



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

**JOSÉ FERNANDO DE ARAÚJO NETO**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DE *Erythroxylum loefgrenii* (Erythroxylaceae)**

**SALVADOR  
2016**

**JOSÉ FERNANDO DE ARAÚJO NETO**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DE *Erythroxylum loefgrenii* (Erythroxylaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química - Área: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Juceni Pereira de Lima David

**SALVADOR**

**2016**

**Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor**

Araújo Neto, José Fernando de  
ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DE ERYTHROXYLUM LOEFGRENII (ERYTHROXYLACEAE)  
/ José Fernando de Araújo Neto. -- Salvador, 2016.  
106 f. : il

Orientadora: Juceni Pereira de Lima David.  
Dissertação (Mestrado - Pós-graduação em Química) --  
Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química,  
2016.

1. Flavonoides. 2. E. loefgrenii. 3. Triterpenos. 4.  
Atividade antioxidante. 5. Teste de letalidade da  
Artemia salina. I. David, Juceni Pereira de Lima. II.  
Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

JOSÉ FERNANDO DE ARAÚJO NETO

“ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE  
*ERYTHROXYLUM LOEFGRENII* (ERYTHROXYLACEAE)”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química,  
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof.<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. Juceni Pereira de Lima David Juceni Pereira de Lima David  
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Ademir Evangelista do Vale Ademir Evangelista do Vale  
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Jorge Mauricio David Jorge Mauricio David  
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)  
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 25 de outubro de 2016.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria Auxiliadora, e minha irmã, Fernanda, pelo amor incondicional, pela dedicação, apoio, amizade, conselhos, orações, por estarem sempre ao meu lado mostrando que sou capaz, por acreditarem mais em mim do que eu mesmo. Mãe a senhora é meu exemplo de vida! Obrigado por tudo!

A meu pai, Damião, exemplo de dignidade e honestidade, por todo amor e carinho.

À toda a minha família pelo carinho, apoio e incentivo.

À minha Orientadora Prof. Dra. Juceni Pereira de Lima David pela oportunidade, confiança e ensinamentos. Obrigado pela paciência, dedicação, compreensão, conhecimentos, obrigado pela imensa contribuição para minha formação profissional.

Aos Profs. Dr. Jorge Maurício David e Dr. Ademir Evangelista por todo apoio, colaboração, aprendizado, dúvidas esclarecidas e pelas valiosas sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais pelo companheirismo, por toda ajuda e momentos de descontração e por colaborarem direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. À Victor, Erika, Paulo, Everton e Clayton e que sempre estiveram dispostos a ajudar, esclarecendo dúvidas e dando boas sugestões.

Aos colegas do Laboratório de Farmacotécnica pela amizade e apoio em todos os momentos.

À Juliana Paixão pelo companheirismo, amizade e apoio nos momentos difíceis em todos esses anos de pesquisa.

Aos amigos que me acompanham desde a graduação, pelo companheirismo, apoio e por todos os momentos únicos juntos: Quiu, Gu, Ubs, Thamy, Piu, Dan, Lua, Seibri, Dody, Josi, Leti, Gab, Rê e Théo.

Aos amigos da escola e que a vida me apresentou no caminho, especialmente a Ricardo, Tharcia, Raísa, Japa, Bruna e Camila.

A presença de vocês tornou essa caminhada, que não é fácil, muito mais leve e prazerosa. Não menti quem disse que *“o sofrimento quando é dividido é reduzido à metade, mas a alegria compartilhada é alegria dobrada”*.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Química e da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, especialmente Luciana e Michel, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A DEUS, meus anjos da guarda e os Espíritos de Luz que me acompanham, por estarem sempre a minha frente abençoando minha família e amigos. Obrigado pela força diante das dificuldades, proteção a toda hora e por atender meus pedidos.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	III
LISTA DE TABELAS .....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE QUADROS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Aspectos gerais sobre a família Erythroxyloaceae .....	1
1.2. Ordem Malpighiales .....	1
1.3. O gênero <i>Erythroxyllum</i> .....	2
1.4. <i>Erythroxyllum loefgrenii</i> .....	3
1.5. Principais constituintes químicos isolados no gênero <i>Erythroxyllum</i> .....	4
1.6. Métodos de avaliação da Atividade Antioxidante .....	4
<b>2. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>8</b>
2.1. Objetivos Específicos.....	8
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>9</b>
3.1. Especificações dos materiais e equipamentos utilizados.....	9
3.1.1. Solventes e reagentes.....	9
3.1.2. Equipamentos .....	9
3.2. Coleta e Identificação do Material Vegetal .....	11
3.3. Obtenção dos extratos .....	12
3.4. Isolamento dos Constituintes Químicos de <i>E. loefgrenii</i> .....	15
3.4.1. Fracionamento do Extrato CHCl <sub>3</sub> do Caule de <i>E. loefgrenii</i> .....	15
3.4.2. Fracionamento do Extrato Hexânico das Folhas de <i>E. loefgrenii</i> .....	18
3.4.3. Purificação do Extrato AcOEt das Folhas de <i>E. loefgrenii</i> .....	18
3.5. Determinação do teor de compostos fenólicos totais .....	22
3.6. Determinação do teor de flavonoides totais .....	23
3.7. Teste de letalidade da <i>Artemia salina</i> .....	23
3.8. Determinação da atividade antioxidante (AA) utilizando o sistema $\beta$ -caroteno / ácido linoléico.....	24
3.9. Determinação da atividade antioxidante (AA) utilizando o método do DPPH .....	25
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>

<b>4.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais</b> .....	27
<b>4.2. Determinação do teor de flavonoides totais</b> .....	29
<b>4.3. Teste de letalidade da <i>Artemia salina</i></b> .....	31
<b>4.4. Determinação da atividade antioxidante (AA) utilizando o sistema <math>\beta</math>-caroteno/ácido linoleico</b> .....	34
<b>4.5. Determinação da atividade antioxidante (AA) pelo método do DPPH</b> .....	36
<b>4.6. Correlação entre a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais</b>	39
<b>4.7. Constituintes Químicos Isolados</b> .....	42
<b>4.8. Identificação Estrutural dos Constituintes Químicos Isolados do extrato <math>\text{CHCl}_3</math> dos caules de <i>E. loefgrenii</i></b> .....	44
4.8.1. Identificação das Substâncias 1 e 2 .....	44
4.8.2. Identificação da Substância 3 .....	57
4.8.3. Identificação das Substâncias 4 e 5 .....	68
<b>4.9. Identificação Estrutural dos Constituintes Químicos Isolados do extrato Hex das folhas de <i>E. loefgrenii</i></b> .....	72
4.9.1. Identificação da Substância 6 .....	72
4.9.2. Identificação da Substância 7 .....	83
<b>4.10. Identificação Estrutural dos Constituintes Químicos Isolados do Extrato AcOEt das folhas de <i>E. loefgrenii</i></b> .....	84
4.10.1. Identificação da Substância 8 .....	84
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	98
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Coluna Cromatográfica do Extrato CHCl <sub>3</sub> dos Caules de <i>E. loefgrenii</i> .....	16
<b>Tabela 2.</b> Coluna Cromatográfica do Extrato Hex das Folhas de <i>E. loefgrenii</i> .....	19
<b>Tabela 3.</b> Coluna Cromatográfica da fração ELFHex 85 .....	21
<b>Tabela 4.</b> Fenóis Totais (mg EAG/ g de Extrato) nos extratos de <i>E. loefgrenii</i> (p < 0,05). .....	28
<b>Tabela 5.</b> Fenóis Totais (mg EAG/ g de Extrato) de diferentes extratos de espécies de <i>Erythroxylum</i> . .....	29
<b>Tabela 6.</b> Flavonoides Totais (mg EQ/ g de Extrato) dos extratos de <i>E. loefgrenii</i> . (p < 0,05) .....	31
<b>Tabela 7.</b> Atividade citotóxica dos extratos das folhas e caules de <i>E. loefgrenii</i> (LC <sub>50</sub> ). .....	34
<b>Tabela 8.</b> Atividade Antioxidante dos extratos das folhas e caule de <i>E. loefgrenii</i> pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico (p < 0,05) (IC <sub>50</sub> ). .....	34
<b>Tabela 9.</b> Atividade Antioxidante dos extratos dos caules e folhas de <i>E. loefgrenii</i> pelo método do DPPH (p < 0,05) (IC <sub>50</sub> ). .....	37
<b>Tabela 10.</b> Correlação entre AA (%) pelo método do DPPH e a concentração de fenóis totais dos extratos de <i>E. loefgrenii</i> . .....	39
<b>Tabela 11.</b> Correlação entre o percentual de inibição (% I) pelo método do β-caroteno e a concentração de fenóis totais dos extratos de <i>E. loefgrenii</i> . .....	40
<b>Tabela 12.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H (δ <sub>H</sub> , CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) das Substâncias <b>1</b> e <b>2</b> e comparação com os dados da literatura. ....	46
<b>Tabela 13.</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C (δ <sub>C</sub> , CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) das Substâncias <b>1</b> e <b>2</b> e comparação com os dados da literatura. ....	47
<b>Tabela 14.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H (δ <sub>H</sub> , CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) da Substância <b>3</b> e comparação com os dados da literatura.....	59
<b>Tabela 15.</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C (δ <sub>H</sub> , CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) da Substância <b>3</b> e comparação com os dados da literatura.....	60
<b>Tabela 16.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H (δ <sub>H</sub> , CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) da Substância <b>6</b> e comparação com os dados da literatura. ....	74
<b>Tabela 17.</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C (δ <sub>C</sub> , CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz) da Substância <b>6</b> e comparação com os dados da literatura. ....	75
<b>Tabela 18.</b> Comparação dos dados de RMN de <sup>13</sup> C da Substância <b>6</b> com os deslocamentos de RMN de <sup>13</sup> C da Narigenina. ....	75
<b>Tabela 19.</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C (δ <sub>C</sub> , DMSO-d <sub>6</sub> , 125 MHz) da Substância <b>8</b> e comparação com os dados da literatura. ....	87
<b>Tabela 20.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H (δ <sub>H</sub> , DMSO-d <sub>6</sub> , 500 MHz) da Substância <b>8</b> e comparação com os dados da literatura. ....	88

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição do gênero <i>Erythroxylum</i> no Brasil. ....	3
<b>Figura 2.</b> Exsicata de <i>Erythroxylum loefgrenii</i> .....	11
<b>Figura 3.</b> Obtenção e partição do extrato MeOH das folhas de <i>E. loefgrenii</i> .....	13
<b>Figura 4.</b> Obtenção e partição do extrato MeOH do caule de <i>E. loefgrenii</i> . ....	14
<b>Figura 5.</b> Fracionamento do Extrato CHCl <sub>3</sub> do Caule de <i>E. loefgrenii</i> . ....	17
<b>Figura 6.</b> Fracionamento do Extrato Hex das Folhas de <i>E. loefgrenii</i> . ....	20
<b>Figura 7.</b> Fracionamento da fração ELFHex 85. ....	22
<b>Figura 8.</b> Curva de calibração do padrão de ácido gálico. ....	27
<b>Figura 9.</b> Curva de calibração do padrão de quercetina. ....	30
<b>Figura 10.</b> Percentual de naupliis mortos nos extratos dos caules de <i>E. loefgrenii</i> .....	33
<b>Figura 11.</b> Percentual de naupliis mortos nos extratos das folhas de <i>E. loefgrenii</i> . ....	33
<b>Figura 12.</b> Percentual da inibição da oxidação (% I) dos extratos das folhas de <i>E. loefgrenii</i> . ....	35
<b>Figura 13.</b> Percentual da inibição da oxidação (% I) dos extratos das folhas de <i>E. loefgrenii</i> . ....	36
<b>Figura 14.</b> AA (%) dos extratos dos caules de <i>E. loefgrenii</i> . ....	38
<b>Figura 15.</b> AA (%) dos extratos das folhas de <i>E. loefgrenii</i> .....	38
<b>Figura 16.</b> Correlação entre os teores de compostos fenólicos totais e as AA pelo (a) método do DPPH (r <sup>2</sup> = 0,903) e pelo (b) método do β-caroteno (r <sup>2</sup> = 0,590).....	41
<b>Figura 17.</b> Estruturas das Substâncias Friedelina (1) e Friedelanol (2).....	45
<b>Figura 18.</b> Espectro RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das Substâncias 1 e 2. ....	48
<b>Figura 19.</b> Espectro RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das Substâncias 1 e 2: expansão da região entre 0,6 e 1,3 ppm. ....	49
<b>Figura 20.</b> Espectro RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das Substâncias 1 e 2: expansão da região entre 1,3 e 2,1 ppm. ....	50
<b>Figura 21.</b> Espectro RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das Substâncias 1 e 2: expansão da região entre 2,1 e 2,65 ppm. ....	51
<b>Figura 22.</b> Espectro RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das Substâncias 1 e 2: expansão da região entre 3,46 e 3,96 ppm. ....	52
<b>Figura 23.</b> Espectro RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das Substâncias 1 e 2. ....	53
<b>Figura 24.</b> Espectro RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das Substâncias 1 e 2: expansão da região entre 5,15 e 19,88 ppm. ....	54
<b>Figura 25.</b> Espectro RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das Substâncias 1 e 2: expansão da região entre 69 e 216 ppm. ....	55
<b>Figura 26.</b> Espectro RMN de DEPT 135 (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das Substâncias 1 e 2. ....	56
<b>Figura 27.</b> Estrutura da Substância Taraxerol. ....	58
<b>Figura 28.</b> Espectro RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Substância 3. ....	61
<b>Figura 29.</b> Espectro RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Substância 3: expansão da região entre 0,7 e 1,8 ppm. ....	62
<b>Figura 30.</b> Espectro RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Substância 3: expansão da região entre 2,9 e 3,9 ppm. ....	63
<b>Figura 31.</b> Espectro RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Substância 3: expansão da região entre 5,15 e 6,1 ppm. ....	64
<b>Figura 32.</b> Espectro RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Substância 3. ....	65
<b>Figura 33.</b> Espectro RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Substância 3: expansão da região entre 70 e 160 ppm. ....	66
<b>Figura 34.</b> Espectro RMN de DEPT 135 (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Substância 3. ....	67
<b>Figura 35.</b> Estruturas das Substâncias β-Sitosterol (4) e Estigmasterol (5). ....	68
<b>Figura 36.</b> Espectro RMN de <sup>13</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das Substâncias 4 e 5. ....	69

<b>Figura 37.</b> Espectro RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) das Substâncias <b>4</b> e <b>5</b> : expansão da região entre 3,15 e 3,67 ppm.....	70
<b>Figura 38.</b> Espectro RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) das Substâncias <b>4</b> e <b>5</b> : expansão da região entre 4,35 e 5,69 ppm.....	71
<b>Figura 39.</b> Estrutura química da Sakuranetina.....	73
<b>Figura 40.</b> Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Substância <b>6</b> .....	76
<b>Figura 41.</b> Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Substância <b>6</b> : expansão da região entre 40 e 130 ppm.....	77
<b>Figura 42.</b> Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Substância <b>6</b> : expansão da região entre 145 e 215 ppm.....	78
<b>Figura 43.</b> Espectro RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Substância <b>6</b> .....	79
<b>Figura 44.</b> Espectro RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Substância <b>6</b> : expansão da região entre 2,55 e 3,8 ppm.....	80
<b>Figura 45.</b> Espectro RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Substância <b>6</b> : expansão da região entre 5,15 e 6,05 ppm.....	81
<b>Figura 46.</b> Espectro RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Substância <b>6</b> : expansão da região entre 6,55 e 7,45 ppm.....	82
<b>Figura 47.</b> (a) Placa cromatográfica: Ponto 1 – Padrão de $\beta$ -sitosterol glicosilado; Ponto 2 – Substância <b>7</b> . (b) Estrutura química do $\beta$ -sitosterol glicosilado.....	83
<b>Figura 48.</b> Estrutura química da Ombuina-3-rutinosídeo.....	86
<b>Figura 49.</b> Espectro RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância <b>8</b> .....	89
<b>Figura 50.</b> Espectro RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância <b>8</b> : expansão da região entre 0,7 e 1,2 ppm.....	90
<b>Figura 51.</b> Espectro RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância <b>8</b> : expansão da região entre 3,65 e 4,45 ppm.....	91
<b>Figura 52.</b> Espectro RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância <b>8</b> : expansão da região entre 5,4 e 6,7 ppm.....	92
<b>Figura 53.</b> Espectro RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância <b>8</b> : expansão da região entre 7,0 e 7,75 ppm.....	93
<b>Figura 54.</b> Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância <b>8</b> .....	94
<b>Figura 55.</b> Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância <b>8</b> : expansão da região entre 16 e 62 ppm.....	95
<b>Figura 56.</b> Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância <b>8</b> : expansão da região entre 60 e 106 ppm.....	96
<b>Figura 57.</b> Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância <b>8</b> : expansão da região entre 110 e 185 ppm.....	97

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Presença de caracteres compartilhados por diferentes famílias de angiospermas segundo Dahlgren (1988). .....	2
---	---

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\% I$  – Percentual de Inibição  
 $A_0$  – Absorbância na ausência de antioxidante  
AA – Atividade Antioxidante  
 $A_{amf}$  = Absorbância final da amostra  
 $A_{ami}$  = Absorbância inicial da amostra  
 $A_{cf}$  = Absorbância final do controle  
 $A_{ci}$  = Absorbância inicial do controle  
AcOEt – Acetato de Etila  
AcONa – Acetato de Sódio  
 $AlCl_3$  – Cloreto de Alumínio  
APG III – Angiosperm Phylogeny Group  
 $A_t$  – Absorbância na presença de antioxidante  
BHT – Hidroxitolueno butilado  
BuOH – Butanol  
CAE – Equivalentes de Ácido Clorogênico  
CC – Cromatografia em Coluna  
CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa  
 $CD_3OD$  – Clorofórmio Deuterado  
 $CHCl_3$  – Clorofórmio  
 $d$  – Dupleto  
DCM – Diclorometano  
 $dd$  – Duplo Dupleto  
DEPT – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DMSO- $d_6$  – Dimetilsulfóxido deuterado  
DPPH – 2,2-difenil,1-picril hidrazil  
EAG - Equivalentes de Ácido Gálico  
ELCAcOEt – Extrato Acetato de Etila dos Caules de *Erythroxylum loefgrenii*  
ELCCHCl<sub>3</sub> – Extrato Clorofórmico dos Caules de *Erythroxylum loefgrenii*  
ELCHex – Extrato Hexânico dos Caules de *Erythroxylum loefgrenii*  
ELCMeOH – Extrato Metanólico dos Caules de *Erythroxylum loefgrenii*  
ELFAcOEt – Extrato Acetato de Etila das Folhas de *Erythroxylum loefgrenii*  
ELFCHCl<sub>3</sub> – Extrato Clorofórmico das Folhas de *Erythroxylum loefgrenii*  
ELFH<sub>2</sub>O – Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Erythroxylum loefgrenii*  
ELFHex – Extrato Hexânico das Folhas de *Erythroxylum loefgrenii*  
ELFMeOH – Extrato Metanólico das Folhas de *Erythroxylum loefgrenii*  
EQ – Equivalentes de Quercetina  
EtOH – Etanol  
 $H_2O$  – Água  
Hex – Hexano  
 $IC_{50}$  – Concentração inibitória 50%  
 $J$  - Constante de Acoplamento  
 $LC_{50}$  – Concentração Letal 50%  
 $m$  – Múltiplo  
MeOD – Metanol Deuterado  
MeOH – Metanol  
Pf – Ponto de Fusão  
 $r$  – Coeficiente de Correlação de Pearson

$R^2$  – Coeficiente de Determinação  
Rf – Índice de Retenção  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
RMN  $^{13}\text{C}$  – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono  
RMN  $^1\text{H}$  – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio  
*s* – Singleto  
*t* – Tripleto  
UV – Ultravioleta  
 $\delta$  – deslocamento químico

## RESUMO

A família Erythroxylaceae é composta por quatro gêneros, sendo o gênero *Erythroxylum* o único gênero representado na região Neotropical. O Brasil é o principal centro de diversidade e endemismo deste gênero com muitas espécies sendo descritas na Região Nordeste. Estudos químicos anteriores indicam a presença de alcaloides, terpenos e compostos fenólicos no gênero *Erythroxylum*. Este trabalho descreve o estudo fitoquímico dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico de *Erythroxylum loefgrenii* obtidos dos caules e das folhas, além da realização de testes de atividade biológicas (atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e da inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno e o teste da letalidade da *Artemia salina*) com esses extratos. A partir das folhas de *E. loefgrenii* foram isolados e identificados os flavonoides sakuranetina e ombuína-3-rutinosídeo, e o esteroide  $\beta$ -Sitosterol glicosilado. A partir do caule de *E. loefgrenii* foram isolados e identificados os triterpenos friedelina, friedelanol, taraxerol e os esteróis Estigamsterol e  $\beta$ -Sitosterol. Estas substâncias foram isoladas através de métodos cromatográficos e a identificação estrutural foi realizada através da análise dos dados espectrométricos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  unidimensional, propriedades físicas (pf.), e pela comparação desses dados com aqueles disponibilizados na literatura.

Palavras-chave: *E. loefgrenii*, flavonoides, triterpenos, atividade antioxidante, teste de letalidade da *Artemia salina*.

## ABSTRACT

The Erythroxylaceae family is constituted of four genera, the genus *Erythroxylum* is the only genus represented in the Neotropical region. Brazil is the main center of diversity and endemism of this genus with many species being described in the Northeast Region. Previous chemical studies indicate the presence of alkaloids, terpenes and phenolic compounds in the genus *Erythroxylum*. This work describes the phytochemical study of hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol extracts obtained from the stems and leaves of *Erythroxylum loefgrenii*, and evaluation of biological activities (antioxidant activity by the methods of DPPH and  $\beta$ -carotene bleaching assay and test the lethality of brine shrimp) of these extracts. From the leaves of *E. loefgrenii* were isolated and identified the flavonoids sakuranetin and ombuin-3-rutinoside, and the steroid glycosyl  $\beta$ -sitosterol. From the stem of *E. loefgrenii* were isolated and identified the triterpenoids friedelin, friedelanol, taraxerol and the sterols stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol. These compounds were isolated by chromatographic methods and, the structural identifications were performed by analysis of the spectral data of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR one-dimensional and physical properties (m.p.), as well as comparison of these data with those available in the literature.

Keywords: *E. loefgrenii*, flavonoids, triterpenoids, antioxidant activity, brine shrimp lethality test.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos gerais sobre a família Erythroxylaceae

Erythroxylaceae é uma família pantropical, composta por quatro gêneros (*Erythroxylum*, *Aneulophus*, *Nectaropetalum* e *Pinacopodium*) e aproximadamente 240 espécies (PLOWMAN; HENSOLD, 2004). Os principais centros de diversidade e endemismo estão na Venezuela, Brasil e Madagascar (DALY, 2004).

*Erythroxylum*, com cerca de 230 espécies, é o único gênero representado na região Neotropical, onde estão presentes cerca de 187 espécies endêmicas (PLOWMAN; HENSOLD, 2004). Os gêneros *Aneulophus*, *Nectaropetalum* e *Pinacopodium* tem distribuição restrita a África tropical, no Brasil a família está representada apenas pelo gênero *Erythroxylum*, com cerca de 114 espécies (PLOWMAN, 2001; HEYWOOD et al., 2007).

A família Erythroxylaceae caracteriza-se por ter representantes com porte geralmente arbóreo ou arbustivo; folhas alternas, simples; estípulas intrapeciolares; inflorescência cimosa, frequentemente reduzida a uma única flor ou fascículos; flores bissexuais, actinomorfas, pentâmeras; estames em número duplo ao das pétalas; ovário súpero e fruto do tipo drupa. (LOIOLA et al., 2013).

### 1.2. Ordem Malpighiales

Em estudo anterior ao advento da biologia molecular, Cronquist (1988) posicionou a família Erythroxylaceae dentro da ordem Linales, baseando-se, principalmente, na morfologia foliar e presença de vasos escalariformes. No entanto, estudos moleculares recentes demonstram que a família Erythroxylaceae é grupo-irmão da família Rhizophoraceae, indicando que a família Erythroxylaceae faz parte da ordem Malpighiales (SCHWARZBACH; RICKLEFS, 2000; SOLTIS et al., 2000). Além das análises moleculares, a grande afinidade entre Rhizophoraceae e Erythroxylaceae fundamenta-se por compartilharem caracteres morfológicos e anatômicos listados por Dahlgren (1988) (**Quadro 1**, p. 2). Na classificação proposta pelo APG III (2009), a família Erythroxylaceae é considerada como parte da ordem Malpighiales.

**Quadro 1.** Presença de caracteres compartilhados por diferentes famílias de angiospermas segundo Dahlgren (1988).

Caracteres	Rhizophoraceae	Erythroxylaceae
1. Presença de endotélio em combinação com óvulos crassinucelados	x	x
2. Presença de arilo formado a partir do exóstoma	x	x
3. Semente coberta com exotegumento fibroso	x	x
4. Embrião clorofilado	x	x
5. Plastídeos que contêm cristais de proteínas, presentes nos elementos de tubo crivado do floema.	x	x
6. Presença de certos tipos de alcaloides		
Higrolina	x	x
Tropânicos	x	x
Pirrolizidínicos	x	
Σ dos caracteres compartilhados	8	7

### 1.3. O gênero *Erythroxylum*

O gênero *Erythroxylum* é o maior e mais representativo da família Erythroxylaceae tendo como centro de diversidade e endemismo a América do Sul. Contêm aproximadamente 230 espécies, das quais 187 são encontradas na região Neotropical. O gênero é mais conhecido pela espécie *Erythroxylum coca* L., a partir da qual a cocaína comercial é derivada (PLOWMAN; HENSOLD, 2004).

O Brasil é o principal centro de diversidade e endemismo, com registro de 114 espécies, das quais 74 endêmicas, sendo 71 destas encontradas na Região Nordeste. O gênero representa um grupo de grande amplitude ecológica, com espécies desenvolvendo-se nos mais diversificados locais desde ao nível do mar até 1.000 m de altitude, habitando desde ambientes úmidos, tais como, a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica, até áreas semiáridas, em vegetação de Caatinga, Carrasco e Cerrado (**Figura 1**, p. 3) (DALY, 2004; LOIOLA et al., 2013).

No Nordeste do Brasil encontra-se a maior diversidade e o maior número de espécies endêmicas no país, com várias novas espécies sendo descritas (COSTA-LIMA; ALVES, 2013; COSTA-LIMA; ALVES, 2015; LOIOLA, 2013; LOIOLA; SALES, 2008; LOIOLA; SALES, 2012).

Dentre os estados brasileiros, a Bahia é o que apresenta maior número de espécies de *Erythroxylum*, distribuídas principalmente na Mata Atlântica (PLOWMAN, 1987). O estudo realizado por Araújo et al. (2014) encontrou 28 espécies de *Erythroxylum* na Mata Atlântica da Bahia. Essa alta diversidade de *Erythroxylum* na Mata Atlântica da Bahia é acompanhada por uma destacada taxa de endemismo, já que das 13 espécies apontadas como endêmicas da Bahia por Loiola (2013), apenas *E. longisetulosum* não ocorre neste bioma.



**Figura 1.** Distribuição do gênero *Erythroxylum* no Brasil.

O gênero caracteriza-se pela presença de plantas lenhosas, arbustos ou árvores, glabras, com catafilos geralmente semelhantes às estípulas. As folhas são alternas e inteiras, com estípulas intrapeciolares. As flores são monoclinas, diclamídeas, pentâmeras e heterostílicas, com 10 estames de filetes unidos na base, formando um tubo que circunda o pistilo. O ovário é súpero, tricarpelar, trilocular, mas geralmente com apenas um único óvulo desenvolvido. O fruto é uma drupa, vermelha a púrpura (LOIOLA et al., 2007).

#### **1.4. *Erythroxylum loefgrenii***

A espécie *Erythroxylum loefgrenii* Diogo possui distribuição restrita ao Brasil, sendo encontrada nos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Minas Gerais. Possui estípulas não estriadas, a forma de vida é do tipo arbusto e o substrato é terrícola, seu domínio fitogeográfico é a caatinga (LOIOLA; COSTA-LIMA, 2015).

### **1.5. Principais constituintes químicos isolados no gênero *Erythroxylum***

Estudos químicos anteriores indicam a presença de alcaloides, terpenos e compostos fenólicos (HEGNAUER, 1981; CHÁVEZ et al., 1996; BARREIROS et al., 2002; BARREIROS et al., 2007; RIBEIRO, 2011). O gênero *Erythroxylum* é reconhecido pela ocorrência de alcaloides tropânicos nas folhas, caules, raízes e frutos de várias espécies (RIBEIRO, 2011). A cocaína, um dos alcaloides tropânicos mais estudado, foi identificada em 23 espécies do gênero *Erythroxylum* (BIERIA et al., 2006). Além dos alcaloides tropânicos, há relatos da presença de outros tipos de alcaloides no gênero como os pirrolidínicos e piridínicos (HEGNAUER, 1981).

Da classe dos terpenos, é destacada a presença de triterpenos e diterpenos. Os triterpenos, encontrados nas folhas e frutos, são principalmente triterpenos pentacíclicos do tipo oleonano. A presença de ácidos graxos esterificados a triterpenos em folhas tem sido uma característica comum das espécies que ocorrem na Restinga brasileira (HEGNAUER, 1981; CHAVÉZ et al., 1996; BARREIROS et al., 2002). Os diterpenos, encontrados na madeira e frutos de cerca de 14 espécies de *Erythroxylum*, pertencem aos grupos dos ent-kauranos, ent-beyeranos, ent-devadaranos, rianodanos, ent-labdanos e ent-rosanos (KAPADI; DEV, 1964; ANSELL; PEGEL; TAYLOR, 1993; BARREIROS et al., 2007).

Com relação aos flavonoides, se destaca a presença dos flavonóis no gênero, principalmente a quercetina e o kaempferol, assim como os seus derivados glicosilados (BOHM et al., 1988, BARREIROS et al., 2007; RIBEIRO, 2011).

### **1.6. Métodos de avaliação da Atividade Antioxidante**

Radicais livres são inevitavelmente produzidos nos sistemas biológicos e também exogenamente, são conhecidos por causarem dano oxidativo à estrutura das biomoléculas e numerosas desordens degenerativas como mutagênese, carcinogênese, distúrbios cardiovasculares e envelhecimento (BARREIROS; DAVID, 2006; SINGH; SINGH, 2008; PYRZYNSKA; PEKAL, 2013). As descobertas do efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças, agindo como causador ou agravante, impulsionou a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células vivas (ALVES et al., 2010).

Antioxidantes são compostos que combatem os radicais livres intervindo em uma das três principais etapas do processo oxidativo: iniciação, propagação e terminação (CUI; LUO;

MURTHY, 2004). A capacidade antioxidante é amplamente utilizada como um parâmetro para caracterizar a habilidade de sequestrar ou neutralizar radicais livres de diferentes substâncias. Esta capacidade está relacionada à presença de compostos capazes de proteger os sistemas biológicos dos danos oxidativos. Existem muitos métodos disponíveis para avaliar a eficiência antioxidante de substâncias puras e extratos de plantas, os ensaios mais comuns envolvem cromógenos de natureza radicalar que na presença de um antioxidante desaparecem, esta reação pode ser acompanhada por espectrofotometria (PYRZYNSKA; PEKAL, 2013).

O DPPH (2,2-difenil,1-picril hidrazil) é conhecido desde 1922 quando Goldschmidt e Renn descobriram um radical livre estável de coloração violeta. O ensaio do DPPH é um dos mais populares e um dos métodos mais empregados para testar a habilidade de compostos atuarem como sequestradores de radicais livres ou doadores de hidrogênios. A avaliação da atividade antioxidante de compostos utilizando o DPPH foi introduzida por Blois (1958), utilizando a cisteína como um modelo de antioxidante, o método modificado proposto por Brand-Williams et al. (1995) no qual substâncias ou extratos reagem com uma solução metanólica do radical estável DPPH e a redução do radical é acompanhada pelo decréscimo na absorvância num comprimento de onda característico durante a reação têm sido extensivamente utilizado.

O radical estável DPPH possui forte paramagnetismo devido ao seu elétron desemparelhado, este composto pode aceitar um elétron ou átomo de hidrogênio para se tornar uma molécula diamagnética estável (BLOIS, 1958). A estabilidade do radical se deve a deslocalização do elétron desemparelhado sobre a molécula como um todo, de maneira que a molécula não sofre dimerização como outros radicais livres. A deslocalização também dá origem à intensa cor roxa, com absorção numa solução etanólica ao redor de 520 nm (KEDARE; SINGH, 2011), mas após sofrer redução por um antioxidante ou por espécies radicalares a absorção desaparece e ocorre a descoloração da solução como resultado da redução e formação da hidrazina correspondente (PYRZYNSKA; PEKAL, 2013).

O sítio radicalar do DPPH está protegido por dois anéis fenila ortogonais entre si e o anel picrilo num ângulo de 30° com seus dois grupos nitro orientados acima e abaixo do sítio radicalar, sendo o impedimento estérico um problema central da reação com o DPPH. A velocidade da reação parece estar relacionada com a estrutura química dos antioxidantes, uma vez que moléculas pequenas que têm melhor acesso ao sítio radicalar apresentam capacidade antioxidante relativamente maior, desta forma, a acessibilidade estérica ao radical DPPH parece ser o principal fator determinante da reação (XIE; SCHAICH, 2014).

A reação entre o radical DPPH e um antioxidante fornece uma relação com as reações que ocorrem no sistema oxidativo, como a autooxidação de lipídios ou outras substâncias insaturadas. A molécula de DPPH (Z•) representa os radicais livres formados no sistema cuja atividade é suprimida pela substância antioxidante (KEDARE; SINGH, 2011).

A capacidade redutora dos antioxidantes frente ao DPPH pode ser avaliada pelo decaimento da absorbância a 515-528 nm à medida que a hidrazina correspondente é formada. O ensaio de DPPH é frequentemente simplificado pela medida da concentração de DPPH no início da reação e após um certo tempo de incubação, no ensaio original foi recomendado o tempo de 30 minutos (PYRZYNSKA; PEKAL, 2013).

Os resultados do ensaio podem ser expressos de muitas maneiras, a maioria dos estudos expressa os resultados em termos da porcentagem da inibição ou sequestro do DPPH, calculado como  $I\% = (A_0 - A_t)/A_0 * 100$ , onde  $A_0$  e  $A_t$  é a absorbância na ausência e presença de antioxidante, respectivamente (PYRZYNSKA; PEKAL, 2013). Brand-Williams et al. (1995) utilizou o termo  $IC_{50}$  (concentração inibitória) para interpretação dos resultados do método do DPPH, sendo definido como a concentração do substrato que causa redução de 50% na concentração do DPPH, o  $IC_{50}$  é calculado usando o gráfico obtido através dos valores de porcentagem de inibição versus concentração do extrato ou composto. O  $IC_{50}$  pode ser utilizado para comparar a capacidade antioxidante de diferentes compostos ou extratos de origem natural, um baixo valor de  $IC_{50}$  indica alta atividade antioxidante.

O ensaio do DPPH é considerado um método espectrofotométrico válido, acurado, fácil e econômico para avaliar a atividade antioxidante de substâncias e extratos, pode ser usado para amostras líquidas e sólidas, o composto radicalar é estável e não precisa ser gerado antes do ensaio como em outros ensaios de sequestro de radicais livres e não é específico para nenhum componente antioxidante em particular, mas sim à capacidade antioxidante total da amostra. (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995; KEDARE; SINGH, 2011; PYRZYNSKA; PEKAL, 2013).

Outro método de avaliação da atividade antioxidante é através da oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. O  $\beta$ -caroteno é um carotenoide de origem natural de coloração laranja, abundante em frutas e vegetais, a descoloração dos carotenoides ocorre quando estas substâncias são expostas a radicais ou substâncias oxidantes (KRINSKY; JOHNSON, 2005). O método de oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico é um dos mais utilizados na avaliação da atividade antioxidante, o princípio do método é baseado na descoloração de uma solução contendo  $\beta$ -caroteno devido à quebra do sistema de ligações duplas conjugadas por espécies

radicais formadas pela auto-oxidação do ácido linoleico através do aquecimento, sendo monitorado pelo decaimento da absorbância (MARCO, 1968; MILLER, 1971). Quando um antioxidante apropriado é adicionado à solução, o processo de descoloração pode ser retardado por uma reação de competição entre o  $\beta$ -caroteno e os antioxidantes pelos radicais formados devido a oxidação do ácido linoleico (DJORDJEVIC et al., 2004).

O método de oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico avalia a capacidade de uma amostra ou composto de proteger um substrato ( $\beta$ -caroteno) da oxidação causada pelos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. Os radicais gerados pela oxidação espontânea do ácido graxo promovida por indução térmica a 50°C provocam a descoloração da emulsão aquosa formada pelo ácido linoleico e o  $\beta$ -caroteno (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005). O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico. A quantificação é baseada no decaimento da absorbância do  $\beta$ -caroteno em 470 nm na presença de diferentes concentrações de uma substância antioxidante com leitura imediata e em intervalos de 15 minutos, por um tempo total de 120 minutos (PRIETO et al., 2012).

Este método permite a avaliação da atividade antioxidante de extratos de plantas, comparando com um antioxidante padrão desejado. Os resultados do ensaio de oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico podem ser expressos como porcentagem de inibição da oxidação calculada pela correlação entre a queda da absorbância das amostras e o decaimento da absorbância do controle. Os resultados também podem ser expressos sob a forma de  $IC_{50}$ , a concentração do substrato que causa inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno em 50%, calculado usando o gráfico obtido através dos valores de porcentagem de inibição versus concentração do extrato ou composto. Além disso, construindo um gráfico que avalie a curva cinética de oxidação (absorbância *versus* tempo em minutos) é possível determinar a eficiência antioxidante de uma amostra em uma dada concentração através do valor de F1 (relação entre as tangentes da curva de oxidação da amostra e do controle entre 15 e 45 minutos após o início da reação) que mede a eficiência em bloquear a reação em cadeia, através da interação com os radicais peróxidos. Pela curva de oxidação também é possível avaliar a possibilidade de o antioxidante participar de outras reações durante o processo oxidativo pelo cálculo de F2 (relação entre as tangentes das curvas de oxidação da amostra e do controle entre 75 e 90).

## **2. OBJETIVO GERAL**

Realizar um estudo fitoquímico e avaliar as atividades biológicas de *Erythroxylum loefgrenii* (Erythroxylaceae) contribuindo para o conhecimento quimiotaxonômico e potencial biológico das espécies desta família.

### **2.1. Objetivos Específicos**

Determinar as atividades citotóxica e antioxidante dos extratos obtidos a partir do caule e folhas de *Erythroxylum loefgrenii*;

Isolar os constituintes químicos presentes nas folhas e caule de *Erythroxylum loefgrenii* candidatos a novos fármacos;

Elucidar as estruturas das substâncias isoladas através de técnicas espectroscópicas;

Contribuir para o conhecimento da química da família Erythroxylaceae.

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Especificações dos materiais e equipamentos utilizados**

##### **3.1.1. Solventes e reagentes**

Os solventes orgânicos (acetona, acetato de etila (AcOEt), clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), diclorometano (DCM), hexano (Hex) e metanol (MeOH)) empregados nos processos de partição, cromatografias, recristalização e purificação foram das marcas Merck, Quimex e Vetec, todos em grau PA. A água utilizada foi destilada e deionizada em aparelho da marca Milli-Q. Os solventes deuterados ( $\text{CHCl}_3$ , MeOH e DMSO) foram da marca Isotech.

Os reagentes e padrões empregados nas avaliações das atividades biológicas foram das seguintes marcas: DPPH e  $\beta$ -caroteno (Sigma), Ácido linolênico (Aldrich Chem. Co.), Ácido gálico (Riedel), BHT (Acrös Organics), Quercetina (Sigma).

Nas cromatografias em coluna (CC), os adsorventes utilizados foram gel de sílica 60 (0,063-0,200 mm) da Merck, gel de sílica 60 A (0,035-0,070 mm, marca Acrös Organics).

Nas cromatografias em camada delgada (CCDC) foram utilizadas placas de alumínio recobertas com sílica gel fluorescente PF 254-366 da marca Whatman e Merck.

As placas de cromatografia em camada delgada foram reveladas com luz na região do ultravioleta (254 e 365 nm) e reveladores químicos. Dentre estes, os mais utilizados foram os reagentes de Liebermann- Burchard, Cloreto de Alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) e vapores de Iodo.

##### **3.1.2. Equipamentos**

Os materiais vegetais foram secos em estufa de secagem e esterilização com circulação mecânica, modelo 320-SE, Fanem; e foram moídos em moinho, modelo TE-650, Willey Tecnal.

Os solventes foram evaporados em rotaevaporador rotatório sob pressão reduzida Rotavapor – RII (Buchi).

Para as observações de fluorescência foi utilizado gabinete, modelo CM-10, Spectroline.

As amostras foram pesadas em balança analítica modelo AND GR-200.

Nos testes de atividade antioxidante pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e pelo método do DPPH e na determinação do conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais as absorbâncias foram lidas no leitor de microplaca BioRad Elx800.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz e 300 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (500 MHz) unidimensionais e bidimensionais foram adquiridos em espectrômetros Bruker Avance III empregando sequências de pulsos tradicionais para os experimentos de correlação homo- e heteronucleares.

As medidas de ponto de fusão foram registradas em aparelho digital Microquímica Ind. e Com. Ltda MQAPF-301.

### 3.2. Coleta e Identificação do Material Vegetal

A espécie *Erythroxylum loefgrenii* foi coletada no Parque da Chapada Diamantina, no município de Morro do Chapéu, Bahia, sendo identificada pela professora Maria Lenise S. Guedes e registrada no Herbário “Alexandre Leal Costa” do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, sob o número 107779 (Figura 2, p. 11).

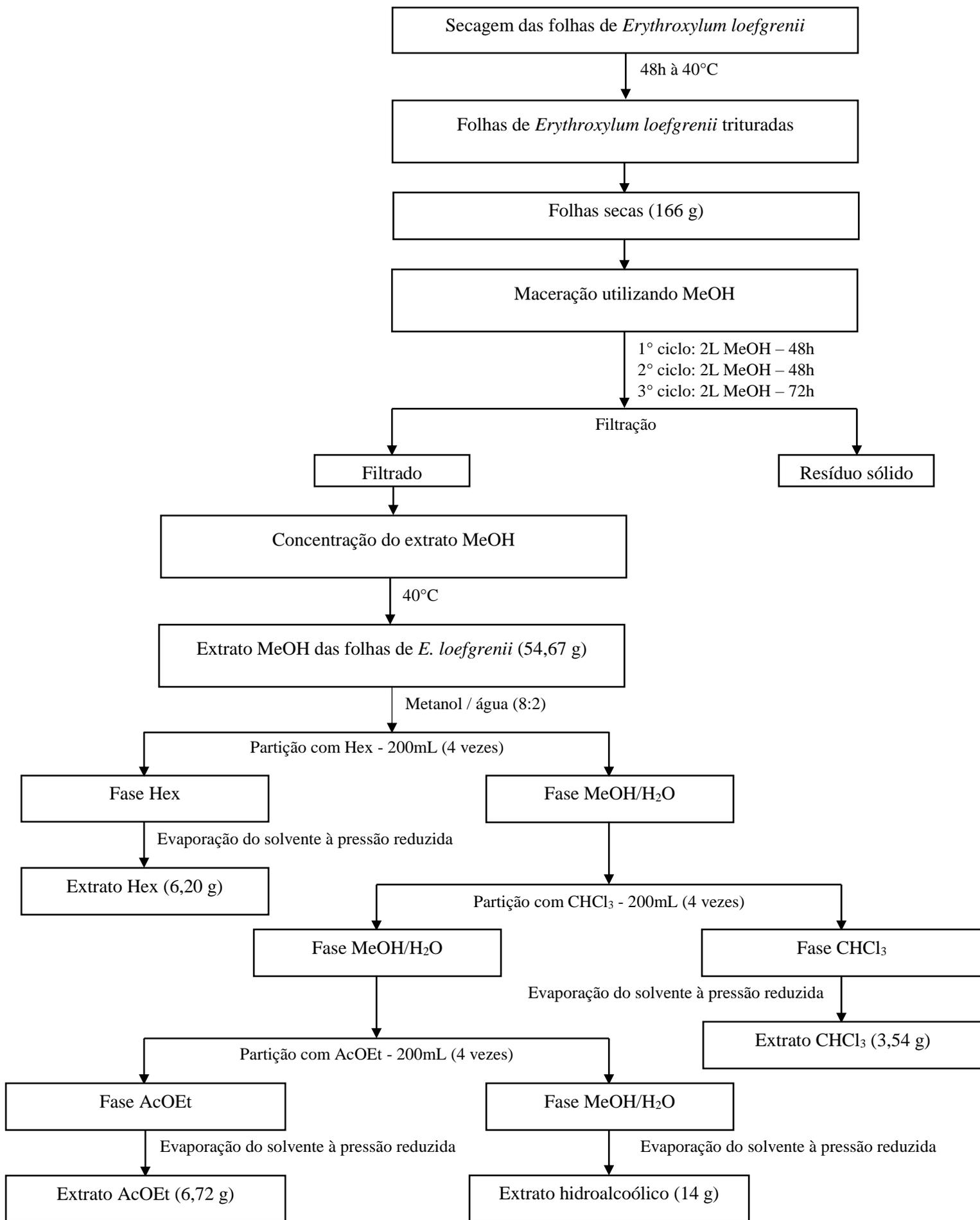


**Figura 2.** Exsicata de *Erythroxylum loefgrenii*.

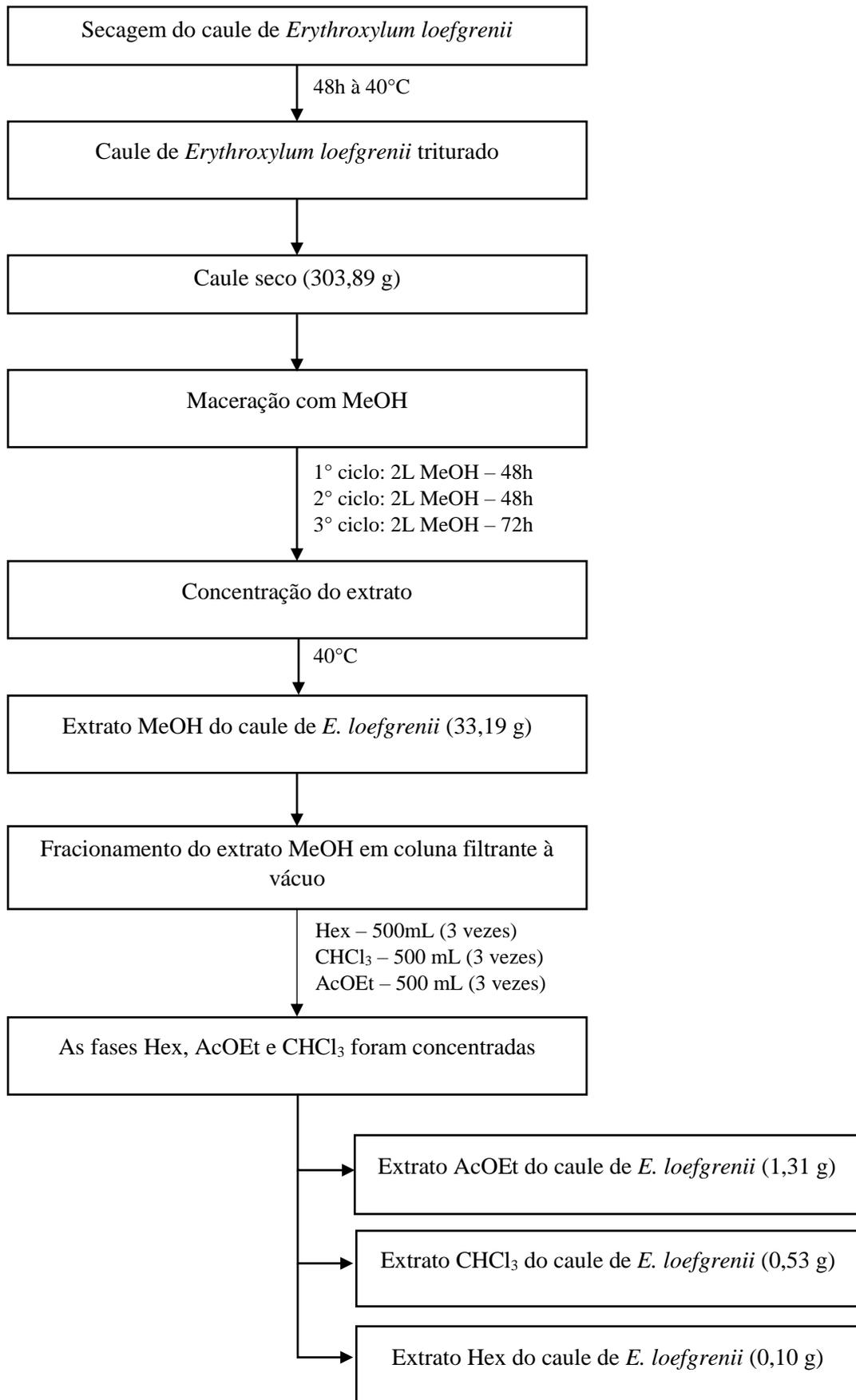
### 3.3. Obtenção dos extratos

As folhas de *E. loefgrenii* foram secas em estufa e trituradas em liquidificador obtendo-se uma massa de (166 g). Foram feitas três extrações por maceração sucessivas utilizando MeOH. Após a filtragem e evaporação do MeOH em rotaevaporador obteve-se o extrato MeOH bruto (ELFMeOH = 54,67 g). O extrato metanólico foi solubilizado na mistura MeOH / H<sub>2</sub>O numa proporção de 8:2 (v/v). Em um funil de separação foi realizada a partição líquido-líquido com Hex, sendo retiradas três porções da fase hexânica. Após a filtragem e evaporação do Hex obteve-se o extrato hexânico (ELFHex = 6,20 g). Posteriormente foi realizada partição líquido-líquido da fase metanólica restante utilizando-se três porções de CHCl<sub>3</sub>. Assim, após a filtragem e evaporação do CHCl<sub>3</sub> foi obtido o extrato clorofórmico (ELFCHCl<sub>3</sub> = 3,54 g). Utilizando três porções AcOEt foi realizada nova partição líquido-líquido da fase metanólica, que após a filtragem e evaporação do AcOEt forneceu o extrato acetato de etila (ELFAcOEt = 6,72 g). O resíduo hidroalcoólico restante foi evaporado à pressão reduzida fornecendo o extrato hidroalcoólica (ELFH<sub>2</sub>O/MeOH = 14 g) (**Figura 3**, p. 13).

Os caules de *E. loefgrenii* foram secos em estufa com circulação de ar à temperatura de 40°C e triturados em moinho obtendo-se 303,89 g. Foram feitas três extrações por maceração sucessivas utilizando MeOH como solvente. Após a filtragem e evaporação do MeOH obteve-se o extrato MeOH bruto (ELCMeOH = 33,19 g). O extrato MeOH bruto foi submetido a fracionamento em coluna filtrante, utilizando-se sílica Gel como fase estacionária e os solventes Hex, CHCl<sub>3</sub> e AcOEt, em ordem crescente de polaridade. Após a evaporação do Hex, CHCl<sub>3</sub> e AcOEt em Rotaevaporador obteve-se os extratos hexânico (ELCHex = 0,10 g), clorofórmico (ELCCHCl<sub>3</sub> = 0,53 g) e acetato de etila (ELCAcOEt = 1,31 g) do caule de *E. loefgrenii* (**Figura 4**, p. 14).



**Figura 3.** Obtenção e partição do extrato MeOH das folhas de *E. loefgrenii*.



**Figura 4.** Obtenção e partição do extrato MeOH do caule de *E. loefgrenii*.

### 3.4. Isolamento dos Constituintes Químicos de *E. loefgrenii*

#### 3.4.1. Fracionamento do Extrato CHCl<sub>3</sub> do Caule de *E. loefgrenii*

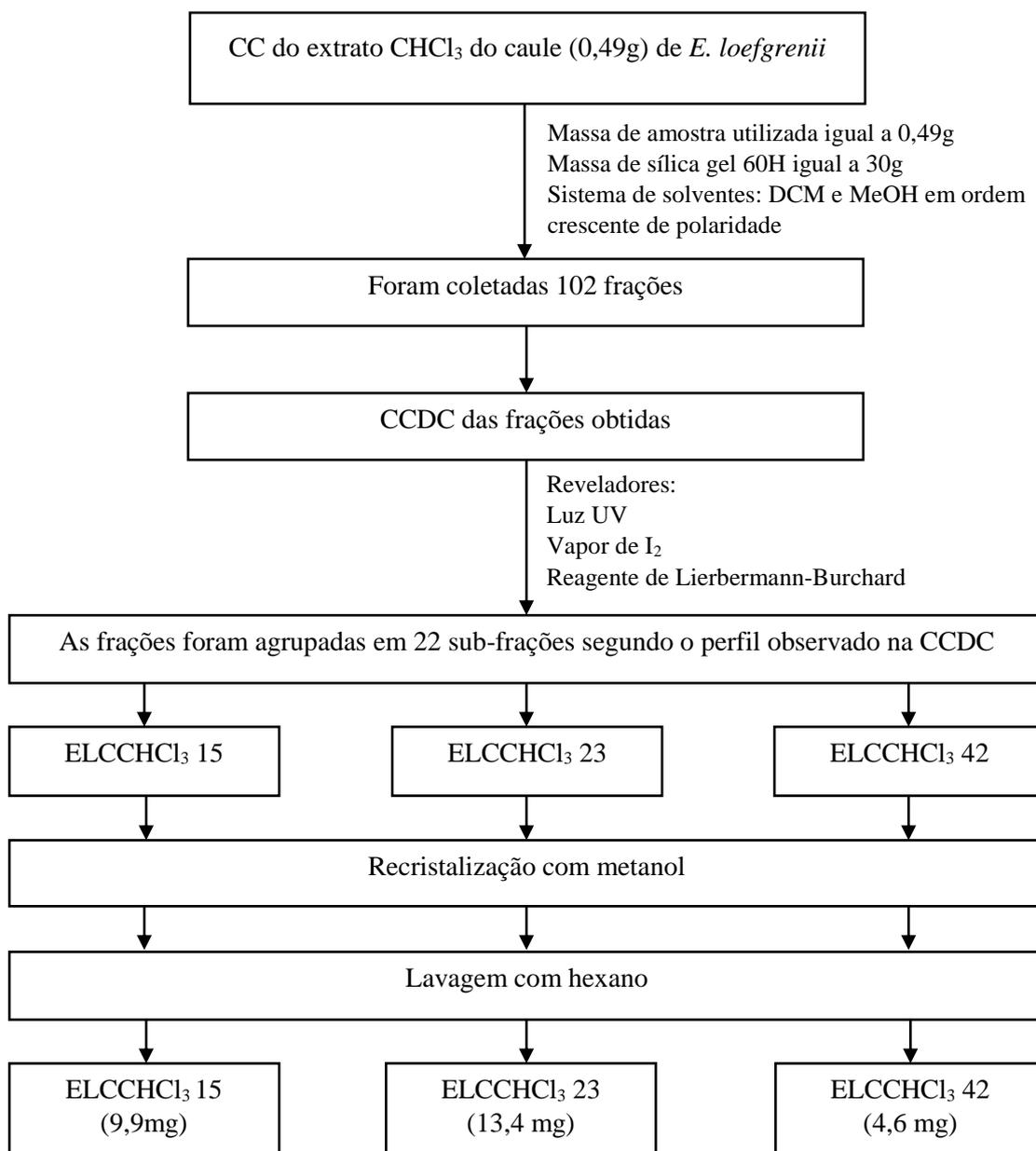
O extrato CHCl<sub>3</sub> obtido do caule de *E. loefgrenii* (0,49 g) foi submetido a uma CC em gel de sílica 60 A utilizando como eluente uma mistura de DCM e MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas dessa coluna 102 frações de aproximadamente 15 mL cada. Essas frações foram agrupadas em 22 sub-frações com base no perfil observado na CCDC utilizando como reveladores o reagente de Liebermann-Burchard, vapores de I<sub>2</sub> e visualização com luz UV (**Tabela 1**, p. 16).

As frações ELCCHCl<sub>3</sub> 15 e 23, eluídas em DCM, e a fração 42 eluída em DCM / MeOH (99:1) foram submetidas à recristalização com MeOH. Os cristais formados em cada uma dessas frações foram separados do sobrenadante por filtração e solubilizados em CHCl<sub>3</sub>. Após a evaporação do solvente os cristais formados foram lavados separadamente com Hex, separando-se a parte solúvel em Hex do restante. A análise espectroscópica por RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT 135, dessas frações permitiu identificar as misturas de **1** e **2** (9,9 mg), **4** e **5** (4,6 mg), bem como, a substância **3** (13,4 mg) nas frações ELCCHCl<sub>3</sub> 15, ELCCHCl<sub>3</sub> 42 e ELCCHCl<sub>3</sub> 23, respectivamente (**Figura 5**, p. 17).

**Tabela 1.** Coluna Cromatográfica do Extrato CHCl<sub>3</sub> dos Caules de *E. loefgrenii*.

Frações Obtidas	Sistema de Solvente	Frações Agrupadas	Massa (mg)	Observação
		1	3,0	
		2 – 3	4,4	
		4 – 7	4,8	
1 – 30	DCM	8 – 15	9,9	ELCCHCl <sub>3</sub> 15 Substâncias <b>1 e 2</b>
		16 – 18	5,1	
		19 – 23	13,4	ELCCHCl <sub>3</sub> 23 Substância <b>3</b>
		24 – 27	7,3	
		28 – 30	6,5	
		31	4,0	
31 – 60	DCM:MeOH (99:1)	32 – 42	4,6	ELCCHCl <sub>3</sub> 42 Substâncias <b>4 e 5</b>
		43 – 51	19,0	
		52 – 57	14,2	
		58 – 60	8,9	
61 – 63	DCM:MeOH (98:2)			
64 – 66	DCM:MeOH (95:5)	61 – 66	25,0	
67 – 69	DCM:MeOH (9:1)			
70 – 72	DCM:MeOH (85:15)	67 – 72	32,3	
73 – 75	DCM:MeOH (8:2)	73	9,1	
		74 – 75	16,4	
76 – 82	DCM:MeOH (7:3)	76 – 82	23,0	
83 – 89	DCM:MeOH (6:4)	83 – 89	46,0	
90 – 99	DCM:MeOH (1:1)	90 – 94	29,1	
		95 – 99	31,2	
100 – 102	MeOH	100 – 102	17,6	

Obs: O volume coletado das frações coletadas de 1 a 60 foi de aproximadamente 15 mL e de 62 a 102 de aproximadamente de 50 mL



**Figura 5.** Fracionamento do Extrato CHCl<sub>3</sub> do Caule de *E. loefgrenii*.

### 3.4.2. Fracionamento do Extrato Hexânico das Folhas de *E. loefgrenii*

O extrato hexânico obtido das folhas da *E. loefgrenii* (5,5 g) foi submetido a uma CC em gel de sílica 60 A utilizando como eluentes uma mistura de HEX, AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas dessa coluna 127 frações de aproximadamente 50 mL cada. Essas frações foram agrupadas em 30 sub-frações com base no perfil observado na CCDC utilizando Liebermann-Burchard, vapores de I<sub>2</sub> e luz UV reveladores (**Tabela 2**, p. 19, **Figura 6**, p. 20).

A fração ELFHex 85 (155,2 mg) foi submetida a CC em gel de sílica 60 A utilizando como eluentes DCM e MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 60 frações, agrupadas em 16 sub-frações com base no perfil observado na CCDC utilizando Liebermann-Burchard, I<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub> e luz UV como reveladores. A análise espectroscópica por meio de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C da fração ELFHex 85(5) (7,1 mg), eluída em DCM, permitiu chegar à identificação estrutural da substância **6** (**Tabela 3**, p. 21, **Figura 7**, p. 22).

A fração ELFHex 102 (18,7 mg), eluída em AcOEt/MeOH (95:5), foi submetida à lavagem com AcOEt, que após a evaporação do solvente levou à formação de um sólido branco. A análise por CCDC utilizando Liebermann-Burchard e luz UV dessa fração permitiu a identificação da substância **7** (**Figura 6**, p. 20).

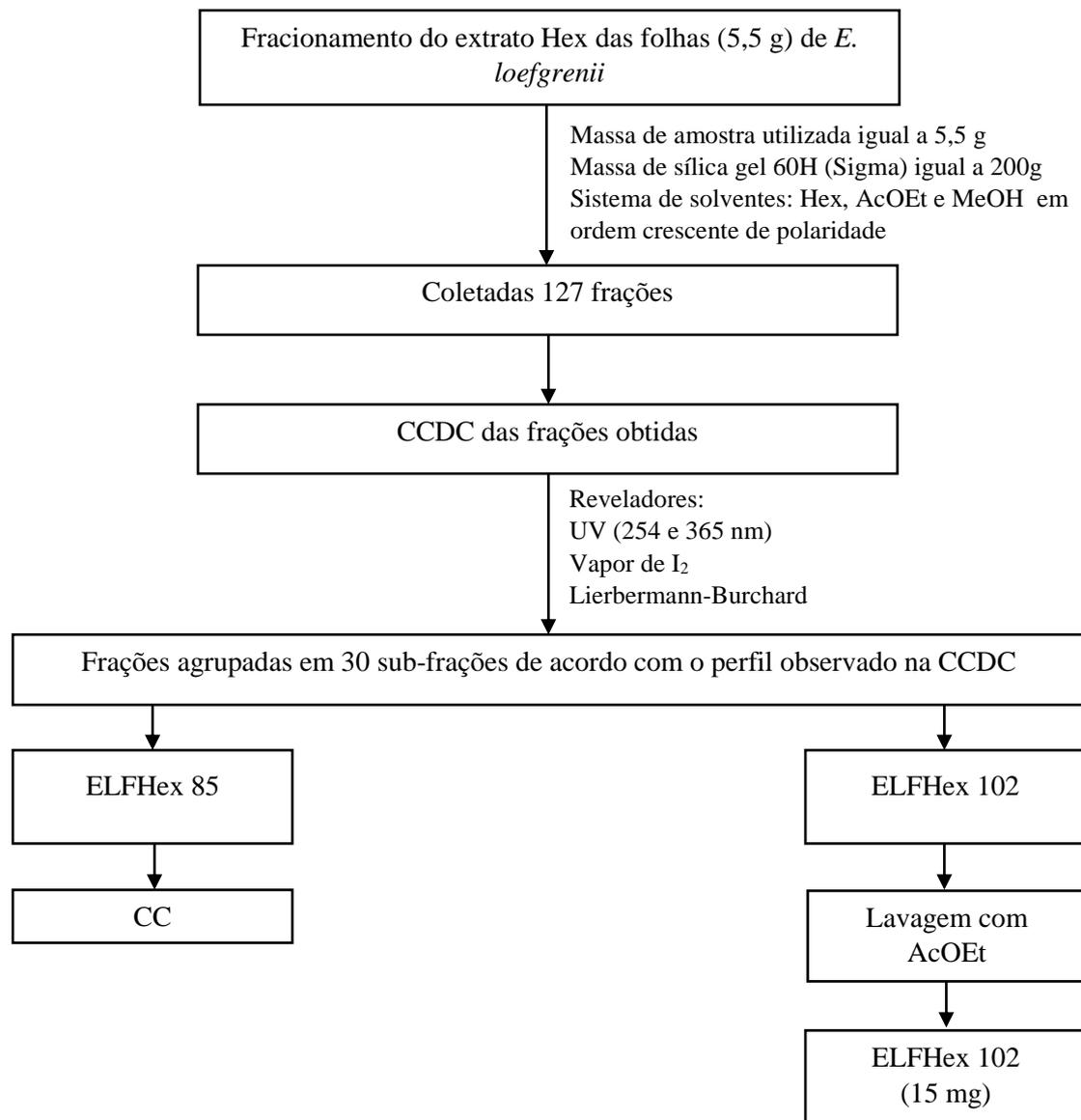
### 3.4.3. Purificação do Extrato AcOEt das Folhas de *E. loefgrenii*

O extrato AcOEt das folhas de *E. loefgrenii* (3 g) foi submetido à sucessivas lavagens com metanol, os perfis das frações obtidas foram analisados por CCDC utilizando vapor de I<sub>2</sub>, luz UV e AlCl<sub>3</sub> como reveladores, fornecendo a fração ELFAcOEt 1 (12,6 mg). A análise espectroscópica por RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C da fração ELFAcOEt 1 permitiu chegar à identificação estrutural da substância **8**.

**Tabela 2.** Coluna Cromatográfica do Extrato Hex das Folhas de *E. loefgrenii*.

Frações Obtidas	Sistema de Solvente	Frações Agrupadas	Massa (mg)	Observação
1 – 2	Hex	1 – 2	47,1	
3 – 5	Hex			
6 – 7	Hex:AcOEt (99:1)	3 – 10	202,3	
8 – 10	Hex:AcOEt (98:2)			
11 – 15	Hex:AcOEt (97:3)	11 – 12	136,5	
		13 – 15	32,8	
16 – 18	Hex:AcOEt (97:3)			
19	Hex:AcOEt (96:4)	16 – 19	46,9	
20 – 23	Hex:AcOEt (96:4)	20 – 23	56,7	
24 – 25	Hex:AcOEt (96:4)			
26	Hex:AcOEt (95:5)			
27	Hex:AcOEt (94:8)	24 – 29	67,4	
28	Hex:AcOEt (92:8)			
29	Hex:AcOEt (9:1)			
		30 – 32	33,9	
30 – 50	Hex:AcOEt (9:1)	33 – 35	54,2	
		36 – 37	87,0	
		38 – 50	217,2	ELFHex 50 CC
		51 – 55	62,8	ELFHex 55 CC
51 – 58	Hex:AcOEt (85:15)	56 – 58	34,3	
59 – 68	Hex:AcOEt (85:15)			ELFHex 75 CC
69 – 75	Hex:AcOEt (8:2)	59 – 75	358,4	
76 – 77	Hex:AcOEt (7:3)	76 – 77	36,7	
78 – 79	Hex:AcOEt (7:3)			
80 – 83	Hex:AcOEt (6:4)	78 – 85	155,2	ELFHex 85 CC
84 – 85	Hex:AcOEt (1:1)			
		86 – 90	100,6	
86 – 94	Hex:AcOEt (1:1)	91 – 93	74,1	
		94	23,0	
95 – 96	Hex:AcOEt (3:7)	95 – 98	41,9	
97 – 98	AcOEt			
		99 – 100	38,7	
99 – 102	AcOEt:MeOH (95:5)	101 – 102	15	ELFHex 102 Substância 7
103 – 104	AcOEt:MeOH (9:1)			
105	AcOEt:MeOH (8:2)	103 – 105	32,6	
106	AcOEt:MeOH (8:2)			
107	AcOEt:MeOH (7:3)	106 – 107	21,3	
		108 – 109	46,2	
108 – 113	AcOEt:MeOH (7:3)			
		110 – 113	103,7	
114	AcOEt:MeOH (7:3)			
115 – 116	AcOEt:MeOH (6:4)	114 – 116	86,4	
		117 – 118	98,5	
117 – 123	AcOEt:MeOH (1:1)	119 – 123	202,4	
124	AcOEt:MeOH (1:1)			
125 – 126	MeOH	124 – 126	126,3	

Obs: O volume coletado das frações coletadas foi aproximadamente 50 mL.

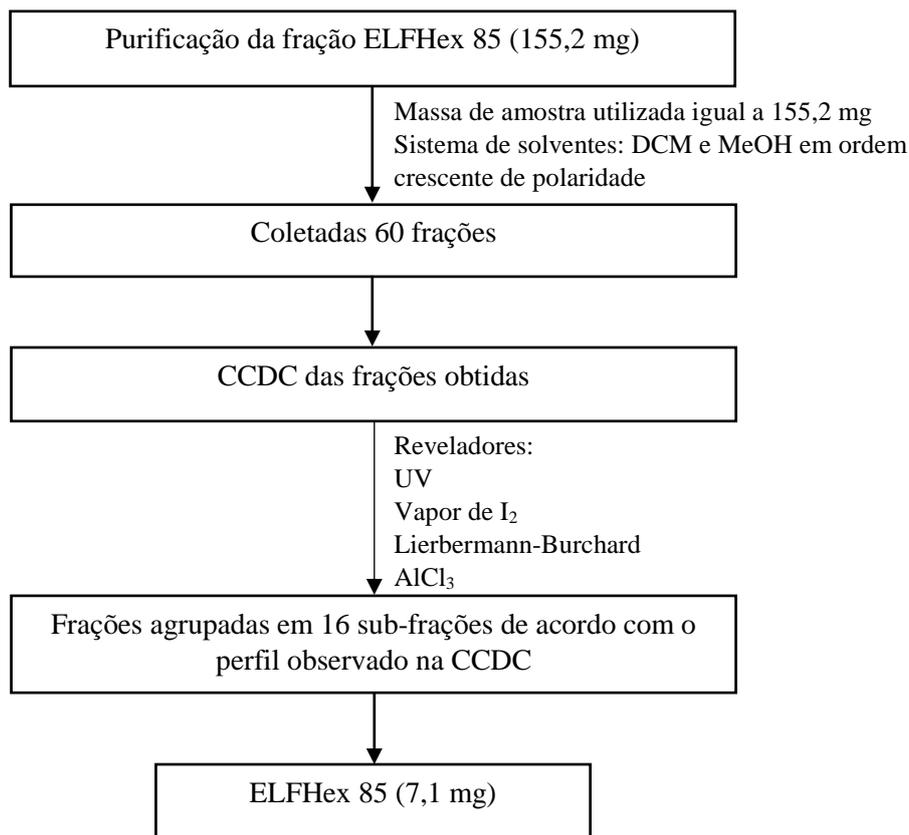


**Figura 6.** Fracionamento do Extrato Hex das Folhas de *E. loefgrenii*.

**Tabela 3.** Coluna Cromatográfica da fração ELFHex 85

Frações Obtidas	Sistema de Solvente	Frações Agrupadas	Massa (mg)	Observação
		1	2,6	
		2 – 5	8,5	
		6 – 10	13,8	
		11 – 14	14,0	
1 – 36	DCM	15 – 16	7,1	ELFHex 85(5) Substância 6
		17 – 24	10,9	
		25 – 27	7,1	
		28 – 30	6,3	
		31 – 34	9,0	
		35 – 36	10,4	
37 – 40	DCM:MeOH (99:1)	37 – 40	8,7	
41 – 44	DCM:MeOH (98:2)			
45 – 46	DCM:MeOH (97:3)	41 – 46	12,4	
47 – 48	DCM:MeOH (96:4)	47 – 48	6,1	
49 – 50	DCM:MeOH (95:5)			
51	DCM:MeOH (9:1)	49 – 51	6,7	
52	DCM:MeOH (85:15)			
53	DCM:MeOH (8:2)	52 – 53	5,9	
54 – 57	DCM:MeOH (7:3)	54 – 57	7,5	
58 – 59	DCM:MeOH (6:4)			
60	MeOH	58 – 60	10,7	

O volume coletado das frações coletadas de 1 a 60 foi de aproximadamente 30 mL.



**Figura 7.** Fracionamento da fração ELFHex 85.

### 3.5. Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais nos extratos obtidos de *E. loefgrenii* foi realizada de acordo com o método de Folin-Ciocalteu em microplaca, seguindo o protocolo descrito por Al-Duais et al. (2009) e Müller et al. (2010), e adaptado por Bobo-García et al. (2014). O método está baseado na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico em solução alcalina. O aparecimento de coloração azulada produzida é diretamente proporcional ao teor de fenólicos presentes no material analisado e medido em  $\lambda=750$  nm.

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais, 20  $\mu\text{L}$  de cada extrato (1000  $\text{mg L}^{-1}$ ) foi adicionado a cada poço da microplaca, misturado com 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu (1:4), e agitado por 60s. Após 240s foi adicionado 75  $\mu\text{L}$  de uma solução de carbonato de sódio (100  $\text{g L}^{-1}$ ) e agitado por 60s. Após 2h de incubação no escuro à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em 750 nm no leitor de microplaca. O branco da reação foi preparado com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada e a absorbância do branco foi subtraída das absorbâncias dos extratos e do padrão de ácido gálico. O ácido gálico foi utilizado como padrão em concentrações que variaram de 10 a 500  $\text{mg L}^{-1}$ . O teor de compostos fenólicos totais foi calculado a partir da

curva de concentração *versus* absorvância construída com o padrão de ácido gálico (10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 e 500 mg L<sup>-1</sup>) e foram expressos como mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g de Extrato). Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Os dados desta análise foram submetidos a análise de variância (ANOVA), usando teste Tukey com ( $p < 0.05$ ). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Sisvar 5.6, Microsoft Excel 2010 e o IBM SPSS Statistics.

### **3.6. Determinação do teor de flavonoides totais**

A determinação do teor de flavonoides totais nos extratos obtidos de *E. loefgrenii* foi realizada através de um ensaio colorimétrico utilizando o cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), este método se baseia na formação de um complexo entre o alumínio e o flavonoide com absorvância máxima em 430 nm. O ensaio foi realizado segundo a metodologia proposta por Chatatikun e Chiabchalard (2013) na qual 50 µL dos extratos (1000 mg L<sup>-1</sup>) ou da solução padrão de quercetina (5, 10, 25, 50, 75, 100 e 200 mg L<sup>-1</sup>) em EtOH 80% foi adicionado a 10 µl de uma solução de cloreto de alumínio 10% seguido da adição de 150 µL de EtOH 95%. O branco foi preparado com etanol 80%. 10 µL de AcONa 1M foi adicionado à mistura em uma microplaca de 96 poços. Os reagentes foram misturados e incubados por 40 minutos na temperatura ambiente protegidos da luz. A absorvância foi medida a 415 nm no leitor de microplaca.

O teor de flavonoides totais foi calculado a partir da curva de concentração *versus* absorvância construída com o padrão de quercetina e o conteúdo de flavonoides totais nos extratos foi expresso como mg equivalentes de quercetina por grama de Extrato (mg EQ/g de Extrato). Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Os dados desta análise foram submetidos a análise de variância (ANOVA), usando teste Tukey com ( $p < 0.05$ ). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Sisvar 5.6, Microsoft Excel 2010 e o IBM SPSS Statistics.

### **3.7. Teste de letalidade da *Artemia salina***

Os ensaios de toxicidade dos extratos AcOEt, CHCl<sub>3</sub>, Hex e MeOH das folhas e caule de *E. loefgrenii* utilizando *Artemia salina* baseou-se na metodologia proposta por Serrano, Ortega e Villar (1996).

O aquário montado para a eclosão dos ovos de *Artemia salina* é dividido em dois compartimentos, os ovos de *A. salina* foram depositados no compartimento protegido da luz. Com a eclosão, após 48h de incubação, os *naupliis* migraram para o compartimento iluminado. A solução do aquário foi preparada com 1 L de água mineral e 3,8 g de sal marinho sintético. Dez *naupliis* foram transferidos para cada frasco contendo os extratos e o volume dos frascos foi completado para 5,0 mL com a mesma água do mar artificial. Esse sistema permaneceu sob iluminação e os *naupliis* sobreviventes foram contados após 24 horas. Os extratos foram testados nas concentrações de 25, 50, 100, 125, 250, 500, 750 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O branco foi preparado com 5,0 mL de água do mar artificial. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A porcentagem de mortos em cada concentração foi determinada através da média aritmética das triplicatas. Os *naupliis* que não exibiram nenhum movimento, durante dez segundos de observação, foram considerados mortos. Foi construído o gráfico de concentração *versus* porcentagem de *naupliis* mortos e, por regressão linear, calculado a concentração letal 50% ( $\text{LC}_{50}$ ).

### **3.8. Determinação da atividade antioxidante (AA) utilizando o sistema $\beta$ -caroteno / ácido linoléico**

O método de oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico, ou seja, a capacidade de um extrato ou substância de proteger um substrato lipídico da oxidação. O método foi inicialmente descrito por Marco (1968) e posteriormente modificado por Miller (1971) e baseia-se em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico.

A determinação da AA utilizando o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Ribeiro et al. (2011) adaptando o teste para microplaca. A mistura reativa foi preparada pela adição de 20  $\mu\text{L}$  de ácido linoléico, 200  $\mu\text{L}$  de Tween 20, 1 mL de  $\text{CHCl}_3$  e 1 mL de solução de  $\beta$ -caroteno a 2  $\text{mg mL}^{-1}$  em Erlenmeyer. Em seguida, o  $\text{CHCl}_3$  foi removido em rotaevaporador, na temperatura de 40 °C. À mistura isenta de  $\text{CHCl}_3$ , foi adicionado 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  previamente saturada com oxigênio durante 30 min com agitação vigorosa.

Para determinar as absorbâncias, foi utilizada uma microplaca de poliestireno com 96 poços. Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  da mistura reativa e 10  $\mu\text{L}$  de cada extrato obtido a partir dos caules e folhas de *E. loefgrenii* nas concentrações de 200,

400, 600, 800 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  usando como padrão o mesmo volume de BHT nas concentrações de 100, 200, 400, 600, 800 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O branco foi preparado com metanol.

A placa foi incubada a 45°C para acelerar as reações de oxidação e iniciar o descolorimento do  $\beta$ -caroteno. As leituras das absorvâncias foram realizadas imediatamente e com intervalos de 15 min, durante 120 min, em leitor de microplaca no comprimento de onda de 470 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação, que foi calculada em relação ao decaimento da absorvância do controle ( $A_c$ ). A queda da absorvância das amostras ( $A_{am}$ ) foi correlacionada com a queda do controle, obtendo-se a porcentagem da inibição da oxidação (% I) através da Equação 1:

$$\% I = \frac{(A_{c_i} - A_{c_f}) - (A_{am_i} - A_{am_f})}{A_{c_i} - A_{c_f}} \times 100$$

Onde:

$A_{c_i}$  = Absorvância inicial do controle

$A_{c_f}$  = Absorvância final do controle

$A_{am_i}$  = Absorvância inicial da amostra

$A_{am_f}$  = Absorvância final da amostra

Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Os dados desta análise foram submetidos a análise de variância (ANOVA), usando teste Tukey com ( $p < 0.05$ ). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Sisvar 5.6, Microsoft Excel 2010 e o IBM SPSS Statistics.

### **3.9. Determinação da atividade antioxidante (AA) utilizando o método do DPPH**

A atividade antioxidante foi determinada através do método do DPPH segundo a metodologia desenvolvida por Brand-Williams et al. (1995) e proposta por Ribeiro et al. (2011) adaptando o teste para microplaca. O teste avalia a capacidade de um extrato ou substância de reduzir o DPPH, formando a 2,2-difenil,1-picril hidrazina de coloração amarela, com consequente desaparecimento da coloração monitorada pelo decréscimo da absorvância. Para cada extrato e padrões foram utilizadas oito diferentes concentrações (12,5, 25, 50, 100, 200, 250, 400 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 50  $\mu\text{L}$  dos extratos e dos padrões Quercetina e BHT dissolvidos em

metanol foram adicionados a 200µL de DPPH 100 µM na microplaca e a redução da absorbância foi determinada a 515 nm no minuto 0 e no minuto 30 no leitor de placa de microplaca. O branco foi preparado com 50µL de MeOH e 200µL de DPPH. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A atividade antioxidante (% AA) foi calculada através da equação:

$$\% AA = \frac{A_0 - A_t}{A_0} * 100$$

Onde:

$A_0$  = absorbância do controle

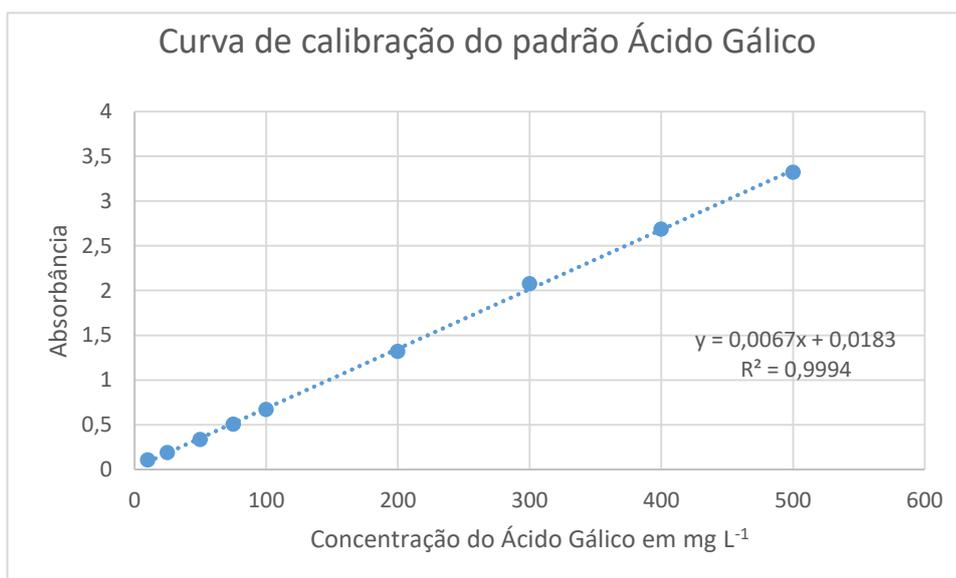
$A_t$  = a absorbância na presença de antioxidante

E o IC<sub>50</sub>, definido como a concentração inibitória de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%, foi calculado pela equação da reta do gráfico de concentração *versus* atividade antioxidante. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Os dados desta análise foram submetidos a análise de variância (ANOVA), usando teste Tukey com ( $p < 0.05$ ). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Sisvar 5.6, Microsoft Excel 2010 e o IBM SPSS Statistics.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais

As dosagens dos teores dos compostos fenólicos nos extratos dos caules e folhas de *E. loefgrenii* foi determinada através da curva de calibração do padrão de ácido gálico apresentada na **Figura 8** (p. 27). A curva é linear na faixa de concentração de 10 a 500 mg L<sup>-1</sup> com R<sup>2</sup> igual a 0,9994 e equação da reta igual a  $y = 0,0067x + 0,0183$ , onde y é igual absorbância e x igual a concentração. Substituindo a absorbância obtida para cada extrato na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> na equação da reta obtém-se os resultados expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g de Extrato).



**Figura 8.** Curva de calibração do padrão de ácido gálico.

Os compostos fenólicos constituem um dos principais grupos de metabólitos secundários com atividade antioxidante encontrados nas plantas, os teores de compostos fenólicos totais nos extratos de *E. loefgrenii* variaram de  $25,63 \pm 2,35$  a  $370,70 \pm 9,28$  mg EAG/g de Extrato. Na **Tabela 4** (p. 28) estão apresentados os teores de compostos fenólicos totais dos extratos obtidos dos caules e folhas de *E. loefgrenii*. As maiores concentrações de compostos fenólicos foram encontradas nos extratos AcOEt e MeOH das folhas e caules e, no extrato ELFCHCl<sub>3</sub> das folhas de *E. loefgrenii*. Não há diferença significativa entre as concentrações de compostos fenólicos observadas nos extratos ELCAcOEt e ELCMeOH dos caules. Enquanto que no extrato ELFAcOEt das folhas, a concentração de compostos fenólicos

é 2,09 vezes maior do que no extrato ELFMeOH das folhas. O extrato Hex apresentou as menores concentrações de compostos fenólicos nas folhas e no caule.

**Tabela 4.** Fenóis Totais (mg EAG/ g de Extrato) nos extratos de *E. loefgrenii* ( $p < 0,05$ ).

EXTRATO	Fenóis Totais (mg EAG/ g de Extrato) $\pm$ desvio padrão	
	FOLHAS	CAULE
AcOEt	370,70 $\pm$ 9,28 <sup>a</sup>	180,70 $\pm$ 9,89 <sup>b</sup>
CHCl <sub>3</sub>	153,24 $\pm$ 3,85 <sup>c</sup>	84,13 $\pm$ 2,69 <sup>d</sup>
Hex	41,15 $\pm$ 1,95 <sup>e</sup>	25,63 $\pm$ 2,35 <sup>e</sup>
MeOH	177,42 $\pm$ 6,87 <sup>b</sup>	194,43 $\pm$ 7,81 <sup>b</sup>

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Devido à complexidade química dos compostos fenólicos, não há um método conhecido que forneça a abordagem perfeita na determinação do teor desses compostos (WANG; WELLER, 2006). O ensaio de Folin-Ciocalteu está baseado na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico em solução alcalina. Apesar de não ser um ensaio específico, é o método mais utilizado na determinação de compostos fenólicos. Os resultados podem ser superestimados uma vez que os substratos oxidativos não fenólicos podem interferir na reação de maneira aditiva, e os compostos fenólicos oxidados podem ser regenerados, interferindo na reação de maneira sinérgica (MAGALHÃES et al., 2010). Dentre os compostos não fenólicos que podem reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu estão os ácidos orgânicos, tais como, os ácidos ascórbico, cítrico e tartárico, açúcares como a frutose, glicose e sacarose, carotenoides, aminoácidos e o sulfato ferroso (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Na determinação dos compostos fenólicos totais das folhas e caules de *E. loefgrenii* as maiores concentrações foram encontradas nos extratos mais polares, os extratos AcOEt e MeOH. Estes resultados são condizentes com os resultados encontrados por Córdova et al. (2012) na determinação do teor de compostos fenólicos totais nos extratos AcOEt, CHCl<sub>3</sub>, Hex e BuOH de três variedades de *Erythroxylum alaternifolium* endêmicas de Cuba, onde os teores de compostos fenólicos variaram de 1,3 a 284,0 mg equivalentes de ácido clorogênico por grama de extrato (mg CAE/g de Extrato). No entanto, enquanto no presente estudo as maiores concentrações de compostos fenólicos foram encontradas nos extratos AcOEt dos caules e folhas de *E. loefgrenii*, Córdova et al. (2012) encontraram as maiores concentrações nos

extratos BuOH das três variedades de *E. alaternifolium*. Os extratos AcOEt das três variedades de *E. alaternifolium* apresentaram teores de compostos fenólicos totais que variaram de 12 a 116 mg CAE/g de Extrato.

A comparação entre a concentração de fenóis totais de diferentes extratos de espécies do gênero *Erythroxylum* e os resultados obtidos neste estudo para os extratos MeOH e AcOEt do caule e folhas de *E. loefgrenii* constam na **Tabela 5** (p. 29).

**Tabela 5.** Fenóis Totais (mg EAG/ g de Extrato) de diferentes extratos de espécies de *Erythroxylum*.

	Fenóis Totais (mg EAG/ g de Extrato) ± desvio padrão			
	Extrato EtOH	Extrato AcOEt	Extrato H <sub>2</sub> O	Extrato MeOH
<i>E. suberosum</i> (OLIVEIRA et al., 2015)	575,50 ± 2,50	242,20 ± 9,53		
<i>E. citrifolium</i> (CASTAÑEDA et al., 2013)			200 ± 6	
<i>E. sideroxyloides</i> (SOOBRAATTEE et al., 2008)			24	
<i>E. laurifolium</i> (PICOT et al., 2014)			160,25 ± 0,74	454,68 ± 0,71
<i>E. loefgrenii</i> *		180,70 ± 9,89		194,43 ± 7,81
<i>E. loefgrenii</i> **		370,70 ± 9,28		177,42 ± 6,87

\*CAULES

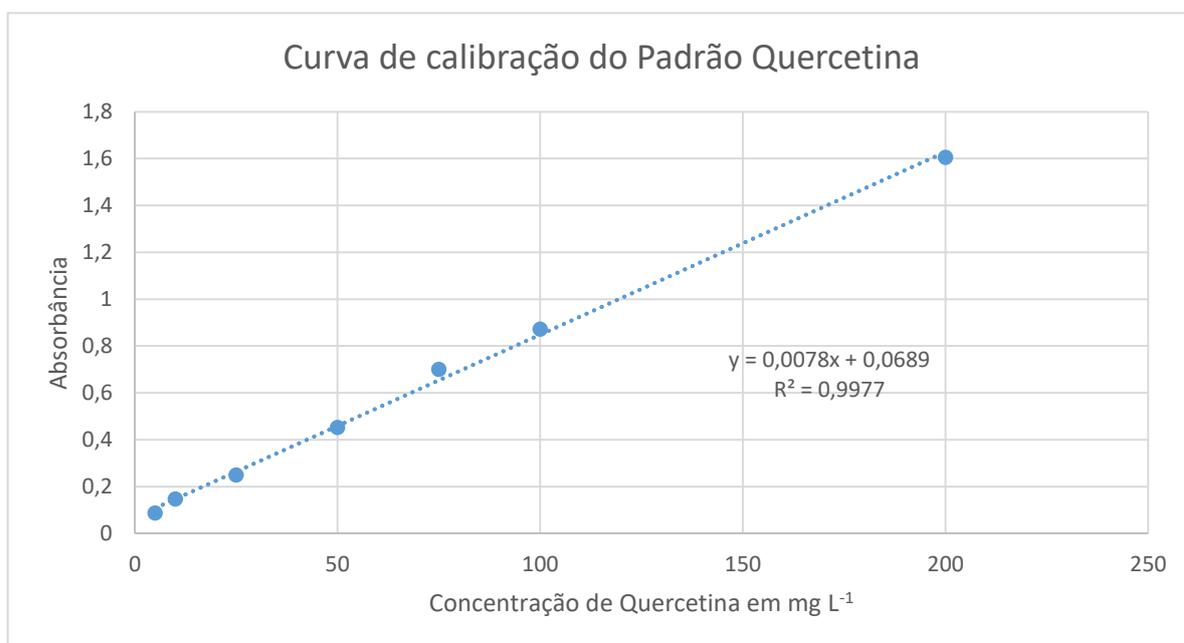
\*\*FOLHAS

#### 4.2. Determinação do teor de flavonoides totais

A dosagem do teor dos flavonoides totais nos extratos obtidos dos caules e folhas de *E. loefgrenii* foi realizada através da curva de calibração do padrão de quercetina apresentada na **Figura 9** (p. 30). A curva foi linear na faixa de concentração de 10 a 200 mg L<sup>-1</sup> com R<sup>2</sup> igual a 0,9977 e equação da reta foi igual a  $y = 0,0078x + 0,0689$ , onde y foi igual absorvância e x igual a concentração. Substituindo a absorvância obtida para cada extrato na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> na equação da reta foram obtidos os resultados expressos em mg equivalentes de quercetina por grama de extrato (mg EQ/g de Extrato).

Os teores de flavonoides totais nos extratos de *E. loefgrenii* variaram de 18,39 ± 1,83 a 276,72 ± 3,03 mg EQ/ g de Extrato. Na **Tabela 6** (p. 31) estão apresentados os teores de

flavonoides totais dos extratos obtidos a partir dos caules e folhas de *E. loefgrenii*. A concentração de flavonoides totais foi maior para todos os extratos obtidos das folhas de *E. loefgrenii* quando comparados aos mesmos extratos dos caules. As maiores concentrações de flavonoides foram encontradas nos extratos ELFAcOEt e ELFCHCl<sub>3</sub> das folhas de *E. loefgrenii*. No entanto, o extrato ELFAcOEt apresenta uma concentração de flavonoides totais 2,23 vezes maior que o extrato ELFCHCl<sub>3</sub>. Com relação aos extratos dos caules, as maiores concentrações foram encontradas nos ELCAcOEt e ELCCHCl<sub>3</sub>; não havendo diferença significativa entre as concentrações de flavonoides observadas nos extratos ELCHex e ELCMeOH. Os extratos Hex das folhas e dos caules e o extrato ELCMeOH dos caules apresentaram as menores concentrações de flavonoides totais entre os extratos testados.



**Figura 9.** Curva de calibração do padrão de quercetina.

**Tabela 6.** Flavonoides Totais (mg EQ/ g de Extrato) dos extratos de *E. loefgrenii*. (p < 0,05)

EXTRATO	Flavonoides Totais (mg EQ/ g de Extrato) ± desvio padrão	
	FOLHAS	CAULE
AcOEt	276,72 ± 3,03 <sup>a</sup>	44,33 ± 4,25 <sup>b</sup>
CHCl <sub>3</sub>	124,12 ± 4,65 <sup>c</sup>	31,34 ± 5,06 <sup>d</sup>
Hex	85,23 ± 2,95 <sup>e</sup>	18,47 ± 1,81 <sup>f</sup>
MeOH	107,83 ± 4,01 <sup>g</sup>	18,39 ± 1,83 <sup>f</sup>

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

No gênero *Erythroxylum* os flavonoides glicosilados são mais abundantes que as respectivas agliconas. Córdova et al. (2012) determinaram o teor de flavonoides totais nos extratos AcOEt, CHCl<sub>3</sub>, Hex e BuOH de três variedades de *Erythroxylum alaternifolium* endêmicas de Cuba, nos quais os teores de flavonoides variaram de 0,02 a 0,21 mg EQ/ g de Extrato, sendo as maiores concentrações encontradas nos extratos BuOH das três variedades. Picot et al. (2014) analisaram os teores de flavonoides totais nos extratos MeOH e H<sub>2</sub>O de cinco plantas medicinais das Maurícias usadas tradicionalmente para o tratamento da diabetes, entre elas a *Erythroxylum laurifolium*, que apresentou teores de flavonoides iguais a 20,11 ± 0,59 e 23,17 ± 0,79 mg equivalente de rutina por g de Extrato, para os extratos MeOH e H<sub>2</sub>O, respectivamente. Estes valores são inferiores aos teores de flavonoides encontrados no presente estudo, onde as concentrações de flavonoides totais variaram de 18,39 ± 1,83 a 276,72 ± 3,03 mg EQ/ g de Extrato e as maiores concentrações foram encontradas nos extratos ELFAcOEt e ELFCHCl<sub>3</sub> das folhas de *E. loeffgrenii*.

#### 4.3. Teste de letalidade da *Artemia salina*

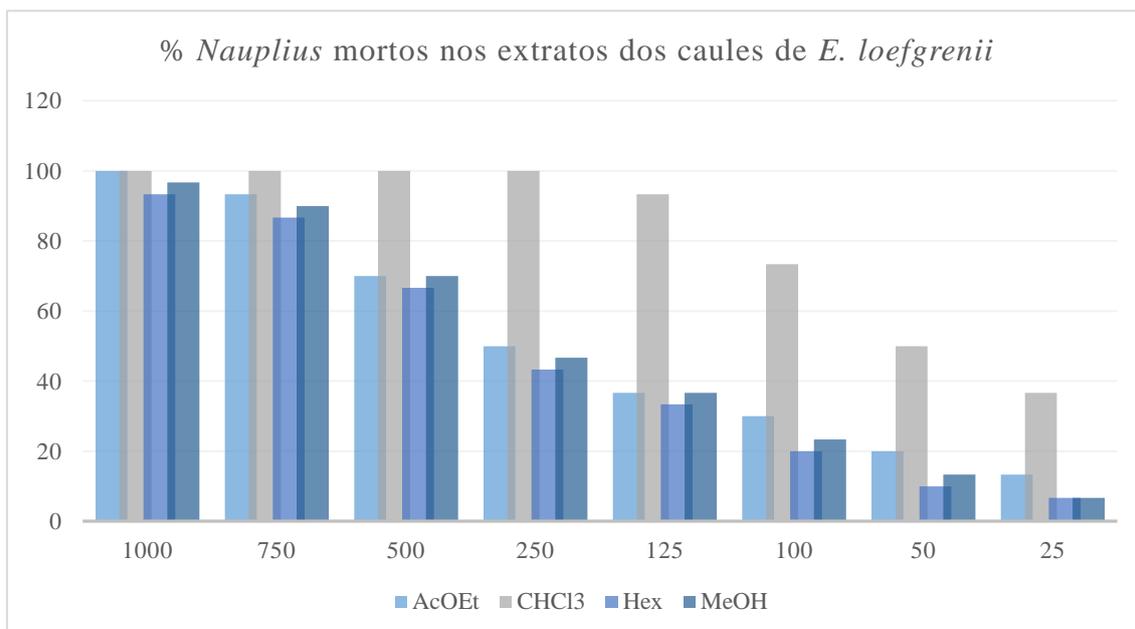
A *Artemia salina* é um microcrustáceo marinho usado como organismo alvo na detecção de compostos bioativos em extratos de plantas. A significativa correlação entre o ensaio de letalidade da *A. salina* e a inibição do crescimento de linhagens celulares de tumores humanos sólidos demonstrada pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos demonstra o valor deste bioensaio como uma ferramenta de triagem na pesquisa de novas drogas antitumorais

(McLAUGHLIN; ROGERS, 1988). Os ovos de *A. salina* se mantêm viáveis por muitos anos, sendo uma conveniente fonte biológica para bioensaios rápidos, simples e baratos, podendo ser realizados em laboratórios de química de produtos naturais devido a não exigência de técnicas assépticas na sua realização uma vez que a maioria destes laboratórios não são adequadamente equipados para a realização de bioensaios utilizando animais ou órgãos e tecidos isolados (MAYORGA et al., 2010; LIEBERMAN, 1999).

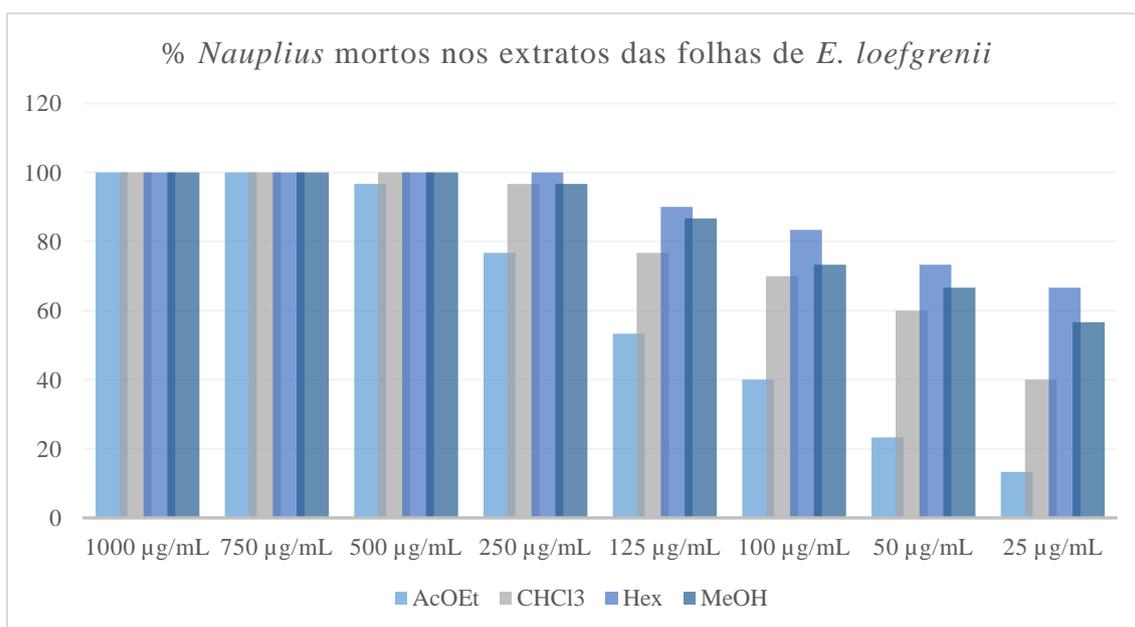
Muitos laboratórios de produtos naturais usam este ensaio na sua rotina de isolamento, purificação e elucidação estrutural como uma técnica de triagem biológica inicial com o objetivo de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na busca por substâncias bioativas (ALMEIDA-CORTEZ et al., 2004; SIQUEIRA et al., 1998). Quanto menor o valor de LC<sub>50</sub> apresentado por um extrato ou substância, mais tóxico é o composto frente a *A. salina*. A toxicidade pode ser considerada baixa quando a LC<sub>50</sub> é superior a 500 µg mL<sup>-1</sup>; moderada para valores entre 100 a 500 µg mL<sup>-1</sup> e elevada quando a LC<sub>50</sub> é inferior a 100 µg mL<sup>-1</sup> (AMARANTE et. al., 2011).

Nesse estudo os extratos apresentaram toxicidade frente a *A. salina* com percentuais que variaram de 6,67% na concentração de 25 µg mL<sup>-1</sup> a 100% de atividade na concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup>. Nas concentrações de 1000 e 750 µg mL<sup>-1</sup> todos os extratos obtidos a partir das folhas apresentaram atividade máxima frente a *A. salina*. Dos extratos obtidos a partir das folhas, o extrato ELFAcOEt foi o menos ativo em todas as concentrações. Enquanto que, o extrato ELFHex foi o mais ativo em todas as concentrações testadas. Com exceção do extrato ELFCHCl<sub>3</sub>, todos os extratos obtidos das folhas de *E. loefgrenii* foram mais ativos que os extratos obtidos dos caules. O extrato ELCCHCl<sub>3</sub> dos caules de *E. loefgrenii* foi notadamente mais ativo contra *A. salina* que os demais extratos obtidos dos caules **Figura 10** e **Figura 11** (p. 33).

Utilizando as curvas de regressão linear obtida para cada extrato foi possível calcular a concentração letal 50% (LC<sub>50</sub>). Os extratos AcOEt dos caules e das folhas de *E. loefgrenii* e os extratos ELCHex e ELCMeOH dos caules apresentaram toxicidade moderada segundo a classificação proposta por Amarante et al. (2011). Enquanto que os extratos CHCl<sub>3</sub> dos caules e das folhas e os extratos ELFHex e ELFMeOH das folhas apresentaram toxicidade elevada. Os extratos que podem ser considerados os mais tóxicos frente a *A. salina* foram os extratos ELCCHCl<sub>3</sub> dos caules e o extrato ELFHex das folhas de *E. loefgrenii* (**Tabela 7**, p. 34).



**Figura 10.** Percentual de naupliis mortos nos extratos dos caules de *E. loefgrenii*.



**Figura 11.** Percentual de naupliis mortos nos extratos das folhas de *E. loefgrenii*.

**Tabela 7.** Atividade citotóxica dos extratos das folhas e caules de *E. loefgrenii* (LC<sub>50</sub>).

Extratos	LC <sub>50</sub> µg mL <sup>-1</sup>			
	AcOEt	CHCl <sub>3</sub>	Hex	MeOH
Caule	331,16	35,68	405,48	372,73
Folhas	140,98	69,45	27,54	47,22

A realização deste teste é relevante para guiar a avaliação preliminar de possíveis atividades biológicas, as potenciais indicações terapêuticas e o perfil de segurança de extratos obtidos a partir de plantas.

#### 4.4. Determinação da atividade antioxidante (AA) utilizando o sistema β-caroteno/ácido linoleico

Os resultados da avaliação da atividade antioxidante dos extratos das folhas e dos caules de *E. loefgrenii* pelo sistema modelo β-caroteno/ácido linoléico estão descritos na **Tabela 8** (p. 34). Os valores estão expressos como IC<sub>50</sub> em µg mL<sup>-1</sup>, ou seja, a concentração do antioxidante presente nos extratos necessária para inibir em 50% a oxidação lipídica do sistema. O IC<sub>50</sub> foi calculado a partir da curva de regressão linear construída a partir das concentrações testadas (200, 400, 600, 8000 e 1000 µg mL<sup>-1</sup>) *versus* percentual de atividade antioxidante.

**Tabela 8.** Atividade Antioxidante dos extratos das folhas e caule de *E. loefgrenii* pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico (p < 0,05) (IC<sub>50</sub>).

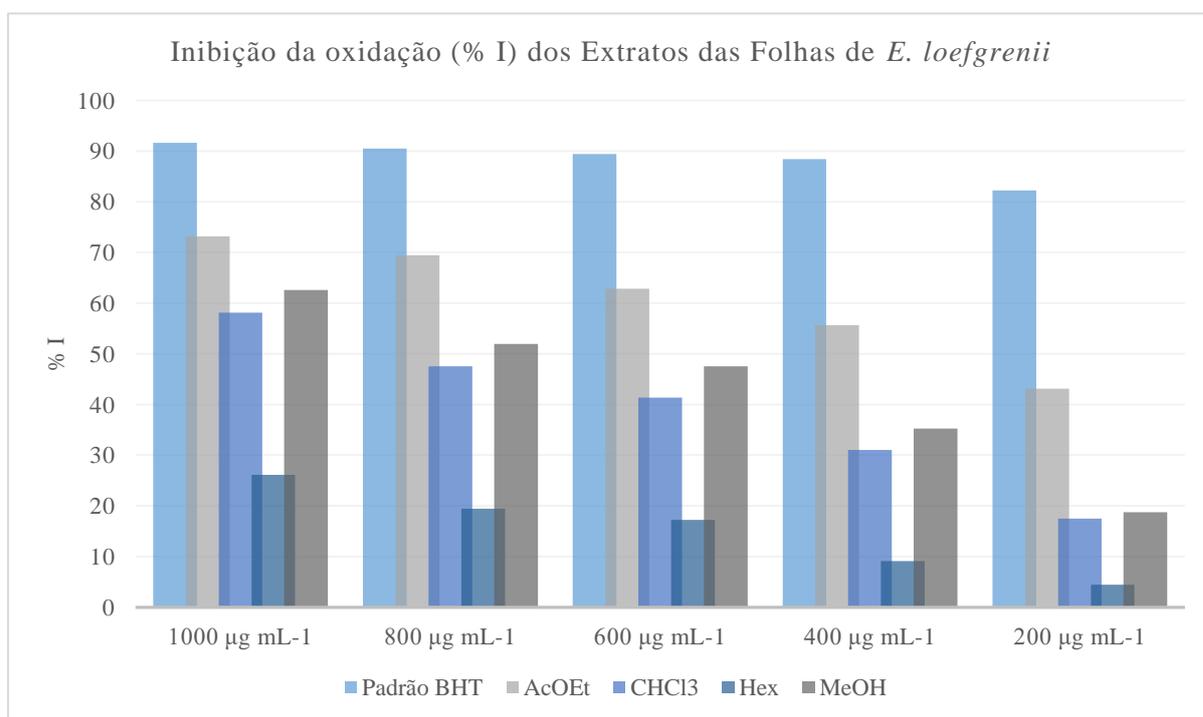
Extratos	IC <sub>50</sub> µg mL <sup>-1</sup>				
	AcOEt	CHCl <sub>3</sub>	Hex	MeOH	Padrão BHT
Folhas	275,85 ± 6,72 <sup>a</sup>	821,89 ± 5,24 <sup>c</sup>	2051,26 ± 43,44 <sup>e</sup>	731,33 ± 16,45 <sup>c</sup>	32,04
Caule	557,14 ± 3,93 <sup>b</sup>	1220,25 ± 46,81 <sup>d</sup>	10107,99 ± 38,72 <sup>f</sup>	624,89 ± 51,35 <sup>b</sup>	

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

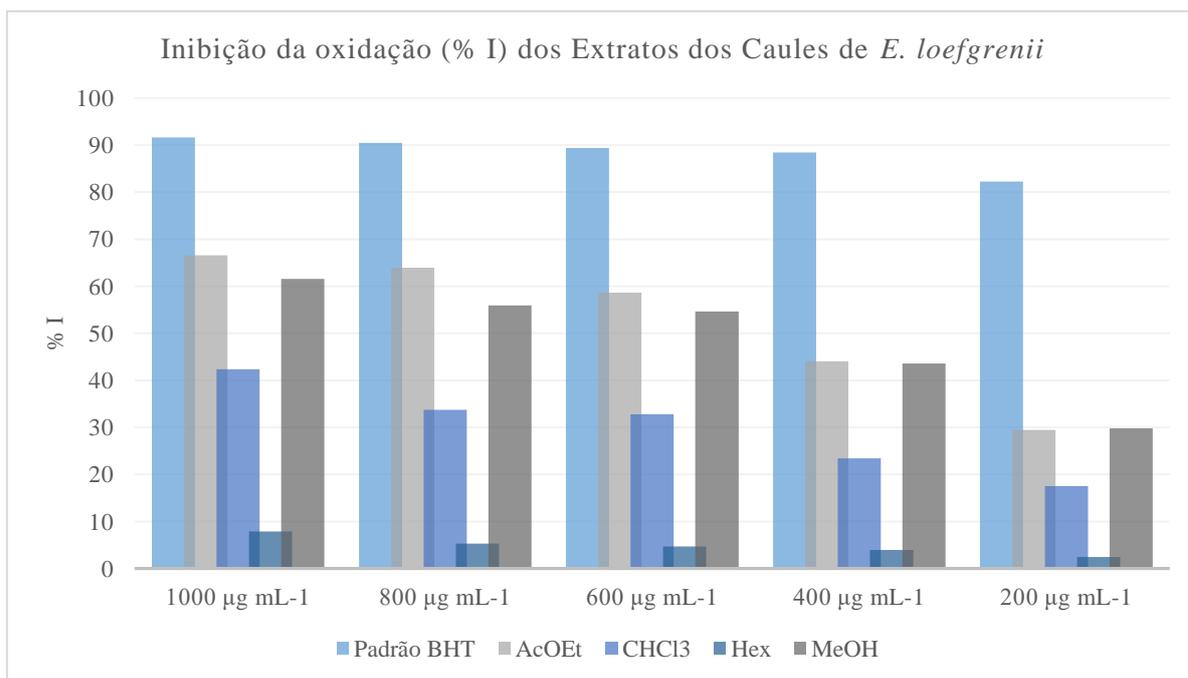
Observa-se a partir da **Tabela 8** (p. 34) que a maior AA foi representada pelo extrato ELFAcOEt das folhas de *E. loefgrenii*, com valor IC<sub>50</sub> de 275,85 ± 6,72 µg mL<sup>-1</sup>. Com exceção do extrato ELFMeOH, todos os extratos obtidos das folhas de *E. loefgrenii* apresentaram melhor IC<sub>50</sub> quando comparados aos respectivos extratos obtidos dos caules. Apesar de nenhum extrato apresentar AA próxima a apresentada pelo padrão BHT, os resultados obtidos para os

extratos AcOEt do caule e das folhas indicam que esses extratos podem ser uma fonte de metabólitos secundários com AA.

A atividade antioxidante dos extratos variou de 2,46% a 73,15% de inibição (**Figura 12**, p. 35 e **Figura 13**, p. 36). Os extratos Hex dos caules e das folhas apresentaram a menor AA em todas as concentrações testadas. Os extratos AcOEt dos caules e das folhas exibiram os maiores percentuais de inibição nas concentrações 400, 600, 800 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Em todos os extratos houve aumento da AA com o aumento da concentração dos extratos. A maior atividade do extrato ELFAcOEt das folhas de *E. loefgrenii* (73,15% na concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi menor que a AA do padrão BHT na menor concentração (82,27% na concentração de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ribeiro (2011) avaliou a AA dos extratos AcOEt,  $\text{CHCl}_3$  e Hex de *Erythroxylum rimosum* pelo sistema modelo  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e encontrou valores de atividade antioxidante que variaram de 22,76% a 36,33% de inibição. O maior percentual de inibição da oxidação também foi encontrado no extrato AcOEt nas concentrações testadas.



**Figura 12.** Percentual da inibição da oxidação (% I) dos extratos das folhas de *E. loefgrenii*.



**Figura 13.** Percentual da inibição da oxidação (% I) dos extratos das folhas de *E. loefgrenii*.

#### 4.5. Determinação da atividade antioxidante (AA) pelo método do DPPH

Os extratos AcOEt, CHCl<sub>3</sub>, Hex e MeOH dos caules e folhas de *E. loefgrenii* foram submetidos ao ensaio de AA pelo método de sequestro do radical estável 2,2-difenil,1-picril hidrazil (DPPH). A capacidade de sequestrar o radical DPPH exibida pelos extratos, expressa em percentual de atividade antioxidante (% AA), encontra-se na **Figura 15** (p. 38) e **Figura 14** (p. 38).

O radical estável DPPH reage com a substância antioxidante sendo convertido a 2,2-difenil,1-picril hidrazina. O grau de descoloração reflete a capacidade do extrato em sequestrar o radical livre. O valor de IC<sub>50</sub> é definido como a concentração da substância ou extrato requerido para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (DENG; CHENG; YANG, 2011). O baixo valor de IC<sub>50</sub> indica alta atividade antioxidante, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será o IC<sub>50</sub> e, conseqüentemente maior a sua AA (DENG; CHENG; YANG, 2011; SOUSA et al., 2007). Através do gráfico do percentual de sequestro de radicais livres *versus* concentração da amostra obtém-se a equação da reta e o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) por regressão linear para todos os extratos testados.

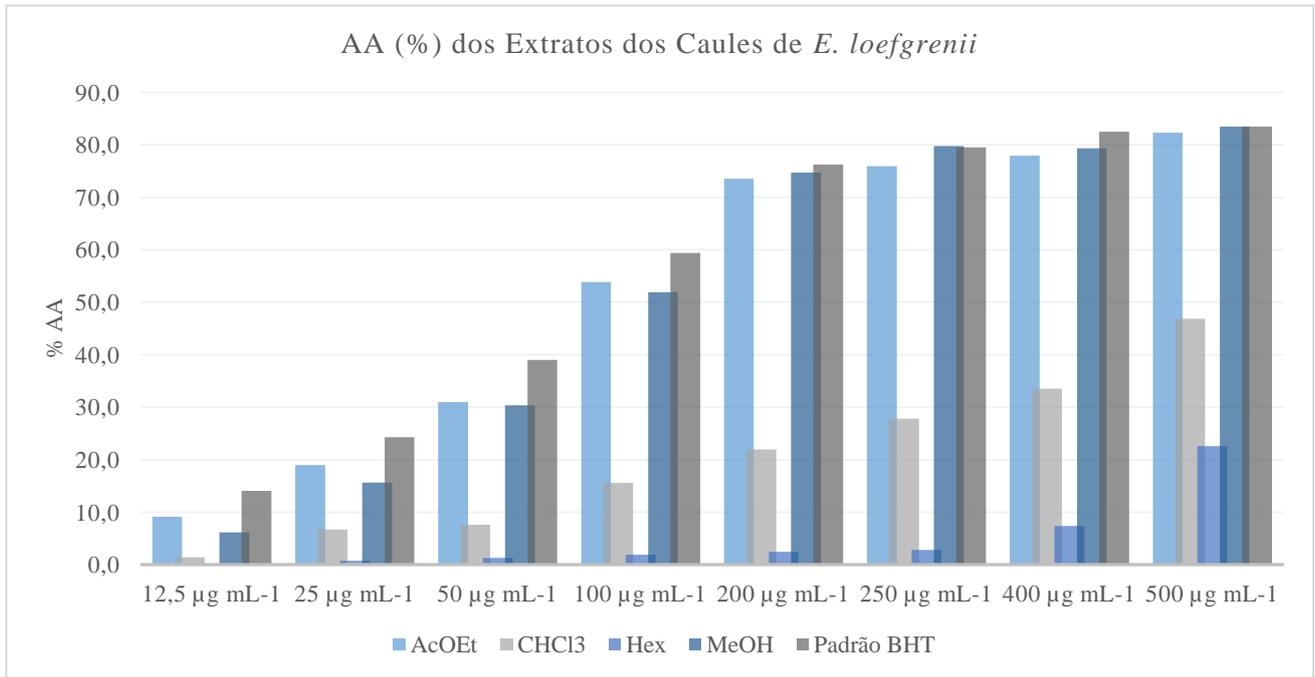
O IC<sub>50</sub> obtido a partir das equações da reta (**Tabela 9**, p. 37) mostra que os extratos AcOEt e MeOH das folhas e dos caules possuem alta AA, semelhante ao padrão BHT, e superior ao padrão de quercetina.

**Tabela 9.** Atividade Antioxidante dos extratos dos caules e folhas de *E. loefgrenii* pelo método do DPPH ( $p < 0,05$ ) ( $IC_{50}$ ).

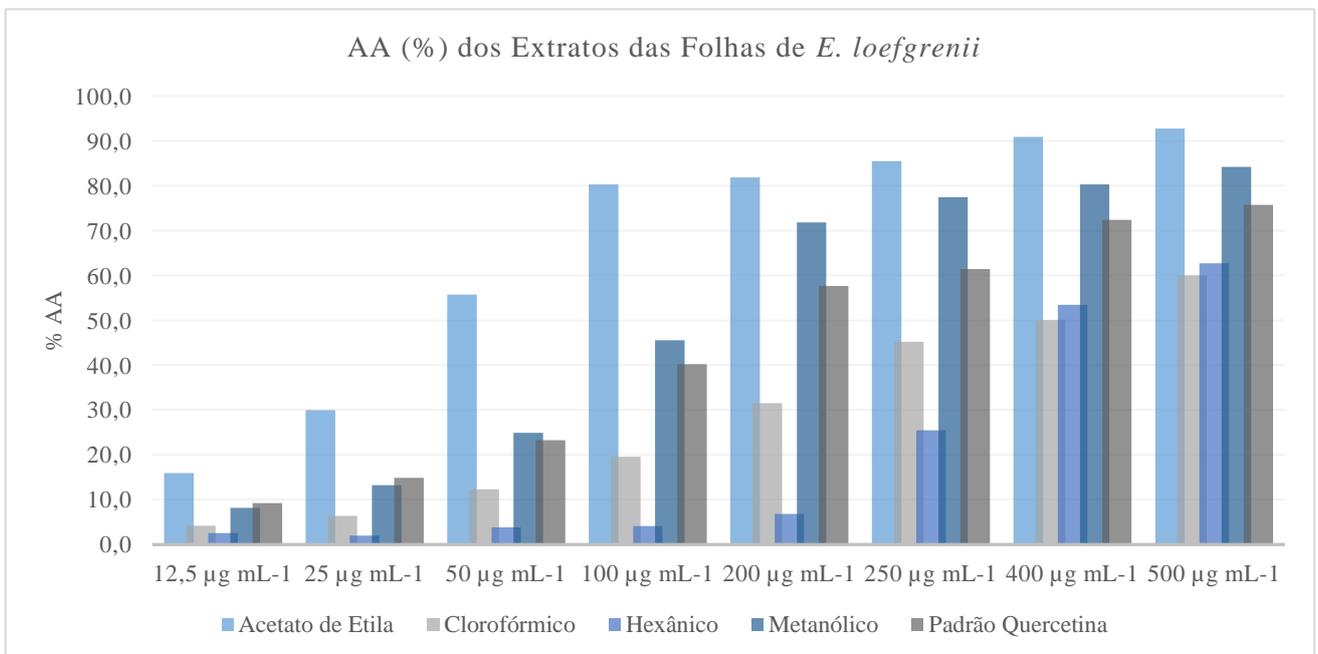
Extratos	$IC_{50} \pm DP$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
	Folhas	Caule
AcOEt	$53,16 \pm 0,54^a$	$115,42 \pm 0,92^a$
CHCl <sub>3</sub>	$321,78 \pm 9,39^b$	$600,12 \pm 33,50^c$
Hex	$1875,66 \pm 92,59^d$	$5443,02 \pm 75,66^e$
MeOH	$128,18 \pm 1,33^a$	$117,59 \pm 2,24^a$
Padrão BHT	$132,92 \pm 2,37^a$	
Padrão Quercetina	$214,60 \pm 1,27^f$	

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante. No entanto, os extratos AcOEt e MeOH dos caules e das folhas de *E. loefgrenii* foram os mais ativos, exibindo percentuais de sequestro de radicais livres comparáveis ao do padrão antioxidante BHT e Quercetina. Em todas as concentrações testadas o extrato ELFAcOEt das folhas apresentou AA (% AA) superior à dos padrões BHT e Quercetina e o menor  $IC_{50}$ , indicando que esse extrato pode ser uma fonte promissora de metabólitos com ação antioxidante. Os extratos Hex dos caules e das folhas foram os menos ativos em todas as concentrações testadas. Enquanto que, os extratos CHCl<sub>3</sub> dos caules e das folhas apresentaram um percentual de sequestro de radicais livre intermediário (**Figura 14**, p. 38 e **Figura 15**, p. 38). Estudos anteriores corroboram a alta AA das espécies do gênero *Erythroxylum*, especialmente nos extratos de maior polaridade. Oliveira et al. (2014) avaliou a capacidade antioxidante dos extratos EtOH e AcOEt de *E. suberosum*; o extrato EtOH apresentou o menor  $IC_{50}$  ( $180 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), enquanto o extrato AcOEt exibiu um  $IC_{50}$  de  $740 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ribeiro (2011) avaliou a capacidade antioxidante dos extratos AcOEt, CHCl<sub>3</sub> e Hex de *E. rimosum*. O extrato AcOEt apresentou o menor  $IC_{50}$  ( $21,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), enquanto os extratos CHCl<sub>3</sub> e Hex apresentaram  $IC_{50}$  igual  $140,11$  e  $286,82 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Rocha et al. (2015) avaliou a AA do extrato MeOH das folhas de *E. deciduum* e concluiu que esse extrato possui atividade antioxidante com  $IC_{50}$  de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Estes resultados evidenciam que os metabólitos presentes nesses extratos atuam como redutores do radical DPPH formando a hidrazina correspondente.



**Figura 14.** AA (%) dos extratos dos caules de *E. loefgrenii*.



**Figura 15.** AA (%) dos extratos das folhas de *E. loefgrenii*.

#### 4.6. Correlação entre a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos possuem reconhecida atividade antioxidante devido às suas propriedades redutoras e estrutura química (HOSSAIN; RAHMAN, 2011). Os ensaios de atividade antioxidante realizados mostraram que os extratos que apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos foram àqueles que tiveram maior atividade antioxidante frente ao radical DPPH e maior percentual inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno.

Nos extratos os compostos fenólicos estão presentes em mistura com outras substâncias e, a presença de compostos fenólicos em extratos não é o único fator responsável pela atividade antioxidante por estabilização de radicais. Devem ser considerados também aspectos sobre a estrutura dos compostos fenólicos, uma vez que alguns requisitos estruturais, como a posição e o número de hidroxilas presentes nas moléculas dos polifenóis, dentre outros, são essenciais para uma atividade antioxidante pronunciada (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Para avaliar se há correlação entre o teor de compostos fenólicos totais dos extratos e a AA determinada pelos métodos do DPPH e do  $\beta$ -caroteno determinou-se o coeficiente de correlação de Pearson (r) que mede o grau da correlação linear entre duas variáveis quantitativas. O coeficiente de correlação Pearson varia de -1 a 1 e, considera-se correlação significativa quando se verifica valor de r acima de 0,7 e  $p < 0,05$ . A concentração dos extratos utilizada na avaliação da correlação foram de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o método do DPPH e  $600 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o método do  $\beta$ -caroteno. Os resultados encontrados para a correlação entre os teores de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e do  $\beta$ -caroteno encontram-se na **Tabela 10** (p. 39) e na **Tabela 11** (p. 40), respectivamente.

**Tabela 10.** Correlação entre AA (%) pelo método do DPPH e a concentração de fenóis totais dos extratos de *E. loefgrenii*.

Correlação			
		Fenóis Totais	% AA
Fenóis Totais	Correlação de Pearson	1	0,950**
	Sig. (bilateral)		0,000
	N	8	8
% AA	Correlação de Pearson	0,950**	1
	Sig. (bilateral)	0,000	
	N	8	8

\*\* . A correlação é significativa no nível 0,01 (bilateral).

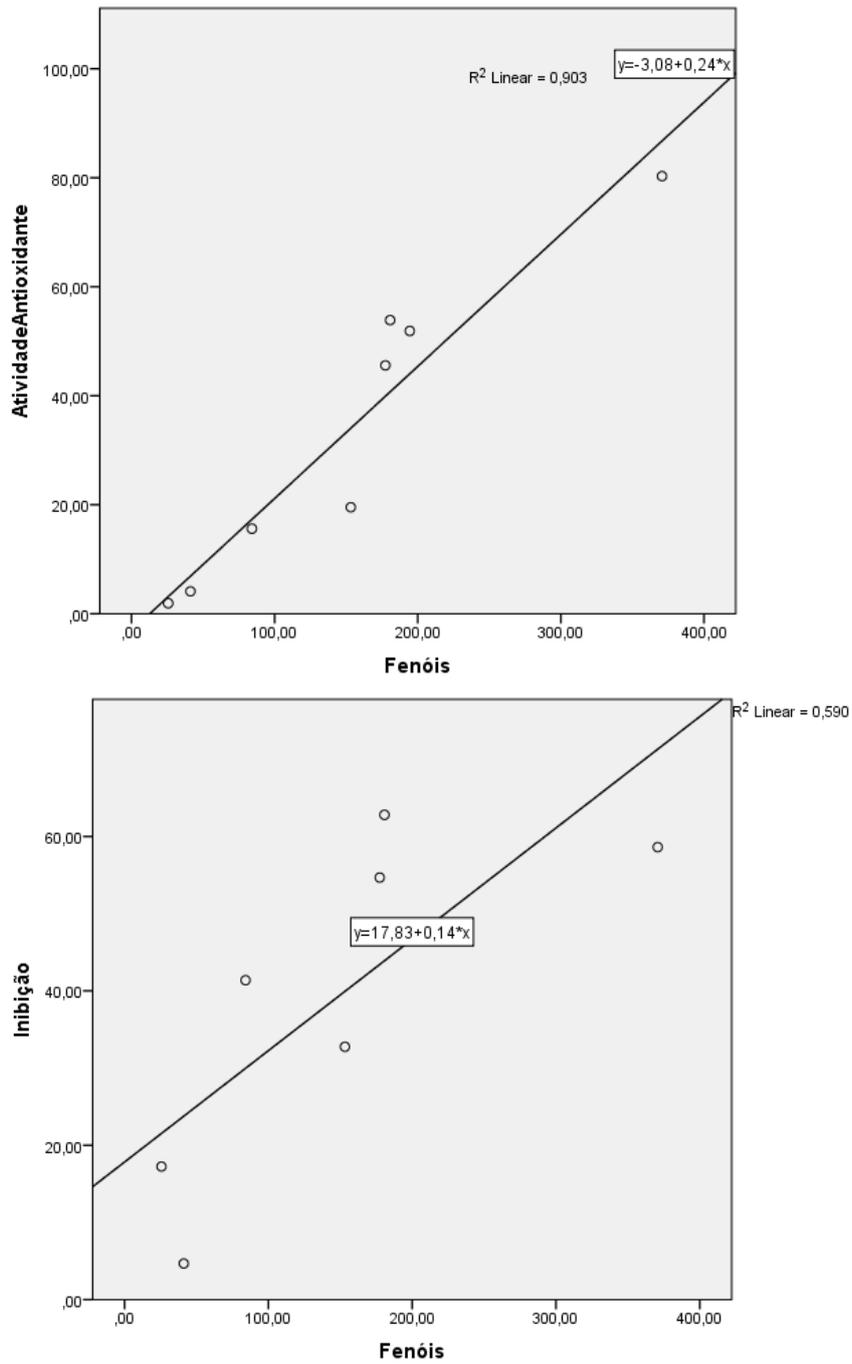
**Tabela 11.** Correlação entre o percentual de inibição (% I) pelo método do  $\beta$ -caroteno e a concentração de fenóis totais dos extratos de *E. loefgrenii*.

		Correlação	
		Fenóis Totais	% I
Fenóis Totais	Correlação de Pearson	1	0,768*
	Sig. (bilateral)		0,026
	N	8	8
% I	Correlação de Pearson	0,768*	1
	Sig. (bilateral)	0,026	
	N	8	8

\*. A correlação é significativa no nível 0,05 (bilateral).

Os resultados obtidos demonstram uma forte correlação entre o teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos do caule e das folhas de *E. loefgrenii* e a atividade antioxidante (%AA) pelo método do DPPH ( $r = 0,950$ ) e pelo método do  $\beta$ -caroteno ( $r = 0,768$ ), ambas com nível de significância menor que 0,05.

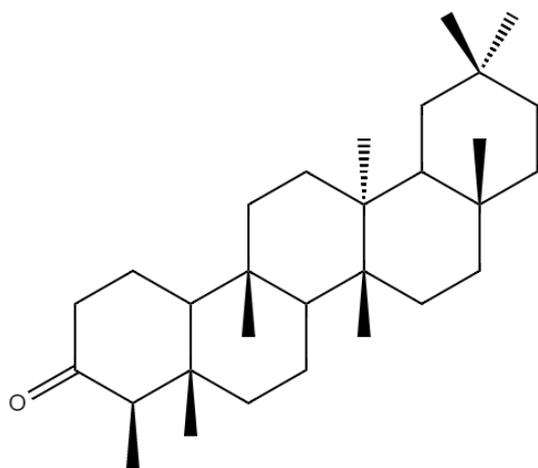
Neste estudo, foi observada alta correlação entre as variáveis teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante pelo método do DPPH, com coeficiente de correlação elevado e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) maior que 0,9. Para o método do  $\beta$ -caroteno, apesar do coeficiente de correlação maior que 0,7, o coeficiente de determinação foi igual a 0,590 (**Figura 16**, p. 41). Os resultados do estudo da correlação entre o teor de compostos fenólicos totais e os métodos de determinação da atividade antioxidante indicam que a atividade antioxidante encontrada para os extratos AcOEt e MeOH provavelmente está relacionada ao alto teor de compostos fenólicos presente nesses extratos.



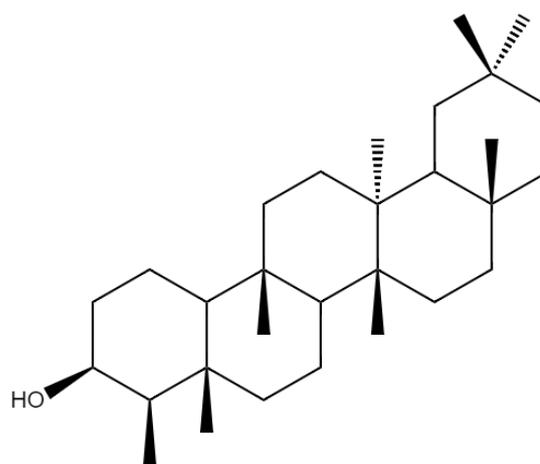
**Figura 16.** Correlação entre os teores de compostos fenólicos totais e as AA pelo (a) método do DPPH ( $r^2 = 0,903$ ) e pelo (b) método do  $\beta$ -caroteno ( $r^2 = 0,590$ ).

#### 4.7. Constituintes Químicos Isolados

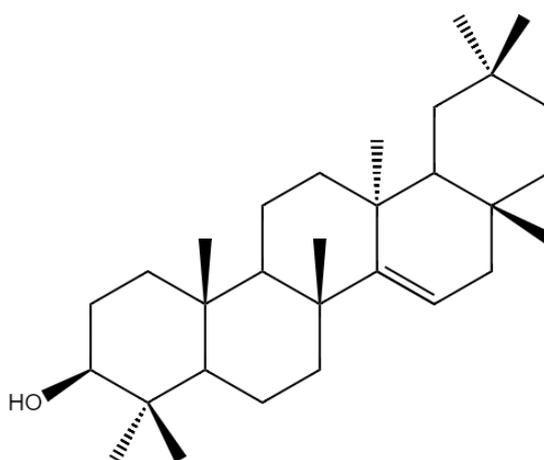
O estudo químico do caule de *E. loefgrenii*, através dos procedimentos descritos anteriormente, resultou no isolamento e identificação das seguintes substâncias.



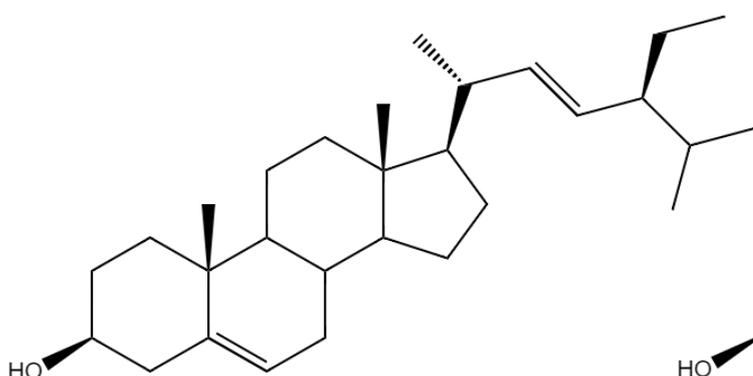
Friedelina (1)



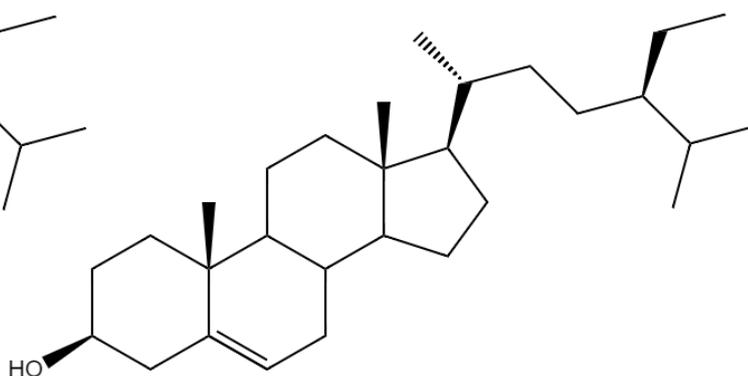
Friedelanol (2)



Taraxerol (3)

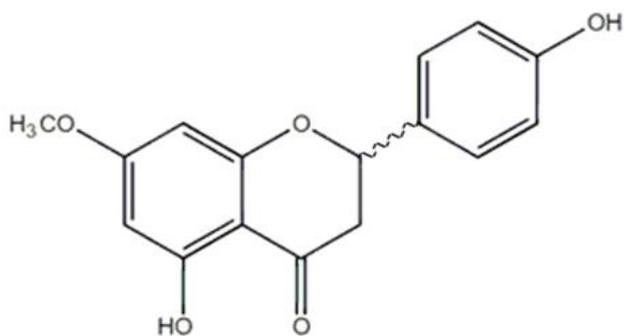


$\beta$ -Sitosterol (4)

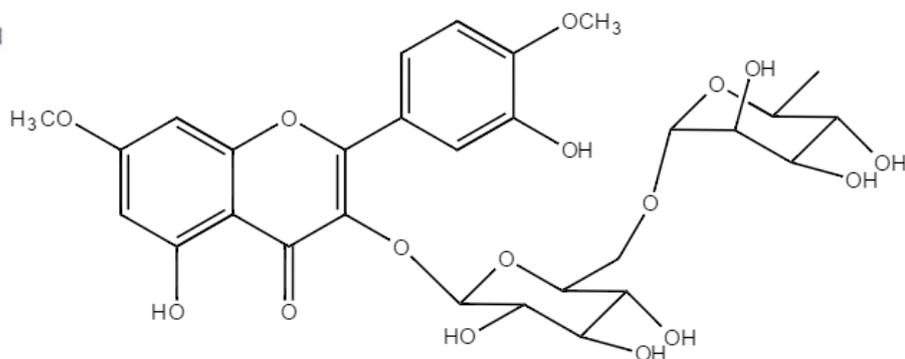


Stigmasterol (5)

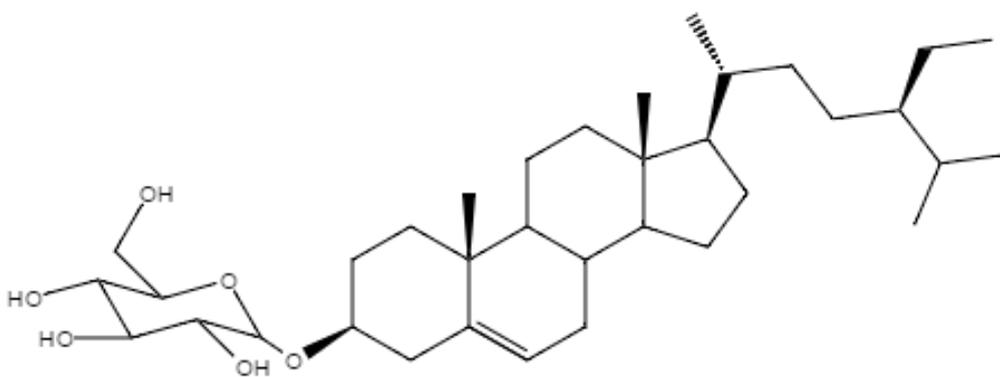
A partir das folhas de *E. loefgrenii*, através dos procedimentos descritos anteriormente, foram isoladas as seguintes substâncias:



Sakuranetina (6)



Ombuina-3-rutinosídeo (8)



β-Sitosterol glicosilado (7)

A determinação estrutural dos compostos foi efetuada a partir da análise dos dados obtidos dos métodos espectrométricos de RMN unidimensionais, <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, e bidimensionais como DEPT135, espectrometria de massas, pelo ponto de fusão e comparação dos dados obtidos com a literatura disponível.

## 4.8. Identificação Estrutural dos Constituintes Químicos Isolados do extrato CHCl<sub>3</sub> dos caules de *E. loefgrenii*

### 4.8.1. Identificação das Substâncias 1 e 2

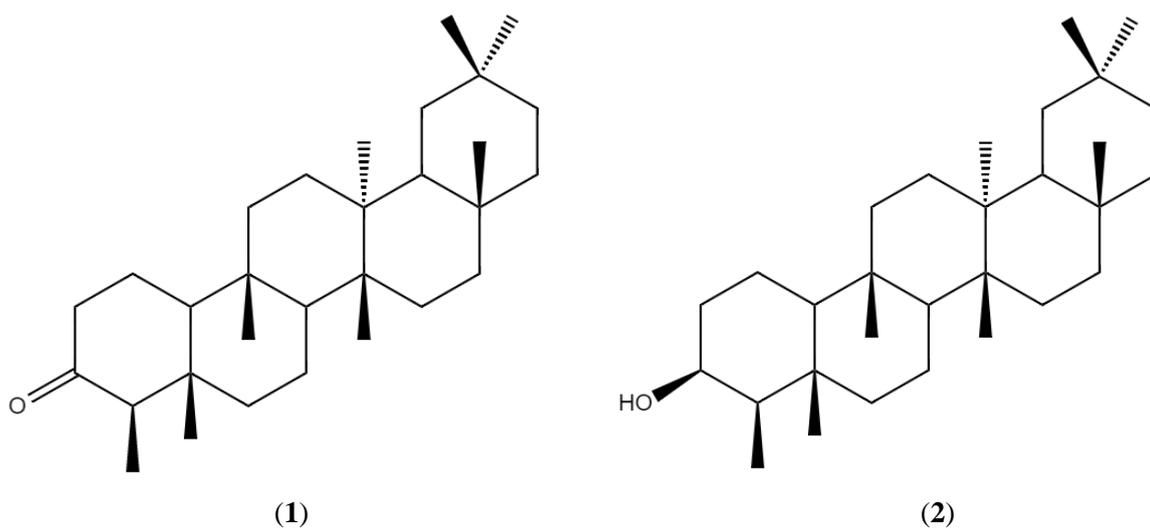
A mistura formada pelas Substâncias **1** e **2** na CCDC apresentou R<sub>f</sub> 0,6 e 0,45 usando Hex/AcOEt (8:2) e, reação positiva ao revelador de Liebermann-Burchard, sugerindo que se tratava de um triterpeno ou esteroide. A mistura se apresentou como cristais brancos com ponto de fusão entre 260,0 °C e 264,3 °C.

O espectro de <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) (**Figura 18**, p. 48) (**Tabela 12**, p. 46) apresentou singletos na região entre δ<sub>H</sub> 0,70 e 1,16: 0,70, 0,83, 0,84, 0,87, 0,90, 0,93, 0,94, 0,98, 1,03, 1,15, 1,16 correspondentes a hidrogênios em grupos metila (**Figura 19**, p. 49). O espectro apresentou ainda sinais referentes à presença de três hidrogênios α-carbônicos H-2 (2H) e H-4 (1H). Para a Substância **1** foram assinalados o sinal em δ<sub>H</sub> 2,37 (*ddd*, *J* = 13,78; 5,40 e 2,28 Hz, H-2 ax.) e os sinais entre δ<sub>H</sub> 2,18 e 2,33 ppm (*m*, H-4 ax. e H-2 eq.) (**Figura 21**, p. 51). Os sinais entre δ<sub>H</sub> 1,25 e 2,00 indicando a presença de hidrogênios metilênicos e metínicos foram assinalados para as duas Substâncias (**1** e **2**) (**Figura 20**, p. 50). O sinal em δ<sub>H</sub> 3,71 foi assinalado para a Substância **2** (*q*, *J* = 2,55 Hz, H-3), correspondendo ao hidrogênio carbinólico desblindado (**Figura 22**, p. 52).

O espectro de <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) (**Figura 23**, p. 53) (**Tabela 13**, p. 47) mostrou sinais importantes na identificação das substâncias presentes nessa mistura. Assim, foi possível observar 56 átomos de carbono na região entre δ<sub>C</sub> 7,0 e 214,0. O sinal em δ<sub>C</sub> 213,53 (C-3), referente à presença de carbono cetônico, e em δ<sub>C</sub> 7,04 (C-23), atribuído à um grupo metílico bastante protegido devido ao efeito γ-gauche da carbonila, estão relacionados ao esqueleto triterpênico da Substância **1**. Enquanto que, o sinal em δ<sub>C</sub> 72,97 foi atribuído ao carbono sp<sup>3</sup> oxigenado (C-3) relacionado ao esqueleto triterpênico da Substância **2** (**Figura 24**, p. 54 e **Figura 25**, p. 55). No espectro DEPT 135 (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) (**Figura 26**, p. 56) foram registrados 43 sinais, sendo vinte e dois primários ou terciários e 21 secundários, os treze sinais não registrados no DEPT 135 correspondem a carbonos quaternários. A análise dos espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN indica que a mistura é formada por dois triterpenos de fórmulas moleculares C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O e C<sub>30</sub>H<sub>52</sub>O.

A comparação dos dados espectrais obtidos com os dados encontrados na literatura permitiu identificar a mistura como sendo formada pelas Substâncias Friedelina (**1**) e

Friedelanol (2) (ALMEIDA et al, 2011; SALAZAR et al., 2000). Na literatura existe relato do isolamento da Friedelina a partir das cascas dos caules de *Erythroxylum barbatum* (SANTOS, 2007). Elias et al., (2016) detectaram a presença de Friedelina e Friedelanol em *Erythroxylum daphnites* por CG-MS.



**Figura 17.** Estruturas das Substâncias Friedelina (1) e Friedelanol (2).

**Tabela 12.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta_{\text{H}}$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) das Substâncias **1** e **2** e comparação com os dados da literatura.

H	Friedelina (ALMEIDA et al., 2011)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) da Substância <b>1</b>	3- $\beta$ -Friedelanol (ALMEIDA et al., 2011)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) da Substância <b>2</b>
2	2,39 ( <i>ddd</i> ; $J = 13,7$ ; 5,1 e 1,9 Hz; H-2a)	2,37 ( <i>ddd</i> , $J = 13,78$ ; 5,40 e 2,28 Hz, H-2a)	1,90 ( <i>dt</i> ; $J = 10,0$ e 2,3 Hz; H-2a)	
	2,29 ( <i>m</i> ; $J = 13,8$ ; 13,6 e 6,5 Hz; H-2b)	2,33 ( <i>m</i> , H-2 eq.)	1,56 ( <i>m</i> ; H-2b)	
3			3,73 ( <i>m</i> ; H-3)	3,71 ( <i>q</i> , $J = 2,55$ Hz, H-3)
4	2,24 ( <i>q</i> ; $J = 6,5$ Hz; H-4)	2,18 ( <i>m</i> , H-4 ax.)	0,94 ( <i>s</i> ; H-4)	0,9
Me-23	0,87 ( <i>d</i> ; $J = 6,5$ Hz; H-23)		0,93 ( <i>d</i> ; $J = 7,3$ Hz; H-23)	
Me-24	0,73 ( <i>s</i> ; H-24)	0,70 ( <i>s</i> ; H-24)	0,97 ( <i>s</i> ; H-24)	0,93 ( <i>s</i> ; H-24)
Me-25	0,88 ( <i>s</i> ; H-25)	0,87 ( <i>s</i> ; H-25)	0,86 ( <i>s</i> , H-25)	0,85 ( <i>s</i> , H-25)
Me- 26	1,01 ( <i>s</i> ; H-26)	0,98 ( <i>s</i> ; H-26)	0,99 ( <i>s</i> ; H-26)	0,94 ( <i>s</i> ; H-26)
Me- 27	1,05 ( <i>s</i> ; H-27)	1,03 ( <i>s</i> ; H-27)	1,01 ( <i>s</i> ; H-27)	0,98 ( <i>s</i> ; H-27)
Me- 28	1,18 ( <i>s</i> ; H-28)	1,16 ( <i>s</i> ; H-28)	1,17 ( <i>s</i> ; H-28)	1,15 ( <i>s</i> ; H-28)
Me- 29	1,00 ( <i>s</i> ; H-29)	0,97 ( <i>s</i> ; H-29)	0,95 ( <i>s</i> ; H-29)	0,93 ( <i>s</i> ; H-29)
Me- 30	0,95 ( <i>s</i> ; H-30)	0,92 ( <i>s</i> ; H-30)	1,00 ( <i>s</i> , H-30)	0,97 ( <i>s</i> , H-30)

**Tabela 13.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta_{\text{C}}$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) das Substâncias **1** e **2** e comparação com os dados da literatura.

C	Friedelanol (SALAZAR et al., 2000)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) da Substância <b>2</b>	Friedelina (MAHATO; KUNDU, 1994)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) da Substância <b>1</b>
1	16,16	16,00	22,3	22,49
2	36,14	36,28	41,5	41,74
3	71,59	72,97	213,2	213,53
4	49,62	49,37	58,2	58,44
5	38,09	38,04	42,1	42,37
6	41,99	41,92	41,3	41,49
7	17,69	17,76	18,2	17,76
8	53,27	53,40	53,1	53,31
9	37,18	37,65	37,4	37,31
10	61,65	61,55	59,4	59,68
11	35,66	35,76	35,6	35,55
12	30,69	30,84	30,5	30,72
13	38,38	38,57	39,7	39,88
14	39,69	39,91	38,3	38,51
15	32,34	32,99	32,4	32,53
16	35,9	35,83	36	36,22
17	30,02	29,58	30	30,21
18	42,88	42,99	42,7	42,99
19	35,36	35,38	35,3	35,38
20	28,17	28,39	28,1	28,39
21	32,88	33,01	32,7	32,63
22	39,28	39,49	39,2	39,46
23	12,09	11,83	6,8	7,04
24	16,58	16,60	14,6	14,87
25	18,35	18,16	17,9	18,16
26	20,13	20,47	20,2	20,33
27	18,69	18,88	18,6	18,45
28	32,12	32,29	32,1	32,29
29	35,02	35,24	35	35,24
30	31,85	31,99	31,7	31,99

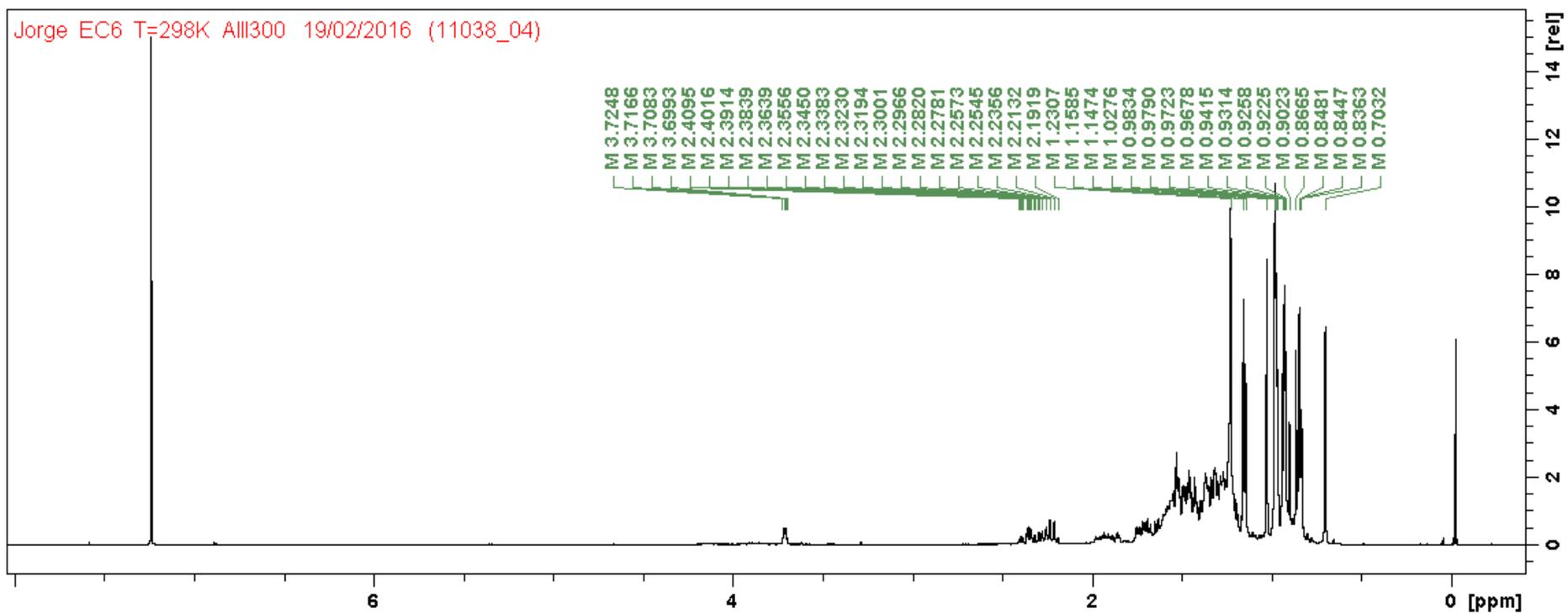
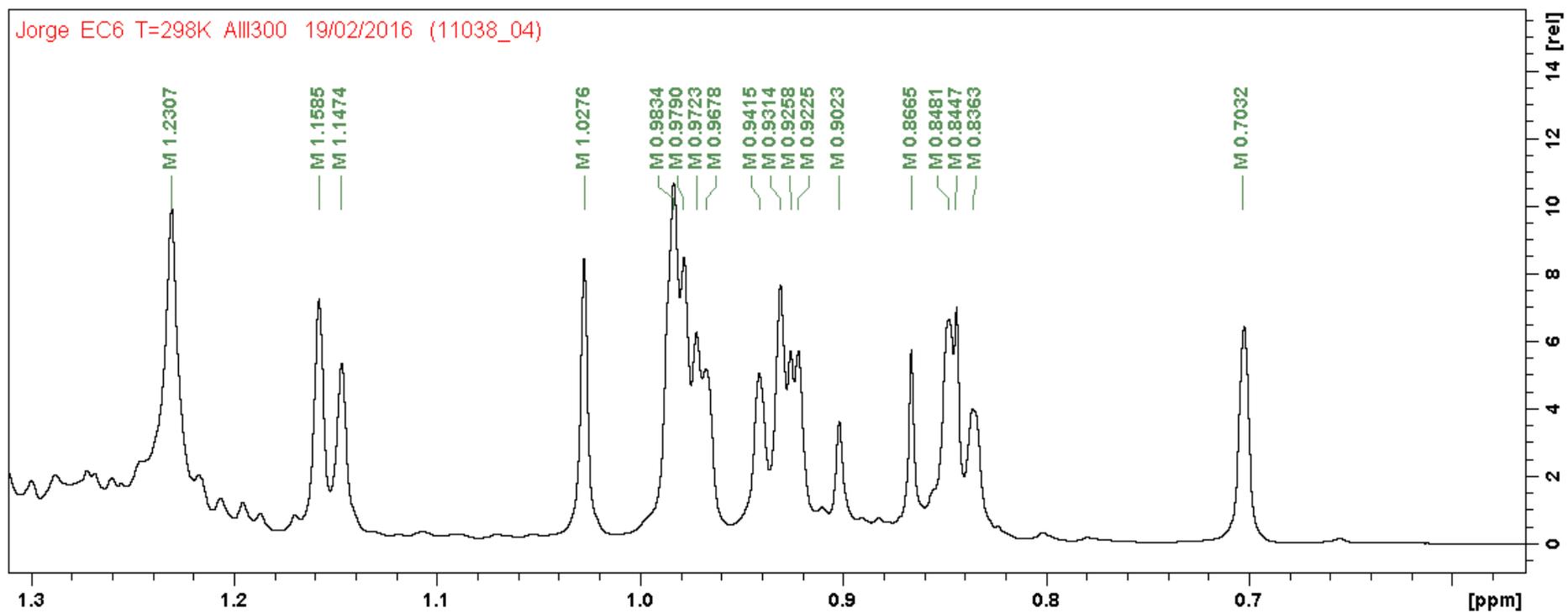
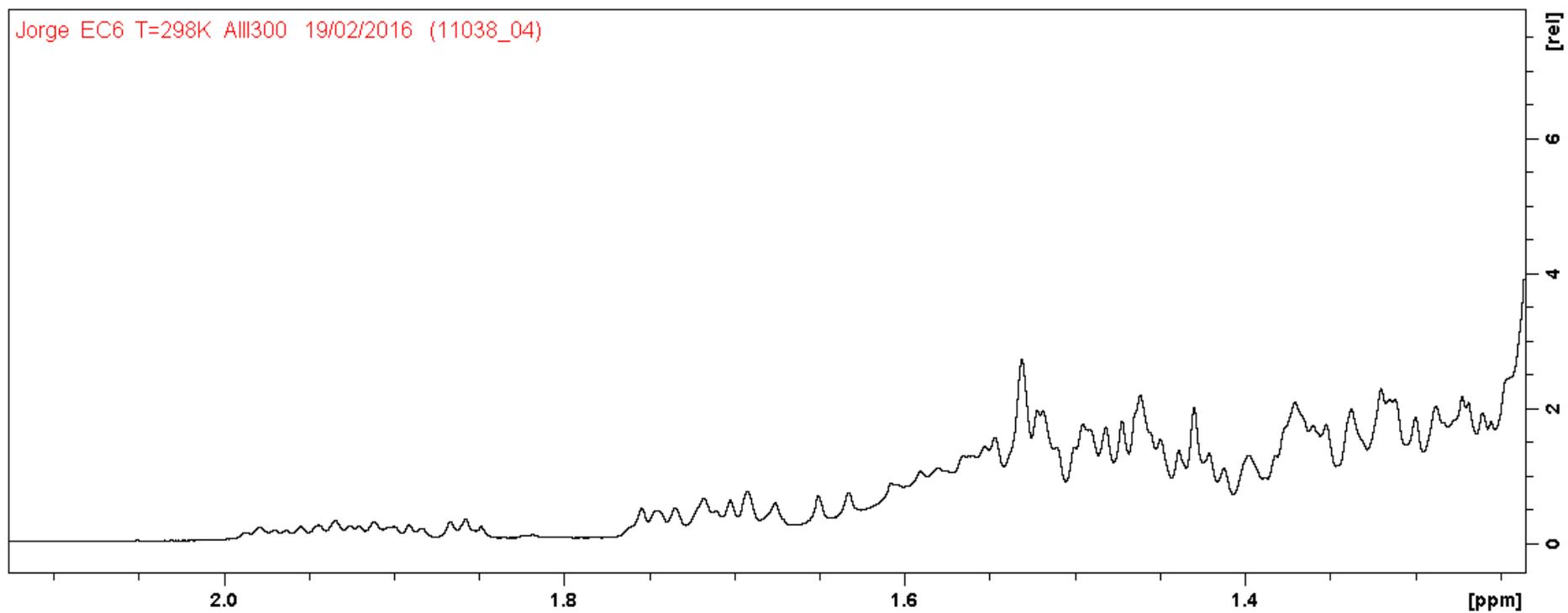


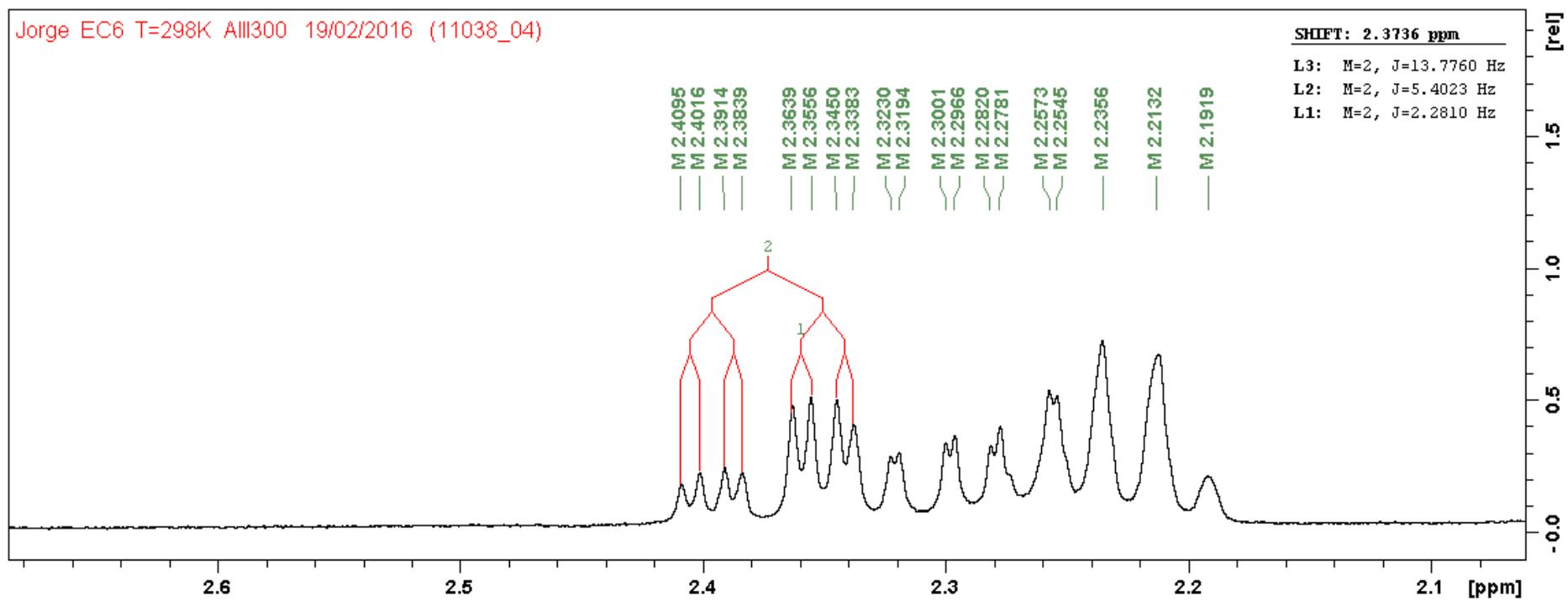
Figura 18. Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das Substâncias 1 e 2.



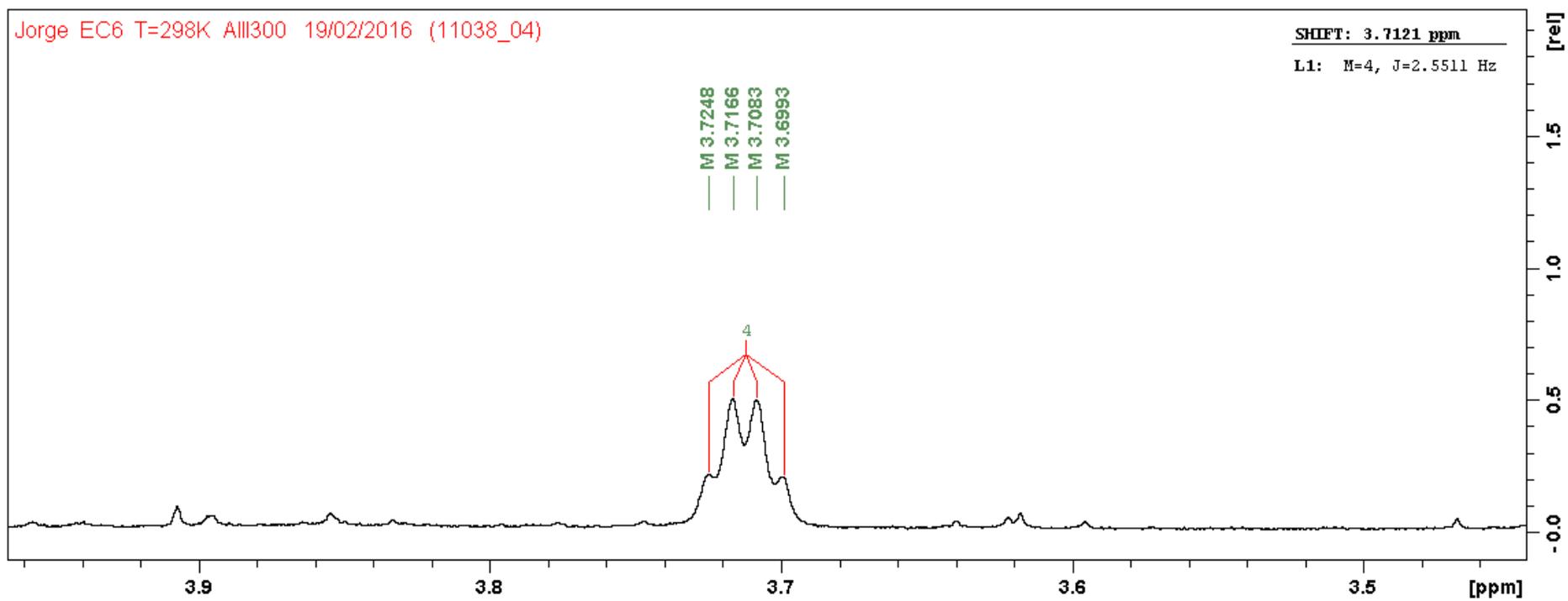
**Figura 19.** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das Substâncias **1** e **2**: expansão da região entre 0,6 e 1,3 ppm.



**Figura 20.** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das Substâncias **1** e **2**: expansão da região entre 1,3 e 2,1 ppm.



**Figura 21.** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das Substâncias **1** e **2**: expansão da região entre 2,1 e 2,65 ppm.



**Figura 22.** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das Substâncias **1** e **2**: expansão da região entre 3,46 e 3,96 ppm.

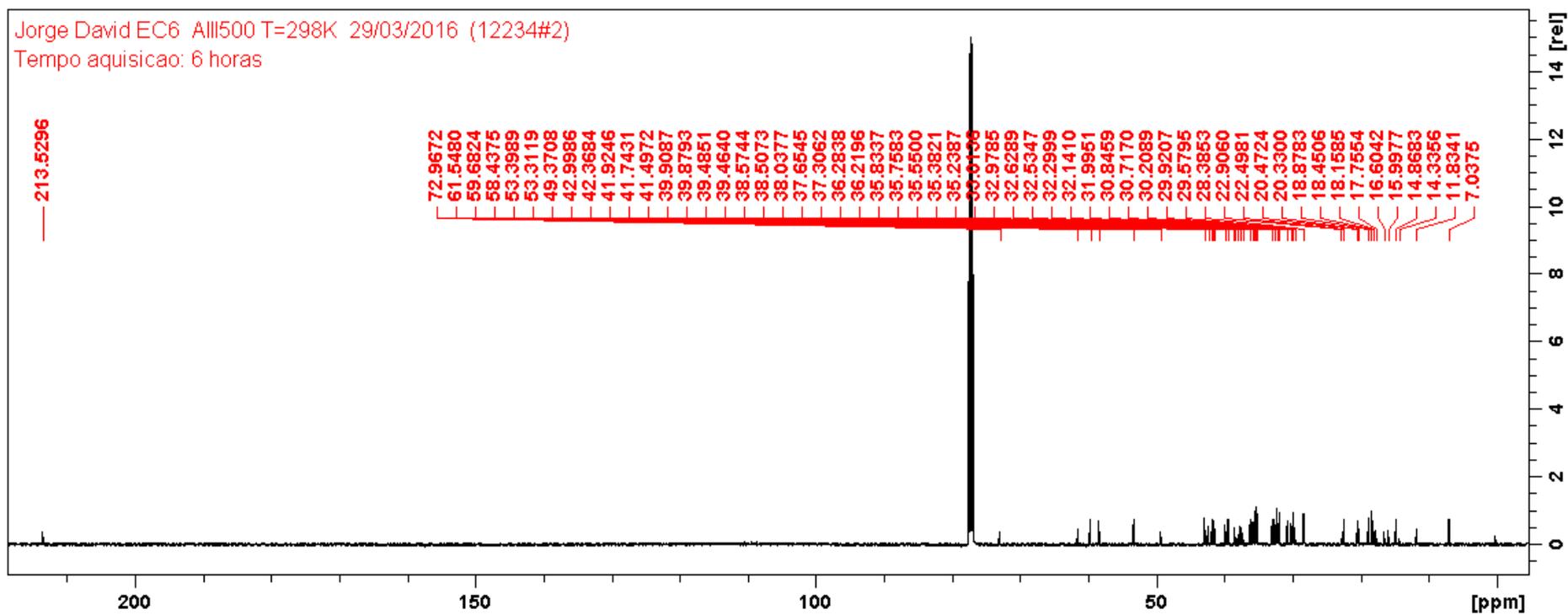


Figura 23. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das Substâncias 1 e 2.

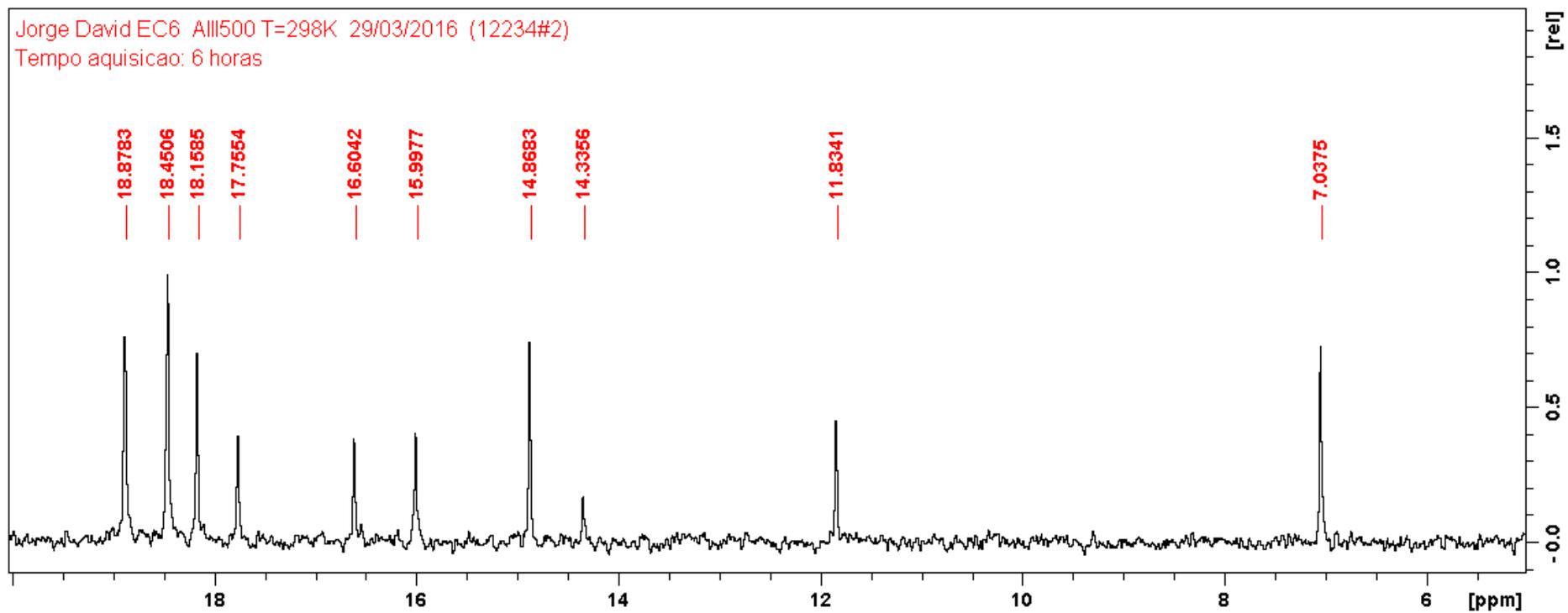
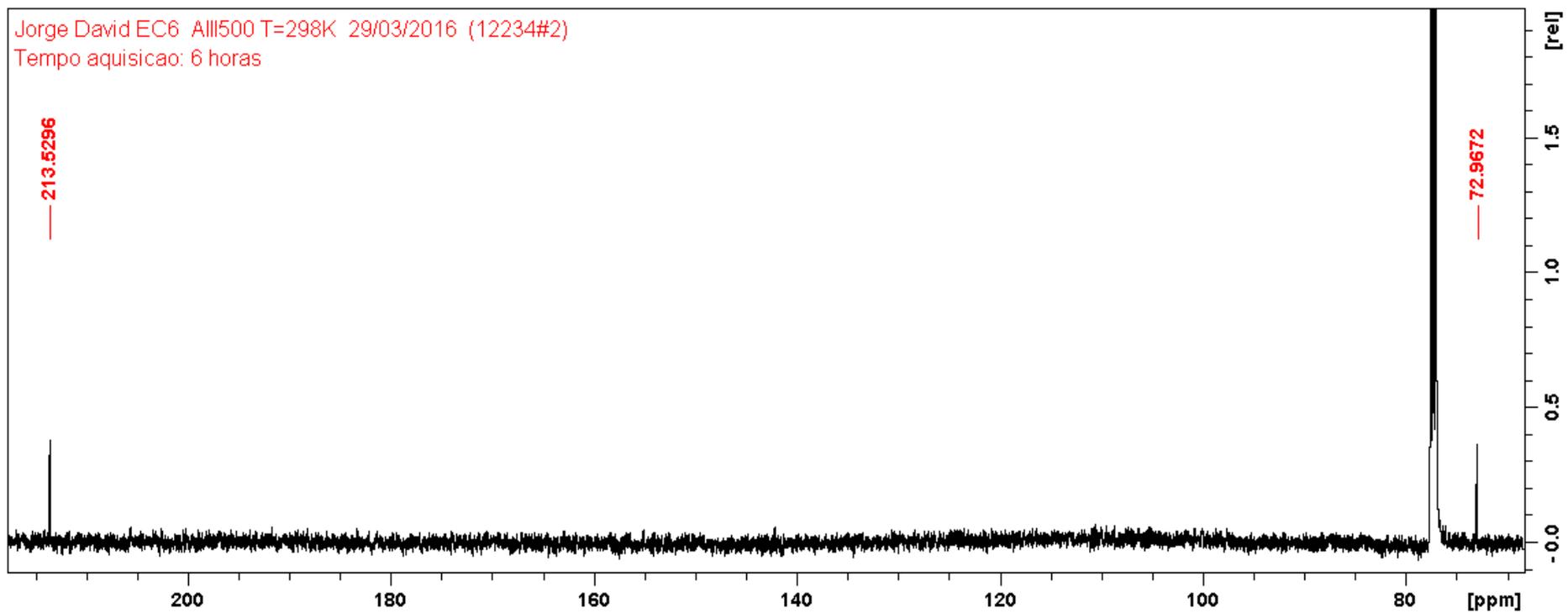


Figura 24. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das Substâncias **1** e **2**: expansão da região entre 5,15 e 19,88 ppm.



**Figura 25.** Espectro RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) das Substâncias **1** e **2**: expansão da região entre 69 e 216 ppm.

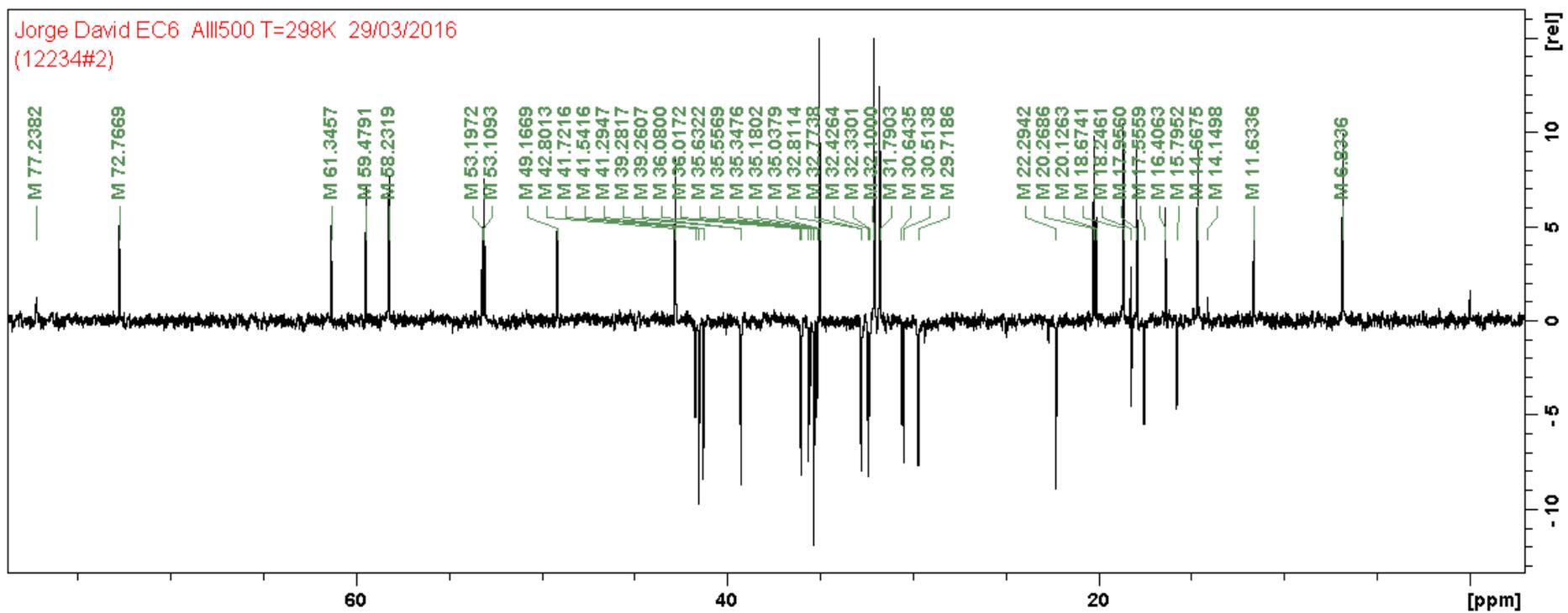


Figura 26. Espectro RMN de DEPT 135 (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das Substâncias 1 e 2.

#### 4.8.2. Identificação da Substância 3

A Substância **3** foi isolada do extrato  $\text{CHCl}_3$  dos caules de *E. loefgrenii* e, na CCDC usando Hex/AcOEt (8:2) apresentou reação positiva ao revelador de Liebermann-Burchard (Rf 0,4), sugerindo que se tratava de um triterpeno ou esteroide. O ponto de fusão medido para a Substância **3** foi 283,2 °C – 284,5 °C.

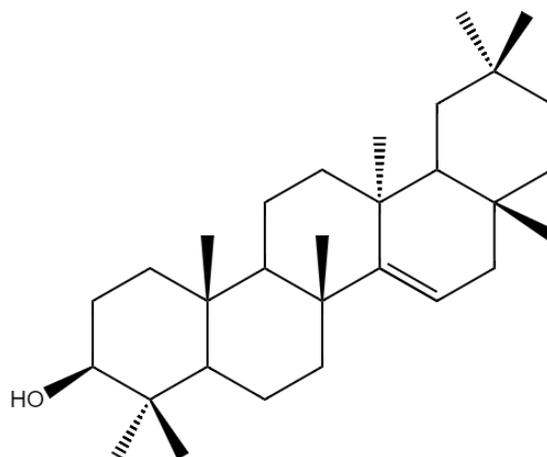
O espectro de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) (**Figura 28**, p. 61) da Substância **3** apresentou oito sinais em  $\delta_{\text{H}}$  0,78, 0,80, 0,89, 0,89, 0,91, 0,93, 0,96 e 1,07 (s) (**Figura 29**, p. 62) atribuídos a oito grupos metilas ligados a carbonos quaternários. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  5,51 (*dd*,  $J = 8,17$  e  $3,31$  Hz, 1H, H-15) sugere a presença de um hidrogênio olefínico relacionado à dupla ligação endocíclica na estrutura (**Figura 31**, p. 64). O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,17 (*dd*,  $J = 10,64$  e  $4,94$  Hz, 1H, H-3) sugere a presença de um hidrogênio carbinólico (**Figura 30**, p. 63). Observa-se ainda no espectro, os sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  1,19 a 2,10, que foram atribuídos aos grupos metilênicos e metínicos da Substância **3**.

No espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da Substância **3** (**Figura 32**, p. 65) observaram-se trinta sinais de carbono, caracterizando um esqueleto triterpênico. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  158,1 (C-14) e 117,0 (C-15), foram atribuídos aos carbonos olefínicos, confirmando a presença de uma dupla ligação endocíclica, e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  79,2 ppm (C-3) foi atribuído ao carbono  $\text{sp}^3$  oxigenado (**Figura 33**, p. 66), as constantes de acoplamento de H-3 com os Hidrogênios vicinais de H-2 (2H) ( $J = 10,64$  e  $4,94$  Hz), sugerem que a hidroxila encontra-se numa orientação  $\beta$  em C-3.

O espectro DEPT 135 ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) (**Figura 34**, p. 67) apresentou vinte e três sinais de carbonos, sendo treze carbonos primários ou terciários (amplitude positiva) e dez secundários (amplitude negativa) concluindo-se que existem sete carbonos quaternários na estrutura. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 levou à uma estrutura de fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ .

Os deslocamentos químicos dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  presentes da Substância **3** e a comparação destes com os dados da literatura, podem ser visualizados na **Tabela 14** (p. 59) e na **Tabela 15** (p. 60). Com base nestes dados e registros na literatura foi possível identificar a Substância **3** como o triterpeno oleanano pentacíclico conhecido como  $3\beta$ -Taraxerol com índice de deficiência de hidrogênio igual a 6 devido aos cinco anéis e a dupla ligação. Barreiros et al. (2000) relata o isolamento de um derivado do taraxerol esterificado a um ácido graxo na

posição C-3 a partir das folhas de *Erythroxylum passerimun*, no entanto, esse é o primeiro relato do isolamento do triterpeno Taraxerol na forma livre no gênero *Erythroxylum*.



**Figura 27.** Estrutura da Substância Taraxerol.

**Tabela 14.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta_{\text{H}}$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) da Substância **3** e comparação com os dados da literatura.

$^1\text{H}$	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) da Substância <b>3</b>	$3\beta$ -Taraxerol (ANJUM, 2011)
H-3	3,17 ( <i>dd</i> , $J = 10,64, 4,94$ Hz, 1H)	3,17 ( <i>dd</i> , $J = 10,5, 3,5$ Hz, 1H)
H-15	5,51 ( <i>dd</i> , $J = 8,17$ e $3,31$ Hz, 1H)	5,52 ( <i>dd</i> , $J = 8,0, 3,5$ Hz, 1H)
CH <sub>3</sub> -23	0,89 ( <i>s</i> , 3H)	0.89 ( <i>s</i> , 3H)
CH <sub>3</sub> -24	0,89 ( <i>s</i> , 3H)	0.89 ( <i>s</i> , 3H)
CH <sub>3</sub> -25	0,96 ( <i>s</i> , 3H)	0.96 ( <i>s</i> , 3H)
CH <sub>3</sub> -26	1,07 ( <i>s</i> , 3H)	1.07 ( <i>s</i> , 3H)
CH <sub>3</sub> -27	0,80 ( <i>s</i> , 3H)	0.80 ( <i>s</i> , 3H)
CH <sub>3</sub> -28	0,78 ( <i>s</i> , 3H)	0.78 ( <i>s</i> , 3H)
CH <sub>3</sub> -29	0,91 ( <i>s</i> , 3H)	0.91 ( <i>s</i> , 3H)
CH <sub>3</sub> -30	0,93 ( <i>s</i> , 3H)	0.93 ( <i>s</i> , 3H)

**Tabela 15.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta_{\text{H}}$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da Substância **3** e comparação com os dados da literatura.

$^{13}\text{C}$	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) da Substância <b>3</b>	$3\beta$ -Taraxerol (OLADOYE et al., 2015)
1	37,94	37,7
2	27,34	27,2
3	79,29	79,1
4	39,19	39
5	55,73	55,5
6	19,01	18,8
7	35,34	35,1
8	38,97	38,8
9	48,94	48,8
10	36,02	35,8
11	17,72	17,5
12	37,92	37,7
13	37,77	37,6
14	158,30	158,1
15	117,08	116,9
16	36,88	36,7
17	38,20	38
18	49,49	49,3
19	41,53	41,3
20	29,02	28,8
21	33,91	33,7
22	33,32	33,1
23	28,22	28
24	15,67	15,44
25	15,64	15,4
26	30,13	29,9
27	26,14	25,9
28	30,03	29,8
29	33,57	33,1
30	21,53	21,3

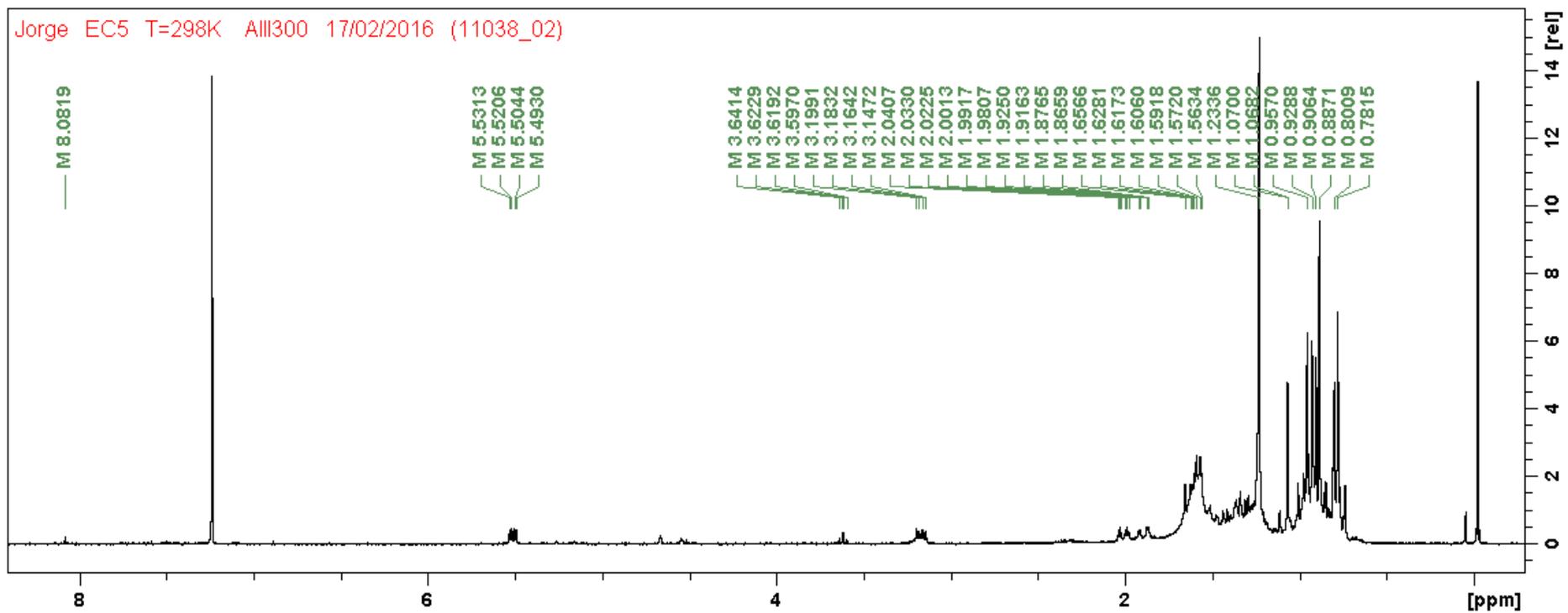
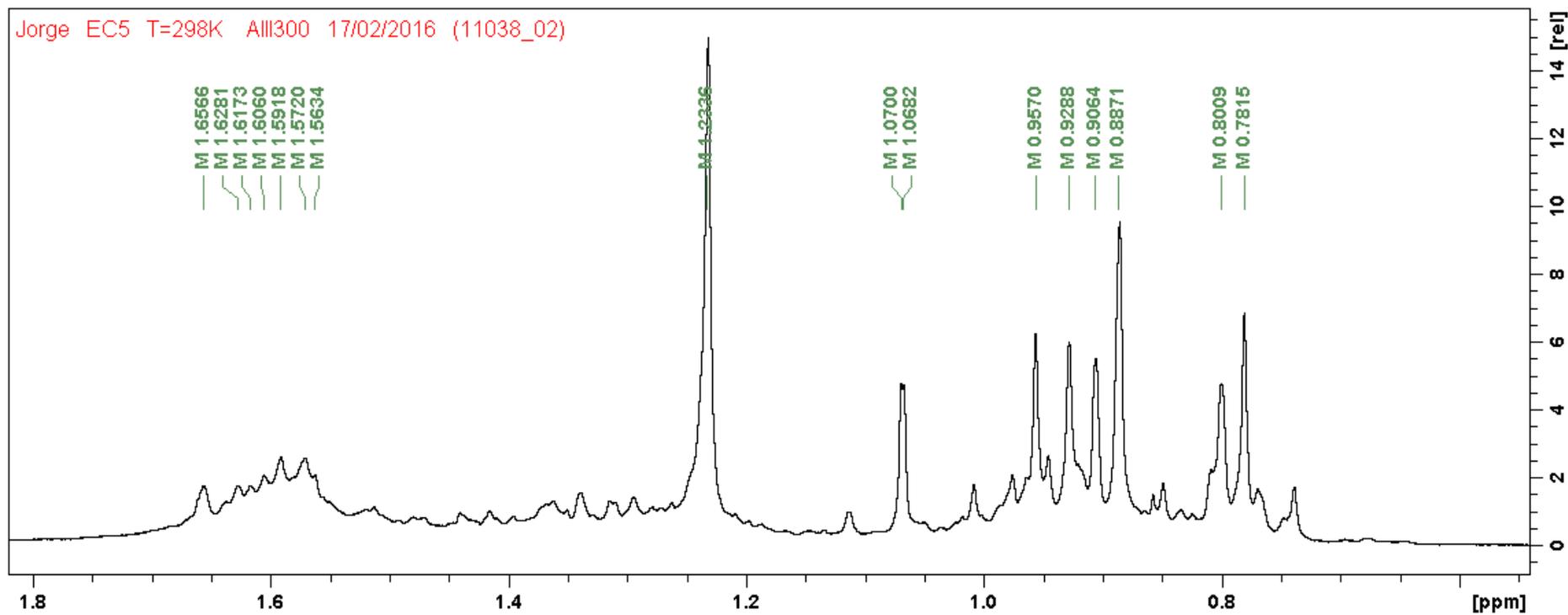
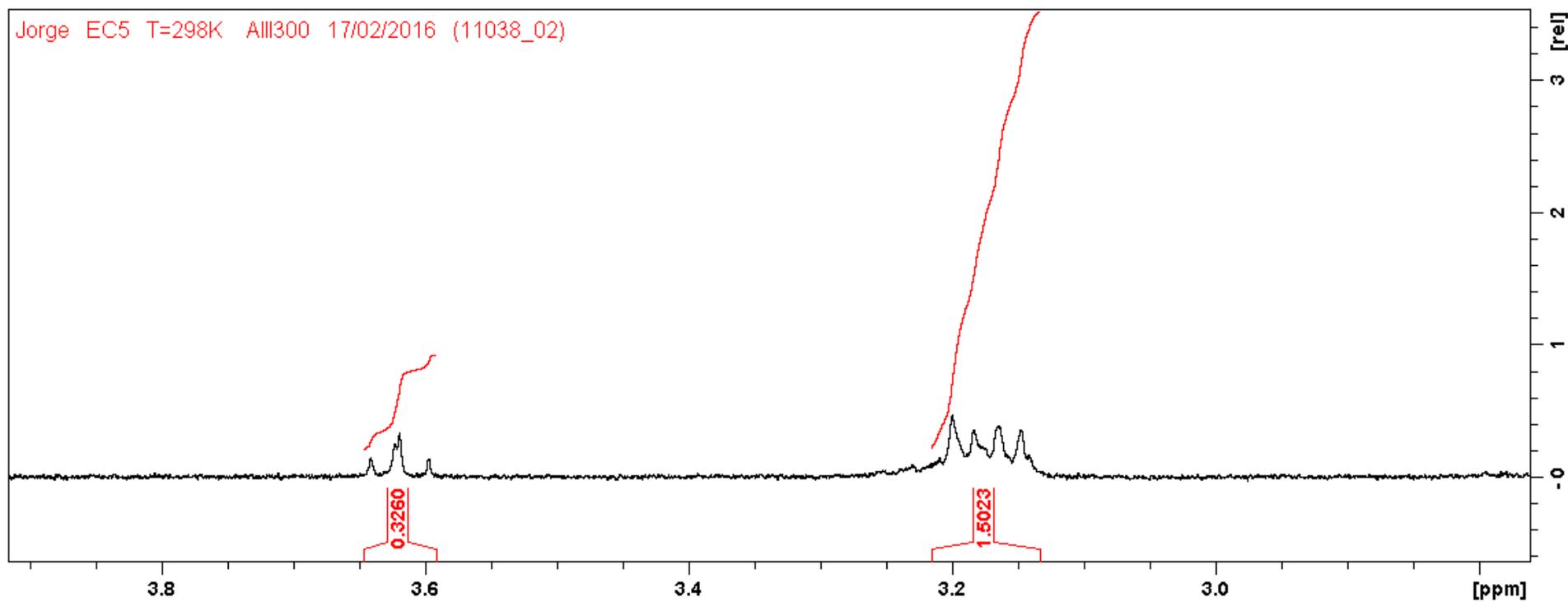


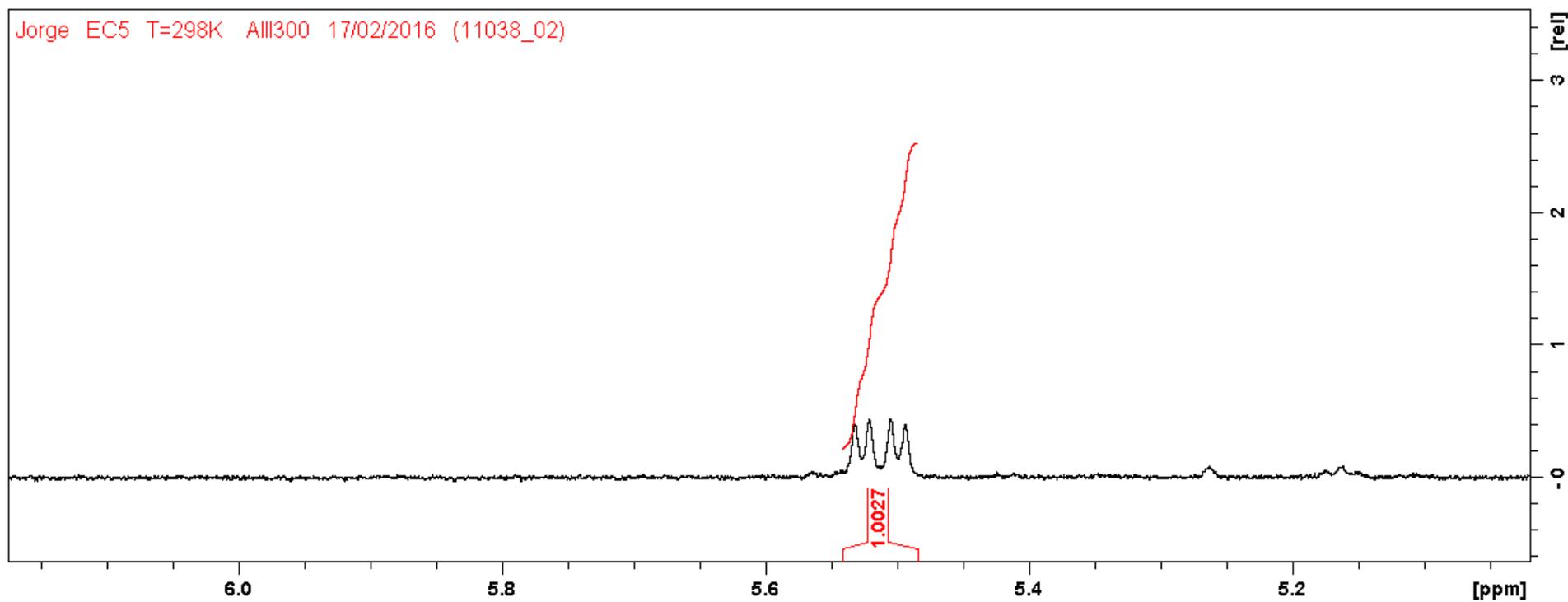
Figura 28. Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 3.



**Figura 29.** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 3: expansão da região entre 0,7 e 1,8 ppm.



**Figura 30.** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância **3**: expansão da região entre 2,9 e 3,9 ppm.



**Figura 31.** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância **3**: expansão da região entre 5,15 e 6,1 ppm.

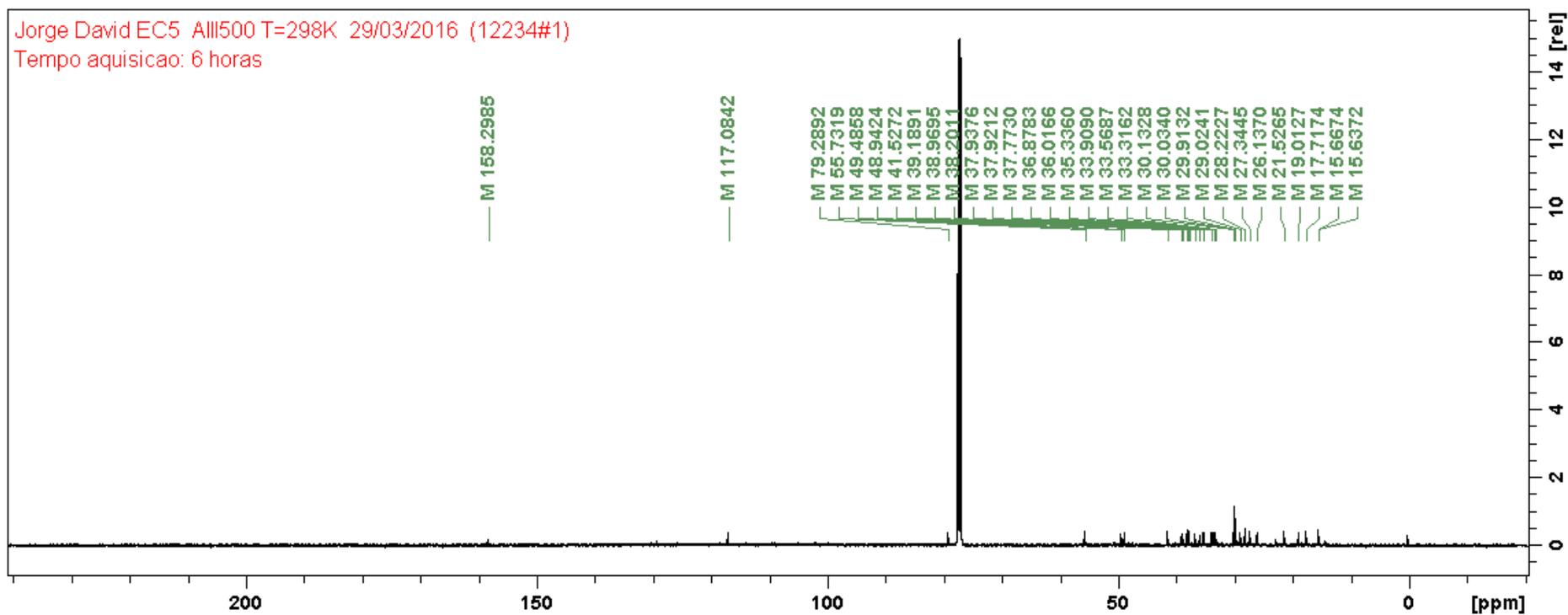
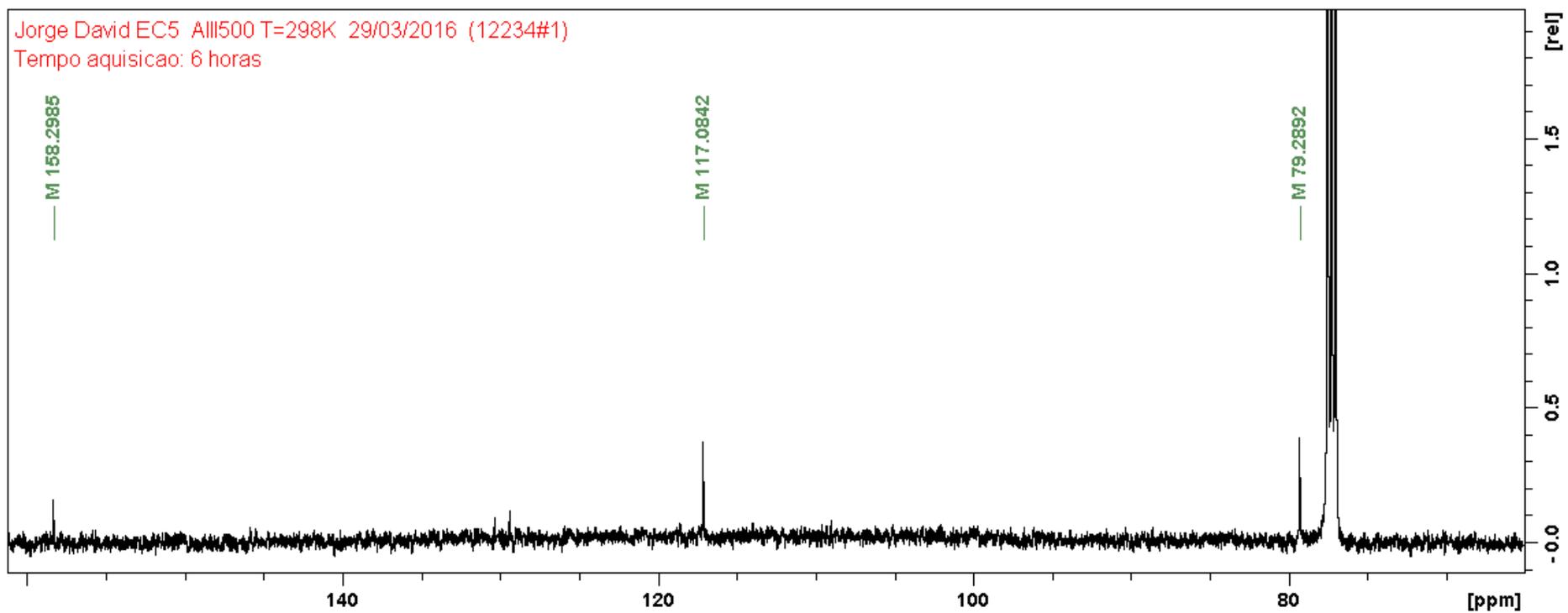
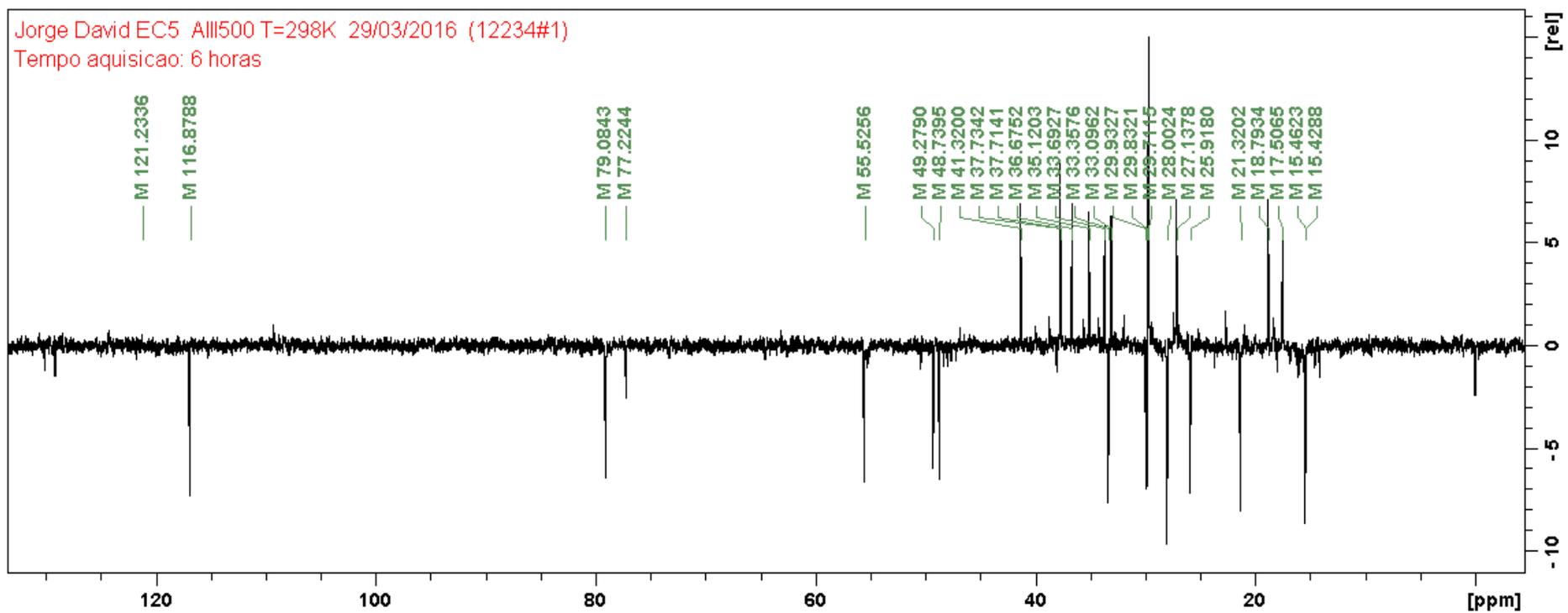


Figura 32. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 3.



**Figura 33.** Espectro RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da Substância 3: expansão da região entre 70 e 160 ppm.



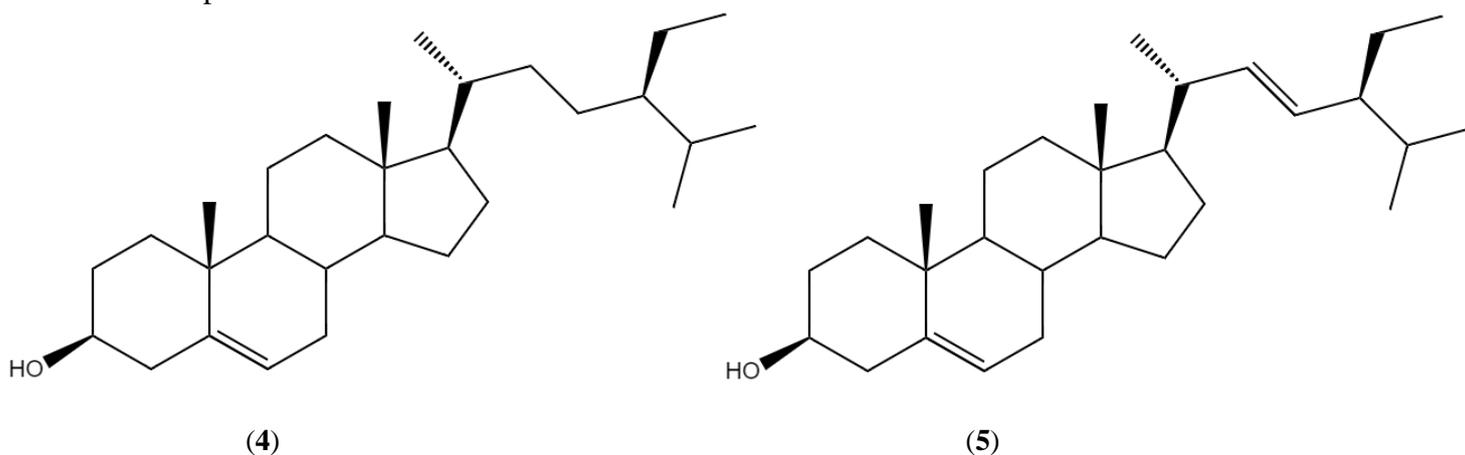
**Figura 34.** Espectro RMN de DEPT 135 (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 3.

### 4.8.3. Identificação das Substâncias 4 e 5

A mistura formada pelas substâncias **4** e **5** foi isolada do extrato  $\text{CHCl}_3$  dos caules de *E. loefgrenii*. Essa mistura, na CCDC usando Hex/AcOEt (8:2), apresentou reação positiva ao revelador de Liebermann-Burchard ( $R_f$  0,19). A mistura se apresentou como um sólido transparente com ponto de fusão na faixa de 137,2 – 141,5 °C.

O espectro de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) apresentou singletos em  $\delta_{\text{H}}$  0,66, 0,68, 0,78, 0,80, 0,83, 0,89, 0,91 e 0,99 atribuídos aos grupos metílicos das substâncias presentes na mistura. Entre 1,38 ppm e 2,35 ppm foram observados multipletos, atribuídos aos hidrogênios dos grupos metílicos e metilênicos da molécula.

A mistura de **4** e **5** foi evidenciada no espectro de RMN  $^1\text{H}$  pelo multipeto em  $\delta_{\text{H}}$  3,50 (H-3) que pode ser atribuído ao átomo de hidrogênio ligado ao carbono carbinólico (hidrogênio oximetínico) e pelo sinal em  $\delta_{\text{H}}$  5,33 (*d*,  $J = 5,32$  Hz, H-6) referente aos hidrogênios olefínicos característico de fitoesteróis com dupla ligação entre os carbonos 5 e 6, aliados a presença dos sinais adicionais em  $\delta_{\text{H}}$  4,99 (*dd*,  $J = 8,45$  e 15,38 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  5,13 (*dd*,  $J = 8,45$  e 15,17 Hz) correspondentes aos hidrogênios olefínicos H-22 e H-23, respectivamente, da cadeia lateral de fitoesteróis. A análise dos dados de  $^1\text{H}$  RMN e a comparação com dados da literatura (AHMED et al., 2013) indicam que essa mistura é formada por compostos de fórmulas moleculares  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$  e  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$  referentes aos fitoesteróis  $\beta$ -Sitosterol (**4**) e Estigmasterol (**5**), respectivamente.



**Figura 35.** Estruturas das Substâncias  $\beta$ -Sitosterol (**4**) e Estigmasterol (**5**).

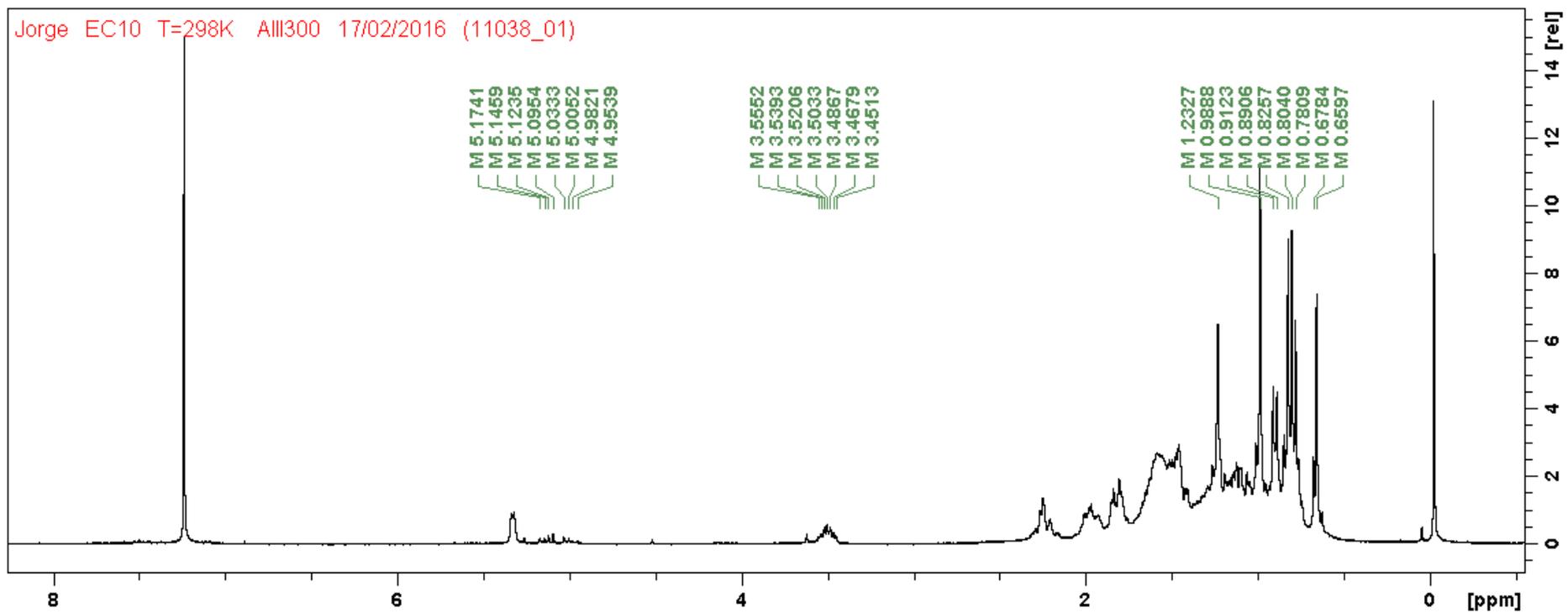


Figura 36. Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das Substâncias 4 e 5.

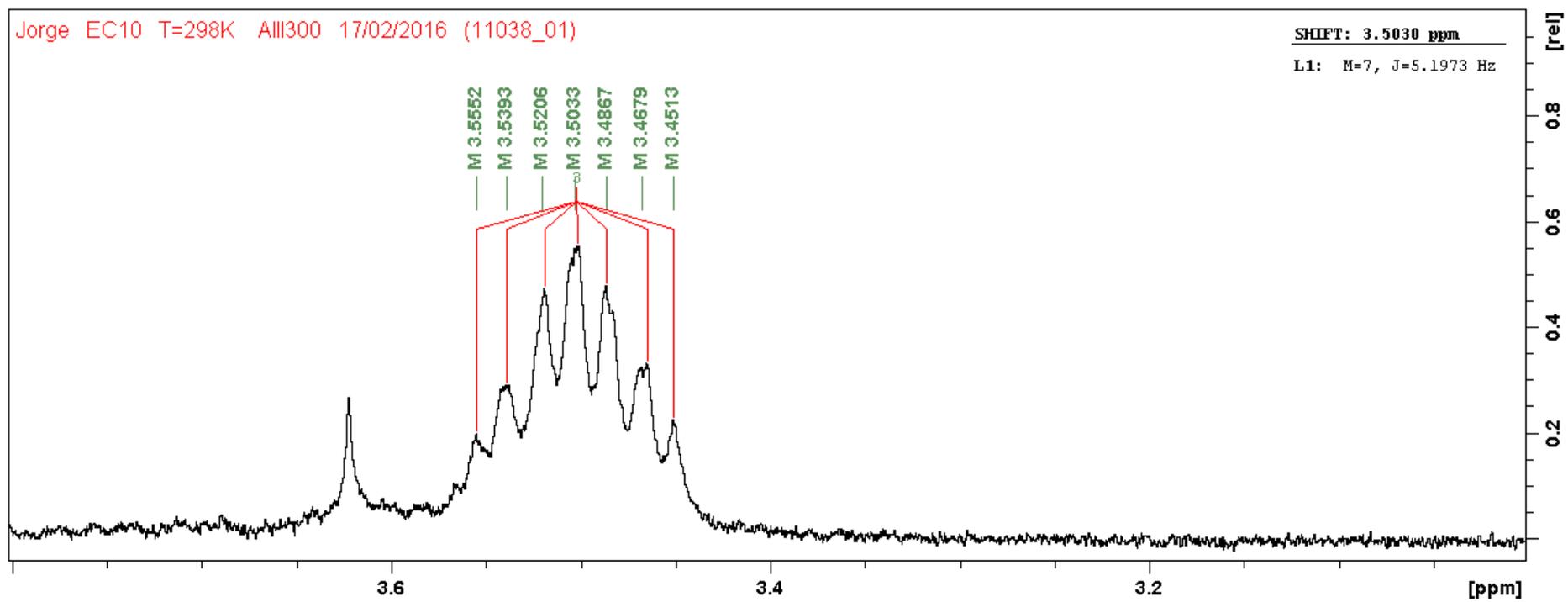


Figura 37. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das Substâncias 4 e 5: expansão da região entre 3,15 e 3,67 ppm.

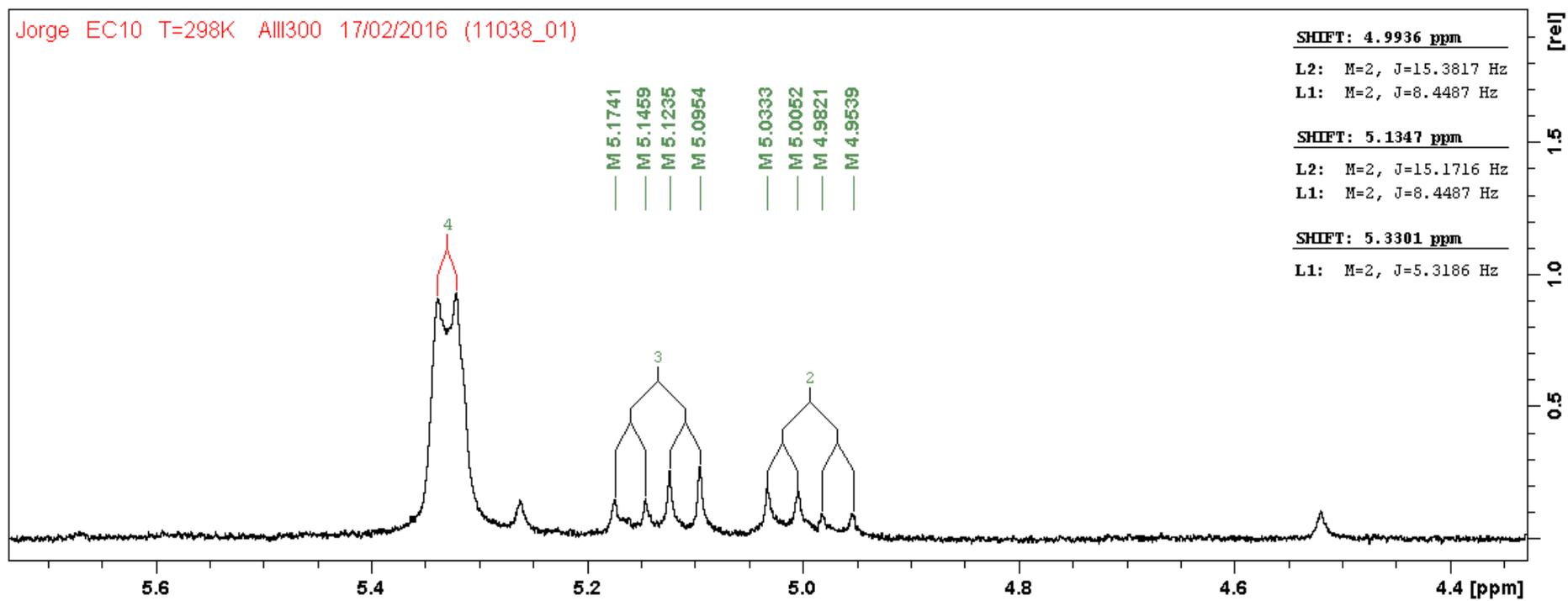


Figura 38. Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das Substâncias 4 e 5: expansão da região entre 4,35 e 5,69 ppm.

## 4.9. Identificação Estrutural dos Constituintes Químicos Isolados do extrato Hex das folhas de *E. loefgrenii*

### 4.9.1. Identificação da Substância 6

A Substância 6 foi isolada do extrato Hex das folhas de *E. loefgrenii* e, na CCDC usando Hex/AcOEt (7:3) apresentou Rf 0,35 e, deu reação positiva no revelador de AlCl<sub>3</sub>, sugerindo que essa substancia tratava-se de um flavonoide.

O espectro de <sup>1</sup>H RMN da Substância 6 (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) (**Figura 43**, p. 79) (**Tabela 16**, p. 74) apresentou dois dubletos, em  $\delta_H$  7,24 ( $J = 8,55$  Hz) e 6,74 ( $J = 8,55$  Hz) atribuídos a hidrogênios aromáticos. A magnitude das constantes de acoplamento mostra H apresentando uma relação *orto*, sugerindo a presença do anel B di-substituído de um flavonoide. O sinal em  $\delta_H$  7,24 foi atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6' e o sinal em  $\delta_H$  6,74 aos hidrogênios H-3' e H-5' (**Figura 46**, p. 82).

Os sinais para dois hidrogênios aromáticos em  $\delta_H$  5,96 e 5,97 com acoplamento *meta* ( $d$ ,  $J = 2,25$  Hz, 1H), respectivamente, são indicativos de Hidrogênios do anel A tetra-substituído de flavonoide e, foram atribuídos a H-6 e H-8, respectivamente. O espectro apresentou um sinal em  $\delta_H$  3,72 ( $s$ , 3H) atribuído a uma metoxila (**Figura 44**, p. 80 e **Figura 45**, p. 81).

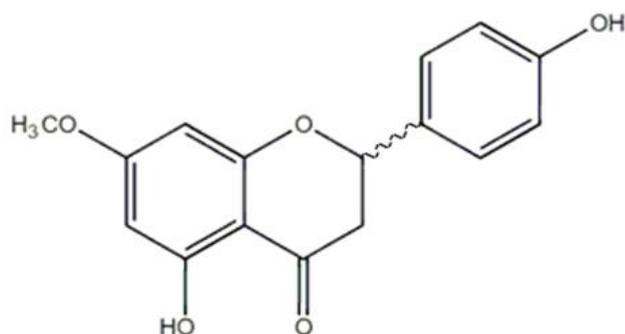
Nesse espectro de <sup>1</sup>H RMN foi observado ainda a presença de sinais em  $\delta_H$  5,29 ( $dd$ ,  $J = 3,0$  e 12,9 Hz, 1H), 2,65 ( $dd$ ,  $J = 2,98$  e 17,18 Hz, 1H) e 3,06 ( $dd$ ,  $J = 17,20$  e 12,95 Hz, 1H), cuja multiplicidade indica que a Substância 6 é uma flavanona, sendo o primeiro duplo dubleto atribuído ao H-2 e os outros dois duplos dubletos aos hidrogênios H-3 (**Figura 44**, p. 80 e **Figura 45**, p. 81). Os valores da constante de acoplamento de H-2 ( $J = 12,9$  e 3,0 Hz), remetem a acoplamento axial-axial e axial-equatorial, sugerindo o substituinte em C-2 em posição equatorial.

O espectro de <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) (**Figura 40**, p. 76) (**Tabela 17**, p. 75) apresentou 14 sinais correspondentes a 16 átomos de carbono. Os sinais em  $\delta_C$  129,55, 127,68, 114,95, 102,67, 94,34 e 93,55 foram atribuídos a carbonos de natureza aromática.

O deslocamento químico em  $\delta_C$  196,86 é característico de carbonila cetônica conjugada e foi atribuído ao C-4. O sinal em  $\delta_C$  42,65 (C-3), de carbono metilênico, indica

que não há dupla ligação entre os carbonos C-2 ( $\delta_C$  79,22) e C-3 do anel C do flavonóide, podendo assim propor a estrutura de uma flavanona. Os sinais em  $\delta_C$  94,34 e 93,55 foram atribuídos aos carbonos C-6 e C-8 da Substância **6** e o sinal em  $\delta_C$  168,14 ao C-7. Os sinais dos carbonos C-2'/C-6' e C-3'/C-5' aparecem sobrepostos no espectro de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_C$  127,68 e 114,95, respectivamente (**Figura 41**, p. 77 e **Figura 42**, p. 78). O sinal em  $\delta_C$  54,90 sugere a presença de uma metoxila na molécula. A posição da metoxilação pode ser identificada por comparação dos deslocamentos dos carbonos oxigenados (C-5, C-7 e C-4') e dos carbonos em posição *orto* aos carbonos oxigenados da Substância **6** (C-6, C-8, C-3' e C-5') com os deslocamentos dos respectivos carbonos da flavanona tri-hidroxilada Narigenina, isto porque, o sinal do carbono diretamente metoxilado aparece em campo mais baixo enquanto os carbonos em posição *orto* à metoxilação aparecem em campo mais alto (MARKHAM et al., 1978). A comparação dos deslocamentos dos carbonos oxigenados e dos carbonos em posição *orto* da Substância **6** e da Narigenina sugere que a metoxilação ocorre no C-7 (**Tabela 18**, p. 75). A análise dos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN indica que a Substância **6** trata-se de uma flavanona com fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$ .

A análise dos dados de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN obtidos e a comparação com os dados da literatura (VASCONCELOS et al., 1998) permitiu a identificação da Substância **6** como a flavanona Sakuranetina (**Figura 39**, p. 73), sendo esse o primeiro relato da identificação desta flavanona no gênero *Erythroxylum*.



**Figura 39.** Estrutura química da Sakuranetina.

**Tabela 16.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta_{\text{H}}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) da Substância **6** e comparação com os dados da literatura.

H	$^1\text{H}$ (ppm) da Substância <b>6</b>	$^1\text{H}$ (ppm) da Sakuranetina (VASCONCELOS et al., 1998)
2	5,29 ( <i>dd</i> , $J = 12,9$ e $3,0$ Hz)	5,36 ( <i>dd</i> , $J = 3,5$ e $13,5$ Hz)
3	3b 2,65 ( <i>dd</i> , $J = 17,2$ e $3,0$ Hz) 3a 3,06 ( <i>dd</i> , $J = 17,2$ e $12,9$ Hz)	3a 3,10 ( <i>dd</i> , $J = 13,5$ e $17,2$ Hz) 3b 2,79 ( <i>dd</i> , $J = 3,5$ e $17,2$ Hz)
4		
5		
6	5,97 ( <i>d</i> , $J = 2,3$ Hz)	6,08 ( <i>d</i> , $J = 2,3$ Hz)
7		
8	5,96 ( <i>d</i> , $J = 2,3$ Hz)	6,05 ( <i>d</i> , $J = 2,3$ Hz)
9		
10		
1'		
2'	7,24 ( <i>d</i> , $J = 8,6$ Hz)	7,34 ( <i>d</i> , $J = 8,6$ Hz)
3'	6,74 ( <i>d</i> , $J = 8,6$ Hz)	6,89 ( <i>d</i> , $J = 8,6$ Hz)
4'		
5'	6,74 ( <i>d</i> , $J = 8,6$ Hz)	6,89 ( <i>d</i> , $J = 8,6$ Hz)
6'	7,24 ( <i>d</i> , $J = 8,66$ Hz)	7,34 ( <i>d</i> , $J = 8,6$ Hz)
O-CH <sub>3</sub> (7)	3,72 ( <i>s</i> )	3,81 ( <i>s</i> )
OH-5		12,03 ( <i>s</i> )

**Tabela 17.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta_{\text{C}}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) da Substância **6** e comparação com os dados da literatura.

C	$^{13}\text{C}$ (ppm) da Substância <b>6</b>	$^{13}\text{C}$ (ppm) da Sakuranetina (VASCONCELOS et al., 1998)
2	79,22	80,0
3	42,65	43,2
4	196,86	196,0
5	163,85	164,2
6	94,34	95,1
7	168,14	168,0
8	93,55	94,2
9	163,33	162,9
10	102,67	103,1
1'	129,55	130,5
2'	127,68	128,0
3'	114,95	115,6
4'	157,69	156,1
5'	114,95	115,6
6'	127,68	128,0
O-CH <sub>3</sub> (7)	54,90	55,7

**Tabela 18.** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da Substância **6** com os deslocamentos de RMN de  $^{13}\text{C}$  da Narigenina.

	$^{13}\text{C}$ (ppm) Substância <b>6</b>	$^{13}\text{C}$ (ppm) Narigenina (MARKHAM; TERNAI, 1976)
5	163,85	163,3
6	94,34	95,8
7	168,14	166,4
8	93,56	94,9
3'	114,95	115,1
4'	157,69	157,4
5'	114,95	115,1

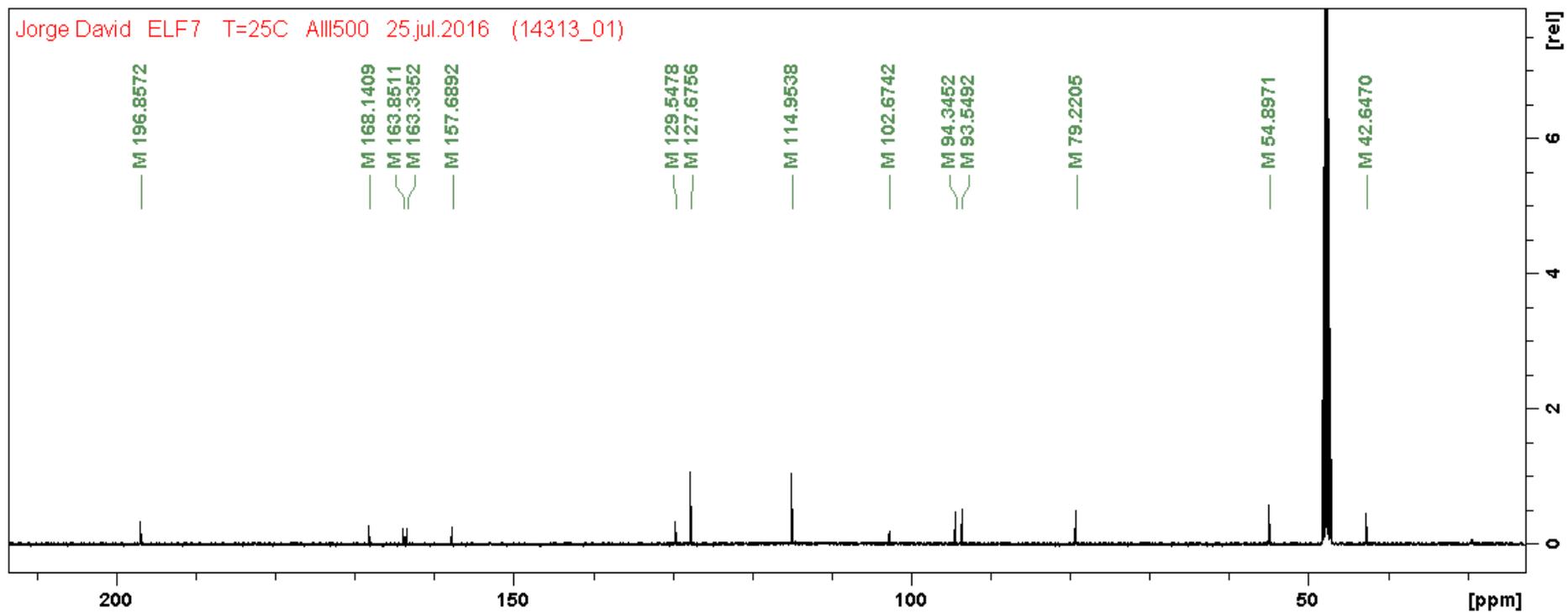


Figura 40. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Substância 6.

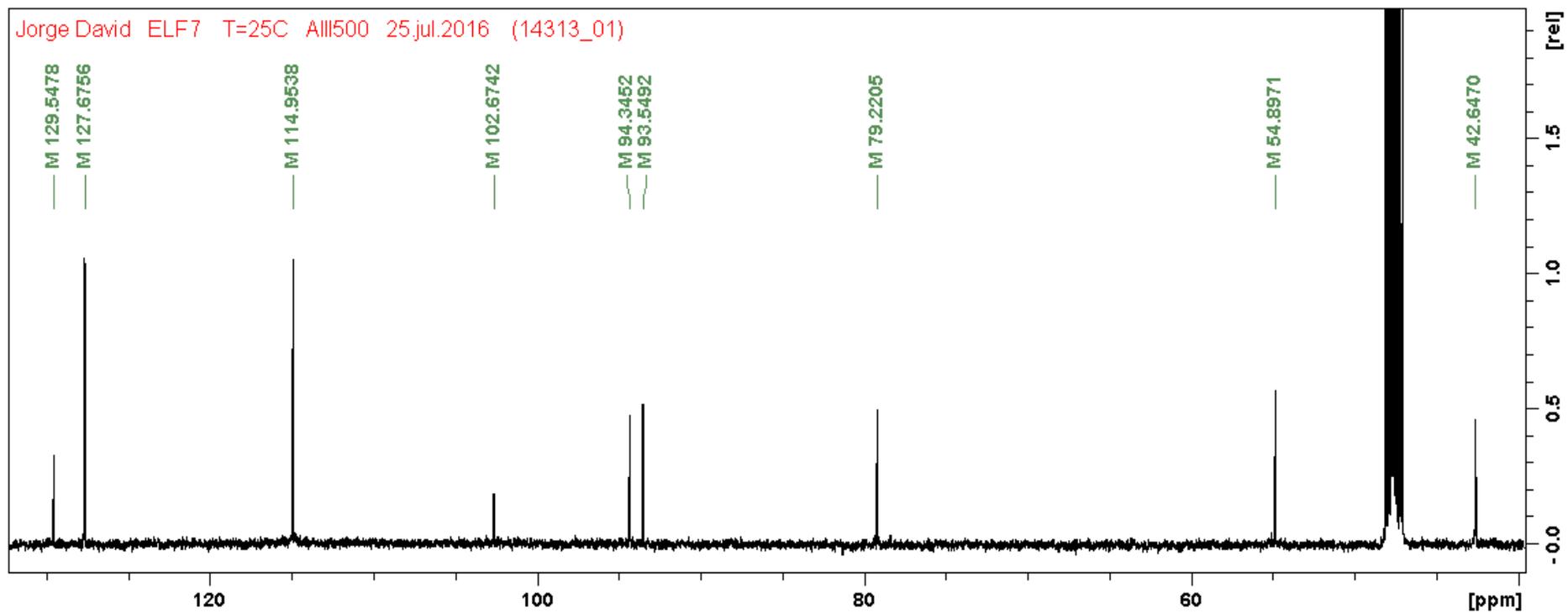


Figura 41. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Substância 6: expansão da região entre 40 e 130 ppm.

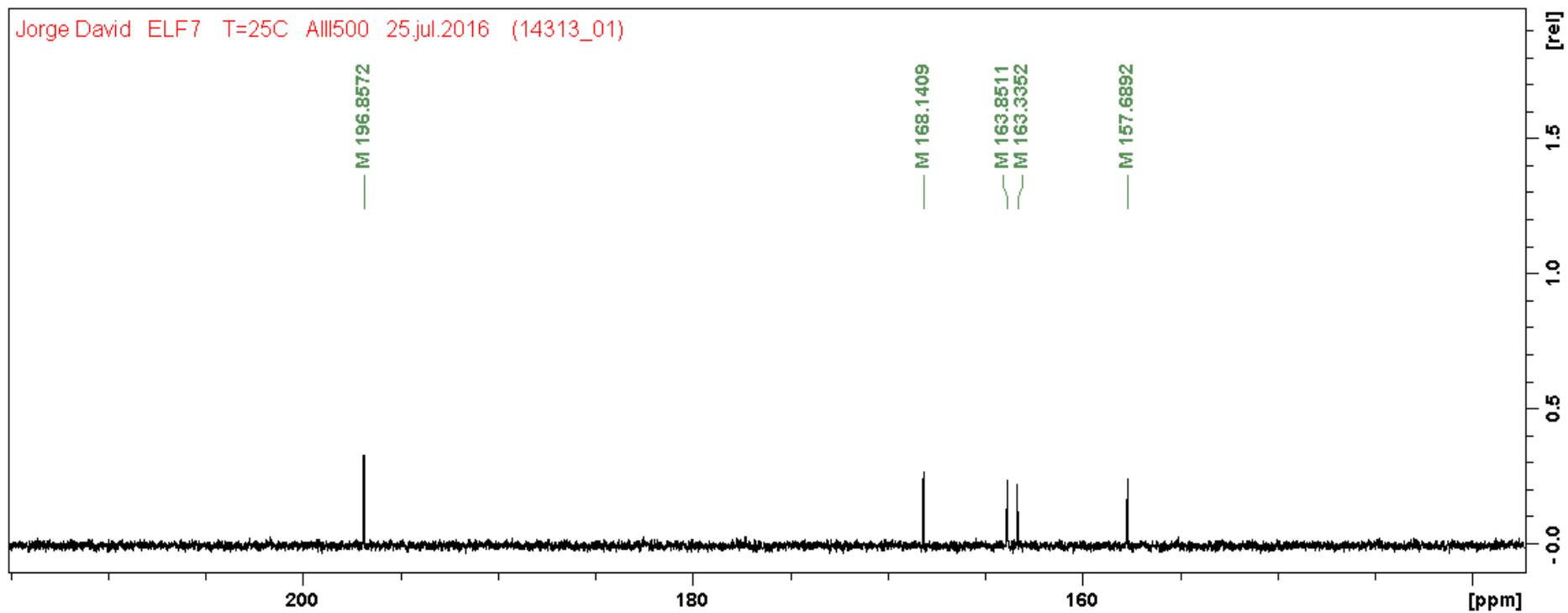


Figura 42. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Substância 6: expansão da região entre 145 e 215 ppm.

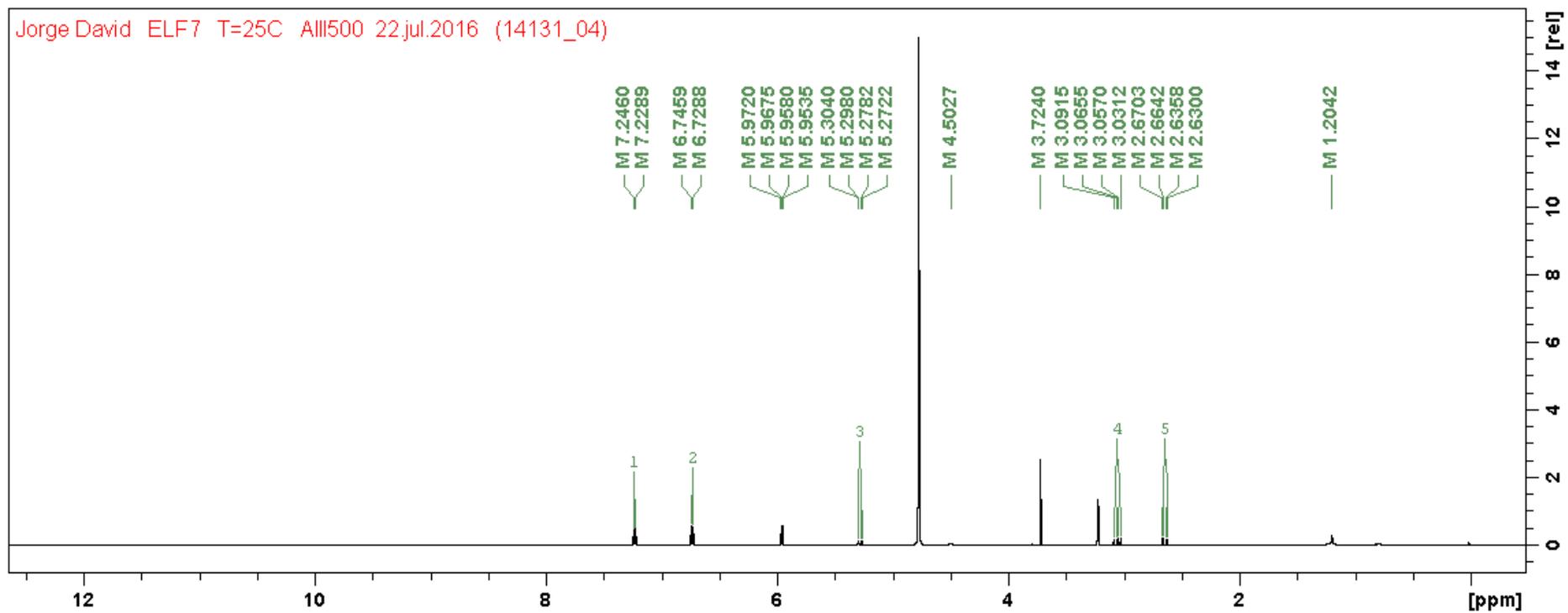
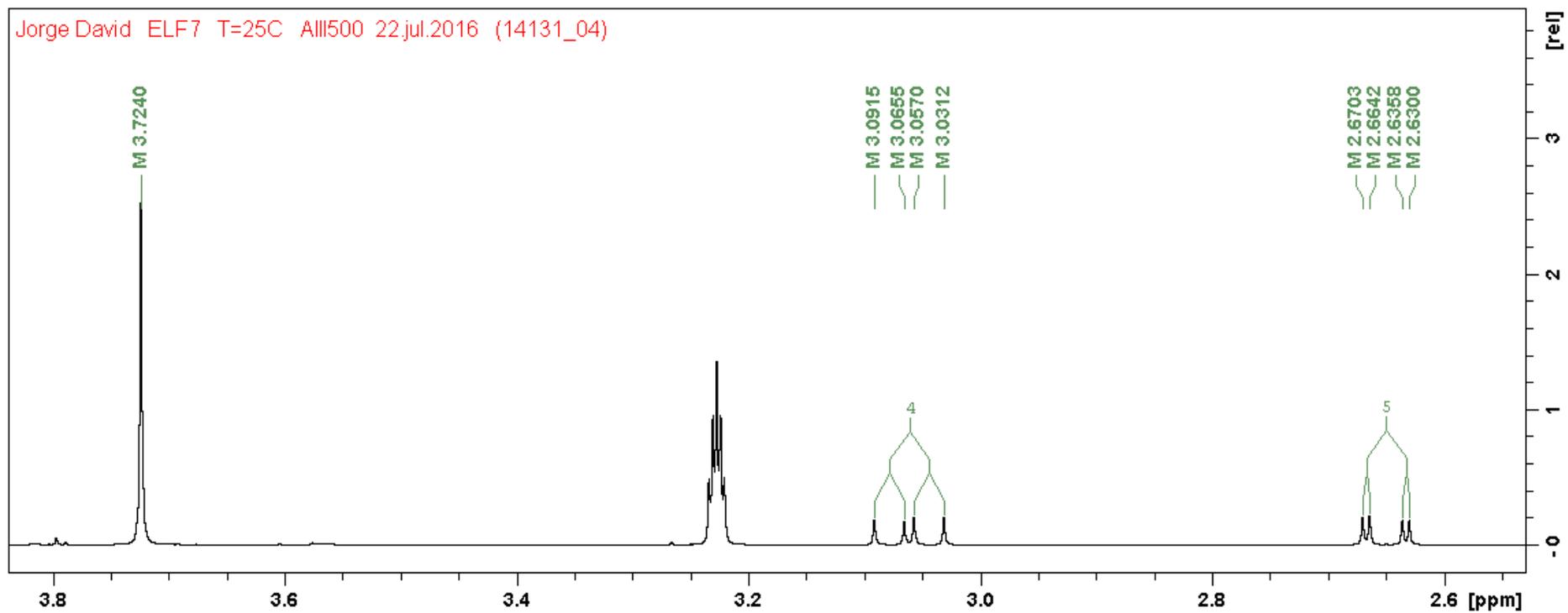
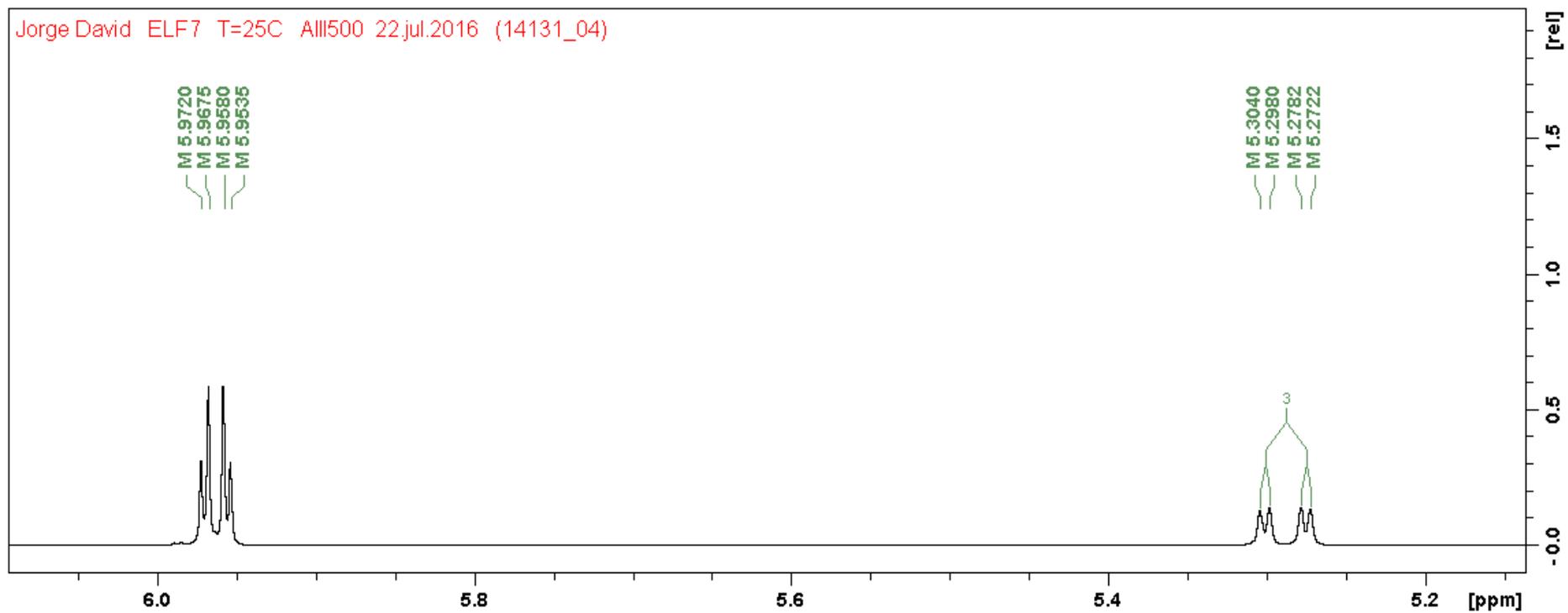


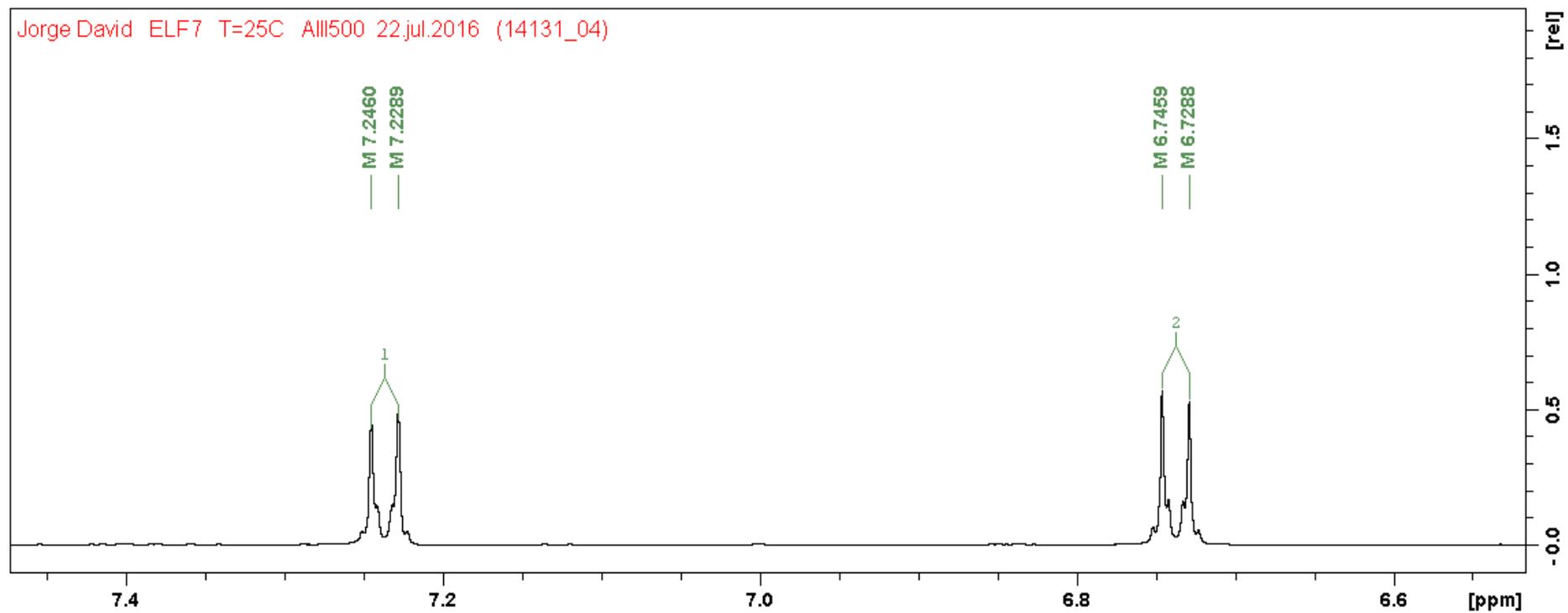
Figura 43. Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Substância 6.



**Figura 44.** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Substância **6**: expansão da região entre 2,55 e 3,8 ppm.



**Figura 45.** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Substância **6**: expansão da região entre 5,15 e 6,05 ppm.

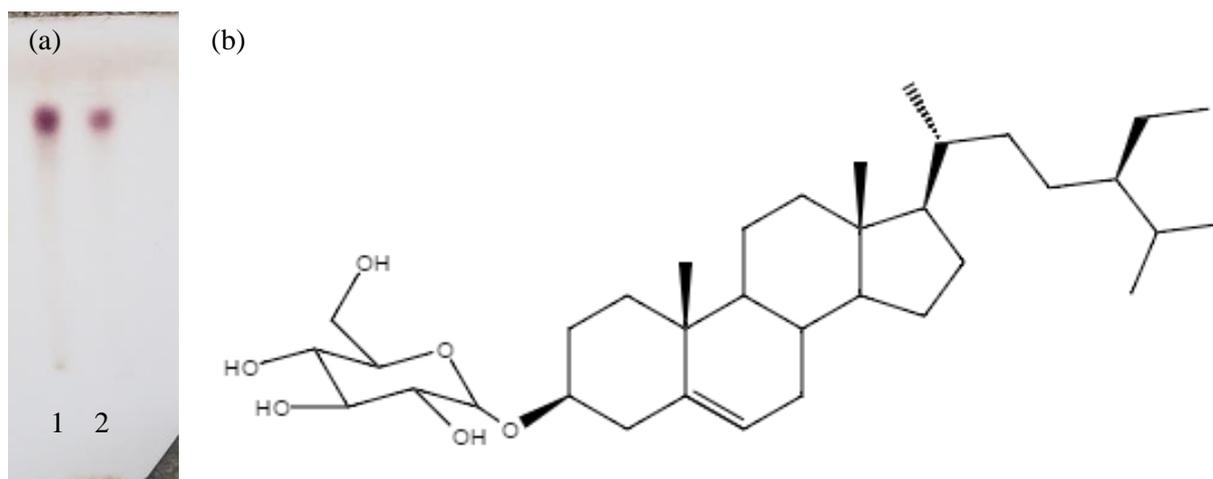


**Figura 46.** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Substância **6**: expansão da região entre 6,55 e 7,45 ppm.

#### 4.9.2. Identificação da Substância 7

A Substância 7 foi isolada do extrato hexânico das folhas de *E. loefgrenii*, na cromatografia em camada delgada apresentou reação positiva ao revelador de Liebermann–Burchard (Rf 0,82 – Diclorometano / Metanol (8:2)) com ponto de fusão na faixa de 279,4 – 283,7 °C.

A Substância 7 (15 mg) foi identificada a partir da cromatografia em camada delgada, utilizando o padrão de  $\beta$ -sitosterol glicosilado (Rf 0,82). A comparação do índice de retenção obtida para o padrão (ponto 1) e para a Substância 7 (ponto 2) e o perfil apresentado pelos pontos frente ao revelador de Liebermann-Burchard, utilizado na detecção de triterpenos e esteroides, nos permitem concluir que a Substância 7 se trata do  $\beta$ -sitosterol glicosilado (**Figura 47**, p. 83).



**Figura 47.** (a) Placa cromatográfica: Ponto 1 – Padrão de  $\beta$ -sitosterol glicosilado; Ponto 2 – Substância 7. (b) Estrutura química do  $\beta$ -sitosterol glicosilado.

## 4.10. Identificação Estrutural dos Constituintes Químicos Isolados do Extrato AcOEt das folhas de *E. loefgrenii*

### 4.10.1. Identificação da Substância 8

A Substância **8** foi isolada do extrato AcOEt das folhas de *E. loefgrenii* como um pó amarelo amorfo, solúvel em piridina. Na CCDC usando como eluente a mistura DCM/MeOH (8:2) apresentou Rf 0,44 e reação positiva ao revelador de AlCl<sub>3</sub>, sugerindo que essa substancia tratava-se de um flavonoide.

O espectro de <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) (**Figura 49**, p. 89) (**Tabela 20**, p. 88) da Substância **8** apresentou sinais característicos de hidrogênios aromáticos em  $\delta_H$  6,37, 6,69, 7,04, 7,54 e 7,74.

A multiplicidade e as constantes de acoplamento dos sinais em  $\delta_H$  6,38 (*d*, *J* = 2,40 Hz, 1H) e 6,69 (*d*, *J* = 2,30 Hz, 1H) indicam que estes Hidrogênios estão *meta* posicionados, sugerindo a presença de um anel A tetra-substituído de flavonoide. Assim esses sinais foram atribuídos aos H-8 e H-6, respectivamente (**Figura 52**, p. 92).

Enquanto que, o registro do sinal para um Hidrogênio em acoplamento *meta* ( $\delta_H$  7,54; *d*, *J* = 2,20 Hz, 1H), do sinal para um Hidrogênio em acoplamento *orto* ( $\delta_H$  7,04, *d*, *J* = 8,70 Hz, 1H) e do sinal para Hidrogênio com acoplamentos *orto* e *meta* ( $\delta_H$  7,73, *dd*, *J* = 2,28 e 8,63 Hz, 1H), que foram atribuídos aos H-2', H-5' e H-6', respectivamente, indicam a presença um anel B tri-substituído de flavonoide (**Figura 53**, p. 93).

Ainda no espectro de <sup>1</sup>H RMN observa-se dois sinais em  $\delta_H$  3,86 (*s*, 3H) e 3,87 (*s*, 3H) característicos de metoxilas. A posição dos sinais dos prótons H-6' e H-2' no espectro de <sup>1</sup>H sugere que uma das metoxilas está localizada no C-4', uma vez que o sinal do próton H-2' aparece em campo mais alto que o sinal do próton H-6' quando a metoxila está no C-4' (MABRY et al., 1970).

Além disso, esse espectro mostrou sinais de hidrogênios metilênicos e metílicos em  $\delta_H$  5,39, 4,39, 3,70 e 0,97 que sugerem a presença de duas unidades osídicas. Os sinais em  $\delta_H$  5,39 (*d*, *J* = 7,45 Hz) e 4,39 (*d*, *J* = 1,6 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios anoméricos de uma unidade de glicose (H-1'') e de uma unidade de ramnose (H-1'''), respectivamente. Os dubletos em  $\delta_H$  3,70 (*J* = 10,35 Hz, 2H) e 0,97 (*J* = 6,25 Hz, 3H) são característicos da presença de uma unidade glicose e uma unidade de ramnose, sendo

atribuídos aos hidrogênios H-6" e H-6"', respectivamente (**Figura 50**, p. 90, **Figura 51**, p. 91 e **Figura 52**, p. 92).

A análise dos sinais dos hidrogênios anoméricos sugere que a glicose e a ramnose formam um dissacarídeo com a glicose ligando-se diretamente ao flavonoide (açúcar primário) e a ramnose como o açúcar terminal. Esses sinais sugerem, ainda, que a ligação da ramnose com a glicose ocorre através da hidroxila no C-6" (MARKHAM; GEIGER, 1986).

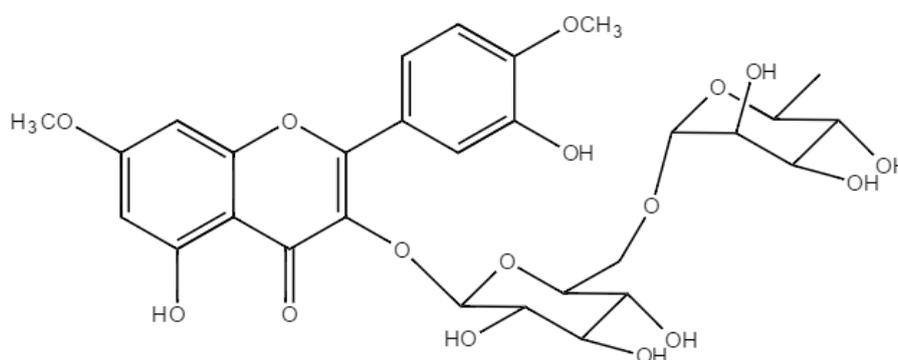
No espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz, DMSO- $d_6$ ) (**Figura 54**, p. 94) (**Tabela 19**, p. 87) observamos ainda a presença de sinais característicos da presença de ligação dupla entre os Carbonos C-2 e C-3 do anel C em  $\delta_{\text{C}}$  133,81 e 156,3 que foram atribuídos aos carbonos C-3 e C-2, respectivamente. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  177,55 foi atribuído à carbonila em C-4. A presença das duas metoxilas foi confirmada pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  55,62 e 56,09 (**Figura 55**, p. 95 e **Figura 57**, p. 97).

No espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN encontramos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  101,15 e 100,79 (C-1" e C-1"') que podem ser atribuídos aos carbonos anoméricos de duas unidades osídicas. Ainda nesse espectro, observamos um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  17,73 atribuído ao carbono metílico da ramnose (C-6"') e em  $\delta_{\text{C}}$  66,87 referente ao carbono metilênico da glicose (C-6"). Os 9 sinais observados na região compreendida entre  $\delta_{\text{C}}$  66,9 e 76,4 confirmam a presença de duas unidades osídicas na estrutura (**Figura 55**, p. 95 e **Figura 56**, p. 96).

A análise dos  $\delta_{\text{C}}$  indica que o flavonoide está glicosilado através do carbono C-3, a constante de acoplamento do hidrogênio anomérico da glicose em  $\delta_{\text{H}}$  5,39 (*d*,  $J = 7,45$  Hz) indica que a ligação glicosídica ao flavonoide ocorre através da glicose numa configuração  $\beta$ . Desta maneira, podemos inferir que as unidades de glicose e ramnose formam o dissacarídeo conhecido como rutinose ligado ao flavonoide por *O*-glicosilação através do carbono C-3.

O espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN apresentou 29 sinais no total, dos quais 15 foram atribuídos ao esqueleto do flavonoide, 12 sinais à unidade de dissacarídeo e os 2 sinais restantes correspondem às duas metoxilas. A análise dos dados de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  RMN indicou que a Substância **8** trata-se de um flavonoide com fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_{16}$ . A análise dos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e a comparação com os dados da literatura permitiram chegar à identificação estrutural da Substância **8**, sendo identificada como o flavonoide glicosilado 7,4'-di-*O*-metilquercetina-3-*O*- $\beta$ -rutinosídeo conhecido como ombuina-3-rutinosídeo.

Bohm et al. (1988) analisaram 13 espécies de *Erythroxylum* e identificaram a presença deste flavonoide em 11 espécies. González-Guevara et al. (2006) identificaram o flavonoide ombuina-3-rutinosídeo em quatro espécies cubanas de *Erythroxylum*: *E. minutifolium* Griseb., *E. areolatum* Linn., *E. confusum* Britt., e *E. suave* Lunan. Estudos recentes relatam o isolamento deste flavonoide nas espécies *E. suberosum* (NASCIMENTO et al., 2012; NASCIMENTO, 2014), *E. alaternifolium* var. *alaternifolium* (CÓRDOVA et al., 2012) e *E. pulchrum* (ALBUQUERQUE et al., 2014). Estes resultados confirmam que a presença de ombuina glicosiladas é marcador quimiotaxonômico característico do gênero *Erythroxylum*.



**Figura 48.** Estrutura química da Ombuina-3-rutinosídeo.

**Tabela 19.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta_{\text{C}}$ , DMSO- $d_6$ , 125 MHz) da Substância **8** e comparação com os dados da literatura.

	$^{13}\text{C}$ (ppm) da Ombuina-3-rutinosídeo (ALBUQUERQUE et al., 2014)	$^{13}\text{C}$ (ppm) da Substância <b>8</b>
2	156,3	156,43
3	134	133,81
4	177,4	177,55
5	160,8	160,88
6	97,9	97,97
7	165,1	165,16
8	92,2	92,27
9	156,5	156,74
10	104,8	105,02
OMe (7)	55,6	55,62
OMe (4')	56,1	56,09
1'	122,3	122,41
2'	115,7	115,77
3'	145,7	145,89
4'	150	150,15
5'	111,1	111,34
6'	121,5	121,53
1''	101,1	101,15
2''	74	74,04
3''	75,7	75,82
4''	70,3	70,59
5''	76,4	76,39
6''	66,8	66,87
1'''	100,7	100,79
2'''	70,5	70,36
3'''	69,8	69,84
4'''	71,8	71,80
5'''	68,1	68,24
6'''	17,6	17,73

**Tabela 20.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta_{\text{H}}$ , DMSO- $d_6$ , 500 MHz) da Substância **8** e comparação com os dados da literatura.

	$^1\text{H}$ (ppm) da Ombuina-3-rutinosídeo (ALBUQUERQUE et al., 2014)	$^1\text{H}$ (ppm) da Substância <b>8</b>
2		
3		
4		
5		
6	6,36 ( <i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,38 ( <i>d</i> , $J = 2,40$ Hz)
7		
8	6,67 ( <i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	6,69 ( <i>d</i> , $J = 2,30$ Hz)
9		
10		
OMe	3,88 ( <i>s</i> )	3,86 ( <i>s</i> )
OMe	3,88 ( <i>s</i> )	3,87 ( <i>s</i> )
1'		
2'	7,55 ( <i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	7,54 ( <i>d</i> , $J = 2,20$ Hz)
3'		
4'		
5'	7,04 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	7,04 ( <i>d</i> , $J = 8,70$ Hz)
6'	7,72 ( <i>dd</i> , $J = 2,5$ e $8,5$ Hz)	7,73 ( <i>dd</i> , $J = 2,28$ e $8,63$ Hz)
1''	5,38 ( <i>d</i> , $J = 7,5$ Hz)	5,39 ( <i>d</i> , $J = 7,45$ Hz)
2''	3,22 <i>m</i>	
3''	3,25 <i>m</i>	
4''	3,39 <i>m</i>	3,40 <i>m</i>
5''	3,24 <i>m</i>	
6''	3,70 ( <i>d</i> , $J = 11,0$ Hz)	3,70 ( <i>d</i> , $J = 10,35$ Hz)
1'''	4,39 <i>sl</i>	4,39 ( <i>d</i> , $J = 1,6$ Hz)
2'''	3,29 <i>m</i>	
3'''	3,08 <i>m</i>	3,08 <i>m</i>
4'''	3,07 <i>m</i>	
5'''	3,26 <i>m</i>	
6'''	0,97 ( <i>d</i> , $J = 6,0$ Hz)	0,97 ( <i>d</i> , $J = 6,25$ Hz)

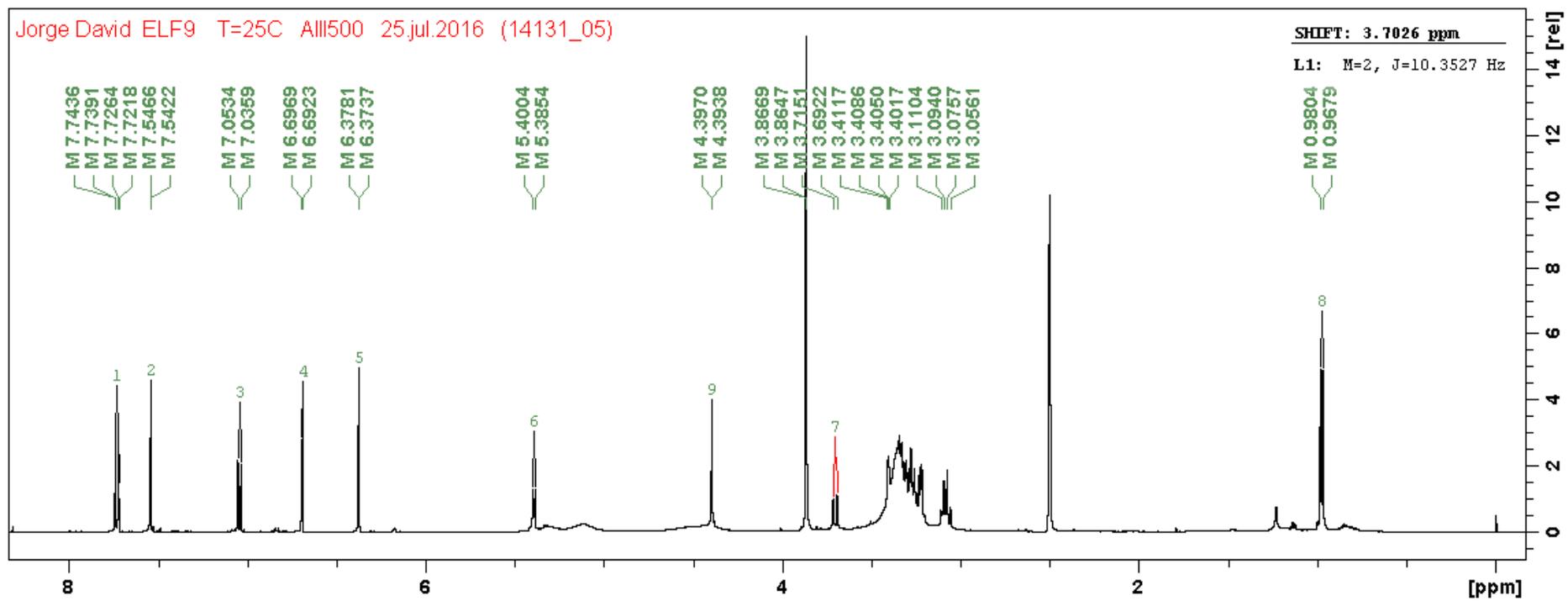
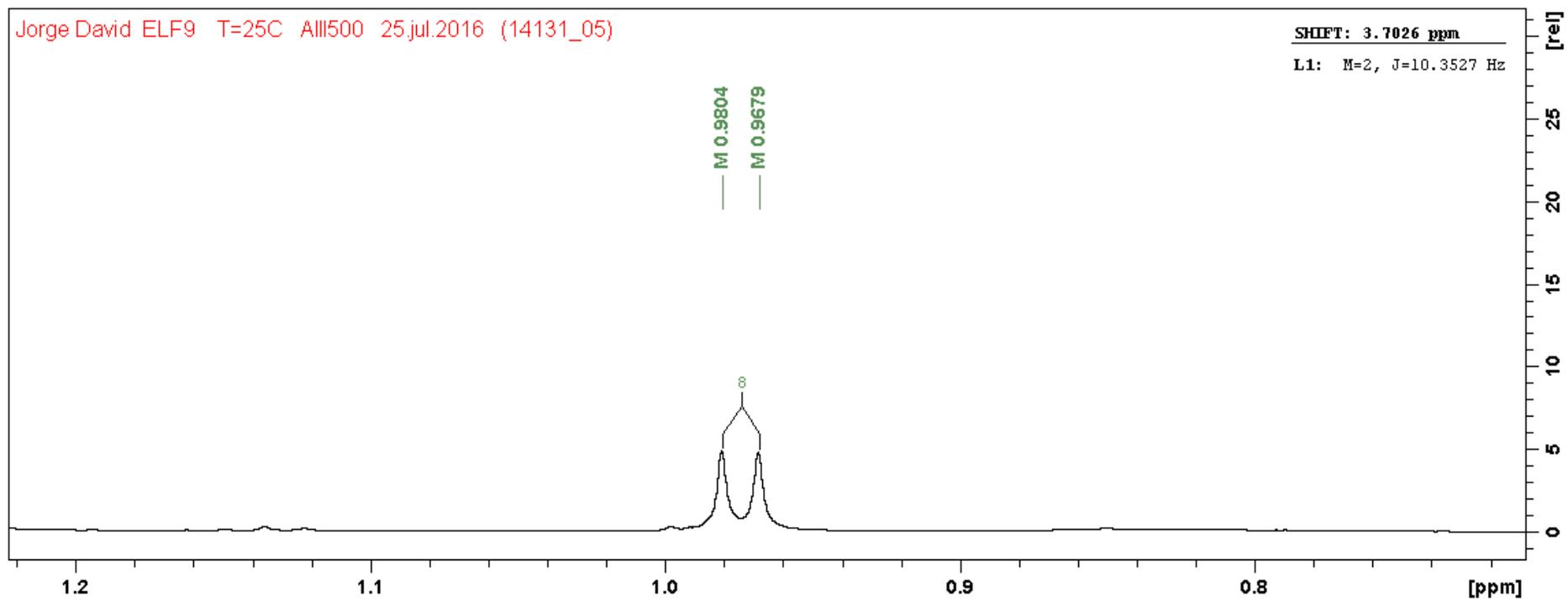
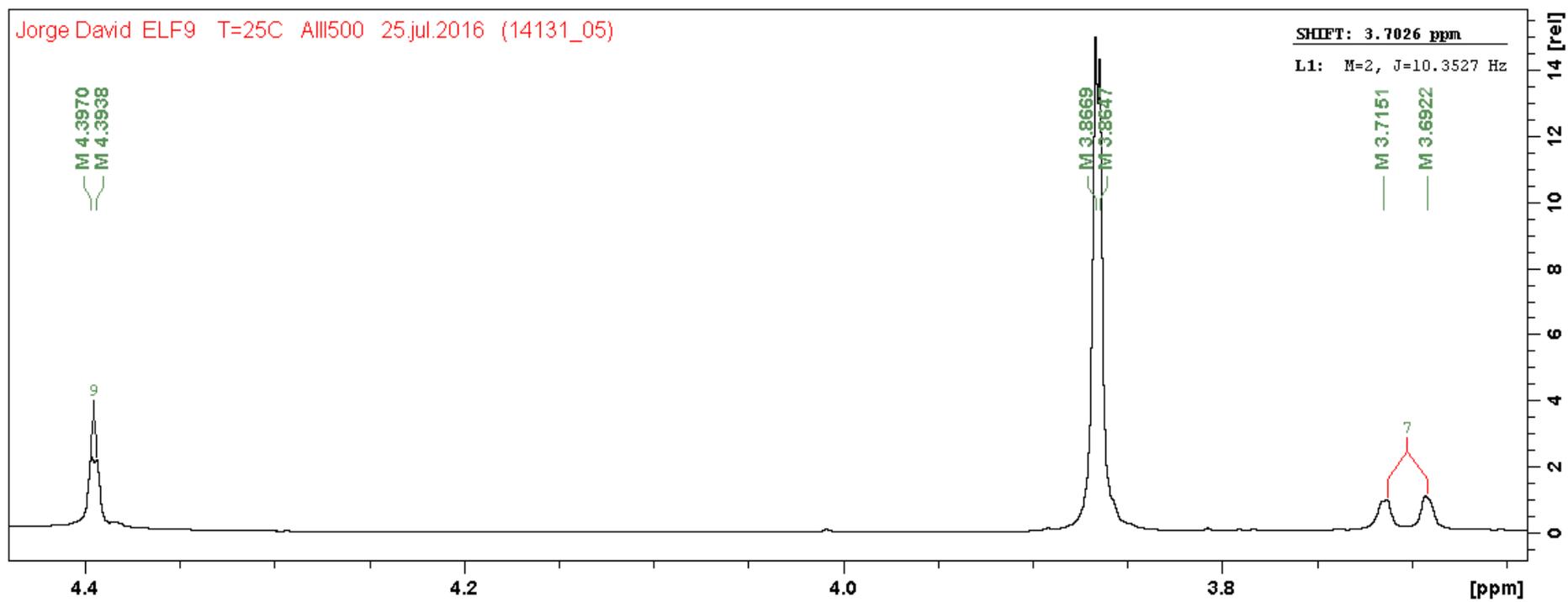


Figura 49. Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância 8.



**Figura 50.** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância **8**: expansão da região entre 0,7 e 1,2 ppm.



**Figura 51.** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância **8**: expansão da região entre 3,65 e 4,45 ppm.

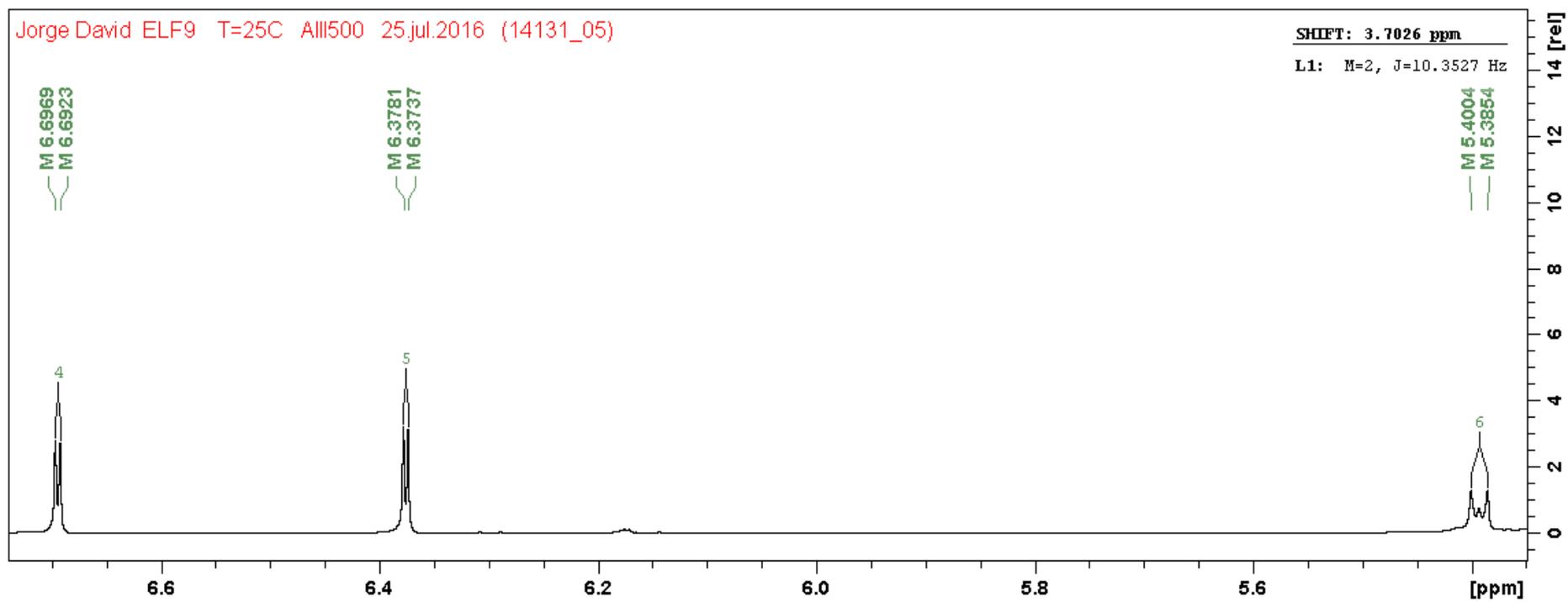


Figura 52. Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância **8**: expansão da região entre 5,4 e 6,7 ppm.

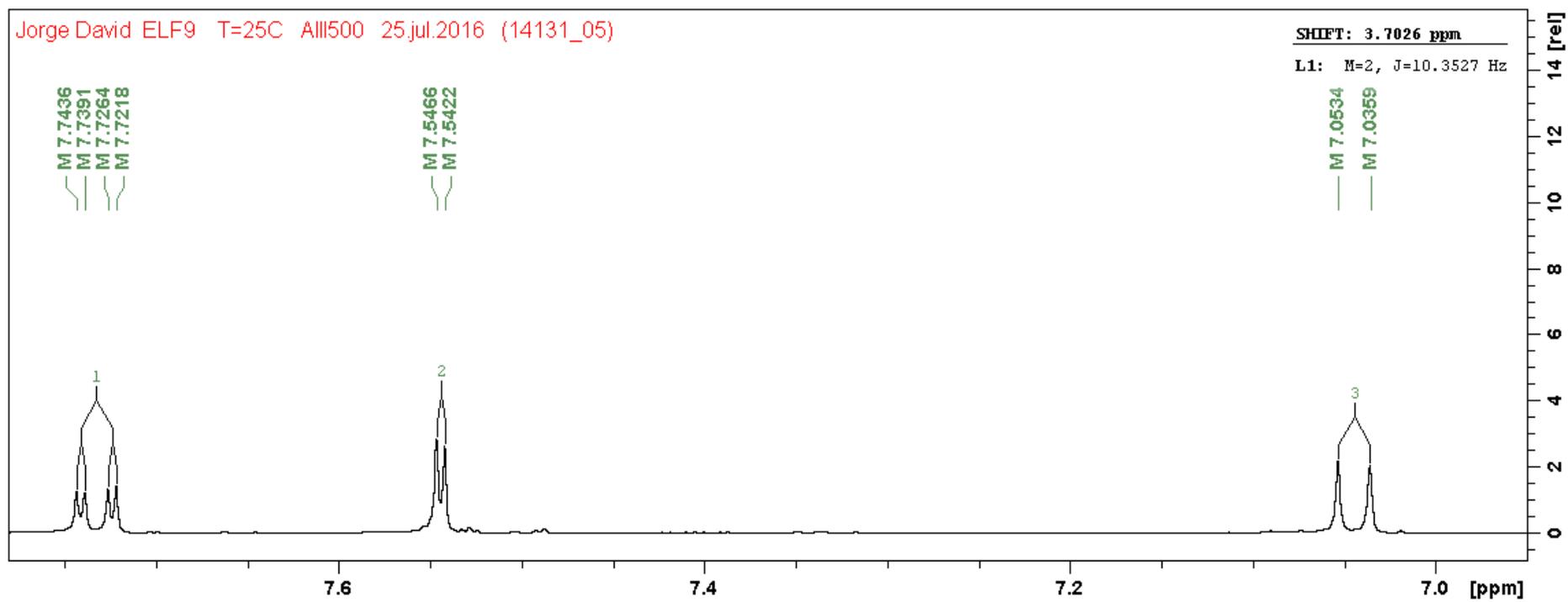


Figura 53. Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância **8**: expansão da região entre 7,0 e 7,75 ppm.

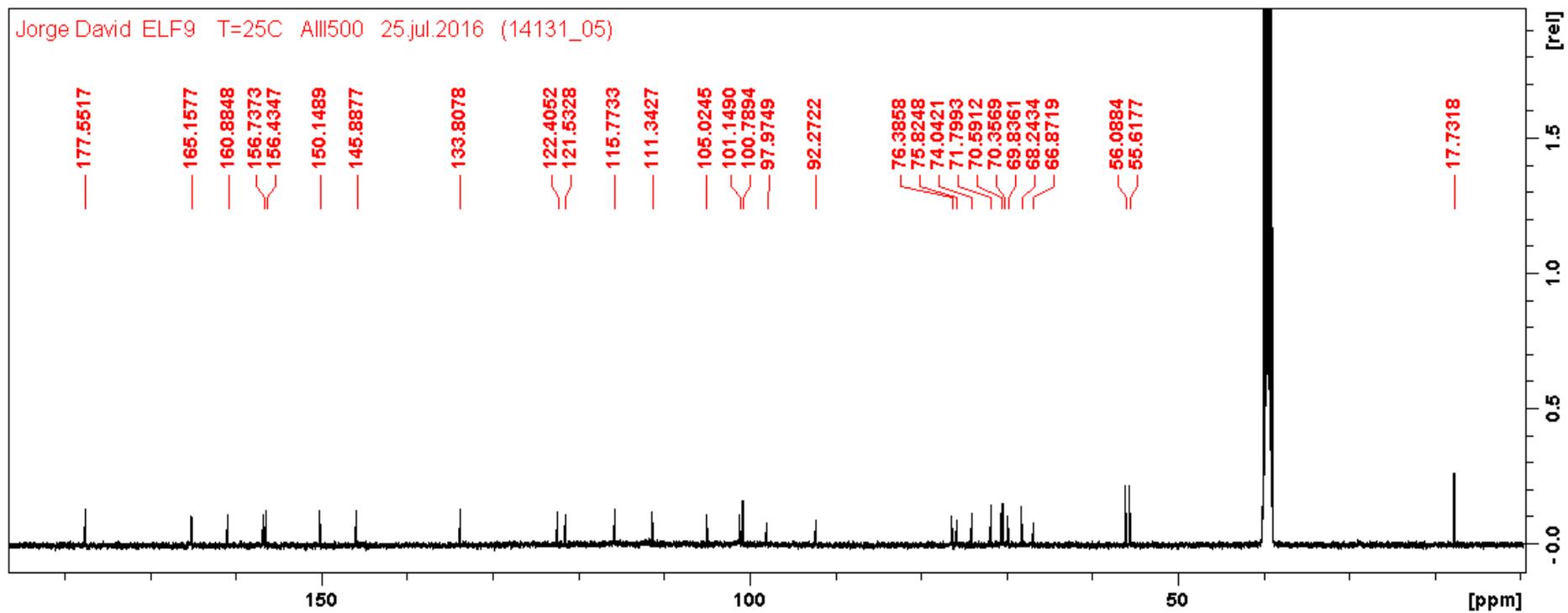
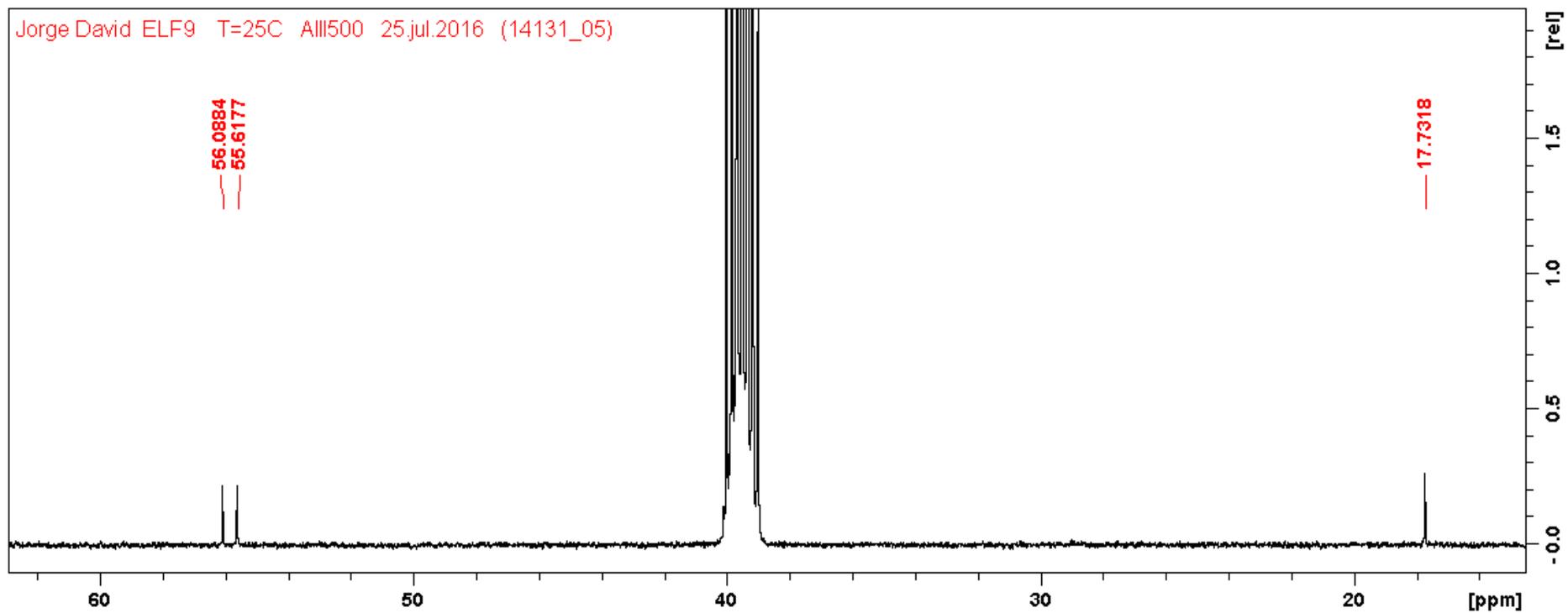


Figura 54. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância 8.



**Figura 55.** Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância **8**: expansão da região entre 16 e 62 ppm.

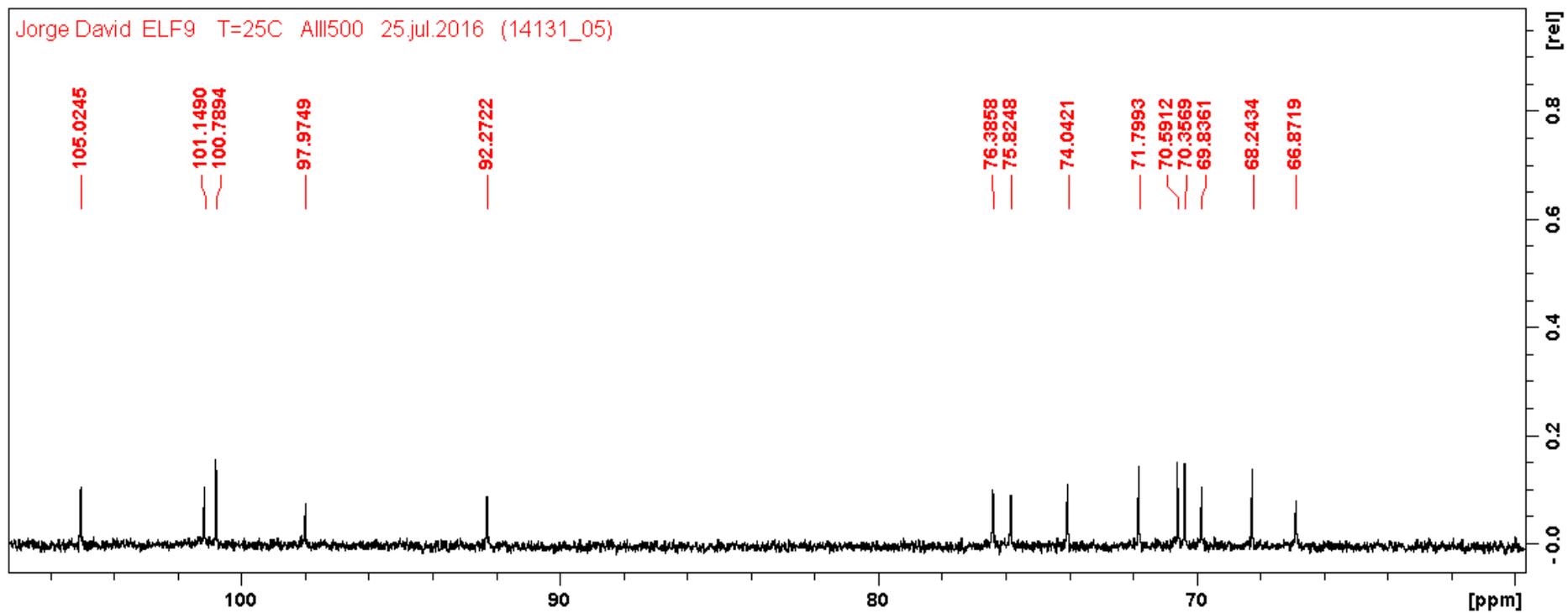


Figura 56. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância 8: expansão da região entre 60 e 106 ppm.

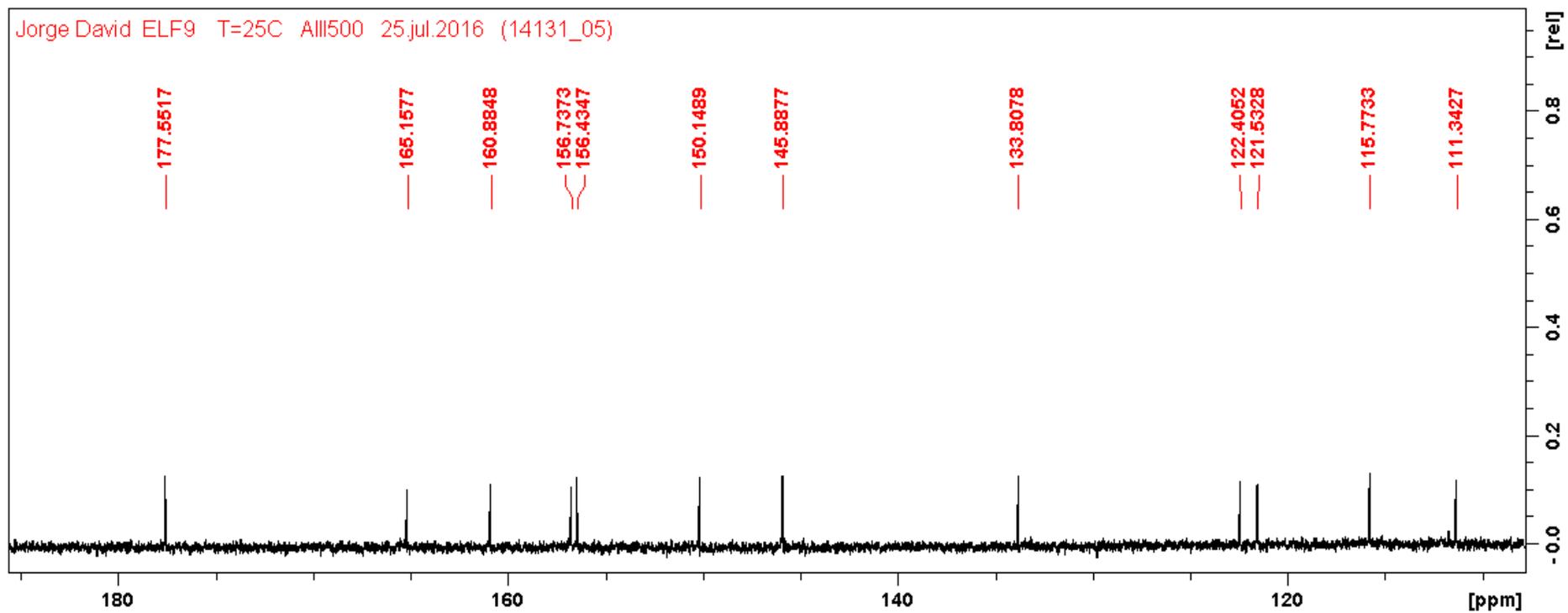


Figura 57. Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) da Substância 8: expansão da região entre 110 e 185 ppm.

## 5. CONCLUSÃO

Este trabalho é o primeiro relato de estudo fitoquímico realizado com a espécie *E. loefgrenii*, contribuindo, desta maneira, para o conhecimento da composição química das espécies de Erythroxylaceae que ocorrem no Brasil.

Analisando-se os constituintes químicos isolados neste trabalho, pôde-se verificar que a *E. loefgrenii*, a exemplo de outras espécies da família Erythroxylaceae, apresenta uma composição química diversificada.

Dos extratos orgânicos das folhas de *E. loefgrenii*, foram isoladas três substâncias: dois flavonoides (Sakuranetina e Ombuína-3-rutinosídeo) e o  $\beta$ -sitosterol glicosilado. Já do extrato orgânico do caule de *E. loefgrenii*, foram isoladas cinco substâncias com destaque para os triterpenos friedelina, friedelanol e taraxerol.

Com relação aos testes de atividades biológicas realizados com os extratos obtidos dos caules e das folhas *E. loefgrenii*, destaca-se o extrato ELFAcOEt das folhas que apresentou toxicidade moderada frente a *A. salina* e elevada atividade antioxidante nos dois métodos testados, a presença dos compostos isolados justifica as atividades relatadas para *E. loefgrenii*. O teste de correlação de Pearsons demonstrou uma forte correlação entre o teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos do caule e das folhas de *E. loefgrenii* e a atividade antioxidante.

Os extratos estudados e as substâncias isoladas apresentam potencial para a continuidade dos estudos de atividade biológica, uma vez que a literatura menciona inúmeras atividades biológicas relacionadas as substâncias presentes nos extratos como antitumoral, antiinflamatória e antioxidante.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, P. M.; BRAHAMB, H.; JANNETB, H. B.; MIGHRIB, Z.; MATTHEW, S. Antioxidant compounds from *Ebenus pinnata*. *Fitoterapia*, v. 78, p. 32-34, 2007.
- AHMED, Y.; RAHMAN, S.; AKHTAR, P.; ISLAM, F.; RAHMAN, M.; YAAKOB, Z. Isolation of steroids from n-hexane extract of the leaves of *Saurauia roxburghii*. *International Food Research Journal*, v. 20, p. 2939-2943, 2013.
- ALBUQUERQUE, C. H.; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, S. L.; SILVA, T. S.; GONÇALVES, G. F.; COSTA, V. C. O; AGRA, M. F.; PESSÔA, H. L. F.; SILVA, M. S. Flavonoides glicosilados de *Erythroxylum pulchrum* A. St.-Hil. (Erythroxylaceae). *Química Nova*, v. 37, p. 1-4, 2014.
- AL-DUAIS, M.; MÜLLER, L.; BÖHM, V.; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: Use of different assays. *European Food Research and Technology*, v. 228, p. 813–821, 2009.
- ALMEIDA, M. F. O.; MELO, A. C. R.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; SOUZA, A. D. L. Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (LECYTHIDACEAE). *Química Nova*, v. 34, p. 1182-1187, 2011.
- ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; SHIPLEY, B.; ARNASON, J. T. Growth and chemical defense in relation to resource availability: tradeoffs or common responses to environmental stress? *Brazilian Journal of Biology*, v. 64, p. 187-194, 2004.
- 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.
- AMARANTE, C. B.; MULLER, A. R.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amazônica*, v.41, p.431-434, 2011.
- AMARO-LUIS, J.; ADRIÁN, M.; DÍAZ, C. Isolation, identification and antimicrobial activity of ombuoside from *Stevia triflora*. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, v. 55, p. 262-268, 1997. .
- ANJUM, A. Cytotoxic and anti-microbial constituents from some Bangladeshi *Bridelia* and *Erythrina* species. 2015. 309 f. Tese (Doutor em Filosofia) – Departamento de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade de Dhaka, Bangladesh, 2015.
- ANSELL, S. M.; PEGEL, K. H.; TAYLOR, D. A. H. Diterpenes from the Timber of *Erythroxylum pictum*. *Phytochemistry*, v. 32, p. 945-952, 1993.
- ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. in mouse and rat models. *Journal of Pharmacy Pharmacology*, v. 63, p. 1070-1077, 2011.

- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 161, p. 105-121, 2009.
- ARAÚJO, T. F.; FIASCHI, P.; AMORIM, A. M. *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae) na Mata Atlântica da Bahia, Brasil. *Rodriguésia*, v. 65, p. 637-658, 2014.
- BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M.; PEREIRA, P. A. P.; GUEDES, M. L. S.; DAVID, J. P. Fatty Acid Esters of Triterpenes from *Erythroxyllum passerinum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 13, p. 669-673, 2002.
- BARREIROS, M. L.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; LOPES, L. M. X.; SÁ, M. S.; COSTA, J. F.O.; ALMEIDA, M. Z.; QUEIROZ, L. P.; SANT'ANA, A. E.G. Ryanodane diterpenes from two *Erythroxyllum* species. *Phytochemistry*, v. 68, p. 1735-1739, 2007.
- BIERIA, S.; BRACHETB, A.; VEUTHEYA, J. L.; CHRISTEN, P. Cocaine distribution in wild *Erythroxyllum* species. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 103, p. 439-447, 2006.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, v. 181, p. 1199-1200, 1958.
- BOBO-GARCÍA, G.; DAVIDOV-PARDO, G.; ARROQUI, C.; VÍRSEDA, P.; MARÍN-ARROYO, M. R.; NAVARRO, M. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 95, p. 204-209, 2015.
- BOHM, B. A.; LOO, T.; NICHOLLS, K. W.; PLOWMAN, T. Flavonoid variation in *Erythroxyllum*. *Phytochemistry*, v. 27, p. 833-837, 1988.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, v. 28, p. 25-30, 1995.
- CASTANEDA, H. T.; DULCEY, A. J. C.; MARTÍNEZ, J. H. I. Total phenolics antioxidant activity and phytochemical profile of some plants from the Yotoco National Protected Forest, Valle del Cauca, Colombia. *Revista de Ciências*, v. 17, p. 35-44, 2013.
- CHATATIKUN, M.; CHIABCHALARD, A. Phytochemical screening and free radical scavenging activities of orange baby carrot (*Daucus carota* Linn.) root crude extracts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 5, p. 9-102, 2013.
- CHÁVEZ, J. P.; SANTOS, I. D.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M. Flavonoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxyllum leal costae*. *Phytochemistry*, v. 41, p. 941-943, 1996.
- CÓRDOVA, W. H. P.; MATOS, M. G.; TABART, J.; SIPEL, A.; KEVERS, C.; DOMMES, J. In vitro Characterization of Antioxidant Properties of Cuban Endemic Varieties of *Erythroxyllum alaternifolium* A. Rich. Isolation of Two Flavonol Glycosides. *Journal of the Chilean Chemical Society*, v. 57, p. 1340-1343, 2012.

- COSTA-LIMA, J. L.; ALVES, M. A new species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) from the Brazilian Atlantic Forest. *Phytotaxa*, v. 141, p. 55-60, 2013.
- COSTA-LIMA, J. L.; ALVES, M. Three new species in Brazilian *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). *Phytotaxa*, v. 192, p. 97-104, 2015.
- CRONQUIST, A. J. *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. 2<sup>a</sup> ed. The New York Botanical Garden, 1988. 555 p.
- CUI, K.; LUO, X.; MURTHY, M. R. V. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 28, p. 771–799, 2004.
- DAHLGREN, R. M. T. Rhizophoraceae and Anisophylleaceae: summary statement, relationships. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 75, p. 1259–1277, 1988.
- DALY, D. Erythroxylaceae. In: SMITH, N. et al. (Eds.). *Flowering Plants of Neotropics*. Princeton, Oxford: Princeton University Press, 2004. p. 143-145.
- DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, v. 125, p. 1430–1435, 2011.
- DJORDJEVIC, A.; CANADANOVIC-BRUNET, J. M.; VOJINOVIC-MILORADOV, M.; BOGDANOVIC, G. Antioxidant properties and hypothetic radical mechanism of fulleranol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>. *Oxidation Communications*, v. 27, p. 806–812, 2004.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 446-452, 2006.
- ELIAS, S. T.; MACEDO, C. C. S.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. O.; LOFRANO-PORTO, A.; COLETTA, R. D.; NEVES, F. A. R.; GUERRA, E. N. S. Cytotoxic effect of *Erythroxylum daphnites* extract is associated with G1 cell cycle arrest and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *Cell Cycle*, v. 15, p. 948-956, 2016.
- FUKUMOTO, L.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 3597–3604, 2000.
- GOLDSCHMIDT, S.; RENN, K. Zweiwertiger Stickstoff: Über das α, α-Diphenyl-β-trinitrophenyl-hydrazyl. *Berichte der deutschen Chemischen Gesellschaft*, v. 55, p. 628-643, 1922.
- GONZÁLEZ-GUEVARA, J. L.; VÉLEZ-CASTRO, H.; GONZÁLEZ-GARCÍA, K. L.; PAYO-HILL, A. L.; GONZÁLEZ-LAVAUT, J. A.; MOLINA-TORRES, J.; PRIETO-GONZÁLEZ, S. Flavonoid glycosides from cuban *Erythroxylum* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 34, p. 539-542, 2006.
- HARBORNE, J. B. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. 1<sup>a</sup> ed. Chapman and Hall/CRC, 1996. 676 p.

- HEGNAUER, R. Chemotaxonomy of Erythroxylaceae (including some ethnobotanical notes on old world species). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 3, p. 279-292, 1981.
- HEYWOOD, V.H. et al. *Flowering plants families of the world*. Ontario: Firefly Books, 2007. 424 p.
- HOSSAIN, M. A.; RAHMAN, S. M. M. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, v. 44, p. 672-676, 2011.
- HUANG, D.; BOXIN, O.U.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1841-1856, 2005.
- KAPADI, A. H.; DEV, S. The Diterpenoids of *Erythroxylum monogynum*-III further constituents, the absolute stereochemistry of monogynol and hydroxymonogynol. *Tetrahedron Letters*, v. 5, p. 2751-2757, 1964.
- KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, v. 48, p. 412-422, 2011.
- KRINSKY, N.I.; JOHNSON, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 26, p. 459-516, 2005.
- LIEBERMAN, M. A brine shrimp bioassay for measuring toxicity and remediation of chemicals. *Journal of Chemical Education*, v. 76, p. 1689-1690, 1999.
- LOIOLA, M. I. B. A new species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) from the Brazilian semiarid region. *Phytotaxa*, v. 150, p. 61-64, 2013.
- LOIOLA, M. I. B. et al. Erythroxylaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M.A. (Orgs.) *Livro Vermelho da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. p. 502-506.
- LOIOLA, M. I. B.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; QUEIROZ, R. T. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. *Acta Botanica Brasilica*, v. 21, p. 473-487, 2007.
- LOIOLA, M. I. B.; SALES, M. F. *Erythroxylum ayrtonianum* (Erythroxylaceae): A New Species from Brazil. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, v. 22, p. 48-50, 2012.
- LOIOLA, M. I. B.; SALES, M. F. Two new species of *Erythroxylum* sect. *Rhabdophyllum* (Erythroxylaceae) from north-eastern Brazil. *Kew Bulletin*, v. 63, p. 655-659, 2008.
- LOIOLA, M.I.B.; COSTA-LIMA, J.L. Erythroxylaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB7680>>. Acesso em: 29 Abr. 2016
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. 1ª ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1970. 354 p.

- MAGALHÃES, L. M.; SANTOS, F.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, v. 83, p. 441–447, 2010.
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v. 37, p. 1517-1575, 1994.
- MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 45, p. 594-598, 1968.
- MARKHAM, K. R.; TERNAL, B. <sup>13</sup>C NMR of Flavonoids-II: Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. *Tetrahedron*, v. 32, p. 2607-2612, 1976.
- MARKHAM, K. R.; TERNAL, B.; STANLEY, R.; GEIGER, H.; MABRY, T. J. Carbon-13 NMR studies of Flavonoids-III: Naturally occurring Flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron*, v. 34, p. 1389-1397, 1978.
- MAYORGA, P.; PÉREZ, K. R.; CRUZ, S. M.; CÁCERES, A. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, p. 897-903, 2010.
- McLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*, v. 32, p. 513-524. 1988.
- MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 48, p. 91-91, 1971.
- MÜLLER, L.; GNOYKE, S.; POPKEN, A. M.; BÖHM, V. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, p. 992–999, 2010.
- NASCIMENTO C. J.; VIOLANTE, I. M. P.; GARCEZ, W. S.; POTT, A.; GARCEZ, F. R. Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxylum suberosum*. *Phytochemistry Letters*, v. 5, p. 401- 406, 2012.
- NASCIMENTO, M. N. G. ESTUDO QUÍMICO DE *Erythroxylum suberosum* (ERYTHROXYLACEAE) FRENTE ÀS CATEPSINAS K, L e V. 2014. 104 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão, 2014.
- OLADOYE, S. O.; AYODELE, E. T.; ABDUL-HAMMED, M.; IDOWU, O. T. Characterisation and Identification of Taraxerol and Taraxer-14-en-3-one from *Jatropha tanjorensis* (Ellis and Soroja) Leaves. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 58, p. 46-54, 2015.
- OLIVEIRA, F. F. S.; AGUIAR, P. N. C.; RIBEIRO, G. J. G.; AMORIM, M. L. L.; GUIMARAES, P. S. S.; MENDONCA FILHO, C. V.; SIVIERI, R. R. G.; BRANDAO, M. G. L.; SANTOS, W. T. P.; GRAEL, C. F. F. Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of Extracts of *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil (Erythroxylaceae). *Research Journal of Phytochemistry*, v. 9, p. 68-78, 2015.

- PICOT, M.; SUBRATTY, A.; MAHOMOODALLY, M. Phytochemical profile and antioxidant properties of six medicinal plants traditionally used in the management of diabetes in Mauritius. *Pharmacologia*, v. 5, p. 42–49, 2014.
- PLOWMAN, T. Erythroxyloaceae Kunth. In: STEVENS, W.D. et al. (Eds.). Flora de Nicaragua. *Monographs Systematic Botany Missouri Botanical Garden*. Missouri Botanical Garden Press, 2001. p. 834-838.
- PLOWMAN, T. Ten new species of *Erythroxyllum* (Erythroxyloaceae) from Bahia, Brazil. *Fieldiana: Botany*, v. 19, p. 1-41, 1987.
- PLOWMAN, T.; HENSOLD, N. Names, types and distribution of neotropical species of *Erythroxyllum* (Erythroxyloaceae). *Brittonia*, v. 56, p. 1-53, 2004.
- PRIETO, M. A.; RODRÍGUEZ-AMADO, I.; VÁZQUEZ, J. A.; MURADO, M. A.  $\beta$ -Carotene Assay Revisited. Application To Characterize and Quantify Antioxidant and Prooxidant Activities in a Microplate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, p. 8983-8993, 2012.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 4290–4302, 2005.
- PYRZYNSKA, K.; PEKAL, A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical methods*, v. 5, p. 4288-4295, 2013.
- RIBEIRO, E. M. O. ESTUDO FITOQUÍMICO de *Erythroxyllum rimosum* O.E.Schulz e *Erythroxyllum betulaceum* Mart. (ERYTHROXYLACEAE). 2011. 265 f.. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, 2011.
- RIBEIRO, E. M. O.; LIMA, L. S.; DAVID, J. M.; VALE, A. E.; LOPES, L. M. X.; DAVID, J. P. A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxyllum rimosum* (Erythroxyloaceae). *Phytochemistry Letters*, v. 6, p. 232-235, 2013.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 20, p. 933–938, 1996.
- ROCHA, M. M.; BORGES, A. C. P.; BUDKE, J. C.; VALDUGA, A. T.; CANSIAN, R. L.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A. Potencial Antioxidante de *Erythroxyllum deciduum* A. St. Hil. In vitro e In vivo. *Perspectiva*, v. 39, p. 07-14, 2015.
- SALAZAR, G. C. M.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A.; LULA, I. S. Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss:  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shift assignments. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 38, p. 977-980, 2000.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte, MG: FEPMVZ, 2002.

- SANTOS, C. C. Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil: *Erythroxylum barbatum* O. E. Schulz, *Erythroxylum amplifolium* (Mart.) O. E. Schulz (Erythroxylaceae) e *Croton sonderianus* Muell Arg. (Euphorbiaceae). 2007. 305 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- SCHWARZBACH, A. E.; RICKLEFS, R. E. Systematic affinities of Anisophylleaceae and Rhizophoraceae, and intergeneric relationships within Rhizophoraceae, based on chloroplast DNA, nuclear ribosomal DNA, and morphology. *American Journal of Botany*, v. 87, p. 547-564, 2000.
- SERRANO, C.; ORTEGA, T.; VILLAR, A.M. Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala – *Artemia salina* bioassay: A revision. *Phytotherapy Research*, v. 10, p. 118-120, 1996.
- SHARMA, K.; ZAFAR, R. Occurrence of taraxerol and taraxasterol in medicinal plants. *Pharmacognosy Review*, v. 9, p. 19-23, 2015.
- SINGH, S.; SINGH, R. P. In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. *Food Reviews International*, v. 24, p. 392–415, 2008.
- SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, v. 21, p. 557-559, 1998.
- SOLTIS, D.; SOLTIS, P.; CHASE, M. W.; MORT, M. E.; ALBACH, D. C.; ZANIS M.; SAVOLAINEN, V.; HAHN, W. H.; HOOT, S. B.; FAY, M. F.; AXTELL, M.; SWENSEN, S. M.; PRINCE, L. M.; KRESS, W. J.; NIXON, K. C.; FARRIS, J. S. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*. v. 133, p. 381-461, 2000.
- SOBRATTEE, M. A; BAHORUN, T.; NEERGHEEN, V. S.; GOOGOLYE, K.; ARUOMA, O. I. Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants. *Toxicology in vitro*, v. 22, p. 45–56, 2008.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JÚNIOR., G. M.; AYRES, M. C. C; COSTA, C. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*. v. 30, p. 351-355, 2007.
- SUNIL, C.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S.; AL-DHABI, N. A. Antioxidant, free radical scavenging and liver protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. leaves. *Food Chemistry*, v. 139, p. 860-865, 2013.
- WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, v. 17, p. 300-312, 2006.
- VASCONCELOS, J. M. J.; SILVA, A. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. Chromones and Flavanones from *Artemisia campestris* subsp. Maritima. *Phytochemistry*, v. 38, p. 310-313, 1998.

XIE, J.; SCHAICH, K. M. Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, p. 4251–4260, 2014.

YANISHILIEVA, N.V.I.; MARINOVA, E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chemistry*, v. 54, p. 377-382, 1995.