'', H-3, H-7	125,2	-	H-3
2	131,7	-	H-7'', H-8'', H-6, H-7	131,9	-	H-7, H-6
3	116,7	6,36 (s)	-	116,9	6,36 (s)	-
4	148,9	-	H-3, H-6	149,0	-	H-3, H-6
5	145,4	-	H-3, H-6	145,5	-	H-3, H-6
6	117,3	6,79 (s)	-	117,4	6,79 (s)	-
7	141,6	7,18 (s)	H-8'', H-6	141,8	7,18 (s)	H-6
8	133,2	-	H-7'', H-8''	133,3	-	H-8''
9	199,7	-	H-7, H-6'	199,9	-	H-7, H-6'
1'	113,8	-	-	114,0	-	-
2'	166,2	-	-	166,3	-	-
3'	103,5	6,18 (d, 2,0)	-	103,7	6,18 (d, 2,2)	-
4'	166,6	-	H-6'	166,7	-	H-6'
5'	108,5	6,38 (dd, 2,0; 8,5)	-	108,6	6,38 (dd, 2,2; 8,8)	-
6'	135,6	7,72 (d, 8,5)	-	135,7	7,71 (d, 8,8)	-
1''	134,2	-	H-7'', H-8'', H-3'', H-5''	134,3	-	H-7''
2''	130,5	7,05 (d, 8,5)	H-7''	130,6	7,06 (d, 8,7)	H-7''
6''	130,5	7,05 (d, 8,5)	H-7''	130,6	7,06 (d, 8,7)	H-7''
3''	116,4	6,68 (d, 8,5)	-	116,5	6,68 (d, 8,7)	-
5''	116,4	6,68 (d, 8,5)	-	116,5	6,68 (d, 8,7)	-
4''	157,4	-	H-2'', H-6'', H-3'', H-5''	157,5	-	H-2'', H-6'', H-3'', H-5''
7''	49,5	4,30 (d, 7,8)	H-8'', H-3, H-2'', H-6''	49,5	4,31 (d, 7,7)	H-8'', H-3, H-2'', H-6''
8''	52,0	4,98 (d, 7,8)	H-7'', H-7	52,2	4,98 (d, 7,7)	H-7'', H-7
9''	206,0	-	H-7'', H-8'', H-6'''	206,3	-	H-7'', H-8'', H-6'''
1'''	113,7	-	-	113,9	-	-
2'''	165,9	-	H-6''', H-3'''	166,0	-	H-6'''
3'''	103,9	6,28 (d, 2,0)	-	104,1	6,28 (d, 2,2)	-
4'''	165,9	-	H-6''', H-3'''	166,1	-	H-5''', H-3'''
5'''	108,9	6,30 (dd, 2,0; 9,0)	-	109,1	6,30 (dd, 2,2; 9,0)	-
6'''	134,6	7,74 (d, 9,0)	-	134,7	7,74 (d, 9,0)	-

\* MOREIRA, 2014. Dados obtidos para shinopsona B utilizando  $\text{CD}_3\text{OD}$  como solvente

### 5.1.3.4 Elucidação estrutural da substância AG4



3β-O-β-glicopiranosilstitosterol (**AG4**)

A substância **AG4** foi isolada da fase acetato de etila das folhas de *A. graveolens* [obtida da fração AFAG-23-B (29,7 mg), conforme item 4.4.2.3, página 74]. Cabe salientar que **AG4** também foi isolada da fase diclorometano do caule de *A. graveolens* [obtida da fração DCAG-31-B (68,4 mg), conforme item 4.4.3.3, página 79].

A substância **AG4** apresentou-se como um sólido branco, insolúvel em clorofórmio, acetona e metanol.

A elucidação estrutural da substância **AG4** foi baseada nos dados obtidos dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ , comparados com dados da literatura.

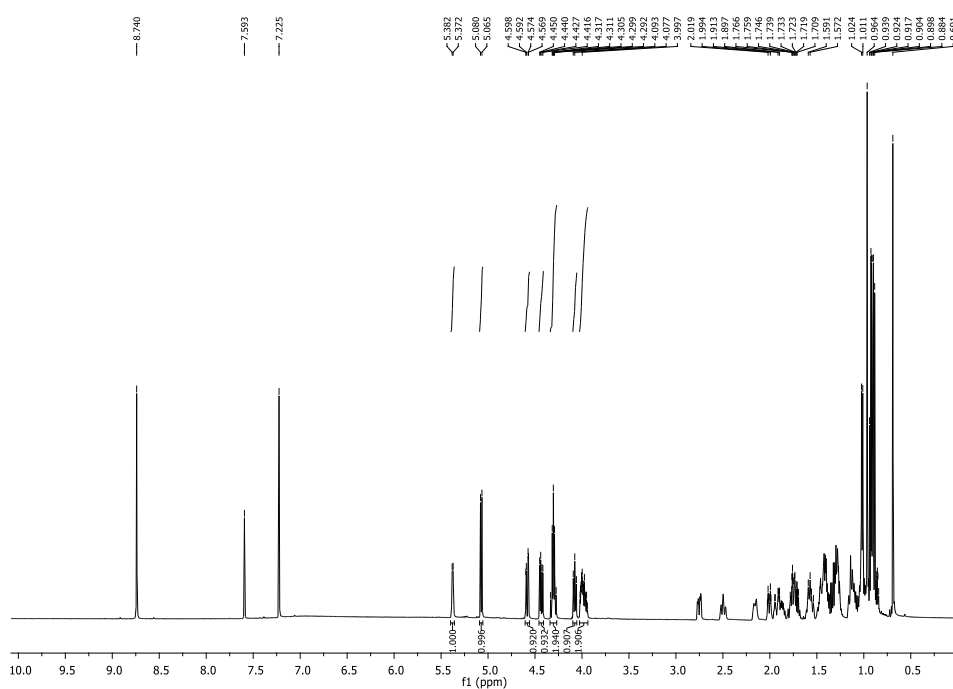
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 81 e 82) de **AG4** exibiu sinais na região entre  $\delta$  0,69 e  $\delta$  1,10 correspondendo a grupos metílicos característicos de esteroides. Além desses, foram observados multipletos na região compreendida entre  $\delta$  3,95 e  $\delta$  4,60, referentes aos hidrogênios oximetínicos e metilênicos da unidade de açúcar. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  também revelou um dubleto em  $\delta$  5,07, integrando para um hidrogênio, com constante de acoplamento de 7,5 Hz, que foi atribuído ao hidrogênio anomérico (H-1'). E essa magnitude da constante de acoplamento ( $J = 7,5$  Hz), que é um indicativo da relação *trans* diaxial entre os hidrogênios H-1' e H-2', confirmou a presença da parte glicosídica, além disso, permitiu estabelecer a configuração  $\beta$  para a glicose. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  também apresentou um multipletto em  $\delta$  4,07 atribuído ao hidrogênio H-3 da parte da aglicona. Além disso, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresentou sinal característico em  $\delta$  5,37 referente ao hidrogênio olefínico H-6.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 83) apresentou sinais para 35 carbonos. Dentre os sinais observados destaca-se a presença de um carbono oximetínico em  $\delta$  79,1 referente ao

carbono C-3, dois carbonos olefínicos em  $\delta$  141,4 e  $\delta$  122,4, atribuídos aos carbonos C-5 e C-6, respectivamente, além da presença de sinais característicos da porção glicosídica ( $\delta$  103,1; 75,8; 78,6; 72,2; 78,9 e 63,4), destacando-se o sinal para o carbono metilênico em  $\delta$  63,4, característico para o carbono C-6' de uma glicose e o sinal em  $\delta$  103,1 para o carbono anomérico C-1'.

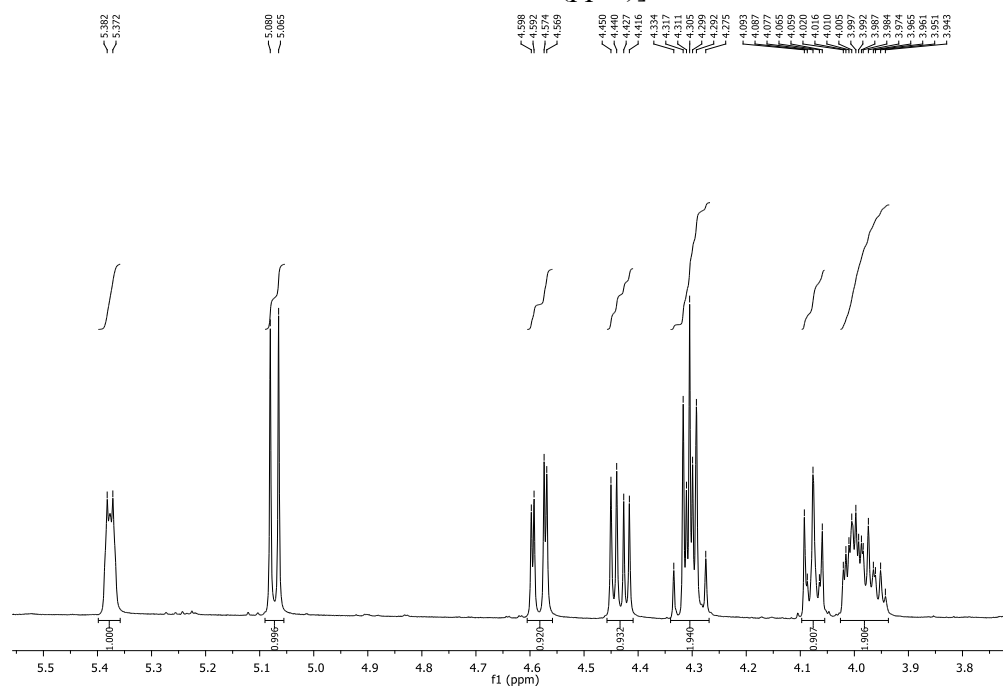
A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e a comparação com valores descritos na literatura (CORREIA, 1999) permitiram a identificação inequívoca de **AG4** como sendo o  $3\beta\text{-O-}\beta\text{-glicopiranosil}itosterol$ , conhecido como *daucosterol* (Tabela 30).

**Figura 81** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **AG4** [500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $\delta$  (ppm)]

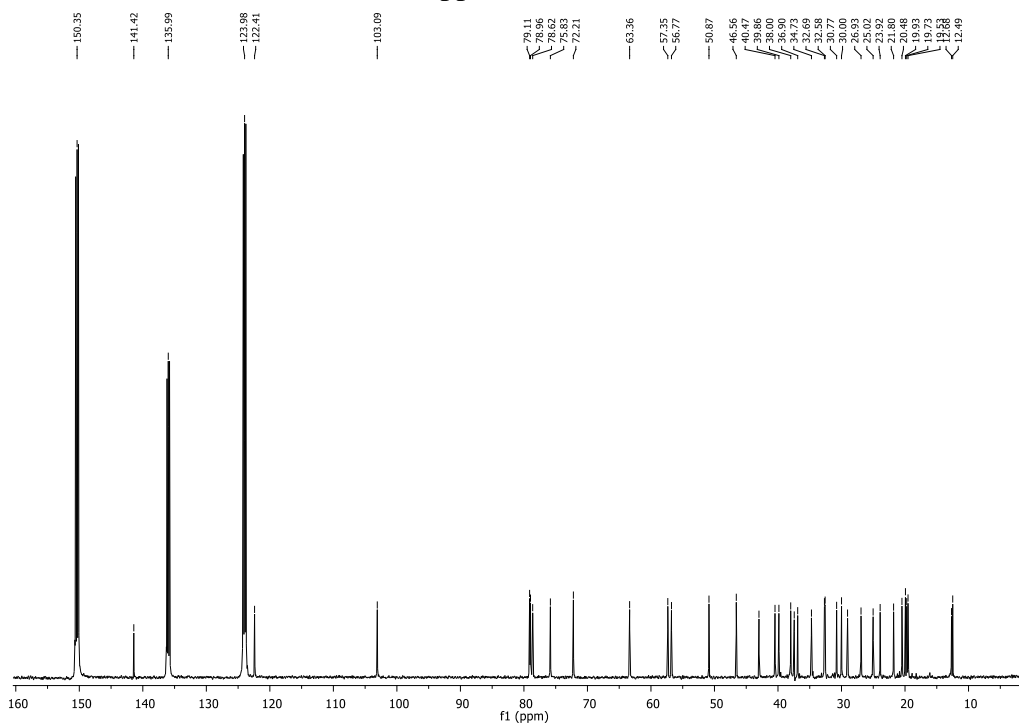




**Figura 82** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **AG4** ampliado na região entre  $\delta$  3,80 e  $\delta$  5,50 [500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 83** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **AG4** [(125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Tabela 30** – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  [125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $\delta$  (ppm)] de **AG4** e valores da literatura (CORREIA, 1999)

AG4				3- $\beta$ -O- $\beta$ -glicopiranosilsterol*			
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	Posição	$\delta^{13}\text{C}$	Posição	$\delta^{13}\text{C}$	Posição	$\delta^{13}\text{C}$
<b>1</b>	38,0	<b>19</b>	19,9	<b>1</b>	37,5	<b>19</b>	19,4
<b>2</b>	32,6	<b>20</b>	37,4	<b>2</b>	32,2	<b>20</b>	36,4
<b>3</b>	79,1	<b>21</b>	19,7	<b>3</b>	78,6	<b>21</b>	19,2
<b>4</b>	39,9	<b>22</b>	34,7	<b>4</b>	39,3	<b>22</b>	34,2
<b>5</b>	141,4	<b>23</b>	26,9	<b>5</b>	140,9	<b>23</b>	26,4
<b>6</b>	122,4	<b>24</b>	46,6	<b>6</b>	121,9	<b>24</b>	46,0
<b>7</b>	30,7	<b>25</b>	30,0	<b>7</b>	30,3	<b>25</b>	29,5
<b>8</b>	32,5	<b>26</b>	20,5	<b>8</b>	32,1	<b>26</b>	19,0
<b>9</b>	50,9	<b>27</b>	19,5	<b>9</b>	50,3	<b>27</b>	20,0
<b>10</b>	36,9	<b>28</b>	23,9	<b>10</b>	36,9	<b>28</b>	23,4
<b>11</b>	21,8	<b>29</b>	12,7	<b>11</b>	21,3	<b>29</b>	12,2
<b>12</b>	40,5	<b>1'</b>	103,1	<b>12</b>	40,0	<b>1'</b>	102,6
<b>13</b>	43,0	<b>2'</b>	75,8	<b>13</b>	42,5	<b>2'</b>	75,3
<b>14</b>	57,4	<b>3'</b>	78,6	<b>14</b>	56,8	<b>3'</b>	78,1
<b>15</b>	25,0	<b>4'</b>	72,2	<b>15</b>	24,5	<b>4'</b>	71,7
<b>16</b>	29,0	<b>5'</b>	78,9	<b>16</b>	28,6	<b>5'</b>	78,5
<b>17</b>	56,7	<b>6'</b>	63,4	<b>17</b>	56,2	<b>6'</b>	62,8
<b>18</b>	12,5			<b>18</b>	12,0		

\* Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $\delta$  (ppm)]

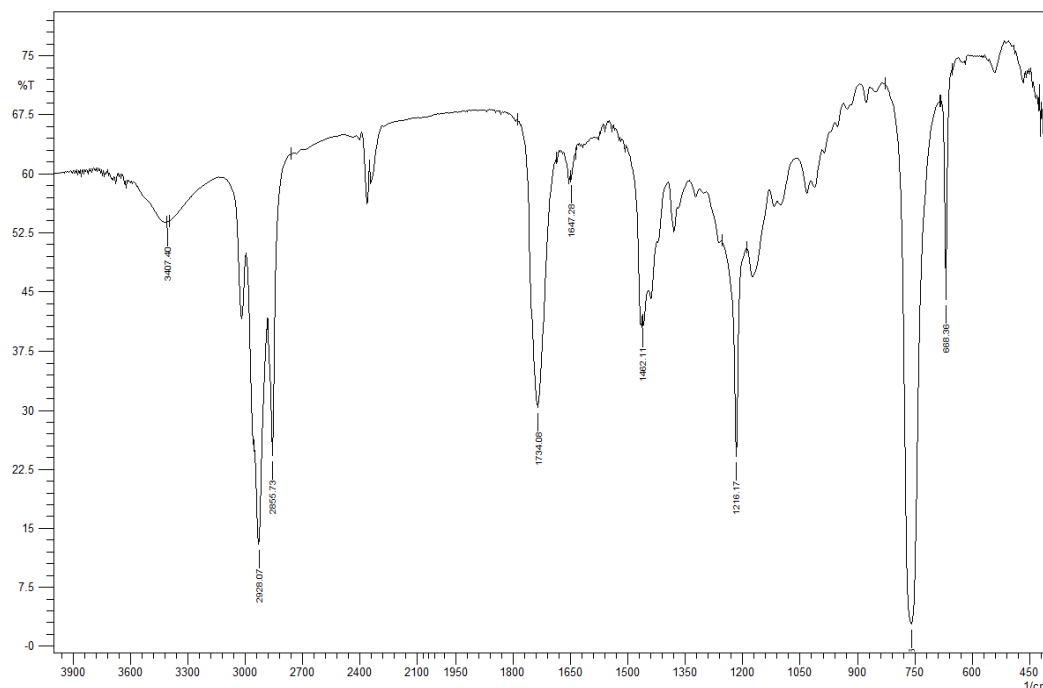
### 5.1.3.5 Identificação dos ácidos graxos que compõem os triacilglicerídeos presentes em AG5

A mistura de triacilglicerídeos (**AG5**) obtida da fração **DCAG-3** (597,4 mg) do caule de *A. graveolens*, apresentou-se na forma de óleo de coloração castanho escuro, conforme procedimento descrito no item 4.4.3, página 75.

O espectro de IV (Figura 84) de **AG5** apresentou banda de absorção em  $3010\text{ cm}^{-1}$  correspondente à deformação axial da ligação H-C=C insaturado, da olefina, bandas de absorção em  $2928$  e  $2855\text{ cm}^{-1}$  de estiramento da ligação  $\text{Csp}^3\text{-H}$ , bem como, banda de absorção em  $1734\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento da ligação C=O do grupo carbonila de éster. Essas absorções confirmou a presença de triacilglicerídeos em **AG5**. Além disso, o espectro de IV revelou banda de absorção forte em torno de  $750\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à deformação angular fora do plano para ligação C-H de ligações duplas com configuração *cis*. Essas informações

sugeriram que os triacilglicerídeos presentes em **AG5** são compostos por ácidos graxos saturados e insaturados.

**Figura 84** - Espectro na região do infravermelho (IV) de **AG5\***

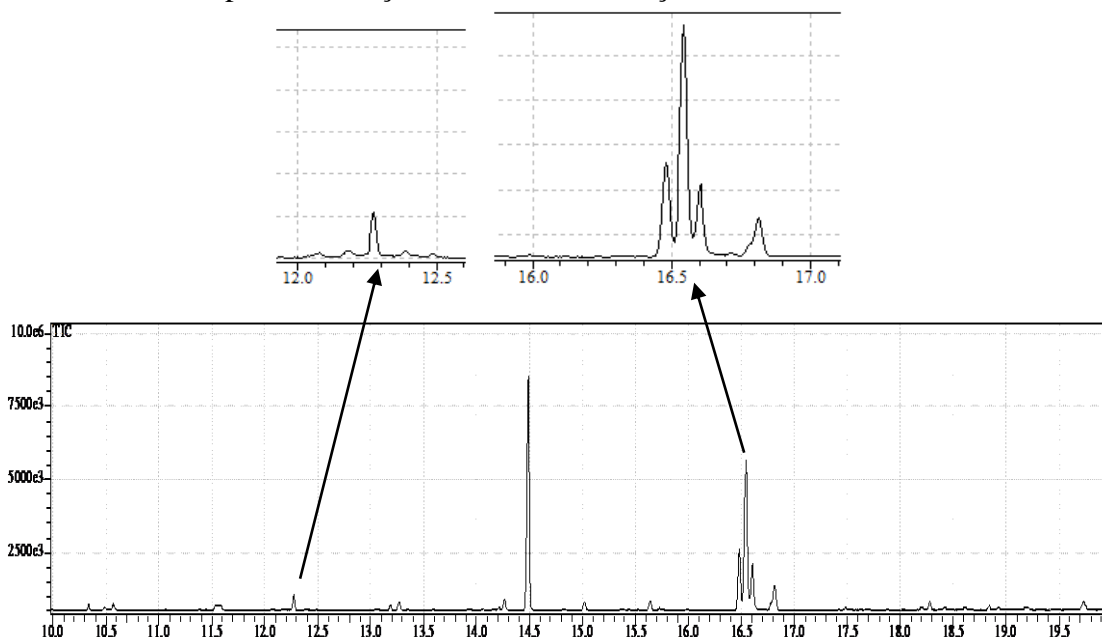


\* Espectro obtido em filme de clorofórmio

**AG5** foi submetida a reação de transesterificação visando a obtenção de ésteres metílicos de ácidos graxos. O protocolo utilizado nessa reação está registrado no item 4.7.1, da página 91.

Após derivatização de **AG5** por meio da reação de transesterificação e obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos correspondentes, estes foram analisados por CG-EM. No cromatograma (Figura 85) foram registrados seis picos majoritários com diferentes tempos de retenção, e cada um deles originou um espectro de massas cujos respectivos íons moleculares em  $m/z$  238,  $m/z$  242,  $m/z$  270,  $m/z$  294,  $m/z$  296,  $m/z$  296 e  $m/z$  298 correspondem ao tetradecanoato de metila (miristato de metila), hexadecanoato de metila (palmitato de metila), *cis,cis*-9,12-octadecadienoato de metila (linoleato de metila), *cis*-9-octadecenoato de metila, *cis*-11-octadecenoato de metila e ao octadecanoato de metila (esterato de metila), respectivamente (Tabela 31).

**Figura 85** - Cromatograma (CG-EM) dos ésteres metílicos de ácidos graxos obtidos a partir da reação de transesterificação de **AG5**



\* Condições cromatográficas ver item 4.1, página 65

**Tabela 31** – Ésteres metílicos de ácidos graxos identificados de **AG5** transesterificada

N° C: N° C=C	t <sub>R</sub> (min.)*	Relação massa/carga (m/z)	% Área	Ésteres Metílicos
C14:0	12,275	242	2,74	Miristato de metila
C17:0	14,490	270	45,12	Palmitato de metila
C19:2	16,480	294	11,14	Linoleato de metila
C19:1	16,545	296	28,17	<i>cis</i> -9-octadecenoato de metila
C19:1	16,605	296	6,90	<i>cis</i> -11-octadecenoato de metila
C19:0	16,815	298	6,27	Esterato de metila

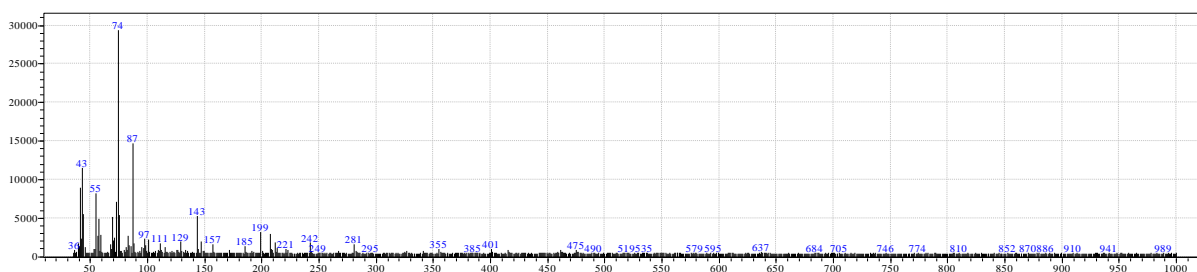
\*t<sub>R</sub> = Tempo de Retenção

A análise dos espectros de massas (Figuras 86, 87 e 88) das substâncias tetradecanoato de metila (miristato de metila), hexadecanoato de metila (palmitato de metila) e octadecanoato de metila (esterato de metila) mostraram a presença de um pico de alta intensidade correspondente a  $m/z$  74 (pico base), sendo atribuído ao rearranjo de McLafferty, conforme pode ser visto no Esquema 6. Além disso, foram observados nesses três espectros de massas (Figuras 86, 87 e 88), a presença de alguns picos entre os picos  $m/z$  74 e o pico de íon molecular, correspondentes à série homóloga:  $[\text{CH}_2=(\text{CH}_2)_m\text{COHOCH}_3]$ . Dentre os picos

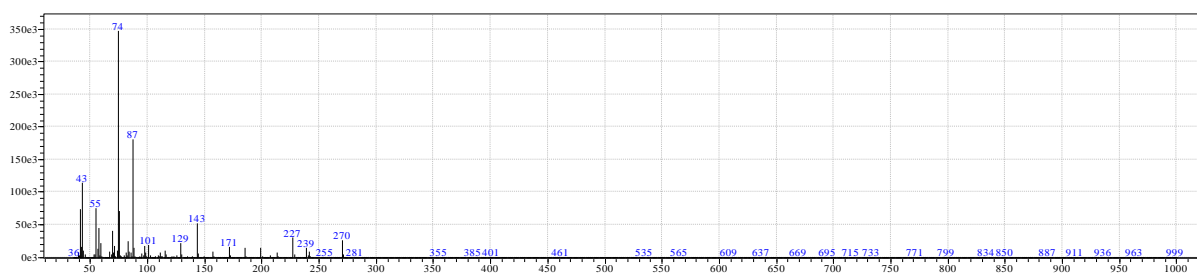
de íons que foram exibidos nos espectros de massas (Figuras 86, 87 e 88) que representam essa série homóloga, destacam-se os íons em  $m/z$  87 e  $m/z$  143.

Foram também observados nesses espectros de massas (Figuras 86, 87 e 88), a presença de íons alquilas em  $m/z$  43 e  $m/z$  57 resultantes da fragmentação da ligação C-C da porção alquila desses ésteres. Esses dados aliados à presença do pico do íon molecular e do pico  $[M-31]^+$ , que é referente a perda do grupo metoxila, corroboraram para a identificação desses três ésteres metílicos de cadeias alquílicas saturadas. A comparação desses espectros de massas (Figuras 86, 87 e 88) com espectros de massas existentes no banco de dados do aparelho (WILEY 229) apresentou um grau de similaridade acima de 90%, o que confirmou a identificação desses três ésteres metílicos de cadeia alquila saturada.

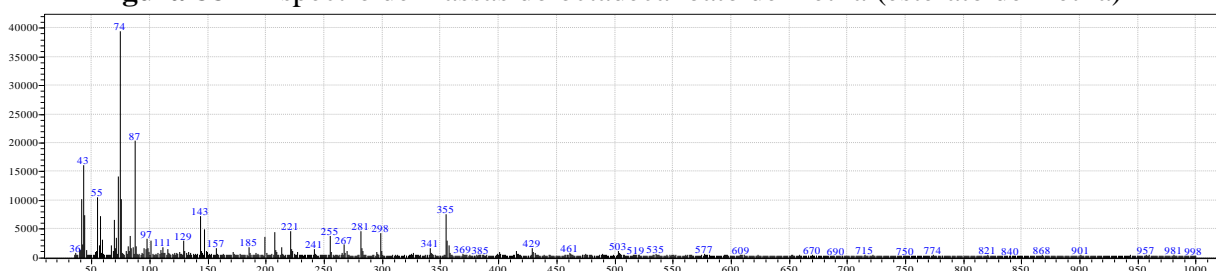
**Figura 86** - Espectro de massas do tetradecanoato de metila (miristato de metila)

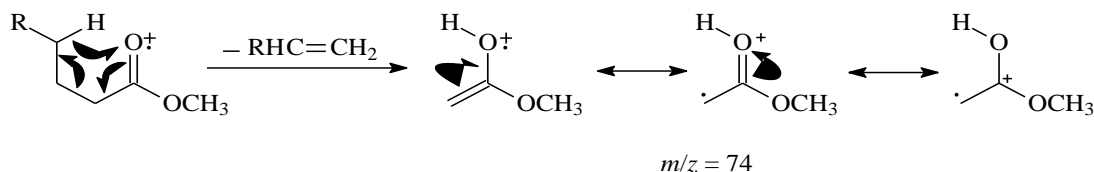


**Figura 87** - Espectro de massas do hexadecanoato de metila (palmitato de metila)

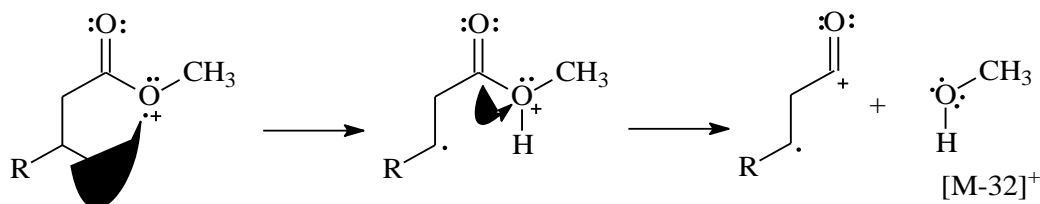


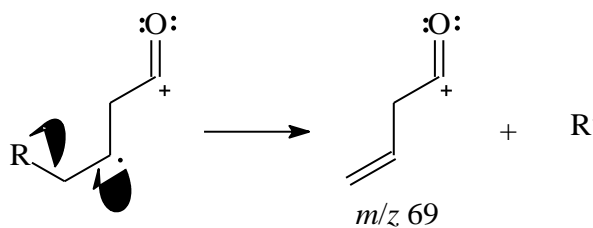
**Figura 88** - Espectro de massas do octadecanoato de metila (esterato de metila)



**Esquema 6 -** Formação do fragmento  $m/z$  74 (rearranjo de McLafferty)

Os espectros de massas (Figuras 89, 90 e 91) das substâncias *cis,cis*-9,12-octadecadienoato de metila (linoleato de metila), *cis*-9-octadecenoato de metila e *cis*-11-octadecenoato de metila apresentaram perfis muitos semelhantes, com picos intensos e característicos na região de menor massa. Através da observação de alguns fragmentos característicos nesses espectros, foi possível distinguir o espectro do éster di-insaturado dos espectros dos dois ésteres mono-insaturados. De acordo com Mjos (2004) os ésteres metílicos *mono*-insaturados apresentam picos de íons correspondentes à série homóloga insaturada com fórmula  $[C_nH_{2n-1}]^+$ , e geralmente o íon  $m/z$  55 ( $n = 4$ ) é o pico base no espectro. Outra característica marcante exibida nos espectros de massas de ésteres metílicos *mono*-insaturados são as presenças dos picos  $[M-32]^+$  e  $[M-74]^+$  que ocorrem devido ao rearranjo de McLafferty, sendo que, o íon  $[M-32]^+$  é resultante da perda do grupo álcool, conforme mostra o Esquema 7 (GEOCZE, 2011; OLIVEIRA, 2009). Além disso, segundo Oliveira (2009 apud MOURA, 2013), a formação do pico  $m/z$  69 nos ésteres metílicos *mono*-insaturados ocorre devido a clivagem da ligação C-C, posterior a formação do pico  $[M-32]^+$  (Esquema 8). Já os espectros de massas dos ésteres metílicos *di*-insaturados, exibem picos de íons que são atribuíveis a série homóloga com fórmula  $[C_nH_{2n-3}]^+$ , sendo que, geralmente o íon  $m/z$  67 ( $n = 5$ ) é o pico base (MJOS, 2004).

**Esquema 7 -** Formação do fragmento referente ao pico  $[M-32]^+$ 

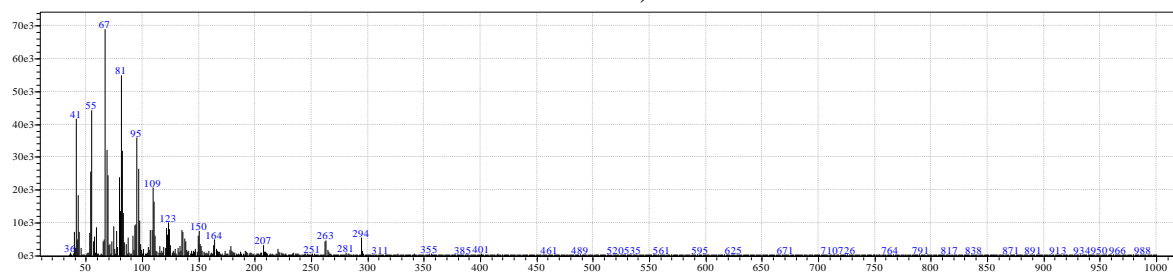
**Esquema 8** - Formação do fragmento referente ao pico  $m/z$  69

No espectro de massas (Figura 89) do *cis,cis*-9,12-octadecadienoato de metila (linoleato de metila) foi observado a presença do pico base em  $m/z$  67 juntamente com os picos em  $m/z$  81, 95, 109 e 123, atribuíveis a fragmentos hidrocarbônicos de fórmula  $[C_nH_{2n-3}]^+$  resultantes de clivagens alilílica. Além disso, foi observado o pico do íon molecular em  $m/z$  294 e o pico  $[M-31]^+$  em  $m/z$  263, referente a perda do grupo metoxila. Cabe salientar que a análise do espectro de massas (Figura 89) não forneceu evidências de íons que pudessem elucidar as posições das duas insaturações presentes no linoleato de metila. Apesar disso, a estrutura do *cis,cis*-9,12-octadecadienoato de metila (linoleato de metila) foi confirmada após comparação de seu espectro de massas com o espectro do *cis,cis*-9,12-octadecadienoato de metila (linoleato de metila) presente na biblioteca de espectros (WILEY 229) do aparelho, que apresentou similaridade de 94%.

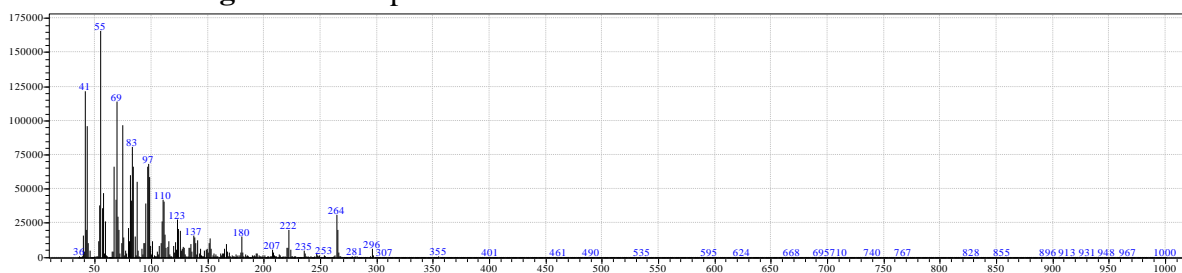
Os espectros de massas (Figuras 90 e 91) das substâncias *cis*-9-octadecenoato de metila e *cis*-11-octadecenoato de metila apresentaram perfis muito semelhantes. Dentre os picos presentes nesses espectros, destacam-se os mais intensos [ $m/z$  41, 55 (pico base), 83 e 97] correspondentes a fragmentos hidrocarbônicos de fórmula  $[C_nH_{2n-1}]^+$  resultantes de clivagens alilílica. Além disso, foi observado nesses espectros a presença do pico do íon molecular em  $m/z$  296, bem como, a presença dos picos de íons  $m/z$   $[M-32]^+$  e  $m/z$   $[M-74]^+$ . Verificou-se também nesses espectros de massas (Figuras 90 e 91) a presença do picos  $m/z$  69 resultante da clivagem da ligação C-C, posterior a formação do pico  $[M-32]^+$ , conforme apresentado no Esquema 8.

Cabe salientar que a análise desses espectros não forneceu evidências de íons que pudessem elucidar as posições da ligação dupla presentes no *cis*-9-octadecenoato de metila e *cis*-11-octadecenoato de metila. As estruturas do *cis*-9-octadecenoato de metila e *cis*-11-octadecenoato de metila foram confirmadas após comparação de seu espectro de massas com os espectros do *cis*-9-octadecenoato de metila e *cis*-11-octadecenoato de metila presente na biblioteca de espectros (WILEY 229) do aparelho, que apresentou similaridade de 95% e 92%, respectivamente.

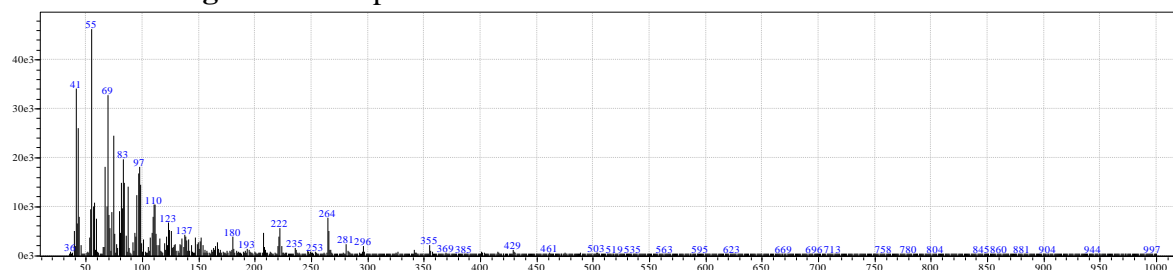
**Figura 89** - Espectro de massas do *cis,cis*-9,12-octadecadienoato de metila (linoleato de metila)



**Figura 90** - Espectro de massas do *cis*-9-octadecenoato de metila



**Figura 91** - Espectro de massas do *cis*-11-octadecenoato de metila

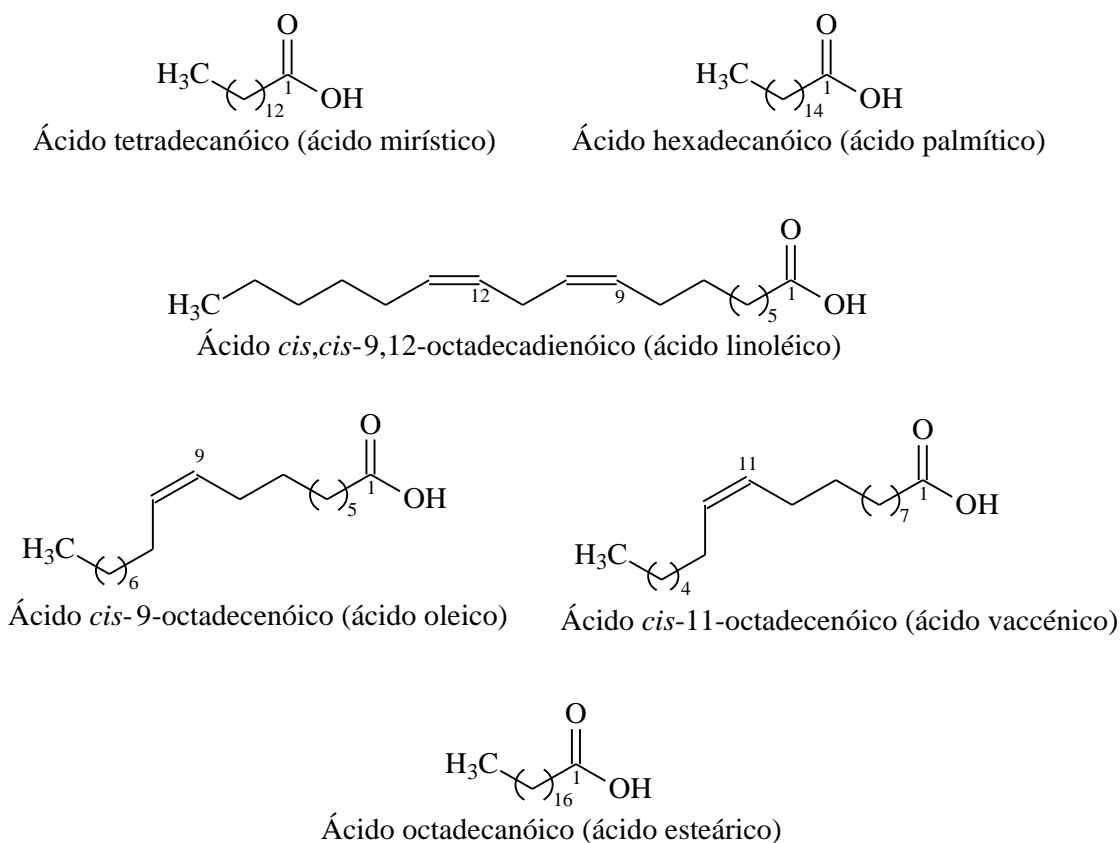


Estes resultados indicam que os componentes presentes na mistura de ésteres metílicos obtidos de **AG5**, encontram-se esterificados com os seguintes ácidos graxos: ácido mirístico (ácido tetradecanóico), ácido palmítico (ácido hexadecanóico), ácido linoléico (ácido *cis,cis*-9, 12-octadecadienóico), ácido oleico (ácido *cis*-9-octadecenoíco), ácido vaccénico (ácido *cis*-11-octadecenoíco e ácido esteárico (ácido octadecanóico).

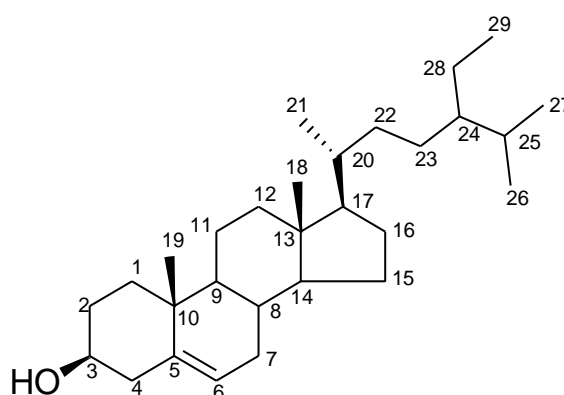
Sendo assim, admite-se que os principais ácidos graxos que compõem os triacilglicerídeos presentes em **AG5** são o ácido mirístico, ácido palmítico, ácido linoléico, ácido oleico, ácido vaccénico e o ácido esteárico (Figura 92).



**Figura 92** - Estruturas dos ácidos graxos que compõem os triacilglicerídeos presentes em **AG5**



### 5.1.3.6 Elucidação estrutural da substância **AG6**



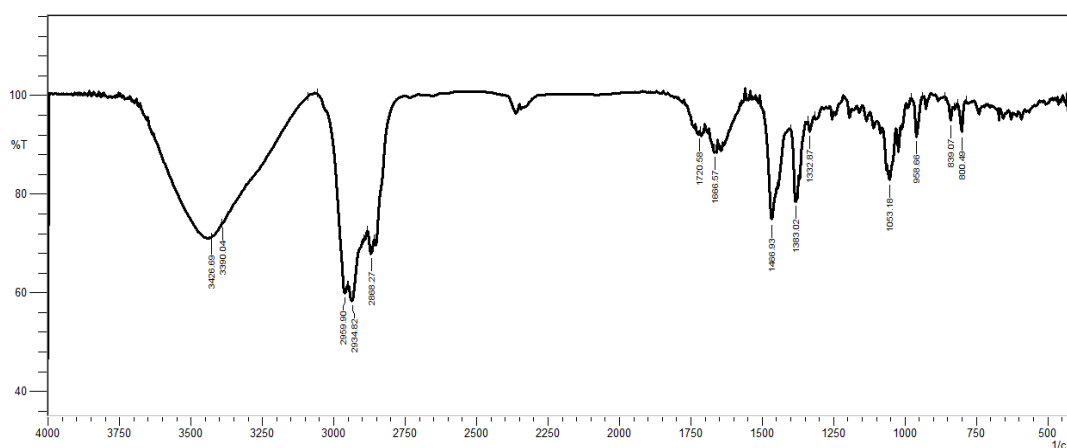
$\beta$ -sitosterol (**AG6**)

A substância **AG6** com massa de 208,5 mg foi isolada da fase diclorometano do caule de *A. graveolens* (subfração **DCAG-8-C**, conforme item 4.4.3.1, página 76), e apresentou-se como um sólido branco, solúvel em clorofórmio. Quando analisado por CCDC e revelada

com o reagente de Liebermann-Burchard apresentou uma coloração rósea indicativo de triterpeno ou esteroide. A elucidação estrutural da substância **AG6** foi baseada nos dados obtidos no infravermelho (IV), RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ , aliados aos dados da literatura (CORREIA, 1999).

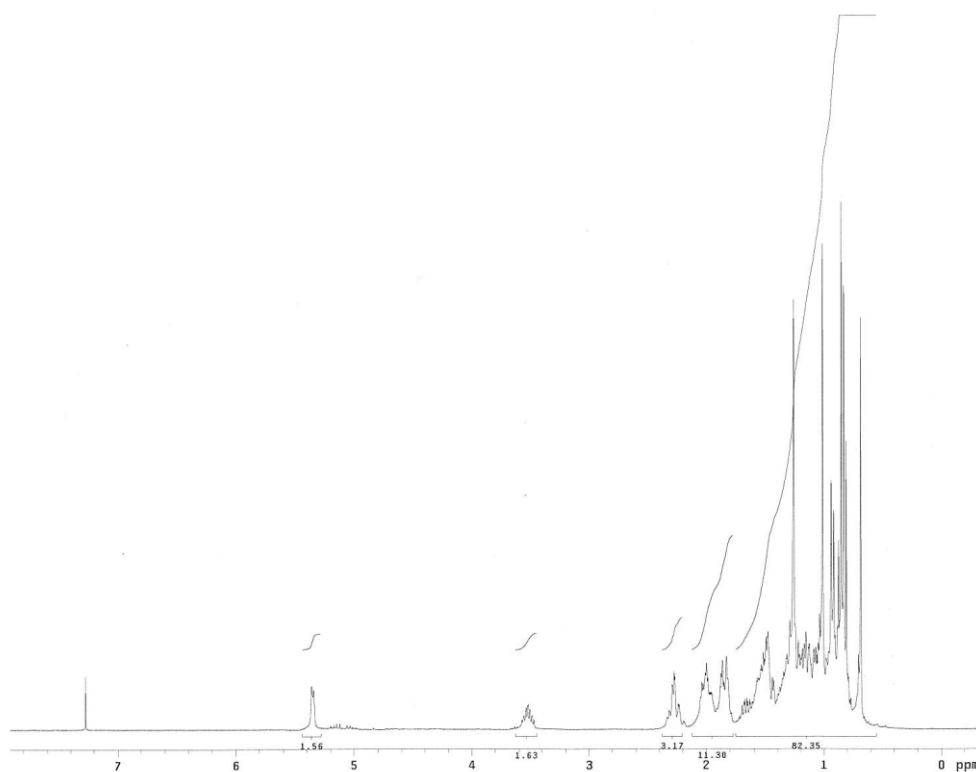
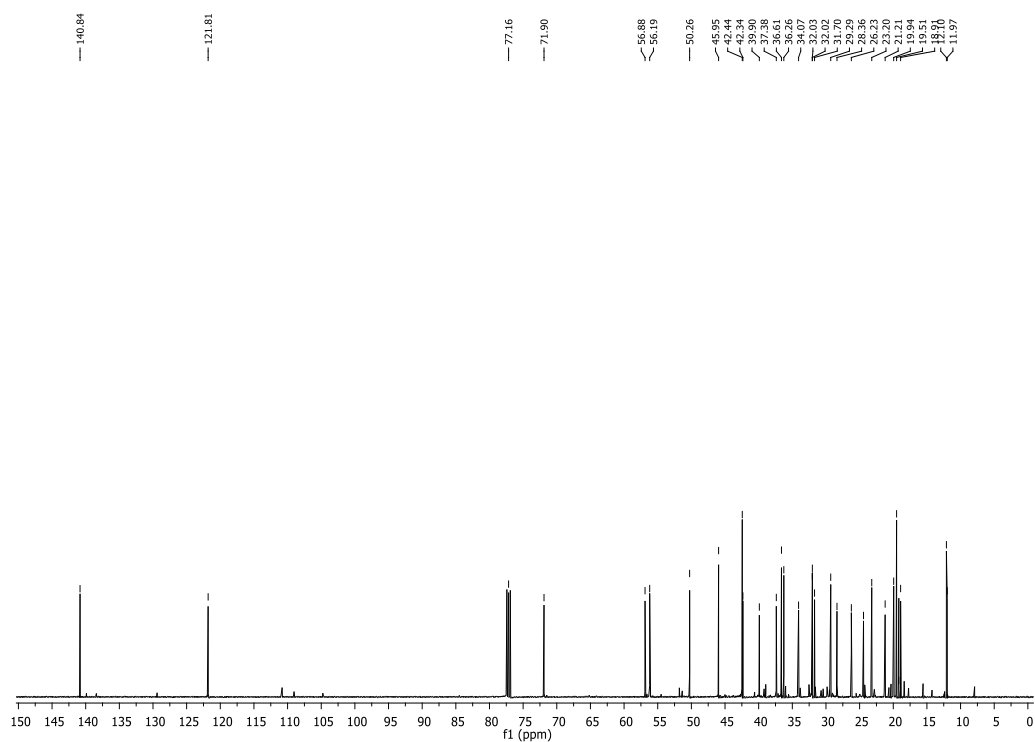
O espectro no infravermelho (Figura 93) exibiu bandas de absorções referentes a deformações axiais de O-H na região de  $3432\text{ cm}^{-1}$ ; absorção intensa na faixa de  $2959\text{ cm}^{-1}$  referente a estiramento de grupo CH. As absorções na região de  $1466$ ,  $1383$  e  $1062\text{ cm}^{-1}$  representam, respectivamente, deformações angulares de  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  e deformação axial de C-O.

**Figura 93.** Espectro na região do infravermelho (IV) da substância **AG6\***



\* Espectro obtido em filme de clorofórmio

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 94) de **AG6**, indicou vários sinais na região entre  $\delta$  0,67 e  $\delta$  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  $\delta$  71,9 (CH) e de carbonos olefínicos em  $\delta$  140,8 (C não hydrogenado) e  $\delta$  121,8 (CH), observados nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 95). Através da comparação dos dados obtidos, especialmente do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , com dados obtidos da literatura (CORREIA, 1999) (Tabela 32), foi possível a identificação inequívoca da substância **AG6** como sendo o  $\beta$ -sitosterol.

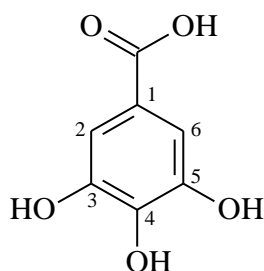
**Figura 94** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **AG6** [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]**Figura 95** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **AG6** [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]

**Tabela 32** – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  [125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] de **AG6** e valores de RMN de  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)] da literatura

<b>AG6</b>				<b><math>\beta</math>-sitosterol*</b>			
<b>Posição</b>	$\delta$ $^{13}\text{C}$	<b>Posição</b>	$\delta$ $^{13}\text{C}$	<b>Posição</b>	$\delta$ $^{13}\text{C}$	<b>Posição</b>	$\delta$ $^{13}\text{C}$
<b>1</b>	37,4	<b>16</b>	28,4	<b>1</b>	37,1	<b>16</b>	28,1
<b>2</b>	31,7	<b>17</b>	56,2	<b>2</b>	31,5	<b>17</b>	55,9
<b>3</b>	71,9	<b>18</b>	12,1	<b>3</b>	71,7	<b>18</b>	11,9
<b>4</b>	42,3	<b>19</b>	19,5	<b>4</b>	42,2	<b>19</b>	19,3
<b>5</b>	140,8	<b>20</b>	36,3	<b>5</b>	140,6	<b>20</b>	36,0
<b>6</b>	121,8	<b>21</b>	18,9	<b>6</b>	121,6	<b>21</b>	18,7
<b>7</b>	32,0	<b>22</b>	34,1	<b>7</b>	31,8	<b>22</b>	33,8
<b>8</b>	31,7	<b>23</b>	26,2	<b>8</b>	31,8	<b>23</b>	25,9
<b>9</b>	50,3	<b>24</b>	46,0	<b>9</b>	50,0	<b>24</b>	45,7
<b>10</b>	36,6	<b>25</b>	29,3	<b>10</b>	36,4	<b>25</b>	29,0
<b>11</b>	21,2	<b>26</b>	19,5	<b>11</b>	21,0	<b>26</b>	19,3
<b>12</b>	39,9	<b>27</b>	19,9	<b>12</b>	39,6	<b>27</b>	19,7
<b>13</b>	42,4	<b>28</b>	23,2	<b>13</b>	42,2	<b>28</b>	22,9
<b>14</b>	56,9	<b>29</b>	12,0	<b>14</b>	56,7	<b>29</b>	11,9
<b>15</b>	24,4	-	-	<b>15</b>	24,2	-	-

\*CORREIA, 1999

### 5.1.3.7 Elucidação estrutural da substância AG7

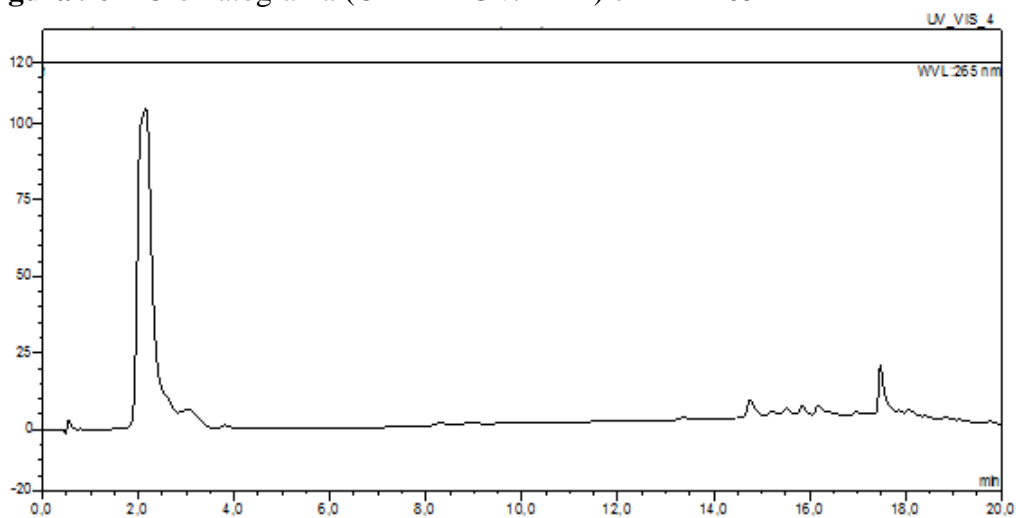


**AG7 (ácido gálico)**

A substância **AG7** com massa de 15,4 mg foi isolada da fase acetato de etila do caule de *A. graveolens* (subfração **ACAG-11-G-8**, conforme item 4.4.4.2, página 82), e apresentou-se com um sólido branco, solúvel em metanol. O monitoramento da subfração **ACAG-11-G-8** por CCDC, seguida de revelação com solução de  $\text{FeCl}_3$ , indicou que essa subfração era constituída de uma substância fenólica devido à coloração escura na cromatoplaça. Através da análise da subfração **ACAG-11-G-8** por CLAE-DAD, foi observado no cromatograma (Figura 96) a presença de um pico com tempo de retenção (tR) de 2,15 minutos, no qual o

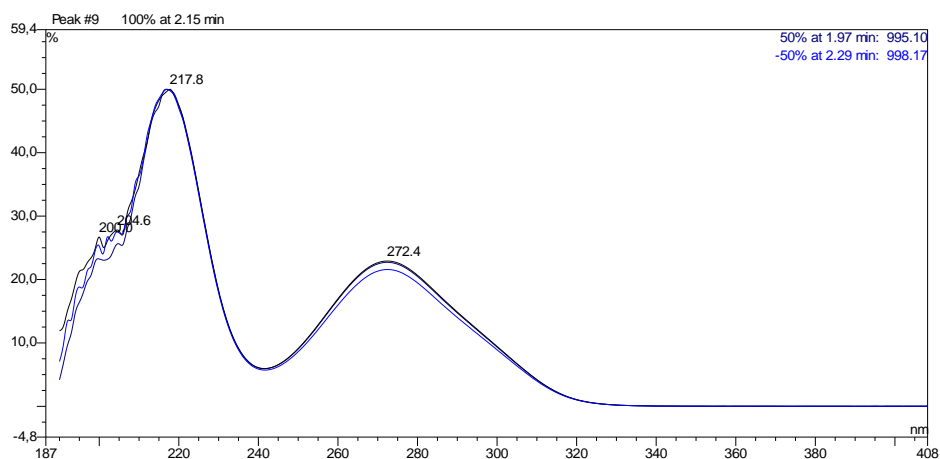
espectro no UV/Vis correspondente a esse pico (Figura 97) revelou  $\lambda_{\text{máx}}$  em 218 e 272 nm, sugerindo tratar-se realmente de uma substância fenólica.

**Figura 96** – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em  $\lambda = 265$  nm da substância **AG7**



\* Condições cromatográficas ver item 4.1, página 65. Tempo de retenção (tR) de **AG7** = 2,15 minutos

**Figura 97** – Espectro no UV, obtido pelo detector DAD, da substância **AG7**



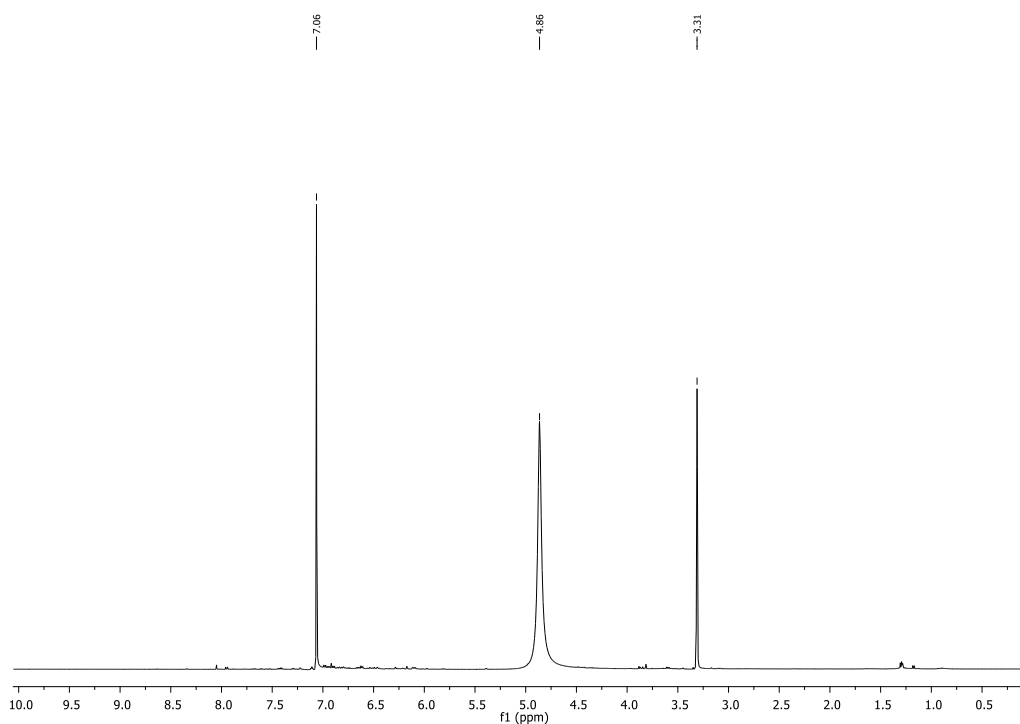
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 98) de **AG7** mostrou um singlete em  $\delta$  7,06, valor característico dos dois hidrogênios ligados a carbonos aromáticos (H-2 e H-6) do ácido gálico.

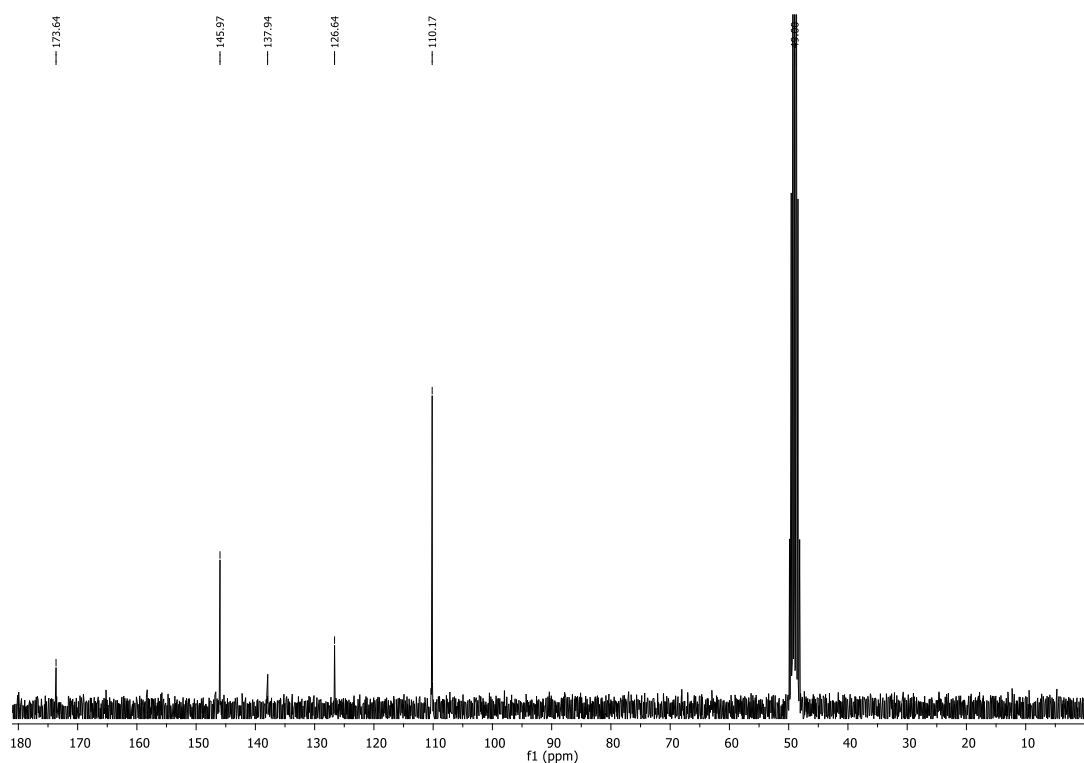
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **AG7** (Figura 99) indicou a presença de cinco sinais, entre eles um sinal em  $\delta$  173,6 de carbono não hydrogenado, referente à carbonila de ácido conjugado, três sinais de carbonos não hydrogenados e um sinal de carbono metínico. O sinal em  $\delta$  146,0, referente a dois carbonos oxigenados, foi atribuído aos carbonos C-3 e C-5, o

sinal em  $\delta$  137,9 foi atribuído ao C-4, o sinal em  $\delta$  126,6 ao C-1 e o sinal em  $\delta$  110,2 (2C) foi atribuído aos carbonos C-2 e C-6.

Sendo assim, através dessa comparação e da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e dados da literatura (MOREIRA, 2009) (Tabela 33), foi possível identificar a substância **AG7** como sendo o ácido gálico.

**Figura 98** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **AG7** [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]

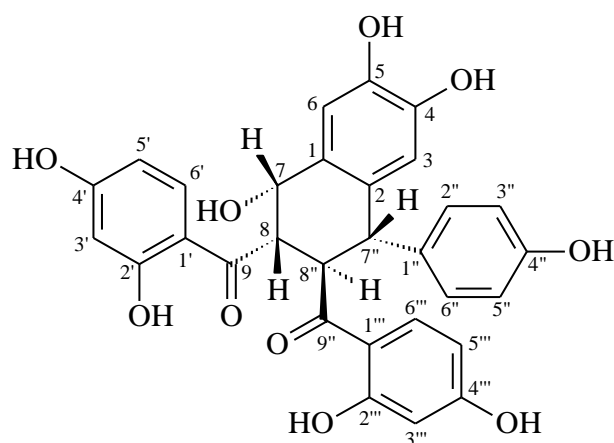


**Figura 99** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **AG7** [75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]**Tabela 33** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de **AG7** [ $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)] e valores da literatura

Posição	AG7		Ácido gálico*	
	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	126,6	-	126,6
2	7,06 (s)	110,2	7,11 (s)	110,2
3	-	146,0	-	146,0
4	-	137,9	-	137,9
5	-	146,0	-	146,0
6	7,06 (s)	110,2	7,11 (s)	110,2
7	-	173,6	-	173,6

\*MOREIRA, 2007.

### 5.1.3.8 Elucidação estrutural da substância AG8

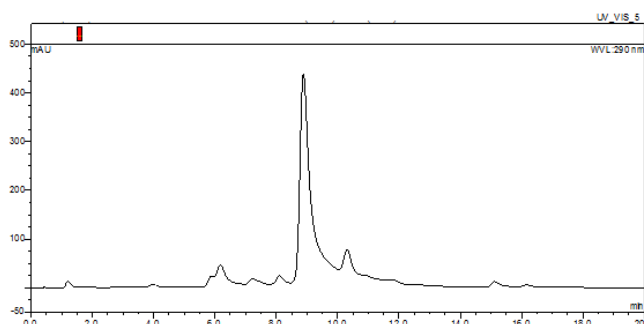


**AG8**

A substância **AG8** (189,2 mg) foi isolada da fase acetato de etila do caule de *A. graveolens* (subfração **ACAG-11-G-4-B**, conforme item 4.4.4.2, página 83), e apresentou-se com um sólido amarelo, solúvel em metanol. A substância **AG8** apresentou temperatura de fusão de 206,3-208,4 °C.

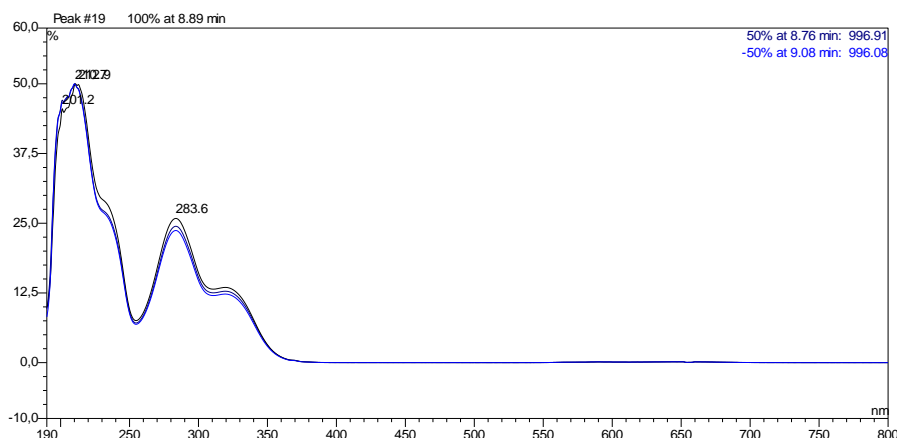
O monitoramento da subfração **ACAG-11-G-4-B** por CCDC, seguida de revelação com solução de FeCl<sub>3</sub>, indicou que essa subfração era constituída de uma substância apresentando grupos fenólicos devido a coloração escura na cromatoplaça. Através da análise da subfração **ACAG-11-G-4-B** por CLAE-DAD, foi observado no cromatograma (Figura 100) a presença de um pico com tempo de retenção (t<sub>R</sub>) de 8,9 minutos, no qual o espectro no UV/Vis correspondente a esse pico (Figura 101) revelou  $\lambda_{\text{máx}}$  em 212, 284 e 320 nm, corroborando tratar-se realmente de uma substância fenólica.

**Figura 100** – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em  $\lambda = 290$  nm de **AG8**



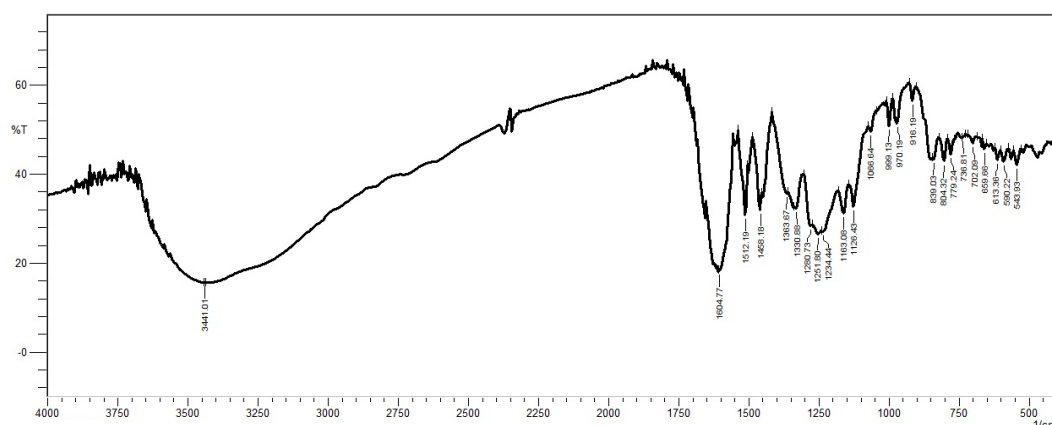
\* Condições cromatográficas ver item 4.1, página 65. Tempo de retenção (t<sub>R</sub>) de **AG8** = 8,9 minutos



**Figura 101** – Espectro no UV, obtido pelo detector DAD, da substância **AG8**

A elucidação estrutural da substância **AG8** foi realizada com base na análise dos espectros no IV, RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT  $135^\circ$ , HSQC, HMBC, NOESY e EM de alta resolução.

O espectro na região do infravermelho (IV) de **AG8** (Figura 102) apresentou banda de absorção larga em  $3441,0\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento axial de hidroxilas (O-H), banda em  $1604,8\text{ cm}^{-1}$  típico de estiramento axial de ligação C=O conjugada, além de bandas em  $1512,2$ ,  $1458,2$  e  $1363,7\text{ cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento da ligação C=C de anel aromático.

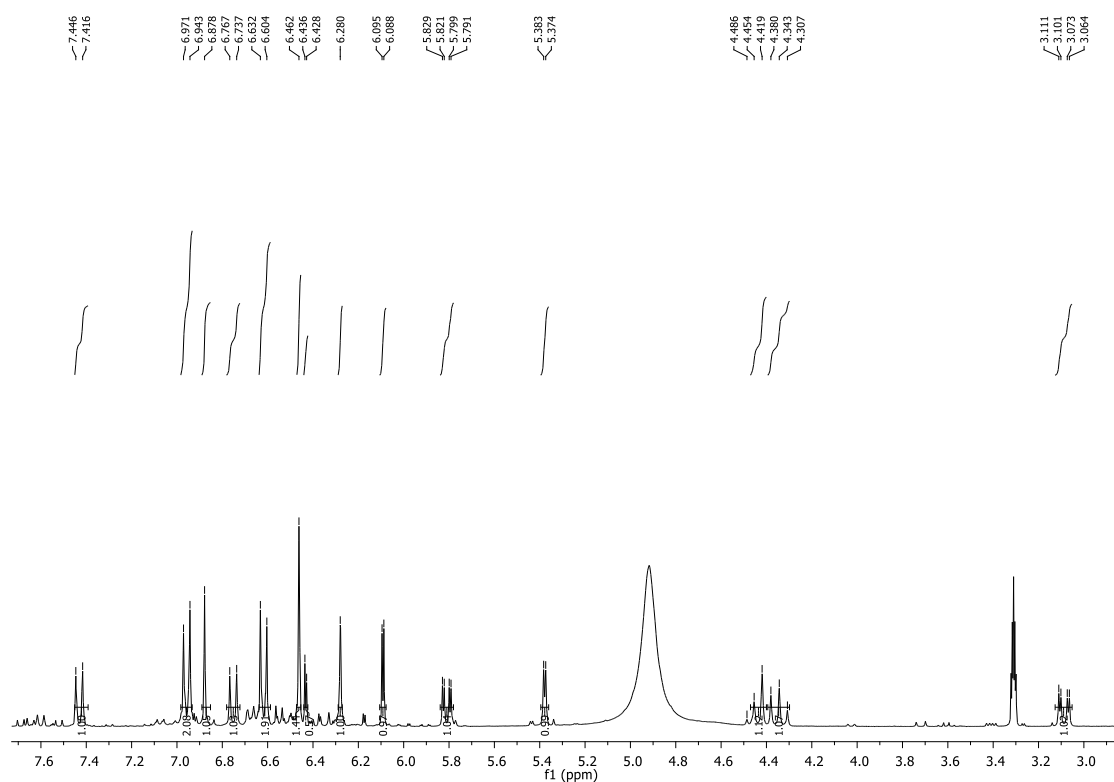
**Figura 102** – Espectro na região do infravermelho (IV) da substância **AG8\***

\*Espectro obtido em pastilha de KBr

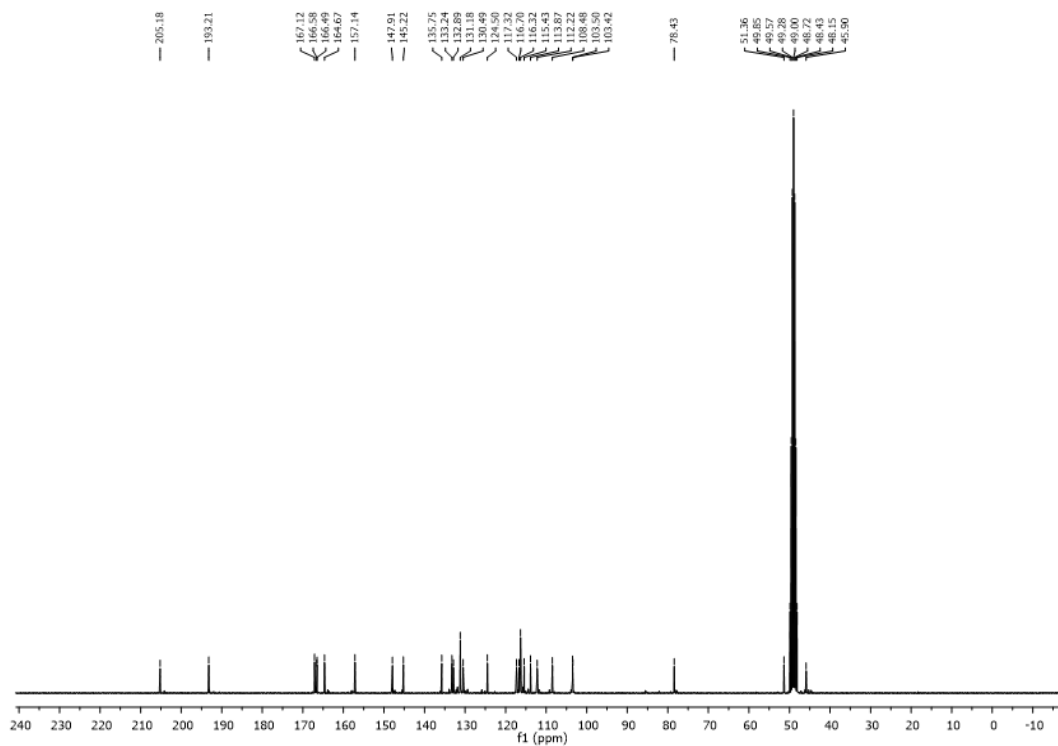
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 103) da substância **AG8**, apresentou sinais na região compreendida entre  $\delta 3,06$  e  $\delta 7,43$ . A presença de sinais principalmente na região entre  $\delta 6,09$  e  $\delta 7,73$  (sinais característicos de hidrogênios aromáticos), indicou a presença de anéis

aromáticos na estrutura da substância **AG8**. Através da análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 104) e DEPT  $135^\circ$  (Figura 105) de **AG8**, verificou-se a presença de sinais para 30 carbonos, dos quais 16 deles foram carbonos metínicos e 14 não-hidrogenados. Dentre os sinais referentes aos carbonos não-hidrogenados, destacou-se dois sinais em  $\delta$  193,2 e  $\delta$  205,2, característicos de carbonila (Figura 104).

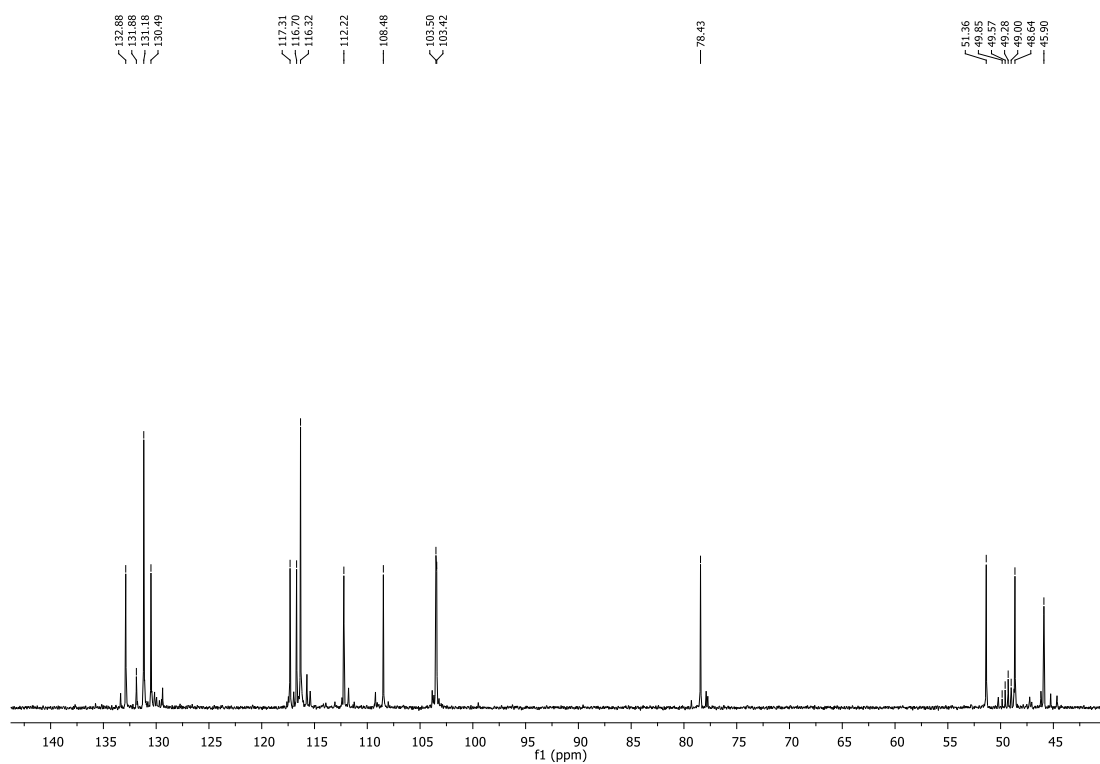
**Figura 103** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **AG8** [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 104** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **AG8** [75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



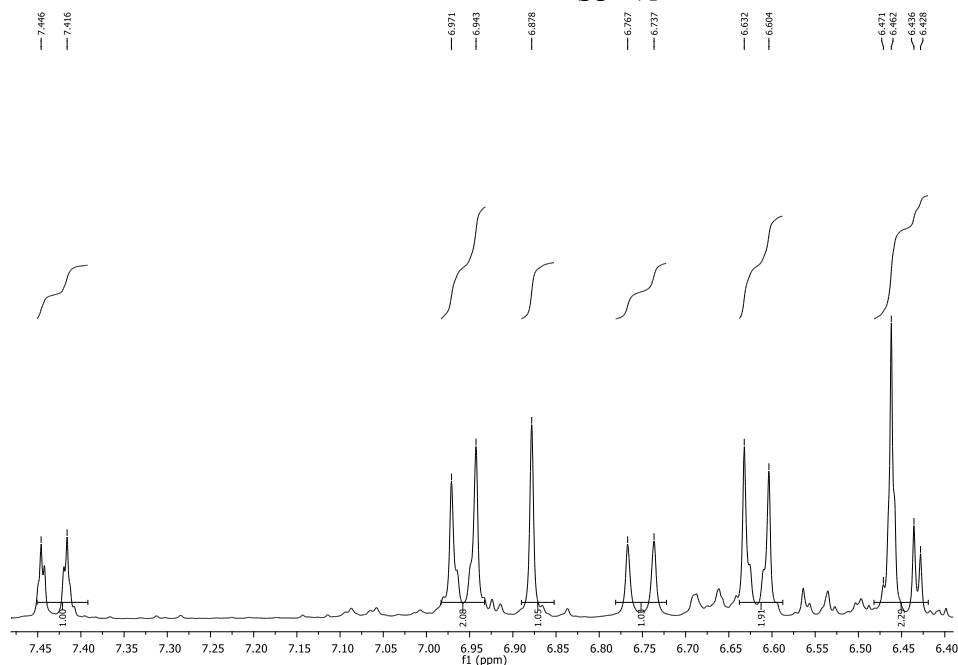
**Figura 105** – DEPT 135° de **AG8** [75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]

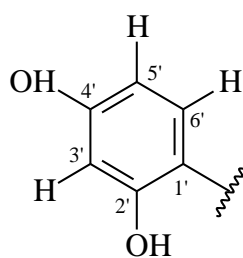
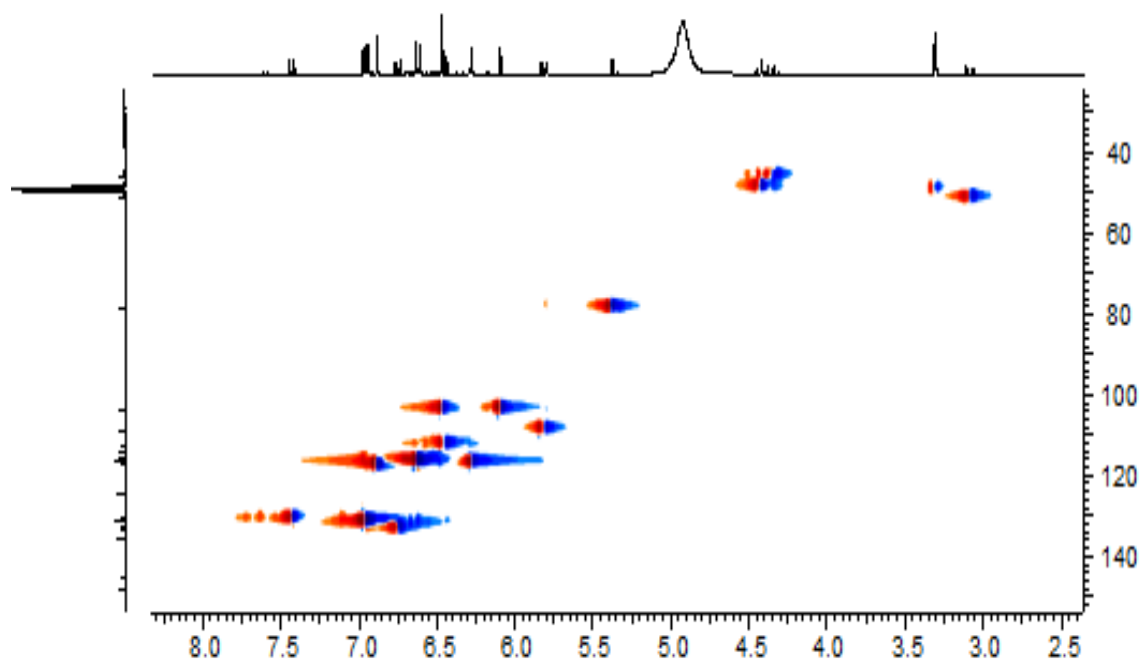
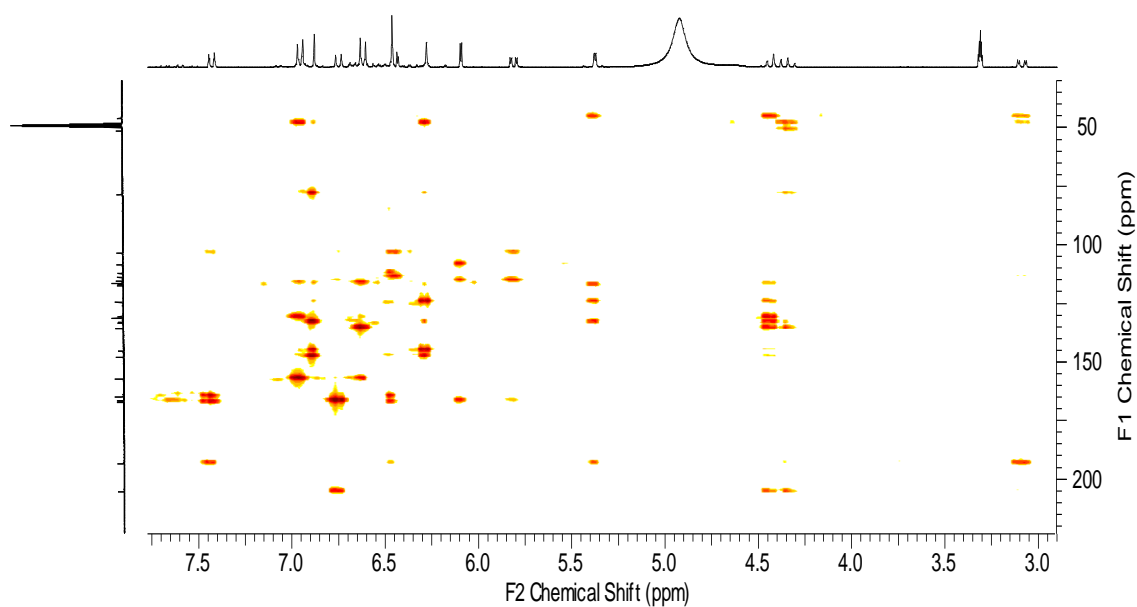


Na região de sinais de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , melhor visualizado no espectro ampliado (Figura 106), pode-se observar a presença de um duplo dubleto em  $\delta$  6,45 ( $J = 2,3$  e  $9,0$  Hz) sobreposto com um dubleto em  $\delta$  6,42 ( $J = 2,3$  Hz), referentes aos hidrogênios H-5' e H-3', respectivamente. A constante de acoplamento de  $2,3$  Hz observada em ambos dubletos indicou o acoplamento *meta* do H-5' com o H-3'. Além disso, observou-se acoplamento em *orto* do H-5' com um dubleto em  $\delta$  7,43 ( $J = 9,0$  Hz) referente ao hidrogênio H-6'. Esses sinais remetem aos hidrogênios do anel **A** da unidade **I** do dímero de chalcona (Figura 107).

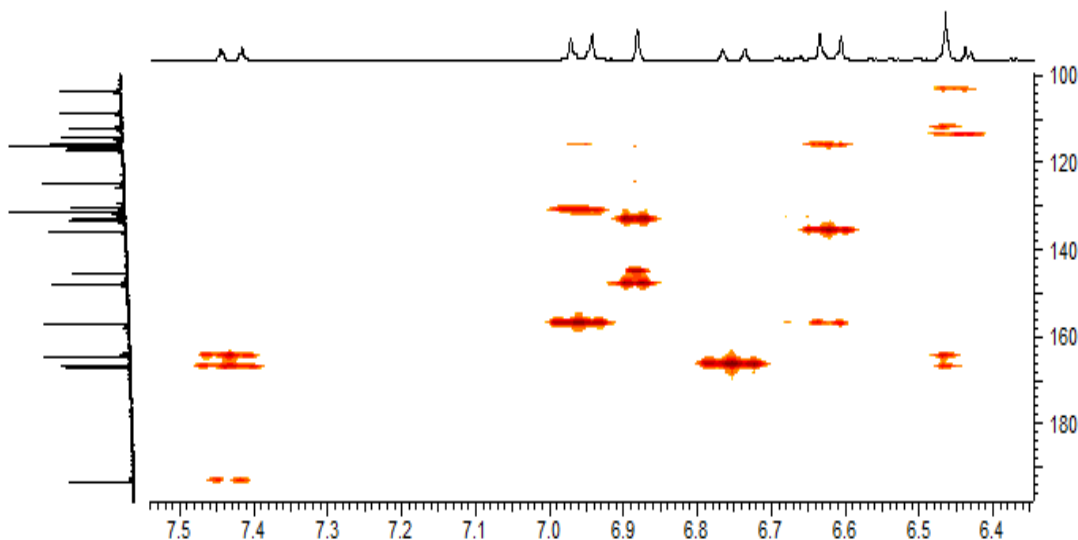
Foi verificado através da análise do espectro de HSQC (Figura 108) correlação do sinal do hidrogênio H-5' em  $\delta$  6,45 com o sinal em  $\delta$  122,2, referente ao carbono C-5'. Além disso, nesse mesmo espectro, foi observado correlações dos hidrogênios em  $\delta$  6,42 e  $\delta$  7,43 com os carbonos em  $\delta$  103,5 (C-3') e  $\delta$  130,5 (C-6'), respectivamente. A análise do espectro de HMBC (Figuras 109 e 110) permitiu verificar a presença de correlações do H-3' ( $\delta$  6,42) com os carbonos em  $\delta$  164,7 (C-2'),  $\delta$  167,1 (C-4'), bem como, as correlações a três ligações entre o H-5' ( $\delta$  6,45) com os carbonos em  $\delta$  113,9 (C-1') e  $\delta$  103,5 (C-3'). Ainda nesse mesmo espectro, foi observado correlações do H-6' ( $\delta$  7,43) com os carbonos em  $\delta$  164,7 (C-2'),  $\delta$  167,1 (C-4') e com o carbono do grupo C=O em  $\delta$  193,2 (C-9). Essas atribuições foram importantes para comprovar que o grupo carbonílico encontrava-se ligado ao anel **A** da unidade **I**. As correlações observadas no espectro de HMBC estão sumarizadas na Figura 111.

**Figura 106** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ampliado na região entre  $\delta$  6,42 e  $\delta$  7,43 da **AG8** [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]

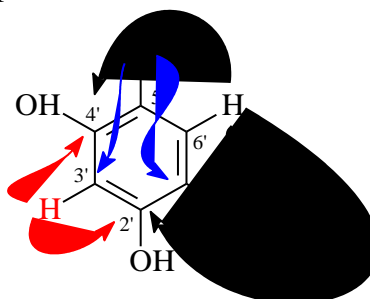


**Figura 107** – Estrutura do anel A da unidade I do dímero de chalcona**Figura 108** – Espectro de HSQC da substância AG8 [300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm)]**Figura 109** – Espectro de HMBC da substância AG8 [300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm)]

**Figura 110**– Ampliação na região entre  $\delta$  6,40 e  $\delta$  7,50/  $\delta$  100,0 e  $\delta$  195,0 do espectro de HMBC de **AG8** [300 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 111** - Principais correlações observadas no espectro de HMBC, entre elas, a que permitiu posicionar a carbonila próxima ao anel **A** da unidade **I** do dímero de chalcona



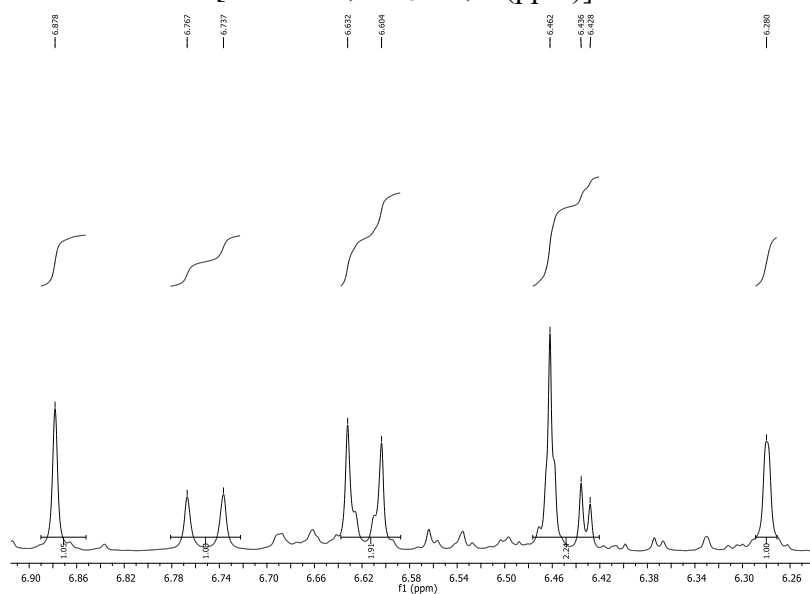
Na análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H, como pode ser visto no espectro ampliado na Figura 112, também foi observado a presença de dois singletos referentes a hidrogênios ligados a carbonos aromáticos em  $\delta$  6,28 e  $\delta$  6,88, integrando para um hidrogênio cada, correspondentes aos hidrogênios H-3 e H-6, respectivamente, do anel aromático 1,2,4,5-tetrasubstituído (Figura 113), sendo este atribuído ao anel **B** da unidade **I** do dímero de chalcona. O espectro de HSQC (Figura 108) revelou correlações dos sinais dos hidrogênios em  $\delta$  6,28 (H-3) e  $\delta$  6,88 (H-6) com os sinais dos carbonos em  $\delta$  116,7 (C-3) e  $\delta$  117,3 (C-6), respectivamente. E, a análise do espectro de HMBC (Figura 109) possibilitou observar a correlação entre o sinal em  $\delta$  6,28 (H-3) com os sinais em  $\delta$  124,5  $\delta$  145,2 e  $\delta$  147,9, referentes aos carbonos C-1, C-5 e C-4, respectivamente. Além disso, foi observado nesse mesmo espectro correlação entre o sinal do singlete em  $\delta$  6,88 (H-6) com os sinais em  $\delta$  133,2

$\delta$  145,2,  $\delta$  147,9 e  $\delta$  78,4, referentes aos carbonos C-2, C-5, C-4 e C-7, respectivamente (Figura 114).

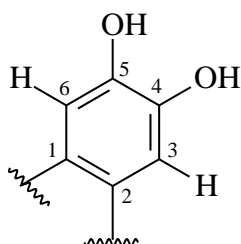
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (ampliado na Figura 115) foi observado a presença de sinais de hidrogênios ligados a carbonos  $sp^3$ . O espectro mostrou a presença de um dubleto em  $\delta$  5,38 ( $J = 2,7$ , H-7) acoplado com um duplo dubleto em  $\delta$  3,09 ( $J = 11,1; 2,7$ , H-8), e pela constante de acoplamento de 2,7 Hz sugere posições *equatorial-axial* entre os hidrogênios H-7 e H-8 e, portanto, relação *cis* entre eles. Verificou-se também acoplamento entre o duplo dubleto em  $\delta$  3,09 ( $J = 11,1; 2,7$ , H-8) com o duplo dubleto em  $\delta$  4,34 ( $J = 10,8; 11,1$ , H-8''), e o valor da constante de acoplamento de 11,1 Hz indica posições *diaxiais* entre H-8 e H-8'', evidenciando a relação *trans* entre esses hidrogênios. Além disso, o espectro também evidenciou o duplo dubleto  $\delta$  4,34 ( $J = 10,8; 11,1$ , H-8'') acoplado com o dubleto em 4,44 ( $J = 10,8$ , H-7''), com uma constante de acoplamento de 10,8 Hz, sugerindo posições *diaxiais* entre H-8'' e H-7'' e, conseqüentemente, relação *trans* entre eles.

O espectro de HSQC (Figura 108) mostrou correlações entre os hidrogênios em  $\delta$  5,38 e  $\delta$  3,09 com os carbonos em  $\delta$  78,4 (C-7) e  $\delta$  51,4 (C-8), respectivamente. Ainda no espectro de HSQC (Figura 108) foi observado correlações entre os hidrogênios em  $\delta$  4,44 e  $\delta$  4,34 com os carbonos em  $\delta$  48,4 (C-7'') e  $\delta$  45,9 (C-8''), respectivamente. Por outro lado, foi observado no espectro de HMBC (Figura 109) correlação a três ligações ( $^3J_{\text{C,H}}$ ) entre o H-3 e o carbono em  $\delta$  48,4 (C-7''), bem como, acoplamento heteronuclear a duas ligações ( $^2J_{\text{C,H}}$ ) entre o hidrogênio em  $\delta$  4,44 (H-7'') e o carbono em  $\delta$  45,9 (C-8''). Além disso, o espectro de HMBC (Figura 109) também mostrou acoplamento heteronuclear a duas ligações ( $^2J_{\text{C,H}}$ ) entre o hidrogênio em  $\delta$  3,09 (H-8) com os carbonos em  $\delta$  193,2 (C-9) e 45,9 (C-8''), bem como, correlação a longa distância ( $^3J_{\text{C,H}}$ ) entre o hidrogênio em  $\delta$  5,38 (H-7) e o carbono carbonílico em  $\delta$  193,2 (C-9). Cabe salientar que através das observações desses acoplamentos foi possível conectar o anel **A** com o anel **B** da unidade **I** do dímero de chalcona, conforme está representado na Figura 116.

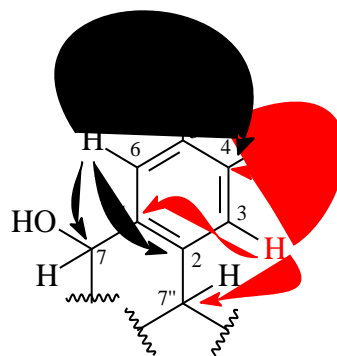
**Figura 112** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ampliado na região entre  $\delta$  6,28 e  $\delta$  6,88 da **AG8** [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 113** – Anel aromático 1,2,4,5-tetrasubstituído do anel **B** da unidade **I** do dímero de chalcona

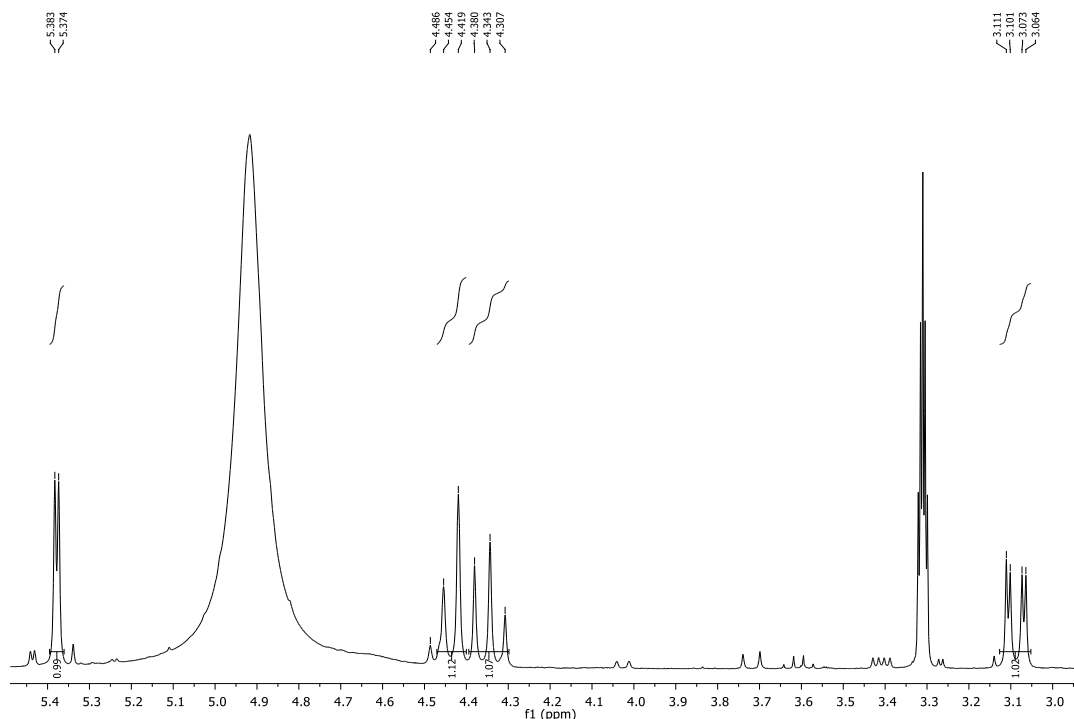


**Figura 114** – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel **B** da unidade **I** do dímero de chalcona

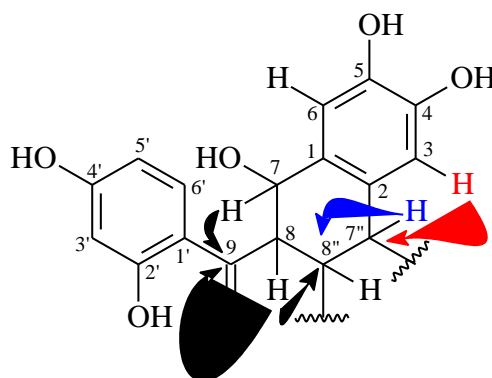




**Figura 115** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ampliado na região entre  $\delta$  3,09 e  $\delta$  5,38 da **AG8** [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 116** – Correlação observada no espectro de HMBC que permitiu conectar o anel **A** ao anel **B** da unidade **I** do dímero de chalcona

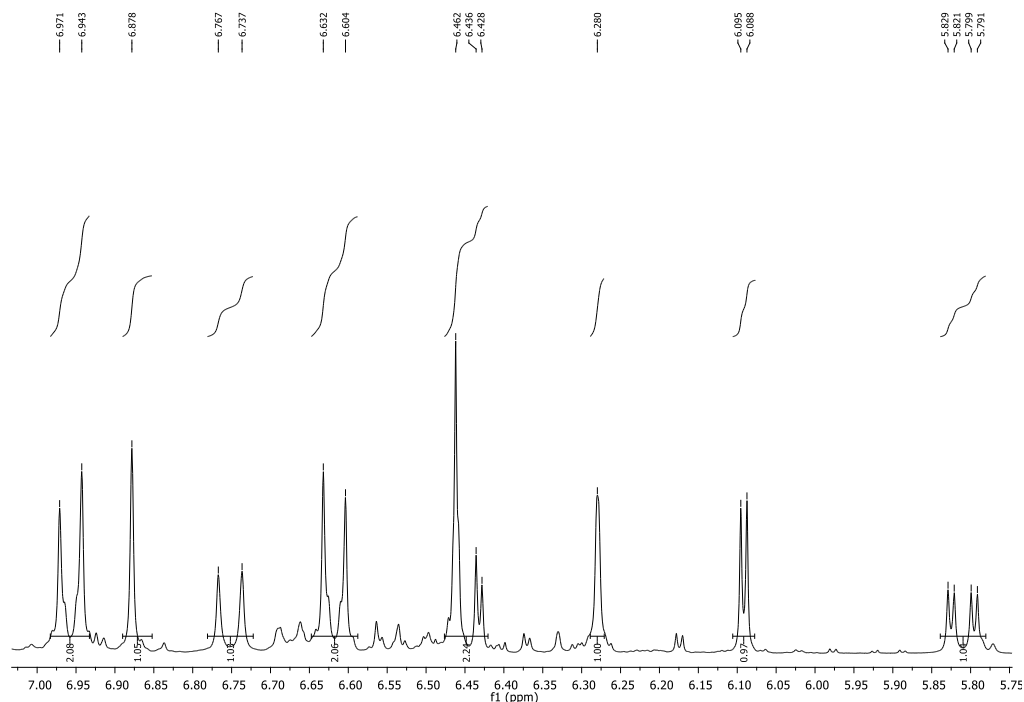


O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (ampliado na Figura 117), apresentou dois dubletos em  $\delta$  6,96 ( $J = 8,5$  Hz) e  $\delta$  6,62 ( $J = 8,5$  Hz), integrando para dois hidrogênios cada, correspondentes às posições 2'',6'' e 3'',5'', respectivamente, característico de anel aromático 1,4-dissubstituído. Sendo este atribuído ao anel **B** da unidade **II** do dímero de chalcona. Através da análise do espectro de HSQC (ampliado na Figura 118), foi possível observar as correlações do dubleto em  $\delta$  6,96 com os carbonos C-2'' e 6'' ( $\delta$  131,2) e do dubleto em  $\delta$  6,62 com os carbonos C-3'',5'' ( $\delta$  116,3). Por outro lado, a análise do espectro de HMBC (Figura 109), mostrou as correlações a três ligações ( $^3J_{\text{C,H}}$ ) entre os hidrogênios H-2'',6'' e o carbono

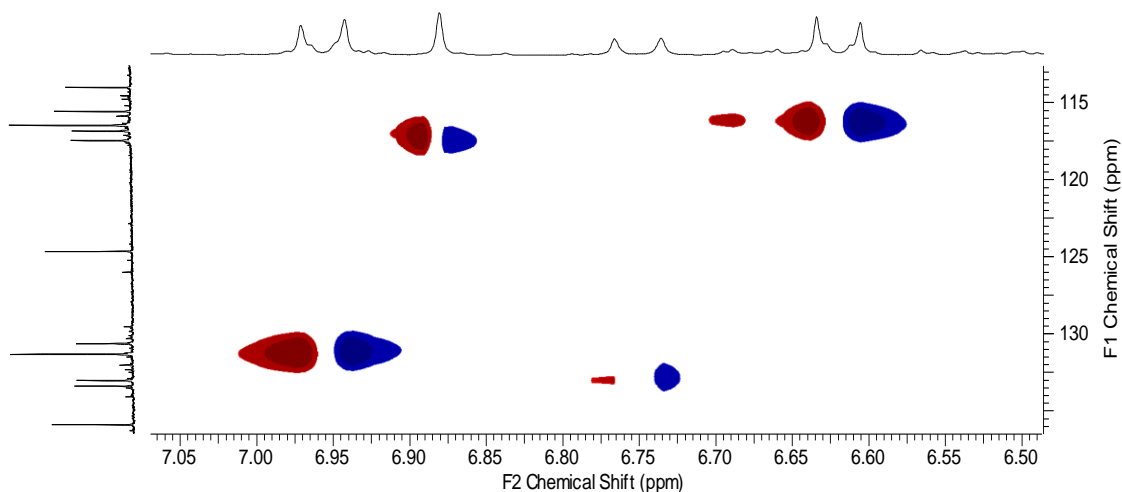
em  $\delta$  48,4 (C-7''), além disso, foi verificada correlação a três ligações ( ${}^3J_{C,H}$ ) entre os hidrogênios H-3'',5'' e o carbono em  $\delta$  135,8 (C-1''). Cabe salientar que através do acoplamento entre os hidrogênios H-2'',6'' e o carbono  $\delta$  48,4 (C-7'') a longa distância ( ${}^3J_{C,H} - H-2'',6'' \rightarrow C-7''$ ), foi possível localizar o anel **B** da unidade **II** próximo ao anel **B** da unidade **I**. O espectro de HMBC (Figura 109) também revelou acoplamento ( ${}^2J_{C,H}$ ) entre o duplete referente ao H-7'' em  $\delta$  4,44 com o carbono C-1'' ( $\delta$  135,8). Todas essas correlações podem ser melhor observadas na Figura 119.

Além dessas correlações observadas no espectro de HMBC, foi também verificado acoplamento ( ${}^3J_{C,H}$ ) entre H-7'' ( $\delta$  4,44) e o carbono C-9'' ( $\delta$  205,2; C=O) e os acoplamentos a três ligações ( ${}^3J_{C,H}$ ) entre o H-7 ( $\delta$  5,38) e os carbonos C-8'' ( $\delta$  45,9) e C-2 ( $\delta$  133,2). Nesse mesmo espectro foi observado acoplamento a duas ligações ( ${}^2J_{C,H}$ ) entre o H-8'' ( $\delta$  4,98) e os carbonos C-8 ( $\delta$  51,4) e C-9'' ( $\delta$  205,2; C=O). Cabe salientar que através dessas correlações observadas no espectro de HMBC (ampliado da Figura 120), foi possível localizar uma carbonila diretamente ligada ao C-8''. Essas correlações podem ser melhor visualizadas na Figura 121.

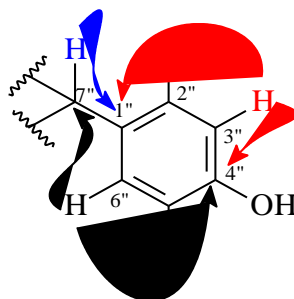
**Figura 117** – Espectro de RMN de  ${}^1H$  ampliado na região entre  $\delta$  5,80 e  $\delta$  6,97 da **AG8** [300 MHz,  $CD_3OD$ ,  $\delta$  (ppm)]



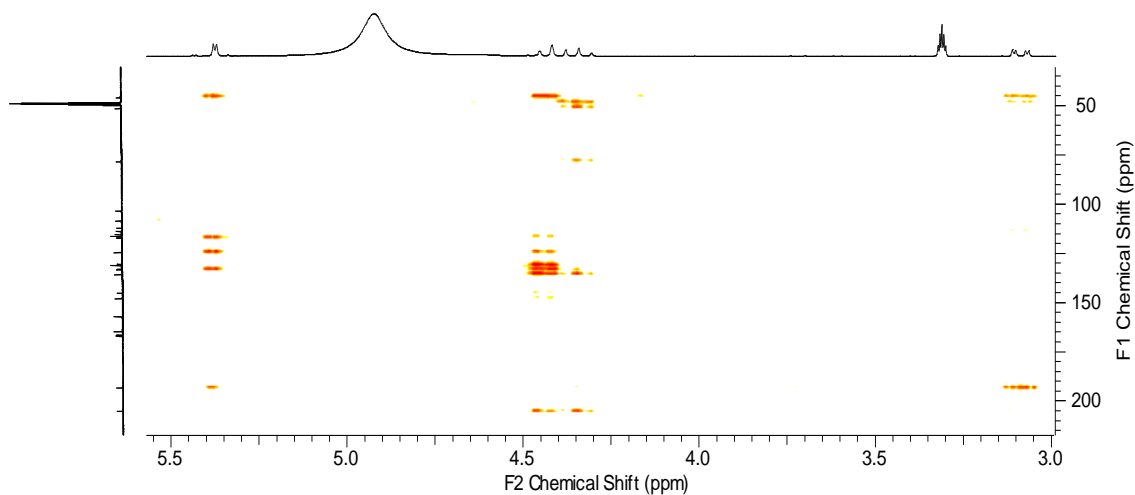
**Figura 118** – Ampliação na região entre  $\delta$  6,62 e  $\delta$  6,96/  $\delta$  116,3 e  $\delta$  131,2 do espectro de HSQC de AG8 [300 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm)]



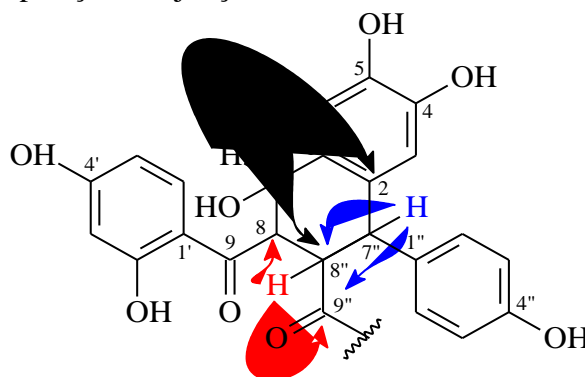
**Figura 119** – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel B da unidade II do dímero de chalcona



**Figura 120** – Ampliação na região entre  $\delta$  4,40 e  $\delta$  5,38/  $\delta$  45,0 e  $\delta$  210,0 do espectro de HMBC de AG8 [300 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm)]

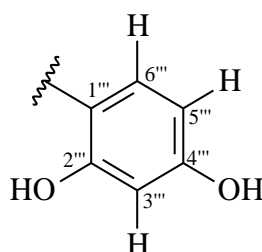


**Figura 121** – Correlações observadas no espectro de HMBC que possibilitaram a confirmação das posições de junção das duas unidades do dímero de chalcona



A estrutura foi completada com análise detalhada dos sinais em  $\delta$  6,09 (*d*,  $J = 2,4$  Hz), 5,81 (*dd*,  $J = 9,0$  e 2,4 Hz) e 6,75 (*d*,  $J = 9,0$  Hz), integrando para um hidrogênio cada no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 117), correspondentes aos H-3''', H-5''' e H-6''', respectivamente. A constante de acoplamento de 2,4 Hz observada em ambos dubletos indicou uma relação *meta* entre H-3''' e H-5'''. Além disso, observou-se um acoplamento *orto* do H-5''' com um dubleto em  $\delta$  6,75 referente ao hidrogênio H-6'''. Esses sinais remetem aos hidrogênios de anel aromático 1,2,4-trissubstituído, sendo atribuído ao anel A da unidade II do dímero de chalcona (Figura 122).

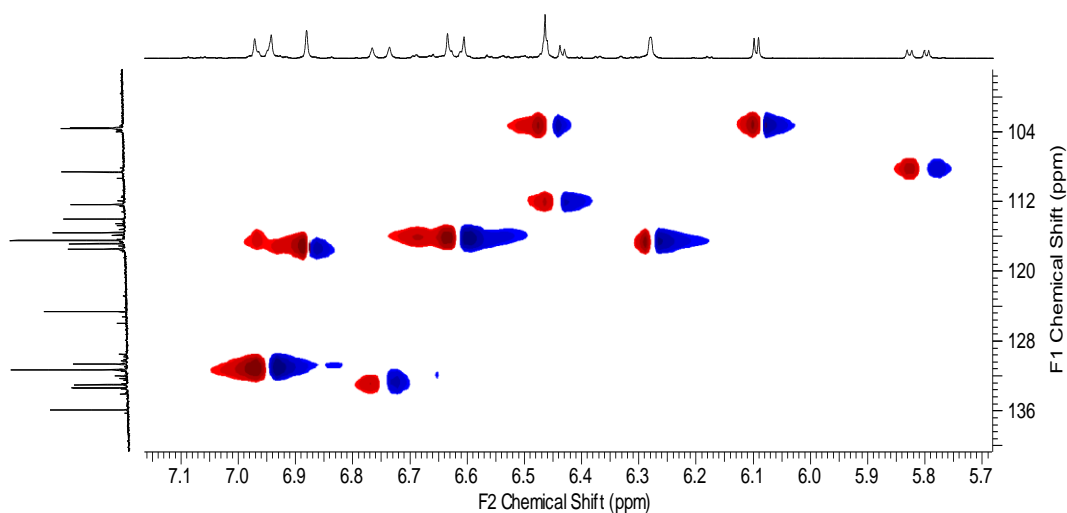
**Figura 122** – Anel aromático 1,2,4-trissubstituído do anel A da unidade II do dímero de chalcona



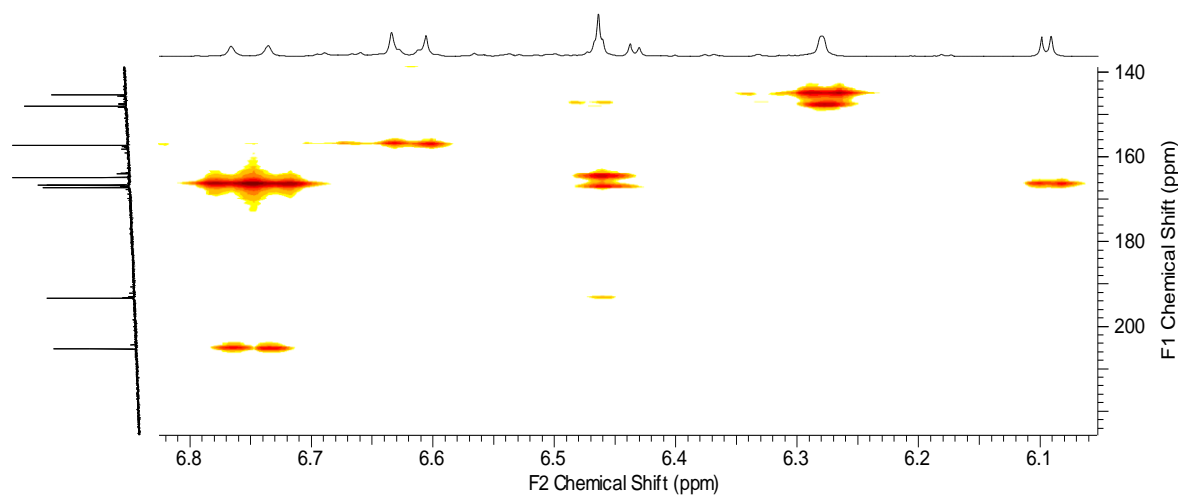
A análise do espectro de HSQC (ampliado na Figura 123) permitiu correlacionar os hidrogênios em  $\delta$  6,09,  $\delta$  5,81 e  $\delta$  6,75 com os carbonos em  $\delta$  103,4 (C-3'''),  $\delta$  108,5 (C-5''') e  $\delta$  132,9 (C-6'''), respectivamente. Através da análise do espectro de HMBC, representado de forma ampliada na Figura 124, foi possível estabelecer correlações que permitiram atribuir os outros carbonos do anel A da unidade II. Foram observados correlações a duas ligações ( $^2J_{\text{C,H}}$ ) entre o hidrogênio H-3''' ( $\delta$  6,09) com os carbonos C-2''' ( $\delta$  166,6) e C-4''' ( $\delta$  166,5),

bem como, correlações a três ligações ( ${}^3J_{C,H}$ ) entre o hidrogênio H-6''' ( $\delta$  6,75) com os carbonos C-2''' ( $\delta$  166,6) e C-4''' ( $\delta$  166,5). Além disso, nesse mesmo espectro foi evidenciado a correlação a três ligações ( ${}^3J_{C,H}$ ) entre o H-6''' e carbono do grupo C=O em  $\delta$  205,2 (C-9'''), posicionando o anel **A** da unidade **II** na molécula. Essas correlações observadas no espectro de HMBC estão ilustradas na Figura 125.

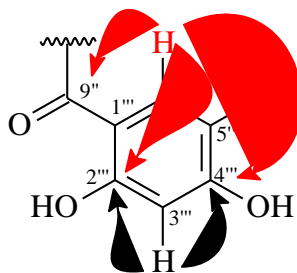
**Figura 123** – Ampliação na região entre  $\delta$  5,81 e  $\delta$  6,75 /  $\delta$  103,4 e  $\delta$  136,5 do espectro de HSQC de AG8 [300 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 124** – Ampliação na região entre  $\delta$  6,09 e  $\delta$  6,75 /  $\delta$  140,0 e  $\delta$  220,0 do espectro de HMBC de AG8 [300 MHz, CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 125** – Correlações observadas no espectro de HMBC que possibilitaram o posicionando o anel **A** da unidade **II** na molécula



Desta forma, através do conjunto de informações obtidas da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $135^\circ$ , bem como, das correlações observadas nos espectros bidimensionais (HSQC e HMBC), foi possível identificar a substância **AG8** como sendo 2',4,4',5,7-penta-hidroxi-7,8-di-hidrochalcona-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4'',4'''-tri-hidroxi-7'',8''-di-hidrochalcona. A determinação da configuração relativa dos centros estereogênicos dos carbonos C-7, C-8, C-7'' e C-8'' de **AG8**, foi determinada a partir dos valores observados das constantes de acoplamentos ( $J$ ) dos hidrogênios H-7, H-8, H-7'' e H-8'', bem como, das correlações observadas no espectro de NOESY. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 103 e 115) os valores de constantes de acoplamentos ( $J$ ) observados correspondentes a interações vicinais [ $^3J(\text{H,H})$ ] entre o hidrogênio H-7 em  $\delta$  5,38 (d,  $J = 2,7$  Hz) e o hidrogênio H-8 em  $\delta$  3,09 (dd,  $J = 11,1; 2,7$  Hz), sugeriu interação *equatorial-axial* entre os hidrogênios H-7 e H-8 e, portanto, relação *cis* entre eles. Entretanto, os valores de constantes de acoplamentos ( $J$ ) observados correspondentes as interações vicinais [ $^3J(\text{H,H})$ ] entre o hidrogênio H-8'' em  $\delta$  4,34 (dd,  $J = 10,8; 11,1$  Hz) com os hidrogênios H-8 em  $\delta$  3,09 (dd,  $J = 11,1; 2,7$  Hz) e H-7'' em  $\delta$  4,44 (d,  $J = 10,8$  Hz), indicaram interações *axial-axial* entre o H-8'' e H-8, bem como, interação *axial-axial* entre os hidrogênios H-8'' e H-7''. Sendo assim, evidenciando relação *trans* entre H-8'' e H-8 e, também, relação *trans* entre H-8'' e H-7''.

O experimento de NOESY (Figura 126) corroborou com as atribuições feitas através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , bem como, das correlações verificadas no espectro de HMBC. Através da análise do espectro de NOESY (Figura 126), foi possível inferir a relação *cis* entre os hidrogênios H-7 e H-8, visto que, foi observado uma interação dipolar mais intensa do hidrogênio H-8 com o hidrogênio H-7 e uma interação menos intensa do hidrogênio H-8 com o hidrogênio H-8''. Essa interação dipolar mais intensa entre o H-8 e H-7, corrobora com a relação *cis* entre os hidrogênios H-7 e H-8, evidenciando que esses hidrogênios estão espacialmente mais próximos. Por outro lado, a interação dipolar menos intensa entre H-8 e H-8'', corrobora com a relação *trans* entre H-8 e H-8'', indicando que esses

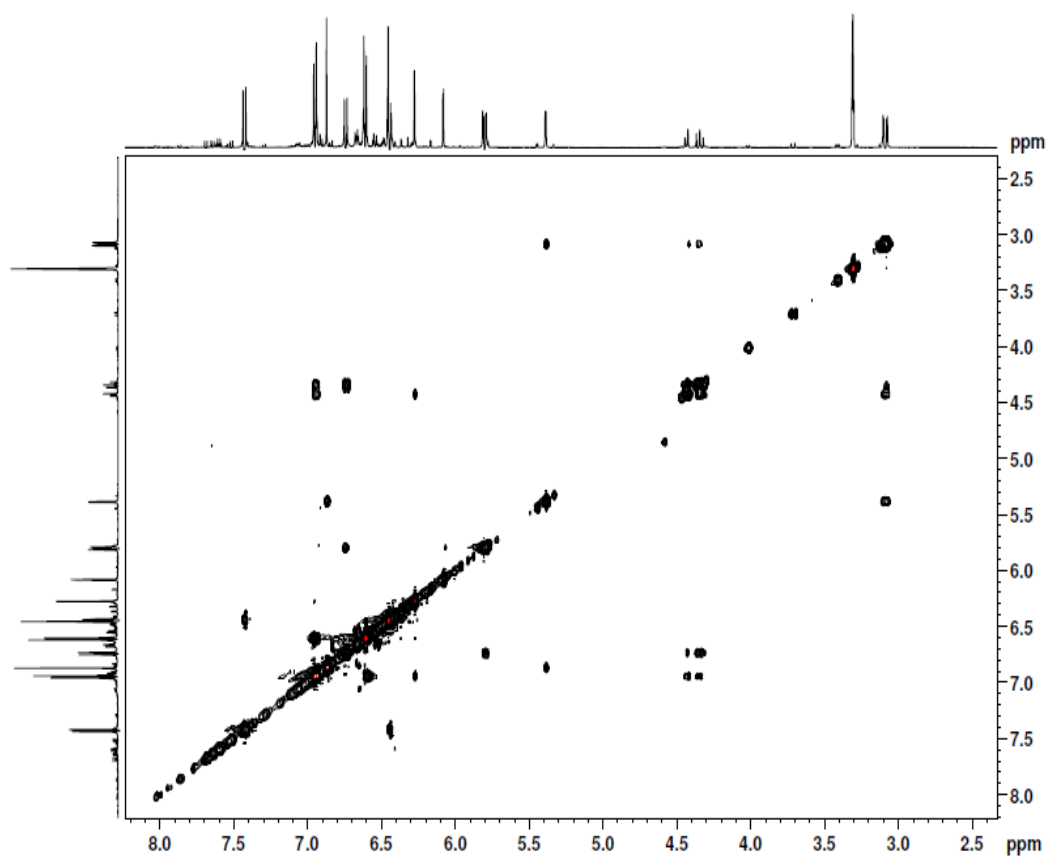
hidrogênios não estão espacialmente tão próximos como os hidrogênios H-7 e H-8 estão. Cabe salientar que as outras interações espaciais observadas no experimento de NOESY não permitiram obter conclusões sobre configuração relativa dos centros estereogênicos, mas corroboraram com as atribuições feitas anteriormente através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e HMBC.

A substância **AG8** foi submetida a análise por espectrometria de massas de alta resolução com o objetivo de confirmar a massa molecular e por consequência a fórmula molecular. Foi realizado o experimento de massas de alta resolução no modo negativo. O espectro de massas de alta resolução no modo negativo (HRESIMS) (Figura 127) apresentou o íon *pseudo* molecular em  $m/z$  525,1165. Sendo assim, através desse resultado foi confirmado a massa de  $([\text{M-H} - \text{H}_2\text{O}]^- 525,1165 \text{ Da})$  que é atribuído à fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$  da substância **AG8** após perda de água e próton.

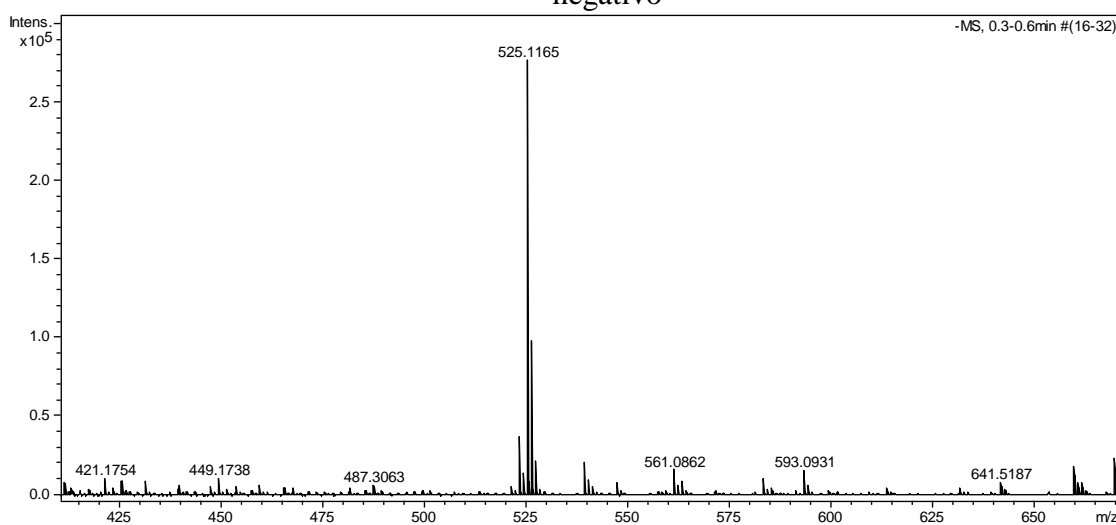
Desta forma, a análise dos dados espectrométricos permitiu identificar a substância **AG8** como sendo  $(7^*S,8^*S,7''^*S,8''^*R)-2',4,4',5,7$ -penta-hidroxi-7,8-di-hidrochalcona- $(2 \rightarrow 7'',8 \rightarrow 8'')$ -2''',4'',4''''-tri-hidroxi-7'',8''-di-hidrochalcona (Figura 128), um dímero de chalcona conhecido como matosina isolada da espécie *Myracrodruon urundeuva* Rf. All. (BANDEIRA, MATOS e BRAZ-FILHO, 2003).

Na Tabela 34 são apresentados todos os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , bem como, das correlações observadas nos espectros bidimensionais (HSQC e HMBC) da substância **AG8**, sendo comparada com os valores apresentados de deslocamento químico de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e das correlações observadas de HSQC e HMBC da substância **matosina** (BANDEIRA, MATOS e BRAZ-FILHO, 2003).

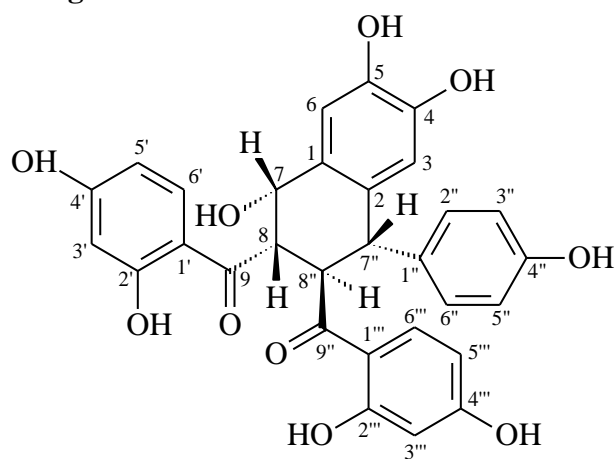
**Figura 126** – Ampliação do espectro NOESY da substância **AG8** na região de 2,5 a 8,3 ppm [500 MHz, CD<sub>3</sub>OD]



**Figura 127** – Espectro de massas de alta resolução da substância **AG8** no modo negativo





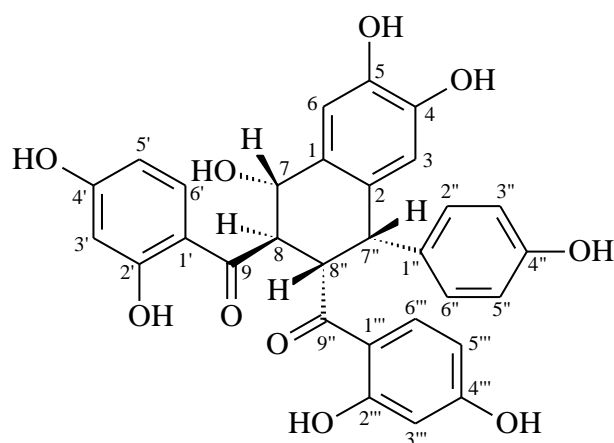
**Figura 128** – Estrutura da substância **AG8**

**Tabela 34** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de **AG8** em  $\text{CD}_3\text{OD}$  [( $\delta$  (ppm); mult.e  $J$  (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores da literatura\*

C	AG8			matosina (BANDEIRA et al., 2011)*		
	HMQC		HMBC	HMQC		HMBC
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^{2,3}J_{\text{C,H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^{2,3}J_{\text{C,H}}$
1	124,5	-	H-7'', H-3, H-7	121,77	-	H-7'', H-3, H-7
2	133,2	-	H-7'', H-6, H-7	130,50	-	H-3, H-6, H-7
3	116,7	6,28 (s)	-	113,95	6,28 (s)	H-7''
4	147,9	-	H-3, H-6	145,18	-	H-3, H-6
5	145,2	-	H-3, H-6	142,48	-	H-3, H-6
6	117,3	6,88 (s)	H-7	114,56	6,88 (s)	H-7
7	78,4	5,38 (d, 2,7)	H-8'', H-6	75,68	5,38 (s)	H-8'', H-6
8	51,4	3,09 (dd, 11,1; 2,7)	H-7'', H-8''	48,63	3,08 (d, 11,4)	H-7''
9	193,2	-	H-8, H-7, H-6'	190,47	-	H-8, H-7, H- 6', H-8''
1'	113,8	-	H-5'	111,11	-	H-3, H-5'
2'	164,7	-	H-3', H-6'	161,94	-	H-3', H-5'
3'	103,5	6,42 (d, 2,3)	H-5'	100,76	6,46 (s)	H-5'
4'	167,1	-	H-3', H-6'	163,80	-	H-5', H-6'
5'	112,2	6,45 (dd, 2,3; 9,0)	H-3'	109,50	6,45 (d, 8,3)	H-3'
6'	130,5	7,43 (d, 9,0)	-	127,73	7,43 (d, 8,3)	-
1''	135,8	-	H-7'', H-8'', H-3'', H-5''	133,02	-	H-7'', H-3'', H-5''
2''	131,2	6,96 (d, 8,5)	H-7''	128,42	6,95 (d, 8,2)	H-7''
6''	131,2	6,96 (d, 8,5)	H-7''	128,42	6,95 (d, 8,2)	H-7''
3''	116,3	6,62 (d, 8,5)	-	113,57	6,62 (d, 8,2)	-
5''	116,3	6,62 (d, 8,5)	-	113,57	6,62 (d, 8,2)	-
4''	157,2	-	H-2'', H-6'', H-3'', H-5''	154,41	-	H-2'', H-6'', H-3'', H-5''
7''	48,4	4,44 (d, 10,8)	H-3, H-2'', H-6''	46,70	4,43 (d, 10,6)	H-8, H-2'', H-6''
8''	45,9	4,34 (dd, 10,8; 11,1)	H-8, H-7'', H-7	43,17	4,34 (dd, 10,6; 11,4)	H-8, H-7'', H-7
9''	205,2	-	H-7'', H-8'', H-6'''	202,45	-	H-7'', H-8'', H-6'''
1'''	115,4	-	H-5''', H-3'''	112,69	-	H-5''', H-3'''
2'''	166,6	-	H-6''', H-3'''	163,80	-	H-6''', H-3'''
3'''	103,4	6,09 (d, 2,4)	H-5'''	100,67	6,09 (s)	H-5'''
4'''	166,5	-	H-5''', H-6''', H-3'''	164,45	-	H-5''', H-6'''
5'''	108,5	5,81 (dd, 2,4; 9,0)	H-3'''	105,74	5,80 (d, 9,0)	H-3'''
6'''	132,9	6,75 (d, 9,0)	-	130,15	6,75 (d, 9,0)	-

\*[ $\text{CD}_3\text{OD}$ , RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) e RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz)].

### 5.1.3.9 Elucidação estrutural da substância AG9

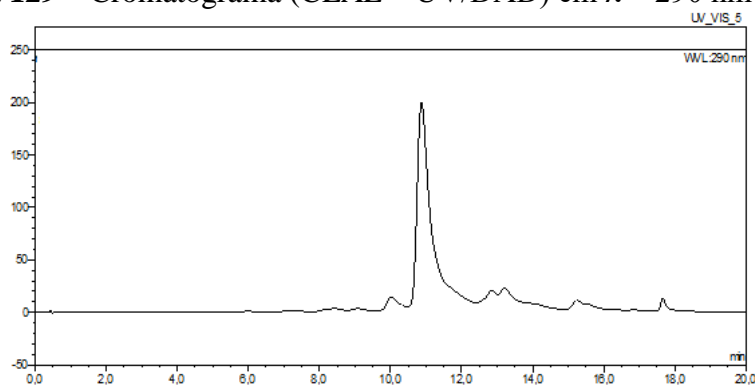


**AG9**

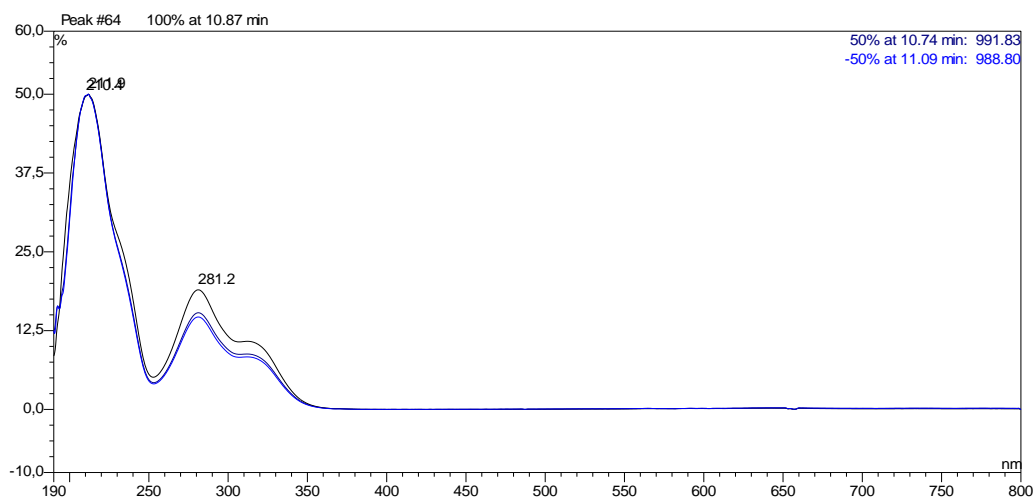
A substância **AG9** (21,9 mg) foi isolada da fase acetato de etila do caule de *A. graveolens* (subfração **ACAG-11-G-4-F**, conforme item 4.4.4.2, página 83), e apresentou-se com um sólido amarelo, solúvel em metanol. A substância **AG9** apresentou temperatura de fusão de 207,1-209,5 °C.

O monitoramento da subfração **ACAG-11-G-4-F** por CCDC, seguida de revelação com solução de FeCl<sub>3</sub>, indicou que essa subfração era constituída de uma substância com grupos fenólicos devido a coloração azul escura na cromatoplaça. Através da análise da subfração **ACAG-11-G-4-F** por CLAE-DAD, foi observado no cromatograma (Figura 129) a presença de uma substância eluindo no tempo de retenção (tR) de 10,9 minutos cujo o espectro no UV/Vis associado a esse pico (Figura 130) apresenta  $\lambda_{\text{máx}}$  em 210, 281 e 320 nm, corroborando tratar-se realmente de uma substância fenólica.

**Figura 129** – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em  $\lambda = 290$  nm de **AG9**

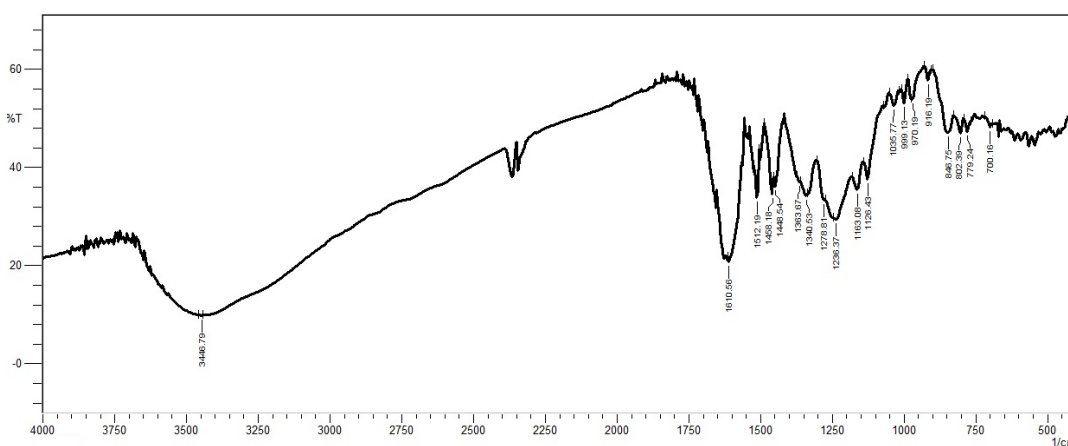


\* Condições cromatográficas ver item 4.1, página 65. Tempo de retenção (tR) de **AG9** = 10,9 minutos

**Figura 130** – Espectro no UV, obtido pelo detector DAD, de **AG9**

A determinação estrutural da substância **AG9** foi estabelecida com base na análise dos dados espectrométricos obtidos no IV, RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC, NOESY, EM de alta resolução e por comparação com dados da literatura (BANDEIRA, MATOS e BRAZ-FILHO, 2003).

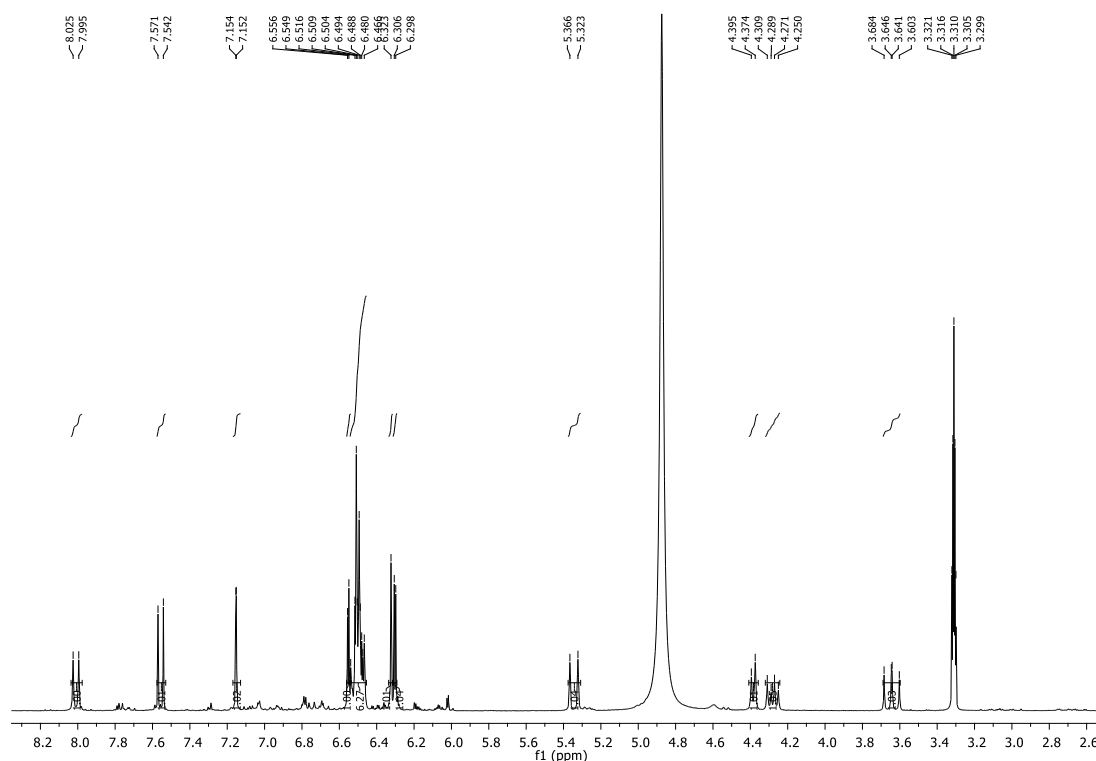
O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) de **AG9** (Figura 131) apresentou banda larga em  $3446,8\text{ cm}^{-1}$ , atribuída a estiramento de ligações O-H, banda em  $1610,6\text{ cm}^{-1}$  típico de estiramento axial de ligação C=O conjugada, além de bandas em  $1512,2$ ,  $1458,2$  e  $1340,5\text{ cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento da ligação C=C de anéis aromáticos.

**Figura 131** – Espectro na região do infravermelho (IV) da substância **AG9\***

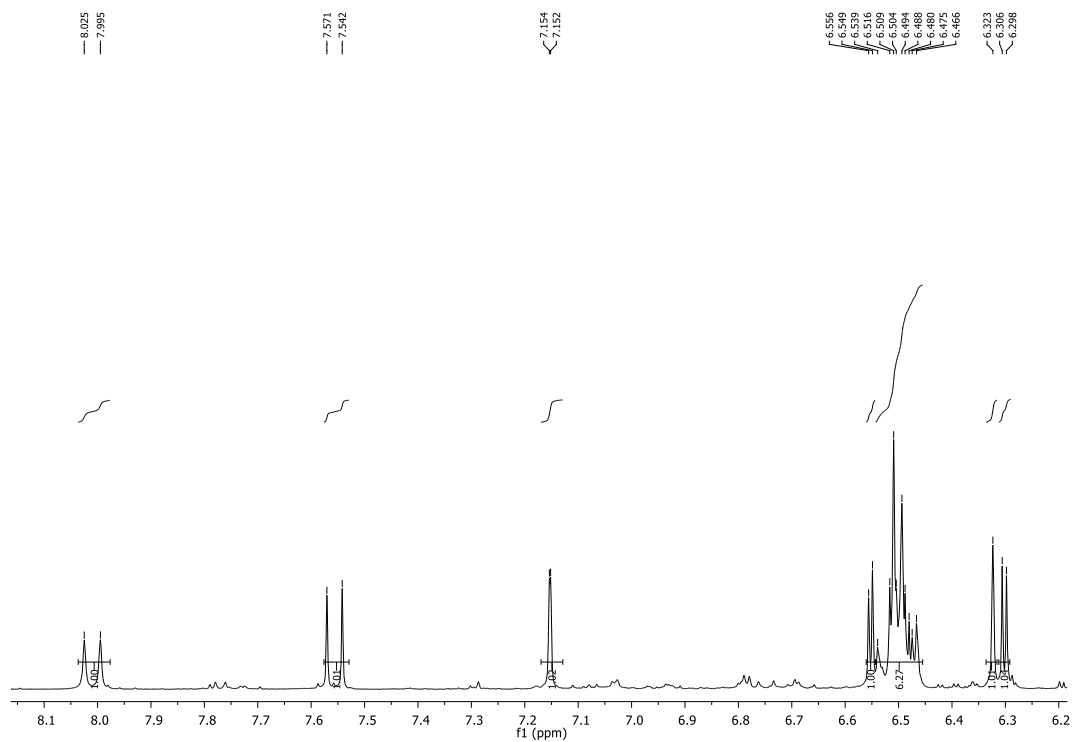
\*Espectro obtido em pastilha de KBr

Os sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 132, 133 e 134) e RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 135, 136 e 137) da substância **AG9**, apresentaram semelhanças com os sinais dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância **AG8**, que teve sua elucidação estrutural discutida anteriormente (página 144). Como pode ser notado na Figura 132, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **AG9** apresentou sinais na região compreendida entre  $\delta 3,64$  e  $\delta 8,01$ . A presença de sinais principalmente na região entre  $\delta 6,30$  e  $\delta 8,01$  (sinais característicos de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos), confirmou a presença de anéis aromáticos na estrutura da substância **AG9**. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 135, 136 e 137) de **AG9**, registrou de sinais para 30 carbonos, dos quais 16 deles foram carbonos metínicos e 14 não-hidrogenados. Dentre os sinais referentes aos carbonos não-hidrogenados, destacou-se dois sinais em  $\delta 194,4$  e  $\delta 204,4$  que são característicos de carbonila.

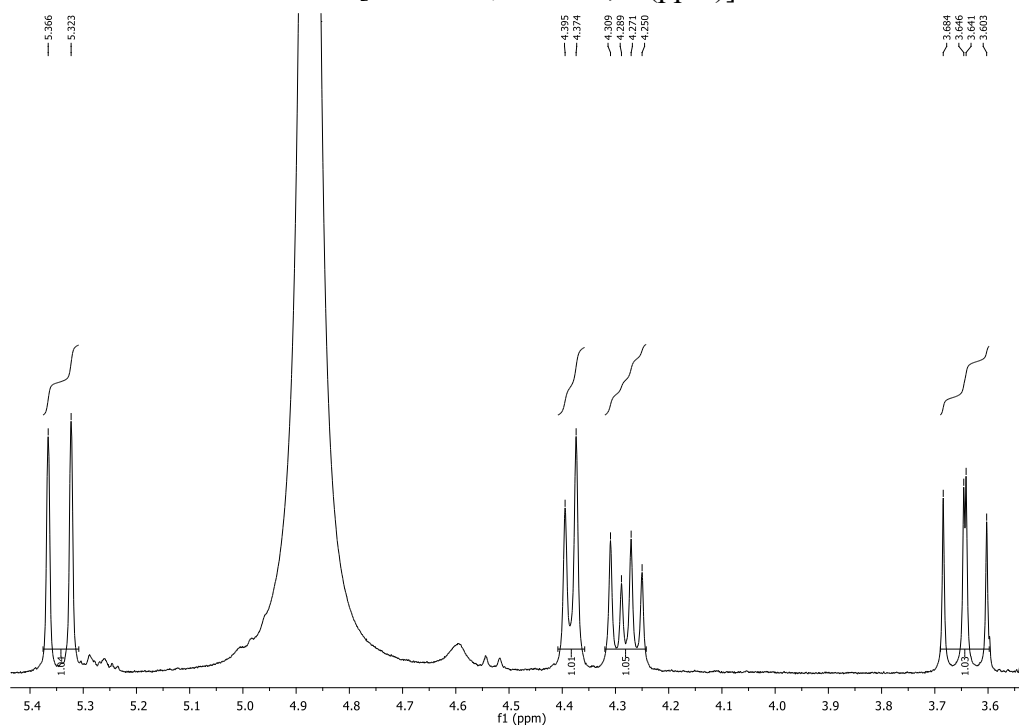
**Figura 132** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **AG9** [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



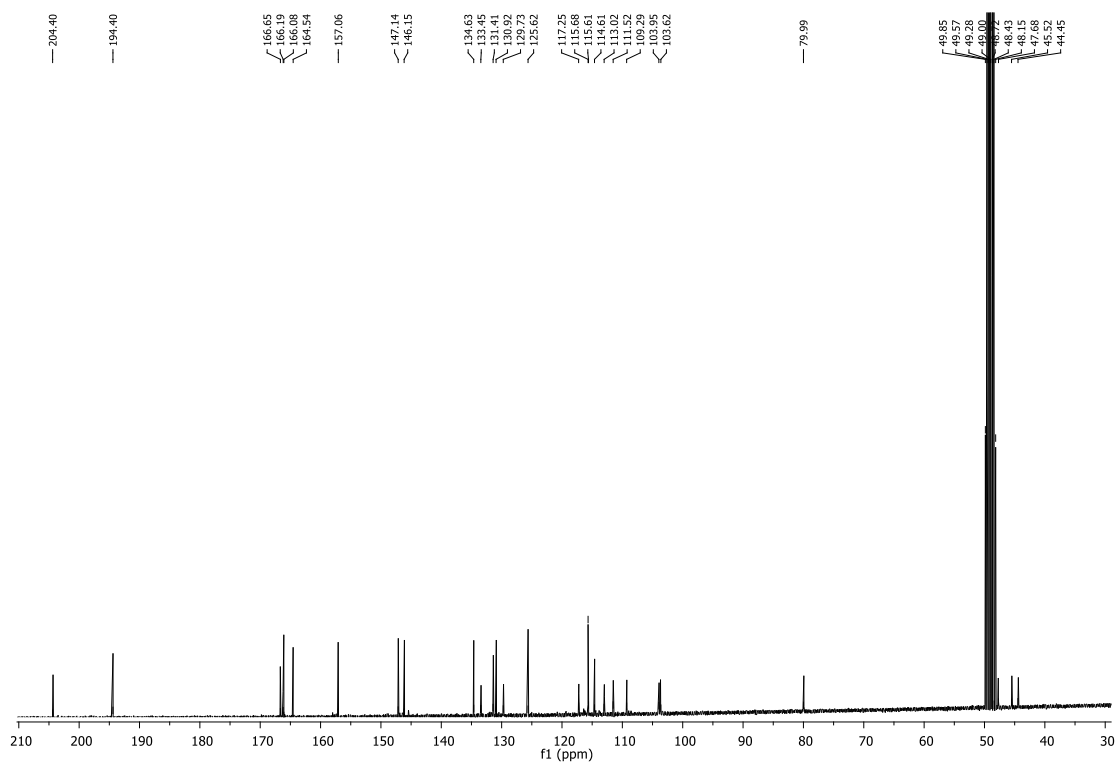
**Figura 133** – Ampliação na região entre  $\delta$  6,20 e  $\delta$  8,10 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de AG9 [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



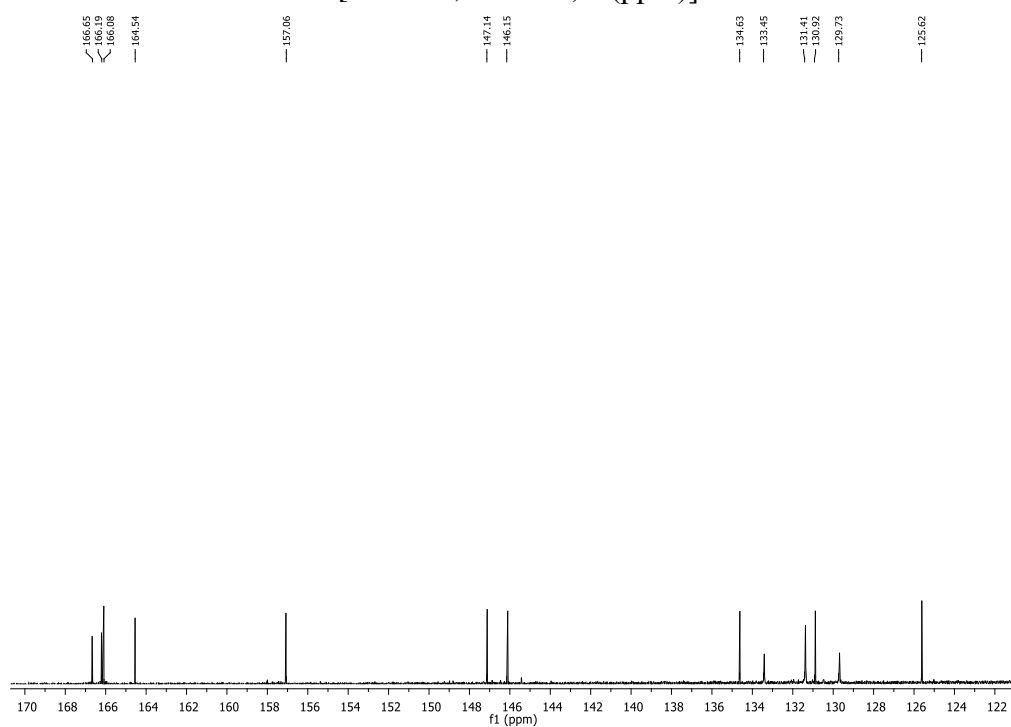
**Figura 134** – Ampliação na região entre  $\delta$  3,60 e  $\delta$  5,40 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de AG9 [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



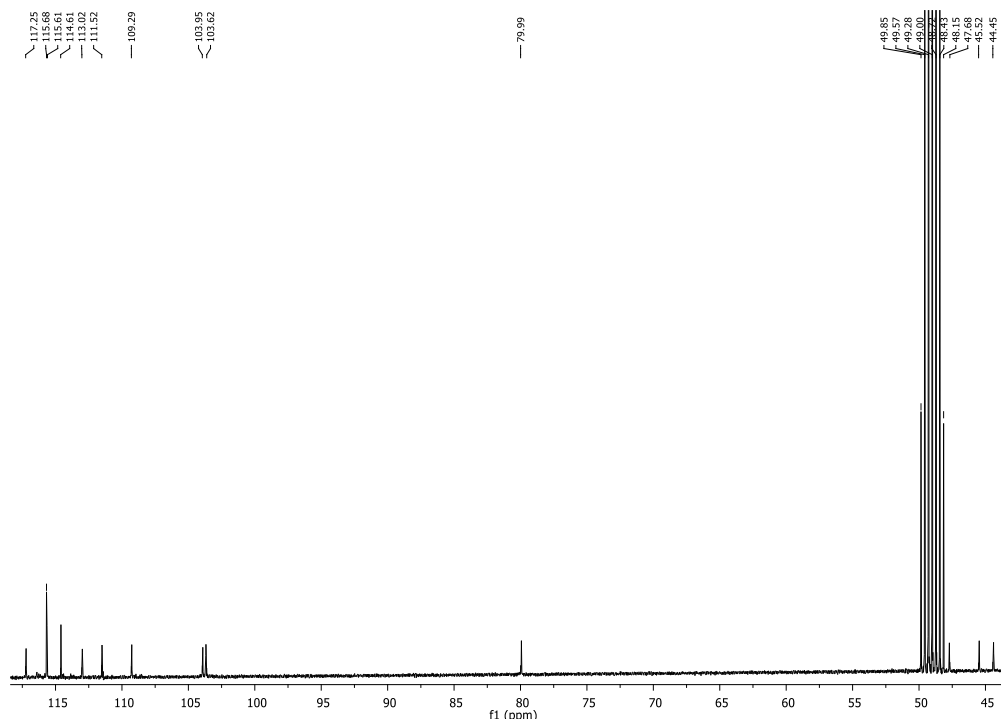
**Figura 135** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **AG9** [75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 136** – Ampliação na região entre  $\delta$  122,0 e  $\delta$  170,0 do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **AG9** [75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 137** – Ampliação na região entre  $\delta$  44,0 e  $\delta$  118,0 do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **AG9** [75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]

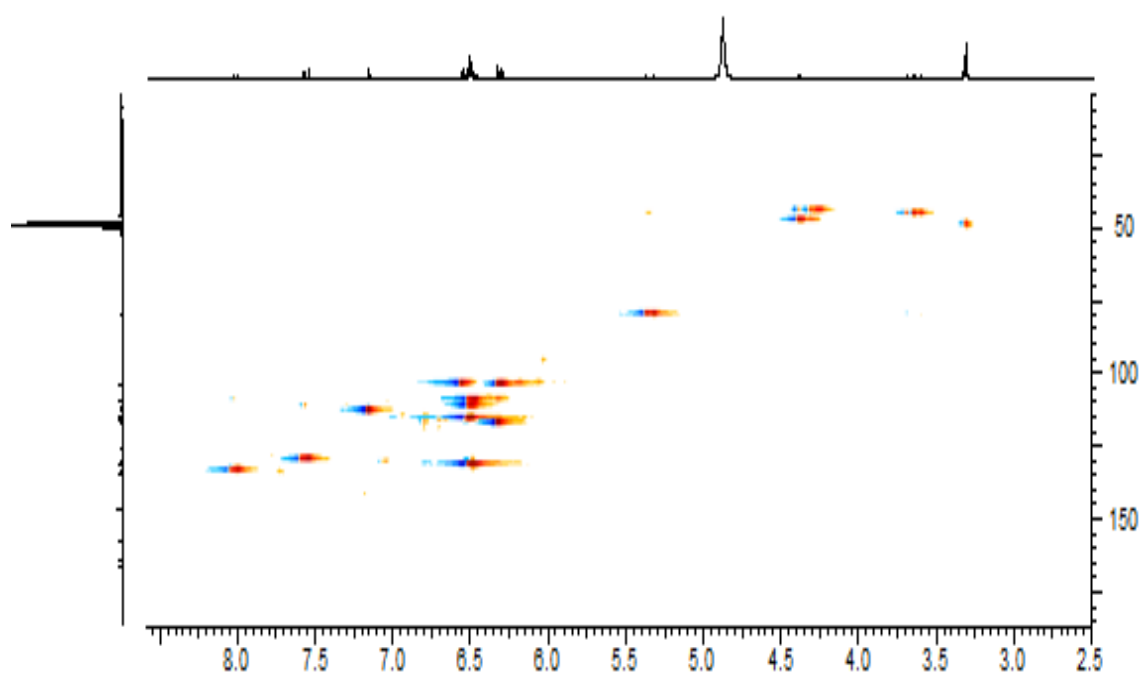


A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 132, 133 e 134), RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 135, 136 e 137), bem como, das correlações observadas nos espectros bidimensionais de HSQC (Figura 138) e HMBC (Figura 139) e a comparação com dados da literatura (BANDEIRA, MATOS e BRAZ-FILHO, 2003), levaram a identificação da substância **AG9** como tendo a estrutura similar que foi proposta para substância **AG8**. No entanto, a análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , principalmente da observação das constantes de acoplamentos dos hidrogênios H-7, H-8, H-8'' e H-7'', revelou que a substância **AG9** se diferenciava da substância **AG8** apenas na configuração relativa dos centros estereogênicos dos carbonos C-7, C-8, C-7'' e C-8''. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (ampliado na Figura 134) indicou a presença de um duplete em  $\delta$  5,34 ( $J = 12,9$ , H-7) acoplado com um duplo duplete em  $\delta$  3,64 ( $J = 12,9$ ; 11,6, H-8), e pela constante de acoplamento de 12,9 Hz sugeriu interação *axial-axial* entre os hidrogênios H-7 e H-8 e, portanto, relação *trans* entre eles. Verificou-se também acoplamento entre o duplo duplete em  $\delta$  3,64 ( $J = 12,9$ ; 11,6, H-8) com o duplo duplete em  $\delta$  4,28 ( $J = 6,2$ ; 11,6, H-8''), e o valor da constante de acoplamento de 11,6 Hz indicou interação *axial-axial* entre H-8 e H-8'', evidenciando a relação *trans* entre esses hidrogênios. Além disso, o espectro também evidenciou o duplo duplete  $\delta$  4,28 ( $J = 6,2$ ; 11,6, H-8'') acoplado com o duplete em 4,38 ( $J = 6,2$ , H-7''), com uma constante de acoplamento de 6,2 Hz, sugerindo

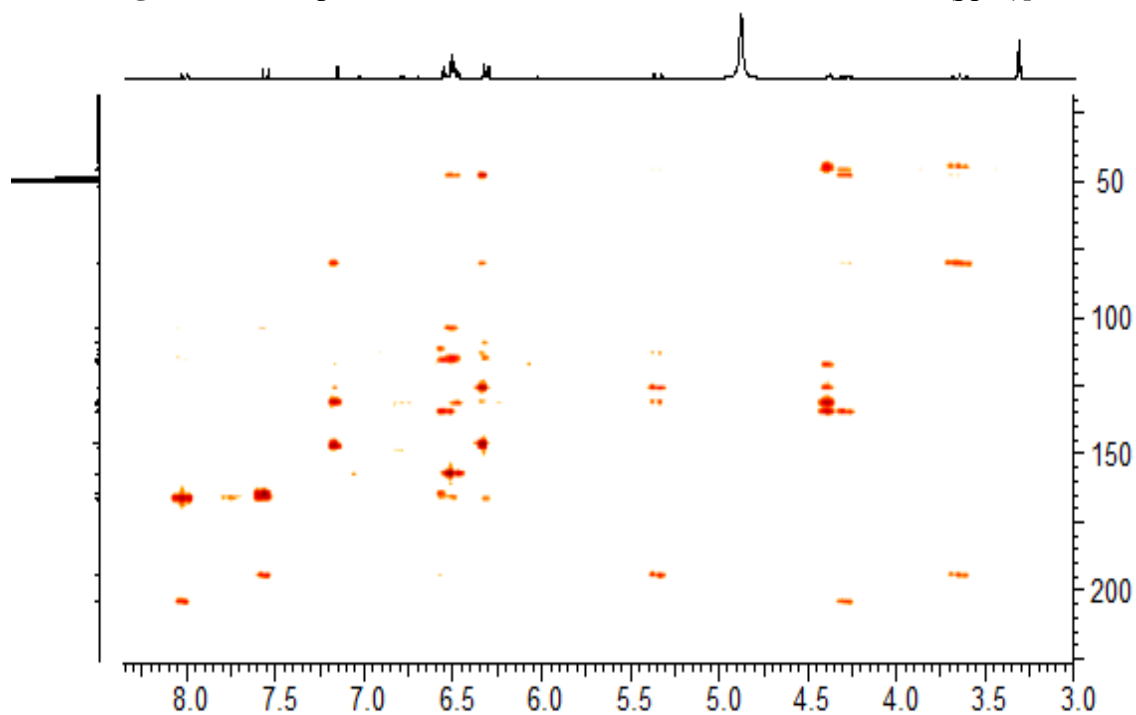


interação *axial-equatorial* entre H-8'' e H-7'' e, conseqüentemente, relação *cis* entre eles. Sendo assim, através dessas atribuições, foi possível diferenciar a substância **AG9** (Figura 140-A), das substâncias **AG8** (Figura 140-B) e **matosina** (Figura 140-C). Na Tabela 35 são apresentados os valores de deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  referentes aos hidrogênios H-7, H-8, H-8'' e H-7'', bem como, os valores das constantes de acoplamentos ( $J$ ) obtidas de **AG9**, sendo comparadas com os dados obtidos das substâncias **AG8** e **matosina**.

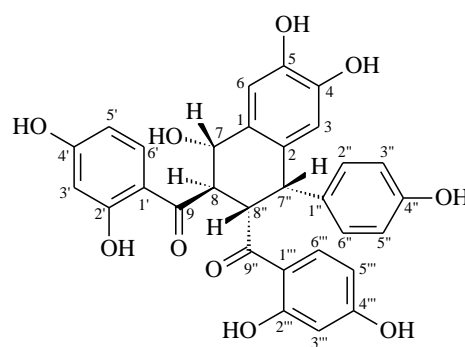
**Figura 138** – Espectro de HSQC de **AG9** [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



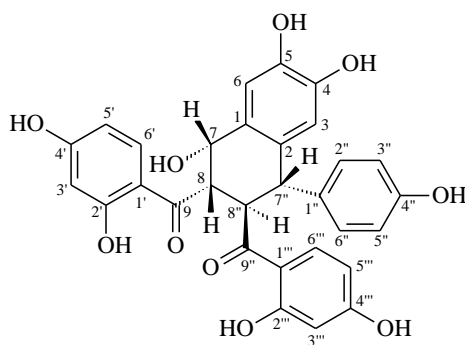
**Figura 139** – Espectro de HMBC de AG9 [300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm)]



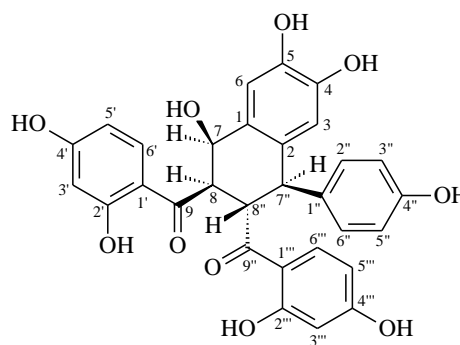
**Figura 153** – Estruturas das substâncias AG9, AG8 e Matosina



**A = AG9**



**B = AG8**



**C = Matosina**

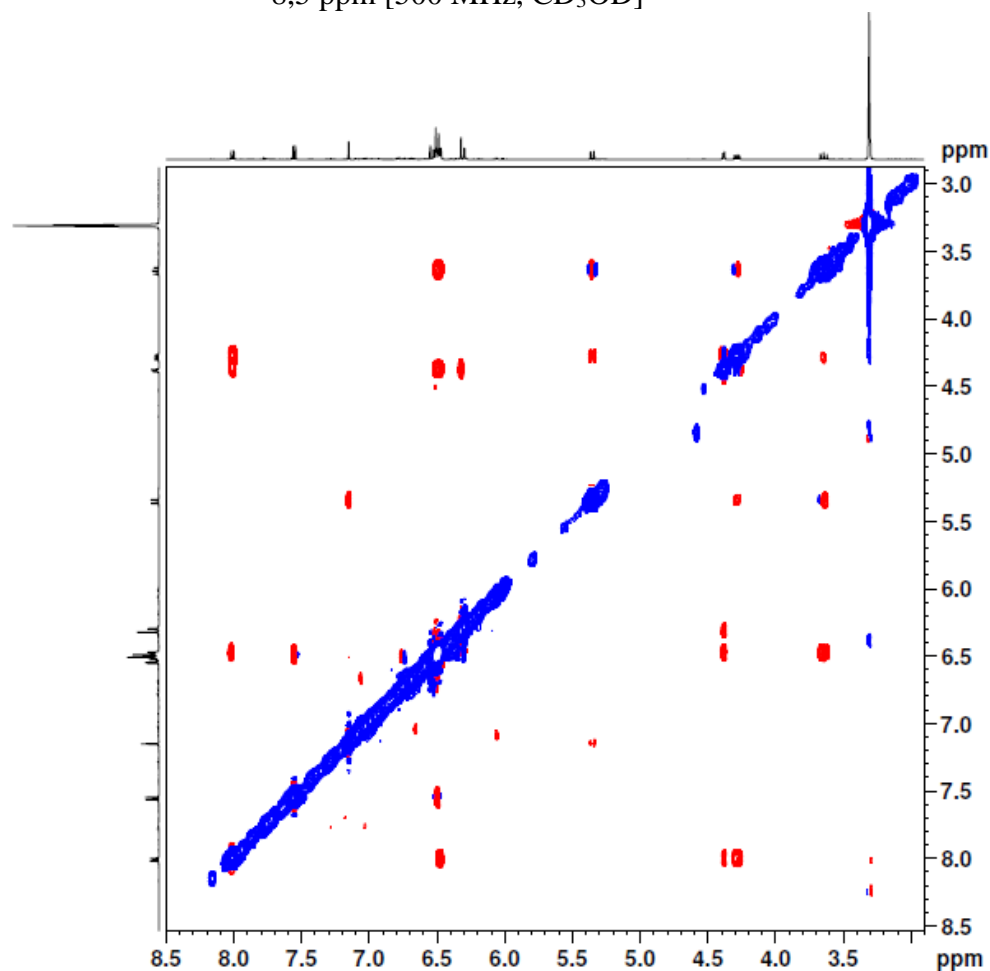
**Tabela 35** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) de **AG9** em  $\text{CD}_3\text{OD}$  [ $\delta$  (ppm); mult.e  $J$  (Hz) entre parênteses] e comparação com valores das substâncias **AG8** e **Matosina**

Posição	AG9	AG8*	Matosina <sup>#</sup> (BANDEIRA, MATOS e BRAZ-FILHO, 2003).
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$
7	5,34 ( <i>d</i> , 12,9)	5,38 ( <i>d</i> , 2,7)	5,38 ( <i>s</i> )
8	3,64 ( <i>dd</i> , 12,9; 11,6)	3,09 ( <i>dd</i> , 11,1; 2,7)	3,08 ( <i>d</i> , 11,4)
8''	4,28 ( <i>dd</i> , 6,2; 11,6)	4,34 ( <i>dd</i> , 10,8; 11,1)	4,34 ( <i>dd</i> , 10,6; 11,4)
7''	4,38 ( <i>d</i> , 6,2)	4,44 ( <i>d</i> , 10,8)	4,43 ( <i>d</i> , 10,6)

\*. #Dados obtidos para **AG8** e **Matosina** utilizando  $\text{CD}_3\text{OD}$  como solvente

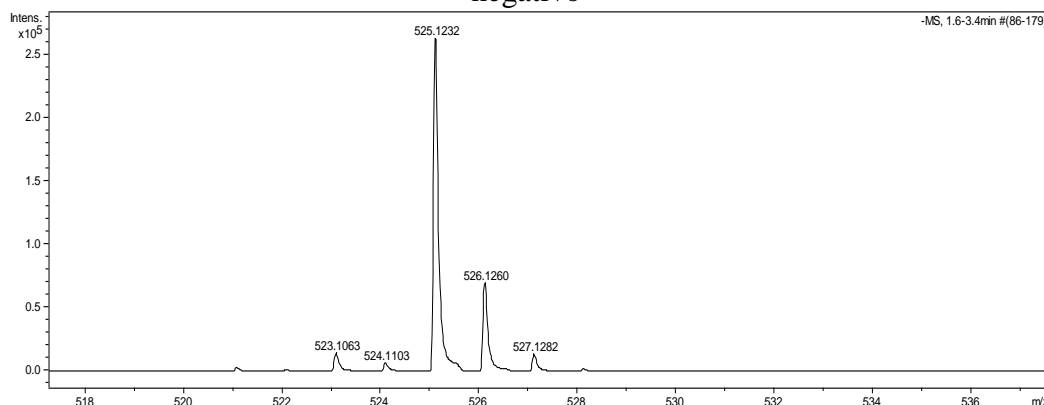
Para corroborar com as atribuições feitas através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , bem como, das correlações verificadas nos espectros de HSQC e HMBC, foi realizado o experimento de NOESY (Figura 141). Dentre as correlações reveladas no experimento de NOESY (Figura 141) destaca-se as interações espaciais do hidrogênio H-8 com os hidrogênios H-8'' e H-7, bem como, as interações espaciais do hidrogênio H-8'' com os hidrogênios H-8, H-7'' e H-7. Além disso, o experimento de NOESY também revelou interações espaciais do hidrogênio H-7 com os hidrogênios H-7'', H-8 e H-6, sendo assim, confirmando a proximidade espacial desses hidrogênios.

**Figura 141** – Ampliação do espectro NOESY da substância (**AG09**) na região de 3,0 a 8,5 ppm [500 MHz, CD<sub>3</sub>OD]



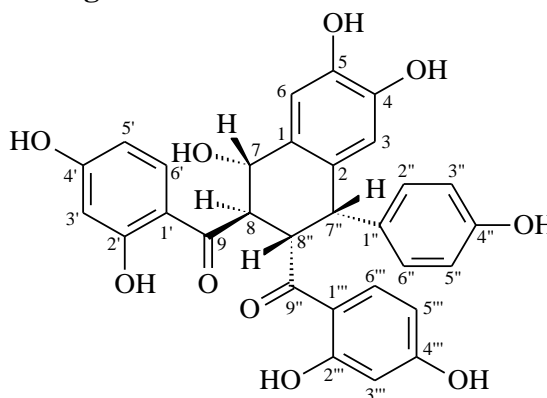
A substância **AG9** foi submetida a análise por espectrometria de massas de alta resolução com o objetivo de confirmar a massa molecular e por consequência a fórmula molecular. Foi realizado o experimento de massas de alta resolução no modo negativo. O espectro de massas de alta resolução no modo negativo (HRESIMS) (Figura 142) apresentou o íon *pseudo* molecular em  $m/z$  525,1232. Sendo assim, através desse resultado foi confirmado a massa de  $([M-H - H_2O]^- 525,1232 \text{ Da})$  que é atribuído à fórmula molecular  $C_{30}H_{24}O_{10}$  da substância **AG9** após perda de água e próton.

**Figura 142** – Espectro de massas de alta resolução da substância **AG9** no modo negativo



Desta forma, através da análise dos dados espectrométricos de **AG9** e da comparação desses dados com os dados espectrométricos das substâncias **AG8** (discutido anteriormente, na página 144) e **matosina** (BANDEIRA, MATOS e BRAZ-FILHO, 2003), foi possível propor a estereoquímica para substância **AG9** como sendo,  $7^*S,8^*R,7'''S,8'''S$ . Sendo assim, a substância **AG9** foi identificada como sendo  $(7^*S,8^*R,7'''S,8'''S)$ -2',4,4',5,7-penta-hidroxi-7,8-di-hidrochalcona-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4''',4'''-tri-hidroxi-7'',8''-di-hidrochalcona (Figura 143), um novo dímero de chalcona, isômero da substância matosina isolada da espécie *Myracrodruon urundeuva* Rf. All. (BANDEIRA, MATOS e BRAZ-FILHO, 2003). Nas Tabelas 36 e 37 são apresentados todos os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ , bem como, das correlações observadas nos espectros bidimensionais (HSQC e HMBC) da substância **AG9**, sendo comparadas com os valores apresentados de deslocamento químico de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e das correlações observadas de HSQC e HMBC pelas substâncias **AG8** e **Matosina**, respectivamente.

**Figura 143** – Estrutura da substância **AG9**



**Tabela 36** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de **AG9** em  $\text{CD}_3\text{OD}$  [( $\delta$  (ppm); mult.e  $J$  (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores de **AG8**

C	AG8*			AG9		
	HSQC		HMBC	HSQC		HMBC
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^{2,3}J_{\text{C,H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^{2,3}J_{\text{C,H}}$
1	124,5	-	H-7'', H-3, H-7	125,6	-	H-7'', H-3, H-7
2	133,2	-	H-7'', H-6, H-7	131,4	-	H-7'', H-3, H-6, H-7
3	116,7	6,28 (s)	-	117,3	6,32 (s)	H-7''
4	147,9	-	H-3, H-6	147,1	-	H-3, H-6
5	145,2	-	H-3, H-6	146,2	-	H-3, H-6
6	117,3	6,88 (s)	H-7	113,0	7,15 (s)	H-7
7	78,4	5,38 (d, 2,7)	H-8'', H-6	79,9	5,34 (d, 12,9)	H-8'', H-8, H-6
8	51,4	3,09 (dd, 11,1; 2,7)	H-7'', H-8''	45,4	3,64 (dd, 12,9; 11,6)	H-7''
9	193,2	-	H-8, H-7, H-6'	194,4	-	H-8, H-7, H-6'
1'	113,8	-	H-5'	115,7	-	-
2'	164,7	-	H-3', H-6'	164,5	-	H-6'
3'	103,5	6,42 (d, 2,3)	H-5'	103,9	6,51 (d, 1,5)	H-5'
4'	167,1	-	H-3', H-6'	166,1	-	H-3', H-5', H-6'
5'	112,2	6,45 (dd, 2,3; 9,0)	H-3'	111,5	6,47 (m)	H-3'
6'	130,5	7,43 (d, 9,0)	-	129,7	7,56 (d, 8,7)	-
1''	135,8	-	H-7'', H-8'', H-3'', H-5''	134,6	-	H-7'', H-3'', H-5''
2''	131,2	6,96 (d, 8,5)	H-7''	130,9	6,50 (d, 8,4)#	H-7''
6''	131,2	6,96 (d, 8,5)	H-7''	130,9	6,50 (d, 8,4)#	H-7''
3''	116,3	6,62 (d, 8,5)	-	115,6	6,49 (d, 8,4)#	H-2'', H-6''
5''	116,3	6,62 (d, 8,5)	-	115,6	6,49 (d, 8,4)#	H-2'', H-6''
4''	157,2	-	H-2'', H-6'', H-3'', H-5''	157,1	-	H-2'', H-6'', H-3'', H-5''
7''	48,4	4,44 (d, 10,8)	H-3, H-2'', H-6''	47,7	4,38 (d, 6,2)	H-8'', H-3, H-2'', H-6''
8''	45,9	4,34 (dd, 10,8; 11,1)	H-8, H-7'', H-7	44,4	4,28 (dd, 6,2; 11,6)	H-8, H-7''
9''	205,2	-	H-7'', H-8'', H-6'''	204,4	-	H-6'''', H-8'''
1'''	115,4	-	H-5'''', H-3'''	114,6	-	H-5'''', H-3'''
2'''	166,6	-	H-6'''', H-3'''	166,2	-	H-6'''
3'''	103,4	6,09 (d, 2,4)	H-5'''	103,7	6,30 (d, 2,4)	H-5'''
4'''	166,5	-	H-5'''', H-6'''', H-3'''	166,6	-	H-5'''', H-6'''
5'''	108,5	5,81 (dd, 2,4; 9,0)	H-3'''	109,3	6,55 (dd, 9,0; 2,4)	-
6'''	132,9	6,75 (d, 9,0)	-	133,5	8,01 (d, 9,0)	-

\*[ $\text{CD}_3\text{OD}$ , RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) e RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz)]. #Sinal sobreposto

**Tabela 37** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de **AG9** em  $\text{CD}_3\text{OD}$  [( $\delta$  (ppm); mult.e  $J$  (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores da literatura\*

AG9			matosina (BANDEIRA, MATOS e BRAZ-FILHO, 2003)*			
C	HMQC		HSBC	HSQC		HMBC
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^{2,3}J_{\text{C,H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^{2,3}J_{\text{C,H}}$
1	125,6	-	H-7'', H-3, H-7	121,77	-	H-7'', H-3, H-7
2	131,4	-	H-7'', H-3, H-6, H-7	130,50	-	H-3, H-6, H-7
3	117,3	6,32 (s)	H-7''	113,95	6,28 (s)	H-7''
4	147,1	-	H-3, H-6	145,18	-	H-3, H-6
5	146,2	-	H-3, H-6	142,48	-	H-3, H-6
6	113,0	7,15 (s)	H-7	114,56	6,88 (s)	H-7
7	79,9	5,34 (d, 12,9)	H-8'', H-8, H-6	75,68	5,38 (s)	H-8'', H-6
8	45,4	3,64 (dd, 12,9; 11,6)	H-7''	48,63	3,08 (d, 11,4)	H-7''
9	194,4	-	H-8, H-7, H-6'	190,47	-	H-8, H-7, H-6', H-8''
1'	115,7	-	-	111,11	-	H-3, H-5'
2'	164,5	-	H-6'	161,94	-	H-3', H-5'
3'	103,9	6,51 (d, 1,5)	H-5'	100,76	6,46 (s)	H-5'
4'	166,1	-	H-3', H-5', H-6'	163,80	-	H-5', H-6'
5'	111,5	6,47 (m)	H-3'	109,50	6,45 (d, 8,3)	H-3'
6'	129,7	7,56 (d, 8,7)	-	127,73	7,43 (d, 8,3)	-
1''	134,6	-	H-7'', H-3'', H-5''	133,02	-	H-7'', H-3'', H-5''
2''	130,9	6,50 (d, 8,4)#	H-7''	128,42	6,95 (d, 8,2)	H-7''
6''	130,9	6,50 (d, 8,4)#	H-7''	128,42	6,95 (d, 8,2)	H-7''
3''	115,6	6,49 (d, 8,4)#	H-2'', H-6''	113,57	6,62 (d, 8,2)	-
5''	115,6	6,49 (d, 8,4)#	H-2'', H-6''	113,57	6,62 (d, 8,2)	-
4''	157,1	-	H-2'', H-6'', H-3'', H-5''	154,41	-	H-2'', H-6'', H-3'', H-5''
7''	47,7	4,38 (d, 6,2)	H-8'', H-3, H-2'', H-6''	46,70	4,43 (d, 10,6)	H-8, H-2'', H-6''
8''	44,4	4,28 (dd, 6,2; 11,6)	H-8, H-7''	43,17	4,34 (dd, 10,6; 11,4)	H-8, H-7'', H-7
9''	204,4	-	H-6''', H-8''	202,45	-	H-7'', H-8'', H-6'''
1'''	114,6	-	H-5''', H-3'''	112,69	-	H-5''', H-3'''
2'''	166,2	-	H-6'''	163,80	-	H-6''', H-3'''
3'''	103,7	6,30 (d, 2,4)	H-5'''	100,67	6,09 (s)	H-5'''
4'''	166,6	-	H-5''', H-6'''	164,45	-	H-5''', H-6'''
5'''	109,3	6,55 (dd, 9,0; 2,4)	-	105,74	5,80 (d, 9,0)	H-3'''
6'''	133,5	8,01 (d, 9,0)	-	130,15	6,75 (d, 9,0)	-

\*[ $\text{CD}_3\text{OD}$ , RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) e RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz)]. #Sinal sobreposto

Ao analisar as estruturas dos dímeros de chalcona (**AG3**, **AG8** e **AG9**) isolados respectivamente da fase acetato de etila das folhas e da fase acetato de etila do caule de *A. graveolens*, percebe-se que as estruturas desses dímeros são formadas pela junção de duas duplas ligações, das posições  $\alpha$  e  $\beta$  de duas unidades de chalconas, resultando em um novo anel de seis carbonos.

Os dímeros de chalconas são pouco comuns e de acordo com dados da literatura, estes tipos químicos só foram isolados de espécies das famílias Anacardiaceae e Leguminosae (BANDEIRA, MATOS & BRAZ-FILHO, 1994; BANDEIRA, MATOS & BRAZ-FILHO, 2003; BAI et al., 2003; MOREIRA, 2014). Da casca da raiz de *S. brasiliensis* foram isolados os dímeros de chalconas conhecidos por schinopsona A e B (MOREIRA, 2014) e da casca do caule de *Myracrodruon urundeuva* foram isolados os dímeros de chalconas denominados de urundeuquina A, B, C e matosina (BANDEIRA, MATOS & BRAZ-FILHO, 1994) e das raízes de *Glycyrrhiza uralensis* (Leguminosae) foi isolada a licobichalcona (BAI et al., 2003).

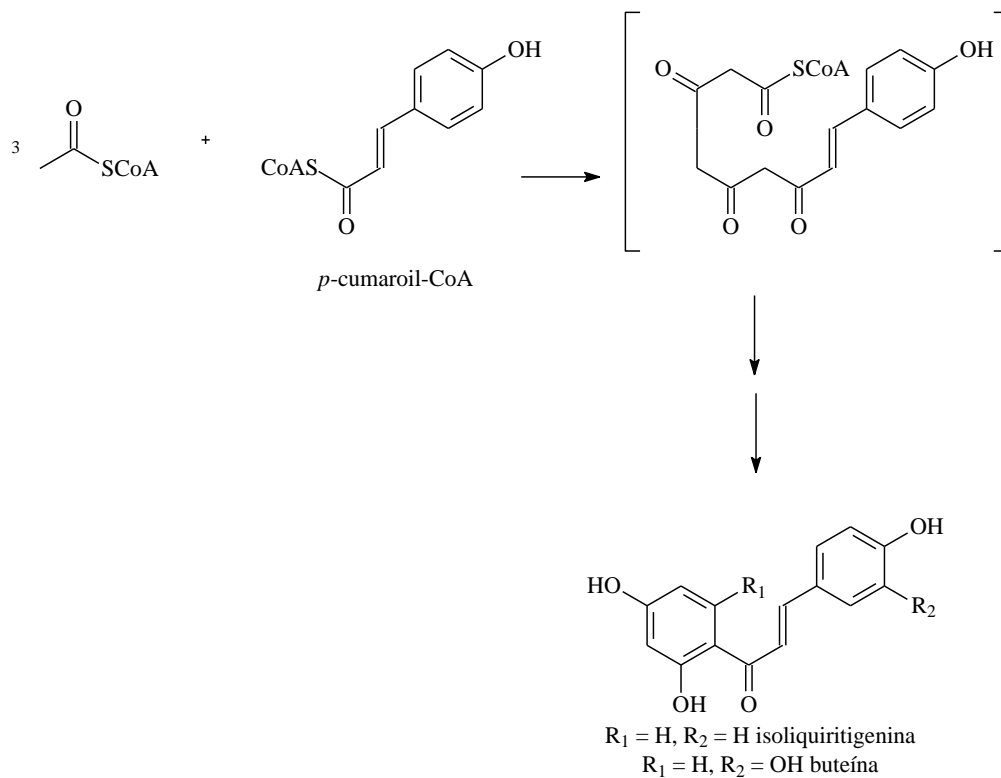
A rota biossintética proposta por Bai et al. (2003) para formação da licobichalcona foi baseada no acoplamento de radicais dos monômeros constituintes do dímero com subsequentes rearranjos promovendo a formação do anel adicional de seis membros. A rota biossintética apresentada por Moreira (2014) para os dímeros de chalcona schinopsona A e B, também considerou que na formação desses tipos químicos acontece via acoplamento de radicais das duas unidades monoméricas de chalconas.

Sendo assim, considerando as propostas biossintética apresentadas por esses autores (BAI et al., 2003; MOREIRA, 2014) para os dímeros de chalconas licobichalcona e schinopsona A e B, pode-se também propor que na formação dos dímeros de chalconas (**AG3**, **AG8** e **AG9**) isolados da fase acetato de etila das folhas e caule de *A. graveolens*, aconteça a partir do acoplamento de radicais das duas unidades de chalconas.

Como pode ser observado no Esquema 9, a estrutura básica das chalconas, dois anéis aromáticos conectados por três átomos de carbono ( $C_6-C_3-C_6$ ), tem sua origem biossintética resultante da utilização de metabólitos das vias do chiquimato e do acetato. Sabe-se que a via de degradação do aminoácido fenilalanina envolve uma série de reações catalisadas por enzimas específicas, que leva à formação do ácido *para*-cumárico na forma de coenzima A (CoA). Este, por sua vez, reage com três moléculas de malonil-CoA, em uma reação catalisada pela enzima chalcona sintase, dando origem a estrutura básica das chalconas (YUNES & FILHO, 2014).

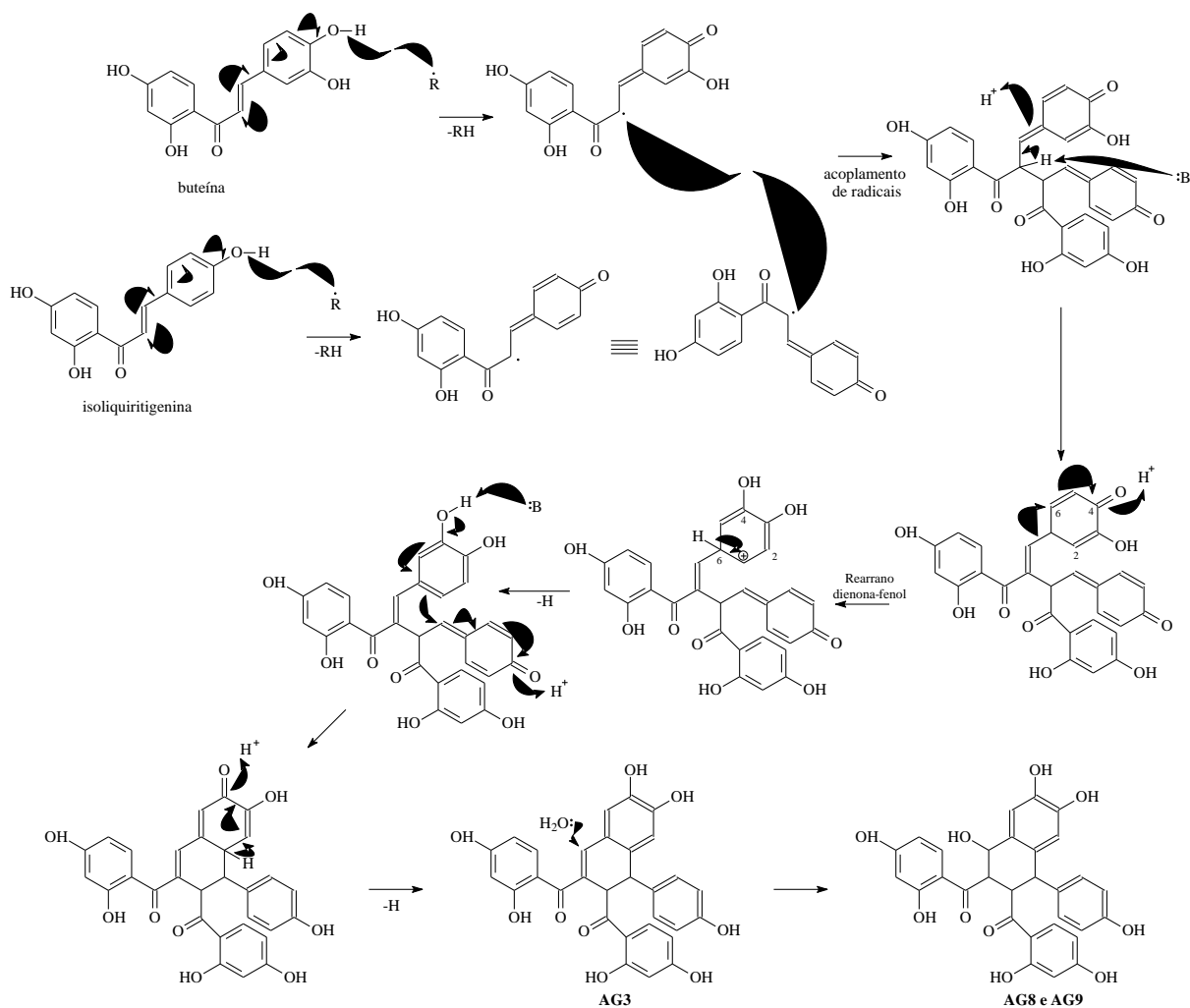


**Esquema 9** – Rota biossintética para formação da estrutura das chalcona isoliquiritigenina e buteína

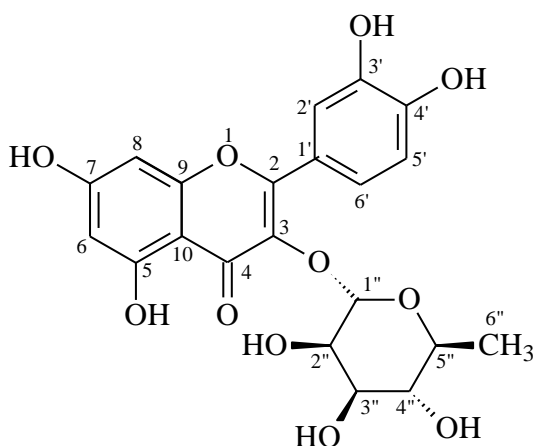


A partir da junção das unidades monoméricas de chalconas (buteína e isoliquiritigenina), formam-se, por exemplo, as estruturas dos dímeros de chalconas (**AG3**, **AG8** e **AG9**), considerando que essa junção ocorre via acoplamento de radicais, conforme pode ser notado no Esquema 10.

**Esquema 10 – Proposta de rota biossintética para formação de AG3 e AG8 e AG9**



### 5.1.3.10 Elucidação estrutural da substância AG10

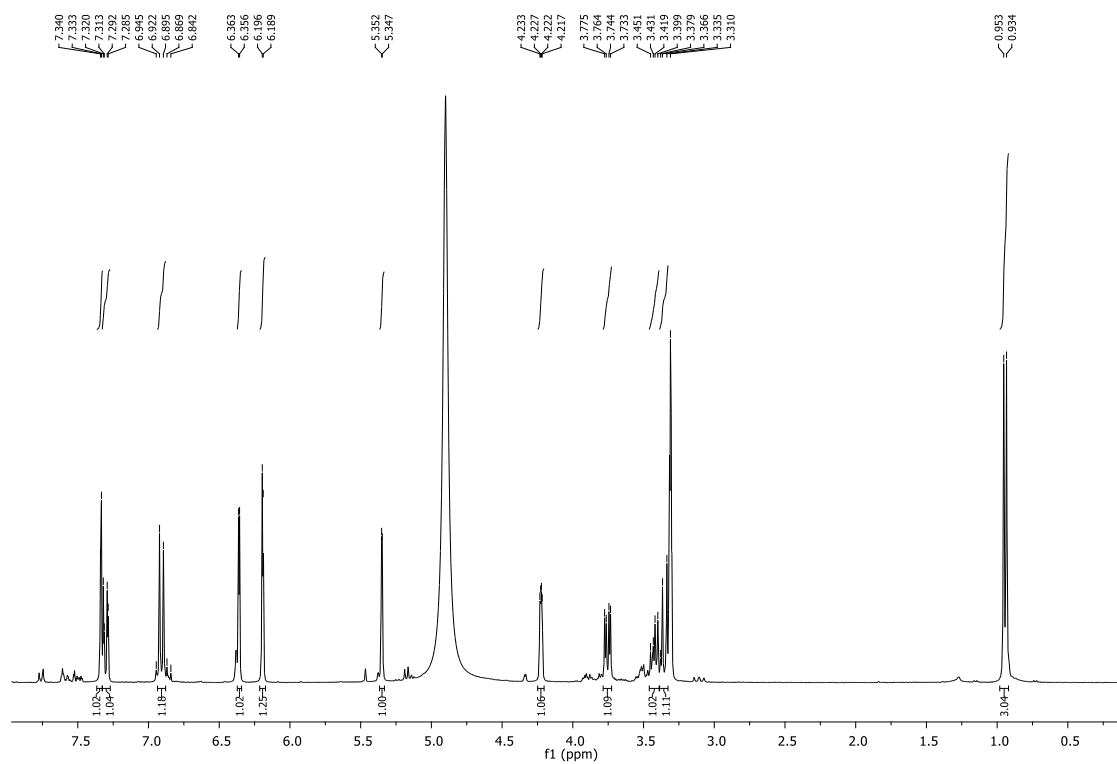


**AG10**

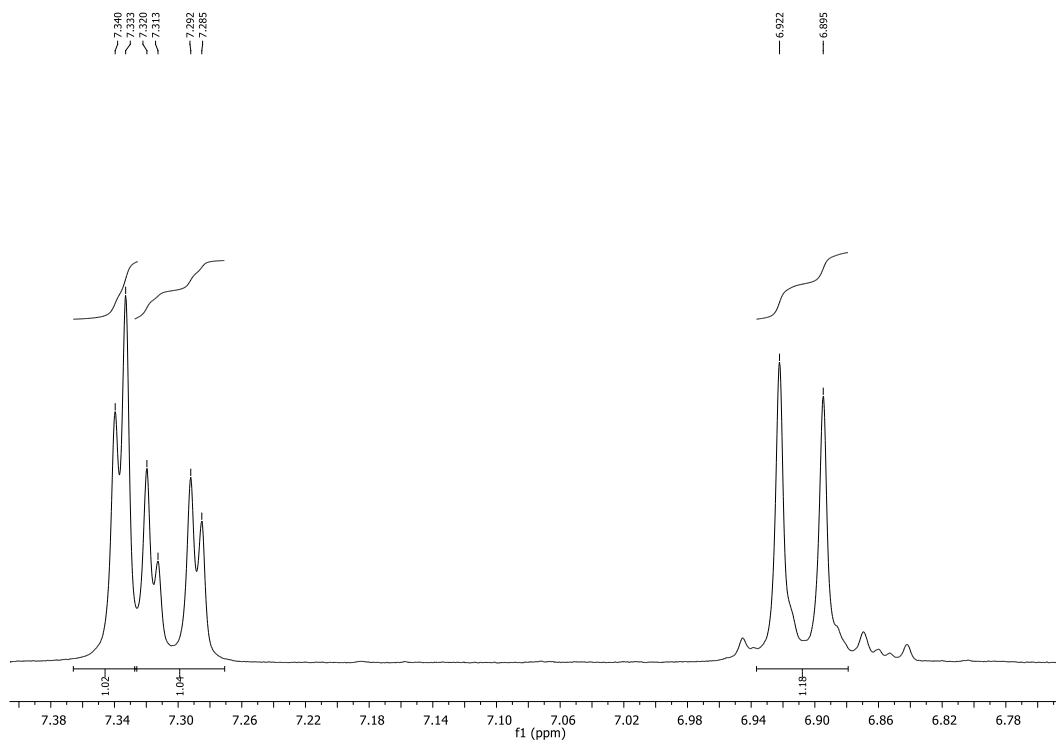
A substância **AG10** (31,3 mg) foi isolada da fração **ACAG-12-J-2-A** da fase acetato de etila do caule de *A. graveolens* (conforme item 4.4.4.3, página 84). A substância **AG10** apresentou-se com um sólido amarelo, solúvel em metanol. A análise da fração **ACAG-12-J-2-A** por CCDC, seguida de revelação com solução de  $\text{FeCl}_3$ , indicou que essa fração era constituída de uma substância fenólica devido à coloração escura na cromatoplaça. A estrutura da substância **AG10** foi elucidada através da análise dos dados dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e através da comparação com dados da literatura (CORREIA et al., 2008).

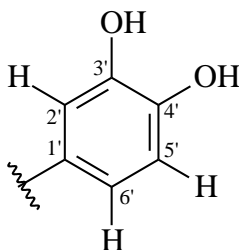
A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 144 e 145) revelou a presença de um duplo dubleto em  $\delta$  7,30 ( $J = 2,1$  e  $8,1$  Hz) e de um dubleto em  $\delta$  7,33 ( $J = 2,1$  Hz), referentes aos hidrogênios H-6' e H-2', respectivamente. A constante de acoplamento de 2,1 Hz observada em ambos dubletos indicou o acoplamento *meta* do H-6' com o H-2'. Além disso, observou-se acoplamento em *orto* do H-6' com um dubleto em  $\delta$  6,90 ( $J = 8,1$  Hz) referente ao hidrogênio H-5'. Essas atribuições sugeriu a presença de um anel aromático trissubstituído, indicando tratar-se do anel **B** de um flavonoide (Figura 146).

**Figura 144** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **AG10** [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]

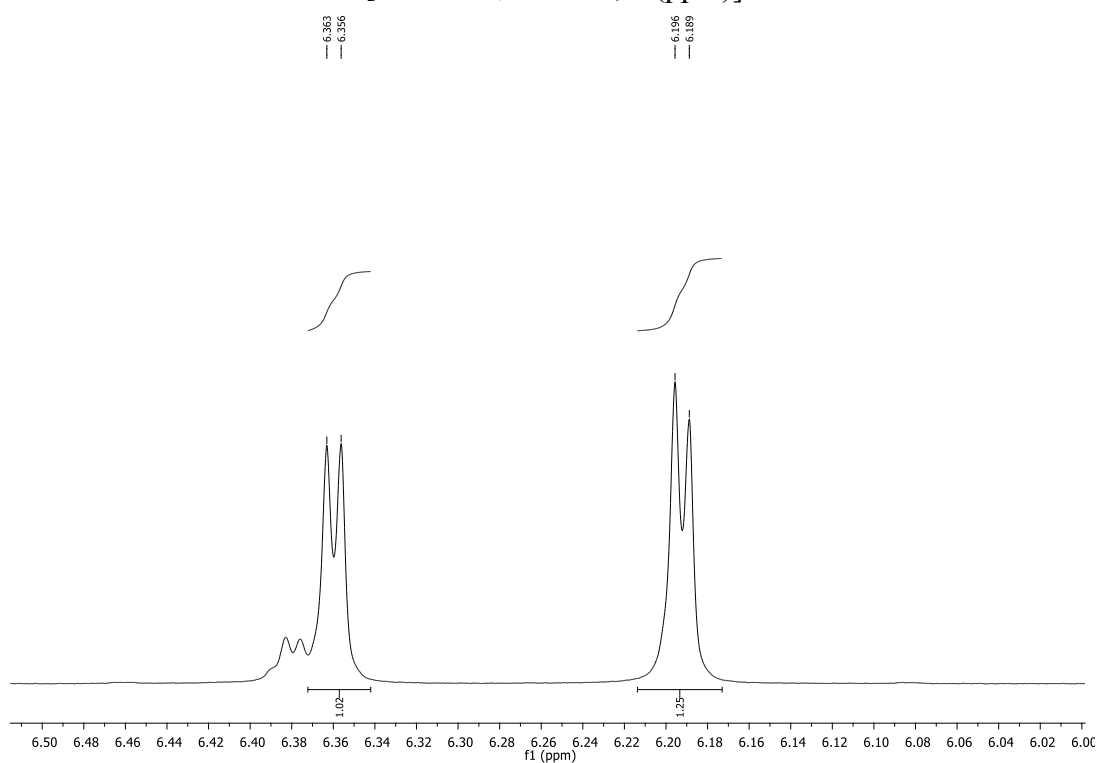


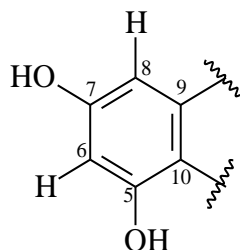
**Figura 145** – Ampliação na região entre  $\delta$  6,70 e  $\delta$  7,40 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **AG10** [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



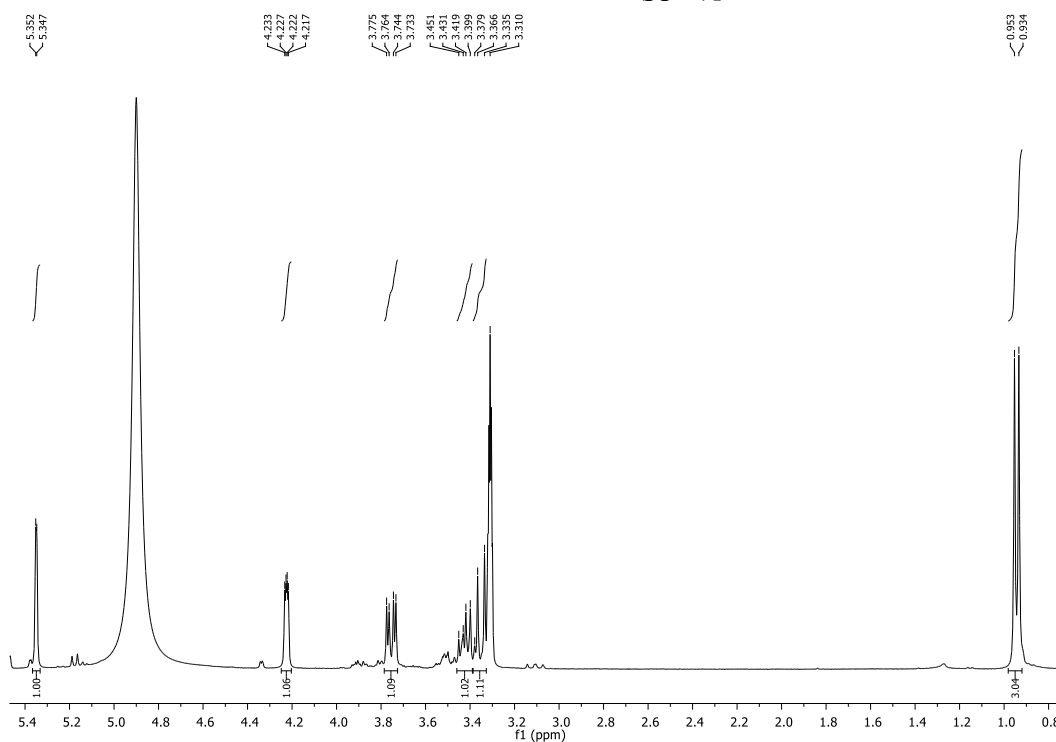
**Figura 146** – Estrutura do anel **B** de **AG10**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (ampliado na Figura 147) também revelou a presença de um par de dubletos com constante de acoplamento ( $J$ ) de 2,1 Hz em  $\delta$  6,36 e  $\delta$  6,19, correspondentes aos sinais dos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente. A constante de acoplamento ( $J$ ) de 2,1 Hz observada em ambos dubletos indicou o acoplamento *meta* entre H-6 e H-8. Essas atribuições sugeriu a presença de um anel aromático tetrasubstituído, sendo atribuído ao anel **A** de um flavonoide (Figura 148).

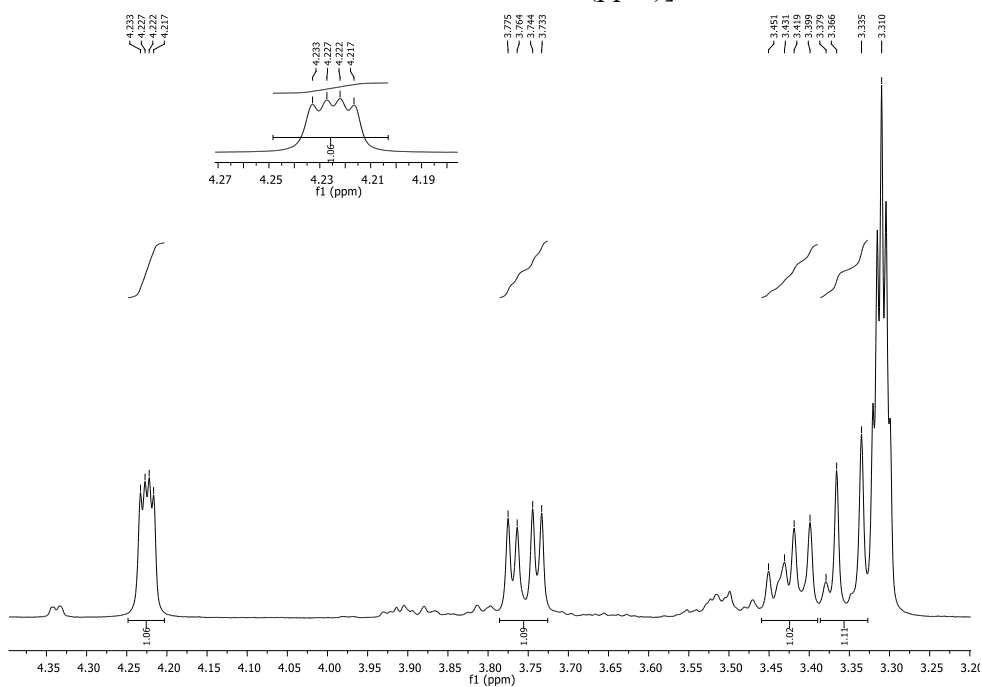
**Figura 147** – Ampliação na região entre  $\delta$  6,00 e  $\delta$  6,50 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **AG10** [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]

**Figura 148** – Estrutura do anel A de AG10

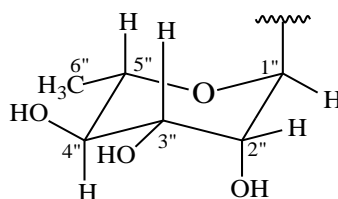
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (ampliado nas Figuras 149 e 150) apresentou um dubleto em  $\delta$  5,35, integrando para um hidrogênio, com constante de acoplamento de 1,5 Hz. Além disso, verificou-se a presença de multipletos entre  $\delta$  3,30 e  $\delta$  4,24 característico de açúcar e, por fim, foi observado a presença de um dubleto em  $\delta$  0,94, integrando para três hidrogênios, com constante de acoplamento de 5,7 Hz, sugerindo a presença de um grupo metílico. Essas atribuições remetem a um monossacarídeo. Sendo que, o dubleto em  $\delta$  0,94 é típico do grupo metílico da ramnose (Figura 151). O dubleto em  $\delta$  5,35 é atribuído ao hidrogênio anomérico (H-1'') da ramnose e pela constante de acoplamento ( $J$ ) de 1,5 Hz, concluiu-se tratar-se do anomero  $\alpha$  (caso a configuração fosse  $\beta$ -ramnose a constante de acoplamento ( $J$ ) observada seria entre 6 a 8 Hz) (MENDEZ, et al., 1995).

**Figura 149** – Ampliação na região entre  $\delta$  0,80 e  $\delta$  5,60 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de AG10 [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]

**Figura 150** – Ampliação na região entre  $\delta$  3,20 e  $\delta$  4,36 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **AG10** [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 151** – Estrutura do monossacarídeo ramnose

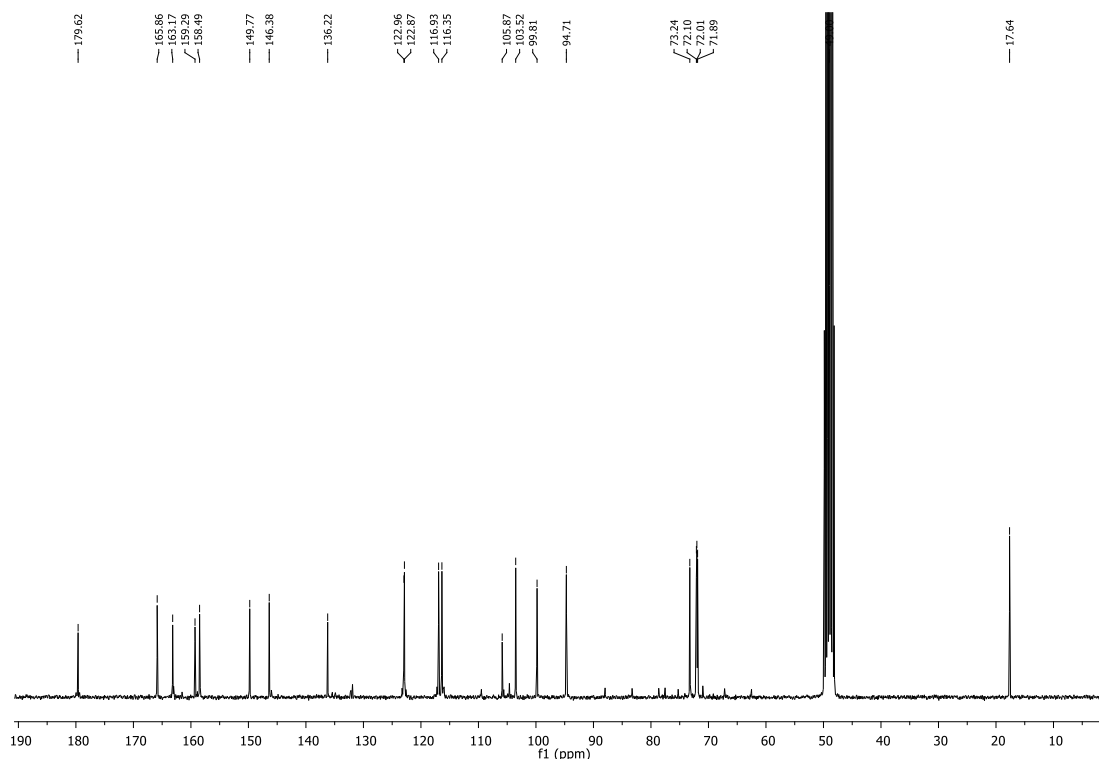


O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 152) revelou a presença de 15 sinais referentes a carbonos característicos da estrutura básica dos flavonoides e mais outros 6 sinais de carbonos referente ao monossacarídeo ramnose. Os sinais observados nesse espectro atribuídos aos carbonos carbinólicos C-5'', C-2'', C-3'' e C-4'' do glicosídeo corroboram com a estrutura da ramnose, principalmente o sinal em  $\delta$  17,6 atribuído ao carbono (C-6'') do grupo metílico da ramnose.

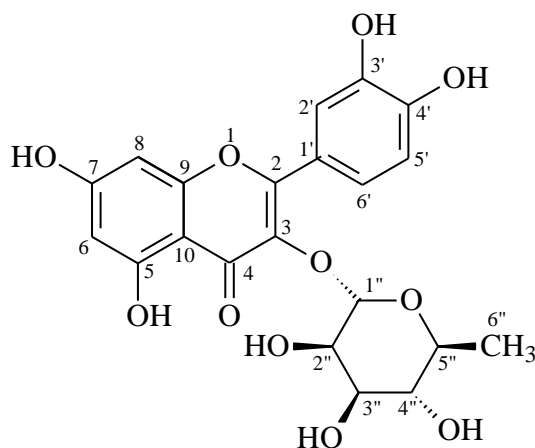
Sendo assim, através da análise dos dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ , inferiu-se que a substância **AG10** é um flavonol-3-*O*- $\alpha$ -glicosilado cuja estrutura é 3-*O*- $\alpha$ -ramnopiranosil-5,7,3',4'-tetraidroxiflavona (Figura 153), conhecido como quercetina-3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo (quercitrina). Cabe salientar que a elucidação estrutural de **AG10** também foi

corroborada com a comparação dos dados obtidos dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  com dados da literatura (CORREIA et al., 2008). Os dados experimentais atribuídos de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  de **AG10** sendo comparados com dados da literatura são apresentados na Tabela 38.

**Figura 152** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **AG10** [75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 153** – Estrutura de **AG10** [quercetina-3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo (quercitrina)]





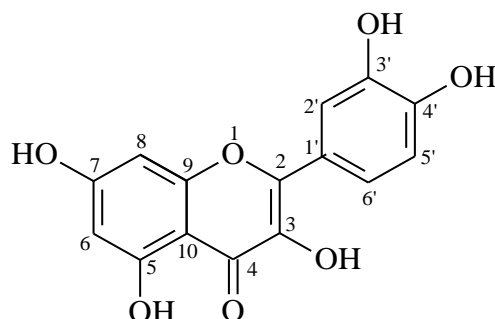
**Tabela 38** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de **AG10** em  $\text{CD}_3\text{OD}$  [( $\delta$  (ppm); mult.e  $J$  (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores da literatura\*

AG10			Literatura (CORREIA et al., 2008)*	
C/H	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	158,5	-	158,45	-
3	136,2	-	136,14	-
4	179,6	-	179,54	-
5	163,2	-	163,01	-
6	99,8	6,19 ( <i>d</i> , 2,1)	100,04	6,18 ( <i>sl</i> )
7	165,9	-	166,35	-
8	94,7	6,36 ( <i>d</i> , 2,1)	94,89	6,35 ( <i>sl</i> )
9	159,3	-	158,24	-
10	105,9	-	105,71	-
1'	123,0	-	122,95	-
2'	116,4	7,33 ( <i>d</i> , 2,1)	116,40	7,34 ( <i>m</i> )
3'	146,4	-	146,36	-
4'	149,8	-	149,78	-
5'	116,9	6,90 ( <i>d</i> , 8,1)	116,96	6,91 ( <i>d</i> , 7,6)
6'	122,9	6,90 ( <i>dd</i> , 2,1; 8,1)	122,86	7,34 ( <i>m</i> )
1''	103,5	5,35 ( <i>d</i> , 1,5)	103,49	5,35 ( <i>sl</i> )
2''	72,0	4,22 ( <i>m</i> )	71,99	4,23 ( <i>m</i> )
3''	72,1	3,75 ( <i>dd</i> , 3,3; 9,3)	72,11	3,75 ( <i>dd</i> , 1,5; 7,5)
4''	73,2	3,35 ( <i>dd</i> , 3,9; 9,3)	73,26	3,35 ( <i>m</i> )
5''	71,9	3,41 ( <i>d</i> , 6,0)	71,87	3,42 ( <i>m</i> )
6''	17,6	0,94 ( <i>d</i> , 5,7)	17,62	0,94 ( <i>d</i> , 5,8)

\*[ $\text{CD}_3\text{OD}$ , RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz)]

### 5.1.4 Identificação e determinação estrutural das substâncias isoladas das flores de *T. guianensis*

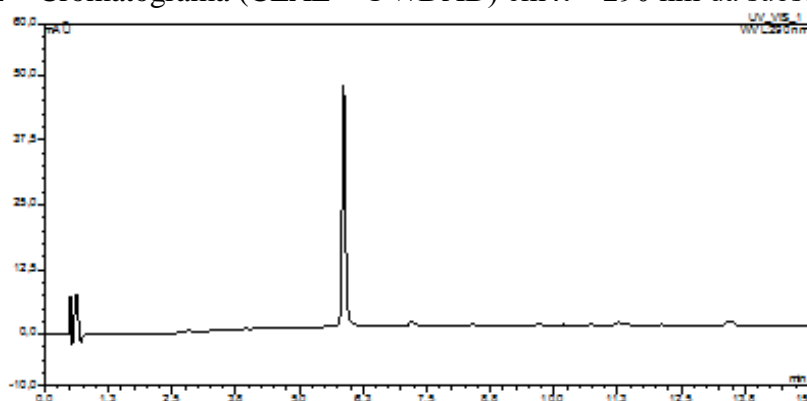
#### 5.1.4.1 Elucidação estrutural da substância AG11



**AG11**

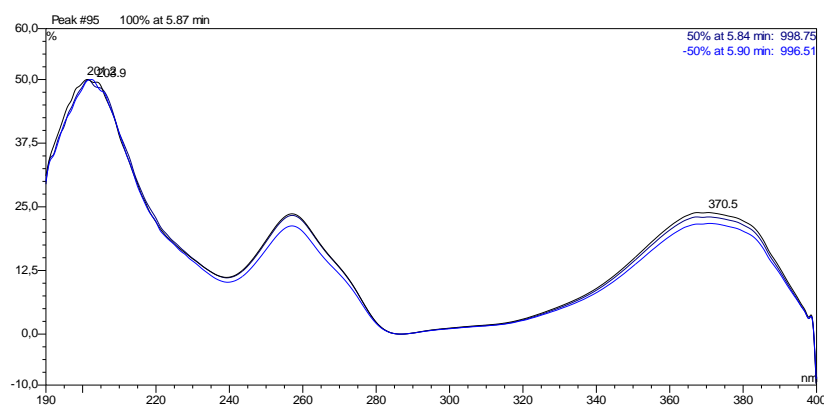
A substância **AG11** (10 mg) foi isolada da fração **DTG-11-C** da fase diclorometano das flores de *T. guianensis* (conforme item 4.5.1.1, página 86). A substância **AG11** apresentou-se com um sólido amarelo, solúvel em metanol. A análise da fração **AG11** por CCDC, seguida de revelação com solução de FeCl<sub>3</sub>, indicou que essa fração era constituída de uma substância fenólica devido à coloração escura na cromatoplaça. Através da análise da fração **DTG-11-C** por CLAE-DAD, foi observado a presença de um único pico no cromatograma (Figura 154), indicando que a fração era composta por uma única substância. O espectro no UV/Vis do pico (Figura 155) revelou  $\lambda_{\text{máx}}$  em 203, 258 e 370 nm, sugerindo tratar-se realmente de uma substância fenólica.

**Figura 154** – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em  $\lambda = 290$  nm da substância **AG11**



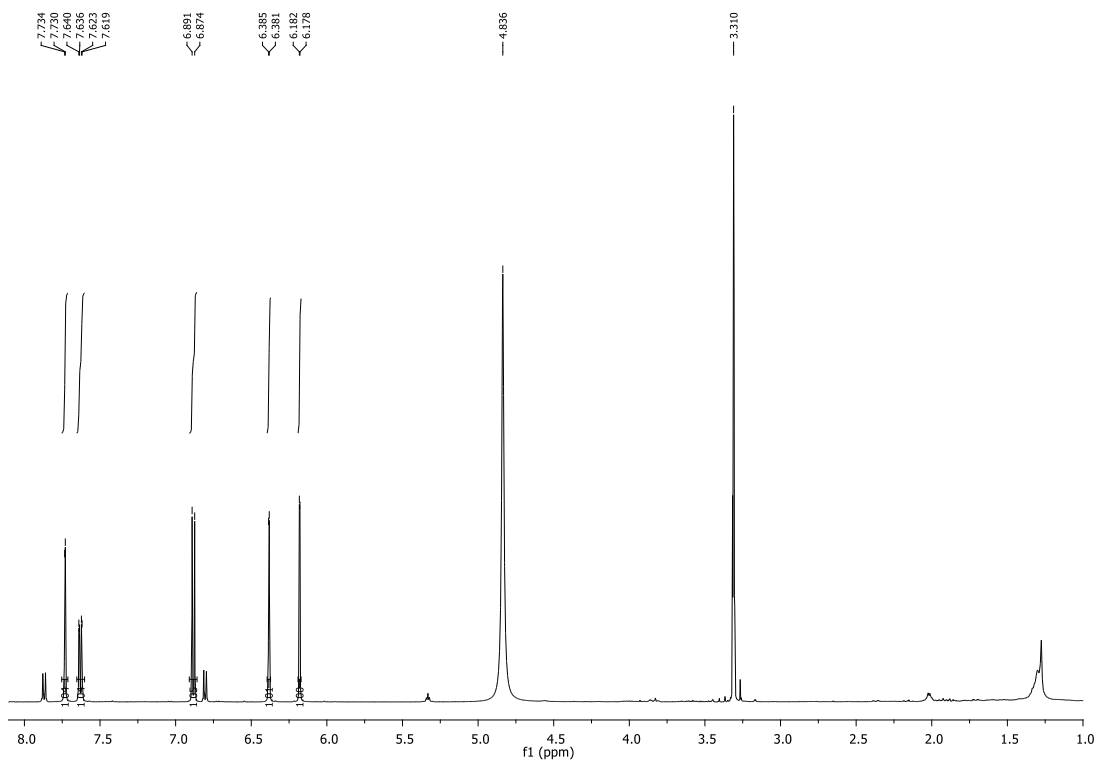
\* Condições cromatográficas ver item 4.1, página 65. Tempo de retenção (tR) de AG11 = 5,9 minutos

**Figura 155** – Espectro no UV, obtido pelo detector DAD, da substância **AG11**

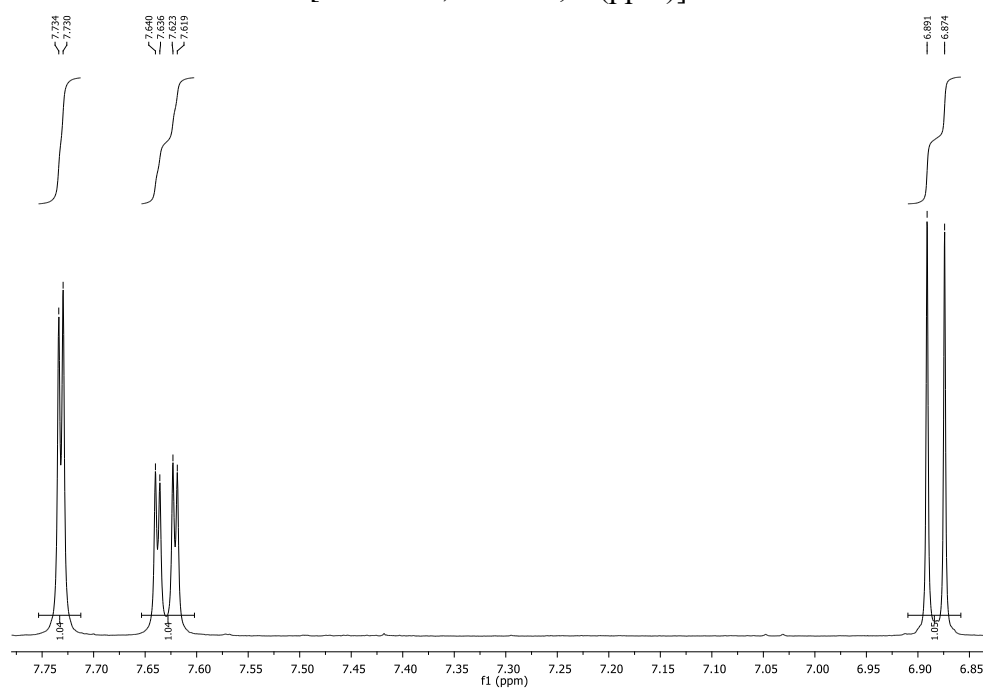


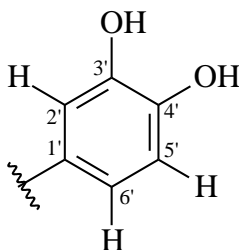
A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 156 e 157) de **AG11** revelou a presença de um duplo dubleto em  $\delta$  7,63 ( $J = 2,0$  e 8,5 Hz) e de um dubleto em  $\delta$  7,73 ( $J = 2,0$  Hz), referentes aos hidrogênios H-6' e H-2', respectivamente. A constante de acoplamento de 2,0 Hz observada em ambos dubletos indicou o acoplamento *meta* do H-6' com o H-2'. Além disso, observou-se acoplamento em *orto* do H-6' com um dubleto em  $\delta$  6,88 ( $J = 8,5$  Hz) referente ao hidrogênio H-5'. Essas atribuições sugeriu a presença de um anel aromático trissubstituído, indicando tratar-se do anel **B** de um flavonoide (Figura 158).

**Figura 156** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **AG11** [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]

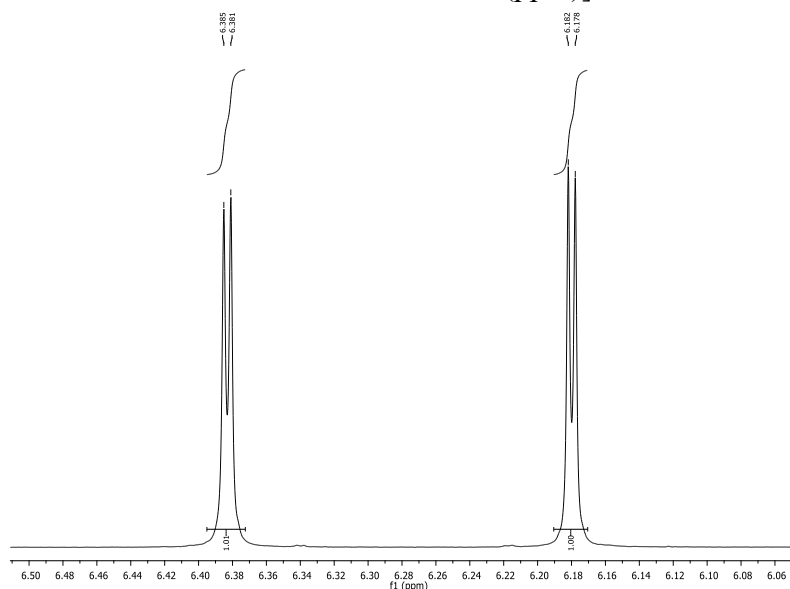


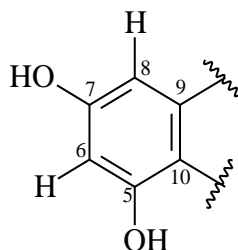
**Figura 157** – Ampliação na região entre  $\delta$  6,85 e  $\delta$  7,75 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **AG11** [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



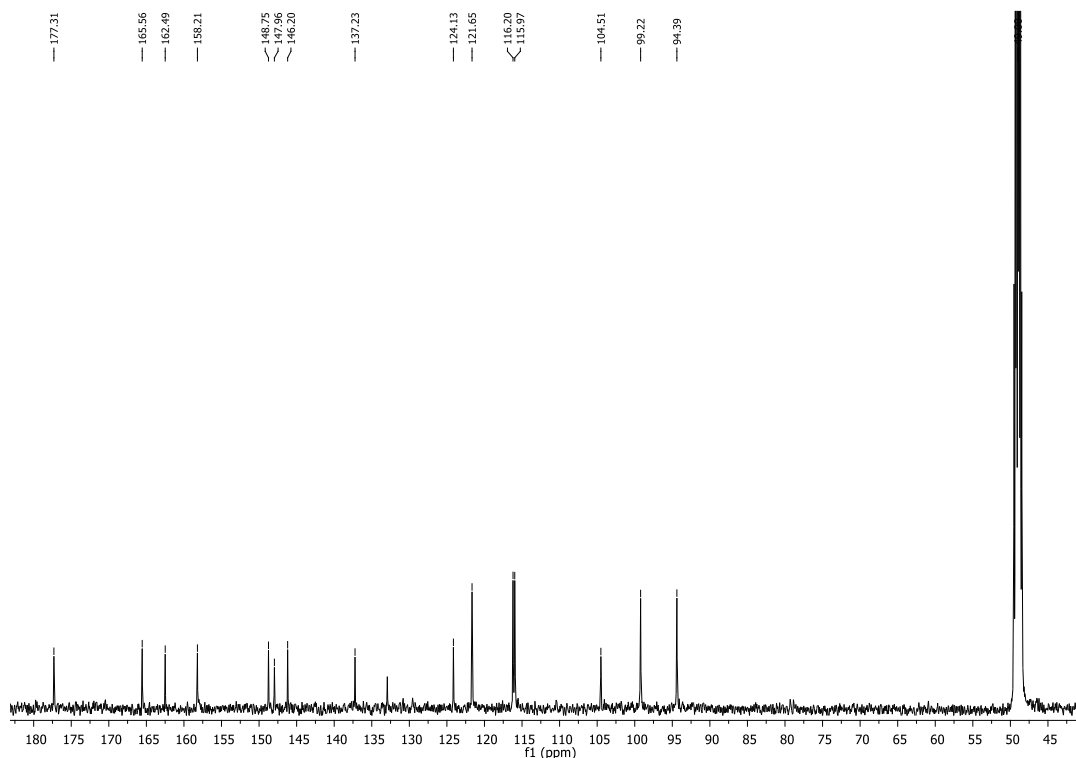
**Figura 158** – Estrutura do anel **B** de **AG11**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (ampliado na Figura 159) também revelou a presença de um par de dubletos com constante de acoplamento ( $J$ ) de 2,0 Hz em  $\delta$  6,38 e  $\delta$  6,18, correspondentes aos sinais dos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente. A constante de acoplamento ( $J$ ) de 2,0 Hz observada em ambos dubletos indicou o acoplamento *meta* entre H-6 e H-8. Essas atribuições sugeriu a presença de um anel aromático tetrasubstituído, sendo atribuído ao anel **A** de um flavonoide (Figura 160).

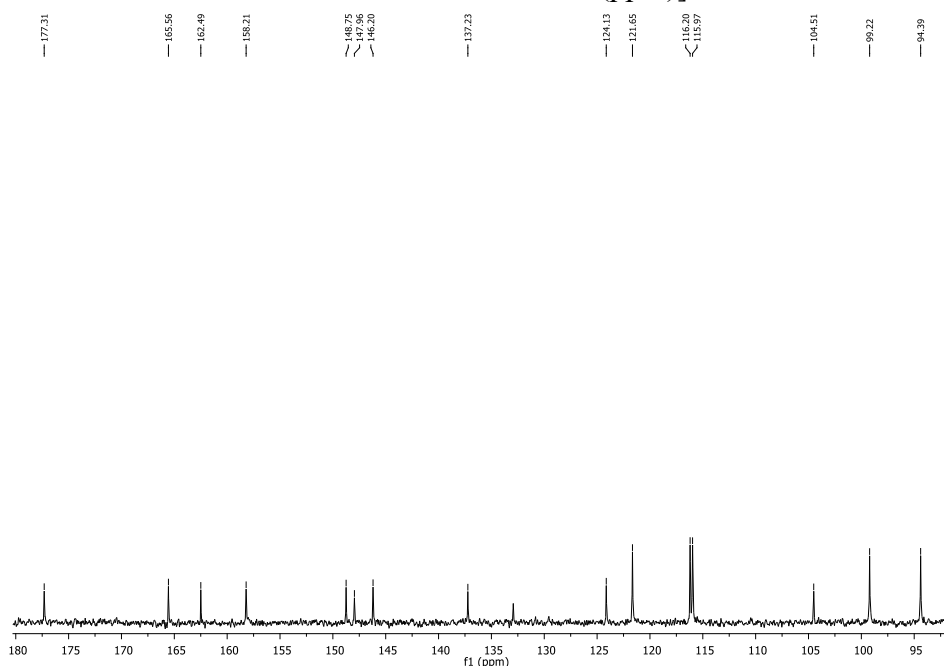
**Figura 159** – Ampliação na região entre  $\delta$  6,06 e  $\delta$  6,50 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **AG11** [500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]

**Figura 160** – Estrutura do anel A de **AG11**

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 161 e 162) revelou a presença de 15 sinais referentes a carbonos característicos da estrutura básica dos flavonoides. A análise desses sinais revelou que a substância **AG11** possui uma estrutura flavanóidica do tipo flavonol. Verificou-se a presença de carbonos característicos do flavonol, como o sinal de carbono carbonílico em  $\delta$  177,3 referente ao C-4, e os sinais de carbonos não hydrogenados em  $\delta$  137,2 e  $\delta$  148,0 referentes aos carbonos C-3 e C-2, além dos carbonos não hydrogenados em  $\delta$  148,7 e  $\delta$  146,2 atribuídos aos carbonos C-4' e C-3', respectivamente. A análise destes dados, associados aos observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e comparação com dados da literatura (GUVENALP & DEMIREZER, 2005) (Tabela 39), permitiu caracterizar a substância **AG11** como sendo 5,7,3',4'-tretrahidroxi flavonol, também conhecida como quercetina.

**Figura 161** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **AG11** [125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]

**Figura 162** – Ampliação na região entre  $\delta$  90,0 e  $\delta$  180,0 do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de AG11 [125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]

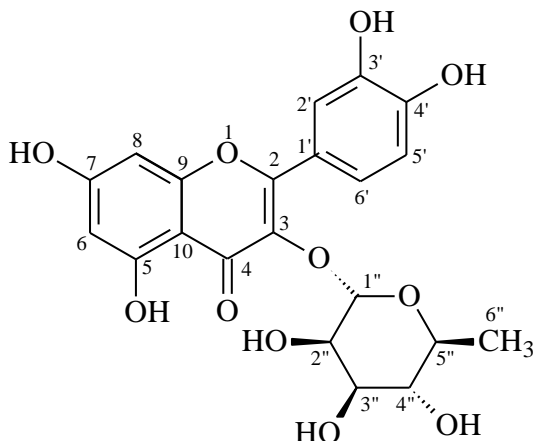


**Tabela 39** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de AG11 em  $\text{CD}_3\text{OD}$  [( $\delta$  (ppm); mult.e  $J$  (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores da literatura\*

AG11			Literatura (GUVENALP & DEMIREZER, 2005)*	
C/H	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	148,0	-	147,9	-
3	137,2	-	137,2	-
4	177,3	-	177,3	-
5	162,5	-	162,5	-
6	99,2	6,18 ( <i>d</i> , 2,0)	99,3	6,17 ( <i>d</i> , 2,0)
7	165,6	-	165,7	-
8	94,4	6,38 ( <i>d</i> , 2,0)	94,4	6,37 ( <i>d</i> , 2,0)
9	158,2	-	158,2	-
10	104,5	-	104,7	-
1'	124,1	-	124,1	-
2'	116,0	7,73 ( <i>d</i> , 2,0)	116,0	7,73 ( <i>d</i> , 2,0)
3'	146,2	-	146,2	-
4'	148,7	-	148,7	-
5'	116,2	6,88 ( <i>d</i> , 8,5)	116,2	6,87 ( <i>d</i> , 8,0)
6'	121,7	7,63 ( <i>dd</i> , 2,0; 8,5)	121,6	7,62 ( <i>dd</i> , 2,0; 7,5)

\*[ $\text{CD}_3\text{OD}$ , RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) e RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz)]

### 5.1.4.2 Identificação da substância AG10 na subfração ATG-7-D

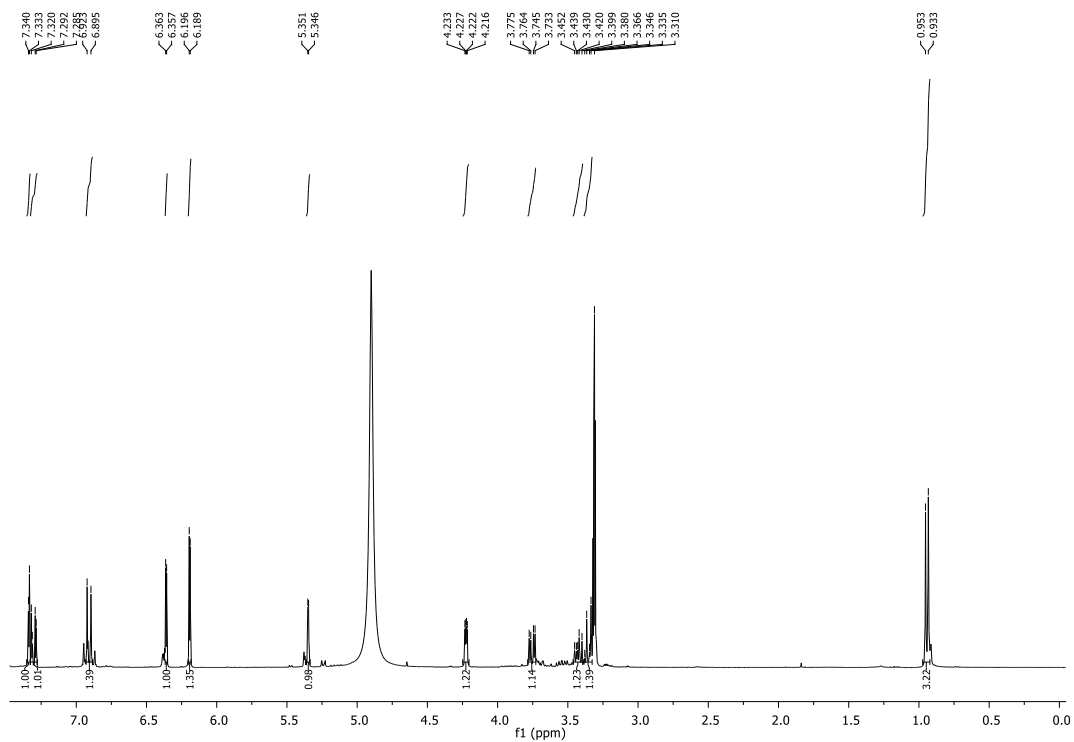


**AG10**

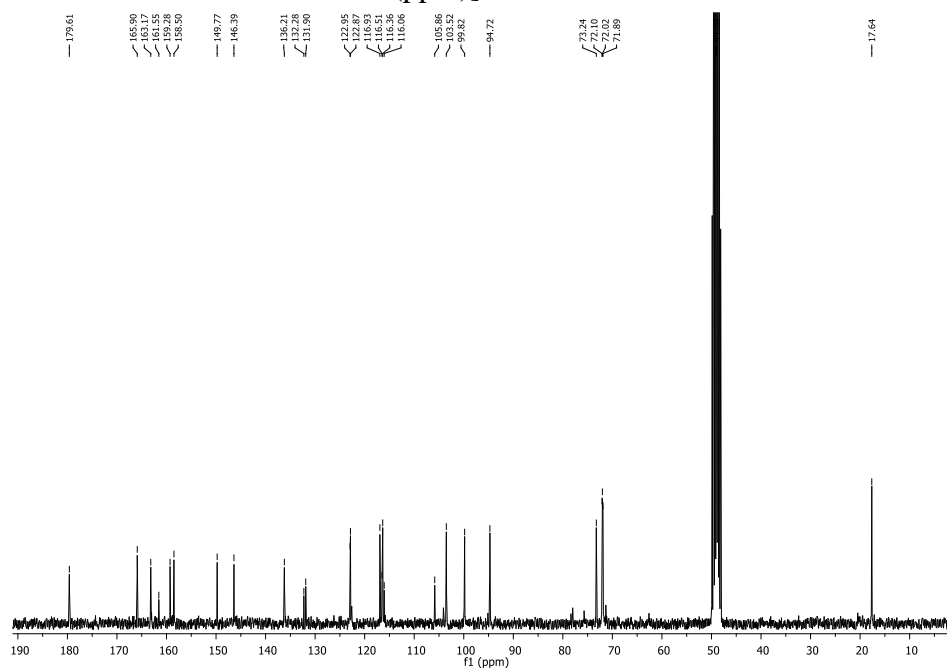
A substância **AG10** que foi isolada da espécie *A. graveolens*, conforme mencionado item 4.4.4.3 (página 84), foi também isolada da subfração **ATG-7-D** (20,1 mg) da fase acetato de etila das flores de *T. guianensis* (conforme item 4.5.2.1, página 88). A subfração **ATG-7-D** apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em metanol. A análise da subfração **ATG-7-D** por CCDC, seguida de revelação com solução de  $\text{FeCl}_3$ , indicou que essa fração era constituída de uma substância fenólica devido a coloração escura na cromatoplaça. A constatação que a subfração **ATG-7-D** tratava-se da substância **AG10** [quercetina-3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo (quercitrina)] se deu através da análise dos dados dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 163), RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 164) e através da comparação com dados da literatura (CORREIA et al., 2008), conforme são apresentados na Tabela 40.



**Figura 163** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração ATG-7-D [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 164** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da subfração ATG-7-D [75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]

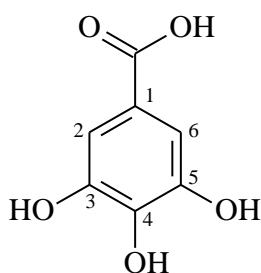


**Tabela 40** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de **AG10** em  $\text{CD}_3\text{OD}$  [( $\delta$  (ppm); mult.e  $J$  (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores da literatura\*

AG10			Literatura (CORREIA et al., 2008)*	
C/H	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	158,5	-	158,45	-
3	136,2	-	136,14	-
4	179,6	-	179,54	-
5	163,2	-	163,01	-
6	99,8	6,19 ( <i>d</i> , 2,1)	100,04	6,18 ( <i>sl</i> )
7	165,9	-	166,35	-
8	94,7	6,36 ( <i>d</i> , $\approx$ 2,1)	94,89	6,35 ( <i>sl</i> )
9	159,3	-	158,24	-
10	105,9	-	105,71	-
1'	123,0	-	122,95	-
2'	116,4	7,33 ( <i>d</i> , 2,1)	116,40	7,34 ( <i>m</i> )
3'	146,4	-	146,36	-
4'	149,8	-	149,78	-
5'	116,9	6,90 ( <i>d</i> , 8,4)	116,96	6,91 ( <i>d</i> , 7,6)
6'	122,9	7,30 ( <i>dd</i> , 2,1; 8,4)	122,86	7,34 ( <i>m</i> )
1''	103,5	5,35 ( <i>d</i> , 1,5)	103,49	5,35 ( <i>sl</i> )
2''	72,0	4,22 ( <i>m</i> )	71,99	4,23 ( <i>m</i> )
3''	72,1	3,75 ( <i>dd</i> , 3,3; 9,0)	72,11	3,75 ( <i>dd</i> , 1,5; 7,5)
4''	73,2	3,35 ( <i>m</i> )	73,26	3,35 ( <i>m</i> )
5''	71,9	3,41 ( <i>d</i> , 6,3)	71,87	3,42 ( <i>m</i> )
6''	17,6	0,94 ( <i>d</i> , 6,0)	17,62	0,94 ( <i>d</i> , 5,8)

\*[ $\text{CD}_3\text{OD}$ , RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) e RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz)]

### 5.1.4.3 Identificação da substância AG7 na subfração ATG-7-F



**AG7 (ácido gálico)**

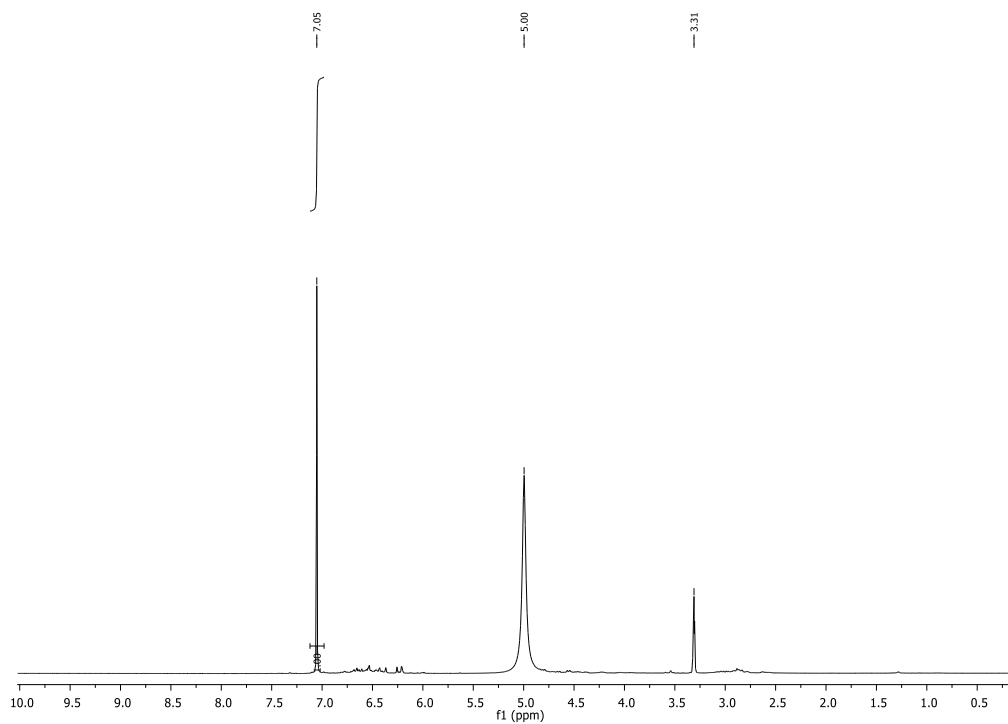
A substância **AG7** que foi isolada da espécie *A. graveolens*, conforme mencionado item 4.4.4.2 (página 82), foi também isolada da subfração **ATG-7-F** (25,0 mg) da fase acetato de etila das flores de *T. guianensis* (conforme item 4.5.2.1, página 88).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 165) da subfração **ATG-7-F** mostrou um singlete em  $\delta$  7,05, valor característico dos dois hidrogênios ligados a carbonos aromáticos (H-2 e H-6) do ácido gálico.

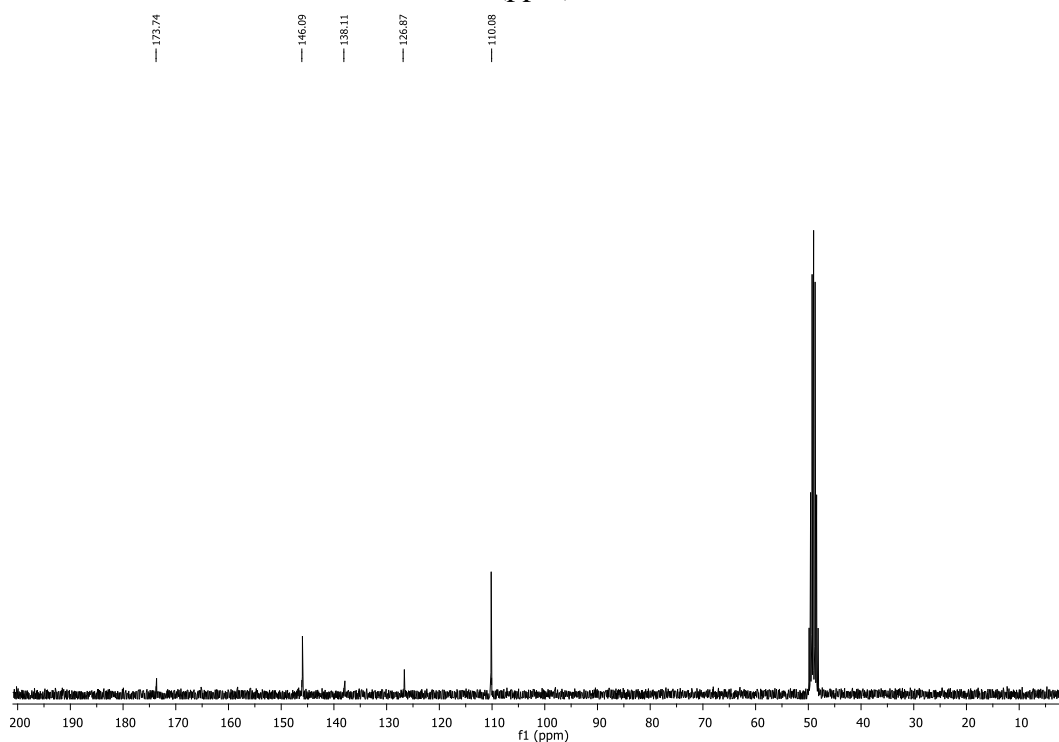
Através da análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da subfração **ATG-7-F** (Figura 166) foi verificada a presença de cinco sinais, entre eles um sinal em  $\delta$  173,7 de carbono não hidrogenado, referente à carbonila de ácido conjugado, três sinais de carbonos não hidrogenados e um sinal de carbono metínico. O sinal em  $\delta$  146,1, referente a dois carbonos oxigenados, foi atribuído aos carbonos C-3 e C-5, o sinal em  $\delta$  138,1 foi atribuído ao C-4, o sinal em  $\delta$  126,9 ao C-1 e o sinal em  $\delta$  110,1 (2C) foi atribuído aos carbonos C-2 e C-6.

Sendo assim, através dessa comparação e da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e dados da literatura (MOREIRA, 2009) (Tabela 41), foi possível identificar a subfração **ATG-7-F** como sendo a substância **AG7**, ou seja, o ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (ácido gálico).

**Figura 165** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração **ATG-7-F** [300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Figura 166** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da subfração **ATG-7-F** [75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)]



**Tabela 41** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de **AG7** [ $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm)] e valores da literatura

Posição	AG7		Ácido gálico*	
	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	126,9	-	126,6
2	7,05 (s)	110,1	7,11 (s)	110,2
3	-	146,1	-	146,0
4	-	138,1	-	137,9
5	-	146,1	-	146,0
6	7,05 (s)	110,1	7,11 (s)	110,2
7	-	173,7	-	173,6

\*MOREIRA, 2009.

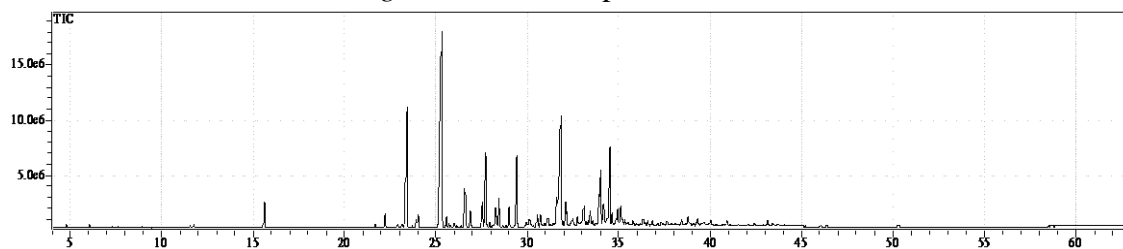
### 5.1.5 Identificação da composição química dos óleos essenciais das flores das espécies *T. guianensis* e *S. mombin*

#### 5.1.5.1 Identificação dos componentes presentes no óleo essencial das flores de *T. guianensis*

O óleo essencial obtido a partir das flores de *T. guianensis* por meio da técnica de hidrodestilação, apresentou uma coloração amarelada e um rendimento médio de  $0,092 \pm 0,02$  %. As substâncias presentes no óleo essencial foram identificadas por CG-EM, através de seus índices de retenção (IR) e espectros de massas em comparação com a literatura (ADAMS, 1995) e também pela comparação com os espectros de massas existentes no banco de dados do aparelho (WILEY 229).

O cromatograma obtido através da análise por CG-EM do óleo essencial extraído das flores de *T. guianensis* pode ser observado na Figura 167. No total foram detectadas 46 substâncias presentes no óleo essencial, no entanto, identificou-se apenas 31 substâncias (Tabela 42), uma vez que as demais substâncias não apresentaram espectros de massas semelhantes aos descritos no banco de dados do aparelho, além disso, os IR cálculos para essas substâncias não eram compatíveis com os espectros de massas apresentados na literatura (ADAMS, 1995), não sendo possível, portanto, identifica-los com confiança.

**Figura 167** – Cromatograma obtido da análise do óleo essencial extraído das flores de *T. guianensis* em triplicata



**Tabela 42** – Percentual dos componentes presentes no óleo essencial das flores de *T. guianensis*

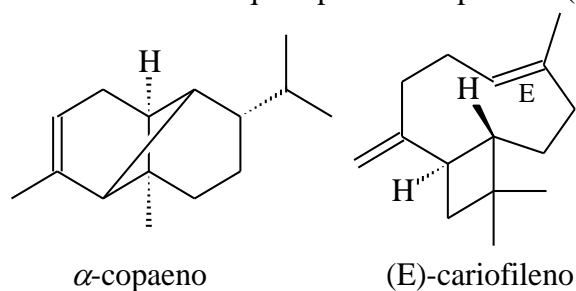
Pico	TR <sub>M</sub>	IR obtido	IR (ADAMS, 1995)	Substâncias	Teor (%)
1	6,037	936	939	$\alpha$ -pineno	0,15
2	7,622	991	991	$\beta$ -mirceno	0,09
3	8,939	1030	1031	Limoneno	0,10
4	11,578	1100	1098	Linalol	0,15
5	11,748	1105	1098	Nonanal	0,20
6	15,606	1196	1190	Salicilato de Metila	1,60
7	21,688	1340	1339	$\delta$ -elemeno	0,21
8	22,206	1353	1351	$\alpha$ -cubebeno	0,90
9	22,896	1369	1368	Ciclosativeno	0,29
10	23,147	1375	1372	$\alpha$ -ylangeno	0,25
11	23,398	1380	1376	$\alpha$ -copaeno	10,47
12	23,713	1390	-	NI	0,11
13	23,936	1393	-	NI	0,11
14	24,012	1394	1391	$\beta$ -elemeno	1,31
15	25,296	1424	1418	( <i>E</i> )-cariofileno	23,99
16	25,573	1434	1432	$\beta$ -gurjuneno	0,63
17	25,720	1436	1433	$\gamma$ -elemeno	0,13
18	25,815	1439	1439	Aromadreno	0,32
19	26,586	1457	1454	$\alpha$ -humuleno	2,56
20	26,877	1466	1461	Allo-aromadendreno	1,15
21	27,532	1482	1480	$\gamma$ -curcumeno	2,03
22	27,734	1486	1480	Germacreno D	6,53
23	27,914	1492	1494	$\alpha$ -salineno	0,22
24	28,125	1496	-	NI	0,06
25	28,263	1499	1493	viridifloreno	1,79
26	28,468	1504	1499	$\alpha$ -muuroleno	1,81
27	28,665	1510	-	NI	0,13
28	29,011	1519	-	NI	1,40
29	29,407	1528	1524	$\delta$ -cadineno	5,82
30	29,927	1542	1538	$\alpha$ -cadineno	0,25
31	30,095	1547	-	NI	0,98
32	30,709	1562	1556	Germacreno B	0,68
33	30,943	1568	1563	$\beta$ -calacoreno	0,27
34	31,109	1572	1565	Ledol	0,67
35	31,823	1590	1581	Cariofileno oxidado	9,67
36	31,932	1594	-	NI	0,22
37	32,093	1597	1590	Viridiflorol	2,63
38	32,460	1608	-	NI	0,99
39	32,742	1616	-	NI	0,56
40	33,086	1625	-	NI	1,23
41	33,438	1635	-	NI	0,84
42	34,001	1650	1653	$\alpha$ -cadinol	6,81
43	34,155	1654	-	NI	1,96
44	34,496	1663	-	NI	6,21
45	34,963	1676	-	NI	0,75
46	35,084	1679	-	NI	0,80
Total de compostos identificados (% área relativa)					83,68
Total de compostos não identificados (NI) (% área relativa)					16,32

TR<sub>M</sub> = tempo de retenção obtido da triplicata; IR obtido = índice de retenção calculado pela co-injeção de uma série homóloga de n-alcanos; NI = não identificado

Como pode ser observado na Tabela 42, a maioria das substâncias identificadas no óleo essencial extraído das flores de *T. guianensis* foram de natureza terpênica, como, por exemplo, os monoterpenos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -mirceno e limoneno, os sesquiterpenos  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -copaeno, (*E*)-cariofileno, germacreno B, entre outros.

As substâncias majoritárias presente no óleo essencial foram os sesquiterpenos  $\alpha$ -copaeno (10,47 %) e o (*E*)-cariofileno (23,99 %) (Figura 168). Cabe salientar que apesar dos valores dos IR obtidos (calculados) para essas duas substâncias majoritárias apresentarem uma pequena diferença em relação aos IR registrados para estas substâncias na literatura (ADAMS, 1995), não houve imprecisão na identificação dessas substâncias, visto que, a identificação dessas substâncias foram corroboradas pela comparação dos espectros de massas obtidos pelo CG-EM com os espectros de massas dessas substâncias apresentadas na literatura (ADAMS, 1995), bem como, com os espectros de massas existentes no banco de dados do aparelho (WILEY 229), conforme pode ser visto nas Figuras 169 e 170.

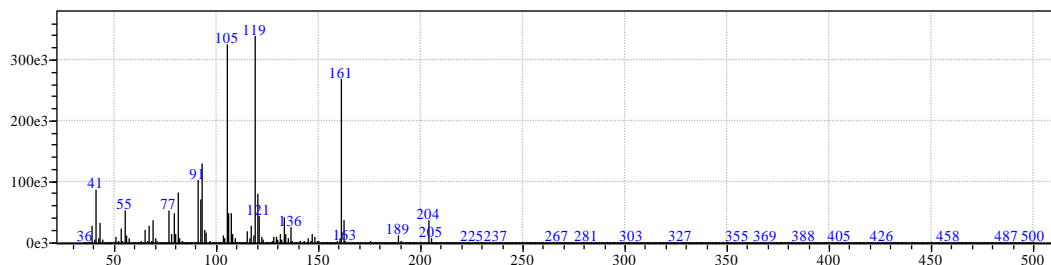
**Figura 168** – Estruturas dos sesquiterpenos  $\alpha$ -copaeno e (*E*)-cariofileno



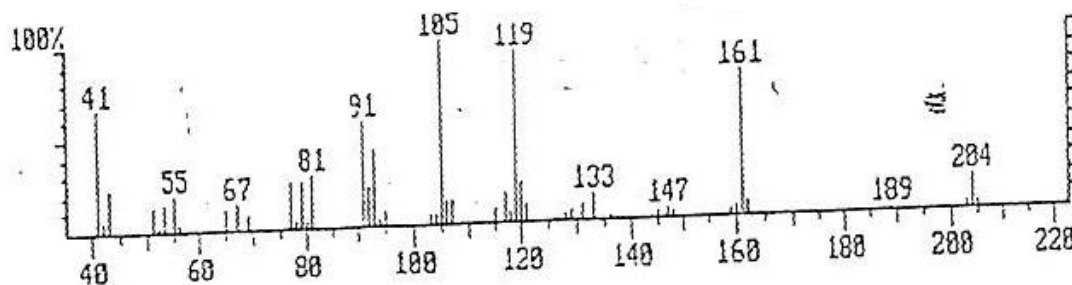


**Figura 169** – Espectro massa da substância  $\alpha$ -Copaeno obtido pelo CG-EM comparado com os espectros de massa da literatura (ADAMS, 1995) e do banco de dados do aparelho (WILEY 229)

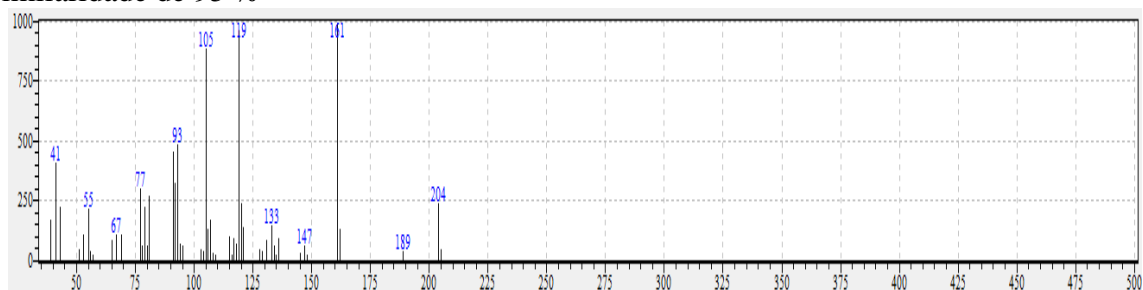
Pico 11;  $TR_M = 23,398$ ;  $\alpha$ -Copaeno (10,47 %); IR obtido (calculado) = 1380



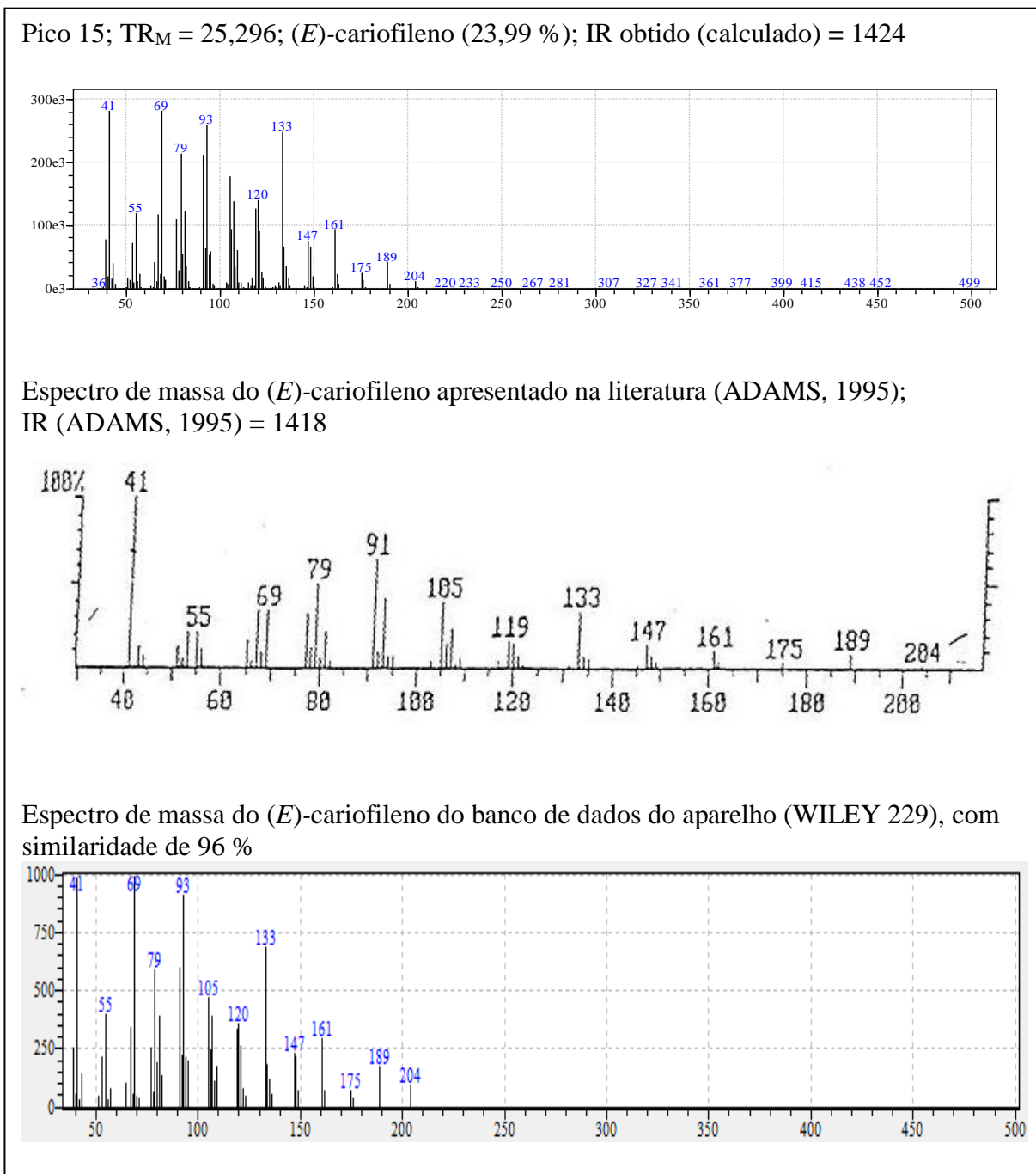
Espectro de massa do  $\alpha$ -Copaeno apresentado na literatura (ADAMS, 1995);  
IR (ADAMS, 1995) = 1376



Espectro de massa do  $\alpha$ -Copaeno do banco de dados do aparelho (WILEY 229), com similaridade de 95 %



**Figura 170** – Espectro massa da substância (*E*)-cariofileno obtido pelo CG-EM comparado com os espectros de massa da literatura (ADAMS, 1995) e do banco de dados do aparelho (WILEY 229)

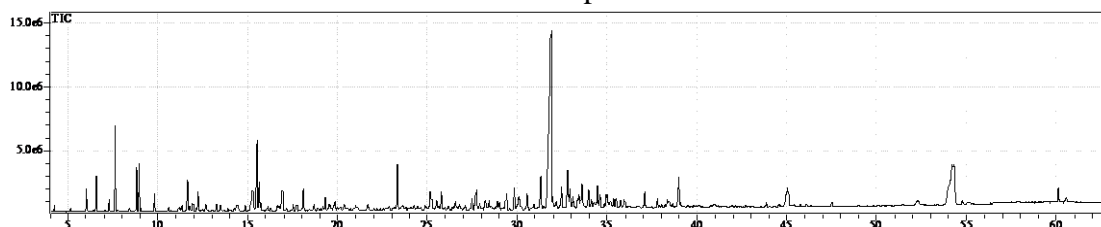


### 5.1.5.2 Identificação dos componentes presentes no óleo essencial das flores de *S. mombin*

Através da técnica de hidrodestilação foi possível extrair o óleo essencial presente nas flores de *S. mombin*. O óleo essencial extraído das flores de *S. mombin*. apresentou uma coloração esverdeada e rendimento médio de  $0,069 \pm 0,05$  %. As substâncias presentes no óleo essencial foram identificadas por CG-EM, através de seus IR e espectros de massas em comparação com a literatura (ADAMS, 1995) e também pela comparação com os espectros de massas existentes no banco de dados do aparelho (WILEY 229).

O cromatograma obtido através da análise por CG-EM do óleo essencial extraído das flores de *S. mombin* está ilustrado na Figura 171.

**Figura 171** – Cromatograma obtido da análise do óleo essencial extraído das flores de *S. mombin* em triplicata



Como pode ser observado na Tabela 43, no total foram detectadas 35 substâncias presentes no óleo essencial, no entanto, identificou-se apenas 22 substâncias, uma vez que as demais substâncias não apresentaram espectros de massas semelhantes aos descritos no banco de dados do aparelho, bem como, os IR cálculos para essas substâncias não eram compatíveis com os espectros de massas apresentados na literatura (ADAMS, 1995), não sendo possível, portanto, identifica-las com a devida confiabilidade.

**Tabela 43** – Percentual dos componentes presentes no óleo essencial das flores de *S. mombin*

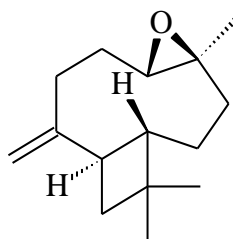
Pico	TR <sub>M</sub>	IR obtido	IR (ADAMS, 1995)	Substâncias	Teor (%)
1	6,031	936	939	$\alpha$ -pineno	1,45
2	6,532	953	-	NI	2,29
3	7,270	980	980	$\beta$ -pineno	0,88
4	7,617	992	991	Mirceno	5,08
5	8,777	1024	1022	<i>orto</i> -Cimeno	2,55
6	8,925	1029	1031	Limoneno	2,96
7	9,788	1053	-	NI	1,24
8	11,636	1102	1099	Perilleno	2,54
9	12,255	1118	1117	<i>exo</i> - Fenchol	1,44
10	12,635	1127	-	NI	0,90
11	15,266	1190	-	NI	3,03
12	15,509	1194	1189	$\alpha$ -terpineol	6,68
13	15,570	1196	1190	Salicilato de metila	2,07
14	15,668	1199	1194	Mirtenol	0,51
15	16,786	1226	-	NI	1,91
16	17,499	1241	1239	Cuminal	0,65
17	17,674	1245	1242	Carvona	0,67
18	18,016	1254	-	NI	1,97
19	19,274	1282	1275	Citronellil formato	1,14
20	23,349	1378	1376	$\alpha$ -copaeno	3,76
21	25,132	1423	1418	( <i>E</i> )-cariofileno	2,25
22	25,759	1439	1443	Farneceno	1,73
23	27,499	1481	1491	Valenceno	1,22
24	27,657	1485	1483	Curcumeno	1,98
25	29,792	1539	1538	$\alpha$ -cadineno	1,56
26	30,032	1545	-	NI	1,87
27	31,168	1574	-	NI	1,53
28	31,705	1586	1581	Óxido de Cariofileno	28,71
29	32,684	1613	1606	Epóxido de humuleno	3,52
30	32,920	1621	-	NI	1,24
31	33,491	1636	-	NI	2,20
32	33,895	1648	1653	$\alpha$ -cadinol	1,72
33	34,368	1660	-	NI	1,88
34	36,981	1732	-	NI	1,67
35	38,834	1785	-	NI	2,87
Total de compostos identificados (% área relativa)					75,07
Total de compostos não identificados (NI) (% área relativa)					24,93

TR<sub>M</sub> = tempo de retenção obtido da triplicata; IR obtido = índice de retenção calculado pela co-injeção de uma série homóloga de n-alcenos; NI = não identificado

Conforme pode ser notado na Tabela 43, a substância majoritária presente no óleo essencial extraído das flores de *S. mombin* foi o sesquiterpenoide óxido de cariofileno (28,71 %) (Figura 172). O valor do IR obtido (calculado) para o óxido de cariofileno presente no

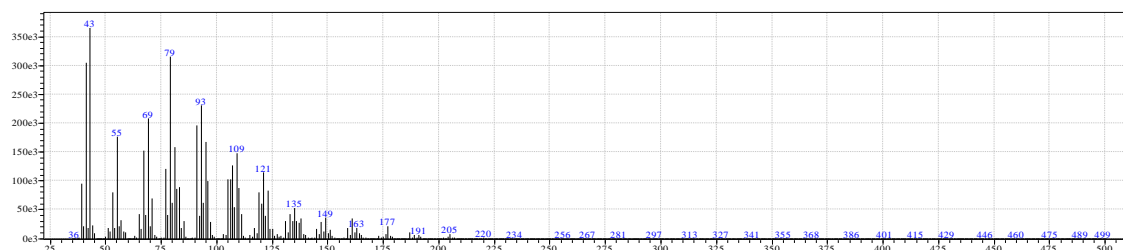
óleo essencial foi de 1586. Esse valor obtido apresenta uma pequena diferença em relação ao IR registrado para esta substância na literatura (ADAMS, 1995). No entanto, pode-se afirmar que não houve imprecisão na identificação dessa substância, visto que, a sua identificação foi corroborada pela comparação do seu espectro de massa obtido pelo CG-EM com o espectro de massa dessa substância apresentada na literatura (ADAMS, 1995), bem como, com os espectros de massas existentes no banco de dados do aparelho (WILEY 229), apresentando similaridade acima de 90 %, conforme pode ser visto na Figura 173.

**Figura 172** – Estrutura do óxido de cariofileno

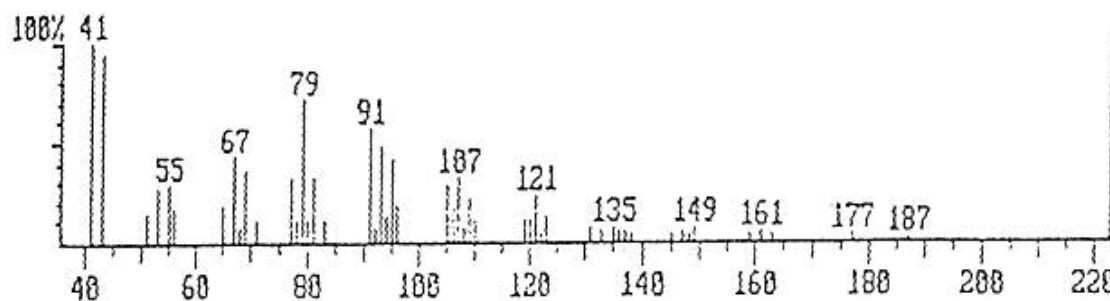


**Figura 173** – Espectro massa do óxido de cariofileno obtido pelo CG-EM comparado com os espectros de massa da literatura (ADAMS, 1995) e do banco de dados do aparelho (WILEY 229)

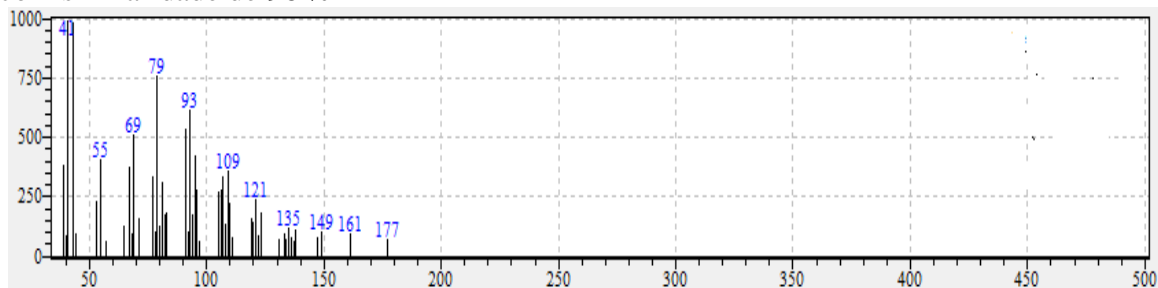
Pico 28;  $TR_M = 31,705$ ; óxido de cariofileno (28,71 %); IR obtido (calculado) = 1586



Espectro de massa do óxido de cariofileno apresentado na literatura (ADAMS, 1995);  
IR (ADAMS, 1995) = 1581



Espectro de massa do óxido de cariofileno do banco de dados do aparelho (WILEY 229),  
com similaridade de 96 %



## 5.2 Testes de atividades biológicas

### 5.2.1 Avaliação da atividade antioxidante - Teste do sequestro do radical livre DPPH

A literatura apresenta diversos métodos que são empregados para determinar a atividade antioxidante (AA) *in vitro* de substâncias biologicamente ativas. Estes testes têm auxiliado os pesquisadores na avaliação da atividade de substâncias isoladas de produtos naturais, bem como de substâncias obtidas de fontes sintéticas, tornando-se ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos, ajudando na escolha de espécies vegetais para estudos químicos e farmacológicos (ALVES et al., 2010).

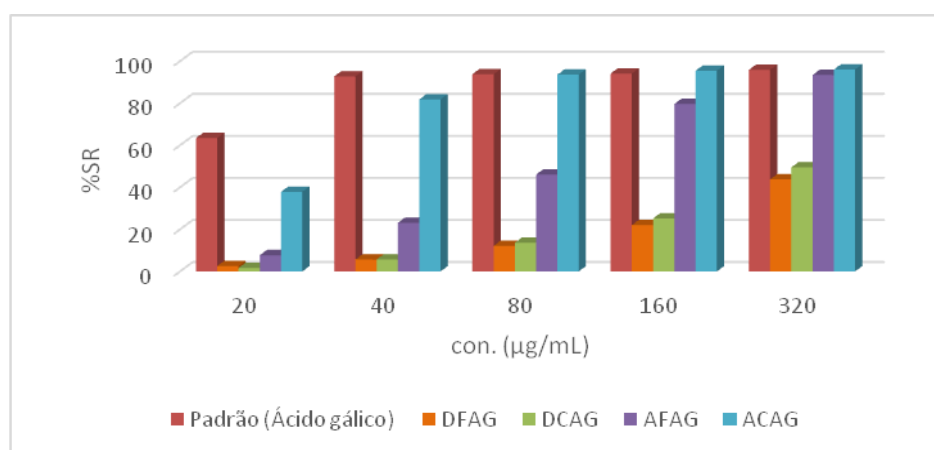
Dentre os métodos mais comuns utilizados para se determinar a atividade antioxidante (AA) *in vitro* de modo prático, rápido, reprodutível e sensível destacam-se aqueles que envolvem um radical cromóforo, simulando as espécies reativas de oxigênio, sendo o radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) um dos mais utilizados.

O teste do sequestro do radical livre DPPH foi utilizado para avaliar a atividade antioxidante das fases orgânicas obtidas dos extratos metanólicos brutos das folhas e caules da espécie *A. graveolens* e das fases orgânicas obtidas do extrato metanólico bruto das flores de *T. guianensis*. As concentrações utilizadas das fases orgânicas e dos padrões para realização desse teste variaram de 20 a 320 µg/mL. Nesse estudo foram utilizados como controle, os antioxidantes naturais ácido gálico e a quercetina.

No estudo da avaliação do potencial antioxidante das fases orgânicas das folhas e caule da espécie *A. graveolens*, pode-se verificar que a fase acetato de etila do caule (ACAG) apresentou considerável atividade antioxidante quando comparadas com demais fases orgânicas testadas dessa espécie, como pode ser observado no gráfico da Figura 174. Pode-se perceber através da análise do gráfico que nas concentrações de 40, 80, 160 e 320 µg/mL, a fase ACAG mostrou considerável atividade antioxidante acima de 50% de percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SRL), apresentando valores próximos ao padrão utilizado (ácido gálico), o que faz sugerir que na composição dessa fase ACAG pode estar presentes substâncias com significativa atividade antioxidante. Já a fase acetato de etila das folhas (AFAG), conforme pode ser notado no gráfico (Figura 174), nas concentrações de 20 e 40 µg/mL apresentou baixa capacidade antioxidante, ou seja, abaixo de 50% de percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SRL). No entanto, nas concentrações de 80, 160 e 320 µg/mL, pode-se verificar um aumento significativo no percentual de sequestro do radical livre

DPPH (%SRL) acima de 50%. Por outro lado, as fases diclorometânicas das folhas (DFAG) e do caule (DCAG) nas cinco concentrações testadas (20, 40, 80, 160 e 320  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentaram baixa capacidade antioxidante, ou seja, abaixo de 50% de percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SRL), conforme pode ser visto no gráfico da Figura 174.

**Figura 174** – Gráfico da capacidade sequestradora de radicais livres das fases orgânicas obtidos das folhas e caule de *A. graveolens*, frente ao reagente DPPH



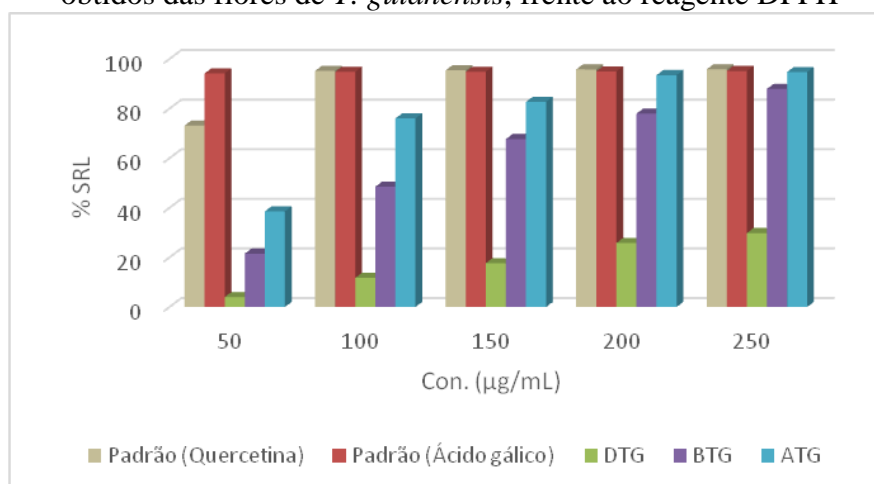
Já no estudo da avaliação do potencial antioxidante das fases orgânicas das flores de *T. guianensis*, conforme pode ser visto no gráfico da Figura 175, ao comparar o potencial antioxidante de cada fase orgânica testada, pode-se constatar que a fase acetato de etila (ATG) apresentou considerável atividade antioxidante. Pode-se perceber através da análise do gráfico que nas concentrações de 100, 150, 200 e 250  $\mu\text{g/mL}$ , a fase ATG mostrou considerável atividade antioxidante acima de 50% de percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SRL). Além disso, nas concentrações de 200 e 250  $\mu\text{g/mL}$  a fase ATG mostrou potencial antioxidante com valores próximos aos padrões utilizados (ácido gálico e quercetina), o que faz sugerir que na composição dessa fase (ATG) pode estar presentes substâncias com significativa atividade antioxidante.

Ainda analisando o gráfico da Figura 175, pode-se perceber que a fase butanólica (BTG) nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  apresentou baixa capacidade antioxidante, ou seja, abaixo de 50% de percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SRL). No entanto, nas concentrações de 150, 200 e 250  $\mu\text{g/mL}$ , pode-se verificar um aumento significativo no percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SRL) acima de 50%. Por outro lado, a fase diclorometânica (DTG) nas cinco concentrações (50, 100, 150, 200 e 250  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentou



baixa capacidade antioxidante, ou seja, abaixo de 50% de percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SRL), conforme pode ser visto no gráfico da Figura 175.

**Figura 175** – Gráfico da capacidade sequestradora de radicais livres das fases orgânicas obtidos das flores de *T. guianensis*, frente ao reagente DPPH



### 5.2.2 Teste de letalidade frente a *Artemia Salina* Leach

Frequentemente o teste de letalidade da *Artemia salina* L. (BST) tem sido utilizado como bioensaio de laboratório com objetivo de determinar a toxicidade pela estimativa da dose letal média ( $DL_{50}$ ), ou seja, a concentração que dizima metade de uma população. Este método, que determina o valor da  $DL_{50}$  das substâncias ativas e das fases orgânicas em meio salino, em µg/mL, tem sido empregado no estudo de plantas medicinais com intuito de avaliar, principalmente, a atividade antitumoral (ANDERSON et al., 1991; KANWAR, 2007; MEYER et al., 1982).

As fases orgânicas das folhas e do caule da espécie *A. graveolens*, bem como, as fases orgânicas das flores da espécie *T. guianensis* foram submetidas ao teste de letalidade frente a *A. salina* em seis concentrações distintas, conforme mencionado no item 4.6.4., página 89. Os resultados obtidos estão ilustrados nas Tabelas 44 e 45. De acordo com dados da literatura substâncias que apresentam  $DL_{50} > 1000$  µg/mL são consideradas inativas frente a *A. salina* e aquelas que apresentam  $DL_{50} < 100$  µg/mL são consideradas muito ativas. Substâncias que apresentam o  $DL_{50}$  entre 100 e 1000 µg/mL são consideradas moderadamente ativas (ANDERSON et al., 1991; DAVID, et al., 2001).

Conforme pode ser notado na Tabela 44, as fases diclorometânica (DFAG) e acetato de etila (AFAG) das folhas de *A. graveolens* apresentaram valores de DL<sub>50</sub> igual a 74,62 µg/mL e 235,18 µg/mL, respectivamente. Já as fases diclorometânica (DCAG) e acetato de etila (ACAG) do caule de *A. graveolens* apresentaram valores de DL<sub>50</sub> igual a 34,05 µg/mL e 235,62 µg/mL, respectivamente. Esses resultados indicam uma elevada toxicidade das fases DFAG e DCAG, sendo consideradas muito ativas. Por outro lado, os resultados apresentados de DL<sub>50</sub> das fases AFAG e ACAG indicam uma moderada toxicidade, sendo, portanto, consideradas moderadamente ativas.

**Tabela 44** – Resultados do teste de letalidade frente *A. salina* para as fases orgânicas das folhas e do caule de *A. graveolens*

Fases orgânicas	Letalidade frente <i>A. salina</i>	
	DL <sub>50</sub> (µg/mL)	Classificação da toxicidade
DFAG	74,62	Muito ativa
AFAG	235,18	Moderadamente ativa
DCAG	34,05	Muito ativa
ACAG	235,62	Moderadamente ativa

As fases diclorometânica das flores de *T. guianensis* (DTG), acetato de etila das flores *T. guianensis* (ATG) e butanólica das flores *T. guianensis* (BTG) apresentaram valores de DL<sub>50</sub> igual a 615,46 µg/mL, 166,36 µg/mL e 249,87 µg/mL, respectivamente (Tabela 45). Esses resultados indicam uma moderada toxicidade dessas fases, sendo, portanto, consideradas moderadamente ativas.

**Tabela 45** – Resultados do teste de letalidade frente *A. salina* para as fases orgânicas das flores de de *T. guianensis*

Fases orgânicas	Letalidade frente <i>A. salina</i>	
	DL <sub>50</sub> (µg/mL)	Classificação da toxicidade
DTG	615,46	Moderadamente ativa
ATG	166,36	Moderadamente ativa
BTG	249,87	Moderadamente ativa

### 5.2.3 Avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase

A atividade anticolinesterásica foi avaliada quantitativamente usando a eserina como controle positivo. São apresentados na Tabela 46 os resultados obtidos para as fases orgânicas das folhas e caules da espécie *A. graveolens*. Na Figura 176 é feita uma comparação entre os valores de %I encontrados para as fases orgânicas avaliadas.

De acordo com Vinutha et al. (2007), as fases orgânicas cuja inibição da atividade acetilcolinesterásica for maior que 50% são considerados potentes inibidoras, moderadas quando a inibição for entre 30 e 50% e fracas inibidoras quando for abaixo de 30% de inibição.

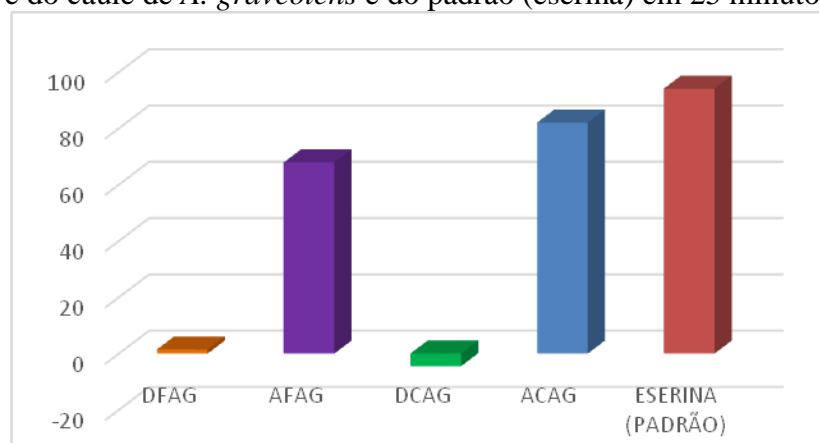
Os resultados mostram que das quatro fases orgânicas analisadas, foram as fases AFAG e ACAG que apresentaram excelentes atividades anticolinesterásica no tempo analisado. As fases AFAG e ACAG podem ser consideradas potentes inibidoras da acetilcolinesterase, visto que, apresentaram inibição acima de 50%. Já as fases DFAG e DCAG apresentaram inibição abaixo de 30%, sendo, portanto, consideradas fracas inibidoras (Figura 176).

Por conta das excelentes atividades anticolinesterásica apresentadas pelas fases AFAG e ACAG, as substâncias AG3, AG8 e AG9 isoladas dessas fases orgânicas foram selecionadas para serem submetidas a avaliação da atividade anticolinesterásica. Os resultados podem ser observados na Tabela 47 e na Figura 177. De acordo com os resultados obtidos, as substâncias AG3, AG8 e AG9, apresentem excelentes atividade anticolinesterásica no tempo analisado. Como pode ser notado na Tabela 47 e na Figura 177, as substâncias AG3, AG8 e AG9 apresentaram inibição acima de 50%, apresentando valores de inibição próximos ao valor do padrão eserina.

**Tabela 46** – Percentual de inibição da AChE (%I) obtido para as fases orgânicas das folhas e do caule de *A. graveolens* e o padrão (eserina)

Fases orgânicas/Padrão	25 minutos
	% I
<b>DFAG</b>	1,47
<b>AFAG</b>	67,89
<b>DCAG</b>	-4,48
<b>ACAG</b>	82,08
<b>ESERINA</b>	94,14

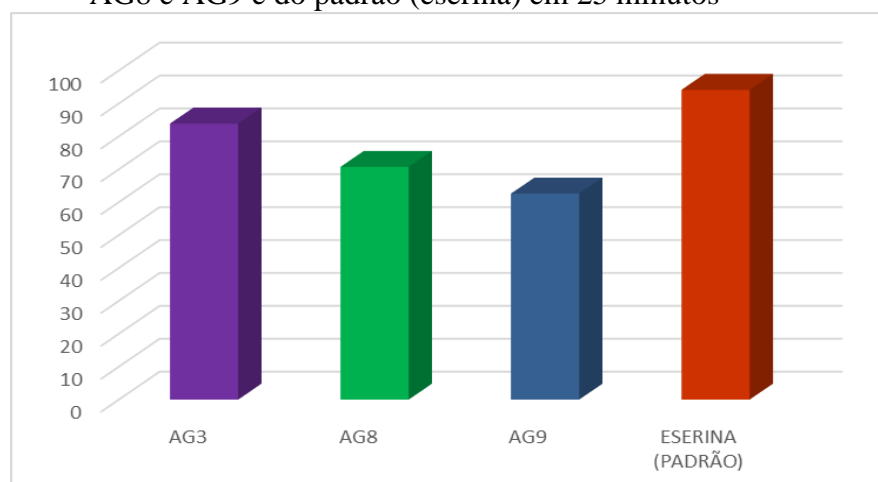
**Figura 176** - Comparação dos valores de %I inibição da AChE das fases orgânicas das folhas e do caule de *A. graveolens* e do padrão (eserina) em 25 minutos



**Tabela 47** – Percentual de inibição da AChE (%I) obtido para as substâncias AG3, AG8 e AG9 e o padrão (eserina)

Fases orgânicas/Padrão	25 minutos
	% I
<b>AG3</b>	83,88
<b>AG8</b>	70,72
<b>AG9</b>	62,60
<b>ESERINA</b>	94,14

**Figura 177** - Comparação dos valores de %I inibição da AChE das substâncias AG3, AG8 e AG9 e do padrão (eserina) em 25 minutos



## 6 CONCLUSÕES

Este trabalho contribuiu para o conhecimento da composição química de três espécies de plantas da família Anacardiaceae: *Astronium graveolens*, *Tapirira guinanensis* e *Spondias mombin*.

Pode-se verificar nos resultados obtidos neste trabalho que a maior parte dos metabólitos secundários isolados das espécies *A. graveolens* e *T. guinanensis* são derivados fenólicos.

O estudo fitoquímico das fases orgânicas das folhas de *A. graveolens* possibilitou o isolamento e a identificação das substâncias 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de metila (galato de metila),  $3\beta$ -*O*- $\beta$ -glicopiranosilsterol (daucosterol) e o dímero de chalcona ( $7''''R, 8''''S$ )-2',4,4',5-tetra-hidroxichalcona-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4'',4'''-tri-hidroxi-7'',8''-di-hidrochalcona.

A partir do estudo fitoquímico das fases orgânicas dos caules de *A. graveolens* foram isolados e identificados o  $\beta$ -sitosterol e seu derivado glicosilado, ácido gálico e seu derivado galato de metila, 3-*O*- $\alpha$ -ramnopiranosil-5,7,3',4'-tetraidroxiflavona (quercitrina) e três dímeros de chalcona: ( $7''''R, 8''''S$ )-2',4,4',5-tetra-hidroxichalcona-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4'',4'''-tri-hidroxi-7'',8''-di-hidrochalcona, ( $7''S, 8''S, 7''''S, 8''''R$ )-2',4,4',5,7-penta-hidroxi-7,8-di-hidrochalcona-(2 $\rightarrow$ 7'',8 $\rightarrow$ 8'')-2''',4'',4'''-tri-hidroxi-7'',8''-di-hidrochalcona e o novo dímero de chalcona ( $7''S, 8''R, 7''''S, 8''''S$ )-2',4,4',5,7-penta-hidroxi-7,8-di-

hidrochalcona-(2→7'',8→8'')-2''',4'',4'''-tri-hidroxi-7'',8''-di-hidrochalcona, isômero da substância matosina isolada da espécie *Myracrodruon urundeuva* Rf. All. (BANDEIRA, MATOS e BRAZ-FILHO, 2003).

Foram ainda identificados em mistura ácidos graxos de triacilglicerídeos por CG-EM presentes em frações das fases diclorometânicas das folhas e dos caules de *A. graveolens*. De uma fração da fase diclorometânica das folhas foram identificados cinco ácidos graxos (ácido mirístico, ácido palmítico, ácido linoléico, ácido  $\alpha$ -linolênico e ácido esteárico) que compõem os triacilglicerídeos, tendo como componente majoritário o ácido palmítico (41,48 %). Já da fração da fase diclorometânica do caule foram identificados em mistura seis ácidos graxos (ácido mirístico, ácido palmítico, ácido linoléico, ácido oleico, ácido vaccênico e o ácido esteárico) que compõem os triacilglicerídeos, sendo que o componente majoritário dessa fração foi também o ácido palmítico (45,12 %).

O estudo fitoquímico das fases orgânicas das flores de *T. guianensis* resultou no isolamento de três metabólitos secundários, os flavonoides 3,3',4',5,7 – penta-hidroxiflavona (quercetina), 3-O- $\alpha$ -ramnopiranosil-5,7,3',4'-tetra-hidroxiflavona (quercitrina) e o ácido gálico.

No estudo da composição química dos óleos essenciais extraídos das flores de *T. guianensis* e de *S. mombin*, constatou-se que os principais constituintes químicos presentes nesses óleos foram de natureza terpênica. Foram identificados 31 componentes no óleo essencial extraído das flores de *T. guianensis*, sendo que, os componentes majoritários foram os sesquiterpenos  $\alpha$ -copaeno (10,47 %) e o (*E*)-cariofileno (23,99 %). Já no óleo essencial extraído das flores de *S. mombin* foram identificados 22 componentes, sendo que, o componente majoritário foi o sesquiterpenoide óxido de cariofileno (28,71 %).

Na avaliação da atividade antioxidante das fases orgânicas da espécie *A. graveolens*, foram as fases acetato de etila das folhas e dos caules que apresentaram as melhores atividades antioxidante no teste do sequestro do radical DPPH. A boa atividade antioxidante apresentada por essas fases orgânicas pode ser devido à presença de substâncias fenólicas, tais como, o galato de metila e o ácido gálico presente nessas fases. Também foi avaliada a capacidade antioxidante das fases orgânicas das flores da espécie *T. guianensis*. No teste do sequestro do radical DPPH constatou-se que a fase acetato de etila foi a que apresentou considerável atividade antioxidante. Essa boa atividade antioxidante apresentada por essa fase pode ser atribuída à presença de substância fenólicas como a quercetina e seu derivado glicosilado e o ácido gálico.

No teste de letalidade da *A. salina* os resultados obtidos para as fases orgânicas da espécie *A. graveolens*, indicaram uma elevada toxicidade das fases diclorometânica das folhas e dos caules, sendo consideradas muito ativas. Por outro lado, os resultados apresentados de  $DL_{50}$  das fases acetato de etila das folhas e dos caules indicaram uma moderada toxicidade, sendo, portanto, consideradas moderadamente ativas. Já no teste de letalidade da *A. salina* para as fases orgânicas da espécie *T. guianensis*, os resultados obtidos indicaram uma moderada toxicidade das fases diclorometânica, acetato de etila e butanólica, sendo, portanto, consideradas moderadamente ativas.

Quanto à avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase das fases orgânicas da espécie *A. graveolens*, foram as fases acetato de etila das folhas e dos caules que apresentaram as melhores atividades anticolinesterásica no tempo analisado. As fases acetato de etila das folhas e dos caules podem ser consideradas potentes inibidoras da acetilcolinesterase, visto que, apresentaram inibição acima de 50%. Já as fases diclorometânica das folhas e dos caules apresentaram inibição abaixo de 30%, sendo, portanto, consideradas fracas inibidoras.

Na avaliação da atividade anticolinesterásica das substâncias AG3, AG8 e AG9, os resultados obtidos, mostraram que essas três substâncias, exibiram excelente atividade anticolinesterásica no tempo analisado, apresentando inibição acima de 50%, com valores de inibição próximos ao valor do padrão eserina.

Desta forma, esse estudo contribui para o conhecimento quimiosistemático das espécies *A. graveolens*, *T. guianensis* e *S. mombin* pertencentes à família Anacardiaceae.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; CARRETERO, E.; ACITORES-MARTÍNEZ, C.; NOGUEIRA, B.; VILLAR, A. Antiinflammatory activity of some medicinal plant extracts from Venezuela, **Journal of Ethnopharmacology**. v. 55, p. 63-68, 1996.
- ABO, K. A.; OGUNLEYE, V. O.; ASHIDI, J. S. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytotherapy research**. v. 13, p. 494-497, 1999.
- ADAMS, M.; GMUEDNER, F.; HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders - A survey of ethnobotanical literature. **Journal of Ethnopharmacology**. v.113, p.363-81, 2007.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil componentes by gas chromatography/Mass Spectroscopy. *Allured Publishing Corporatin*, 469 p., 1995.
- AIVES, C. Q. **Flavonóides Antioxidantes e Derivados de Ácido Gálico Isolados de *Cenostigma gardnerianum* Tul. (Leguminosae)**, Dissertação de Mestrado – Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2007.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**. v. 33, p. 2202-2210, 2010.
- ANDERSON, J. E.; C. M. GOETZ, McLAUGHLIN, J. L.; SUFFNESS, M. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities and antitumour prescreens. **Phytochemical Analysis**. v. 2, p. 107-111, 1991.
- ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunnn. Ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, p. 231-235, 2007.
- ANDRADE, E. H. A.; RIBEIRO, A. F.; SILVA, M. H. L.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA; SOARES, J. G. Plantas medicinais aromáticas usadas pelas populações tradicionais de Caxiuanã. In: ESTAÇÃO CIENTÍFICA FERREIRA PENNA – DEZ ANOS DE PESQUISA NA AMAZÔNIA, CBO\_015, 2002, Belém,-PA.
- ANDRADE, E. H. A. ; RIBEIRO, A. F. ; SILVA, M. H. L. ; ZOGHBI, M. G. B. ; MAIA, J. G. S.. Plantas medicinais aromáticas usadas pela população ribeirinha de Caxiuanã.. In: XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2000, Recife. Livros de Resumos XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Recife, 2000. p. 126.
- ARNAO, M. B.; CANO, A.; ACOSTA, M. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. **Redox Report**. v. 5, P. 365-370, 2000.
- AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; IWALEWA, E. O.; AKANMU, M. A.; UKPONMWAN, O. E. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin*



L. (Anacardiaceae) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 103, p. 166-175, 2006.

AKINPELU, D. A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. **Fitoterapia**. v. 72, p.286–287, 2001.

ANJANEYULU, V.; SATYANARAYANA, P.; VISWANADHAM, K.N.; JYOTHI, V.G.; NAGESWARA RAO, K.; RADHIKA, P. Triterpenoids from *Mangifera indica*. **Phytochemistry**. v. 50, p.1229–1236, 1999.

ARAÚJO, J. Q. **Estudos de docking e qsar-3d dependente do Receptor de inibidores da acetilcolinesterase**. 2010, 217f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

ARAÚJO, Maria Eduarda Machado de. **Química Analítica aplicada aos produtos naturais**. Departamento de química e bioquímica. Faculdade de Ciências de Lisboa. Lisboa, 2005, 60p. ATTA-UR-RAHMA; PARVEEN, S.; KHALID, A.; FAROOQ, A.; CHOUDHARY, M. I. Acetyl and butyrylcholinesterase-inhibiting triterpenoid alkaloids from *Buxus papillosa*. **Phytochemistry**. v. 58, p. 963-968, 2001.

BACHELIER, J. B.; ENDRESS, P. K. Comparative floral morphology and anatomy of Anacardiaceae and Burseraceae (Sapindales), with a special focus on gynoecium structure and evolution. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 159, p. 499–571, 2009.

BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. de A.; BRAZ-FILHO, R. Structural elucidation and total assignment of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of new chalcone dimmers. **Magnetic Resonance in Chemistry**. v. 41, p. 1009-1014, 2003.

BANDEIRA, M. A. M; MATOS, F. J. de A. Matos, Braz-filho R. New Chalconoid Dimers from *Myracrodruon urundeuva*. **Natural Product Letters**. v. 4, p. 113-120, 1994.

BAI, H.; LI, W.; KOIKE, K.; DOU, D.; PEI, Y.; CHEN, Y.; NIKAIDO, T. A novel Biflavonoid from roots of *Glycyrrhiza uralensis* cultivated in China. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. v. 51, p.1095-1097, 2003.

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

BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A, Hauser WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shamody HJ 1991. Manual of clinical microbiology. 5.ed. Washington, DC: **American Society for Microbiology**, p. 1117-1125, 1991.

BASSO, L.A.; SILVA, L.H.P.; FETT-NETO, A.G.; JUNIOR, W.F.A.; MOREIRA, I.S.; PALMA, M.S.; CALIXTO, J.B.; FILHO, S.A.; SANTOS, R.R.; SOARES, M. B.P.E.; SANTOS, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.100, p. 575-606, 2005.

BAUER, A. W.; KERBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, N. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**. v.45, p. 493-496, 1966.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie**. v. 28, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**. v. 56, p. 317-333, 1998.

BRONDZ, I. Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. **Analytica Chimica Acta**. v. 465, p. 1-37, 2002.

CALOW, P. Marine and estuarine invertebrate toxicity tests. In: HOFFMAN, D. et al. **Handbook in cytotoxicology**. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1993. v. 1. p. 1-5.

CARDOSO, M. P. **Estudo fitoquímico do caule de *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae)**. 2007. 227f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; PAOLI, A.A.S. “Estruturas do pericarpo e da semente de *Astronium graveolens* Jacq. (Anacardiaceae) com notas taxonômicas”. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 23, p. 87-96, 2000.

CASTEELS, P.; AMPE, C.; JACOBS, F.; TEMPST, P. Functional and chemical characterizations of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the Honeybee (*Apis mellifera*). **Journal of Biological Chemistry**. v. 268, p. 7044-7054, 1993.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia Salina* Leach. **Química Nova**. v. 23, p. 20-22, 2000.

CESARIN, D.S.; FERREIRA, J.N.; BRAZ, R.F. Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalconas. **Química Nova**. v. 24, p. 604-611, 2001.

CHEN, T. K.; WIEMER, D. F.; HOWARD, J. J. A volatile leafcutter ant repellent from *Astronium graveolens*. **Naturwissenschaften**. v. 71, p. 97-98, 1984.

CHIARADIA, L. D. Synthesis and pharmacological activity of chalcones derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in Raw264.7 cells stimulated by LPS: Quantitative structure-activity relationships. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. v.16, p. 658-667, 2008.

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

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

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. 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.

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.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L. A.; CLAEYS, M.; VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Antiviral caffeoyl ester from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**. v. 31, p. 1979- 1981, 1992.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L. A.; CLAEYS, M.; VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**. v. 30, p. 1129-1130, 1991.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L.; CLAEYS, M.; GEERTS, ST.; VANDEN BERGHE, D.; VILLETINCK, A. Antibacterial and Molluscicidal Phenolic Acids from *Spondias mombin*. **Planta Medica**. v. 60, p. 460-463, 1994.

COATES, N. J.; GILPIN, M. L.; GWYNM, M. N.; LEWIS, D. E. SB-202742, A novel  $\beta$ -lactamase inhibitor isolated from *Spondias mombin*. **Journal of Natural Products**. v. 57, p. 654-657, 1994.

COSTA, A. C. R.; SILVA, A. L. R.; SOUZA, C. R.; NASCIMENTO, R. R. G. In: CONGRESSO NACIONAL DE QUÍMICA do RN, 47. 2007, Rio Grande do Norte. Abordagem Fotoquímica e Avaliação da Atividade Larvicida e Nematocida de *Astronium fraxinifolium* Schott. Natal: ABQ, 2007.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais Terapêuticos para Processo Inflamatório. **Revista Virtual de Química**. v. 1, p. 241-266, 2009.

CHRISTIE, W. W.; SÉBÉDIO, L. L.; JUANÉDA, P. A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid (CLA). **Inform**. v. 12, p. 147-152, 2001.

CHRISTIE, W. W. Gas chromatography mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. **Lipids**. v. 33, p. 343, 1998.

DA SILVA, G. A.; de BRITO, N. J. N.; dos SANTOS, E. C. G.; LÓPEZ, J. A.; ALMEIDA, M. G. Gênero *Spondias*: Aspectos Botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Revista de Biologia e Farmácia**. ISSN 1983-4209-Columa 10-Número 01, 2014.

DA SILVA, E. P.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. “Diidrobenzofuranos alquilados das sementes de *Tapirira guianensis* (ANACARDIACEAE)”. **Livro de Resumos da 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia-SP, 2012. Resumo QPN-045.

- DHAR, D.N. **The chemistry of chalcones and related compounds**. New York, NY. Wiley-Interscience. 1981.
- 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, p. 287-289, 1998.
- DAVID, J. P.; SILVA, E. F.; MOURA, D. L. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**. v. 24, p. 730-733, 2001.
- DE MORAIS, S. M.; DANTAS, J. D. P.; DA SILVA, A. R. A.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, p.169-177, 2005.
- De SOUZA, L. P. **Padronização de extratos vegetais: *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae)**. 2012. 96 f. Dissertação Mestrado em Química – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.
- DIMMOCK, J. R.; ELIAS, D. W.; BEAZELY, M. A.; KANDEPU, N. M. Bioactivities of chalcones. **Current Medicinal Chemistry**. v.6, p.1125-1149, 1999.
- DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Construindo a História dos Produtos Naturais #7. **MultiCiência**: 2006.
- ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v. 7, p. 88-95, 1961.
- EL FIKI, N. M. Chemical composition and biological activity of *Spondias Luttea* L. cultivated in Egypt. **Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 25, p. 206-221, 2000.
- FABRICANT, D. S; FAMSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**. v. 109, p. 69-75, 2001.
- FABROWSKI, F.J. ***Eucaliptus smithii* R. T. BAKER (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. Curitiba, 2002, 225 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; VIANA, M. P.; SOUZA, T. M.; VASCONCELOS, I. M.; SOARES, B. M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; CARVALHO, A. F. U. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.83, p. 1045-1058, 2011.
- FILHO, O. P.; DORVAL, A.; FILHO, E. B. “Leaf cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (HYMENOPTERA, FORMICIDAE) preference for different species under laboratory conditions”. **Ciência Florestal**. v. 1, p. 1-7, 2002.

FONTANA, R.; MENDES, M. A.; SOUZA, B. M.; DONNO, K.; CÉSAR, L. M. M. e PALMA M. S. Jelleines: a Family of antimicrobial peptides from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). **Peptides**. v. 27, p. 2624–2631, 2004.

FONSECA, E. N.; FIGER, A.; FURTADO, D. T.; LOPES, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; LEITÃO, S. G. Análise química e atividade antimicrobiana do óleo essencial dos frutos de *Vitex cymosa* Bertero. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 8, p. 87, 2006.

FORZZA, R. C. 2010 **Lista de espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>> Acesso em: 24 de janeiro de 2015.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. **Ecotoxicology in theory and practice**. Londres: Chapman and Hall, 1994. 247 p.

GARRIDO, G.; GONZÁLEZ, D.; LEMUS, Y.; GARCÍA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; DELGADO, R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG®). **Pharmacological Research**. v. 50, p. 143–149, 2004.

GEOCZE, K. C. **Análise exploratória de carotenoides, óleos essenciais e triacilglicerídeos do pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.) de municípios brasileiros situados no Bioma Cerrado. 2011. 201p**. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

GIASSON, B. I.; ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V. M. Y.; TROJANOWSKI, J. Q. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 32, p. 1264-1275, 2002.

GIESE, S. K. **Estudo da composição química dos óleos florais de *Byrsonima brachybotrya* (Malpighiaceae)**. 2005. 71p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GIORDANI, R. B. et al. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (amaryllidaceae). **Química Nova**. v. 31, n. 8, p. 2042-2046, 2008.

GOETZ, G. M.; LEPOITTEVIN, J.P. 1999. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 9, 1141.

GONÇALVES, J. L. S.; LOPES, R. C.; OLIVEIRA, D. B.; COSTA, S. S.; MIRANDA, M. M. F. S.; ROMANOSA, N. S. O.; SANTOS, M. D. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 99, p.403–407, 2005.

GÜVENALP, Z. ; DEMIREZER, L. O. Flavonol glycosides from *Asperula arvenis* L. **Turkish Journal of Chemistry**. v. 29, p. 163-169, 2005.

HAMANO, P. S.; MERCADANTE, A. Z. Composition of carotenoids from comercial products of cajá (*Spondias lutea*). **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 14, p. 335-343, 2001.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v. 55, p. 481-504, 2000.

HASAN, A. et al. Synthesis and inhibitory potential towards acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and lipoxygenase of some variably substituted chalcones. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 20, p. 41-47, 2005.

HERNÁNDEZ, V.; MALAFRONTA, N.; MORA, F.; PESCA, M.S.; AQUINO, R.P.; MENCHERINI, T. Antioxidant and antiangiogenic activity of *Astronium graveolens* Jacq. leaves. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**. v.28, p. 917-922, 2014.

HERNÁNDEZ, V.; MORA, F.; ARAQUE, M.; MONTIJO, S. De.; ROJAS, L.; MELÉNDEZ, P.; TOMMASI, N. De. Chemical composition and antibacterial activity of *Astronium graveolens* Jacq. Essential oil. **Revista Latinoamericana de Química**. v. 41, p. 89-94, 2013.

IMAI, T.; INOUE, S.; MATSUSHITA, N.O.Y; SUZUKI, R.; DE JESUS, M. S.J.M.H; FINGER, S.K.O.Z.; FUKUSHIMA, K. Heartwoode extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril*, and *Astronium Lecointei* and their antioxidant activities. **The Japan Wood Research Society**. v. 54, p. 470-475, 2008.

JANSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J. C.; BAERHEIM, S. A. Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species. **Pharmazie**. v. 45, 1987.

JUNIOR, C. V.; BONZANI, V. da S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**. v. 24, p. 655-660, 2004.

KANWAR, A. S. Brine shrimp *Artemia salina*- a marine animal for simple and rapid biological assays. **Journal of Chinese Clinical Medicine**. v.2, p. 236-240, 2007.

KARAMAN, İ.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and metanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 85, p. 231-235, 2003.

KINAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microorganismos. **Neotropical Biology and Conservation**. v. 5, p. 120-132, maio/agosto, 2010.

LEBEAU, J. et al. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 29, p. 900-912, 2000.

LEITE, E. J. State-of-knowledge on *Astronium fraxinifolium* Schott (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**. v. 5, p. 63-77, 2002.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, p. 158-163, 2006.

- LIMA, Helena R. P. ; KAPLAN, M.A.C. ; CRUZ, A. V. M. ,Influência dos fatores Abióticos e variabilidade dos terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**. v. 10, p. 71-77. Ago/Dez, 2003.
- LINS NETO, E.M.F.; PERONI, N.; ALBUQUERQUE, U.P. Traditional Knowledge and Management of Umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): An Endemic Species from the Semi-Arid Region of Northeastern Brazil. **Economic Botany**. v. 64, p. 11-21, 2010.
- LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. **Biossíntese de produtos naturais**. Ed. IST Press, 2007.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 01, 6a.ed., Nova Odessa, São Paulo: Ed. Plantarum, 2014.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4a.ed., Nova Odessa, São Paulo: Ed. Plantarum, 2002.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 544p.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.
- LUZ, C. L. S. **Anacardiaceae R. Br. na Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. 2011. Dissertação de mestrado (Mestrado em Biologia), Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica, São Paulo, 2011.
- MACHADO, A. C. **Caracterização do extrato de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e seu efeito sobre a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos**. 2013. 108 f. Tese de doutorado, Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.
- MANN, J. **Chemical aspects of biosynthesis**. New York, NY: Oxford University Press Inc. 1994, cap.05, p. 53 a 61.
- MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 78, p.133–137, 2001.
- MARTINELL, G.; MORAES, M. A. (Orgs.). **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, cap. 2, p. 140-141, 2013.
- MARSTON, A., KISSLING, J., HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**. v.13, p.51-54, 2002.
- MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais**. Guia de seleção e emprego de plantas medicinais do nordeste do Brasil. vol.01. Ed. UFCE, Fortaleza, 1989.
- MATOS, F. J. A. **Farmácias Vivas**. 3. Ed., p. 85-86, Fortaleza: UFC, 1998.

MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D. e MELE, G. Óleo da castanha de caju: Oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**. v. 32, p. 732-741, 2009.

MENDEZ, J.; BILIA, A.R.; MORELLI, I. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania pittieri*. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. v. 70, p. 223-226, 1995.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAN, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., McI. AUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**. v. 45, p. 31-34, 1982.

MJOS, S.A. The prediction of fatty acid structure from selected ions in electron impact mass spectra of fatty acid methyl esters. **European Journal of Lipid Science Technology**. v. 106, p. 550-560, 2004.

MILLER, A.; SCHAAL, B. Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America, Washington**. v. 102, p. 12801-12806, 2005.

MITCHELL, J. D. & DALY, D.C., 1998. The “tortoise’s cajá” – A new species of *Spondias* (Anacardiaceae) from southwestern Amazonia. **Brittonia**. v. 50, p. 447-451, 1998.

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

MOTA, M. L. R.; THOMAS, G.; BARBOSA FILHO, J. M. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 13, p.289–300, 1985.

MOREIRA, B. O. **Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antioxidante dos Extratos Hexânico e Diclorometânico das Folhas de *Schinopsis brasiliensis* ENGL. (Anacardiaceae)**. 2007. 127f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

MOREIRA, B. O. et al. Screening of radical scavenging activity of extracts of three plant from the caatinga of northeast. In: 2nd Brazilian Conference of Natural Products & XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematic and Ecology (RESEM), 2009, São Pedro. São Paulo. **Anais 2nd Brazilian Conference of Natural Products & XXVIII RESEM**. Sociedade Brasileira de Química, 2009.

MOREIRA, B. O. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Schinopsis brasiliensis* (Anacardiaceae)**. 2014. 131f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

MORTON, J. F. **Fruits of Warm Climates**. Miami: FL., p. 245-248, 1987.

MOURA, C. M. **Contribuição à quimiotaxonomia de Anacardiaceae – estudo fitoquímico e das atividades antifúngicas e antitumorais de *Astronium fraxinifolium* Schott**



**ocorrente no Cerrado.** 2014. 109f. Dissertação (Mestre em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MOURA, M. C. DE O. **Caracterização do perfil em ácidos graxos do óleo de palmeiras encontradas no estado de Roraima.** 2013. 133p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Roraima, Roraima, 2013.

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

NI, L., MENG, Q. M., SIROSKI, J. A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opinion.** v.14, p. 1669-1691, 2004.

NOWAKOWSKA, Z. et al. Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial evaluation of new (E)-chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 43, p. 707-713, 2007.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A. S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant *staphylococci* to orégano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters.** V. 230, p. 191-195, 2004.

NUNES, X. P. et al. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de Mimosa paraibana Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v.18, suplemento, p. 718-723, 2008.

OLIVEIRA, M. G. **Obtenção de Biodiesel via Catálise Enzimática e caracterização Através de Técnicas Cromatográficas e Espectrometria de Infravermelho Associada à Calibração Multivariada.** 2009. 92p. Dissertação (Mestrado em Química analítica) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

OSTROSKU, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 18, p. 301-307, 2008.

PEREIRA, A. B. D. **Contribuição para a padronização química de *hancornia speciosa* gomes: desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação de marcadores químicos.** 2012. 150 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

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

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova.** v. 25, Suplemento 1, p.45-61, 2002.

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

PRASHANTH, D; AMIT, A.; SAMIULLA, D. S.; ASHA, M. K. PADMAJA, R. Glucosidase inhibitory activity of *Mangifera indica* bark. **Fitoterapia**. v. 72, p.686–688, 2001.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003. p. 43-74.

RYHAGE, R.; STENHAGEN, E. Mass spectrometric studies. I. Saturated normal long-chain methyl esters. **Arkiv for Kemi**, v. 13, p. 523, 1959.

ROBBERS, J.E., SPEEDIE, M.K., TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 327p.

ROUMY, V.; FABRE, N.; PORTET, B.; BOURDY, G.; ACEBEY, L.; VIGOR, C.; VALENTIN, A.; MOULIS, C. Four anti-protozoal and anti-bacterial compounds from *Tapirira guianensis*. **Phytochemistry**. v. 70, p. 305-311, 2009.

SACRAMENTO, C. K. do; SOUZA, F. X. Cajá (*Spondias mombin* L.), Jabuticabal: Funep, 42 p. (Série Frutas Nativas, 4), 2000.

SAHM, D. F.; WASHINGTON II, J. A. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: Balows, A.; Hausser, W.J.; Hermann, K.L.; Isenberg, H.D.; Shamody, H.J. Manual of clinical microbiology. 5.ed. Washington, DC: **American Society for Microbiology**. p. 1105-1116, 1991.

SALOMÃO, A. N.; SILVA, J. A. **Reserva Genética Florestal Tamanduá**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006.

SALVAT, A.; ANTONACCI, L.; FORTUNATO, R. H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. **Phytomedicine**. v. 11, p. 230-234, 2004.

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.

SANTOS, A. S. Descrição de Sistemas e de Métodos de Extração de Óleos Essências e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. **Comunicado Técnico [do] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Belém, v. 99, p. 1-7, 2004.

SANTIN, D.A.; LEITÃO-FILHO, H.F. Restabelecimento e revisão taxonômica do gênero *Myracrodruon* Freire-Allemão (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**. v. 14, p.133-145, 1991.

SANTIN, D. A. **Revisão taxômica do gênero *Astronium* Jacq. e Revalidação do gênero *Muracodruon* FR. Allem. (ANACARDIACEAE)**. 1989. 196 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Biologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

SCARTEZZINI, P.; SPERONI, E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 71, p. 23–43, 2000.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, C. S.; COSTA, S. S. Screening of anti-fungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 96, p.563–568, 2005.

SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R. Anacardiaceae In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB44>>. Acesso em: 16 dez. 2014.

SILVA-LUZ, C.L., PIRANI, J.R. Anacardiaceae in: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB004385>>. Acesso em: 10 de jan. 2015.

SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R. Anacardiaceae in: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB004408>> Acesso em: 15 de janeiro de 2015.

SILVA, G.A. et al. Avaliação da letalidade e atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *Spondias mombin* aff. *tuberosa*. **Revista Facider**. v.1, p. 1-18, 2012.

SILVA C.A.; LIMA, C.A.; COSTA D.S. **Caracterização química do óleo essencial da casca do *citrus sinensis* obtido por hidrodestilação em aparelho clewenger**. Belém-PA, 2010.

SILVA, M. S. S. **Alcalóides de Plantas da Família Amaryllidaceae: Isolamento Caracterização e Testes de Inibição de Acetilcolinesterase**. 2009, 234f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A.A., PETROVICK, P.R.. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2000.

SIMÕES, CM.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENCKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 1999. p. 387-415.

SIMÕES, Claudia Maria Oliveira *et alli*. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1ª Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universitária/UFRGS/Ed.UFSC,1999. 821p.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.12, p.35-40, 2002.

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

SOUZA V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG/II**. Editora Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

SPITELLER, G., SPITELLER-FRIEDMANN M., HOURIET, R., **Monastsh Chem**. v. 97, p. 121, 1966.

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

STRAPAZZON, J.O. 2004. *Composição química e análise antimicrobiana do óleo volátil de Annona squamosa L. (Ariticum.)* Chapecó, SC. Monografia de graduação. Universidade Comunitária Regional de Chapecó, 53 p.

TREVISAN, M. T. S.; BEZERRA, M. Z. B.; SANTIAGO, G. M.; FEITOSA, C. M. "Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*". **Química Nova**. v 29, p. 415-418, 2006.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D. J. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**. v. 11, p. 463-467, 1963.

VAYA, J.; AVIRAM, M. Nutritional antioxidants: mechanisms of action, analyses if activities and medical applications. **Current Medicinal Chemistry Immunology Endocrine and Metabolic Agents**. v. 1, p.99-117, 2001.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**. v. 10, p. 189-195, 2003.

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

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

VINUTHA, B.; PRASHANTH, D.; SALMA, K.; SREEJA, S. L.; PRATITI, D.; PADMAJA, R.; RADHIKA, S.; AMIT, A.; VENKATESHWARLU, K.; DEEPAK, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 109, p.359-63, 2007.

VOGL, O.; MITCHELL, J. D. Oriental lacquer. 11. Botany and chemistry of the active components of poisonous Anacardiaceae. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**. A33, p. 1581-1599, 1996.

WANNAN, B. S. Analysis of generic relationships in Anacardiaceae. **Blumea**. v. 51, p. 165-195, 2006.

YUNES, R. A.; FILHO, V. C. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 4. ed. Revista e Ampliada – Itajaí, SC: Editora da Univali, cap. 14, p. 433-464, 2014.

ZACARIAS, N.A.; COSTA, C.E.; CAMPIOTI, D.A.; VIERTLER, H.; SUMODJO, T.A. **Comportamento potenciodinâmico da 1,3-difenil-2-propen-1-ona (chalcona) e 1,3-difenil-3-fenitio-2-propen-1-ona em DMF**. Disponível em: <http://www.sbq.org.br>. Acesso em 07 setembro 2015.

ZGODA, J. R.; PORTER, J. R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Pharmaceutical Biology**. v. 39, p. 221-225, 2001.

ZUANAZZI, J. A. S. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª ed. Florianópolis: Ed. da UFSC, Porto Alegre: Ed. da UFRGS. Cap. 23, p. 499, 2001.

ZUANAZZI, J. A. S.; MOTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M O; SCHENKEL, E. P; GOSMANN, G.; MELLO, J. C P de; MENTZ, Lilian A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade, cap. 23, p. 577-614, 2000.