



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

BRUNO OLIVEIRA MOREIRA

**Estudo químico e avaliação das atividades biológicas de
Schinopsis brasiliensis (Anacardiaceae) e quantificação
dos bioativos de *Cenostigma macrophyllum* (Leguminosae)**

Salvador - BA
2014

BRUNO OLIVEIRA MOREIRA

**Estudo químico e avaliação das atividades biológicas de
Schinopsis brasiliensis (Anacardiaceae) e quantificação
dos bioativos de *Cenostigma macrophyllum* (Leguminosae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Mauricio David

Salvador - BA
2014

Sistema de Bibliotecas – IQ/UFBA

Moreira, Bruno Oliveira.

Estudo químico e avaliação das atividades biológicas de *Schinopsis brasiliensis* (Anacardiaceae) e quantificação dos bioativos de *Cenostigma macrophyllum* (Leguminosae). / Bruno Oliveira Moreira. - 2015.
262 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Maurício David.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2014.

1. Produtos naturais. 2. Anacardiaceae. 3. Leguminosa. 4. Antioxidantes. 5. Fitoquímico. I. David, Jorge Maurício. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. IV. Título.

CDD - 583.32

CDU - 547.9

Aos meus pais, Nivaldo e Evaní
As minhas irmãs, Lorena e Karol
Aos tão pequeninos e tão amorosos
Pedrinho e Caio.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus, sempre presente.

Aos meus amados pais, Nivaldo e Evaní, que sempre me guiaram no caminho da retidão e não mediram esforços para incentivar os meus estudos. As minhas queridas irmãs, Lorena e Karol, pela amizade e constantes incentivos.

Ao Prof. Dr. Jorge Maurício David pela orientação, por todo apoio dispensado, pelos ensinamentos e principalmente, pelo exemplo de competência e humildade.

A Prof^a Dr^a Juceni Pereira David pelo apoio e concessão do seu laboratório à época da interdição do IQ devido ao incêndio, fundamental para que nosso laboratório não parasse.

Aos professores do programa de pós-graduação em química da UFBA pelos valiosos ensinamentos.

A prof.^a Dr^a Regiane Yatsuda e todos os “meninos” do Lab. 115 e 103 que participaram da realização dos teste biológicos *in vivo*.

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo Lopes e a doutoranda Maria das Neves e seu marido Vando pela coleta do material vegetal.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Aos funcionários do Instituto de Química.

Aos amigos do GPPN Paty, José Candido, Darlan, Raul, Eliezer, Larissa “loira”, Angélica, Fábio, Vanessa, Hugo, Jéferson, Maísa, Luciano e Érika, pela maravilhosa convivência e diálogos enriquecedores e a Larissa “morena” pelo auxílio nos testes de atividade antioxidante.

Aos amigos dos outros grupos de pesquisa do IQ Neto, Raimundo, Téo, Lourenço, Ana Paula, Aldo e Jorginho que sempre foram solícitos.

As minhas queridas IC's Bel, Ramine e Dai muito obrigado! Deixo registrado aqui a minha imensa torcida pelo sucesso de vocês.

Ao amigo Clayton por ter cedido alguns padrões para análises e mais que isso pela amizade nessa longa jornada.

Ao IMS por ter permitido “um semestre” de afastamento para o término dos experimentos.

Aos colegas do IMS Re, Mariluze, Anderson, Angélica, Elenir, Lucas, Telma, Robson, Maise, Amélia, Braga, Tiana, Dani, Patrício, Gil, Juliano, Andrea e Carol pelos incentivos.

Aos meus amigos Adriano, Rafael, Milton, Jardel, Douglas, Luana, Marcelo, Adriana, Gama, Robson, Juracir, Deny e Cleber que sempre me incentivaram.

A minha companheira Nai por todo o seu amor, amizade, companheirismo, por compartilhar as angustias dessa fase e tornar muito mais agradáveis minhas idas a Salvador, por incentivar e ajudar na parte analítica do trabalho e, após tudo isso, ainda me fazer feliz.

Enfim, a todos que estiveram ao meu lado durante essa longa caminhada.

O homem erudito é um descobridor de fatos que já existem, mas o homem sábio é um criador de valores que não existem e que ele faz existir.

Albert Einstein

Se o conhecimento pode criar problemas, não é através da ignorância que podemos solucioná-los.

Isaac Asimov

RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico e a avaliação da atividade antioxidante, anticolinesterásica, antinociceptiva, anti-inflamatória e da toxicidade, de *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae), planta utilizada na medicina popular para o tratamento de impotência sexual, inflamação na garganta, tosse e diarreia. Também descreve o desenvolvimento e validação de um método analítico utilizando CLAE-DAD para quantificação de substâncias bioativas na casca do caule e nas folhas de *Cenostigma macrophyllum* Tul. (Leguminosae) e avaliação da atividade antioxidante, anticolinesterásica, antinociceptiva e anti-inflamatória dos extratos padronizados. As fases orgânicas obtidas por partição do extrato metanólico bruto dos galhos, casca e cerne da raiz de *S. brasiliensis* apresentaram boa atividade antioxidante, pelo método do sequestro do radical livre DPPH e do sistema β -caroteno/ácido linolênico. As fases CHCl_3 , AcOEt e BuOH do cerne e da casca da raiz de *S. brasiliensis* apresentaram atividade superior a 50% de inibição da acetilcolinesterase, ao passo que o extrato metanólico bruto da raiz apresentou atividade antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo*, avaliadas através dos ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético e determinação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. As fases hexânica, CHCl_3 e BuOH da casca e do cerne da raiz de *S. brasiliensis* apresentaram elevada toxicidade no teste da *A. salina*. Através da análise por CG-EM das fases hexânica e clorofórmica da raiz de *S. brasiliensis* foram identificados a presença principalmente de compostos fenólicos, ácidos graxos e seus ésteres metílicos, esteroides e carboidratos. Através de métodos cromatográficos usuais (CC, CCDP em sílica gel e permeação em gel de Sephadex LH-20) foi possível isolar das diferentes fases dos galhos e raízes de *S. brasiliensis* as substâncias β -sitosterol e seu derivado glicosilado, α e β -amirina, galato de metila, ácido gálico, ácido elágico, quercetina-3-O- β -D-xilopiranosídeo e os novos dímeros de chalcona 2',4,4',5-tetrahidroxichalcona-(2 \rightarrow 7'',8 \rightarrow 8'')-4''-hidroxietenilbenzeno (schinopsona A) e (7''*R,8''*S)-2',4,4',5-tetrahidroxichalcona-(2 \rightarrow 7'',8 \rightarrow 8'')-2''',4''',4'''-trihidroxí-7'',8''-dihidrochalcona (schinopsona B). As estruturas das substâncias isoladas foram elucidadas através da análise dos dados obtidos pelos espectros de massas de alta resolução, RMN de ^1H e ^{13}C (BB e DEPT), NOEdiff além de técnicas bidimensionais (HMBC, HMQC ou HSQC, NOESY). O método analítico de perfil cromatográfico desenvolvido e validado, utilizando CLAE-DAD, foi aplicado na quantificação de ácido gálico, galato de metila, ácido elágico, agathisflavona e amentoflavona no extrato metanólico das folhas e casca do caule de *C. macrophyllum*. Os extratos padronizados apresentaram boa atividade antioxidante, tanto pelo método do sequestro do radical livre DPPH quanto pelo sistema β -caroteno/ácido linolênico. No teste de atividade anticolinesterásica os extratos das folhas e da casca do caule apresentaram $68,77 \pm 1,20\%$ e $86,91 \pm 1,76\%$, respectivamente de inibição da acetilcolinesterase. A avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo* demonstraram que os dois extratos avaliados apresentaram boa atividade.

Palavras-chave: *Schinopsis brasiliensis*, dímeros de chalcona, *Cenostigma macrophyllum*, CLAE-DAD, atividade antioxidante, atividade anticolinesterásica, atividade anti-inflamatória e antinociceptiva.

Abstract

This work describes the phytochemical study and evaluation of antioxidant, anticholinesterase, antinociceptive, anti-inflammatory activities and toxicities of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae), a plant which is used in folk medicine to treat impotence, sore throat, cough and diarrhea. It also describes the development and validation of an analytical method by HPLC/DAD for quantification of bioactives compounds present in the bark of stem and leaves of *Cenostigma macrophyllum* Tul. (Leguminosae) besides the evaluation of antioxidant, anticholinesterase, antinociceptive and anti-inflammatory activities of its standardized extracts. The organic phases obtained from the partition of the crude methanol extract of stems, bark and heartwood of the root of *S. brasiliensis* showed good antioxidant activity by the methods of the quenching of DPPH and β -carotene/linolenic acid system. The CHCl_3 , EtOAc and BuOH phases of the heartwood and the bark of the roots of *S. brasiliensis* showed activity superior to 50% of inhibition of acetylcholinesterase, while crude methanolic extract from the root showed *in vivo* antinociceptive and anti-inflammatory activities, obtained by writhing in the acetic acid induced test and determination of neutrophil migration to the peritoneal cavities. The hexane, CHCl_3 and BuOH phases of the barks and heartwood of the roots of *S. brasiliensis* showed high toxicity in the brine shrimp test. By GC-MS of the hexane and chloroform extracts from root of *S. brasiliensis* could be identified mainly the presence of phenolic, fatty acids and their methyl esters, steroids and carbohydrates. Ordinary chromatographic techniques such as CC, CCDP on silica gel and gel permeation in Sephadex LH-20 permitted to isolate from the different organic phases of the branches and the roots β -sitosterol and its glycosyl derivative, α -amyrin, β -amyrin, methyl gallate, gallic acid, ellagic acid, quercetin-3-O- β -D-xylopyranoside and new chalcone dimers, the 2',4,4', 5-tetrahydroxychalcone-(2 \rightarrow 7', 8 \rightarrow 8')-4'-hydroxyetenylbenzene (schinopsone A) and the (7''*R,8''*S)-2',4,4',5-tetrahydroxychalcone-(2 \rightarrow 7'',8 \rightarrow 8'')-2'',4'',4'''-trihydroxy-7'',8''-dihydrochalcone (schinopsone B). The structures of the isolates were elucidated by the data obtained through, high-resolution mass spectra, ^1H and ^{13}C NMR (BB and DEPT), NOEdiff and two-dimensional NMR techniques (HMBC, HMQC or HSQC, NOESY). The chromatographic analytical method developed and validated using HPLC-DAD was applied to the quantification of gallic acid, methyl gallate, ellagic acid, agathisflavone and amentoflavone from the methanol extract of leaves and stems bark of *C. macrophyllum*. Standardized extracts showed good antioxidant activity, in both tests assayed (quenching of radical DPPH and β -carotene/linolenic acid system). Anticholinesterase activity of extracts from the leaves and bark of stem showed $68.77 \pm 1.20\%$ and $86.91 \pm 1.76\%$, respectively of acetylcholinesterase inhibition. The evaluation of the *in vivo* antinociceptive and anti-inflammatory activity demonstrated that both extracts evaluated show good activity.

Keywords: *Schinopsis brasiliensis*, chalcone dimers, *Cenostigma macrophyllum*, HPLC-DAD, antioxidant activity, anticholinesterase activity, anti-inflammatory and antinociceptive activity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Schinopsis brasiliensis* (ANACARDIACEAE)

Figura 1 – Distribuição da família Anacardiaceae (azul denota a presença de membros desta família).....	35
Figura 2 – Estrutura da mangiferina.	37
Figura 3 – Desenho com descrição detalhada das partes de <i>S. brasiliensis</i>	41
Figura 4 – Fotos de <i>S. brasiliensis</i> . A. Hábito. B. Folha e flores. C. Frutos.....	42
Figura 5 – Núcleo estrutural básico das chalconas.....	51
Figura 6 – Forma radicalar (A) e não radicalar (B) do DPPH.....	54
Figura 7 – Reações químicas envolvidas no teste de atividade anticolinesterase desenvolvido por Ellman.	57
Figura 8 – Procedimento experimental empregado no preparo dos extratos e das fases dos galhos, casca e cerne da raiz de <i>S. brasiliensis</i>	66
Figura 9 – Reação de sililação.....	89
Figura 10 – Cromatogramas de íons totais da fase hexânica da casca (A) e do cerne (B) de <i>S. brasiliensis</i>	89
Figura 11 – Cromatogramas de íons totais da fase clorofórmica da casca (A) e do cerne (B) da raiz de <i>S. brasiliensis</i>	92
Figura 12 – Dados físicos e espectrométricos das substâncias isoladas dos galhos e raízes de <i>S. brasiliensis</i>	94
Figura 13 – Espectro de RMN de ^1H das substâncias SB1 e SB2 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)].....	98
Figura 14 – Espectro de RMN de ^{13}C das substâncias SB1 e SB2 [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)].....	98
Figura 15 – Espectro de RMN de ^1H da substância SB3 [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)].....	100
Figura 16 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância SB3 [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)].....	100
Figura 17 – Espectro de RMN de ^1H da substância SB4 [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	101

Figura 18 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância SB4 [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	102
Figura 19 – Espectro de RMN de ^1H da substância SB5 [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	104
Figura 20 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância SB5 [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	105
Figura 21 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância SB5 [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	105
Figura 22 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância SB5 [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	106
Figura 23 – Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C da substância SB5 [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	106
Figura 24 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância SB5 [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	107
Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H da substância SB6 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)].....	110
Figura 26 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância SB6 [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)].....	110
Figura 27 – Espectro de RMN de ^1H da substância SB7 [300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ (ppm)].....	111
Figura 28 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância SB7 [300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ (ppm)].....	112
Figura 29 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm da subfração CCaRSB.3-C. Picos cromatográficos: 1 - galato de metila, $t_{R1} = 2,43$ min; 2 - ácido elágico, $t_{R2} = 3,90$ min.....	113
Figura 30 – Espectros no UV obtidos pelo detector DAD nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos cromatográficos 1 e 2 da figura 29.....	113
Figura 31 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do padrão galato de metila ($t_{R1} = 2,45$ min) e o seu espectro no UV obtidos pelo detector DAD nas regiões ascendente, apical e descendente.....	113
Figura 32 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do padrão ácido elágico ($t_{R1} = 3,90$ min) e o seu espectro no UV obtidos pelo detector DAD nas regiões ascendente, apical e descendente.....	114
Figura 33 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm da substância SB9	117
Figura 34 – Espectro no UV, obtido pelo detector DAD, da substância SB9	117

Figura 35 – Espectro de RMN de ^1H de SB9 [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	118
Figura 36 – Ampliações do espectro de RMN de ^1H de SB9 [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].	118
Figura 37 – Espectro de RMN de ^{13}C de SB9 [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	119
Figura 38 – Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C de SB9 [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	119
Figura 39 – Espectro de HSQC da substância SB9 [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].	120
Figura 40 – Espectro de HMBC da substância SB9 [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	120
Figura 41 – Espectro de massas da substância SB9	120
Figura 42 – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel A da unidade I da schinopsona A (SB9).....	121
Figura 43 – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel B da unidade I do dímero e na junção das unidades da schinopsona A (SB9).....	121
Figura 44 – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel B da unidade II do dímero e na junção com o C-7” da schinopsona A (SB9).....	121
Figura 45 – Estrutura da urundeuquina B.....	122
Figura 46 – Estruturas de urundeuquina A e urundeuquina C.....	127
Figura 47 – Proposta de rota biossintética para formação de schinopsona A e B.....	131
Figura 48 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 290$ nm da substância SB10	131
Figura 49 – Espectro no UV, obtido pelo detector DAD, da substância SB10	132
Figura 50 – Espectro no IV da substância SB10	132
Figura 51 – Espectro de massas da substância SB10	132
Figura 52 – Espectro de RMN de ^1H de SB10 [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	133
Figura 53 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H de SB10 [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	133
Figura 54 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H de SB10 [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	134
Figura 55 – Espectro de RMN de ^{13}C de SB10 [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	134
Figura 56 – Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C de SB10 [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	135

Figura 57 – Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C de SB10 [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	135
Figura 58 – DEPT 135° de SB10 [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	136
Figura 59 – Espectro de HMQC da substância SB10 [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	136
Figura 60 – Espectro de HMBC da substância SB10 [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	137
Figura 61 – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel B da unidade I da schinopsona B (SB10).....	137
Figura 62 – Principais correlações observadas no espectro de HMBC que permitiram conectar o anel A ao anel B da unidade I da schinopsona B (SB10).....	137
Figura 63 – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel B da unidade II da schinopsona B (SB10).....	138
Figura 64 – Correlações observadas no espectro de HMBC que possibilitaram a confirmação das posições de junção das duas unidades da schinopsona B (SB10).....	138
Figura 65 – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel A da unidade II da schinopsona B (SB10).....	138
Figura 66 – Ampliação do espectro NOESY da schinopsona B (SB10) na região de 4,0 a 8,4 ppm [500 MHz, CD_3OD].....	139
Figura 67 – Ampliação do espectro NOESY da schinopsona B (SB10) na região de 6,3 a 7,9 ppm [500 MHz, CD_3OD].....	139
Figura 68 – Espectro de NOEdiff da schinopsona B (SB10), para irradiação em 4,98 e 4,31 ppm [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].....	140
Figura 69 – Comparação dos resultados da AA pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH) das fases orgânicas dos galhos e raiz de <i>S. brasiliensis</i> e dos padrões.....	145
Figura 70 – Comparação dos valores de CE_{50} da AA pelo sistema β -caroteno/ácido linolênico das fases orgânicas dos galhos e raiz de <i>S. brasiliensis</i> e dos padrões em 30 e 60 min.....	147
Figura 71 - Comparação dos valores de %I inibição da AChE das fases orgânicas dos galhos e raiz de <i>S. brasiliensis</i> e do padrão em 30 e 60 min.....	150
Figura 72 – Efeito dos extratos MCarSB e MCErSB no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (1,0%) em camundongos.....	153
Figura 73 – Efeito dos extratos MCarSB e MCErSB (50 e 100 mg/Kg) sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, pré-tratados por via subcutânea 30 min antes da Carragenina (500 μg /cavidade) induzir peritonite.....	155

CAPÍTULO 2: Quantificação de bioativos por CLAE-DAD e avaliação da atividade biológica dos extratos padronizados de *Cenostigma macrophyllum* Tul. (Leguminosae)

Figura 1 – Foto do caule, flores e folhas de um espécimen de <i>C. macrophyllum</i>	174
Figura 2 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do extrato MCCM, referente à condição 1 da Tabela 7.....	204
Figura 3 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do extrato MCCM, referente à condição 2 da Tabela 7.....	205
Figura 4 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do extrato MCCM, referente à condição 3 da Tabela 7.....	205
Figura 5 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do extrato MCCM, referente às condições da Tabela 7. A) condição 4. B) condição 5.....	206
Figura 6 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do extrato MCCM, referente à condição 6 da Tabela 7.....	207
Figura 7 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do extrato MCCM, referente à condição 7 da Tabela 7.....	207
Figura 8 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do extrato MCCM, referente às condições da Tabela 7. A) condição 8. B) condição 9.....	208
Figura 9 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm, eluição gradiente do extrato MCCM, referente à condição 7 da Tabela 7, $t_R = 24,9$ minutos para o ácido elágico (AE).....	209
Figura 10 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm, eluição gradiente do extrato MCCM, referente às condições da Tabela 7. A) condição 10. B) condição 11. C) condição 12.....	210
Figura 11 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm, eluição gradiente do extrato MCCM, referente às condições da Tabela 7. A) condição 13. B) condição 14. C) condição 15.....	211
Figura 12 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm, eluição gradiente do extrato MCCM, referente às condições da Tabela 7. A) condição 16. B) condição 17. C) condição 18.....	212
Figura 13 – Cromatograma CLAE – UV/DAD ($\lambda = 265$ nm) obtido do extrato MCCM. Condição cromatográfica 17. Picos cromatográficos: 1 - ácido gálico (AG), $t_{R1} = 2,94$ min; 2 - galato de metila (GM), $t_{R2} = 14,04$ min; 3 - ácido elágico (AE), $t_{R3} = 35,56$ min e seus espectros no UV obtidos pelo detector DAD nas regiões ascendente, apical e	214

descendente.....	
Figura 14 – (A) Cromatograma CLAE – UV/DAD ($\lambda = 265$ nm) obtido do extrato MFCM. Condição cromatográfica 17. (B) Ampliação do cromatograma na região de 56 a 59 minutos. Picos cromatográficos: 1 - ácido gálico (AG), $t_{R1} = 2,90$ min; 2 - galato de metila (GM), $t_{R2} = 14,03$ min; 3 - ácido elágico (AE), $t_{R3} = 35,57$ min; 4 - agathisflavona (AT), $t_{R4} = 58,49$ min; 5 - amentoflavona (AM), $t_{R5} = 58,63$ min e seus espectros no UV obtidos pelo detector DAD nas regiões ascendente, apical e descendente.....	215
Figura 15 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) sobrepostos em $\lambda = 265$ nm de três soluções ($2,0$ mg mL ⁻¹) do extrato MCCM.....	216
Figura 16 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) sobrepostos em $\lambda = 265$ nm de injeções repetitivas (n=10) de uma solução do extrato MCCM ($2,0$ mg mL ⁻¹).....	218
Figura 17 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) sobrepostos em $\lambda = 265$ nm do padrão (ácido gálico - vermelho) e da amostra (azul) e comparação dos espectros no UV.....	220
Figura 18 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) sobrepostos em $\lambda = 265$ nm do padrão (galato de metila - azul) e da amostra (preto).....	220
Figura 19 – Comparação dos espectros no UV do padrão (galato de metila) e da amostra do cromatograma anterior (Figura 18).....	221
Figura 20 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) sobrepostos em $\lambda = 265$ nm do padrão (ácido elágico - preto) e da amostra (azul) e comparação dos espectros no UV.....	221
Figura 21 – (A) Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) sobrepostos em $\lambda = 265$ nm dos padrões (agathisflavona e amentoflavona - azul) e da amostra (preto). (B) Ampliação do cromatograma na região de 56 a 59 minutos e comparação dos espectros no UV...	222
Figura 22 – Curvas analíticas e seus parâmetros obtidos por padronização externa utilizando o método proposto para quantificação de AG , GM , AE e AT nos extratos MCCM e MFCM por CLAE – UV/DAD.....	223
Figura 23 – Curva analítica e seus parâmetros obtidos por padronização externa utilizando o método proposto para quantificação de AM nos extratos MCCM e MFCM por CLAE – UV/DAD.....	224
Figura 24 – Gráfico de distribuição dos resíduos das curvas analíticas construídas para o AG , GM , AE e AT	225
Figura 25 – Gráfico de distribuição dos resíduos da curva analítica construída para a amentoflavona.....	226
Figura 26 – Diagrama de Pareto para avaliação da robustez, utilizando área do pico como variável independente.....	237
Figura 27 – Diagrama de Pareto para avaliação da robustez, utilizando tempo de retenção como variável independente.....	237
Figura 28 – Cromatograma CLAE – UV/DAD ($\lambda = 265$ nm) do extrato MCCM. 1 - ácido gálico, $t_{R1} = 2,94$ min; 2 - galato de metila, $t_{R2} = 14,04$ min; 3 - ácido elágico, $t_{R3} = 35,56$	238

min.....	
Figura 29 – Cromatograma CLAE – UV/DAD ($\lambda = 265$ nm) do extrato MFCM. 1 - ácido gálico, $t_{R1} = 2,90$ min; 2 - galato de metila, $t_{R2} = 14,03$ min; 3 - ácido elágico, $t_{R3} = 35,57$ min; 4 - agathisflavona, $t_{R4} = 58,49$ min; 5 - amentoflavona, $t_{R5} = 58,63$ min.	239
Figura 30 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) sobrepostos em $\lambda = 265$ nm do extrato MCCM (na cor preta) e bergenina (azul).....	241
Figura 31 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do extrato MCCM. 1 - derivado ácido elágico (não identificado), $t_{R1} = 23,30$ min; 2 - ácido elágico, $t_{R2} = 35,56$ min 3 - derivado ácido elágico (não identificado), $t_{R3} = 50,09$ min e comparação dos espectros no UV.....	242
Figura 32 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) sobrepostos em $\lambda = 265$ nm do extrato MFCM (na cor preta) com: A) Vitexina. B) Isovitexina. C) Quercetina. D) Quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo. E) quercetina-3-O-(6''-O-galoil)- β -D-glicopiranosídeo e F) Quercetina-3-O-(6''-O-E- <i>p</i> -cumaroil)- β -D-glicopiranosídeo (todos na cor azul).....	243
Figura 33 – Comparação dos valores de CE_{50} dos extratos MCCM e MFCM e do padrão quercetina. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=3)...	246
Figura 34 – Comparação dos valores de CE_{50} dos extratos MCCM e MFCM e dos padrões BHT e BHA em 30 e 60 min. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=3).....	247
Figura 35 - Comparação dos valores de %I inibição da AChE dos extratos MCCM e MFCM e do padrões em 30 e 60 min. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=3).....	249
Figura 36 – Efeito dos extratos MCCM e MFCM no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (1,0%) em camundongos.....	251
Figura 37 – Efeito do extrato MFCM (100 mg/Kg) sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos pré-tratados por via subcutânea 30 min antes da Carragenina (500 μ g/cavidade) induzir peritonite.....	253

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1: Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Schinopsis brasiliensis* (ANACARDIACEAE)

Quadro 1 – Substâncias isoladas de *S. brasiliensis*..... 45

CAPÍTULO 2: Quantificação de bioativos por CLAE-DAD e avaliação da atividade biológica dos extratos padronizados de *Cenostigma macrophyllum* Tul. (Leguminosae)

Quadro 1 – Substâncias isoladas de *Cenostigma macrophyllum*..... 176

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Schinopsis brasiliensis* (ANACARDIACEAE)

Tabela 1 – Massas das fases orgânicas obtidas pela partição do extrato MeOH bruto dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	67
Tabela 2 – Massas das fases orgânicas obtidas pela partição do extrato MeOH bruto das raízes de <i>S. brasiliensis</i>	67
Tabela 3 – Frações obtidas da CC da fase hexânica dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	69
Tabela 4 – Frações obtidas da CC de HGSB.3.....	70
Tabela 5 – Frações obtidas da CC da fase diclometânica dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	71
Tabela 6 – Frações obtidas da CC da fase AcOEt dos galhos de <i>S. brasiliensis</i>	72
Tabela 7 – Frações obtidas da CC de AGSB.3.....	73
Tabela 8 – Frações obtidas da CC de AGSB.3B.....	73
Tabela 9 – Frações obtidas da CC de AGSB.3B-5.....	74
Tabela 10 – Frações obtidas da CC da fase hexânica da casca da raiz de <i>S. brasiliensis</i>	75
Tabela 11 – Frações obtidas da CC de HCaRSB.3.....	76
Tabela 12 – Frações obtidas da CC da fase clorofórmica das raízes de <i>S. brasiliensis</i>	77
Tabela 13 – Frações obtidas da CC de CCaRSB.3.....	78
Tabela 14 – Frações obtidas da CC de CCaRSB.5.....	79
Tabela 15 – Frações obtidas da CC de CCaRSB.5-B.....	79
Tabela 16 – Frações obtidas da CC de CCaRSB.5-C.....	80
Tabela 17 – Substâncias identificadas (% área relativa) na fase hexânica da casca e do cerne da raiz de <i>S. brasiliensis</i> .	90
Tabela 18 – Substâncias identificadas (% área relativa) na fase clorofórmica da casca e do cerne da raiz de <i>S. brasiliensis</i>	93
Tabela 19 – Dados de RMN de ¹ H (300 MHz) e de ¹³ C (75 MHz) de SB3 e SB4 [(CD ₃) ₂ CO*, CD ₃ OD**, δ (ppm)] e valores da literatura.....	102
Tabela 20 – Dados de RMN de ¹ H (300 MHz) e de ¹³ C (75 MHz) de SB5 [(CD ₃ OD, δ (ppm), mult., J (Hz)] e valores da literatura.....	108

Tabela 21 – Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz), inclusive de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C $^nJ_{\text{C,H}}$ ($n=1$, HMQC; $n=2$ e 3 , HMBC) de SB9 em CD_3OD [δ (ppm); mult.e J (Hz) entre parênteses] e comparação com valores da literatura.....	122
Tabela 22 – Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de SB10 em CD_3OD [δ (ppm); mult.e J (Hz) entre parênteses] e comparação com valores da literatura.....	128
Tabela 23 – Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz), inclusive de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C $^nJ_{\text{C,H}}$ ($n=1$, HMQC; $n=2$ e 3 , HMBC) de SB10 em CD_3OD [δ (ppm); mult.e J (Hz) entre parênteses] e comparação com valores da literatura.....	141
Tabela 24 – Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH) das fases orgânicas dos galhos e raiz de de <i>S. brasiliensis</i> e padrões.....	144
Tabela 25 – Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linolênico das fases orgânicas dos galhos e raiz de <i>S. brasiliensis</i> e padrões.....	146
Tabela 26 – Percentual de inibição da AChE (%I) obtido para as fases orgânicas e eserina (padrão).....	149
Tabela 27 – Resultados de Cl_{50} encontrados para a substância SB10 e eserina (padrão).....	149
Tabela 28 – Resultados do teste de letalidade frente A. salina para as fases orgânicas dos galhos e raízes de <i>S. brasiliensis</i>	151

CAPÍTULO 2: Quantificação de bioativos por CLAE-DAD e avaliação da atividade biológica dos extratos padronizados de *Cenostigma macrophyllum* Tul. (Leguminosae)

Tabela 1 – Massas dos extratos obtidos das folhas e da casca do caule de <i>C. macrophyllum</i>	193
Tabela 2 – Gradiente de eluição após a otimização do método.....	194
Tabela 3 – Concentrações dos padrões utilizadas na construção das curvas analíticas.....	196
Tabela 4 – Concentrações dos padrões utilizadas na avaliação da repetibilidade.....	197
Tabela 5 – Níveis das variáveis experimentais para o estudo da robustez.....	200
Tabela 6 – Matriz do planejamento fatorial completo (2^3) com valores reais e	200

codificados.....	
Tabela 7 – Condições cromatográficas utilizadas para avaliar o desenvolvimento e otimização da análise do extrato MCCM.....	202
Tabela 8 – Valores da média \pm desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos tempos de retenção (t_R) e das áreas dos picos cromatográficos de interesse mostrado na Figura 15, onde foi analisada amostras do extrato MCCM (repetibilidade).....	217
Tabela 9 – Valores da média \pm desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos tempos de retenção (t_R) e das áreas dos picos cromatográficos de interesse mostrado na Figura 16, onde foi analisada a precisão de injeção.....	218
Tabela 10 – Modelo de tabela de análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear dos parâmetros.....	227
Tabela 11 – Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear para curva analítica do ácido gálico.....	227
Tabela 12 – Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear para curva analítica do galato de metila.....	227
Tabela 13 – Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear para curva analítica do ácido elágico.....	228
Tabela 14 – Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear para curva analítica da agathisflavona.....	228
Tabela 15 – Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear para curva analítica da amentoflavona.....	228
Tabela 16 – Coeficientes de variação (CV) obtidos para as diferentes concentrações das substâncias utilizadas na avaliação da repetibilidade do método (n=4).....	231
Tabela 17 – Coeficientes de variação (CV) obtidos para as diferentes concentrações das substâncias utilizadas na avaliação da precisão intermediária (n=3).....	232
Tabela 18 – Resultados do ensaio de recuperação dos padrões nos extratos MCCM e MFCM para avaliar a exatidão do método (n=3).....	233
Tabela 19 – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para as substâncias avaliadas.....	234
Tabela 20 – Matriz do planejamento fatorial completo (2^3) com valores reais e codificados e respostas obtidas na realização do experimento.....	236
Tabela 21 – Concentração das substâncias de interesse nos extratos de <i>C. macrophyllum</i> em $\text{mg g}^{-1} \pm \text{DP}$	239
Tabela 22 – Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH) dos extratos MCCM e MFCM e do padrão.....	245
Tabela 23 – Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linolênico dos extratos MCCM e MFCM.....	247

Tabela 24 – Percentual de inibição da AChE (%I) obtido para os extratos e eserina 249
(padrão).....

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

λ – comprimento de onda

δ – deslocamento químico

$(CD_3)_2CO$ – acetona deuterada

AA – Atividade Antioxidante

ACaRSB – fase acetato de etila da casca da raiz de *Shinopsis brasiliensis*

ACeRSB – fase acetato de etila do cerne da raiz de *Shinopsis brasiliensis*

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ACN – acetonitrila

AcOEt – acetato de etila

AE – ácido elágico

AG – ácido gálico

AGSB – fase acetato de etila dos galhos de *Shinopsis brasiliensis*

AM – amentoflavona

ANOVA – análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AT – agathisflavona

ATCI – iodeto de acetiltiocolina

BB – Broad Band

BCaRSB – fase butanólica da casca da raiz de *Shinopsis brasiliensis*

BCeRSB – fase butanólica do cerne da raiz de *Shinopsis brasiliensis*

BEH – ethylene bridged hybrid

BGSB – fase butanólica dos galhos de *Shinopsis brasiliensis*

BHA – mistura de 2-*terc*-butil-4-hidroxianisol e 3-*terc*-butil-4-hidroxianisol

BHT – 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol

BSTFA – *N,O*-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

BuOH – butanol

CC – cromatografia em coluna

CCaRSB – fase clorofórmica da casca da raiz de *Shinopsis brasiliensis*

CCDC – cromatografia em camada delgada comparativa

CCDP – cromatografia em camada delgada preparativa

CCeRSB – fase clorofórmica do cerne da raiz de *Shinopsis brasiliensis*

CD₃OD – metanol deuterado
CDCl₃ – clorofórmio deuterado
CE₅₀ – concentração eficiente para reduzir a [DPPH] inicial em 50%
Cg – carragenina.
CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CI₅₀ – concentração inibitória para decrescer em 50%
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
CV – coeficiente de variação
d – dubleto
D.P. – desvio padrão
DA - Doença de Alzheimer
DAD – detector de arranjo de diodos
dd – duplo dubleto
DEPT – Distortionless Enhancement Polarization Transference
DGSB – fase diclorometânica dos galhos de *Shinopsis brasiliensis*
DL₅₀ – Dose letal média, concentração que dizima metade de uma população
DMSO-*d*₆ – dimetilsufóxido deuterado
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTNB – ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] - reagente de Ellman
EDTA – ácido etileno diamino tetra acético
EM – Espectrometria de massas
FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
g.l. – graus de liberdade
GM - galato de metila
GPPN – Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais
HCaRSB – fase hexânica da casca da raiz de *Shinopsis brasiliensis*
HCeRSB – fase hexânica do cerne da raiz de *Shinopsis brasiliensis*
HGSB – fase hexânica dos galhos de *Shinopsis brasiliensis*
HMBC – Heteronuclear multi bond correlation
HMQC – Heteronuclear multiple quantum coherence
HSQC – Heteronuclear Single Quantum Correlation
ICH - International Conference on Harmonization
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO - International Standard Organization

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

IV – espectroscopia no infravermelho

J – Constante de acoplamento

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

m – multiplete

m – número de níveis distintos da variável independente

MCCM - Extrato hidrometanólico da casca do caule de *Cenostigma macrophyllum*

MeOH - metanol

MFCM - Extrato hidrometanólico das folhas de *Cenostigma macrophyllum*

MHz – Megahertz

MQ_{ep} – média quadrática devido ao erro puro

MQ_{faj} – média quadrática devido à falta de ajuste

MQ_R – média quadrática da regressão

MQ_r – média quadrática dos resíduos

n – número total de observações

NOEdiff – Nuclear Overhauser Experiment Difference spectrum

NOESY – Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

p – número de parâmetros do modelo

PBS – Salina tamponada com fosfatos

RMN de ^{13}C – Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN de 1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RSD – desvio padrão relativo

s – singleto

s.c. – Subcutânea

Sephadex – Separation Pharmacia Dextran

SQ_{ep} – soma quadrática do erro puro

SQ_{faj} – soma quadrática da falta de ajuste

SQ_R – soma quadrática da regressão

SQ_r – soma quadrática dos resíduos

SQ_T – soma quadrática total

SRL – sequestro do radical livre DPPH

T - temperatura

t – tripleto

t_R – tempo de retenção

Trolox – ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

UV – ultravioleta

Vis – visível

vol. inj. – volume de injeção

WHO – Organização Mundial de Saúde, do inglês “World health organization”.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Schinopsis brasiliensis* (ANACARDIACEAE)

1. INTRODUÇÃO	33
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	35
2.1. A família Anacardiaceae.....	35
2.2. O Gênero <i>Schinopsis</i>	38
2.3. <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	40
2.4. Composição química e atividade biológica da espécie <i>S. brasiliensis</i>	44
2.5. Chalconas.....	51
2.6. Testes de atividade biológica.....	53
2.6.1. Atividade Antioxidante.....	53
2.6.1.1. Atividade antioxidante - Teste do sequestro do radical livre DPPH.....	54
2.6.1.2. Atividade antioxidante - Sistema β -caroteno/ácido linolênico.....	55
2.6.2. Atividade inibidora da acetilcolinesterase.....	56
2.6.3. Teste de letalidade frente a <i>Artemia Salina</i> Leach.....	57
2.6.4. Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.....	58
3. OBJETIVOS	60
3.1. Objetivo Geral.....	60
3.2. Objetivos Específicos.....	60
4. PARTE EXPERIMENTAL	62
4.1. Materiais, equipamentos e reagentes.....	62
4.2. Coleta e identificação da espécie.....	65
4.3. Preparo dos extratos e das fases orgânicas.....	65
4.4. Identificação das substâncias presentes em <i>S. brasiliensis</i> por CG-EM.....	67

4.5. Separação e purificação dos constituintes químicos de <i>S. brasilienses</i>	68
4.5.1. Fracionamento da fase hexânica dos galhos.....	68
4.5.1.1. Purificação da fração HGSB.3.....	69
4.5.2. Fracionamento da fase diclorometânica dos galhos.....	70
4.5.3. Fracionamento da fase acetato de etila dos galhos.....	71
4.5.3.1. Purificação da fração AGSB.3.....	72
4.5.4. Fracionamento da fase butanólica dos galhos dos galhos.....	74
4.5.5. Fracionamento da fase hexânica da casca da raiz.....	75
4.5.5.1. Purificação da fração HCaRSB.3.....	76
4.5.6. Fracionamento da fase clorofórmica da casca da raiz.....	76
4.5.6.1. Purificação da fração CCaRSB.3.....	78
4.5.6.2. Purificação da fração CCaRSB.5.....	78
4.5.6.2.1. Purificação da subfração CCaRSB.5-C.....	80
4.6. Testes de Atividade Biológica.....	81
4.6.1. Atividade antioxidante - Teste do sequestro do radical livre DPPH.....	81
4.6.2. Antioxidante - Sistema β -caroteno/ácido linolênico.....	82
4.6.3. Atividade inibidora da acetilcolinesterase.....	83
4.6.4. Teste de letalidade frente a <i>Artemia Salina</i> Leach.....	84
4.6.5. Atividade anti-Inflamatória e antinociceptiva.....	85
4.6.5.1. Animais.....	85
4.6.5.2. Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	86
4.6.5.3. Avaliação da migração de neutrófilos.....	86
4.7. Análise estatística.....	87
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
5.1. Análise das fases orgânicas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	88

5.2. Substâncias isoladas de <i>S. brasiliensis</i>	94
5.3. Identificação e determinação estrutural dos constituintes químicos isolados de <i>S. brasiliensis</i>	97
5.3.1. Identificação de SB1 e SB2.....	97
5.3.2. Identificação de SB3 e SB4.....	99
5.3.3. Identificação de SB5.....	103
5.3.4. Identificação de SB6 e SB7.....	109
5.3.5. Identificação de SB8.....	112
5.3.6. Determinação estrutural da schinopsona A (SB9).....	114
5.3.7. Determinação estrutural da schinopsona B (SB10)	124
5.4. Testes de atividades biológicas.....	143
5.4.1. Avaliação da Atividade Antioxidante.....	143
5.4.2. Avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase.....	148
5.4.3. Teste de letalidade frente a <i>Artemia Salina</i> Leach.....	150
5.4.4. Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.....	152
6. CONCLUSÕES	156
7. REFERÊNCIAS	158

CAPÍTULO 2: Quantificação de bioativos por CLAE-DAD e avaliação da atividade biológica dos extratos padronizados de *Cenostigma macrophyllum* Tul. (Leguminosae)

1. INTRODUÇÃO	170
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	173
2.1. O Gênero <i>Cenostigma</i>	173
2.2. <i>Cenostigma macrophyllum</i> Tul.....	174
2.3. Composição química e atividade biológica.....	175
2.4. Validação de métodos analíticos.....	182

3. OBJETIVOS	189
3.1. Objetivo Geral.....	189
3.2. Objetivos Específicos.....	189
4. PARTE EXPERIMENTAL	191
4.1. Materiais, equipamentos, reagentes e padrões analíticos.....	191
4.2. Coleta do material vegetal e preparo dos extratos.....	192
4.3. Condições Cromatográficas.....	193
4.4. Validação do método analítico.....	195
4.4.1. Seletividade.....	195
4.4.2. Linearidade.....	195
4.4.2.1 Construção da curva analítica por padronização externa.....	196
4.4.3 Precisão.....	196
4.4.3.1. Repetibilidade.....	196
4.4.3.2 Precisão intermediária.....	197
4.4.4. Exatidão.....	198
4.4.5. Limite de detecção.....	198
4.4.6. Limite de quantificação.....	198
4.4.7. Robustez.....	199
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	201
5.1. Otimização das condições cromatográficas.....	201
5.2. Avaliação dos parâmetros de desempenho do método analítico: repetibilidade e precisão de injeção.....	216
5.3. Validação do método analítico.....	219
5.3.1 Seletividade.....	219
5.3.2 Linearidade.....	223
5.3.3. Precisão.....	230
5.3.3.1. Repetibilidade.....	230

5.3.3.2. Precisão intermediária.....	232
5.3.4. Exatidão.....	233
5.3.5. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	234
5.3.6. Robustez.....	235
5.4. Análise quantitativa.....	238
5.5. Análise qualitativa.....	241
5.6. Teste de atividade biológica.....	244
5.6.1. Avaliação da Atividade Antioxidante.....	244
5.6.2. Avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase.....	248
5.6.3. Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.....	250
6. CONCLUSÕES.....	254
7. REFERÊNCIAS.....	256
ANEXO 1.....	262

Capítulo 1

**Estudo químico e avaliação da atividade biológica
de *Schinopsis brasiliensis* (ANACARDIACEAE)**

1. INTRODUÇÃO

Espécies vegetais vêm sendo usadas com fins medicinais desde os primórdios da humanidade. Grandes civilizações antigas, tais como a Egípcia, Greco-Romana e Chinesa já faziam uso dos recursos vegetais para tratar enfermidades. Nesse sentido, merece destaque, o uso terapêutico de espécies vegetais pela milenar medicina tradicional Chinesa, uma vez que essas plantas medicinais até hoje são estudadas com o intuito de isolar os princípios ativos e descobrir suas ações farmacológicas (VEIGA JUNIOR, PINTO & MACIEL, 2005; VIEGAS, BOLZANI & BARREIROS, 2006).

O reino vegetal é responsável pela maior parte das substâncias orgânicas conhecidas. A ampla diversidade de estrutura dos metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas é resultado de milhões de anos de evolução e interação com o meio ambiente (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

Devido à necessidade do desenvolvimento de fármacos mais eficientes ou que combatam patologias ainda sem tratamento existe um interesse, por parte da indústria farmacêutica e órgãos de pesquisa, na busca de novas substâncias bioativas de fontes vegetais (SANTOS, 2014).

No entanto, do universo de 500 mil espécies de plantas existentes somente 5% têm sido estudada sob o ponto de vista químico e uma porcentagem ainda menor avaliada sob os aspectos biológicos ou farmacológicos (WOLFENDER, RODRIGUEZ & HOSTETTMANN, 1998). Quanto ao estudo de plantas utilizadas com fins medicinais, foi estimado em um trabalho realizado por Assad e Ferro (2005) que no mundo, pelo menos 35 mil espécies de plantas possuem propriedades medicinais, mas apenas 5.000 foram estudadas com o intuito de se detalhar as suas aplicações medicinais. No Brasil, pelo menos 300 plantas medicinais são utilizadas de forma terapêutica pela população. E para piorar a situação, o fantasma da extinção das espécies torna-se cada vez mais presente e ameaçador, estimando-se que mil espécies sejam extintas por ano no planeta, sendo que muitas dessas espécies ainda nem foram descritas, catalogadas e estudadas. Um impacto ainda maior é visto nas florestas tropicais, que cobrem cerca de 7% da superfície terrestre

e abriga aproximadamente 50% de todas as espécies existentes (MEDEIROS, 2003).

A contribuição dos produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos é inquestionável e pode ser evidenciada pelos dados compilados por Newman, Cragg e Snader (2007), onde ficou evidenciado que dos 974 novos fármacos introduzidos no mercado americano no período entre 1981 e 2006, cerca de metade (51%) são produtos naturais, análogos semi-sintéticos ou produtos sintéticos baseados em grupos farmacofóricos de produtos naturais. Contudo, o potencial não explorado de plantas como fonte de substâncias bioativas é enorme.

Depois da descoberta de alguns medicamentos, que geram bilhões de dólares para a indústria farmacêutica, é possível entender a corrida entre algumas indústrias internacionais pela busca de novas substâncias com atividade farmacológica. Esta busca foi intensificada nos anos 90, principalmente nas florestas tropicais onde se concentra grande parte da biodiversidade e especialmente no Brasil, onde a grande maioria das espécies continua sem qualquer estudo químico ou biológico (PINTO et al., 2002).

Assim, a pesquisa de produtos naturais a partir de plantas ocorrentes no Brasil apresenta elevado potencial para a identificação de novas substâncias bioativas com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos contribuindo, assim, para consolidar e inovar o setor farmacêutico nacional (PEREIRA, 2012).

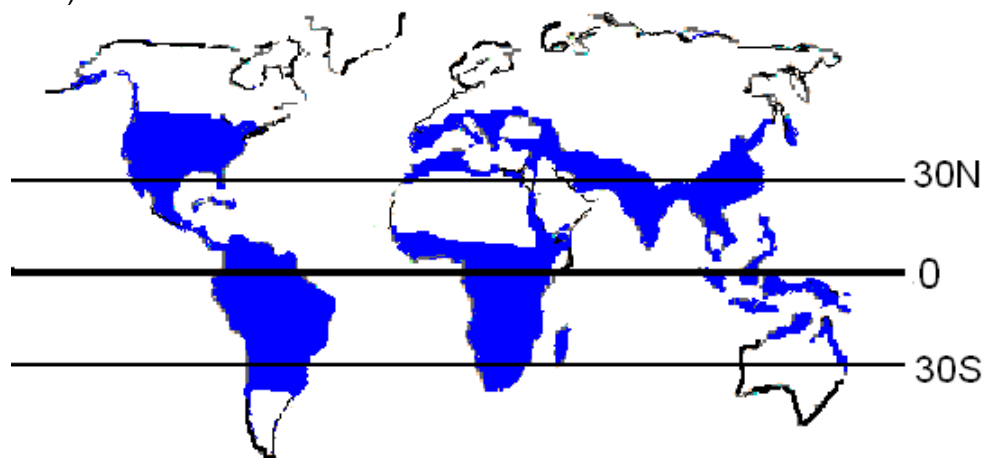
Desta forma, o Brasil não deve abdicar de sua vocação para o estudo de produtos naturais, visto que possui a maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta e é detentor da maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta (PINTO et al., 2002).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. A família Anacardiaceae

A família Anacardiaceae pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Sapindales. É constituída por 76 gêneros e cerca de 600 espécies. Seus gêneros são subdivididos em cinco tribos: Anacardieae, Dobineae, Rhoeeae, Semecarpeae e Spondiadeae (VOGL & MITCHELL, 1996), ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais com algumas espécies em regiões temperadas, membros desta família não são encontrados em áreas secas do deserto (Figura 1) (SILVA, CHINALIA & PAIVA, 2008).

Figura 1 – Distribuição da família Anacardiaceae (azul denota a presença de membros desta família)



Fonte: http://www.clarku.edu/departments/biology/biol110/Rachel/Shmook_webpage.html.
Acesso em: 18 de ago. 2014.

Cerca de 25% dos gêneros dessa família são conhecidos como tóxicos e causadores de dermatite de contato severa. De modo geral, as espécies venenosas desta família estão restritas às tribos Anacardieae, Rhoeeae, Semecarpeae e Spondiadeae (CORREIA, DAVID & DAVID, 2006), e a principal função de seus metabólitos secundários é, presumivelmente, atuar como defensivo contra vertebrados e insetos herbívoros.

A dermatite de contato provocada por essas plantas é atribuída, principalmente, a derivados de compostos fenólicos e catecólicos ou a mistura destas substâncias, denominadas lipídios fenólicos. Essas substâncias podem estar presentes em diferentes partes do material vegetal, ocorrendo principalmente em espécies do gênero *Rhus* (CORREIA, DAVID & DAVID, 2006). O *Rhus* é o maior da família Anacardiaceae compreendendo aproximadamente 200 espécies, sendo, nas Américas, as causadoras mais comuns de dermatite de contato alérgica (MASESANE et al. 2000).

No Brasil algumas espécies de Anacardiaceae são bastantes populares, pois seus frutos são comestíveis, com elevado valor comercial e crescente demanda, bem como, tem valor terapêutico. Podem ser citados como exemplo a mangueira (*Mangifera indica* L.), a cajazeira (*Spondias brasiliensis*) e o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). Destas espécies, as duas últimas são árvores originárias da flora brasileira, sendo a cajazeira dispersa de forma isolada e agrupada, notadamente na Amazônia e na Mata Atlântica, prováveis zonas de dispersão da espécie (SOUZA et al. 2000), ao passo que o cajueiro é encontrado em quase todo o território brasileiro, sendo que a região Nordeste, com uma área plantada superior a 650 mil hectares, responde por mais de 95% da produção nacional (CULTIVO..., 2003).

O cajueiro como um todo constitui uma verdadeira panacéia e seu uso pelos índios remonta aos tempos anteriores à chegada dos portugueses ao Brasil, sendo empregado pelas tribos amazônicas durante séculos. Essa espécie é usada pelos índios no tratamento da diarreia, contra resfriados, gastrite, cólicas, tosses persistentes e afecções pulmonares. É rico em taninos o que lhe confere atividade adstringente, anti-inflamatória e hemostática. A decocção das cascas e a infusão das folhas são usadas como tônico, no tratamento da diabetes e anti-inflamatório (Cardoso, 2007; MORAIS et al. 2005). A atividade biológica de *A. occidentale* é extensamente reportada na literatura, sendo encontrados vários trabalhos descrevendo atividades como antifúngicas, antibacteriana, antivirais, anti-inflamatória (AKINPELU, 2001; GONÇALVES et al. 2005; MOTA, THOMAS & BARBOSA FILHO, 1985; SCHMOURLO et al. 2005). Outro estudo relatou a capacidade dos extratos de *A. occidentale* em fornecer proteção contra estreptozootocina, causadoras de diabetes em ratos (KAMTCHOUING et al. 1998). A atividade antioxidante desta espécie foi exaustivamente estudada (ROACH et al.,

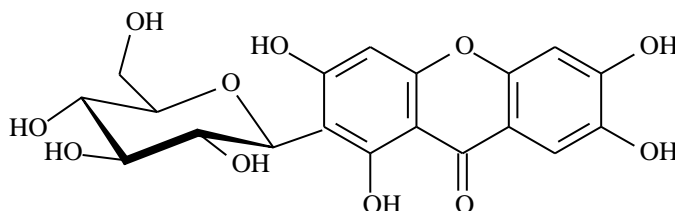
2003; KORNSTEINER, WAGNER & ELMADFA, 2003; KUBO et al. 2006; TREVISAN et al. 2006; ABAS et al. 2006; RAZALI et al. 2008). Estudo recente também relatou que as folhas de *A. occidentale* proporcionou um efeito vasodilatador sobre aorta isolada de rato (RUNNIE et al. 2004).

A mangueira (*Mangifera indica* L.) é outra espécie de Anacardiaceae bastante difundida no Brasil. Segundo dados publicados pela FAO, o Brasil é o quinto maior produtor de mangas, embora isso represente apenas 2,7% do total da produção global de 26 milhões de toneladas.

Além de seu grande emprego como alimento a manga é utilizada na medicina popular para ampla variedade de enfermidades, não só no Brasil como em várias partes do mundo. Estudos recentes demonstraram que extratos de *M. indica* L. possuem atividade antiviral, antibacteriana, analgésica, anti-inflamatória, imunomoduladora (MAKARE, BODHANKAR & RANGARI, 2001), amebicida *in vitro* (TONA et al. 1998), atividade inibitória das enzimas α -amilase e α -glicosidase (PRASHANTH et al. 2001), cardiotônica e propriedades diuréticas (SCARTEZZINI & SPERONI, 2000).

A mangiferina, 1,3,6,7 tetrahidroxixantona-2-C- β -glicopiranosídeo (Figura 2), já foi isolada de várias partes da *M. indica*, como por exemplo folhas, frutos, casca do caule, cerne e raízes (MAKARE et al. 2001). De acordo com Scartezzini e Speroni (2000) a porcentagem desta substância em *M. indica* é de 6,9 %.

Figura 2 – Estrutura da mangiferina



Estudos realizados com extratos aquosos das cascas do caule de uma variedade selecionada de *M. indica*, resultaram em uma formulação farmacêutica cujo nome fantasia é VIAMANG[®], o qual já foi demonstrado exercer atividade

antioxidante *in vitro* e *in vivo*. O componente predominante nesse extrato é a mangiferina (10%). No entanto, além desta substância, o extrato contém ácidos fenólicos, tais como, ácido gálico, ácido benzóico e ácido 3,4-dihidroxi-benzóico, ésteres fenólicos, tais como galato de metila, galato de propila e o benzoato de propila, bem como flavan-3-óis, tais como, catequina e epicatequina. Sendo, também, rico em ácidos graxos, tais como, mirístico, palmítico, esteárico, oléico, linoléico e eicosatrienoico (GARRIDO et al. 2004).

Assim, espécies da família Anacardiaceae têm se mostrado bastante promissoras na busca de substâncias bioativas. Do ponto de vista químico, os gêneros mais estudados desta família são *Mangifera*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Anacardium*, *Spondias*, *Lanea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira* e *Melanorrhoea*. *Mangifera*, *Rhus* e *Anacardium* destacam-se pelo número de investigações relativas à composição química de suas espécies e atividades biológicas de seus extratos e metabólitos. Os estudos destas espécies possibilitaram verificar a ocorrência de flavonoides, terpenos, esteroides, xantonas e, principalmente, dos lipídios fenólicos e derivados. Destaca-se que entre os flavonóides, os biflavonoides são os mais frequentes (CORREIA, DAVID & DAVID, 2006). As bichalconas, também denominadas de dímeros de chalconas, estão bem representadas na família (REDDY et al. 2011).

2.2. O Gênero *Schinopsis*

O gênero *Schinopsis* é constituído por 14 espécies conhecidas devido à utilização de suas madeiras nos meios rurais e urbanos para curtimento de couro ou na indústria madeireira devido à resistência a degradação por umidade, ataque de insetos e radiação ultravioleta (WILLIANS, MILLER & GNAGSTAD, 2001). Assim, em virtude da sua estrutura e constituição química, espécies desse gênero sofrem menos ataques de vários organismos deterioradores, principalmente de fungos e cupins. A resistência à deterioração pode ser atribuída à presença de taninos e substâncias fenólicas complexas, que são tóxicas aos organismos xilófagos (CARDOSO, 2007).

São encontrados poucos relatos na literatura sobre estudos fitoquímicos e avaliação da atividade biológica realizados com espécies do gênero *Schinopsis*, do qual as principais espécies estudadas são *S. balansae* e *S. lorentzii* devido a grande quantidade de taninos condensados encontrados nessas espécies.

Da espécie *S. balansae* é relatada atividade antimicrobiana, antioxidante e antimultagênica dos taninos condensados obtidos a partir dos extratos aquosos (MARTINEZ et al. 2009; NELSON et al. 1997; SALVAT et al. 2001), atividade antioxidante da casca do caule (KANG, et al. 2013), bem como estudo sobre avaliação química e atividade biológica de óleos essenciais (AZZAM, 2004a; ZHI, 2008). Em relação ao estudo fitoquímico dessa espécie é descrito, essencialmente, trabalhos relacionados aos taninos e a tentativa de identificar suas unidades formadoras (KING & WHITE, 1957a; ROUX & PAULUS, 1994; STREIT & FENGEL, 1994).

Da espécie *S. lorentzii* pode ser encontrado na literatura o estudo da inibição da atividade da tirosinase por proantocianidinas (TAKAGI & MITSUNAGA, 2003), atividade citotóxica (AZZAM, 2004b), avaliação da propriedade antifúngica (FICOSECO et al., 2014; TASCIOGLU et al., 2013), avaliação do efeito dos taninos obtidos dessa espécie adicionados na dieta de ruminantes e ovelhas (LÓPEZ-ANDRÉS et al., 2013; VASTA et al., 2009) e estudo sobre avaliação química e biológica de óleos essenciais das folhas (AZZAM, 2004a). Em relação aos estudos fitoquímicos é relatado o isolamento de alcaloides (AZZAM, 2004b), a identificação de antocianidinas (ROUX, 1957), avaliação do teor e estruturas dos taninos (KARDEL et al., 2013) e identificação de algumas substâncias por CG-EM (FICOSECO et al., 2014).

O único trabalho descrito na literatura sobre atividade biológica e estudo fitoquímico da espécie *S. haenkeana* é sobre a sua atividade antifúngica e identificação através de CG-EM de algumas substâncias presentes nas folhas (FICOSECO et al., 2014).

Não foram encontrados relatos de estudos fitoquímicos e avaliação de atividades biológicas de outras espécies de *Schinopsis* além das citadas, com exceção de *S. brasiliensis*, espécie que é o objeto de estudo desse trabalho e tem poucos estudos fitoquímicos e sobre avaliação da atividade biológica descritos na literatura, conforme será detalhado a seguir.

2.3. *Schinopsis brasiliensis* Engl.

Schinopsis brasiliensis Engler (Figura 3 e 4, p. 41 e 42) é uma árvore típica da caatinga, com 10-12 metros de altura, cerca de 60 cm de diâmetro e com ramos providos de espinhos fortes (ENGLER, 1879 apud OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2008), pertencente à família Anacardiaceae, sendo o principal representante do gênero *Schinopsis*, nativo do Brasil. É conhecida popularmente como braúna, baraúna, braúna-parda e braúna-do-sertão no Nordeste, chamacoco ou chamucoco no Pantanal matogrossense, sendo o nome popular quebracho empregado apenas no Pantanal. Este nome deriva da palavra em espanhol “quebra acha” com o significado em português de “quebra machado” em alusão à dureza de sua madeira. Quanto a sua distribuição, ocorre em quase toda a área das caatingas da Bahia à Paraíba, com poucos representantes do Rio Grande do Norte ao Piauí (LIMA, 1989).

S. brasiliensis é uma árvore endêmica do Brasil, sendo uma espécie xerófita, heliófita, totalmente decídua durante o período seco, florescendo em épocas variáveis de um ano para o outro, o mesmo ocorrendo com sua frutificação e maturação dos frutos. Ocorre sempre em solos de várzea ricos em cálcio e nutrientes, bem suprido de matéria orgânica e umidade em profundidade.

Sua madeira é de grande valor econômico para região nordestina, apresenta cerne duro e resistência a fungos xilófagos. Assim, a baraúna fornece madeira de excelente qualidade, densa ($1,23 \text{ g/cm}^3$), castanho-escura, de grande resistência mecânica e praticamente imputrescível (PAES, MORAES & LIMA, 2004), sendo muito empregada na construção civil, no fabrico de móveis e produção de postes, mourões e vigamentos, pois é considerada madeira de lei por muitos autores (GONZAGA et al. 2003). *S. brasiliensis* é rica em taninos, a madeira seca contém 25% destes, que são encontrados em muitas plantas usadas como ervas medicinais. Os taninos podem ser encontrados em raízes, flores, frutos, folhas, cascas e na madeira, servem para proteger as plantas contra os herbívoros e as doenças patogênicas (SERVIÇO...,2009).

Figura 3 – Desenho com descrição detalhada das partes de *S. brasiliensis*



Fonte: <http://florabrasiliensis.cria.org.br/taxonCard?id=7976> Acesso em: 18 de ago. 2014.

Figura 4 – Fotos de *S. brasiliensis*. **A.** Hábito. **B.** Folha e flores. **C.** Frutos



Fonte: **A-** Prof. Dr. Wilson Araújo Lopes. **B-** Centro nordestino de informações sobre plantas (http://www.cnip.org.br/banco_img/Barauna/schinopsisbrasiliensis4.html). **C.** <http://www.roquevalente.com/barauna%20tree.htm> Acesso em: 18 de ago. 2014

Na medicina popular o caule, casca do caule, folhas, frutos e a resina da baraúna são usados no tratamento de fraturas, inflamações em geral, impotência sexual, inflamação na garganta, tosse, gripe e diarreia (ALBUQUERQUE et al., 2007). Segundo Agra (2007) a forma de uso e o modo de administração da casca do caule de *S. brasiliensis* na medicina popular é a decocção de um punhado da casca do caule em um litro de água com açúcar como xarope, tomando de três a quatro vezes ao dia até os sintomas desaparecerem, ou a decocção de um punhado da casca do caule em um litro de água, tomado como chá. No entanto, a forma de uso e o modo de administração varia muito de região para região e é dependente da parte da planta usada. A baraúna também é usada para o tratamento de verminoses em animais e como fonte energética, devido a sua boa qualidade como combustível (CARDOSO, 2007; SILVA et al. 2008).

Mesmo com lugar de destaque na flora Nordestina, particularmente na caatinga, tanto pela sua exuberância e beleza quanto por suas diversas aplicações. O emprego irracional da baraúna para diversos fins, especialmente o madeireiro e a dificuldade e demora na germinação de suas sementes (OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2008), fez com que o IBAMA através da Portaria N° 37-N, de três de abril de 1992 considerasse *S. brasiliensis* como uma das espécies da flora brasileira ameaçada de extinção, classificada como vulnerável. De acordo com Almeida & Albuquerque (2002) uma espécie vulnerável é aquela que sofre sistemática perseguição e, além disso, é muito popular. É importante destacar que da lista oficial da flora brasileira ameaçada de extinção apenas duas espécies são do bioma Caatinga, sendo ambas da família Anacardiaceae e uma delas a *S. brasiliensis* (BRASIL, 2008).

Na Bahia o Conselho Estadual de Meio Ambiente - CEPRAM no artigo primeiro da resolução N° 1.009 de seis de dezembro de 1994 determinou a proibição do corte rasante, armazenamento e comercialização de algumas espécies nativas em todo território do Estado, entre elas a *S. brasiliensis*.

Portanto, diante do exposto, fica evidente a necessidade de conservação de espécies de plantas arbóreas com relevância econômica e medicinal, tal como *S. brasiliensis*. Segundo Reis (1996), espécies medicinais não poderão ser consideradas somente como um recurso terapêutico; Assim, é necessário estabelecer estratégias para desenvolver técnicas de manejo sustentável, aliada com a manutenção do equilíbrio do ecossistema.

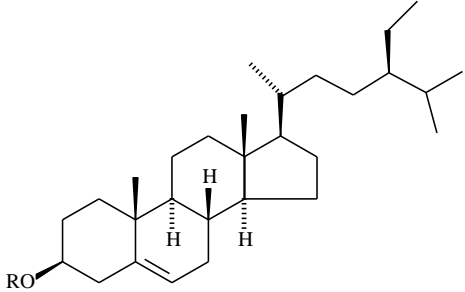
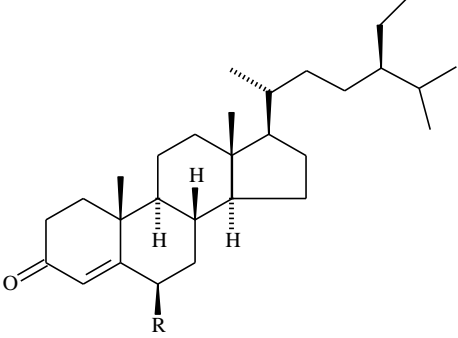
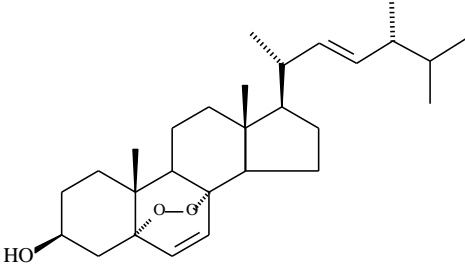
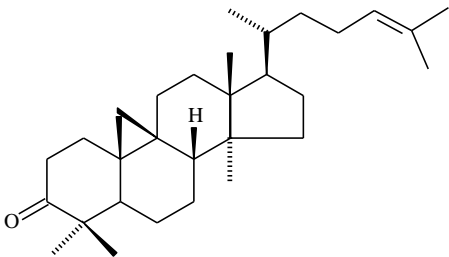
2.4. Composição química e atividade biológica da espécie *S. brasiliensis*

Em relação à avaliação das atividades biológicas de *S. brasiliensis* há relatos na literatura sobre a atividade antioxidante das folhas e sementes (ESTEVAM et al., 2006; FARIAS et al., 2013; MOREIRA et al., 2009; SARAIVA et al., 2011), avaliação da atividade antimicrobiana das folhas, casca do caule, casca da raiz, flor, vargens e sementes (SARAIVA et al., 2007, 2011, 2013; CHAVES et al., 2011, FARIAS et al., 2013;), avaliação da toxicidade, utilizando o bioensaio da *Artemia salina*, das folhas e casca do caule (CARDOSO, 2007; SARAIVA et al., 2011) e avaliação da atividade anticolinesterásica das sementes (FARIAS et al., 2013). Também há relatos da determinação de fenólicos totais e flavonoides totais em extratos obtidos das folhas dessa espécie (SARAIVA et al., 2011).

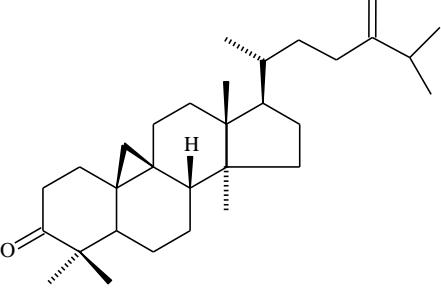
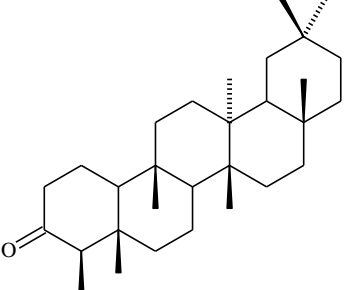
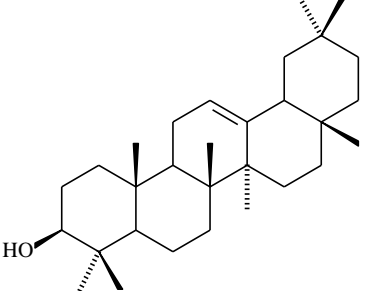
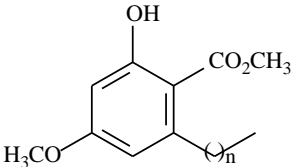
Há poucos estudos fitoquímicos realizados com *S. brasiliensis*, sendo estes recentes e desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa (GPPN). Os trabalhos conduzidos por Cardoso (2001, 2007) e Moreira (2009) resultaram no isolamento de diversas substâncias, inclusive cloradas (Quadro 1), das fases hexânica, clorofórmica ou diclorometânica e acetato de etila, obtidas por partição do extrato metanólico bruto da casca do caule e das folhas dessa espécie.

Desta forma, o fracionamento dos extratos orgânicos dos galhos e da raiz de *S. brasiliensis* é o primeiro relato de estudo fitoquímico dessas partes da espécie. Este estudo tem sua importância maximizada por se tratar de uma espécie que apresenta uso na medicina popular e está na lista das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. Além de acrescentar ao conhecimento quimiotaxinômico das espécies pertencentes ao gênero *Schinopsis*.

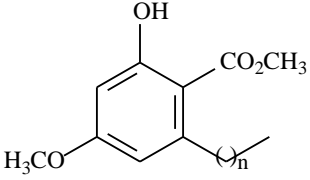
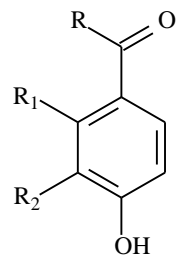
Quadro 1 – Substâncias isoladas de *S. brasiliensis*.

Substâncias	Parte da planta	Referência
 <p>R = OH. β-sitosterol R = Glic. β-sitosterol-glicosilado</p>	casca do caule e folhas	(CARDOSO, 2001, 2007) (MOREIRA, 2007)
 <p>R = H. Estigmast-4-en-3-ona R = OH. Estigmast-4-en-3-ona-6-β-ol</p>	casca do caule	(CARDOSO, 2001, 2007)
 <p>5α,8α- epidioxiergosta-6,22-dien-3-β-ol</p>	casca do caule	(CARDOSO, 2001)
 <p>cicloartenona</p>	Hexânica	casca do caule (CARDOSO, 2001)

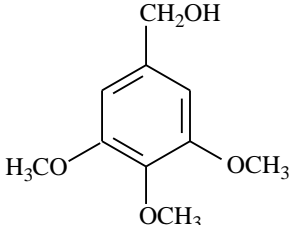
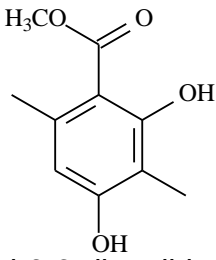
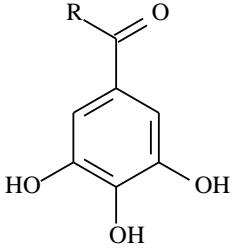
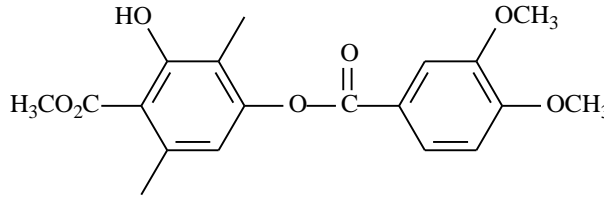
Quadro 1 – Substâncias isoladas de *S. brasiliensis*.

Substâncias	Fase	Parte da planta/ Referência
 <p>24-metileno-cicloartenona</p>	Hexânica	casca do caule (CARDOSO, 2001)
 <p>Friedelina</p>	Hexânica	Folhas (MOREIRA, 2009)
 <p>β-amirina</p>	Hexânica	Folhas (MOREIRA, 2009)
 <p>n=1 6-etil-2-hidroxi-4-metoxibenzoato de metila n=2 6-propil-2-hidroxi-4-metoxibenzoato de metila n=3 6-butil-2-hidroxi-4-metoxibenzoato de metila</p>	Hexânica	casca do caule (CARDOSO, 2001)

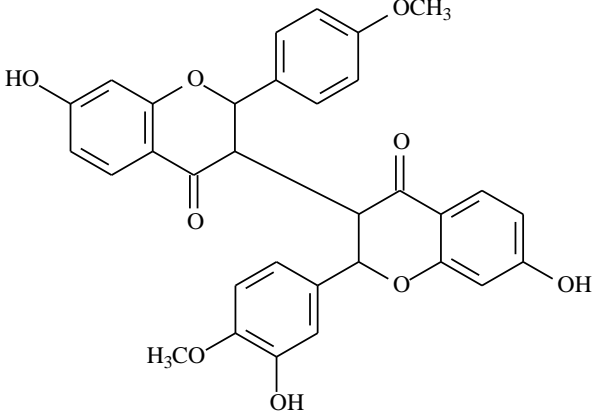
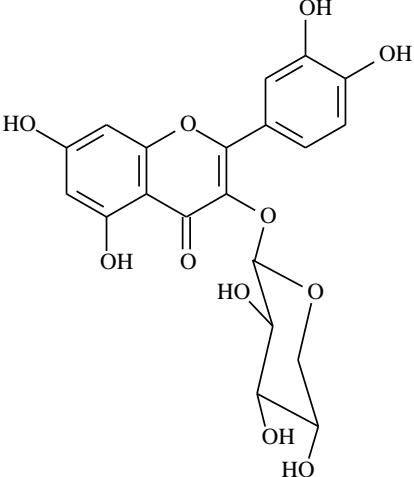
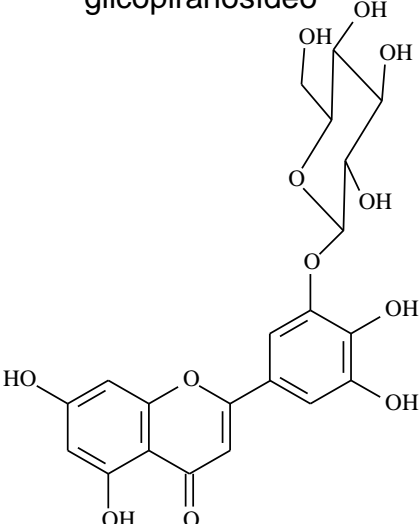
Quadro 1 – Substâncias isoladas de *S. brasiliensis*.

Substâncias	Fase	Parte da planta/ Referência
 <p>n=5 6-hexil-2-hidroxi-4-metoxibenzoato de metila</p> <p>n=6 6-heptil-2-hidroxi-4-metoxibenzoato de metila</p> <p>n=7 6-octil-2-hidroxi-4-metoxibenzoato de metila</p> <p>n=11 6-dodecil-2-hidroxi-4-metoxibenzoato de metila</p> <p>n=19 6-eicosanil-2-hidroxi-4-metoxibenzoato de metila</p>	Hexânica	casca do caule (CARDOSO, 2001)
 <p>R = H, R₁ = H, R₂ = OCH₃. 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído</p> <p>R = OH, R₁ = H, R₂ = OCH₃. Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico</p> <p>R = H, R₁ = OH, R₂ = H. 2,4-dihidroxibenzaldeído</p> <p>R = OCH₃, R₁ = OH, R₂ = H. 2,4-dihidroxibenzoato de metila</p>	casca do caule	(Cardoso, 2007)

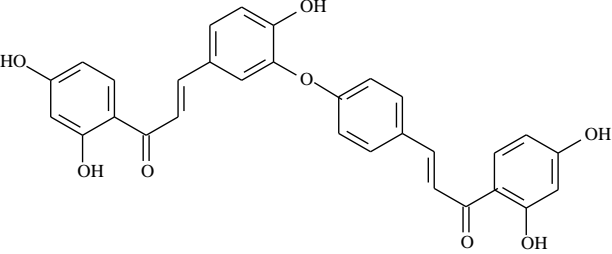
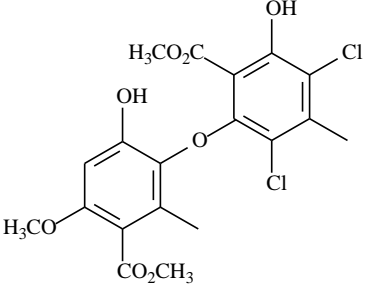
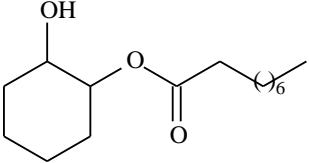
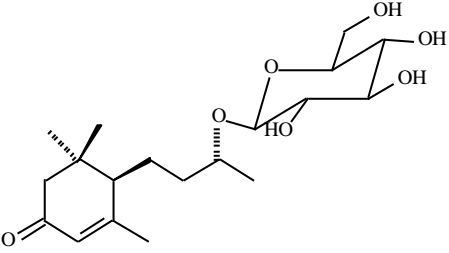
Quadro 1 – Substâncias isoladas de *S. brasiliensis*.

Substâncias	Fase	Parte da planta/ Referência
 <p>álcool 3,4,5-trimetoxibenzílico</p>	casca do caule	(CARDOSO, 2007)
 <p>2,4-dihidroxi-3,6-dimetil-benzoato de metila</p>	casca do caule	(CARDOSO, 2007)
 <p>R = OCH₃. Galato de metila R = OH. Ácido gálico</p>	casca do caule e folhas	(CARDOSO, 2007) (MOREIRA, 2009)
 <p>2-hidroxi-3,6-dimetil-4-(3,4-dimetoxi-benzoiloxi)-benzoato de metila</p>	casca do caule	(CARDOSO, 2007)

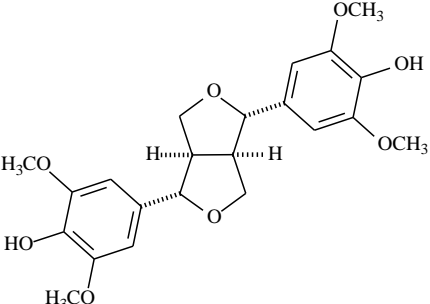
Quadro 1 – Substâncias isoladas de *S. brasiliensis*.

Substâncias	Fase	Parte da planta/ Referência
 <p data-bbox="236 840 831 913">4'-metoxi-7-hidroxi-flavanona-(3→3'')-3'''-metoxi-4''',7''-dihidroxi-flavanona</p>	casca do caule	(Cardoso, 2007)
 <p data-bbox="277 1444 783 1482">quercetina-3-O-β-D-xilopiranosídeo</p>	Folhas	(MOREIRA, 2009)
<p data-bbox="277 1514 783 1588">5,7,4',5'-tetrahidroxiflavona-3'-O-β-glicopiranosídeo</p> 	Folhas	(MOREIRA, 2009)

Quadro 1 – Substâncias isoladas de *S. brasiliensis*.

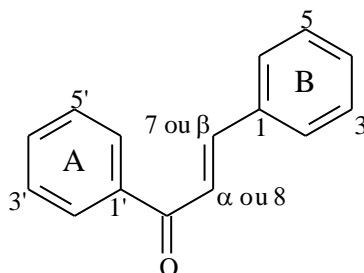
Substâncias	Fase	Parte da planta/ Referência
 <p>4,2',4'-trihidroxicalcona-(3→O→4'')-2''',4'''-dihidroxicalcona.</p>	Clorofórmica	casca do caule (Cardoso, 2007)
 <p>3,5-dicloro-6-(6-hidroxi-4-metoxi-3-metoxicarbonil-2-metil-fenoxi)-2-hidroxi-4-metil-benzoato de metila</p>	casca do caule	(CARDOSO, 2007)
 <p>3-nonanoiloxi-ciclohexanol</p>	casca do caule	(CARDOSO, 2007)
 <p>(6<i>R</i>,9<i>R</i>)-megastigmadi-4-en-3-ona 9-<i>O</i>-β-glicopiranosídeo</p>	Folhas	(MOREIRA, 2009)

Quadro 1 – Substâncias isoladas de *S. brasiliensis*.

Substâncias	Fase	Parte da planta/ Referência
 <p style="text-align: center;">Siringaresinol</p>	casca do caule	(Cardoso, 2007)

2.5. Chalconas

O termo chalcona é utilizado para caracterizar uma classe de compostos que possui como esqueleto fundamental 1,3-diarilpropeno, modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupamento cetona e/ou de um grupamento hidroxila (Figura 5). As chalconas são compostos precursores da via de biossíntese dos flavonoides. O esqueleto básico das chalconas, dois anéis aromáticos conectados por três átomos de carbono ($C_6-C_3-C_6$), é formado biossinteticamente pela união de duas subunidades, uma proveniente do ácido chiquímico responsável pela unidade fenilpropano (anel B), cujo precursor é o tio-éster *p*-cumaroil-CoA e outra da via do acetato (anel A), pela condensação de três unidades de malonil-CoA (BRAVO, 1998; MANN, 1994; ZUANAZZI, 2000).

Figura 5 – Núcleo estrutural básico das chalconas

As chalconas podem existir em duas formas isoméricas (*Z* e *E*), das quais o isômero *E* é considerado termodinamicamente favorável (DHAR, 1981) e por isso é encontrado em maior abundância na natureza.

Diferentemente de outros flavonoides, as chalconas não possuem, na sua estrutura, o anel pirânico que é formado pela adição do oxigênio à posição C-6' e subsequente ciclização com a cadeia de três átomos de carbono e o anel A. Essa característica específica as tornam substâncias quimicamente diferentes dos flavonoides. As chalconas de origem natural sempre apresentam substituintes e, entre os mais comuns, localizados no núcleo aromático, estão as hidroxilas, metoxilas, O-glicosilas, C-glicosilas e C-alquilas (CESARIN, FERREIRA & BRAZ, 2001; ZUANAZZI, 2000).

Uma característica importante nessa classe de compostos é a pigmentação amarela, que passa a vermelha em meio alcalino. Essas substâncias têm um papel importante em sistemas ecológicos em função das cores que produzem nos vegetais e são encontradas em diferentes órgãos, sobretudo nas flores. As cores estão especialmente envolvidas na polinização atuando como atraentes de insetos e pássaros (BRAVO, 1998).

Além do papel sobre sistemas ecológicos as chalconas apresentam uma ampla variedade de atividades farmacológicas a depender dos grupos substituintes presentes nos anéis A e B, tais como, citotóxica, quimiopreventiva, antioxidante, antimicrobiana, antiviral, anticâncer, antiprotzoária, inseticida, anti-inflamatória, antinociceptiva, anti-histamínica e antiulcerogênica, antifúngica, antileishmania, antimalárica e anticolinesterásica (DIMMOCK et al., 1999; HASAN et al., 2005; LEBEAU et al., 2000; NI, MENG & SIROSKI, 2004; NOWAKOWSKA et al., 2007; VIANA et al. 2003).

2.6. Testes de atividade biológica

2.6.1. Atividade Antioxidante

Antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparado ao substrato oxidável, reduz ou previne significativamente a oxidação deste substrato (BENZIE, 1996).

Nos últimos anos vem aumentando o interesse no estudo dos antioxidantes devido principalmente às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo humano. Os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica (BARREIROS, DAVID & DAVID, 2006). No entanto, o seu excesso apresenta efeitos prejudiciais em nível molecular que estão associados a danos às macromoléculas biológicas como lipídios, proteínas, enzimas e até ao DNA (HALLIWELL, 1994). Dessa forma, o desequilíbrio dos radicais livres no organismo encontra-se relacionado com diversas patologias manifestadas como arterosclerose, artrite reumatóide, choque hemorrágico, doenças do coração, doenças autoimunes, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (HALLIWELL, GUTTERIDGE & CROSS, 1992).

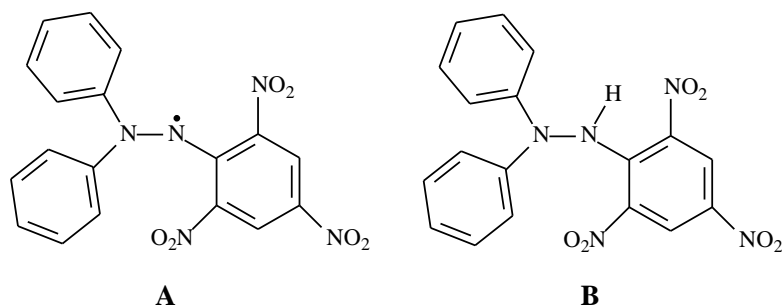
As plantas produzem uma grande variedade de substâncias antioxidantes que atuam prevenindo os danos moleculares causados por espécies reativas de oxigênio (ERO). Os compostos fenólicos compreendem o principal grupo de compostos antioxidantes de origem vegetal, entre estes destacam-se os flavonoides. Os antioxidantes naturais são indicados para atenuar os efeitos deletérios do estresse oxidativo nos organismos. Estudos recentes mostram que vários extratos de plantas exercem ação antioxidante (NUNES et al., 2008).

2.6.1.1. Atividade antioxidante - Teste do sequestro do radical livre DPPH

Existem na literatura vários testes para se determinar a eficiência, de extratos ou substâncias puras, no sequestro de radicais livres. Uma forma simples, rápida e reprodutiva consiste na capacidade de sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta. Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de um determinado substrato em sequestrar o radical DPPH (Figura 6). Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, este radical é reduzido com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido e o decaimento da absorvância é medido espectrofotometricamente. Este método é considerado, do ponto de vista metodológico, um dos mais simples, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais e substâncias puras (ALVES et al., 2010).

Figura 6 – Forma radicalar (A) e não radicalar (B) do DPPH



2.6.1.2. Atividade antioxidante - Sistema β -caroteno/ácido linolênico

Carotenoides são um amplo grupo de pigmentos sintetizados por plantas e microorganismos, insolúvel em água, mas facilmente solúvel em ambientes hidrofóbicos e solventes pouco polares. Essas substâncias podem ser metabolizadas pelo organismo humano quando ingeridas através do consumo de frutas e vegetais. Alguns estudos têm demonstrado que o β -caroteno, o mais abundante dos carotenoides, é capaz de inibir a auto-oxidação de lipídios em tecidos biológicos e produtos alimentícios. (ALVES, 2010; MUELLER & BOEHM, 2011).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de extratos de plantas ou substâncias puras potencialmente interessantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes métodos destaca-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linolênico, originalmente descrito por Marco (1968) e modificado por Miller (1971).

Este método avalia a inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linolênico. Os radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$) formados a partir da abstração de um átomo de hidrogênio de um dos grupos metileno adjacentes às ligações duplas do ácido linolênico seguida pela sua oxidação, ataca as moléculas do β -caroteno altamente insaturadas, promovendo a perda de algumas das suas ligações duplas. Esse processo resulta na perda da coloração laranja característica do sistema, sendo esse processo acompanhado por medidas espectrofotométricas. A extensão da oxidação do β -caroteno pode ser retardada pela presença de um antioxidante (AH), que pode ser uma substância pura ou extrato vegetal, o qual doa um átomo de hidrogênio para extinguir os radicais livres $\text{ROO}\cdot$. Essa reação resulta em um antioxidante na forma radicalar ($\text{A}\cdot$) que é mais estável do que os radicais peroxila (WETTASINGHE & SHAHIDI, 1999; TERPINC, BEZJAK & ABRAMOVIC, 2009).

A habilidade de inibir a oxidação do β -caroteno nesse tipo de testes *in vitro* também é resultado da combinação de outros fatores como temperatura e presença de oxigênio em condições que acelerem a reação de oxidação (PRADO, 2009).

2.6.2. Atividade inibidora da acetilcolinesterase

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva, que causa perda de memória e altera as funções intelectuais superiores, sendo a maior causa de declínio cognitivo em idosos. É associada a diversos fatores de risco, tais como: idade avançada, genótipo da apolipoproteína, traumatismo craniano com perda de consciência, diabetes, hipertensão, elevados níveis de colesterol e fumo. Geralmente, o paciente evolui para morte em torno de 8 a 10 anos após o início do quadro (ARAÚJO, 2010). Atualmente, no mundo, existem cerca de 35,6 milhões de pessoas acometidas pela DA, e a tendência ao envelhecimento populacional torna esses dados ainda mais preocupantes (ADI...,2014).

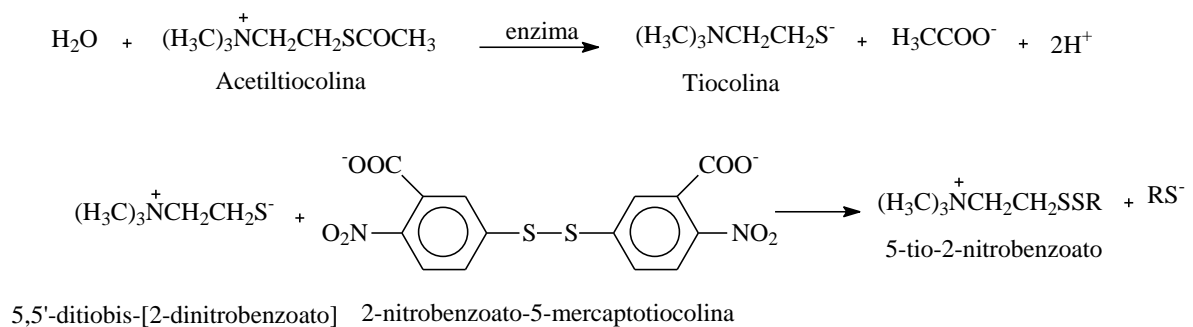
No final dos anos 1970 descobriu-se que os cérebros de pacientes com DA são deficientes em acetilcolina (ACh), um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso central que serve para aumentar a atenção e facilitar a aprendizagem. Observou-se que muitos relatos de déficits cerebrais ligados a DA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

Os medicamentos mais modernos utilizados para tratar os sintomas da DA elevam os níveis de ACh pela inibição da acetilcolinesterase (AChE). O medicamento considerado mais efetivo no tratamento é a galantamina, um alcaloide anticolinesterásico, isolado de plantas da família Amaryllidaceae. Além de alcaloides, outras classes de metabólitos também possuem atividade anticolinesterásica (GIORDANI et al., 2008). Contudo, essa inibição não pode ser exagerada, pois pode causar uma elevada atividade dos receptores colinérgicos, causando possíveis efeitos tóxicos como: hiperatividade, asfixia e até morte (WALKER, 2001).

Existem na literatura várias formas de determinar a inibição da AChE, principalmente adaptações do método de Ellman (1961) e na reação com acetato de 1-naftil desenvolvido por Marston (2002). Neste teste é proposto um método fotométrico de detecção da ação inibitória da enzima AChE, utilizando-se como

substrato a acetiltiocolina, um análogo do substrato natural ACh sendo a atividade enzimática avaliada através do aumento da coloração amarela decorrente da hidrólise de acetiltiocolina a acetato e tiocolina. Este último, após reagir com íon 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoato] (reagente de Ellman), produz o íon colorido 5-tio-2-nitrobenzoato cuja formação pode ser medida em 405 nm em um espectrofotômetro comum (Figura 7).

Figura 7 – Reações químicas envolvidas no teste de atividade anticolinesterase desenvolvido por Ellman



2.6.3. Teste de letalidade frente a *Artemia Salina* Leach

Com o objetivo de estudar a toxicidade de novos produtos naturais, muitos ensaios podem ser utilizados, sendo o mais acessível o teste da letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina*, que foi desenvolvido por Meyer (1982) para detectar compostos bioativos em extratos vegetais.

Substâncias bioativas são quase sempre tóxicos em altas doses. Desta maneira, a avaliação da letalidade em um organismo animal menos complexo pode ser usada para um monitoramento simples e rápido durante o fracionamento de extratos. O ensaio de letalidade em larvas de *A. salina* tem sido introduzido na rotina de muitos grupos de pesquisa envolvidos com isolamento, purificação e elucidação estrutural, já que muitos laboratórios de fitoquímica não estão preparados para a realização de ensaios biológicos (LHULLIER; HORTA & FALKENBERG, 2006). Os cistos de *A. salina* são de baixo custo e facilmente encontrados no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco (Meyer et al., 1982).

Atualmente este organismo pode ser considerado um indicador confiável quanto à toxicidade aguda de extratos orgânicos ou substâncias puras. Esta consideração encontra-se fundamentada em estudos de bioensaios comparativos entre o teste de letalidade frente *A. salina* e testes *in vitro* com linhagens de células cancerígenas, realizado com diversas substâncias reconhecidamente citotóxicas (ANDERSON et al., 1991). Ficou demonstrado, através desse estudo, que o ensaio com *A. salina* é tão acurado quanto os testes realizados com células cancerígenas, proporcionando assim um teste preliminar para seleção de substâncias que podem apresentar atividade anticancerígena de forma simples, econômica e confiável.

2.6.4. Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória

O uso de plantas medicinais como agente analgésico e anti-inflamatório é uma prática comum e, por isso, espécies vegetais têm sido alvo de estudos recentes em diversos modelos, como: contorções abdominais induzidas por agentes álgicos como carragenina, nocicepção induzida por formalina, avaliação da migração de neutrófilos, edema induzido por carragenina, entre outros. Desta forma, a avaliação dos efeitos farmacológicos pode ser usada como estratégia para descobrir novos fármacos de origem vegetal (SOUSA et al., 2009).

Desde os primórdios da humanidade o homem mostrou preocupação em entender as diversas doenças que o afetam, sendo a dor o primeiro sintoma de várias patologias sempre houve um interesse em esclarecer as razões da sua ocorrência e entender os mecanismos para controlá-la. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IAPS) define a dor como uma experiência desagradável, de natureza sensorial, cognitiva e emocional caracterizada por um estímulo nocivo excessivo associado a uma lesão tissular real ou potencial (MILLAN, 1999).

A dor pode ser classificada de diversas maneiras, dependendo do enfoque ao qual se destina esta análise. Em relação ao tempo de permanência da dor no organismo, podemos classificá-la como transitória, aguda e crônica (LOESER & MELZACK, 1999). Em se tratando da origem da estimulação do processo doloroso podemos classificar a dor como nociceptiva (desencadeada pela estimulação dos nociceptores localizados em várias partes do organismo), neurogênica (dano

tecidual neuronal nos Sistemas Nervosos Periférico ou Central), neuropática (disfunção de nervos) e psicogênica, que é a mais difícil de trabalhar, já que não se origina de uma fonte somática detectável, sendo possivelmente desencadeada por fatores psicológicos (MILLAN, 1999).

É aconselhável não usar o termo dor quando o sujeito experimental não pode definir verbalmente a resposta algica. Assim, no contexto de experimentação animal, torna-se preferível a utilização do termo resposta nociceptiva, que engloba as respostas comportamentais e neurofisiológica da dor, dissociando-as do caráter cognitivo-afetivo da resposta (LAPA et al., 2007).

Inflamação é a resposta de um tecido vivo e vascularizado a um agente infeccioso, a um antígeno ou mesmo a um estímulo irritante de natureza física, química ou traumática. Esta resposta se manifesta pela presença de rubor (eritema) dor e perda de função do tecido ou órgão afetado. A instalação de um processo inflamatório pode ser identificada pelo aumento do fluxo sanguíneo local, da permeabilidade vascular causado pela retração de células endoteliais, extravasamento de macromoléculas plasmáticas acompanhada de água levando a formação do edema (LAPA et al., 2007).

Em geral, as lesões teciduais desencadeiam uma reação inflamatória local através do recrutamento de leucócitos que liberam mediadores inflamatórios locais tais como: cininas (bradicinina e calidina), citocinas (interleucinas e fator de necrose tumoral), aminas (serotonina e histamina) e prostanoídes (prostaglandinas, prostaciclina e leucotrienos). Esses mediadores são capazes de estimular e sensibilizar os nociceptores provocando a dor (NUNES, 2012).

Recentemente, o estudo dos mediadores envolvidos no processo inflamatório e da dor vem sendo alvo de um crescente número de estudos. Uma vez que, existe a necessidade de obtenção de um novo fármaco de origem natural eficaz no tratamento do processo inflamatório e da dor que não apresente efeitos colaterais como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e corticosteroides. Desta forma, o estudo de substâncias naturais que possam interferir neste complexo processo biológico é de extrema relevância (AQUINO, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Esse trabalho tem como objetivos isolar e determinar a estrutura dos metabólitos presentes nos galhos e raízes de *Schinopsis brasiliensis*, avaliar as fases orgânicas estudadas e as substâncias isoladas, através de testes de atividade biológica, contribuindo, assim, para o conhecimento químico e potencial biológico das espécies da família Anacardiaceae presentes na caatinga do estado da Bahia.

3.2. Objetivos Específicos

- Isolar, através de métodos cromatográficos, os constituintes químicos provenientes do metabolismo secundário presentes nas fases orgânicas dos galhos e raízes de *S. brasiliensis*;
- Determinar a estrutura das substâncias isoladas através de métodos espectrométricos como RMN de ^1H e de ^{13}C e outros experimentos (DEPT, HMBC, HMQC, NOESY, NOEdiff), além de EM, IV, $[\alpha]_D$, CG-EM, CLAE e comparação com dados da literatura;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* das fases orgânicas através do método do sequestro radical livre DPPH e do sistema β -caroteno/ácido linolênico;
- Avaliar a atividade inibidora da acetilcolinesterase *in vitro* das fases orgânicas e substâncias isoladas;
- Submeter as fases orgânicas ao teste de letalidade frente à *Artemia salina*;

- Avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva *in vivo* dos extratos metanólicos do cerne e casca da raiz de *S. brasiliensis*.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiais, equipamentos e reagentes

Os solventes empregados no preparo dos extratos, na solubilização das amostras, nas eluições em CCDC, CCDP e CC (hexano, acetato de etila, clorofórmio, diclorometano e metanol) foram de grau analítico de procedência Quimex, Qhemis e Synth)

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

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

Nas cromatografias em camada delgada preparativa foram utilizadas placas de gel de sílica 60 F₂₅₄ de 1mm de espessura da Merck[®] e Analtech, placas cromatográficas de alta resolução de 500 e 1000 µm de espessura.

Os métodos de revelação utilizados nas cromatografias em camada delgada consistiram na exposição das placas à radiação, empregando-se, em gabinete apropriado, lâmpada ultravioleta nos comprimentos de onda de 256 e 366 nm (Spectroline - Model CM-10, Fluorescence Analysis Cabinet), vapores de iodo, solução de cloreto férrico (5% em etanol) e reagente de Liebermann-Burchard. Para o preparo desse reagente foram previamente misturados 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e 10 mL de anidrido acético e, posteriormente, essa mistura foi cuidadosamente adicionada à 50 mL de etanol resfriado em banho de gelo.

Os evaporadores rotatórios utilizados para evaporação de solventes sob pressão reduzida foram das marcas BUCHI 461 e IKA LABORTECHNIK HB4 basic, com temperatura variando entre 35°C e 50°C.

Para os testes de atividade antioxidante foi utilizado o radical DPPH, o β -caroteno e o ácido linolênico de procedência Sigma e o espectrofotômetro (Cary 50 conc, Varian, Austrália)

Os espectros de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135°, HMBC, HSQC, HMQC, NOESY e NOEdiff foram registrados em espectrômetro de RMN Varian®, GEMINI 2000 (7,00 Tesla), operando a 300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C) ou no equipamento RMN DRX 500 da Bruker® (11,7 Tesla) operando a 500 MHz (^1H) e 125MHz (^{13}C), utilizando-se CDCl_3 , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, $\text{DMSO}-d_6$ e CD_3OD , (Isotech®) como solventes. O sinal de ^1H e de ^{13}C dos solventes foi utilizado como referência interna em relação ao TMS.

O aparelho utilizado para determinar a temperatura de fusão foi o modelo MQAPF-302, da Microquímica Equipamentos®.

Os espectros no IV foram registrados em espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier, modelo IRAffinity-1, da Shimadzu®. As amostras foram submetidas à análise em pastilha de KBr. Antes da obtenção dos espectros o aparelho foi zerado com o KBr.

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

A melhor resolução cromatográfica foi obtida utilizando gradiente de eluição no modo reverso, com fase móvel constituída de acetonitrila (**B**) e água acidificada com ácido fórmico 0,2% (v/v) (**A**): 5 a 30% **B** por 10 min, seguido de 30 a 100% de **B** de 10 a 15 min. Permanecendo nessa condição até 18 min para limpeza da coluna. A vazão empregada na fase móvel foi de 0,6 mL min^{-1} , o volume de injeção de 10 μL e temperatura de 30 °C. A coluna foi condicionada com o gradiente inicial de solventes por dois minutos entre cada análise.

Os cromatogramas foram registrados com detector de arranjo de diodos em varredura de 190-400 nm e todos os perfis cromatográficos por CLAE foram obtidos em 254, 265, 290 e 330 nm.

As colunas cromatográficas analíticas utilizadas foram: Waters[®] XBridge[™], BEH C₁₈ (100 x 3,0 mm d.i., 2,5 µm de diâmetro de partícula) e DIONEX Acclaim[®] RSLC 120 C₁₈, 5µm, 120Å, 2.1X 100mm.

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

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

As substâncias padrão utilizadas para auxiliar na identificação das substâncias foram ácido elágico (Sigma[®], ≥ 95%), ácido gálico (Sigma[®], ≥ 99%) e galato de metila (MOREIRA, 2009).

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

A homogeneização das amostras para teste de atividade biológica foi feita em agitador Vórtex de tubos, microtubos e frascos (Arsec[®]).

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

As leituras das absorvâncias do teste de inibição da enzima acetilcolinesterase foram feitas em um leitor de ELISA (Biotek[®]), modelo EL800. Os reagentes utilizados nesse teste, iodeto de acetiltiocolina (ACTI) (≥97%), tampão fosfato 0,1 M, albumina sérica bovina (≥96%), 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB), enzima acetilcolinesterase tipo VI-S obtida de *Electroparaus electricous* e eserina (≥99%) foram todos da Sigma-Aldrich[®].

As análises por CG-EM foram realizadas em aparelho QP2010SE (GC2010 Plus) da marca Shimadzu usando coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25 mm) e hélio como gás de arraste. Foram utilizados os reagentes da Sigma-Aldrich[®] N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), trimetilclorosilano (TMCS) para reações de sililação.

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

As análises de rotação óptica específica foram realizadas no Polarímetro Perkin Elmer Precisely, modelo 343.

Os galhos e as raízes de *S. brasiliensis* foram submetidos à moagem, utilizando-se moinho Thomas Wiley Laboratory Mill-Model 4. Após secagem em estufa (Soc. Fabbe Ltda) a 40°C com ventilação.

4.2. Coleta e identificação da espécie

Os galhos de um espécime de *S. brasilienses* foram coletados no município de Valente, Bahia, pelo Prof. Dr. Wilson A. Lopes e as raízes pela doutoranda Maria das Neves M. Carneiro. O material vegetal foi identificado pelo Prof. Dr. Luciano Paganucci de Queiróz, da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Após identificação, sua exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) sob o número 038056.

4.3. Preparo dos extratos e das fases orgânicas

Os galhos e as raízes de *S. brasiliensis*, após serem secos em estufa a 40° C com ventilação e separados em casca e cerne, foram submetidos à moagem, separadamente. O material pulverizado, 329,40 g dos galhos, 1,17 kg da casca e 7,38 kg do cerne da raiz, foram então submetidos à maceração em MeOH, separadamente, por quatro extrações consecutivas, por cerca de 48 h cada, e o filtrado obtido em cada etapa foi reunido e concentrado sob pressão reduzida, originando os extratos metanólicos dos galhos (39,80 g), da casca (444,19 g) e do cerne (312,47 g) da raiz. Esses extratos foram dissolvidos, separadamente, em MeOH/H₂O (7/3) e particionado entre clorofórmio (ou diclorometano no caso dos galhos), dando origem a duas fases, a clorofórmica/diclorometânica e a hidrometanólica.

As fases clorofórmica/diclorometânica, previamente concentradas em rotaevaporador, foram novamente dissolvidas em solução de MeOH/H₂O (95:5) e posteriormente particionada entre hexano, originando as fases hexânica e clorofórmica/diclorometânica.

A fase hidrometanólica de cada extrato foi concentrada à pressão reduzida para eliminar o metanol, restando apenas a fase aquosa. Essa fase foi submetida à partição com acetato de etila, originando as fases AcOEt e aquosa; esta última, foi particionada com butanol, originando a fase BuOH e a fase aquosa. Esta última fase aquosa foi posteriormente descartada. O procedimento realizado encontra-se ilustrado na Figura 8. As fases obtidas foram concentradas, rotuladas e pesadas, as massas obtidas encontram-se descritas nas Tabelas 1 e 2.

Figura 8 – Procedimento experimental empregado no preparo dos extratos e das fases dos galhos, casca e cerne da raiz de *S. brasiliensis*

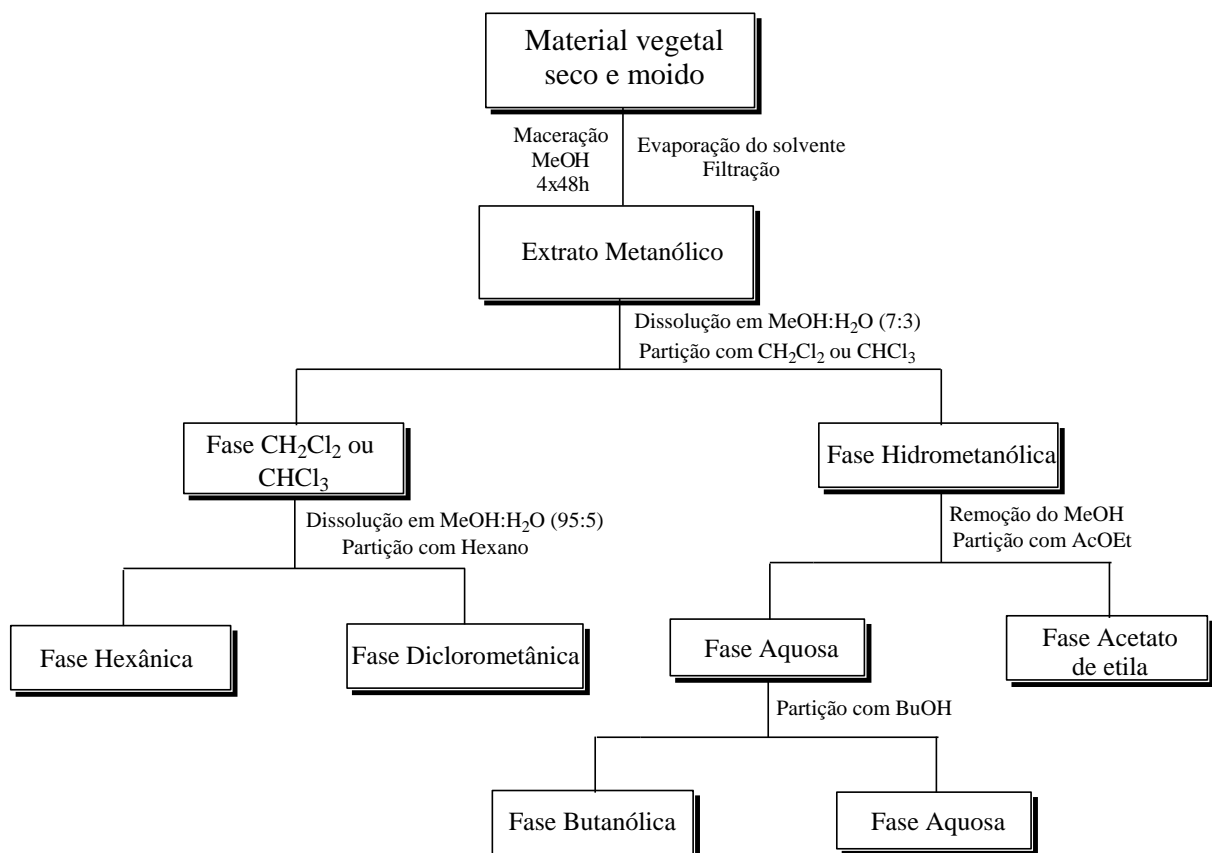


Tabela 1 – Massas das fases orgânicas obtidas pela partição do extrato MeOH bruto dos galhos de *S. brasiliensis*.

Fases dos galhos	Massa (g)
Hexânico (HGSB)	4,43
Diclorometânica (DGSB)	2,09
Acetato de etila (AGSB)	7,73
Butanólico (BGSB)	6,59

Tabela 2 – Massas das fases orgânicas obtidas pela partição do extrato MeOH bruto das raízes de *S. brasiliensis*.

Fases da casca da raiz	Massa (g)	Fases do cerne da raiz	Massa (g)
Hexânica (HCaRSB)	5,74	Hexânica (HCeRSB)	16,64
Clorofórmica (CCaRSB)	4,72	Clorofórmica (CCeRSB)	28,17
Acetato de etila (ACaRSB)	94,75	Acetato de etila (ACeRSB)	76,75
Butanólico (BCaRSB)	84,56	Butanólico (BCeRSB)	32,76

4.4. Identificação das substâncias presentes em *S. brasiliensis* por CG-EM

As fases hexânica e clorofórmica da casca e do cerne da raiz de *S. brasiliensis* foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

Antes de serem analisadas por CG-EM, as amostras foram submetidas à derivatização por sililação. Para esta reação foi pesado 3 mg da amostra em *vial*, onde foi acrescentado 60 µL de piridina. A esta solução foram adicionados 100 µL da mistura reacional de *N,O*-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1%

de trimetilclorosilano (TMCS) (Sigma-Aldrich®). Essa mistura foi aquecida a 70 °C por 30 minutos e 1 µL da mistura foi injetado no CG-EM (CRUZ, 2013).

A temperatura do injetor foi 290 °C com temperatura inicial de 80 °C por 5 min, aumentando de 80 °C a 285 °C na razão de 4 °C/min. A temperatura final permaneceu em 285 °C por 40 minutos. A temperatura do detector foi de 290 °C e a temperatura na interface do sistema CG-EM foi de 290 °C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas entre o intervalo de 30 a 600 Da.

A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas das amostras, com aqueles existentes no banco de dados do aparelho (NIST 08, FFNSC1.3 e WILEY8).

4.5. Separação e purificação dos constituintes químicos de *S. brasilienses*

4.5.1. Fracionamento da fase hexânica dos galhos

A fase hexânica dos galhos de *S. brasiliensis* (4,43 g) foi submetida à purificação por CC, utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel os solventes hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 36 frações de aproximadamente 100 mL cada, as quais foram reunidas em 7 frações (Tabela 3) após análise em CCDC, utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e o reagente de Lieberman-Burchard.

A fração HGSB.1 não foi trabalhada, uma vez que não apresentou revelação em CCDC utilizando-se UV e reagente de Lieberman-Burchard. Análise posterior dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C mostrou que esta fração tratava-se apenas de material graxo. O fracionamento da subfração HGSB.2, HGSB.4, HGSB.5 e HGSB.6 não resultou em nenhuma substância pura. A fração HGSB.7 não foi trabalhada.

Tabela 3 – Frações obtidas da CC da fase hexânica dos galhos de *S. brasiliensis*.

Código	Frações reunidas	Sistema Eluente (Hex:AcOEt)	Massa (g)
HGSB.1	1 – 4	1:0 - 95:5	0,0430
HGSB.2	5 – 8	95:5	0,9109
HGSB.3	9 – 17	9:1 – 8:2	1,8597
HGSB.4	18	7:3	0,0617
HGSB.5	19 – 25	6:4 – 1:1	0,4748
HGSB.6	26 – 34	2,5:7,5	0,6079
HGSB.7	35 – 36	0:1 - MeOH	0,4520

4.5.1.1. Purificação da fração HGSB.3

A fração HGSB.3 (1,8597 g) foi submetida à CC empregando-se como fase estacionária sílica Flash e como fase móvel o sistema Hex:AcOEt em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 23 frações de 80 mL cada, que foram reunidas em 6 subfrações após análise em CCDC, utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e o reagente de Lieberman-Burchard (Tabela 4).

A análise de RMN de ^1H e de ^{13}C e comparação com dados da literatura permitiu identificar a subfração HGSB.3-C como sendo uma mistura de α -amirina e β -amirina, 98,4 mg. (**SB1 e SB2**).

As subfrações HGSB.3-A, HGSB.3-B e HGSB.3-F não foram trabalhadas e o fracionamento das subfrações HGSB.3-D, HGSB.3-E não resultou em substância pura.

Tabela 4 – Frações obtidas da CC de HGSB.3.

Código	Frações reunidas	Sistema Eluente (Hex:AcOEt)	Massa (g)
HGSB.3-A	1 – 3	1:0 – 95:5	0,0709
HGSB.3-B	4 – 6	95:5 – 9:1	0,1481
HGSB.3-C	7 – 8	9:1	0,0984
HGSB.3-D	9 – 14	9:1 – 8:2	1,0087
HGSB.3-E	14 – 19	8:2 – 7:3 – 1:1	0,3255
HGSB.3-F	20 – 23	AcOEt – MeOH	0,1909

4.5.2. Fracionamento da fase diclorometânica dos galhos

A fase diclorometânica dos galhos (2,09 g) foi submetida à purificação por CC de sílica gel 60 utilizando como fase móvel os solventes CHCl_3 e MeOH em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 38 frações de aproximadamente 100 mL cada, as quais foram reunidas em 7 frações (Tabela 5) após análise em CCDC, utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e vapores de iodo.

A fração DGSB.2 (367,0 mg) foi identificada como galato de metila (**SB3**) através da análise de RMN de ^1H e de ^{13}C e comparação com dados da literatura. As frações DGSB.1, DGSB.6 e DGSB.7 não foram trabalhadas e os sucessivos fracionamentos das frações DGSB.3, DGSB.4, DGSB.5 não resultaram em uma nova substância pura, apenas foi constatado a presença nas diversas subfrações da substância **SB3**.

Tabela 5 – Frações obtidas da CC da fase diclometânica dos galhos de *S. brasiliensis*.

Código	Frações reunidas	Sistema Eluente (CHCl₃:MeOH)	Massa (g)
DGSB.1	1 – 4	1:0 – 99:01	0,0200
DGSB.2	5 – 14	97:3 – 95:5	0,3678
DGSB.3	15 – 17	95:5	0,1765
DGSB.4	18 – 22	9:1	0,3605
DGSB.5	23 – 27	9:1	0,1332
DGSB.6	28 – 36	8:2 – 7:3	0,4702
DGSB.7	37 – 38	1:1 – MeOH	0,2016

4.5.3. Fracionamento da fase acetato de etila dos galhos

A fase AcOEt dos galhos (7,73 g) foi submetida à purificação por CC de sílica gel 60 utilizando como fase móvel os solventes CHCl₃ e MeOH em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 28 frações de aproximadamente 100 mL cada, as quais foram reunidas em 6 frações (Tabela 6) após análise em CCDC, utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e vapores de iodo.

A fração AGSB.2 foi identificada como sendo galato de metila (**SB3**). As frações AGSB.1, AGSB.5 e AGSB.6 não foram trabalhadas. Os sucessivos fracionamentos da fração AGSB.4 não resultaram em uma nova substância pura, no entanto foi constatado através de análise por CCD a presença em algumas subfrações de galato de metila (**SB3**) e **SB4**.

A fração AGSB.3 foi submetida a um novo fracionamento visando a obtenção de substâncias puras.

Tabela 6 – Frações obtidas da CC da fase AcOEt dos galhos de *S. brasiliensis*.

Código	Frações reunidas	Sistema Eluente (CHCl₃:MeOH)	Massa (g)
AGSB.1	1 – 3	98:02	0,0293
AGSB.2	4 – 7	95:5	0,2471
AGSB.3	8 – 18	9:1 – 8:2	2,6961
AGSB.4	19 – 23	7:3	2,2911
AGSB.5	24 – 27	1:1	1,0985
AGSB.6	28	MeOH	0,4744

4.5.3.1. Purificação da fração **AGSB.3**

A fração AGBS.3 (2,6961 g) foi submetida à CC empregando-se como fase estacionária sílica Flash e como fase móvel o sistema CH₂Cl₂:MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 21 frações de 100 mL cada, que foram reunidas em 6 subfrações após análise em CCDC, utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e vapores de iodo (Tabela 7).

A análise em CCDC indicou que a subfração AGBS.3-A era composta majoritariamente de galato de metila (**SB3**). Os sucessivos fracionamentos das subfrações AGBS.3-C, AGBS.3-D e AGBS.3-E não resultaram em uma nova substância pura, apenas foi constatado a presença, em algumas subfrações, de galato de metila (**SB3**) e **SB4**. A subfração AGBS.3-F não foi trabalhada.

A subfração AGBS.3-B (0,4941 g) foi submetida à purificação em CC, utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20 e como fase móvel o sistema CH₂Cl₂:MeOH (1:1), foram obtidas 32 subfrações de 10 mL cada que foram agrupadas em 6 subfrações após análise de CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e vapores de iodo (Tabela 8).

Tabela 7 – Frações obtidas da CC de AGSB.3.

Código	Frações reunidas	Sistema Eluente (CH₂Cl₂:MeOH)	Massa (g)
AGSB.3-A	1 – 4	95:05	0,1858
AGSB.3-B	5 – 8	9,25:2,75	0,4941
AGSB.3-C	9 – 13	9:1	0,7813
AGSB.3-D	14 – 15	85:15	0,2643
AGSB.3-E	16 – 19	8:2	0,1881
AGSB.3-F	20 – 21	1:1 - MeOH	0,2675

Tabela 8 – Frações obtidas da CC de AGSB.3B.

Código	Frações reunidas	Massa (g)
AGSB.3B-1	1 – 3	0,1767
AGSB.3B-2	4 – 9	0,0700
AGSB.3B-3	10 – 13	0,0325
AGSB.3B-4	14 – 17	0,0481
AGSB.3B-5	18 – 23	0,0999
AGSB.3B-6	24 – 32	0,1045

A subfração AGSB.3B-1 apresentou, quando analisada em CCDC, um perfil cromatográfico compatível com a mistura das substâncias **SB3** e **SB4**.

A análise de RMN de ¹H e de ¹³C e comparação com dados da literatura permitiu identificar a subfração AGSB.3B-2 (70,0 mg) como sendo o ácido gálico (**SB4**). As subfrações AGSB.3B-3 e AGSB.3B-4D não foram trabalhadas.

A subfração AGSB.3B-5 (99,9 mg) foi submetida a um novo fracionamento em CC, utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20 e como fase móvel o

sistema CH₂Cl₂:MeOH (1:1), foram obtidas 20 subfrações de 7 mL cada que foram agrupadas em 4 subfrações após análise de CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e vapores de iodo (Tabela 9).

Tabela 9 – Frações obtidas da CC de AGSB.3B5.

Código	Frações reunidas	Massa (g)
AGSB.3B5-A	1 – 4	0,0187
AGSB.3B5-B	5 – 9	0,0471
AGSB.3B5-C	10 – 15	0,0185
AGSB.3B5-D	16 – 20	0,0142

A análise de RMN de ¹H e de ¹³C e comparação com dados da literatura permitiu identificar a subfração AGSB.3B5-B (47,1 mg) como sendo quercetina-3-O-β-D-xilopiranosídeo (**SB5**).

4.5.4. Fracionamento da fase butanólica dos galhos dos galhos

A fase butanólica é rica em substâncias polares, optando-se pelo uso da poliamida como fase estacionária. A fase BuOH dos galhos foi fracionada através de CC com poliamida, utilizando como fase móvel o sistema H₂O:MeOH em grau decrescente de polaridade. Foram obtidas 5 frações e após análises em CCDC verificou-se que essas frações eram constituídas majoritariamente por galato de metila (**SB3**) e ácido gálico (**SB4**). Desta forma, devido à dificuldade de fracionamento desse material muito polar e a ausência de evidências de substâncias ainda não isoladas nessa espécie optou-se por não continuar com o fracionamento dessa fração.

4.5.5. Fracionamento da fase hexânica da casca da raiz

A fase hexânica da casca da raiz de *S. brasiliensis* (5,74 g) foi submetida à purificação por CC, utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel os solventes hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 24 frações de aproximadamente 100 mL cada, as quais foram reunidas em 8 frações (Tabela 10) após análise em CCDC, utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e o reagente de Lieberman-Burchard.

Tabela 10 – Frações obtidas da CC da fase hexânica da casca da raiz de *S. brasiliensis*.

Código	Frações reunidas	Sistema Eluente (Hex:AcOEt)	Massa (g)
HCaRSB.1	1 – 3	1:0 – 99:01	0,0467
HCaRSB.2	4 – 5	95:5	1,4887
HCaRSB.3	6 – 7	9:1	0,2832
HCaRSB.4	8 – 9	85:15	0,7201
HCaRSB.5	10 – 12	8:2	0,8415
HCaRSB.6	13 – 19	7:3 – 6:4	0,5054
HCaRSB.7	20 – 22	1:1 -	0,6243
HCaRSB.8	23 – 24	AcOEt – MeOH	0,3874

A fração HCaRSB.3 foi submetida a um novo fracionamento que resultou em substância pura.

4.5.5.1. Purificação da fração HCaRSB.3

A fração HCaRSB.3 (0,2832 g) foi submetida à CC empregando-se como fase estacionária sílica Flash e como fase móvel o sistema Hex:AcOEt em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 14 frações de 80 mL cada, que foram reunidas em 5 subfrações após análise em CCDC, utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e o reagente de Lieberman-Burchard (Tabela 11).

Tabela 11 – Frações obtidas da CC de HCaRSB.3.

Código	Frações reunidas	Sistema Eluente (Hex:AcOEt)	Massa (g)
HCaRSB.3-A	1 – 3	95:5	0,0426
HCaRSB.3-B	4	9:1	0,0343
HCaRSB.3-C	5 – 6	9:1	0,0376
HCaRSB.3-D	7 – 11	8:2 – 7:3	0,0558
HCaRSB.3-E	12 – 14	1:1 – AcOEt – MeOH	0,1049

A análise de RMN de ^1H e de ^{13}C e comparação com dados da literatura permitiu identificar a subfração HCaRSB.3-C (37,6 mg) como sendo β -sitosterol (**SB6**).

4.5.6. Fracionamento da fase clorofórmica da casca da raiz

A fase clorofórmica das raízes (4,72 g) foi submetida à purificação por CC de sílica gel 60 utilizando como fase móvel os solventes CHCl_3 e MeOH em ordem crescente de polaridade. Foram obtidas 27 frações de aproximadamente 100 mL cada, as quais foram reunidas em 9 frações (Tabela 12) após análise em CCDC,

utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e vapores de iodo.

Tabela 12 – Frações obtidas da CC da fase clorofórmica das raízes de *S. brasiliensis*.

Código	Frações reunidas	Sistema Eluente (CHCl₃:MeOH)	Massa (g)
CCaRSB.1	1 – 6	1:0 - 98:02	0,1364
CCaRSB.2	7 – 8	95:5	0,0998
CCaRSB.3	9 – 10	95:5	0,1752
CCaRSB.4	11 – 12	95:5	0,3673
CCaRSB.5	13 – 15	9:1	1,0124
CCaRSB.6	16 – 17	9:1	0,1063
CCaRSB.7	18 – 19	8:2	0,1937
CCaRSB.8	20 – 23	7:3	0,2748
CCaRSB.9	25 – 27	1:1 – MeOH	0,6448

Ao dissolver a fração CCaRSB.4 em metanol para proceder sua análise em CCDC uma parte dessa fração precipitou-se na forma de um sólido branco. Então, o sobrenadante foi retirado e o sólido foi lavado algumas vezes com metanol. Após seco o sólido foi removido com auxílio de uma espátula. A análise de RMN de ¹H e de ¹³C e comparação com dados da literatura permitiu identificar esse sólido (30,5 mg) como sitosterol 3-O-β-D-glicopiranosídeo também conhecido como Daucosterol (**SB7**).

A fração CCaRSB.8 foi identificada através de CLAE-DAD como sendo composta por uma mistura de galato de metila (**SB3**) e ácido gálico (**SB4**) e a fração CCaRSB.9 foi identificada através de CLAE-DAD como sendo composta, predominantemente por ácido gálico (**SB4**).

4.5.6.1. Purificação da fração CCaRSB.3

A fração CCaRSB.3 (0,1752 g) foi submetida à CC empregando-se como fase estacionária sílica Flash, e como fase móvel o sistema CHCl_3 :MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 15 frações de 75 mL cada, que foram reunidas em 4 subfrações após análise em CCDC, utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e vapores de iodo (Tabela 13).

Tabela 13 – Frações obtidas da CC de CCaRSB.3.

Código	Frações reunidas	Sistema Eluente (CH_2Cl_2:MeOH)	Massa (g)
CCaRSB.3-A	1 – 2	95:05	0,0108
CCaRSB.3-B	3 – 9	9:1	0,1003
CCaRSB.3-C	10 – 13	8:2	0,0301
CCaRSB.3-D	14 – 15	1:1 – MeOH	0,0329

A subfração CCaRSB.3-C foi identificada através de CLAE-DAD como sendo composta por uma mistura de galato de metila (**SB3**) e ácido elágico (**SB8**) através da comparação do tempo de retenção e dos espectros no UV com os padrões.

A subfração CCaRSB.3-B, após sucessivos fracionamentos, resultou no isolamento de dois dímeros de chalcona, os quais encontram-se em fase de elucidação estrutural.

4.5.6.2. Purificação da fração CCaRSB.5

A subfração CCaRSB.5 (1,0124 g) foi submetida à CC empregando-se como fase estacionária sílica Flash, e como fase móvel o sistema CHCl_3 :MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 20 frações de 100 mL cada, que

foram reunidas em 5 subfrações após análise em CCDC, utilizando-se como reveladores radiação por luz UV (245 e 365 nm) e vapores de iodo (Tabela 14).

Tabela 14 – Frações obtidas da CC de CCaRSB.5.

Código	Frações reunidas	Sistema Eluente (CH₂Cl₂:MeOH)	Massa (g)
CCaRSB.5-A	1 – 2	95:05	0,0250
CCaRSB.5-B	3 – 6	95:05	0,0868
CCaRSB.5-C	7 – 8	95:05	0,1216
CCaRSB.5-D	9 – 18	95:05 – 9:1	0,6590
CCaRSB.5-E	19 – 20	7:3 – MeOH	0,0309

A subfração CCaRSB.5-B (86,8 mg) foi submetida à purificação em CC, utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20 e como fase móvel o sistema CH₂Cl₂:MeOH (1:1), foram obtidas 12 subfrações de 10 mL que foram agrupadas em 3 subfrações após análise de CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e vapores de iodo (Tabela 15).

Tabela 15 – Frações obtidas da CC de CCaRSB.5-B.

Código	Frações reunidas	Massa (mg)
CCaRSB.5B-1	1 – 3	19,8
CCaRSB.5B-2	4 – 9	38,7
CCaRSB.5B-3	10 – 12	9,0

A subfração CCaRSB.5B-2, após sucessivos fracionamentos, resultou no isolamento de um dímero de chalcona, que se encontra em fase de elucidação estrutural.

A análise de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC e espectrometria de massas de alta resolução permitiu identificar a subfração CCaRSB.5B-3, 9,0 mg, como sendo 2',4,4',5-tetrahidroxichalcona-(2 \rightarrow 7'',8 \rightarrow 8'')-4''-hidroxietenilbenzeno (**SB9**), um dímero de chalcona que tem o seu primeiro relato na literatura.

4.5.6.2.1. Purificação da subfração CCaRSB.5-C

A subfração CCaRSB.5-C (121,6 mg) foi submetida à purificação em CC, utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20 e como fase móvel o sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1), foram obtidas 12 subfrações de 10 mL cada que foram agrupadas em 5 subfrações após análise de CCDC reveladas em UV (254 e 365 nm) e vapores de iodo (Tabela 16).

Tabela 16 – Frações obtidas da CC de CCaRSB.5-C.

Código	Frações reunidas	Massa (mg)
CCaRSB.5C-1	1	6,2
CCaRSB. 5C-2	2 – 4	27,7
CCaRSB.5C-3	5	13,8
CCaRSB.5C-4	6	32,4
CCaRSB.5C-5	7 – 12	28,5

A análise de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, NOESY, NOEdiff e espectrometria de massas de alta resolução permitiu identificar a subfração CCaRSB.5C-4, 32,4 mg, como sendo (7''*R, 8''*S) 2',4,4',5-tetrahidroxichalcona-(2 \rightarrow 7'',8 \rightarrow 8'')-2''',4'',4'''-trihidroxí-7'',8''-dihidrochalcona (**SB10**), um dímero de chalcona inédito na literatura. Análise por CLAE-DAD mostrou que as subfrações CCaRSB.5C-3 e CCaRSB.5C-5 são compostas majoritariamente por **SB10**.

É importante destacar que foram realizadas outras CC com algumas subfrações dessa fase que resultaram em substâncias puras. Contudo, como essas substâncias ainda se encontram em fase de elucidação estrutural optou-se por não registrar esses fracionamentos.

4.6. Testes de Atividade Biológica

4.6.1. Atividade antioxidante - Teste do sequestro do radical livre DPPH

Esse teste avalia a habilidade da substância testada de sequestrar o radical livre estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Figura 6, p. 54) e está baseado no descoramento de uma solução composta pelo radical estável, de cor violeta, quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Seguindo a metodologia de Sousa e colaboradores (2007) com pequenas adaptações, o ensaio do DPPH• foi realizado com as fases orgânicas, sendo preparada uma solução metanólica de DPPH• (40 µg/mL) e soluções com as fases (50, 100, 150, 200, 250 µg/mL) em MeOH. As medidas das absorvâncias das misturas reacionais (300 µL da solução das fases ou do padrão ou de metanol, para o controle, e 2,7 mL da solução estoque de DPPH•), foram realizadas a 515 nm, imediatamente e após 30 minutos de incubação da reação à temperatura ambiente, protegida de luz, em espectrofotômetro. Neste ensaio, utilizou-se ácido gálico, quercetina, BHA, BHT e Trolox como padrões, nas mesmas concentrações das fases. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

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

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

Onde:

A_C = Absorvância final do controle

A_A = Absorvância da amostra no tempo final.

A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% (CE_{50}), foi calculada por regressão linear, em que o eixo da abscissa representou as concentrações da amostra ($\mu\text{g/mL}$) ou do controle positivo e na ordenada, o percentual de sequestro de radical livre (%SRL). Quando necessário foi realizadas diluições nas concentrações das amostras e dos padrões para viabilizar o cálculo das CE_{50} .

4.6.2. Atividade antioxidante - Sistema β -caroteno/ácido linolênico

A avaliação da atividade antioxidante utilizando-se o sistema β -caroteno/ácido linolênico foi realizada de acordo com método descrito por Hidalgo e colaboradores (1994) e Rufino e colaboradores (2006). O meio oxidante consistiu de 40 mg de ácido linolênico e 400 mg do emulsificador Tween 80, no qual foi adicionado uma solução de 2 mg de β -caroteno dissolvido em 1 mL de clorofórmio. Posteriormente, a mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio e então adicionados 200 mL de água destilada, agitando-se para promover a aeração. Alíquotas de 300 μL dos padrões ou das fases (50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH) foram transferidas para cubetas e adicionados 2,7 mL do meio oxidante, sendo a reação acompanhada por espectrofotometria no visível em $\lambda = 470 \text{ nm}$ com leitura imediata e em intervalos de 15 minutos durante 1 h. As cubetas foram incubadas em banho-maria à 50°C . O controle foi preparado com 2,7 mL do meio oxidante e 300 μL de metanol. Todas as análises foram realizadas em triplicatas, empregando-se ácido gálico, quercetina, BHA, BHT e Trolox como padrões, nas mesmas concentrações das fases.

A atividade antioxidante foi expressa em percentual de inibição da oxidação através do decaimento da absorbância, medido em relação ao controle após 60 minutos de incubação. De acordo com a fórmula:

$$AA = (DR_C - DR_A) / DR_C \times 100$$

onde: DR_C e DR_A representam as taxas de clareamento do β -caroteno sem e com a adição de antioxidante, respectivamente. As taxas de degradação (DR) foram calculadas de acordo com a cinética de primeira ordem:

$$DR = \ln(a/b) \times 1/t$$

onde: \ln é o logaritmo natural, a a absorbância inicial no tempo 0 e b a absorbância depois de 60 min e t o tempo total da reação (AHN et al., 2004).

A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para reduzir o percentual de inibição da oxidação em 50% (CE_{50}), foi calculada por regressão linear, em que o eixo da abscissa representou as concentrações da amostra ($\mu\text{g/mL}$) ou do controle positivo e na ordenada, o percentual de atividade antioxidante. Quando necessário foram realizadas diluições nas concentrações das amostras e dos padrões para viabilizar o cálculo das CE_{50} .

4.6.3. Avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase

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

As soluções das fases orgânicas foram preparadas pesando 10 mg de cada fase e dissolvendo em 1 mL de etanol grau HPLC com agitação em Vórtex, obtendo uma concentração de 10 mg/mL. Para as substâncias puras foram preparadas soluções com concentrações de 1000, 500, 375, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Foi utilizado como controle positivo a Eserina ((-)-fisiostigmina).

Para a realização do teste, foram adicionados nas cavidades das microplacas, em triplicata, 140 μL de tampão fosfato (0,1 M) pH 7,5 com 0,1% de albumina sérica bovina, 20 μL da amostra, do padrão ou etanol, no caso do branco, e 20 μL da enzima acetilcolinesterase (AChE) 5,0 U/mL. Após 15 minutos de incubação, foi adicionado 10 μL de iodeto de acetiltiocolina (ACTI) 75 mM e 10 μL de ácido 5-5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) 10mM, sendo, em seguida, realizada a leitura em 405 nm no tempo 0 e de 10 em 10 minutos até os 60 minutos. O percentual de inibição foi obtido através da equação:

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

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

O valor de CI_{50} foi calculado, para substâncias puras, por regressão linear, onde o eixo da abscissa representou as concentrações da amostra ($\mu\text{g/mL}$) ou do controle positivo e na ordenada, o percentual de inibição.

4.6.4. Teste de letalidade frente a *Artemia Salina* Leach

Os ovos de *Artemia salina* (Miramar[®]) e o sal marinho (Ocean Water - Alcon) foram adquiridos de uma loja de aquários local. O teste de letalidade empregado foi adaptado do método descrito por David e colaboradores (2001). Os ovos de *A. salina* foram eclodidos em um aquário retangular, utilizando-se água do mar artificial preparada de acordo com as especificações do fabricante, dissolvendo-se 3,83 g do sal por litro de solução. O sistema foi aerado com bomba específica. O aquário foi construído com uma divisão interna de acrílico contendo vários orifícios, produzindo dois compartimentos não equivalentes em tamanho. Os ovos foram adicionados no compartimento menor, previamente escurecido utilizando-se papel alumínio. O compartimento maior foi externamente iluminado com lâmpada 60W, de modo a atrair os crustáceos para este local, após a eclosão. Os ovos foram incubados por 48 horas em temperatura ambiente. As amostras foram preparadas a partir de uma solução estoque de 1000 $\mu\text{g/mL}$, preparada pela dissolução de 30 mg das fases em 30 mL de solução salina artificial com 2 gotas de Tween 80 e 3 gotas de DMSO, para auxiliar na solubilização das fases, com esse objetivo também foram utilizados ultrassom e agitação em Vórtex. A partir da solução estoque foram obtidas, por diluições, soluções das fases nas concentrações de 250, 200, 150, 100, 75, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$. O preparo do controle negativo seguiu a mesma metodologia do preparo da solução mais concentrada (250 $\mu\text{g/mL}$), sem a presença de qualquer uma das fases orgânicas.

Após 48 horas de incubação, 10 crustáceos foram transferidos, com um auxílio de uma pipeta Pasteur, para frascos tipo "snap" contendo 5 mL das soluções das fases nas concentrações previamente determinadas ou da solução controle. Essas amostras foram mantidas sob iluminação à temperatura ambiente por 24 horas e,

após esse período, o número de *nauplios* sobreviventes foram determinados com auxílio de uma lupa. A larva foi considerada morta caso não exibisse movimentos durante 10 segundos de observação. Todos os experimentos, inclusive os de controle foram realizados em triplicata.

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

4.6.5. Atividade anti-Inflamatória e antinociceptiva

4.6.5.1. Animais

Foram utilizados nos experimentos camundongos *Balb-C* machos, pesando entre 20-30 g. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira da Universidade Federal da Bahia onde permaneciam no ciclo claro-escuro 12 horas (luzes acessas das 6 às 18 horas), a temperatura de 25 ± 2 °C e a umidade relativa de 50 ± 2 %. Os animais ficavam em caixas de polipropileno contendo maravalha na base da caixa e foi permitido livre acesso à comida (Labina[®], Purina) e água filtrada. Os camundongos foram homogeneamente distribuídos entre os grupos. Todos os animais utilizados foram climatizados no laboratório, pelo menos uma hora antes dos testes, realizados na fase clara do ciclo. O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos.

Os testes com os animais foram realizados no Instituto Multidisciplinar em Saúde, sob orientação da Prof^a Dr^a. Regiane Yatsuda. A utilização dos animais nos testes que envolvem a avaliação da atividade antinociceptiva e da atividade anti-inflamatória foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal UNIUBE, ofício CEEA 173/2009 (Anexo 1).

4.6.5.2. Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

O efeito antinociceptivo foi avaliado pelo teste de contorção abdominal induzida por ácido acético, de acordo com procedimentos previamente descritos por Koster, Anderson & Beer (1959) e Vacher, Duchêne-Marullaz & Barrat (1964). Este modelo consiste de uma resposta indicativa de dor através da contorção abdominal dos animais seguidas de extensões dos membros posteriores que são observados durante 30 minutos. O período de observação se dá de 0 à 30 minutos após a injeção do agente álgico.

Grupos de seis camundongos em jejum de 12 horas, foram tratados por via subcutânea (s.c.) com extrato metanólico da casca e do cerna da raiz de *S. brasiliensis* (50, 100 ou 200 mg/Kg) ou indometacina (10 mg/Kg) 30 minutos antes da injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 1,0% (10 mL/Kg). Os animais do controle negativo receberam somente solução salina 0,9% (i.p.).

Os camundongos foram colocados em caixas separadas e depois da administração do ácido acético, o número de contorções da parede abdominal, seguidas de torções do tronco e extensão dos membros posteriores produzidas foram contadas durante 30 minutos como indicativo de nocicepção.

4.6.5.3. Avaliação da migração de neutrófilos

Para a determinação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, o extrato metanólico da casca e do cerna da raiz de *S. brasiliensis* (50, 100 mg/Kg) foi administrado por via subcutânea 30 minutos antes da administração do estímulo inflamatório (Carragenina (Cg), 500 µg - 200 µg por 20 g camundongo). Os camundongos foram sacrificados 4 h após injeção de Cg e as células da região peritoneal foram coletadas por lavagem da cavidade com 3mL de tampão fosfato (PBS) contendo EDTA 1 mM (NUNES et al., 2009). O volume coletado foi semelhante em todos os grupos experimentais e correspondeu a aproximadamente 95% do volume injetado. A contagem total foi realizada em câmara de Neubauer. A contagem diferencial (100 células no total) foi realizada pelo preparo de esfregaços

em citocentrífuga (PRESVAC[®]CT12, Curitiba, Brasil), os quais foram corados por corante Panótico (Laborclin, Brasil) e as células diferenciadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000x). O veículo do extrato (etanol 10%, v/v) foi utilizado como controle. Os resultados foram apresentados como o número de neutrófilos por cavidade.

4.7. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos inicialmente a uma análise exploratória para determinação do melhor teste estatístico, sendo em seguida aplicado o teste mais conveniente para cada análise do presente trabalho. Nos testes realizados com animais os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão ($n=6$), e foi realizada comparação estatística entre os grupos usando análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida do teste de Bonferroni para múltiplas comparações ou pelo teste *post hoc* de Dunnett, usando o programa GraphPad Prism[®] versão 5.0. Valores foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Nos testes de atividade antioxidante, letalidade sobre A. salina e anticolinesterásica os resultados apresentados neste estudo correspondem à média de três repetições ($n=3$) \pm desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados de atividade antioxidante que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($p < 0,05$) aplicando-se ANOVA de uma via, seguida do teste de Bonferroni para múltiplas comparações. Essas análises foram realizadas usando o programa Microcal Origin 7.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

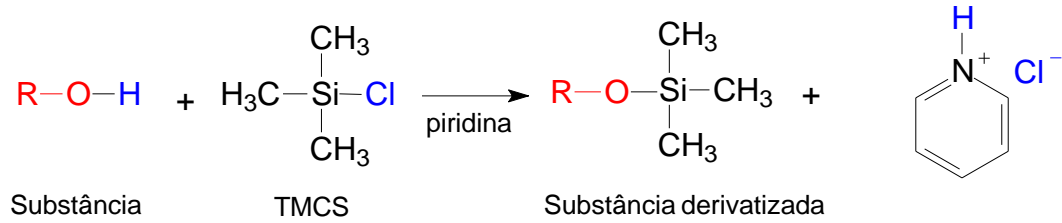
5.1. Análise das fases orgânicas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

A cromatografia gasosa é uma técnica com poder de resolução excelente, viabilizando a análise de centenas de substâncias de uma mesma amostra com um baixo limite de detecção (10^{-12} g). No entanto, seu emprego é limitado à análise de gases, de substâncias voláteis e termicamente estáveis, sendo isso um inconveniente para o estudo de componentes fixos de espécies vegetais. Porém, essa limitação pode ser contornada com a preparação de derivados, que tem por objetivo transformar substâncias contendo grupos funcionais fortemente polares em um derivado com características adequadas para ser analisado por cromatografia gasosa (BONATO, 2006). Em se tratando de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, os vários bancos de espectros comerciais (NIST, WILEY) podem ajudar na identificação das substâncias presentes em extratos orgânicos, após o tratamento prévio desses extratos para viabilizar a sua análise, ou seja, após uma derivatização.

Os mais versáteis reagentes de derivatização para moléculas polares contendo o hidrogênio no grupo funcional (tal como alcoóis, aminas e tióis) são o alquil-silil, sendo o mais comum o trimetilsilil (BONATO, 2006).

Nesse trabalho foram obtidos derivados de trimetilsilil. A substituição do grupo funcional polar do composto pelo grupo trimetilsilil (TMS) confere estabilidade térmica e química, além de maior volatilidade. A formação do trimetilsilil éter é uma técnica muito utilizada para o preparo de derivados de álcoois, esteróis, álcoois terpênicos, ácidos graxos, aminas, tióis entre outros (BARROS, 2003).

A reação de formação dos derivados de trimetilsilil é mostrada de forma simplificada na Figura 9, essa reação é comumente chamada de sililação.

Figura 9 – Reação de silição

As substâncias derivatizadas foram identificadas de acordo com as fragmentações observadas a partir dos espectros de massas obtidos, em comparação com espectros existentes no banco de dados do aparelho com mais de 90% de similaridade e com dados da literatura. A quantificação foi realizada apenas pelo percentual relativo à área de cada amostra.

As substâncias identificadas através dos cromatogramas das fases hexânica da casca (Figura 10A) e do cerne (Figura 10B) da raiz de *S. brasiliensis* estão apresentadas na Tabela 17.

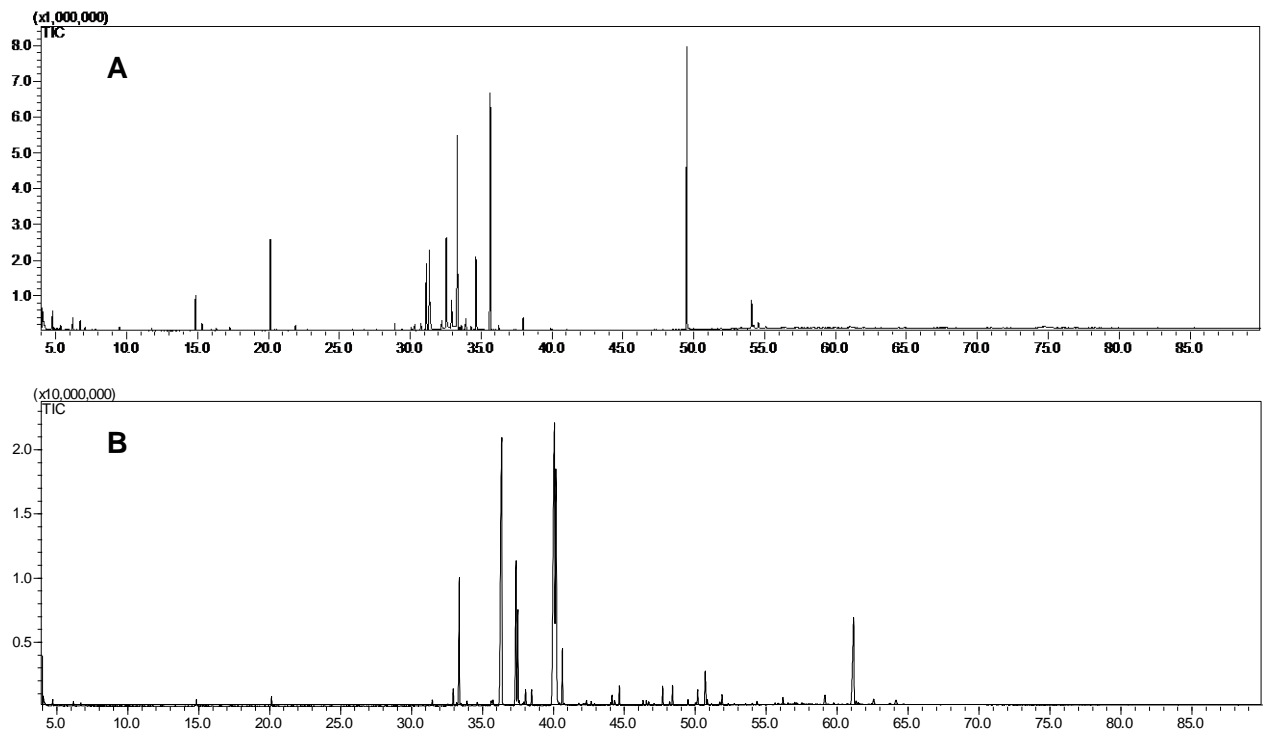
Figura 10 – Cromatogramas de íons totais da fase hexânica da casca (A) e do cerne (B) de *S. brasiliensis*

Tabela 17 – Substâncias identificadas (% área relativa) na fase hexânica da casca e do cerne da raiz de *S. brasiliensis*.

t_R	Identificação	M+	Fórmula	% área	
				cerne	casca
28.166	tetradecanoato de metila	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	0,05	–
31.464	ácido tetradecanóico	300	C ₁₇ H ₃₆ O ₂ Si	0,22	–
32.936	3,4,5-trihidroxibenzoato de metila (galato de metila)	296	C ₁₄ H ₂₄ O ₃ Si ₂	0,62	1,92
33.366	hexadecanoato de metila	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	6,13	–
33.474	ácido (Z)-dodec-5-enóico	270	C ₁₅ H ₃₀ O ₂ Si	0,07	–
33.901	ácido pentadecanóico	314	C ₁₈ H ₃₈ O ₂ Si	0,21	–
34.628	ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (ácido gálico)	458	C ₁₉ H ₃₈ O ₅ Si ₄	0,2	5,25
35.735	heptadecanoato de metila	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	0,14	–
36.368	ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	328	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si	26,1	0,31
37.366	(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de metila	294	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	7,43	–
37.487	(Z)-octadec-9-enoato de metila	296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	4,02	–
38.033	octadecanoato de metila	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	0,7	–
38.468	ácido heptadecanóico	342	C ₂₀ H ₄₂ O ₂ Si	0,65	–
38.808	(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de etila	308	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	0,03	–
39.339	heptanoato de butila	312	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	0,04	–
40.077	ácido (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienóico (ácido linoleico)	352	C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si	19,83	0,17
40.179	ácido (9)-octadec-9-enóico (ácido oleico)	354	C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si	11,39	–
40.632	ácido octadecanóico	356	C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si	2,25	–
40.759	18-metilnonadecanoato de metila	326	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	0,07	–
41.798	ácido (Z)-eicosa-11-enóico	370	C ₂₂ H ₄₆ O ₂ Si	0,08	–
42.338	(8E,11E)-octadeca-8,11-dienoato de metila	294	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	0,17	–
42.660	ácido nonadecanóico	370	C ₂₂ H ₄₆ O ₂ Si	0,15	–
44.129	ácido (E)-eicos-11-enóico	382	C ₂₃ H ₄₆ O ₂ Si	0,34	–
44.645	ácido eicosanóico	384	C ₂₃ H ₄₈ O ₂ Si	0,83	–
46.312	docosanoato de metila	354	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	0,21	–
46.547	ácido heneicosanóico	389	C ₂₄ H ₅₀ O ₂ Si	0,24	–
48.192	tricosanoato de metila	368	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	0,16	–
48.393	ácido docosanóico	412	C ₂₅ H ₅₂ O ₂ Si	0,84	–
50.168	ácido tetracosanóico	440	C ₂₇ H ₅₆ O ₂ Si	0,55	–
50.695	hexadecanoato de 2,3-dihidroxiopropanoato	474	C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si ₂	2,03	–
51.717	esqualeno	410	C ₃₀ H ₅₀	0,18	–
51.880	ácido tetracosanóico	440	C ₂₇ H ₅₆ O ₂ Si	0,42	–
52.320	catequina	650	C ₃₀ H ₅₄ O ₆ Si ₅	0,05	0,13
53.544	ácido pentacosanóico	454	C ₂₈ H ₅₈ O ₂ Si	0,05	–
54.011	oleato de β -sitosterol	678	C ₄₇ H ₈₂ O ₂	0,07	–
54.342	tetracosanol	426	C ₂₇ H ₅₈ O ₂ Si	0,18	–
56.175	oleato de estigmasterol	678	C ₄₇ H ₈₂ O ₂	0,3	–
56.538	acetato de cicloartenol	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	0,06	–
57.010	α -tocoferol	502	C ₃₂ H ₅₈ O ₂ Si	0,08	–
57.513	cicloartenol	426	C ₃₀ H ₅₀ O	0,09	–
59.130	campsterol	472	C ₃₁ H ₅₆ O ₂ Si	0,68	–

Tabela 17 – Substâncias identificadas (% área relativa) na fase hexânica da casca e do cerne da raiz de *S. brasiliensis*.

t_R	Identificação	M+	Fórmula	% área	
				cerne	casca
59.751	estigmasterol	484	C ₃₂ H ₅₆ OSi	0,09	–
61.158	β-sitosterol	486	C ₃₂ H ₅₈ OSi	8,06	0,18
62.570	9,19-ciclolanostan-3-ol-24-metileno	498	C ₃₃ H ₅₈ OSi	0,4	–
63.705	estigmast-4-en-3-ona	412	C ₂₉ H ₄₈ O	0,09	–
64.132	acetato de 9,19-ciclolanostan-3-ol-24-metileno	482	C ₃₃ H ₅₄ O ₂	0,4	–
Total identificado (% área relativa)				97,02	7,96
Carboidratos (% área relativa)				0,55	73,50
Não identificados (% área relativa)				2,43	18,54

Percebe-se pela análise da Figura 10 que há predominância dos picos cromatográficos entre os tempos de retenção 30 e 40 minutos. Foi identificado quase a totalidade dos picos da fase hexânica do cerne (97,02%) ao passo que na fase hexânica da casca foram identificados apenas 7,96 % dos picos. Essas fases são constituídas principalmente de ácidos graxos, ésteres, esteroides e alguns compostos fenólicos.

As substâncias predominantes na fase hexânica do cerne da raiz de *S. brasiliensis* foram o ácido palmítico (26,1%), ácido linoleico (19,83%), ácido oleico (11,39%), β-sitosterol (8,06%), linoleato de metila (7,43%) e o hexadecanoato de metila (6,13%). Entre as substâncias identificadas na fase hexânica da casca da raiz a substância predominante foi o ácido gálico com 5,25%.

Nesse tipo de análise é comum a presença de carboidratos, os quais foram parcialmente caracterizados, após a sililação, por comparação do padrão de fragmentação observado no espectro de massas com as bibliotecas do aparelho. Entretanto, não foi realizada uma identificação individual de cada carboidrato por não ser essa classe de compostos o escopo do trabalho. Assim, a identificação dos carboidratos não foi incluída na Tabela 17, mas o seu teor em relação à área relativa foi calculada e apresentada nessa tabela, onde é possível notar a grande concentração desses compostos na fase hexânica da casca da raiz.

Os cromatogramas resultantes das análises, após sililação, da fase clorofórmica da casca e do cerne da raiz de *S. brasiliensis* são mostrados na Figura 11. Na Tabela 18 são apresentadas as substâncias identificadas.

Em relação ao percentual da área relativa foram identificadas 28,40% e 27,65% das substâncias presentes na casca e cerne da raiz, respectivamente. A maior parte das duas fases é composta por carboidratos ou substâncias cuja identificação não foi possível ao realizar a comparação dos dados obtidos com os dados espectrométricos das bibliotecas disponíveis no aparelho.

As substâncias predominantes na fase clorofórmica do cerne da raiz de *S. brasiliensis* foram galato de metila (18,50%) e ácido gálico (5,99%) e na fase clorofórmica da casca os constituintes em maior concentração foram galato de metila (21,64%) e ácido gálico (4,05%).

Devido ao baixo percentual de substâncias identificadas na fase clorofórmica, após a silição, por CG-EM optou-se por não realizar a derivatização da fase AcOEt, pois essa fase é ainda mais hidrofílica e, conseqüentemente, apresentaria um número ainda menor de substâncias identificadas.

Figura 11 – Cromatogramas de íons totais da fase clorofórmica da casca (A) e do cerne (B) da raiz de *S. brasiliensis*

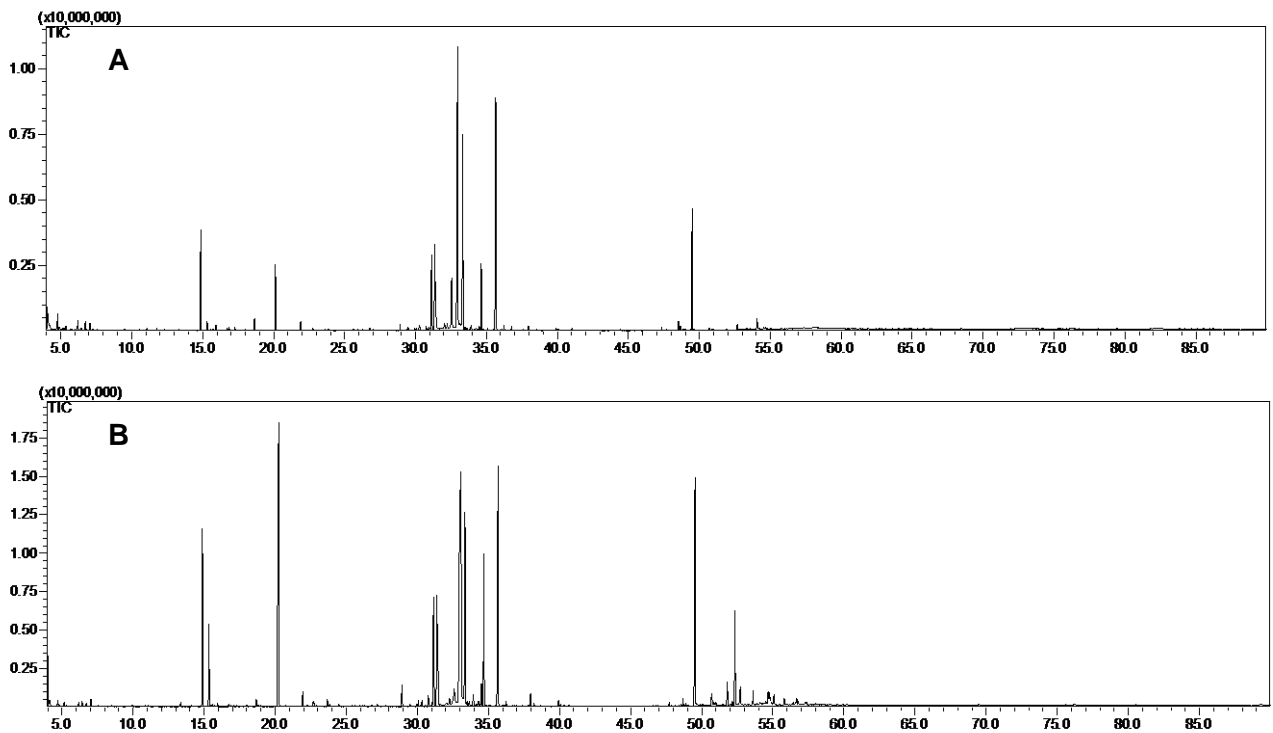


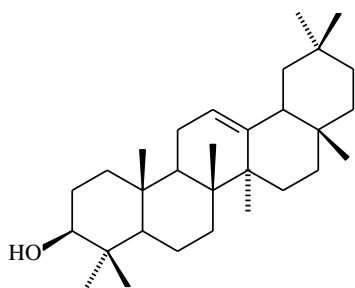
Tabela 18 – Substâncias identificadas (% área relativa) na fase clorofórmica da casca e do cerne da raiz de *S. brasiliensis*.

t_R	Identificação	M+	Fórmula	% área	
				Cerne	casca
6.420	buta-2,3-diol	234	$C_{10}H_{26}O_2Si_2$	0,13	0,12
6.702	cicloex-1-en-1-ol	170	$C_9H_{18}OSi$	0,08	–
7.045	ácido 2-hidroxiopropanóico	234	$C_9H_{22}O_3Si_2$	0,19	0,26
7.536	ácido 2-hidroxietanóico	220	$C_8H_{20}O_3Si_2$	0,03	–
9.963	ácido 3-hidroxiopropanóico	234	$C_9H_{22}O_3Si_2$	0,05	–
11.069	(<i>E</i>)-3-hidróxi-3-metóxipropenoato de metila	204	$C_8H_{16}O_4Si$	0,03	0,08
15.949	ácido butanodióico	262	$C_{10}H_{22}O_4Si_2$	0,10	0,32
16.865	3-hidroxi-but-2-ona	260	$C_{10}H_{20}O_4Si$	0,05	0,16
17.061	ácido (<i>E</i>)-but-2-enodióico	260	$C_{10}H_{20}O_4Si_2$	0,03	–
22.897	3-metóxi-4-hidroxibenzaldeído	224	$C_{11}H_{16}O_3Si$	0,03	–
25,616	Ácido 4-hidroxibenzóico	282	$C_{13}H_{22}O_3Si_2$	–	0,06
27.768	3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeído	254	$C_{12}H_{18}O_4Si$	0,06	–
29.482	ácido 3-metóxi-4-hidroxibenzóico	312	$C_{14}H_{24}O_4Si_2$	0,07	0,25
31.023	ácido 3,4-hidróxidobenzóico	370	$C_{16}H_{30}O_4Si_3$	0,08	–
32,974	3,4,5-trihidroxibenzoato de metila (galato de metila)	296	$C_{14}H_{24}O_3Si_2$	18,50	21,64
34.684	ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (ácido gálico)	458	$C_{19}H_{38}O_5Si_4$	5,99	4,05
36.235	ácido hexadecanóico	328	$C_{19}H_{40}O_2Si$	0,12	0,25
36,755	β -eudesmol	294	$C_{18}H_{34}OSi$	–	0,23
37.815	ácido 2,3,4-trimetóximandélico	386	$C_{17}H_{30}O_6Si_2$	0,04	–
38.174	16-metilheptadecan-1,2-diol	430	$C_{22}H_{54}O_2Si_2$	0,07	–
38.657	ácido 3,5-dihidroxibenzóico	370	$C_{16}H_{30}O_4Si_3$	0,03	–
39.914	ácido (9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i>)-octadeca-9,12-dienóico	352	$C_{12}H_{40}O_2Si$	0,18	0,15
40.064	Ácido linolênico	350	$C_{12}H_{38}O_2Si$	0,07	–
47.689	hexanoato de 2,3-dihidroxi-propila	474	$C_{25}H_{54}O_4Si_2$	0,10	0,10
48.679	ácido 2-hidroxiheptanóico	290	$C_{13}H_{30}O_3Si_2$	0,23	0,26
50.683	(<i>Z</i>)-octadec-9-enoato de 2,3-dihidroxi-propila	500	$C_{27}H_{56}O_4Si_2$	0,49	0,14
52.687	4-metóxi-fenol	196	$C_{10}H_{16}O_2Si$	0,61	0,33
55.776	ácido fumarilacetoacético	488	$C_{20}H_{40}O_6Si_4$	0,19	–
Total identificado (% área relativa)				27,65	28,40
Carboidratos (% área relativa)				43,35	58,65
Não identificados (% área relativa)				28,99	12,95

5.2. Substâncias isoladas de *S. brasiliensis*

Na Figura 12 encontram-se apresentados os dados espectrométricos e físicos das substâncias isoladas das fases hexânica (**SB1** e **SB2**), diclorometânica (**SB3**) e acetato de etila (**SB4** e **SB5**) dos galhos, bem como as substâncias isoladas das fases hexânica (**SB6**) e clorofórmica (**SB7**, **SB8**, **SB9** e **SB10**) da casca da raiz de *S. brasiliensis*.

Figura 12 – Dados físicos e espectrométricos das substâncias isoladas dos galhos e raízes de *S. brasiliensis*

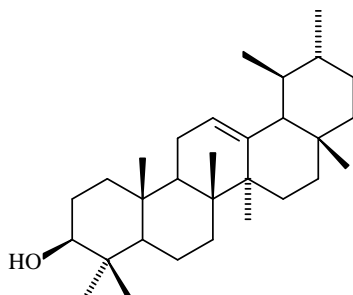


β -amirina (**SB1**)

Sólido branco; FM = C₃₀H₅₀O

RMN ¹H: Figura 13, p. 98. δ 3,25 (1H, *m*, H-3); 5,19 (1H, *t*, H-12).

RMN ¹³C: Figura 14, p. 98. δ 79,0 (C-3); 121,7 (C-12) e 145,2 (C-13).

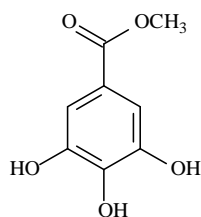


α -amirina (**SB2**)

Sólido branco; FM = C₃₀H₅₀O

RMN ¹H: Figura 13, p. 98. δ 3,25 (1H, *m*, H-3); 5,19 (1H, *t*, H-12).

RMN ¹³C: Figura 14, p. 98. δ 79,0 (C-3); 124,4 (C-12) e 139,6 (C-13).

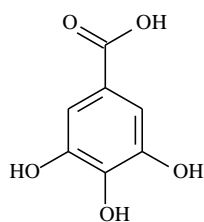


Galato de metila (**SB3**)

Sólido branco; FM = C₈H₈O₄

RMN ¹H: Figura 15, p. 100. δ 3,78 (3H, *s*, -OCH₃); 7,10 (3H, *s*, H-2 e H-6).

RMN ¹³C: Figura 16, p. 100. Tabela 19, p. 102.

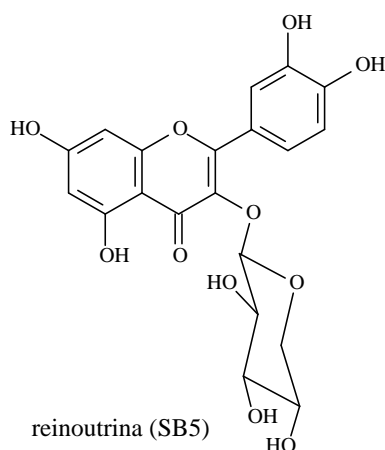


Ácido gálico (SB4)

Sólido branco; FM = $C_8H_8O_4$

RMN 1H : Figura 17, p. 101. δ 7,04 (2H, s, H-2 e H-6).

RMN ^{13}C : Figura 18, p. 102. Tabela 19, p. 102.

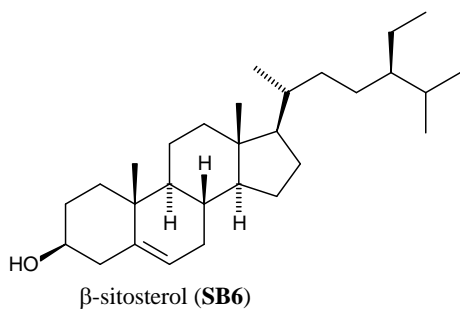


reinoutrina (SB5)

Sólido amarelo; FM = $C_{20}H_{18}O_{11}$

RMN 1H : Figura 19 a 21, p. 104 a 105. Tabela 20, p. 108.

RMN ^{13}C : Figura 22 a 24, p. 106 a 107. Tabela 20, p. 108.

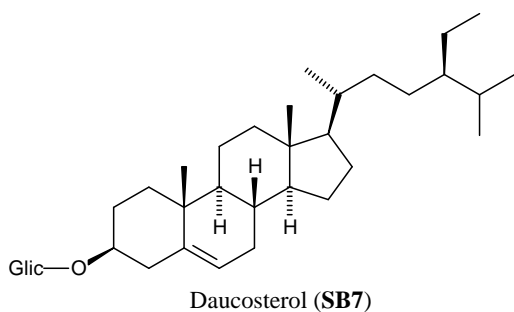


β -sitosterol (SB6)

Sólido branco; FM = $C_{29}H_{50}O$

RMN 1H : Figura 25, p. 110. δ 3,52 (1H, *m*, H-3); 5,33 (1H, *d*, $J = 5,4$ Hz, H-6).

RMN ^{13}C : Figura 26, p. 110. δ 71,7 (C-3); 121,6 (C-6) e 140,7 (C-5).

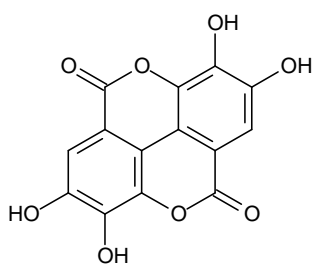


Daucosterol (SB7)

Sólido branco; FM = $C_{35}H_{60}O_6$

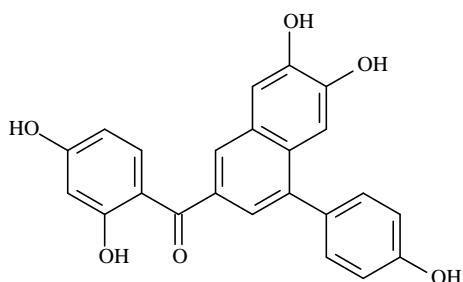
RMN 1H : Figura 27, p. 111. δ 3,64 (1H, *m*, H-3); 4,22 (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz, H-1').

RMN ^{13}C : Figura 28, p. 112. δ 76,8 (C-3); 76,9 (C-5'); 76,8 (C-3'); 73,5 (C-2'); 70,1 (C-4'); 61,1 (C-6') e 100,7 (C-1').

Ácido elágico (**SB8**)

FM = $C_{14}H_6O_8$

Identificado por CLAE-DAD: Figuras 29 a 32, p. 113.
Através da comparação do tempo de retenção e dos espectros no UV com o padrão.

schinopsona A (**SB9**)

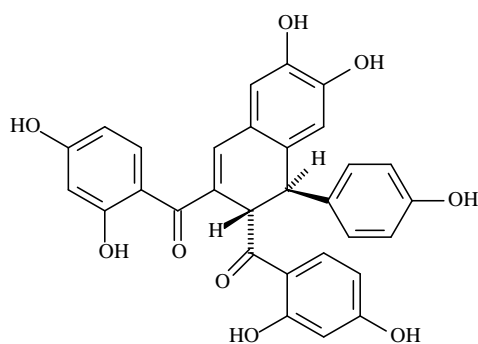
Sólido amarelo; FM = $C_{23}H_{16}O_6$

Cromatograma Figura 33, p. 117; Espectro no UV
Figura 34, p. 117; EM Figura 41, p. 120.

RMN 1H : Figura 35 e 36, p.118. Tabela 21, p. 122.

RMN ^{13}C : Figura 37 e 38, p.119. Tabela 21, p. 122.

HSQC Figura 39, p. 120; HMBC Figura 40 p. 120.

schinopsona B (**SB10**)

Sólido amarelo; FM = $C_{30}H_{22}O_9$

$T_F = 199,7$ à $201,0$ °C

Cromatograma Figura 48, p. 131; Espectro no UV
Figura 49, p. 132; Espectro no IV Figura 50, p. 132;
EM Figura 51, p. 132.

RMN 1H : Figura 52 a 54, p.133. Tabela 21, p. 141.

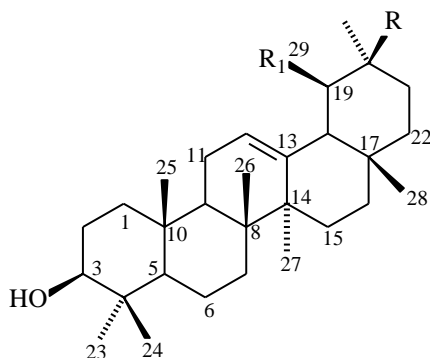
RMN ^{13}C : Figura 55 a 57, p.134. Tabela 21, p. 141.

HMQC Figura 59, p. 136; HMBC Figura 60 p. 137.

$[\alpha]_D^{20} = -52$ (c 0,028; MeOH)

5.3. Identificação e determinação estrutural dos constituintes químicos isolados de *S. brasiliensis*

5.3.1. Identificação de SB1 e SB2



R = CH₃, R₁ = H - β -amirina (**SB1**)
 R = H, R₁ = CH₃ - α -amirina (**SB2**)

As substâncias **SB1** e **SB2** foram identificadas em mistura sendo obtidas da fase hexânica dos galhos de *S. brasiliensis* (subfração HGSB.3-C, conforme item 4.5.1.1. página 69), e apresentou-se como um sólido branco, solúvel em clorofórmio. Análise por CCDC revelada com o reagente de Lieberman-Burchard indicou tratar-se de uma substância de natureza terpenoídica. Esse resultado foi confirmado pela análise dos espectros de RMN de ¹H (Figura 13) destas substâncias a qual mostrou que a maior parte dos sinais estava registrada na região entre δ 0,70 e 1,25, indicando a presença de hidrogênios metílicos, característicos dessa classe de compostos.

O espectro de RMN de ¹H (Figura 13) da subfração HGSB.3-C apresentou um multipletto em δ 3,25 correspondente ao hidrogênio oximetínico e um tripleto em δ 5,19 atribuído ao hidrogênio olefínico, característicos de esqueleto do tipo oleanano e ursano. A mutiplicidade do tripleto em δ 5,19 é resultante do acoplamento vicinal entre o hidrogênio metínico (C_{sp2}) de C-12 com os hidrogênios metilênicos de C-11. Estas informações foram corroboradas pelos sinais observados no espectro de RMN de ¹³C (Figura 14) em δ 79,01 (CH) referente ao carbono oxigenado C-3 e δ 145,15 (C) e δ 121,72 (CH) dos carbonos olefínicos do esqueleto oleanano, bem como em δ 139,55 (C) e δ 124,42 (CH) dos carbonos olefínicos do esqueleto ursano.

A comparação dos dados registrados, especialmente do espectro de RMN de ¹³C, com dados descritos na literatura (MAHATO & KUNDU, 1994) permitiu a

identificação desta subfração como sendo uma mistura dos triterpenos 3β -hidroxiolean-12-eno, mais conhecido como β -amirina e 3β -hidroxiurs-12-eno, mais conhecido como α -amirina. A β -amirina já havia sido isolada das folhas de *S. brasiliensis*, entretanto, esse é o primeiro relato da α -amirina na espécie.

Figura 13 – Espectro de RMN de ^1H das substâncias **SB1 e SB2** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

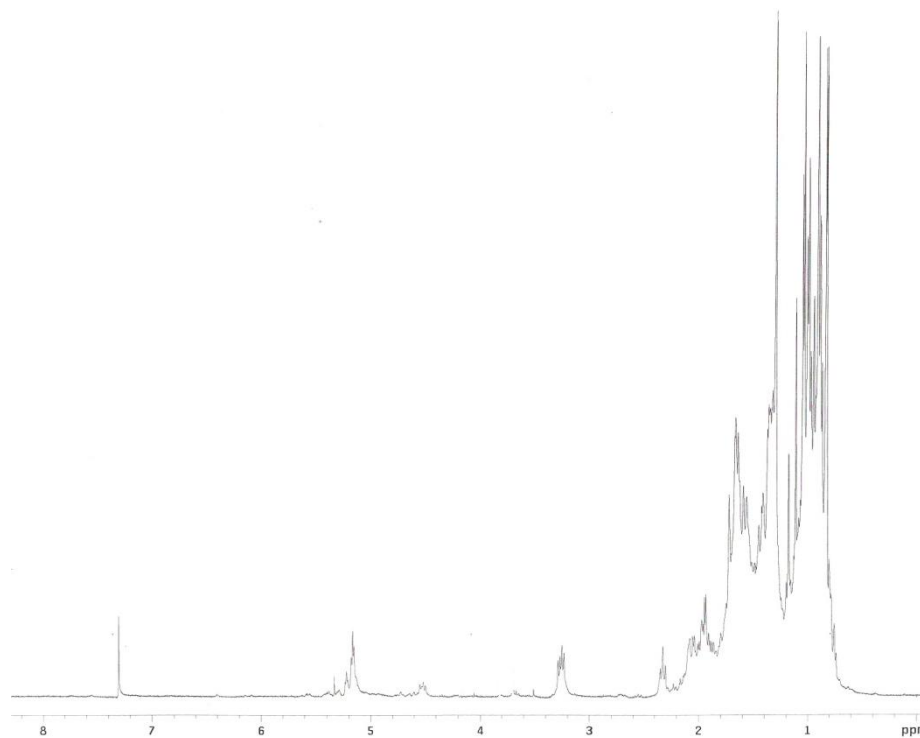
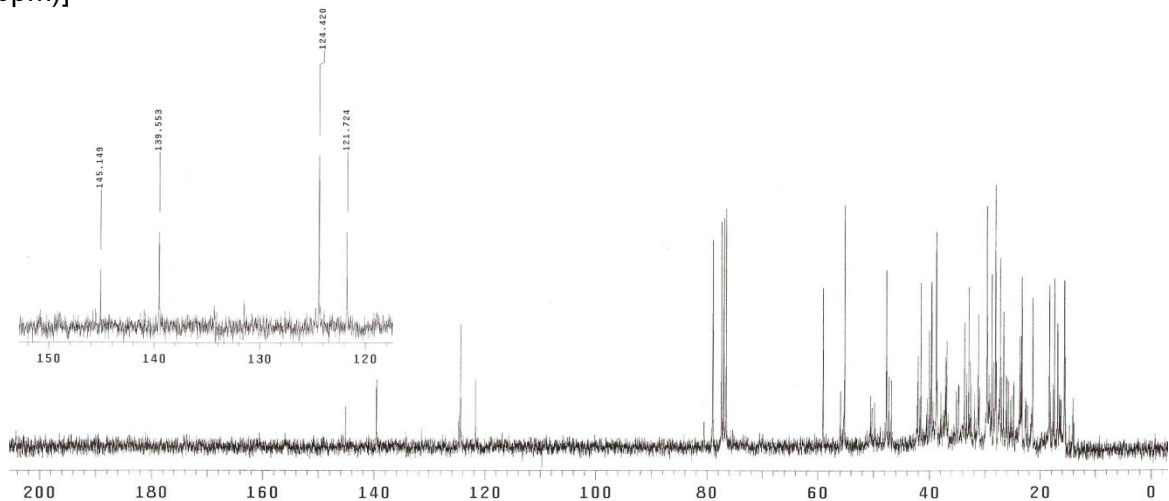
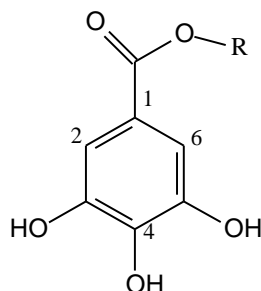


Figura 14 – Espectro de RMN de ^{13}C das substâncias **SB1 e SB2** [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]



5.3.2. Identificação de SB3 e SB4



R= CH₃ - galato de metila (**SB3**)

R= H - ácido gálico (**SB4**)

A substância **SB3** foi isolada da fase diclorometânica dos galhos de *S. brasiliensis* (fração DGSB.2, conforme item 4.5.2. p. 70), e apresentou-se como um sólido branco, solúvel em acetona. Análise por CCDC revelada com solução de FeCl₃ indicou tratar-se de uma substância fenólica devido a coloração escura na cromatoplaca.

O espectro de RMN de ¹H da substância **SB3** (Figura 15) apresentou um singlete em δ 7,10 (2H), característico de hidrogênios ligados a anel aromático (H-2 e H-6), além de um singlete em δ 3,78 (3H), sinal típico de hidrogênios de grupo metoxílico ligado a C_{sp2}.

O espectro de RMN de ¹³C de **SB3** (Figura 16) indicou a presença de seis sinais, entre eles um sinal em δ 167,31 de carbono não hydrogenado, referente ao carbono acila, três sinais de carbonos não hydrogenados, um sinal de carbono metínico, e um sinal de carbono metoxílico. O sinal em δ 146,00, referente a dois carbonos oxigenados, foi atribuído aos carbonos C-3 e C-5, o sinal em δ 138,76 foi atribuído ao C-4 e o sinal em δ 121,56 ao C-1, o sinal em δ 109,73 (2C) foi atribuído aos carbonos C-2 e C-6 e o δ 51,89 é compatível com o deslocamento químico de metoxila de éster.

A comparação dos dados registrados com os dados da literatura (MOREIRA, 2009) permitiram confirmar a estrutura da substância **SB3** como sendo o 3,4,5-trihidroxibenzoato de metila, mais conhecido como galato de metila.

Figura 15 – Espectro de RMN de ^1H da substância **SB3** [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]

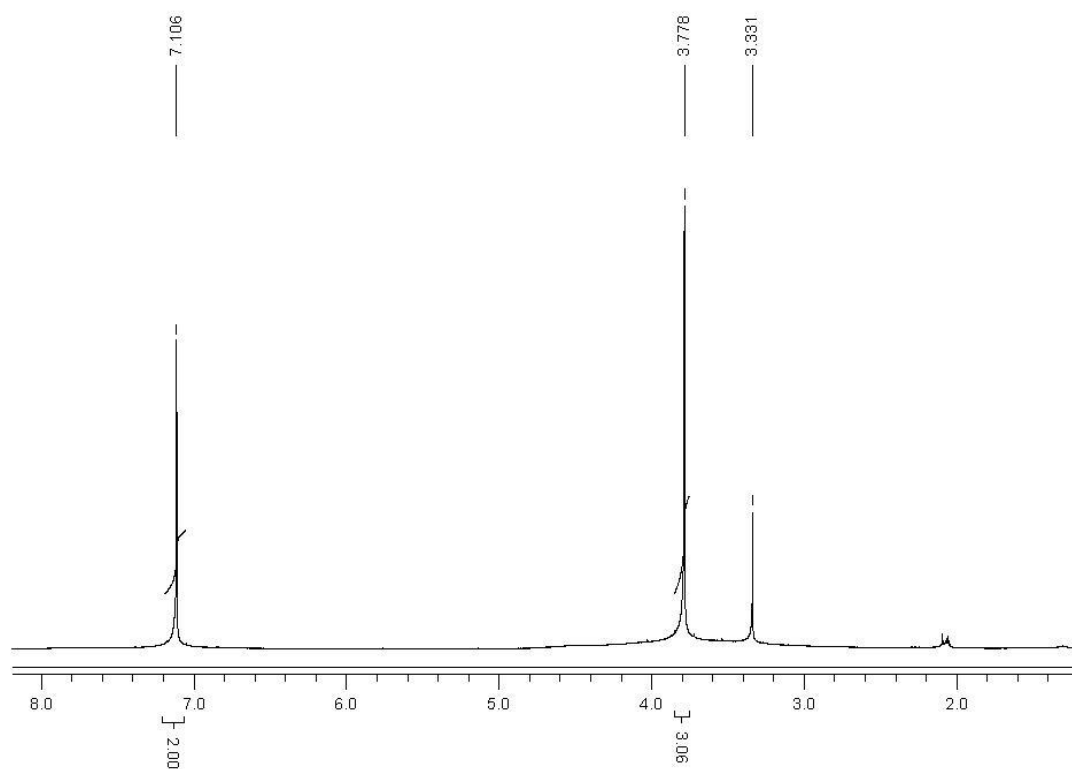
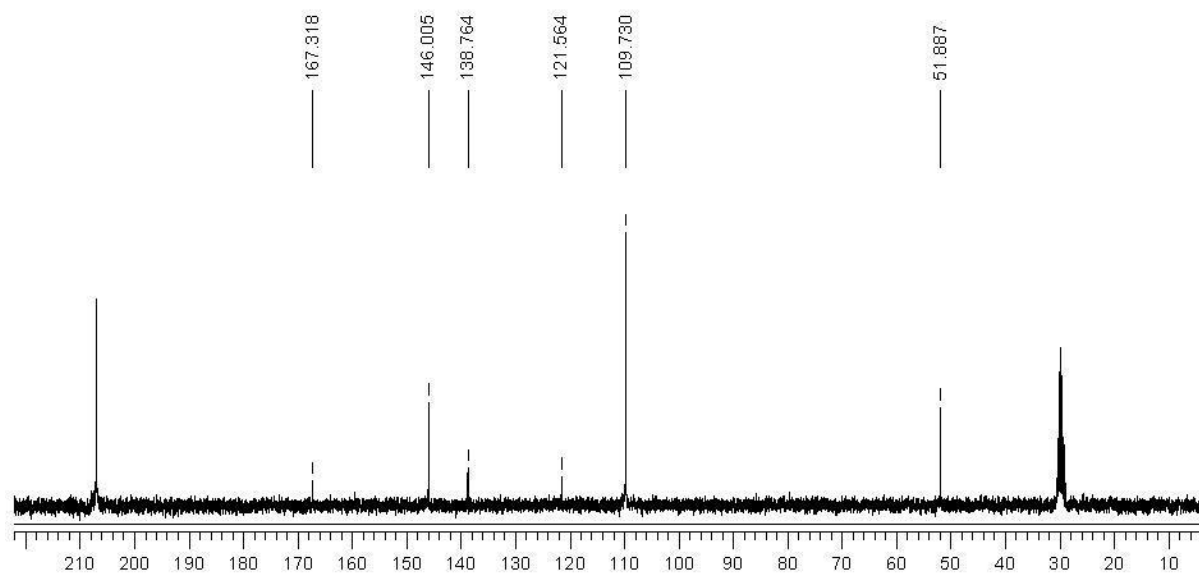


Figura 16 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **SB3** [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ (ppm)]



A substância **SB4**, isolada da fase acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis* (subfração AGSB.3B-2, conforme item 4.5.3.1. p. 72), apresentou-se como um sólido branco, solúvel em metanol. Análise por CCDC revelada com solução de FeCl_3 indicou tratar-se de uma substância fenólica devido à coloração escura na cromatoplaça. Os dados espectrais de **SB4** foram bastante semelhantes aos obtidos para **SB3**. O espectro de RMN de ^1H de **SB4** (Figura 17) apresentou um singlete na região de aromático, atribuído aos hidrogênios H-2 e H-6. No entanto, não foi observado sinal referente à metoxila. A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 18) confirmou os dados observados no espectro de hidrogênio. Assim, através da comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos com os dados descritos na literatura (MOREIRA, 2009) foi possível identificar **SB4** como sendo o ácido 3,4,5- trihidroxibenzoico, mais conhecido como ácido gálico.

Na Tabela 19 estão apresentados os valores de deslocamento químico de RMN ^1H e ^{13}C das substâncias **SB3** e **SB4**, comparando-os com valores descritos na literatura.

Figura 17 – Espectro de RMN de ^1H da substância **SB4** [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

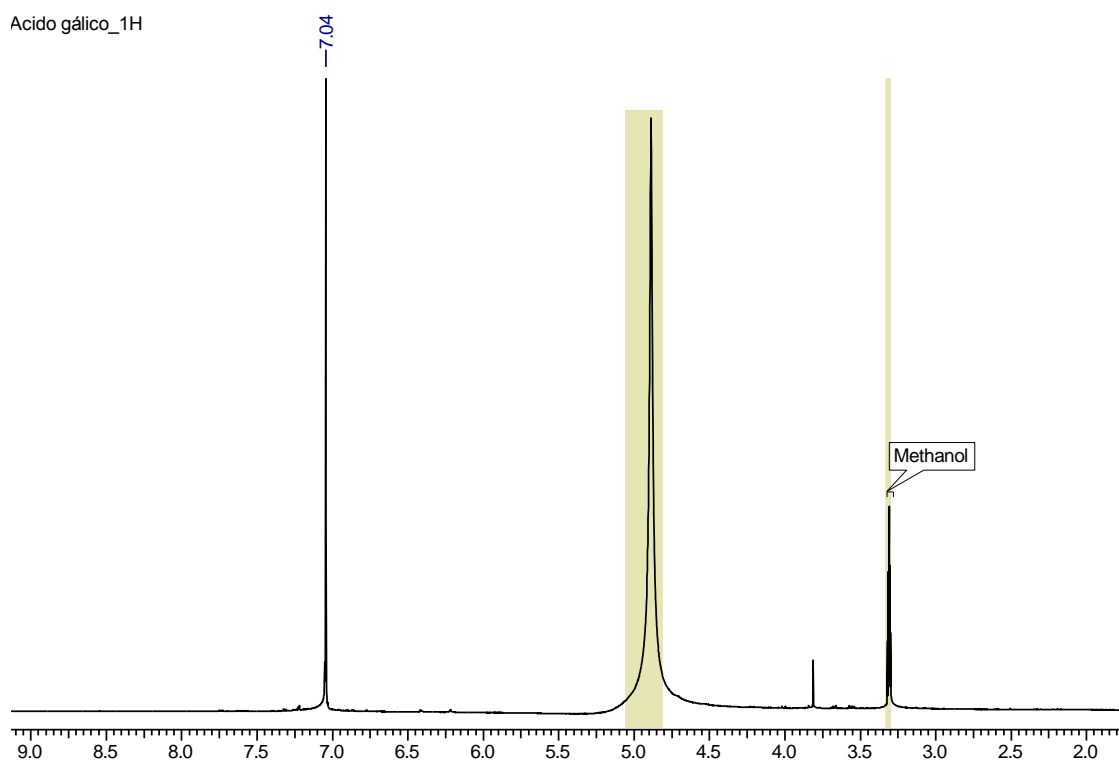
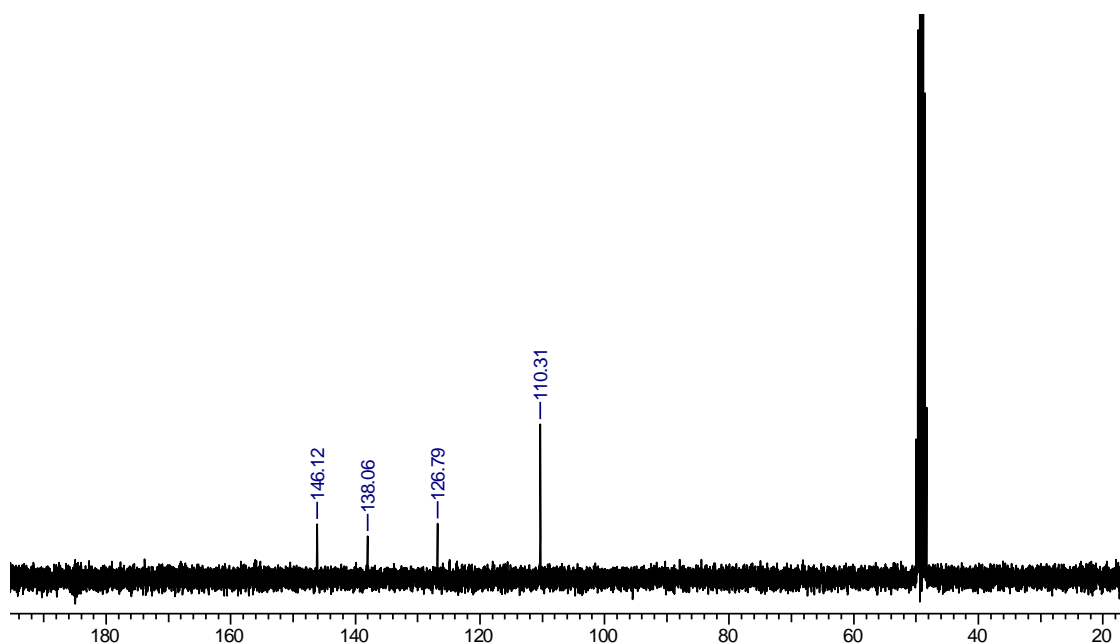
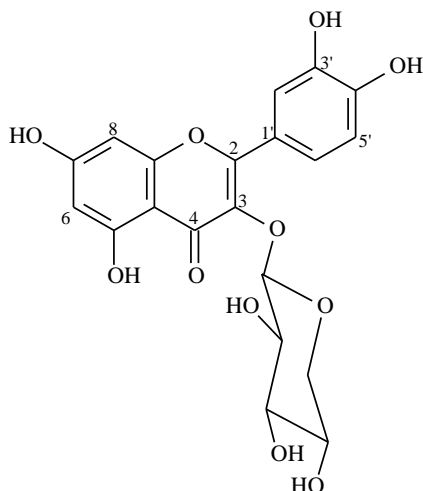


Figura 18 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **SB4** [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]**Tabela 19** – Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) de **SB3** e **SB4** [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}^*$, $\text{CD}_3\text{OD}^{**}$, δ (ppm)] e valores da literatura.

Posição	SB3*		galato de metila [#]		SB4**		Ácido gálico [#]	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	—	121,6	—	121,6	—	126,8	—	126,6
2	7,11 (s)	109,7	7,05 (s)	109,7	7,04 (s)	110,2	7,11 (s)	110,2
3	—	146,0	—	146,0	—	146,1	—	146,0
4	—	138,8	—	138,8	—	138,0	—	137,9
5	—	146,0	—	146,0	—	146,1	—	146,0
6	7,11 (s)	109,7	7,05 (s)	109,6	—	110,3	—	110,2
7	—	167,3	—	167,3	—	***	—	173,6
OCH_3	3,78 (s)	51,9	3,79 (s)	51,9	—	—	—	—

[#]MOREIRA, 2009. *** Não observado devido ao pequeno período de registro do espectro.

5.3.3. Identificação de SB5



A substância **SB5** foi isolada da fase acetato de etila dos galhos de *S. brasiliensis* (subfração AGSB.3B5-B, conforme item 4.5.3.1. p. 72), apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em metanol. Análise por CCDC revelada com solução de FeCl_3 indicou tratar-se de uma substância fenólica devido a coloração escura na cromatoplaca.

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 19 a 21) da substância **SB5** apresentou sinais referentes a hidrogênios ligados a carbonos aromáticos em δ 7,74 (*d*, $J = 2,1$ Hz), 6,88 (*dd*, $J = 8,4$ e $2,1$ Hz) e 7,55 (*d*, $J = 8,4$ Hz), integrando para um hidrogênio cada, atribuídos às posições H-2', H-5' e H-6', respectivamente, de um sistema de spins do tipo AMX de anel aromático 1,2,4-trissubstituído, atribuído ao anel B do flavonol. Puderam ser observados ainda, dois dubletos em δ 6,16 e δ 6,35 com ($J = 2,1$ Hz), integrando para um hidrogênio cada, característicos dos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A do flavonol, respectivamente. Este espectro mostrou também um dubleto em δ 5,13 ($J = 6,6$ Hz), característico de hidrogênio anomérico de um β -glicosídeo bem como sinais na região entre δ 3,42-3,92, característicos de hidrogênios de uma unidade glicosídica. Esses sinais sugeriram que **SB5** tratava-se de um flavonol glicosilado. Além desses sinais foi observado dois singletos em δ 7,03 e δ 3,81 os quais são característicos do galato de metila, o componente majoritário presente nas fases orgânicas dos galhos de *S. brasiliensis*. Percebe-se que, neste caso, o galato de metila é uma impureza, pois a integração do sinal em δ

7,03 é menor que 1, ao passo que era esperado que esse sinal fosse integrado para 2 hidrogênios, se o composto fosse esterificado com uma unidade galoil.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 22 a 24), subtraindo os sinais característicos do galato de metila, foram observados 20 carbonos. Os sinais característicos que permitiram classificar **SB5** como um flavonol glicosilado, com uma unidade osídica em C-3 foram o sinal de carbono carbonílico em δ 179,45 referente ao C-4, e os dois sinais de carbonos não hydrogenados em δ 135,62 e δ 158,40 referentes aos C-3 e C-2. Corroboraram com a proposta da natureza osídica de **SB5** o sinal em δ 104,65 correspondente ao carbono anomérico da unidade do açúcar, bem como os sinais entre δ 74,12 e δ 66,97.

Desta forma, através da análise espectroscópica dos dados e comparação com a literatura (MOREIRA, 2009) (Tabela 20) foi possível identificar a substância **SB5** como quercetina-3-O- β -D-xilopiranosídeo, também conhecida como reinoutrina. Essa substância foi isolada anteriormente das folhas de *S. brasiliensis* (MOREIRA, 2009).

Figura 19 – Espectro de RMN de ^1H da substância **SB5** [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

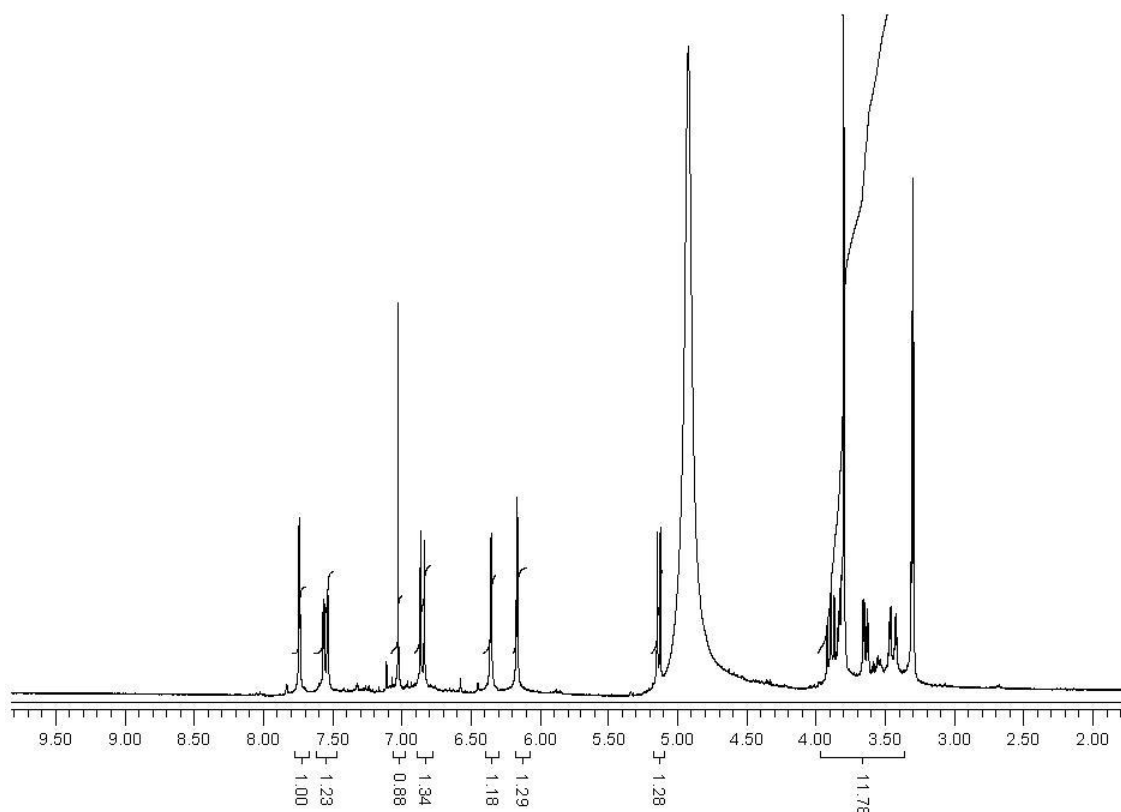


Figura 20 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **SB5** [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

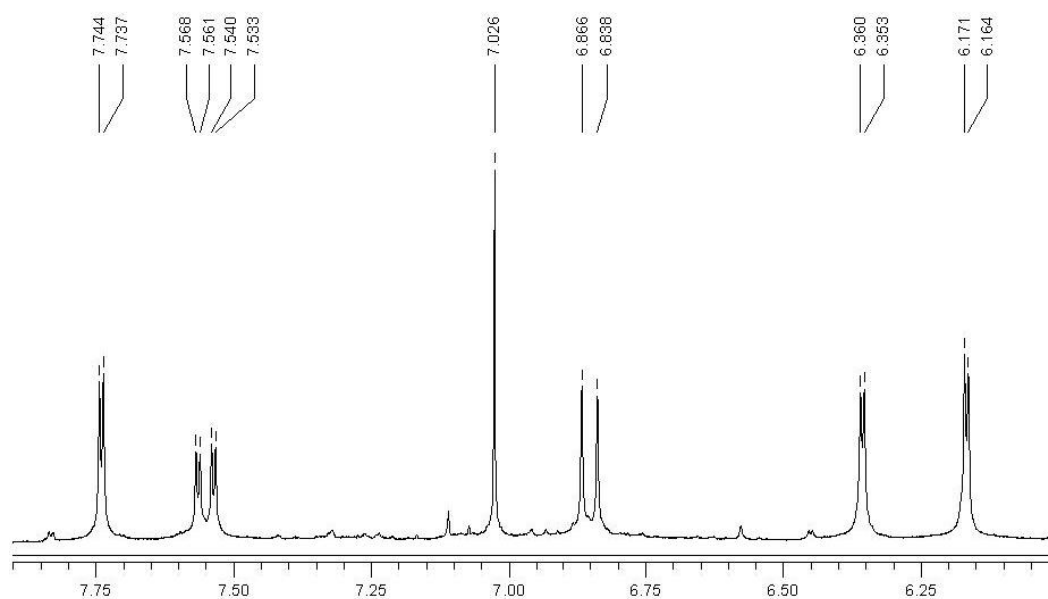


Figura 21 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **SB5** [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

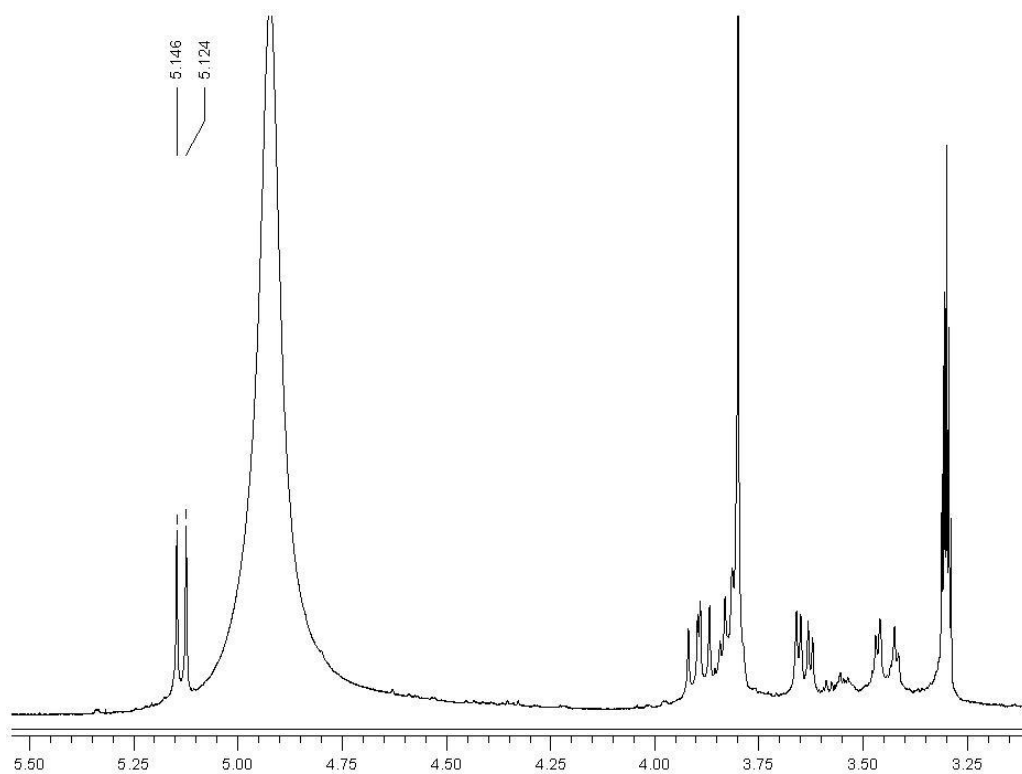


Figura 22 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **SB5** [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

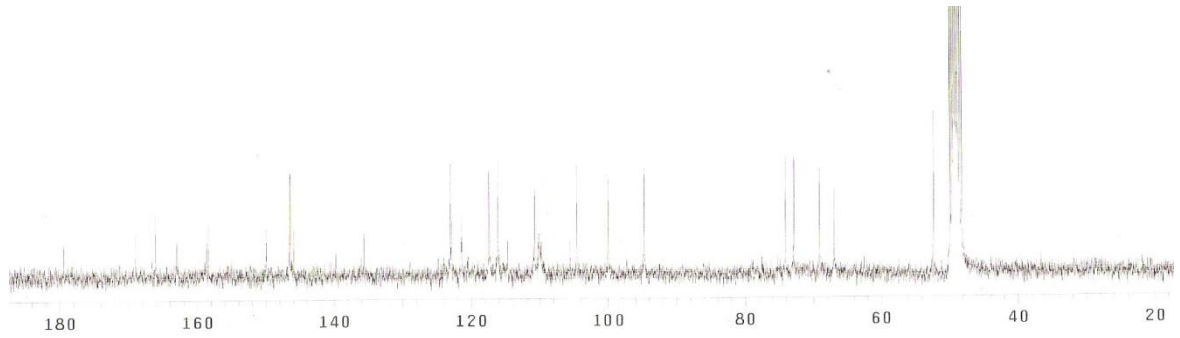


Figura 23 – Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C da substância **SB5** [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

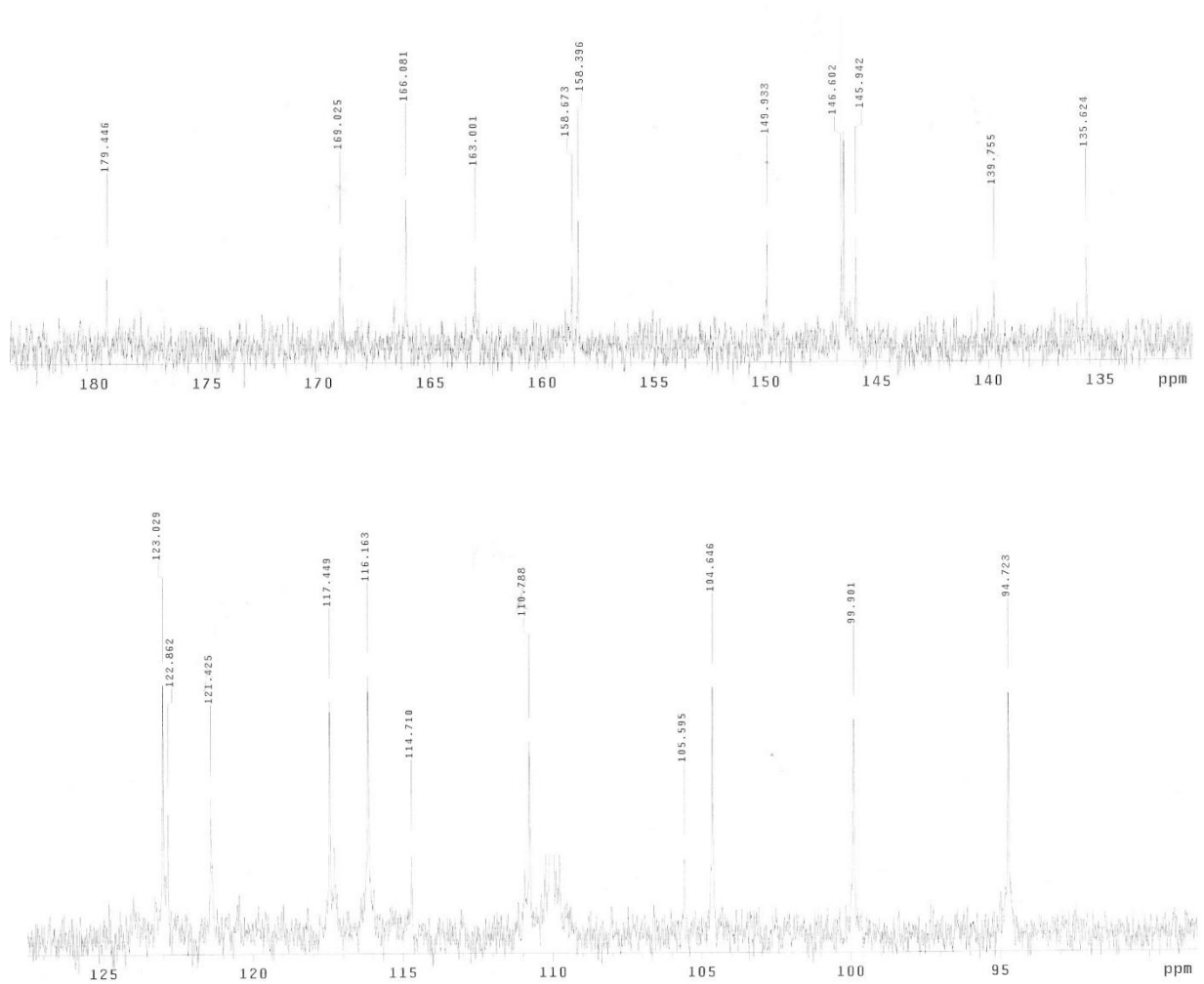


Figura 24 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **SB5** [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

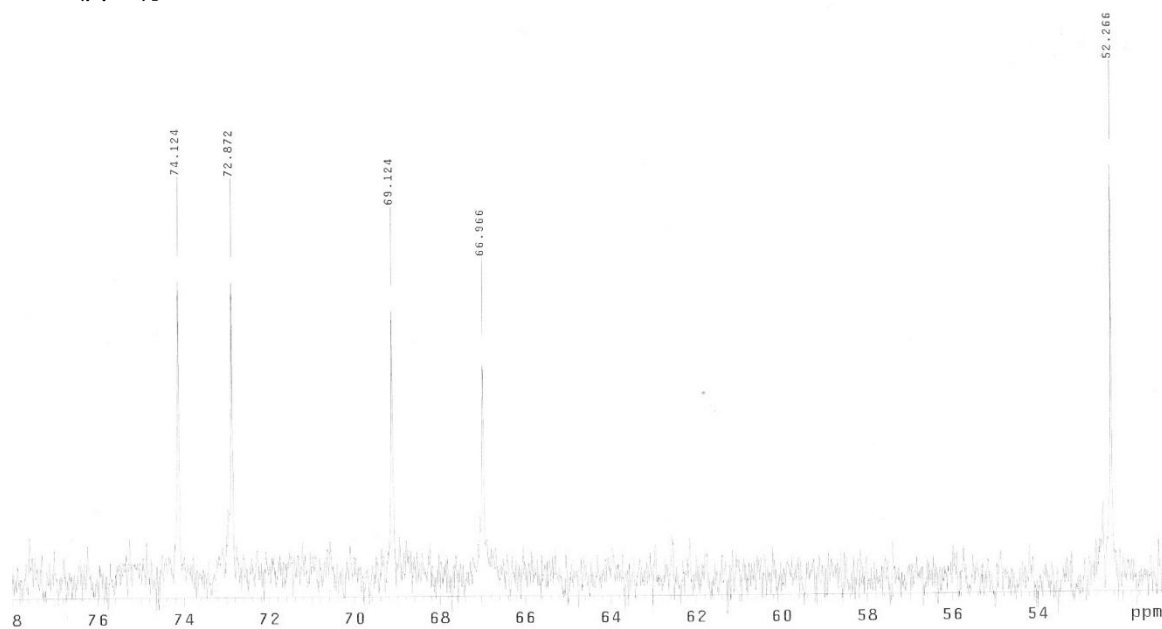
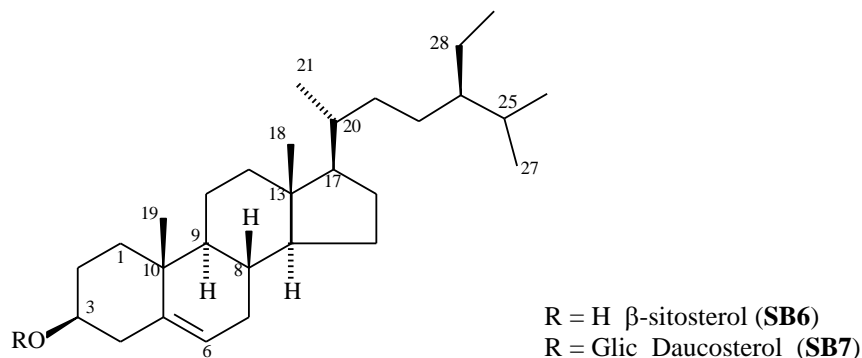


Tabela 20 – Dados de RMN de ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) de **SB5** [(CD₃OD, δ (ppm), mult., J (Hz))] e valores da literatura.

Posição	SB5		Reinourtrina	
	^1H	^{13}C	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}^*$
2	—	158,7	—	158,6
3	—	135,6	—	135,6
4	—	179,4	—	179,3
5	—	163,0	—	162,90
6	6,16 (d; 2,1)	99,9	6,15 (d; 2,1)	99,8
7	—	166,1	—	165,9
8	6,36(d; 2,1)	94,7	6,35 (d; 2,1)	94,7
9	—	158,4	—	158,3
10	—	105,6	—	105,5
1'	—	122,9	—	122,8
2'	7,74 (d; 2,1)	117,45	7,75 (d; 2,1)	117,4
3'	—	145,9	—	145,9
4'	—	149,9	—	149,9
5'	6,85 (d; 8,4)	116,2	6,85 (d; 8,4)	116,1
6'	7,55 (dd; 8,4; 2,1)	123,0	7,55 (dd; 8,4; 2,1)	123,0
1''	5,13 (d; 6,6)	104,7	5,13 (d; 6,6)	104,7
2''	3,87 (dd; 6,6;6,6)	72,9	3,89 (dd; 6,6;6,6)	72,9
3''	3,63 (dd; 8,4; 3,3)	74,1	3,64 (dd; 8,4; 3,3)	74,1
4''	3,88-3,24 (m)	69,1	3,88-3,24 (m)	69,1
5''	eq. 3,42 (dd; 13,2, 3,0) ax. 3,88-3,24 (m)	66,9	eq. 3,44 (dd; 13,2, 3,0) ax. 3,88-3,24 (m)	67,0

* MOREIRA, 2009

5.3.4. Identificação de SB6 e SB7



A substância **SB6**, isolada da fase hexânica da casca da raiz de *S. brasiliensis* (fração HCaRSB.3-C, conforme item 4.5.5.1, p. 76), apresentou-se como um sólido branco, solúvel em clorofórmio. Quando analisado por CCDC revelou com o reagente de Lieberman-Burchard apresentou uma coloração rósea indicativo de triterpeno ou esteroide.

Através da análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 25) foi possível verificar a presença de vários sinais na região entre δ 0,67 e 1,00 correspondendo aos grupos metílicos característicos dessa classe de compostos, além de um multiplete em δ 3,52 correspondente ao hidrogênio oximetínico e um duplete em δ 5,33 ($J = 5,4$ Hz) indicativo de hidrogênio olefínico. O espectro de RMN de ^{13}C corroborou com esses dados, visto que foi observado sinal de carbono oximetínico em δ 71,75 (CH) e de carbonos olefínicos em δ 140,68 (C não hidrogenado) e 121,63 (CH) (Figura 26).

A comparação dos dados obtidos, especialmente o espectro de RMN de ^{13}C , com dados da literatura (MOREIRA, 2009) permitiram a identificação da substância **SB6** como sendo o β -sitosterol.

Muitos estudos relatam a ocorrência do β -sitosterol em conjunto com o estigmasterol. No entanto, nesse estudo foi isolado apenas o β -sitosterol. Esse resultado é interessante, pois o relato de potenciais fontes dessa substância e seus derivados é de grande importância, uma vez que, o sitosterol tem mostrado atividade anti-inflamatória, anti-neoplásica, anti-pirética e moduladora da atividade imunológica. Além disso, o β -sitosterol ajuda na redução do colesterol existente no

plasma dos seres humanos, sendo algumas vezes usado no tratamento da hipercolesterolemia (CARERI & ELVIRI, 2001; PRAGER et al. 2002).

Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H da substância **SB6** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

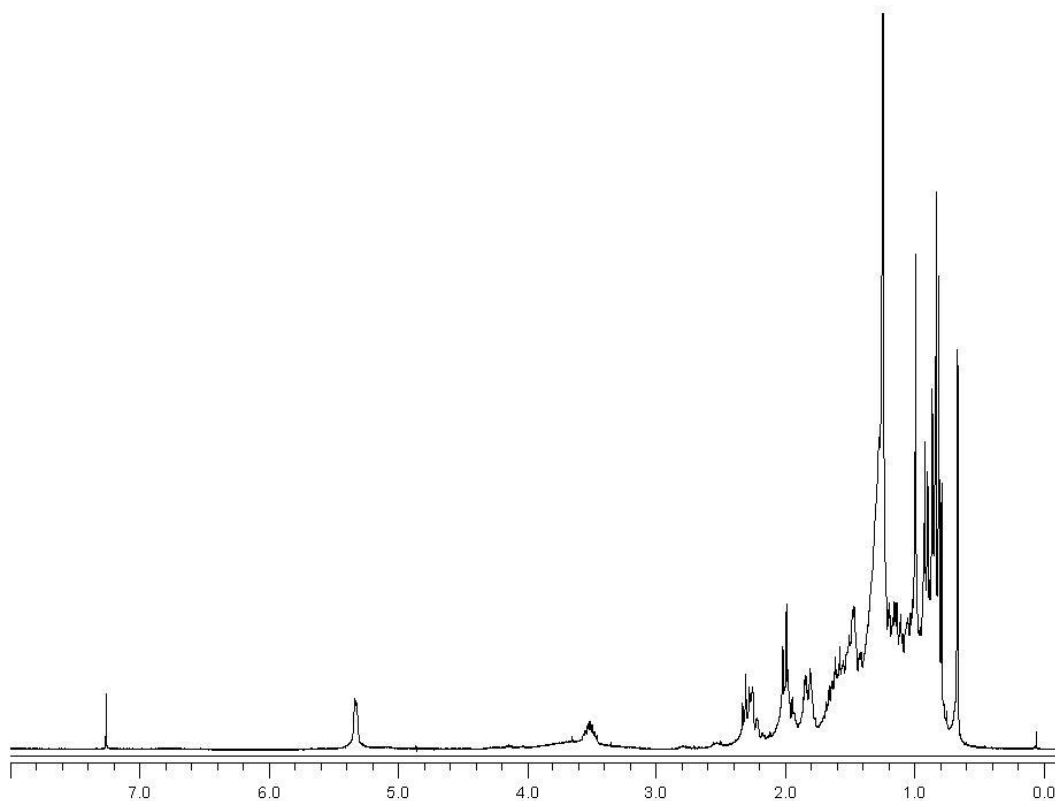
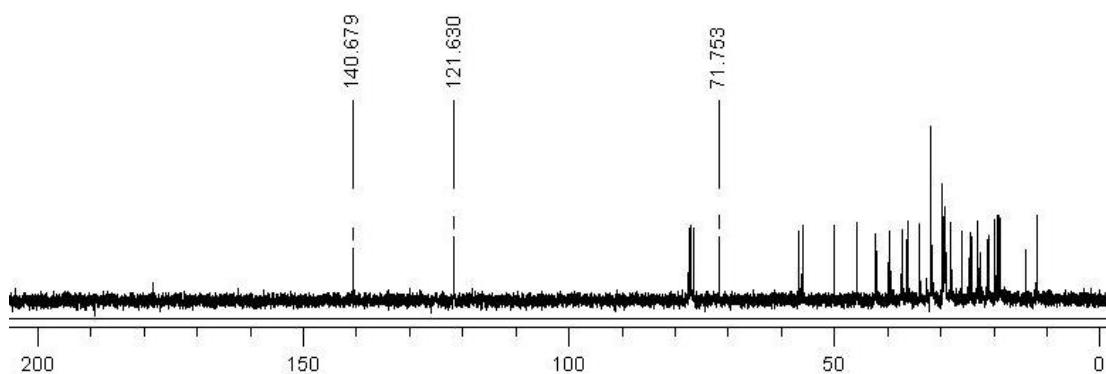


Figura 26 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **SB6** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]



A substância **SB7** foi isolada da fase clorofórmica da casca da raiz de *S. brasiliensis* (fração CCaRSB.4, conforme item 4.5.6., p. 76), e apresentou-se como um sólido branco, insolúvel em clorofórmio, acetona e metanol.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 27) de **SB7** apresentou sinais na região entre δ 0,63 e 0,97 correspondendo a grupos metílicos típicos de esteroides. Além desses, foram observados sinais adicionais entre δ 2,90 e δ 4,22 típicos da presença de um glicosídeo. A análise dos espectros de RMN ^{13}C (Figura 28) permitiu identificar a presença de sinal de carbono metínico anomérico em δ 100,7, além da presença de cinco sinais de carbonos oximetínicos (δ 76,9; 76,8; 73,5; 70,1 e 61,1) característicos de uma unidade de glicose. O sinal em δ 76,8 encontra-se mais desblindado quando comparado com o C-3 do β -sitosterol devido à ligação com a unidade osídica. Este valor é compatível com o deslocamento químico do C-3 de esteroide glicosilado. A configuração β da glicose foi estabelecida devido a constante de acoplamento de 7,6 Hz observada para o hidrogênio do carbono anomérico. Esses dados comparados com valores descritos na literatura (MOREIRA, 2009) permitiram a identificação inequívoca de **SB 7** como sendo o 3 β -O- β -D-glicopiranosil-sitosterol.

Figura 27 – Espectro de RMN de ^1H da substância **SB7** [300 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]

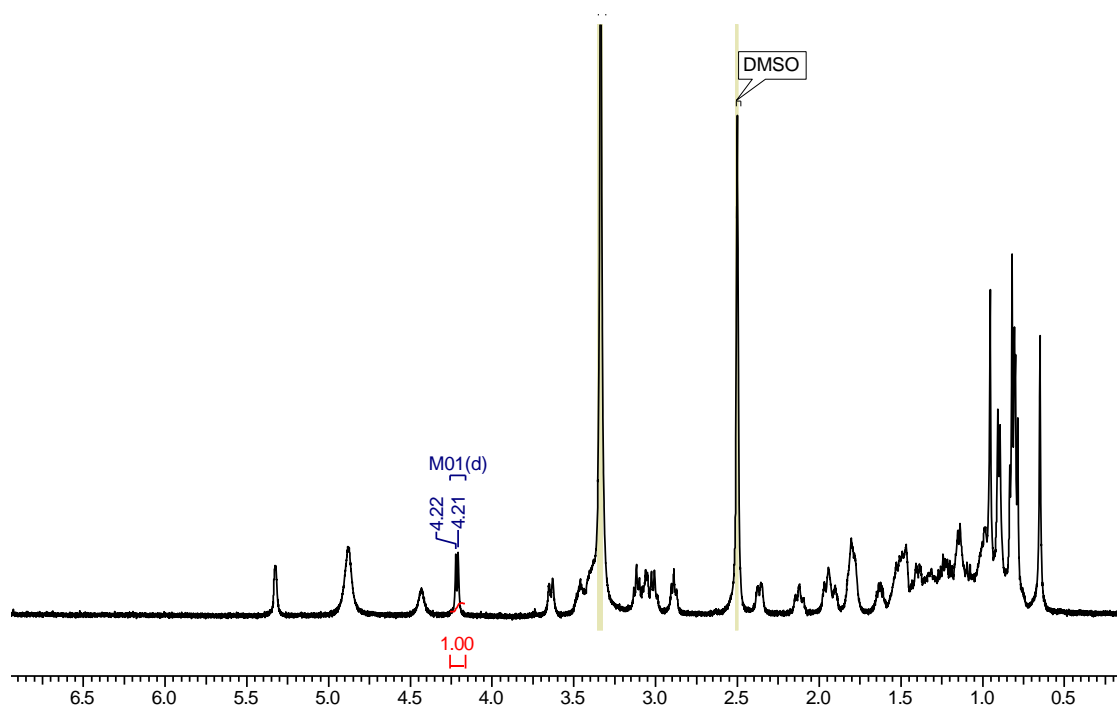
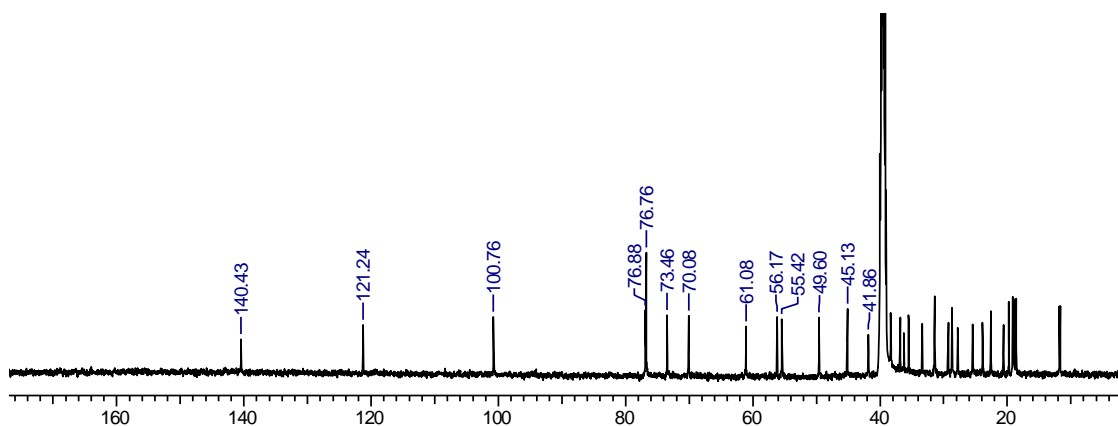
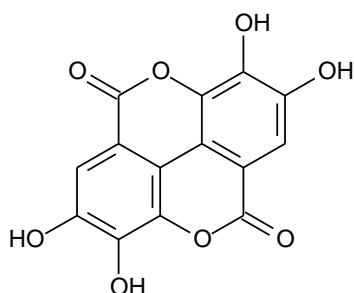


Figura 28 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **SB7** [75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ (ppm)]



5.3.5. Identificação de SB8



Ácido elágico (**SB8**)

A subfração CCarSB.3-C foi identificada através de CLAE-DAD como sendo composta por uma mistura de galato de metila (**SB3**) e ácido elágico (**SB8**), na proporção de 3:1, através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros no UV das substâncias presentes na subfração com os picos cromatográficos dos padrões, como pode ser observado nas Figuras 29 a 32.

Figura 29 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm da subfração CCaRSB.3-C. Picos cromatográficos: **1**- galato de metila, $t_{R1} = 2,43$ min; **2**- ácido elágico, $t_{R2} = 3,90$ min

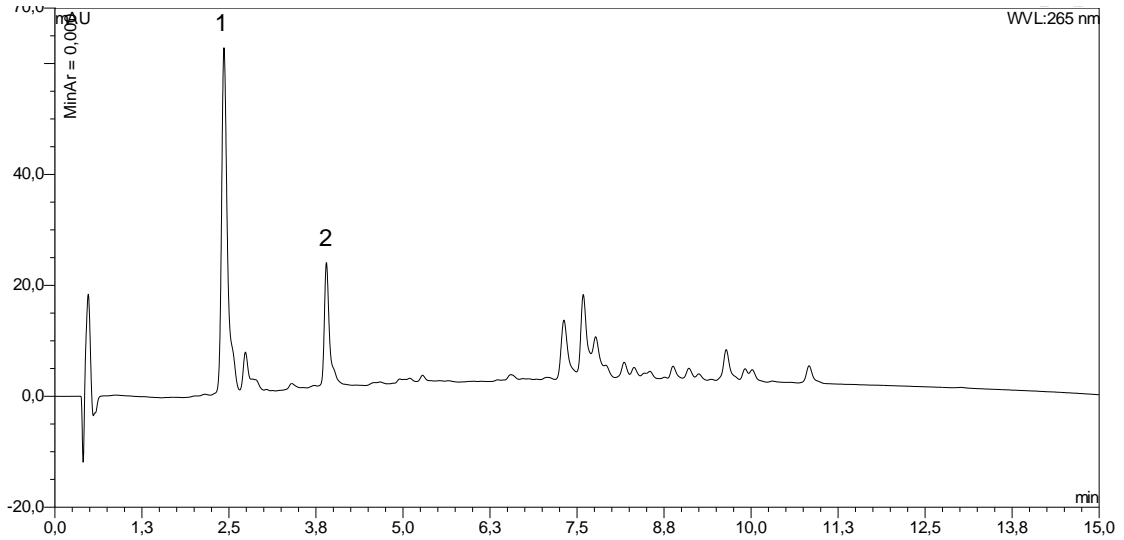


Figura 30 – Espectros no UV obtidos pelo detector DAD nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos cromatográficos **1** e **2** da figura 29

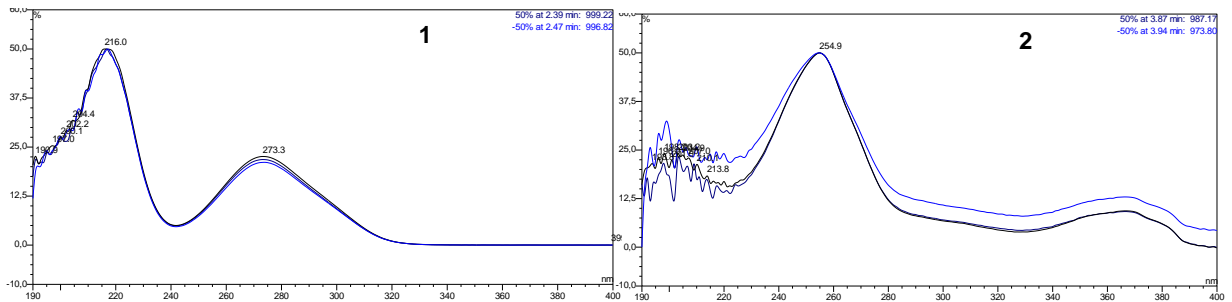


Figura 31 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do padrão galato de metila ($t_{R1} = 2,45$ min) e o seu espectro no UV obtidos pelo detector DAD nas regiões ascendente, apical e descendente

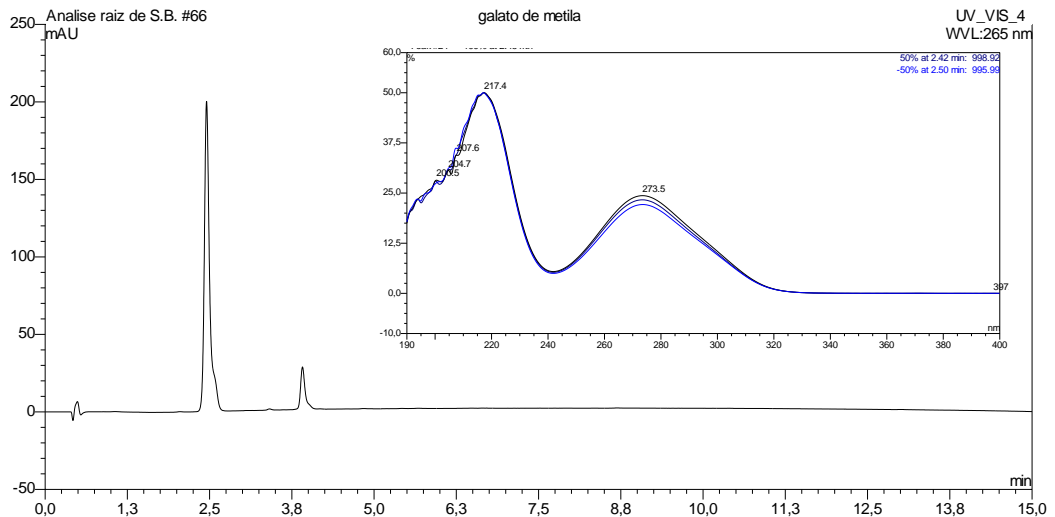
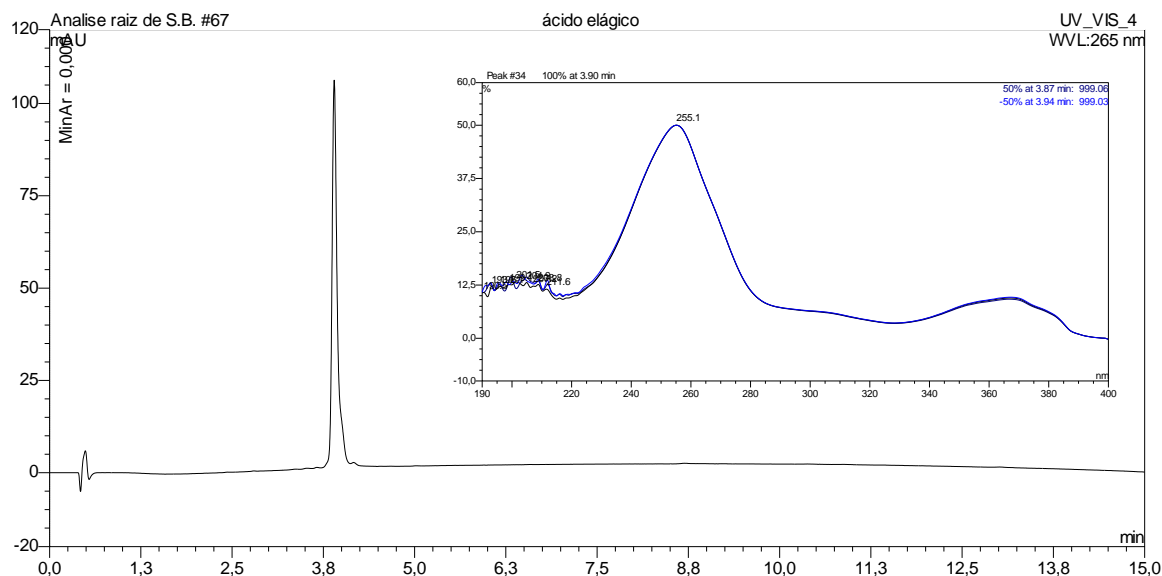
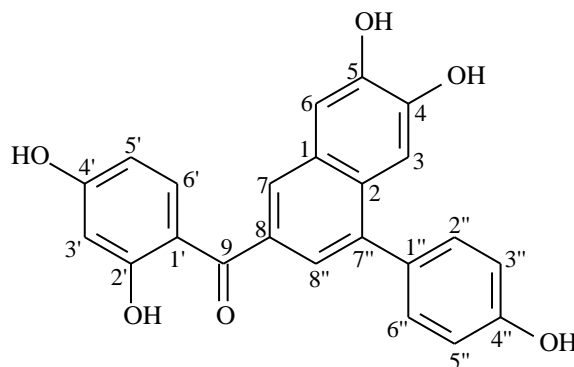


Figura 32 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do padrão ácido elágico ($t_{R1} = 3,90$ min) e o seu espectro no UV obtidos pelo detector DAD nas regiões ascendente, apical e descendente



5.3.6. Determinação estrutural da schinopsona A (SB9)



A substância **SB9** foi isolada da fase clorofórmica das raízes de *S. brasiliensis* (subfração CCaRSB.5B-3, conforme item 4.5.6.2. página 78), e apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em metanol. A análise por CCDC, revelada com solução de FeCl_3 , indicou tratar-se de uma substância fenólica devido a coloração escura na cromatoplaça. Após análise por CLAE-DAD, observou-se a presença de um único pico no cromatograma (Figura 33, p. 117), indicando que a fração era composta por uma substância majoritária. O espectro no UV/Vis do pico (Figura 34 p. 117) revelou

$\lambda_{\text{máx}}$ em 242, 284 e 330 nm, sugerindo tratar-se de uma chalcona. A elucidação estrutural da substância foi realizada com base na análise dos espectros de RMN de ^1H (Figura 35 e 36, p. 118), ^{13}C (Figuras 37 e 38, p. 119), HSQC (Figura 39, p. 120), HMBC (Figura 40, p. 120) e EM de alta resolução (Figura 41, p. 120). Os dados de RMN são mostrados na Tabela 21 (p. 122).

O espectro de massas de alta resolução (HRESIMS) no modo negativo da substância SB9 mostrou o íon *pseudo* molecular em m/z 387,0939 $[\text{M-H}]^+$ correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{O}_6$ (calculado para 387,0947). A presença de vinte e três carbonos na substância pode ser confirmada pelo espectro de RMN de ^{13}C (Figura 37).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 36) apresentou sinais referentes a hidrogênios ligados a carbonos aromáticos em δ 6,37 (*d*, $J = 2,1$ Hz), δ 6,38 (*dd*, $J = 9,4$ e $2,1$ Hz) e δ 7,62 (*d*, $J = 9,4$ Hz), integrando para um hidrogênio cada, correspondentes as posições 3', 5' e 6', respectivamente, de um sistema de spins do tipo ABX de anel aromático 1,2,4-trissubstituído, atribuído ao anel A da unidade I do dímero de chalcona. Analisando em conjunto os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e os espectros de correlações HSQC e HMBC foi possível atribuir todos os carbonos do anel A da unidade I do dímero. O espectro de HSQC permitiu correlacionar os hidrogênios em δ 6,37, 6,38 e 7,62 com os carbonos em δ 104,1 (C-3'), 109,1 (C-5') e 137,3 (C-6'), respectivamente. As correlações observadas no espectro de HMBC, melhor visualizadas na Figura 42, permitiram atribuir os outros carbonos do anel A dessa unidade e evidenciou a correlação a três ligações entre o H-6' e o carbono do grupo C=O em C-9, posicionando uma carbonila próxima ao anel A da unidade I.

Outros sinais observados no espectro de RMN de ^1H foram os dois singletos em δ 7,27 e 7,26 integrando para um hidrogênio cada, indicando um anel aromático tetrassubstituído, o espectro de HSQC permitiu correlacionar esses hidrogênios com os carbonos em δ 112,3 (C-6) e 109,4 (C-3), respectivamente. Esses sinais são referentes ao anel B da unidade I do dímero de chalcona e as correlações apresentadas no espectro de HMBC, melhor observadas na Figura 43, permitiram atribuir os outros carbonos dessa unidade. Além disso, essa região do espectro de HMBC mostrou a correlação entre o hidrogênio em δ 7,27 (H-6) e o carbono em δ 128,5 (C-7), o qual pela observação do espectro de HSQC está diretamente ligado

ao hidrogênio em 7,83 (1H, S_{largo}), foi observada a correlação desse hidrogênio com o C-9 (C=O), no espectro de HMBC. Assim, através das correlações observadas nessa região do espectro foi possível conectar o anel B com o anel A da unidade I do dímero de chalcona.

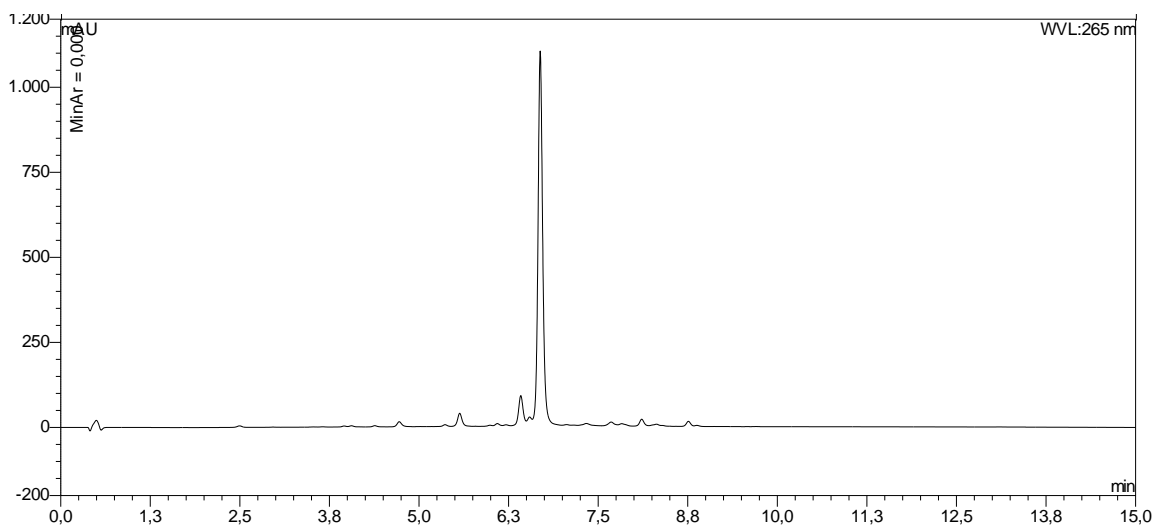
A junção das duas unidades do dímero de chalcona foi claramente confirmada pelas correlações observadas no espectro de HMBC entre o sinal referente ao H-3 (δ 7,26) e o carbono em δ 140,2 (C-7''), além da correlação do H-7 (δ 7,83) e os carbonos em δ 124,7 (C-8'') e δ 131,0 (C-2). O espectro de HSQC mostrou que o C-8'' (δ 124,7) está ligado ao hidrogênio em δ 7,34 (1H, d, $J = 1,7$; H-8'') e esse hidrogênio correlaciona a longa distância ($^3J_{H,C}$) com os carbonos C-7 (δ 128,5) e C-2 (δ 131,0) (Figura 43).

O espectro de RMN de 1H mostrou ainda dois dubletos em δ 7,31 ($J = 8,7$ Hz) e δ 6,93 ($J = 8,7$ Hz), integrando para dois hidrogênios cada, correspondentes as posições 2'',6'' e 3'',5'', respectivamente, característico de anel aromático 1,4-dissubstituído, atribuído ao anel B da unidade II do dímero de chalcona. A análise do espectro de HSQC permitiu correlacionar o dubleto em δ 7,31 com os carbonos em δ 132,1 (C-2'',6'') e o dubleto em δ 6,93 com os carbonos em δ 116,4 (C-3'',5''). Acoplamentos heteronuclear a longa distância (Figura 44) permitiu atribuir os outros sinais do anel B da unidade II do dímero além de localiza-lo em C-7''. Não foram observados sinais referentes ao anel A da unidade II do dímero.

Desta forma, a análise dos dados espectrométricos permitiu identificar a substância **SB9** como sendo 2',4,4',5-tetrahidroxichalcona-(2 \rightarrow 7'',8 \rightarrow 8'')-4''-hidroxietenilbenzeno, um dímero de chalcona com a ausência do anel A da unidade II. Essa chalcona dimérica é inédita na literatura e foi nomeada schinopsona A. Na Tabela 21 são mostrados os dados de RMN dessa substância e realizada uma comparação com os valores de deslocamento químico de ^{13}C apresentados pela substância urundevina B (BANDEIRA et al., 2011), um dímero de chalcona semelhante à schinopsona A, com a única diferença que aquela substância manteve o anel A da unidade II do dímero (Figura 45). A comparação dos dados de δ ^{13}C das duas substâncias comprova a grande semelhança nos deslocamentos químicos, corroborando com a proposta estrutural. Além disso, urundevina B também foi

isolada de uma Anacardiaceae, *Myracrodruon urundeuva* Allemão, demonstrando que as bichalconas são bem representadas nessa família (REDDY et al., 2011).

Figura 33 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm da substância **SB9***



* Condições cromatográficas ver item 4.1., página 62 parte experimental, t_R **SB9** = 6,69 min.

Figura 34 – Espectro no UV, obtido pelo detector DAD, da substância **SB9**

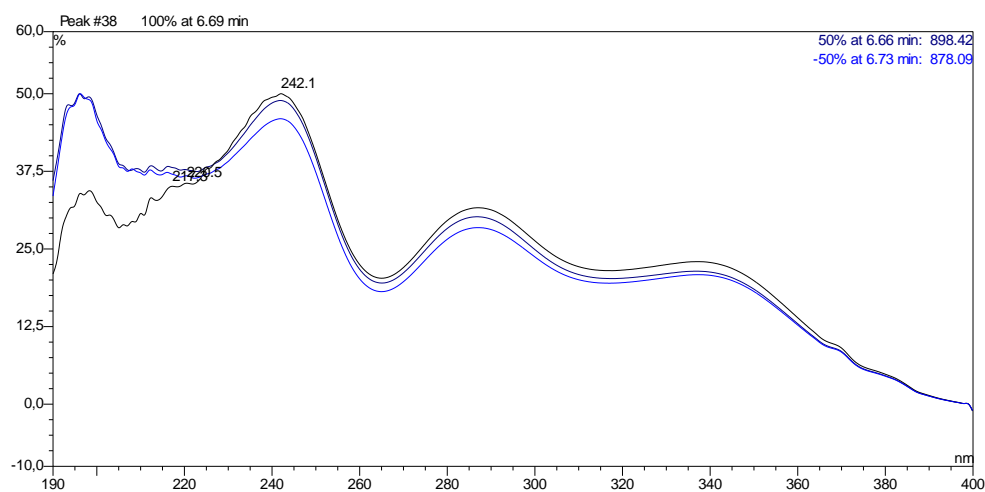


Figura 35 – Espectro de RMN de ^1H de **SB9** [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

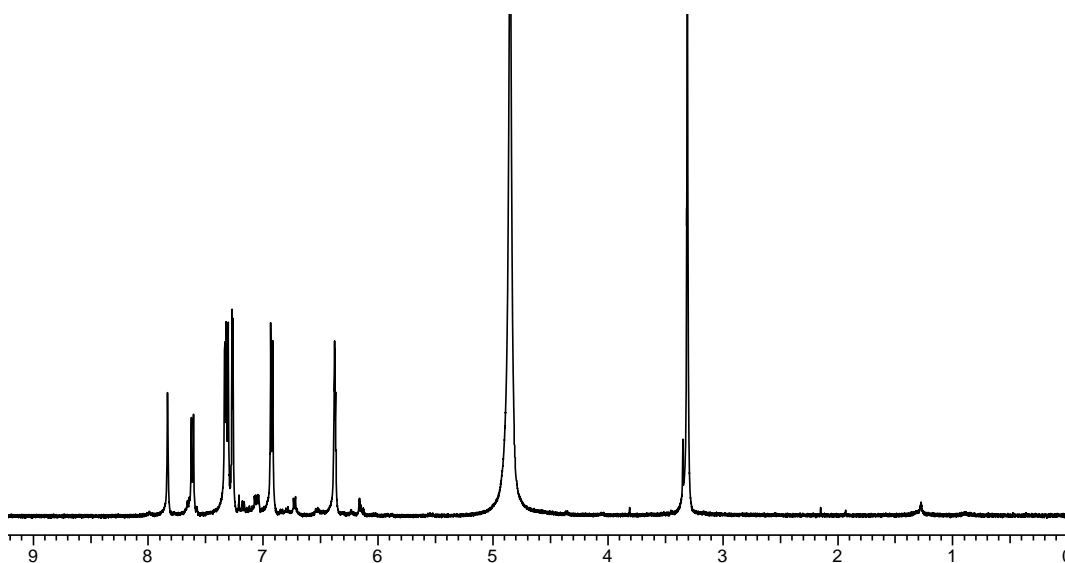


Figura 36 – Ampliações do espectro de RMN de ^1H de **SB9** [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

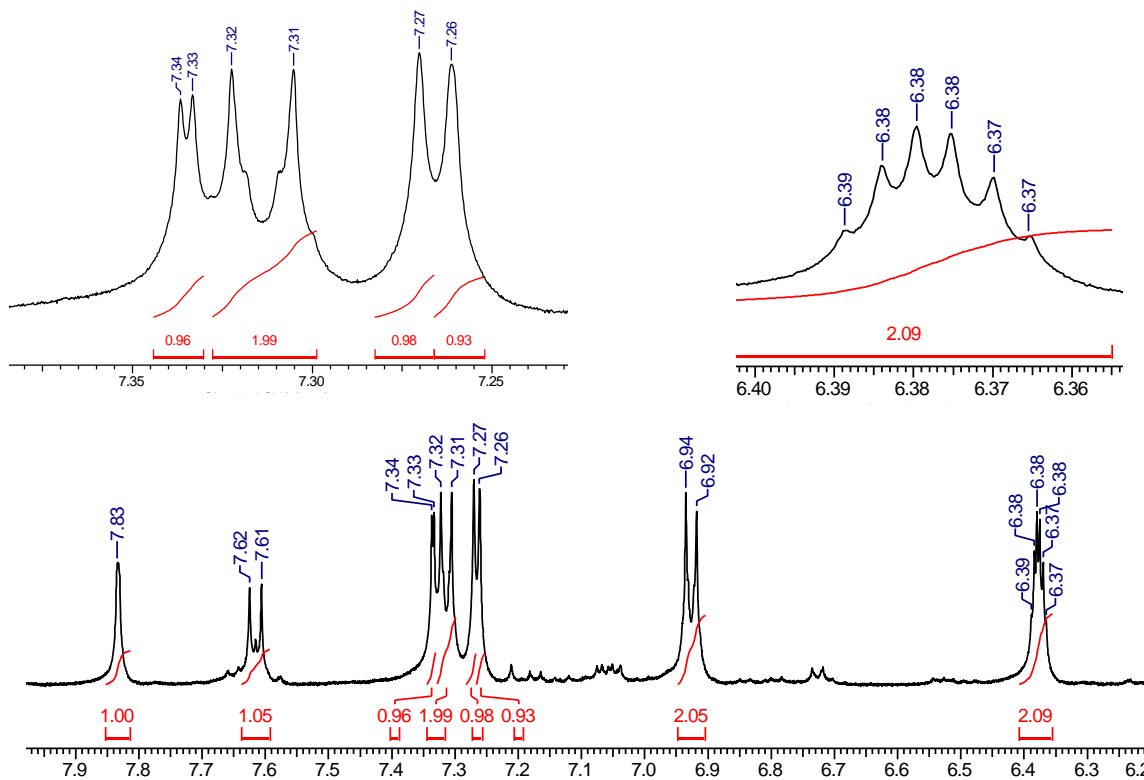


Figura 37 – Espectro de RMN de ^{13}C de **SB9** [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

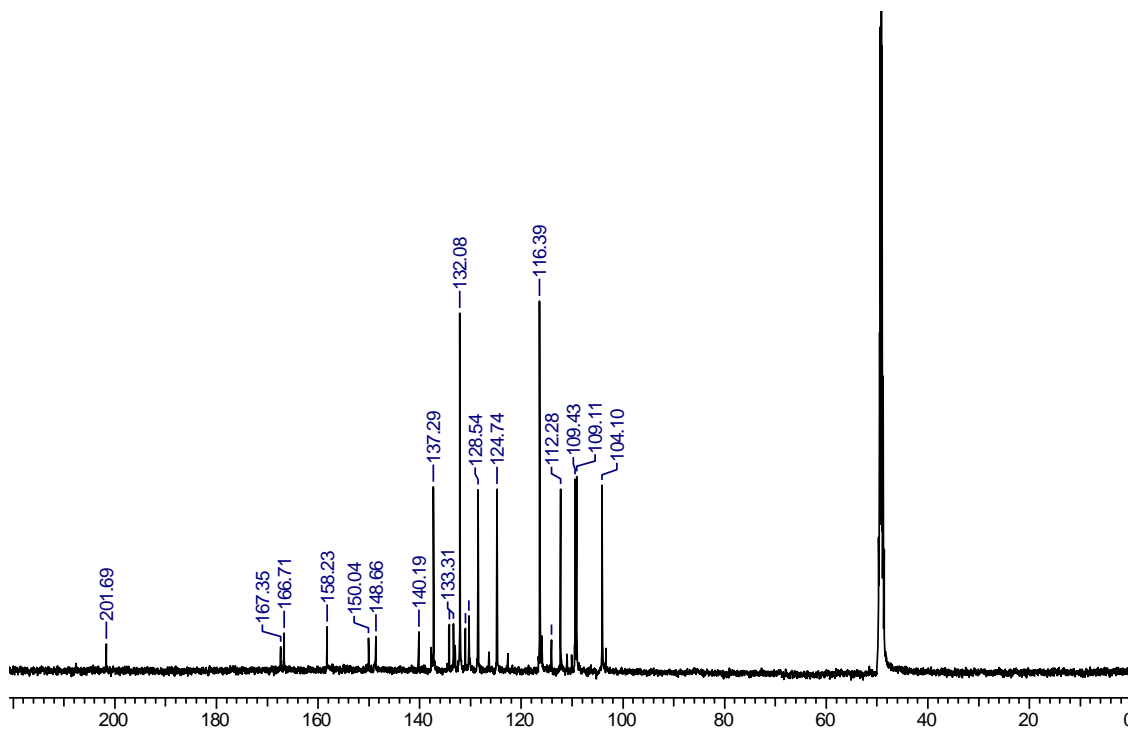


Figura 38 – Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C de **SB9** [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

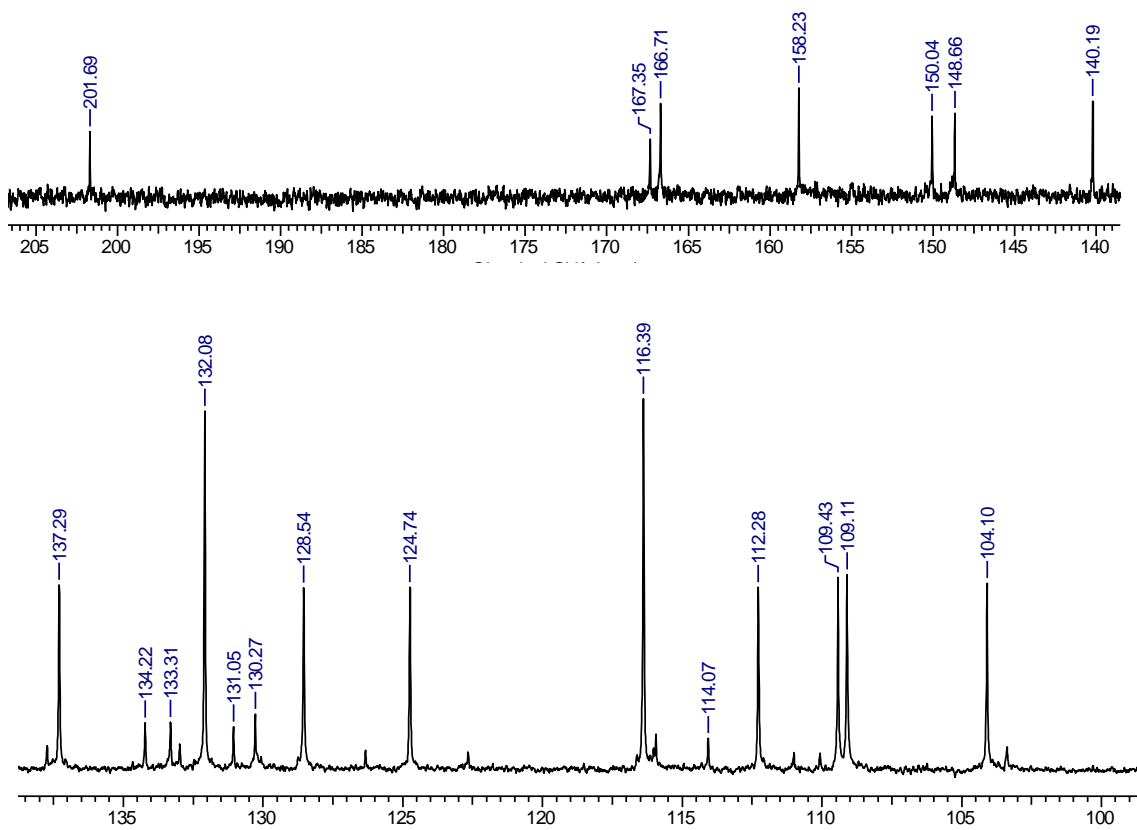


Figura 39 – Espectro de HSQC da substância **SB9** [500 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

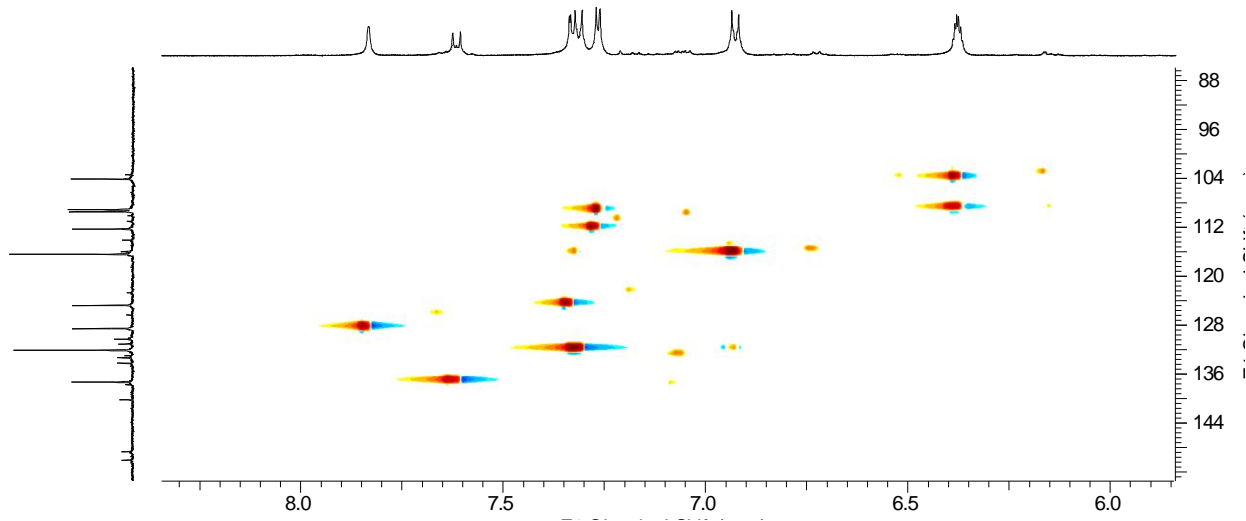


Figura 40 – Espectro de HMBC da substância **SB9** [500 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

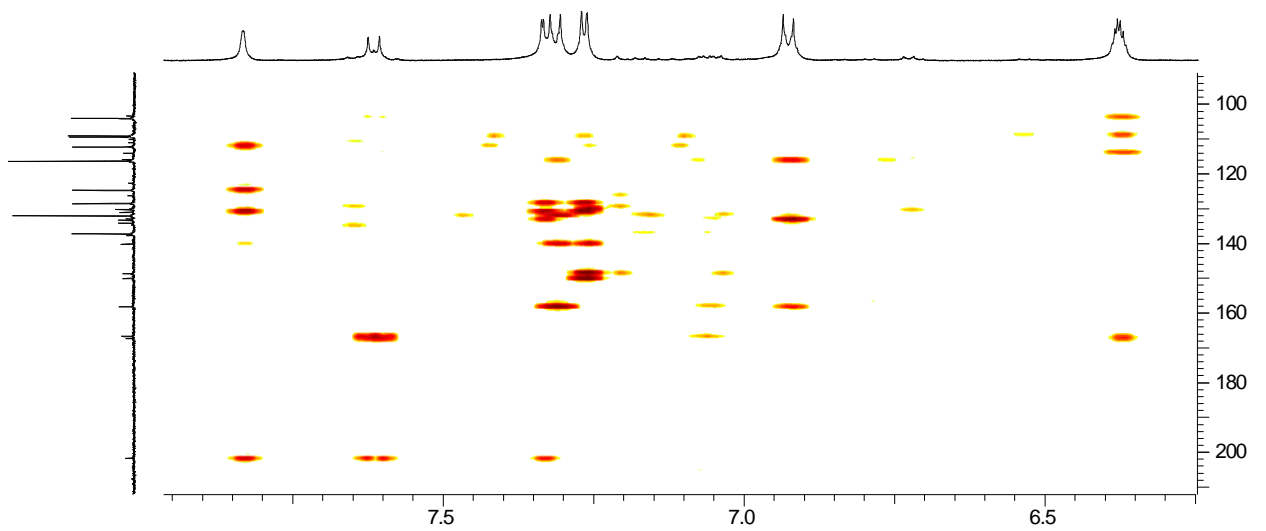


Figura 41 – Espectro de massas da substância **SB9**

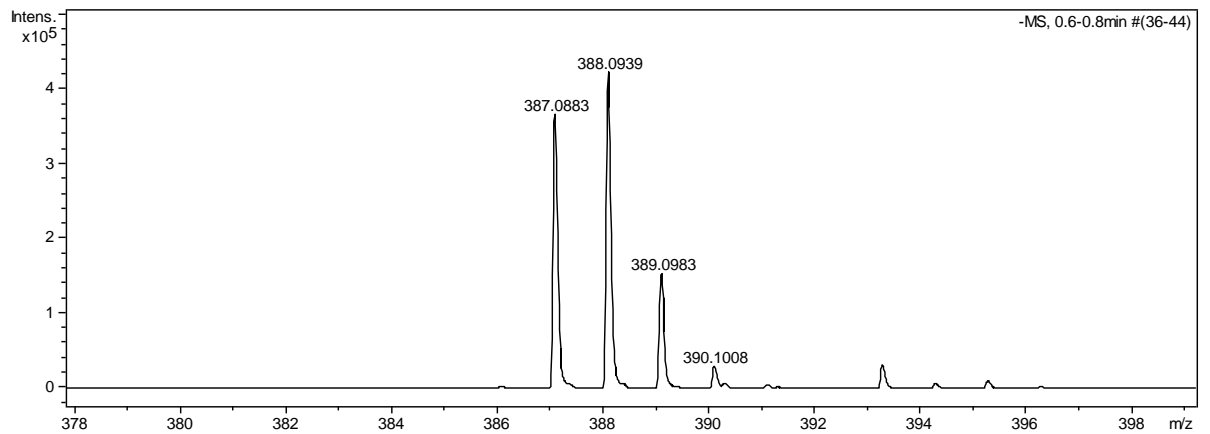


Figura 42 – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel A da unidade I da schinopsona A (**SB9**)

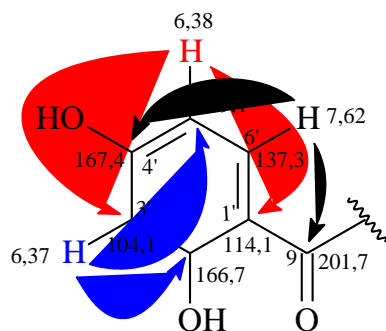


Figura 43 – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel B da unidade I do dímero e na junção das unidades da schinopsona A (**SB9**)

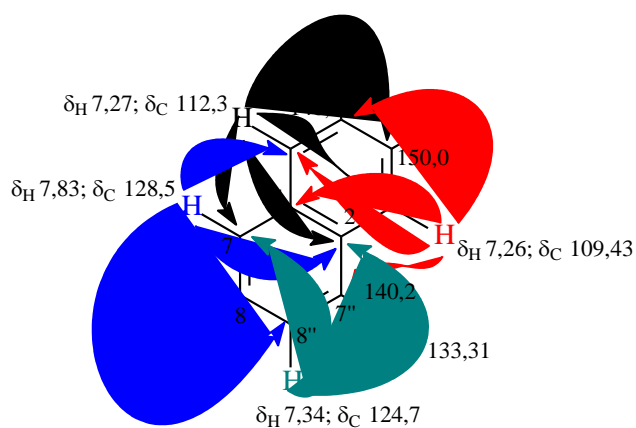


Figura 44 – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel B da unidade II do dímero e na junção com o C-7'' da schinopsona A (**SB9**)

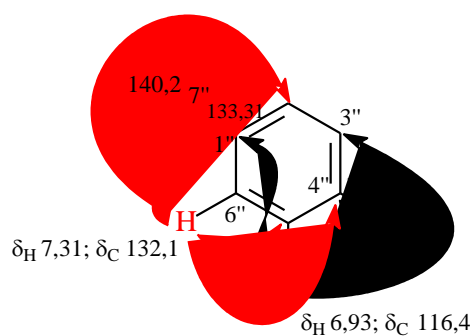


Figura 45 – Estrutura da urundeuvinina B

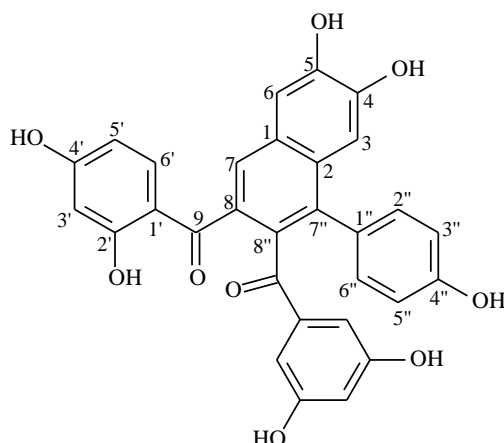


Tabela 21 – Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz), inclusive de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C $^nJ_{\text{C,H}}$ ($n=1$, HMQC; $n=2$ e 3 , HMBC) de **SB9** em CD_3OD [$(\delta$ (ppm); mult.e J (Hz) entre parênteses] e comparação com valores da literatura*.

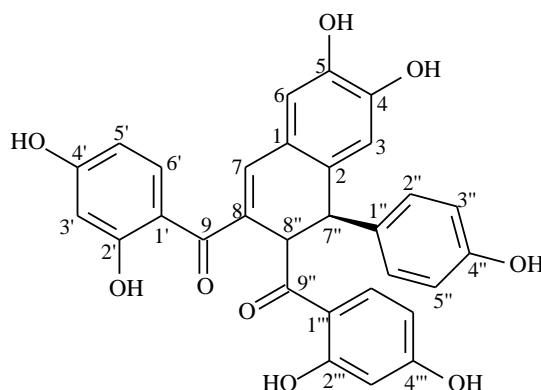
C	HMQC		HMBC	Lit.*
	δ_{C}	δ_{H}	$^{2,3}J_{\text{C,H}}$	δ_{C}
1	130,3	—	H-3	129,37
2	131,0	—	H-6, H-7, H-8''	130,17
4	150,0	—	H-6	150,01
5	148,7	—	H-3	149,3
8	128,5	—		130,31
9	201,7	—	H-6', H-7	200,67
1'	114,1	—	H-5'	114,20
2'	166,7	—	H-3'	166,70
4'	167,4	—	H-6'	167,14

Tabela 21 – Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz), inclusive de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C $^nJ_{\text{C,H}}$ ($n=1$, HMQC; $n=2$ e 3 , HMBC) de **SB9** em CD_3OD [δ (ppm); mult.e J (Hz) entre parênteses] e comparação com valores da literatura*.

	HMQC		HMBC	Lit.*
	δ_{C}	δ_{H}	$^{2,3}J_{\text{C,H}}$	δ_{C}
C				
1''	133,3	—	2H-2''e 6'', H-8''	132,41
4''	158,2	—	2H-2''e 6'', 2H-5'' e 3''	157,76
7''	140,2	—	H-3, 2H-2''e 6''	137,80
CH				
3	109,4	7,26 (s)		109,79
6	112,3	7,27 (s)	H-7	111,79
7	128,5	7,83 (s,l)	H-6, H-8''	128,66
3'	104,1	6,37 (d, 2,1)	H-5'	103,70
5'	109,1	6,38 (dd, 2,1; 9,4)	H-3'	108,89
6'	137,3	7,62 (d, 9,4)		137,38
2'',6''	132,1	7,31 (d, 8,7)	H-5'' ou H-3''	132,83
3'',5''	116,4	6,93 (d, 8,7)	H-6'' ou H-2''	115,68
8''	124,7	7,34 (d, 1,7)	H-7	133,46

* BANDEIRA et al., 2003. Dados obtidos para urundevina B utilizando CD_3OD como solvente.

5.3.7. Determinação estrutural da schinopsona B (SB10)



A substância **SB10** foi isolada da fase clorofórmica das raízes de *S. brasiliensis* (subfração CCarSB.5C-4, conforme item 4.5.6.2.1, página 80), e apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em metanol, com uma temperatura de fusão de 199,7-201,0 °C. A análise por CCDC revelada com solução de FeCl₃ indicou tratar-se de uma substância fenólica devido a coloração escura na cromatoplaça. Após análise por CLAE-DAD, observou-se a presença de um único pico no cromatograma (Figura 48), indicando que a fração era composta por uma única substância. O espectro no UV/Vis do pico (Figura 49) revelou $\lambda_{\text{máx}}$ em 232,9, 282,1 e 325,8 nm, sugerindo tratar-se de uma chalcona. A elucidação estrutural da substância foi realizada com base na análise dos espectros de RMN de ¹H, ¹³C, DEPT 135°, HMQC, HMBC, NOESY, NOEdiff, IV, do $[\alpha]_D$ e EM de alta resolução (Figuras 50 a 68, p. 132 a 137). Os dados de RMN são mostrados na Tabela 23 (p. 141).

O espectro no IV de **SB10** (Figura 50) apresentou banda larga em 3444,9 cm⁻¹, atribuída ao estiramento da ligação O-H, banda em 1627,8 cm⁻¹ típico de ν C=O de chalconas α - β insaturada, além de bandas em 1512,2, 1446,6 e 1361,7 cm⁻¹ atribuídas ao estiramento da ligação C=C e em 1238,3 devido ao ν C-CO-C.

O espectro de massas de alta resolução no modo positivo (HRESIMS) (Figura 51) da substância **SB10** mostrou o íon *pseudo* molecular em m/z 527,1333 [M+H]⁺ correspondente a fórmula molecular C₃₀H₂₂O₉ (calculado para 527,1342). A análise do espectro de RMN de ¹³C (Figuras 55 a 57) e DEPT 135° (Figura 58) confirmou a presença de 30 carbonos, sendo 15 deles de natureza metínica e 15 não hidrogenados. Além disso, a análise do espectro de RMN de ¹³C mostrou dois sinais característicos de carbonila (δ 206,2 e δ 199,9).

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 52 a 54) apresentou dois singletos referentes a hidrogênios ligados a carbonos aromáticos em δ 6,79 e δ 6,36, integrando para um hidrogênio cada, correspondentes aos hidrogênios H-3 e H-6, respectivamente, de anel aromático 1,2,4,5-tetrassubstituído, atribuído ao anel B da unidade I do dímero de chalcona. Analisando em conjunto os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 52 e 55) e as correlações observadas nos espectros de HMQC e HMBC (Figuras 59 e 60) foi possível atribuir todos os carbonos do anel B da unidade I do dímero e estabelecer algumas conectividades. O espectro de HMQC permitiu correlacionar os hidrogênios em δ 6,79 e δ 6,36 e os carbonos em δ 117,4 (C-6) e δ 116,9 (C-3), respectivamente. As correlações observadas no espectro de HMBC, melhor visualizadas na Figura 61, permitiram atribuir os outros carbonos do anel B dessa unidade e evidenciou a correlação a três ligações entre o H-6 e o carbono em δ 141,7 (C-7), bem como a correlação a três ligações entre o H-3 e o carbono em δ 49,5 (C-7"). O espectro de HMQC mostrou a conexão direta entre o carbono em δ 141,7 e o hidrogênio em δ 7,18 (H-7) e entre o carbono em δ 49,5 e o H-7" em δ 4,31.

O espectro de RMN de ^1H mostrou ainda sinais referentes a hidrogênios ligados a carbonos aromáticos em δ 6,18 (*d*, $J = 2,2$ Hz), δ 6,38 (*dd*, $J = 8,8$ e $2,2$ Hz) e δ 7,71 (*d*, $J = 8,8$ Hz), integrando para um hidrogênio cada, correspondentes as posições 3', 5' e 6', respectivamente, de um sistema de spins do tipo ABX de anel aromático 1,2,4-trissubstituído, atribuído ao anel A da unidade I do dímero de chalcona. O espectro de HMQC permitiu correlacionar os hidrogênios em δ 6,18, 6,38 e 7,71 com os carbonos em δ 103,7 (C-3'), 108,7 (C-5') e 135,7 (C-6'), respectivamente. Essa região do espectro de HMBC apresentou apenas duas correlações do H-6' (δ 7,71) com o carbono em δ 166,6 (C-4') e o carbono do grupo C=O em δ 199,9 (C-9), posicionando uma carbonila próxima ao anel A da unidade I. Os valores de deslocamento químico dos carbonos C-1' e C-2' foram atribuídos por comparação com os dados da literatura (BANDEIRA et al., 2011), após a atribuição de todos os outros carbonos. O carbono carbonílico em δ 199,9 (C-9) apresentou acoplamento heteronuclear a longa distância ($^3J_{\text{C,H}}$) com o hidrogênio em δ 7,18 (H-7) e, o C-7 (δ 141,7) mostrou um acoplamento $^3J_{\text{C,H}}$ com o hidrogênio em δ 6,79 (C-

6) (Figura 62), através dessas correlações foi possível conectar o anel A com o anel B da unidade I do dímero de chalcona.

Também foi possível observar no espectro de RMN de ^1H dois dubletos em δ 7,06 ($J = 8,7$ Hz) e δ 6,68 ($J = 8,7$ Hz), integrando para dois hidrogênios cada, correspondentes as posições 2'',6'' e 3'',5'', respectivamente, característico de anel aromático 1,4-dissubstituído, atribuído ao anel B da unidade II do dímero de chalcona. A análise do espectro de HMQC permitiu correlacionar o dubleto em δ 7,06 com os carbonos C-2'' e 6'' (δ 130,6) e o dubleto em δ 6,68 com os carbonos em δ 116,5 (C-3'',5''). As correlações observadas no espectro de HMBC, demonstradas na Figura 63, permitiram atribuir os outros carbonos do anel B dessa unidade e mostrou a correlação a três ligações entre os hidrogênios H-2'',6'' e o carbono em δ 49,5 (C-7''). Esse acoplamento heteronuclear a longa distância ($^3J_{\text{C,H}} - \text{H-2'',6''} \rightarrow \text{C-7''}$) permitiu localizar o anel B da unidade II próximo ao anel B da unidade I, uma vez que o H-3' também apresentou correlação a três ligações com C-7''. A partir dessas correlações a junção das duas unidades do dímero de chalcona foi claramente confirmada pelos acoplamentos heteronucleares a longa distância observadas no espectro de HMBC entre o dubleto referente ao H-7'' e os carbonos C-1'' (δ 134,3) e C-8'' (δ 52,2), bem como pelo acoplamento $^2J_{\text{C,H}}$ verificado entre o H-8'' e os carbonos C-7'' (δ 49,5), C-8 (δ 133,3) e C-9'' (δ 206,3; C=O). Como o H-7'' também apresentou acoplamento $^3J_{\text{C,H}}$ com o carbono carbonílico em 206,3 ppm foi possível localizar uma carbonila diretamente ligada ao C-8''. Outras correlações importantes para comprovar a junção das duas unidades da chalcona foram os acoplamentos $^3J_{\text{C,H}}$ de H-7 com C-8'' (δ 52,2) e C-2 (δ 131,9), todas essas correlações podem ser verificadas na Figura 64.

Por fim, o espectro de RMN de ^1H apresentou sinais referentes a hidrogênios ligados a carbonos aromáticos em δ 6,28 (d , $J = 2,2$ Hz), 6,30 (dd , $J = 9,0$ e 2,2 Hz) e 7,74 (d , $J = 9,0$ Hz), integrando para um hidrogênio cada, correspondentes as posições 3''', 5''' e 6''', respectivamente, de um sistema de spins do tipo ABX de anel aromático 1,2,4-trissubstituído, atribuído ao anel A da unidade II do dímero de chalcona. A atribuição da multiplicidade do duplo dubleto em δ 6,30 e do dubleto em δ 6,28 foi dificultada devido à sobreposição de sinais nessa região. No entanto, após extensa análise conjunta dos espectros de RMN de ^1H , HMQC e HMBC as

multiplicidades desses sinais foram claramente atribuídas e corroboram com os dados da literatura (BANDEIRA et al., 2011). O espectro de HMQC permitiu correlacionar os hidrogênios em δ 6,28, 6,30 e 7,74 com os carbonos em δ 104,1 (C-3'), 109,1 (C-5') e 134,7 (C-6'), respectivamente. As correlações observadas no espectro de HMBC, mostradas na Figura 65, permitiram atribuir os outros carbonos do anel A dessa unidade e evidenciou a correlação a três ligações entre o H-6''' e carbono do grupo C=O em δ 206,3 (C-9''), posicionando o anel A da unidade II na molécula.

Desta forma, a análise dos dados espectrométricos permitiu identificar a substância **SB10** como sendo 2',4,4',5-tetrahidroxichalcona-(2 \rightarrow 7'',8 \rightarrow 8'')-2''',4'',4'''-trihidroxi-7'',8''-dihidrochalcona. Entretanto, a discussão dos dados até aqui não possibilitou estabelecer a configuração relativa dos centros estereogênicos 7'' e 8''. Para determinar a configuração relativa dos carbonos C-7'' e C-8'' foi realizada comparação com os dados da literatura e, principalmente, análise dos espectros de NOESY e NOEdiff.

Na comparação dos deslocamentos químicos e das constantes de acoplamentos de **SB10** com a urundevina A (relação *cis* entre H-7'' e H-8'') e urundevina C (relação *trans* entre H-7'' e H-8'') (Figura 46) percebe-se que os valores de δ e *J* de **SB10** são compatíveis com os encontrados para urundevina C (Tabela 22). Portanto, a comparação com dados da literatura (BANDEIRA et al., 2011) indicou a relação *trans* entre os hidrogênios H-7'' e H-8''.

Figura 46 – Estruturas de urundevina A e urundevina C

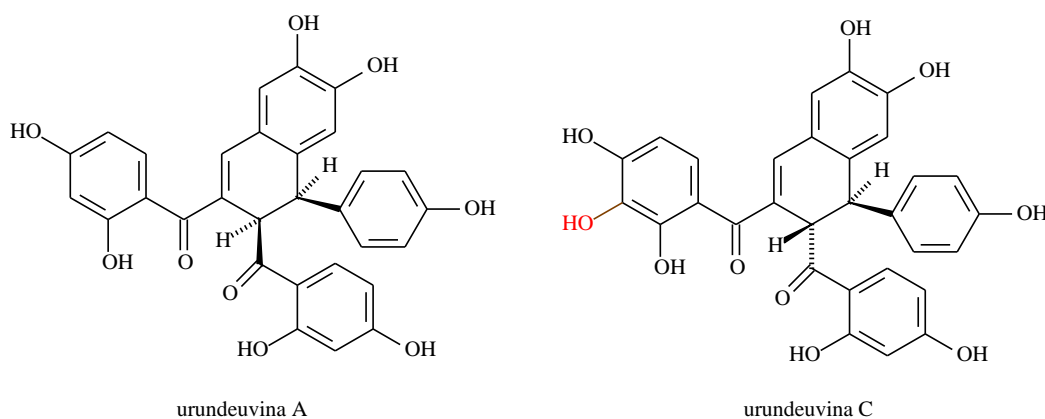


Tabela 22 – Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de **SB10** em CD_3OD [(δ (ppm); mult.e J (Hz) entre parênteses)] e comparação com valores da literatura*.

Posição	SB10		urundevina A		urundevina C	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	125,2	—	124,85	—	125,16	—
2	131,9	—	131,40	—	131,90	—
7	141,7	(s)	141,65	7,34 (s)	142,19	7,21 (s)
8	133,3	—	124,85	—	133,24	—
7''	49,5	4,31 (d, 7,7)	48,39	4,40 (d, 6,1)	49,45	4,30 (d, 7,7)
8''	52,2	4,98 (d, 7,7)	51,12	5,01 (d, 6,1)	52,14	4,98 (d, 7,7)

* BANDEIRA et al., 2003. Dados obtidos para urundevina A e C utilizando CD_3OD como solvente. Só foram mostrados os valores de δ e J fundamentais para estabelecer a estereoquímica.

Como esse é o primeiro relato do isômero com a configuração *trans*, entre os hidrogênios H-7'' e H-8'' da urundevina A, foram realizados os experimentos NOESY (Figura 66 e 67) e NOEdiff (Figura 68) para confirmação da configuração *trans* entre esses hidrogênios.

A análise do espectro NOESY corroborou com as atribuições feitas através das correlações verificadas no espectro de HMBC e, principalmente, permitiu inferir a relação *trans* entre os hidrogênios H-7'' e H-8'' visto que foi observada uma interação espacial mais intensa entre o H-2'',6'' e o H-7'' do que entre H-7'' e H-8'', como era esperado. Por outro lado, se a relação espacial entre H-7'' e H-8'' fosse *cis* seria observada uma forte interação entre esses hidrogênios, bem como uma interação fraca entre H-2'',6'' e o H-7'', o que não foi observado no espectro.

Outra informação obtida através do espectro NOESY que confirmou a relação *trans* entre os hidrogênios H-7'' e H-8'' foi o fato da interação espacial entre H-2'',6'' e H-7'' e entre H-2'',6'' e H-8'' apresentarem a mesma intensidade. Uma vez que, se

a relação espacial entre H-7'' e H-8'' fosse *cis* esperava-se observar uma forte interação entre esses hidrogênios e que não houvesse interação entre H-2'',6'' e H-8''. Portanto, a análise do espectro de NOESY também comprova a relação *trans* entre os hidrogênios H-7'' e H-8''.

Para não deixar dúvidas sobre a configuração relativa dos carbonos C-7'' e C-8'' de **SB10** foi realizado o experimento de NOEdiff (Figura 68). Nesse tipo de experimento o espectro apresenta apenas os sinais dos hidrogênios próximos aos núcleos irradiados, devido ao aumento do sinal em consequência da transferência de polarização entre eles (esse efeito é conhecido como “Efeito Nuclear Overhauser”, NOE). A ausência de sinal significa que o núcleo daquela frequência não está próximo ao núcleo irradiado ou, dependendo do caso, com configuração relativa que não permite aproximação espacial entre os núcleos e, portanto, não ocorre transferência de polarização entre eles. Desta forma, ao irradiar o H-8'' (δ 4,98) (Figura 68) ocorreu um aumento da intensidade do sinal referente ao H-6''' (δ 7,74) muito superior à intensificação do sinal referente ao H-7'' (δ 4,31), devido a maior proximidade espacial entre o H-8'' e o H-6''' quando comparada a proximidade entre o H-8'' e o H-7'', comprovando a relação *trans* entre os hidrogênios H-7'' e H-8''. Contudo, se a relação entre esses hidrogênios fosse *cis* seria observada, ao irradiar o H-8'' (δ 4,98), uma maior intensificação do sinal em δ 4,31 (H-7'') em relação ao sinal em 7,74 (H-6'''), pois o H-7'' estaria espacialmente mais próximo de H-8''. Além disso, quando foi irradiado o H-7'' (δ 4,31) (Figura 68) ocorreu um aumento da intensidade do sinal referente ao H-2'',6'' (δ 7,06) muito superior à intensificação do sinal referente ao H-8'' (δ 4,98), devido ao H-7'' está espacialmente mais próximo do H-2'',6'' quando comparado ao H-8'', confirmando a relação *trans* entre os hidrogênios da posição H-7'' e H-8''.

Desta forma, a análise dos dados espectrométricos permitiu identificar de forma inequívoca a substância **SB10** como sendo (7''*R, 8''*S) 2',4,4',5-tetrahidroxichalcona-(2 \rightarrow 7'',8 \rightarrow 8'')-2''',4''',4''''-trihidroxí-7'',8''-dihidrochalcona, um dímero de chalcona, isômero da urundeuvina A, inédito na literatura que será conhecida como schinopsona B. Essa substância apresentou $[\alpha]_D^{20} = -52$ (c 0,028; MeOH). Na Tabela 23 são mostrados os dados de RMN da schinopsona B e

realizada uma comparação com os valores de deslocamento químico de RMN de ^{13}C apresentados pela substância urundevina A e C (BANDEIRA et al., 2011).

Os dímeros de chalcona formados pela junção de duas duplas ligações, das posições α e β de duas unidades chalconoidícas, produzindo um novo anel de seis carbonos são pouco comuns e só foram isolados nas famílias Anacardiaceae e Leguminosae. Da casca da raiz de *S. brasiliensis* foram isoladas a schinopsona A e B e da casca do caule de *Myracrodruon urundeuva* foram isoladas urundevina A, B, C e matosina (BANDEIRA, MATOS & BRAZ-FILHO, 1994) e das raízes de *Glycyrrhiza uralensis* (Leguminosae) foi isolada a licobichalcona (BAI et al., 2003).

Segundo Bai (2003) a rota biossintética para formação da licobichalcona é baseada no acoplamento de radicais dos monômeros constituintes do dímero com subsequentes rearranjos promovendo a formação do anel adicional de seis membros.

Desta forma, como os dois monômeros precursores da schinopsona A e B vêm de uma rota biossintética bem conhecida (condensação do tio-éster *p*-cumaroil-CoA com três unidades de malonil-CoA numa reação catalisada pela enzima chalcona sintase), a junção das duas unidades monoméricas buteina e isoliquiritigenina formando os dímeros schinopsona A e B, com um novo anel de seis membros, deve ocorrer via acoplamento de radicais como mostrado na Figura 47.

Figura 47 – Proposta de rota biossintética para formação de schinopsona A e B

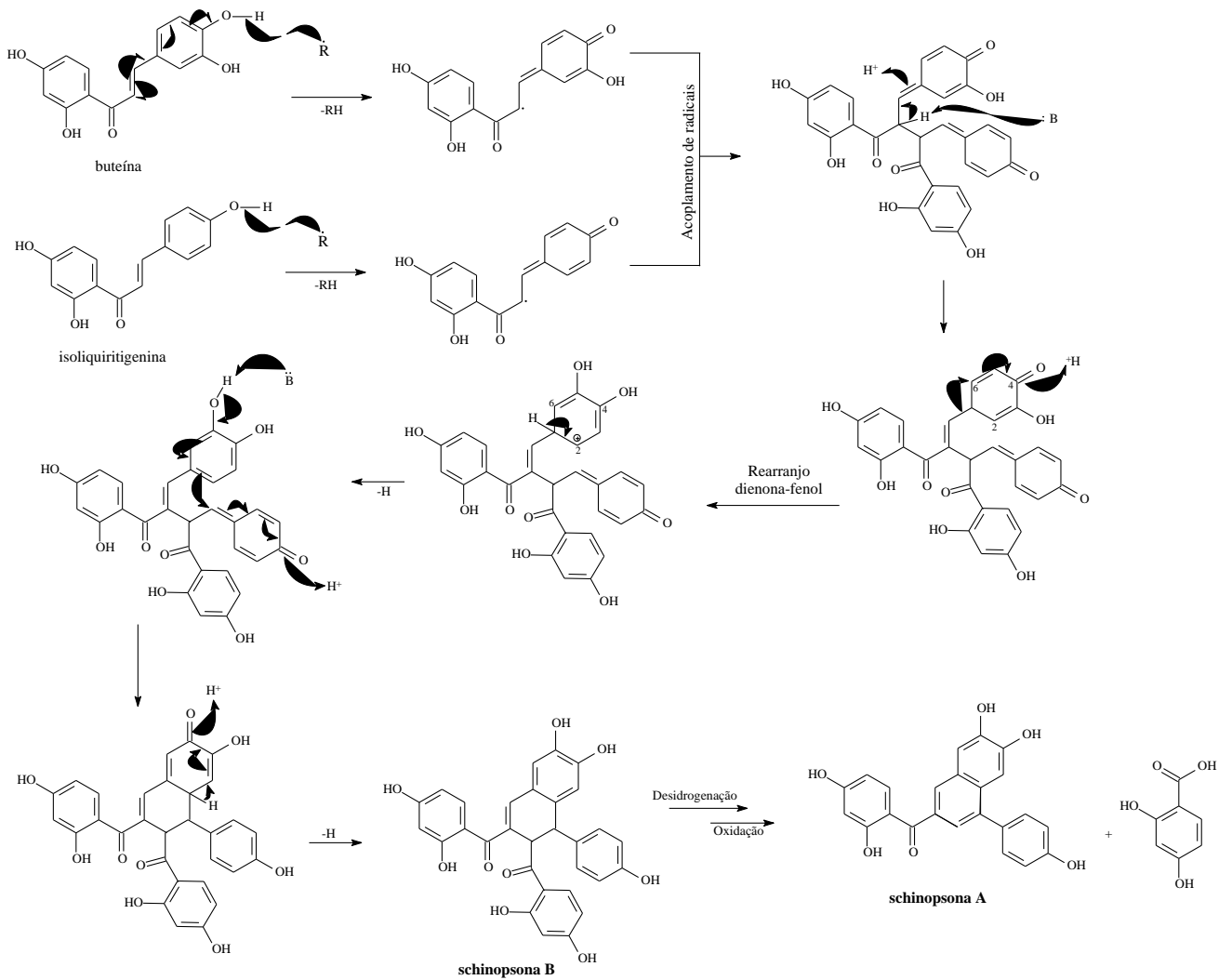
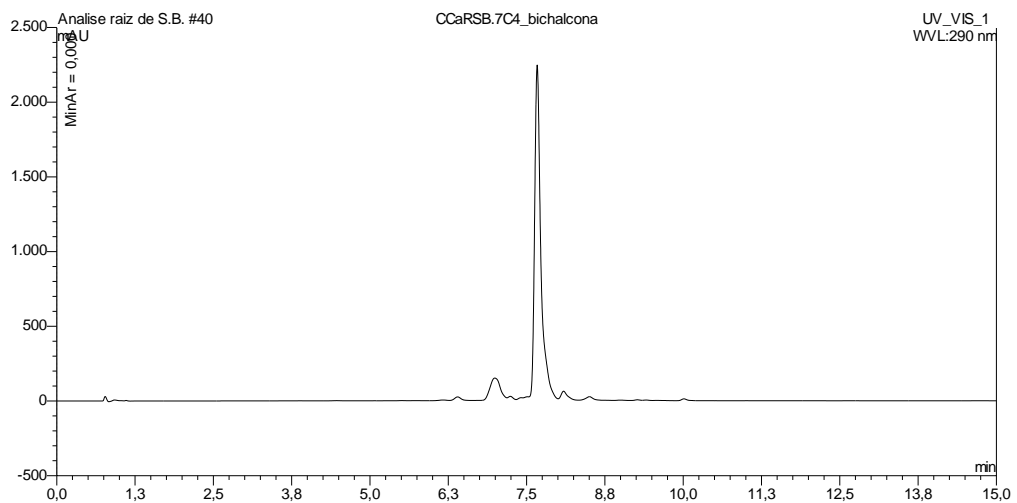


Figura 48 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 290$ nm da substância **SB10***



* Condições cromatográficas ver item 4.1 (p. 62), t_R **SB10** = 7,67 min.

Figura 49 – Espectro no UV, obtido pelo detector DAD, da substância SB10

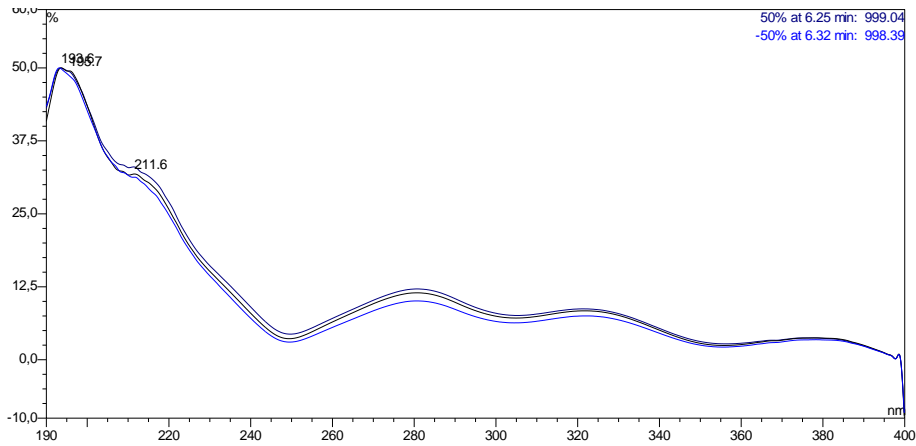


Figura 50 – Espectro no IV da substância SB10

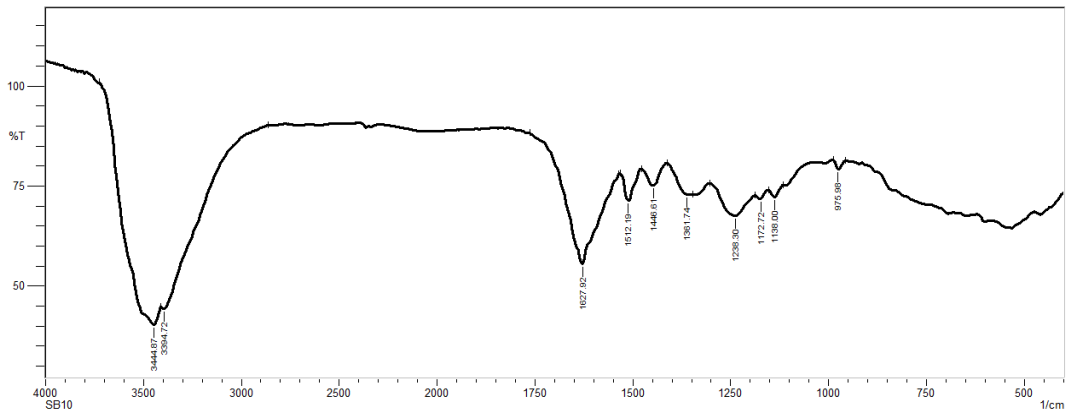


Figura 51 – Espectro de massas da substância SB10

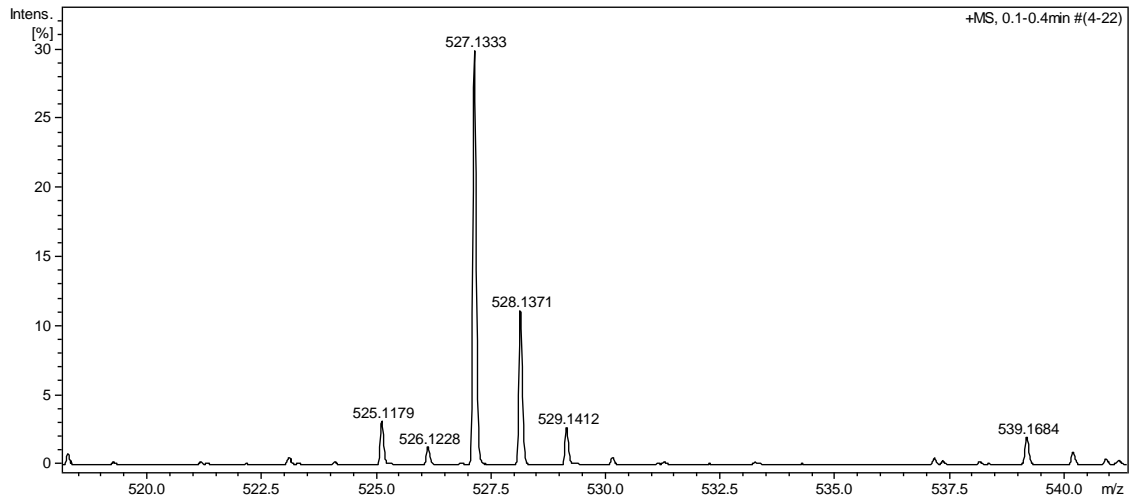


Figura 52 – Espectro de RMN de ^1H de **SB10** [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

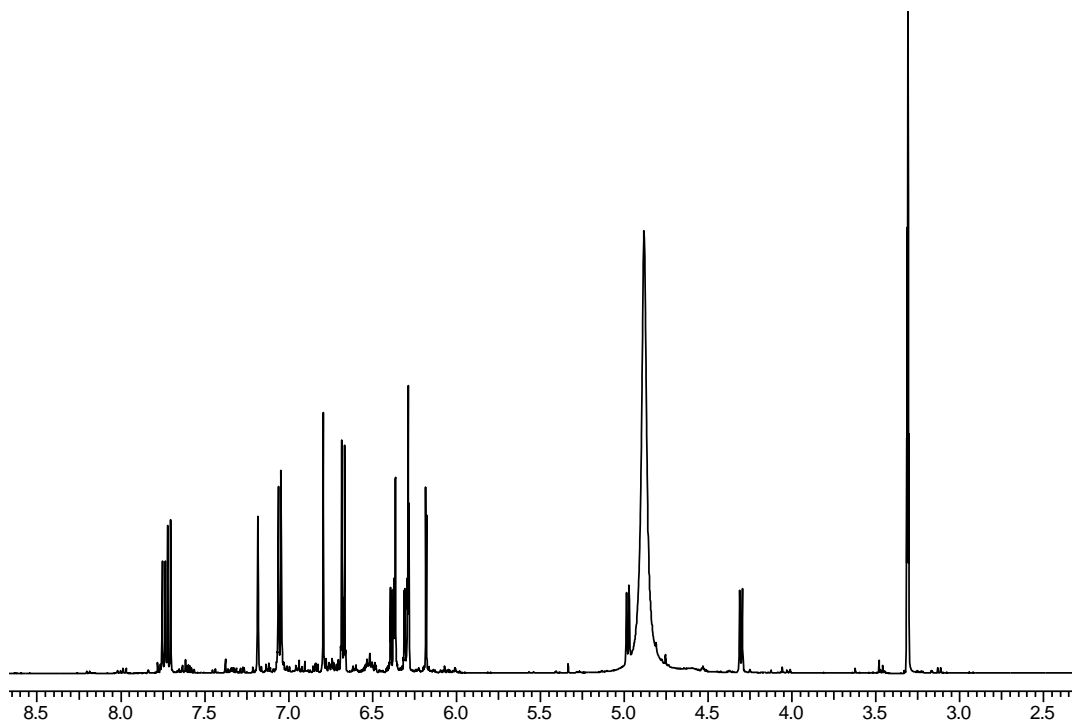


Figura 53 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **SB10** [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

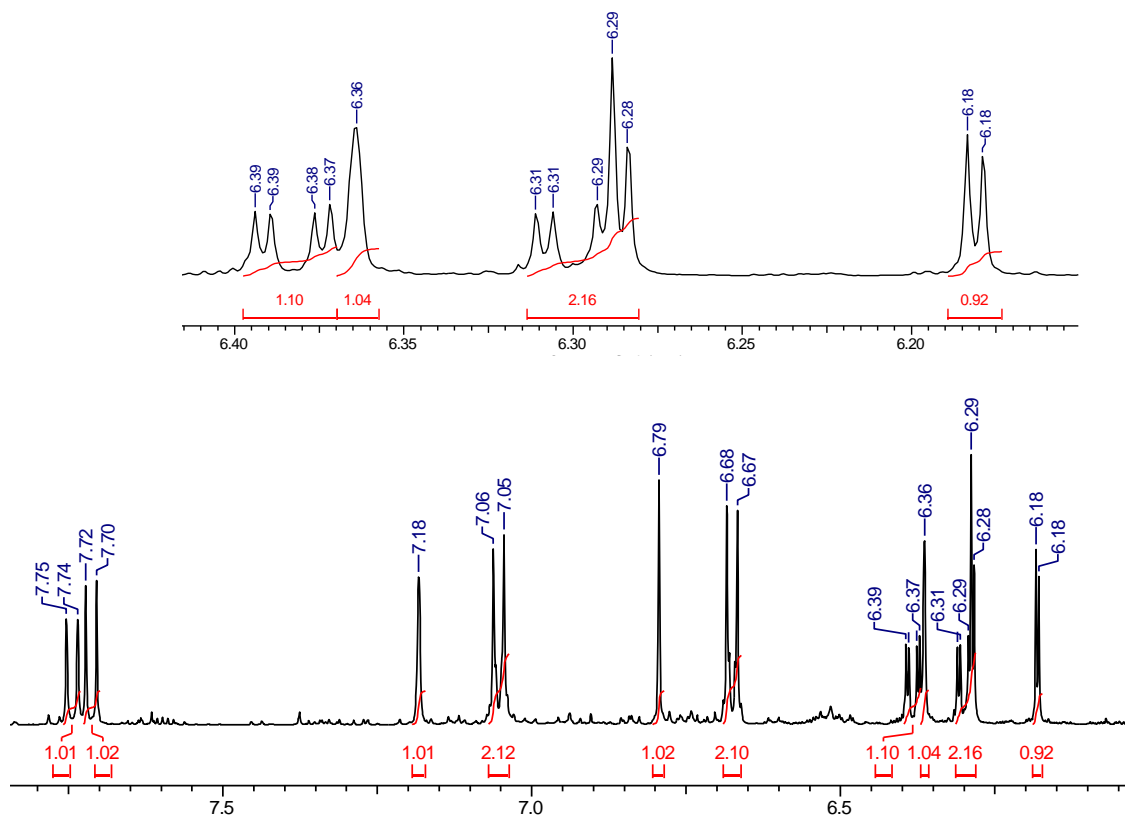


Figura 54 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **SB10** [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

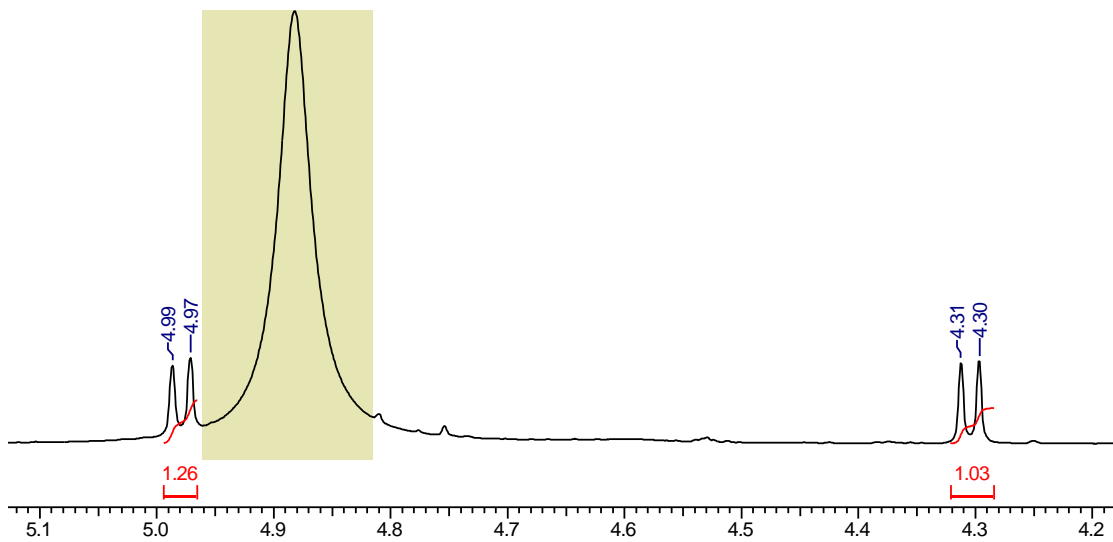


Figura 55 – Espectro de RMN de ^{13}C de **SB10** [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

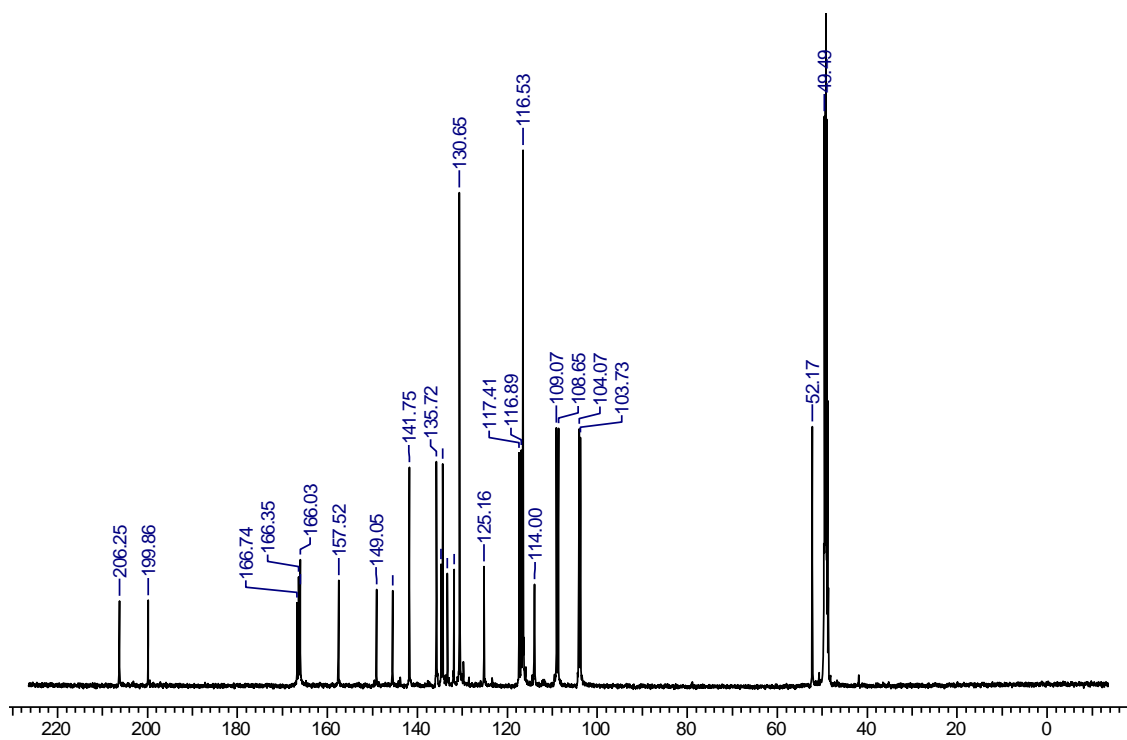


Figura 56 – Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C de **SB10** [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

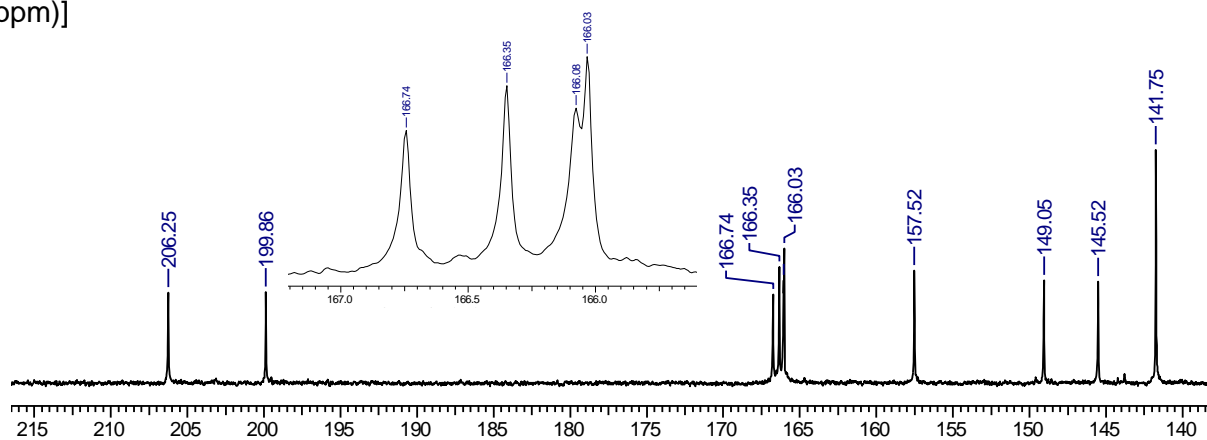


Figura 57 – Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C de **SB10** [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

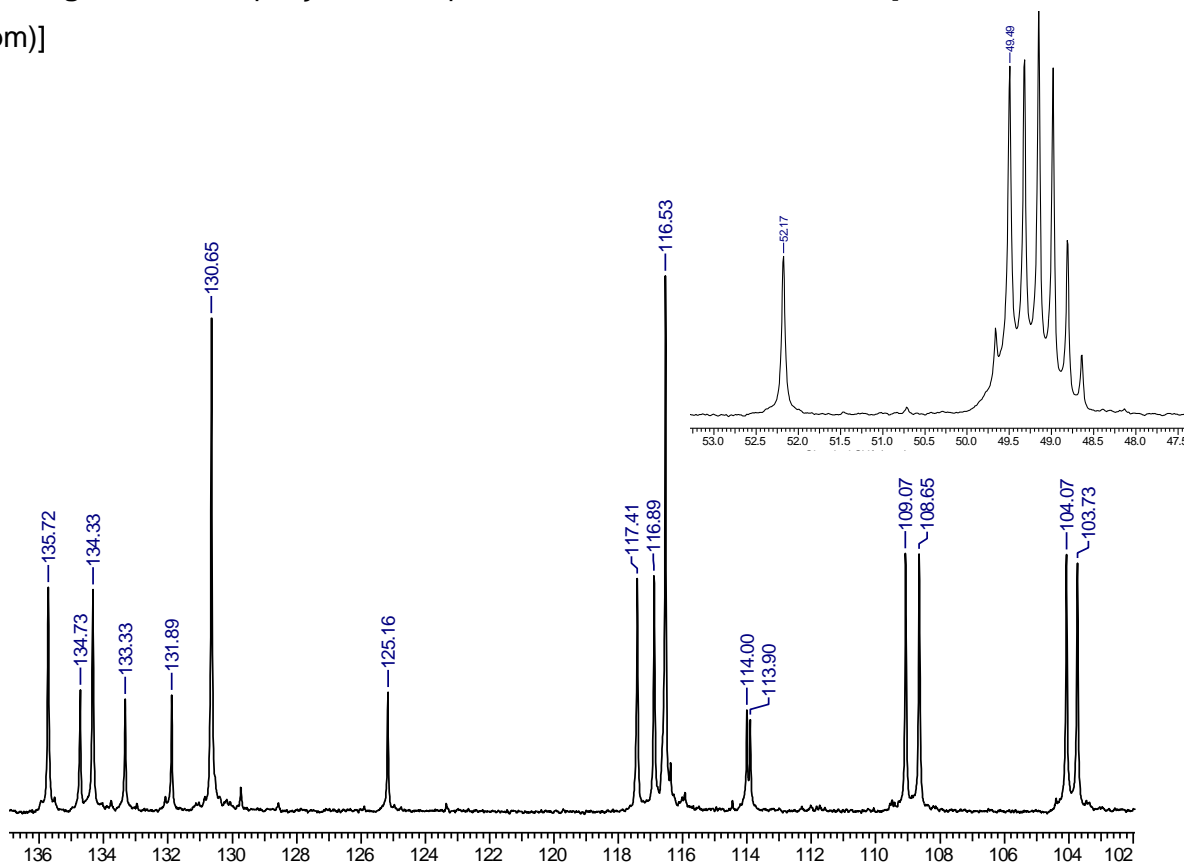


Figura 58 – DEPT 135° de **SB10** [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

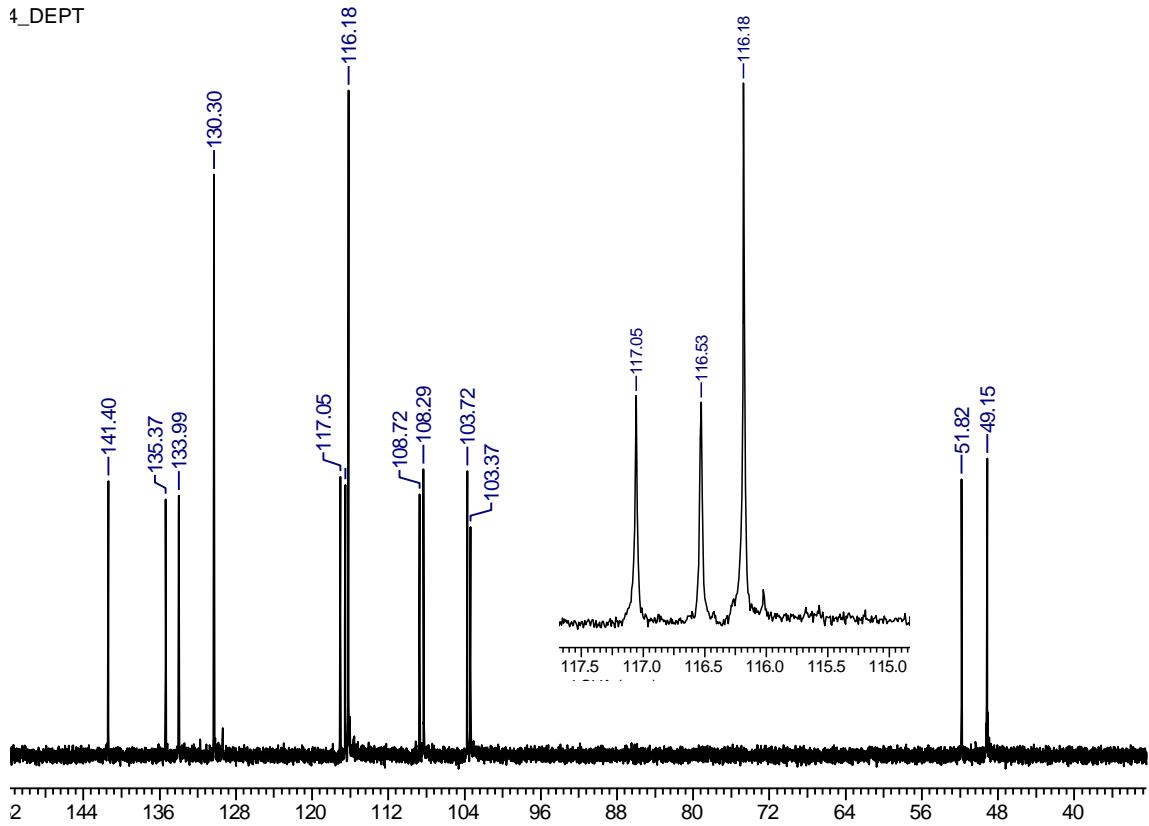


Figura 59 – Espectro de HMQC da substância **SB10** [500 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

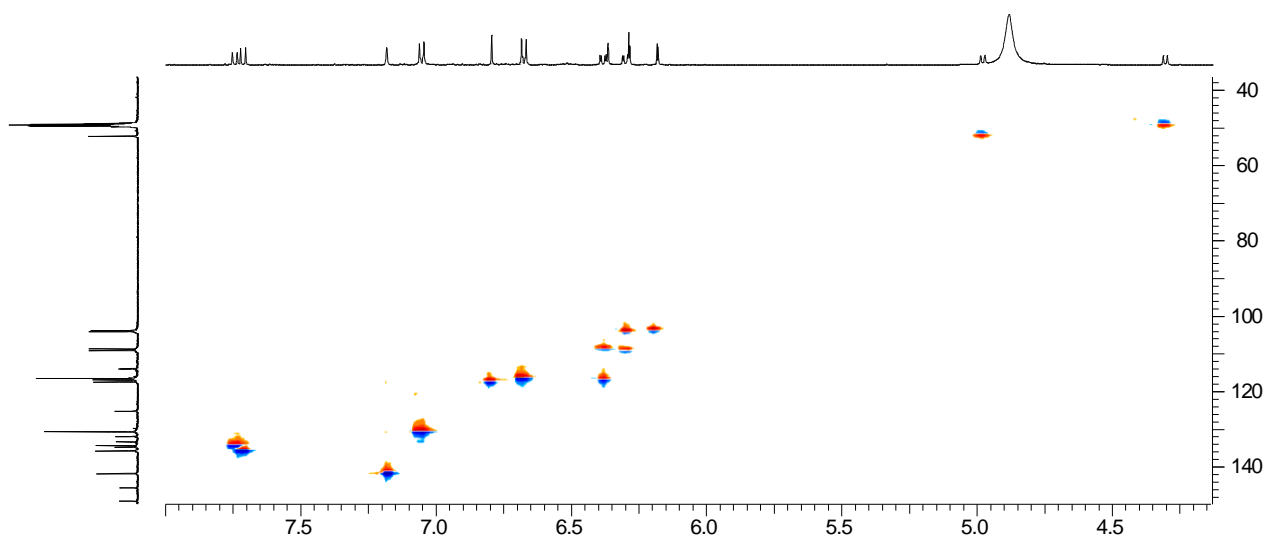


Figura 60 – Espectro de HMBC da substância **SB10** [500 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

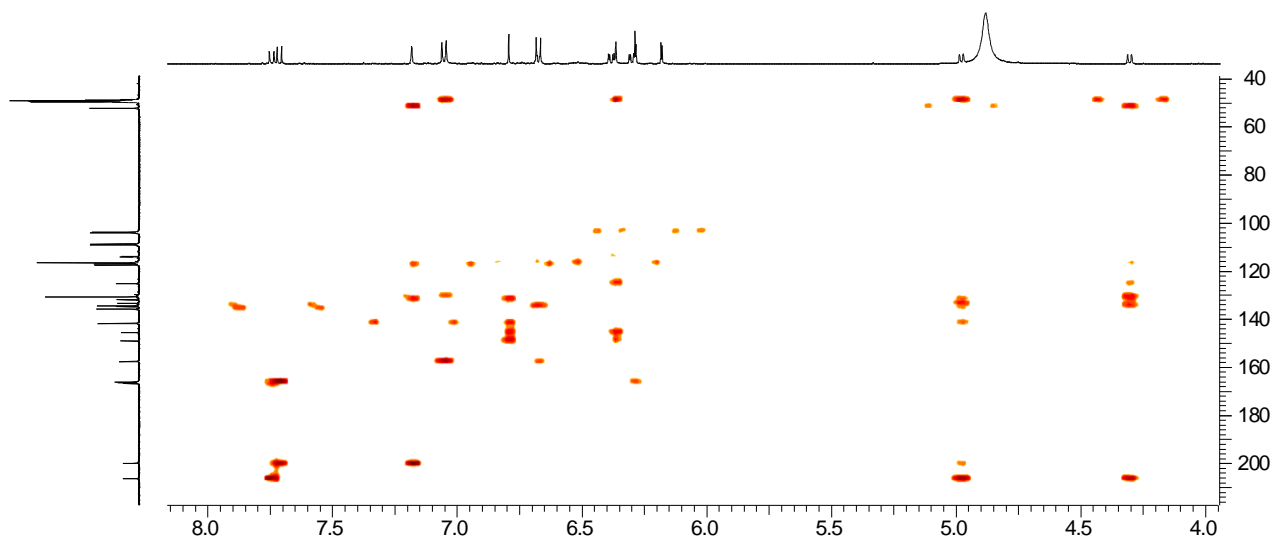


Figura 61 – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel B da unidade I da schinopsona B (**SB10**)

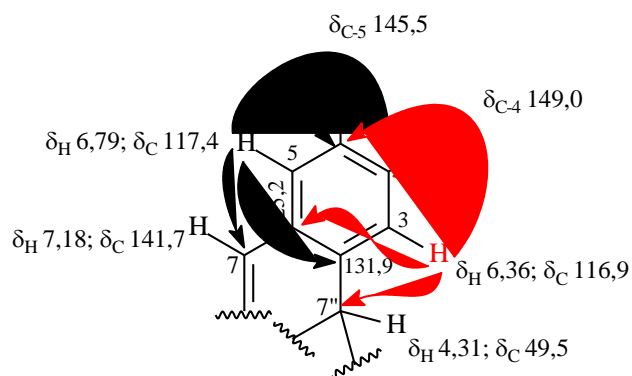


Figura 62 – Principais correlações observadas no espectro de HMBC que permitiram conectar o anel A ao anel B da unidade I da schinopsona B (**SB10**)

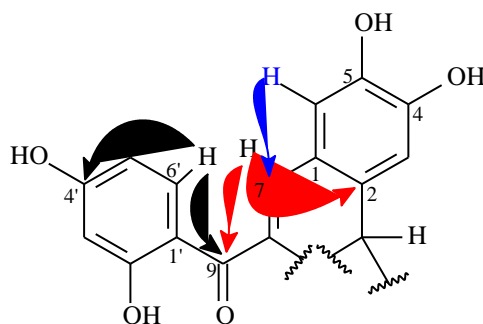


Figura 63 – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel B da unidade II da schinopsona B (**SB10**)

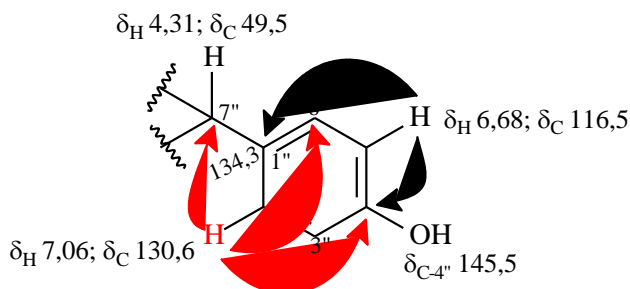


Figura 64 – Correlações observadas no espectro de HMBC que possibilitaram a confirmação das posições de junção das duas unidades da schinopsona B (**SB10**)

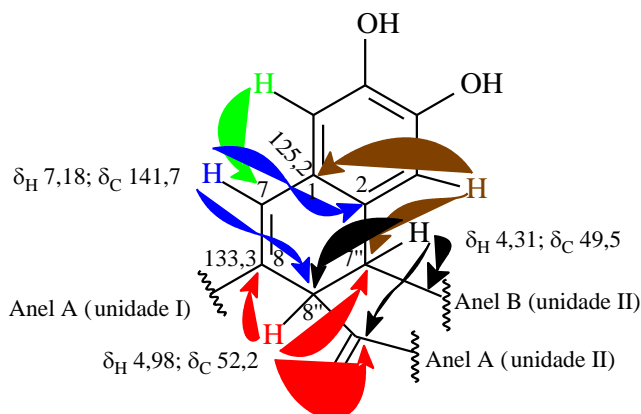


Figura 65 – Correlações observadas no espectro de HMBC na região do anel A da unidade II da schinopsona B (**SB10**)

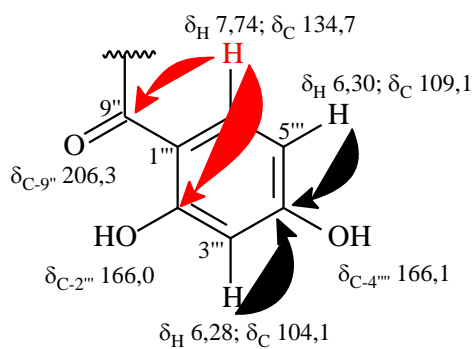


Figura 66 – Ampliação do espectro NOESY da schinopsona B (**SB10**) na região de 4,0 a 8,4 ppm [500 MHz, CD₃OD]

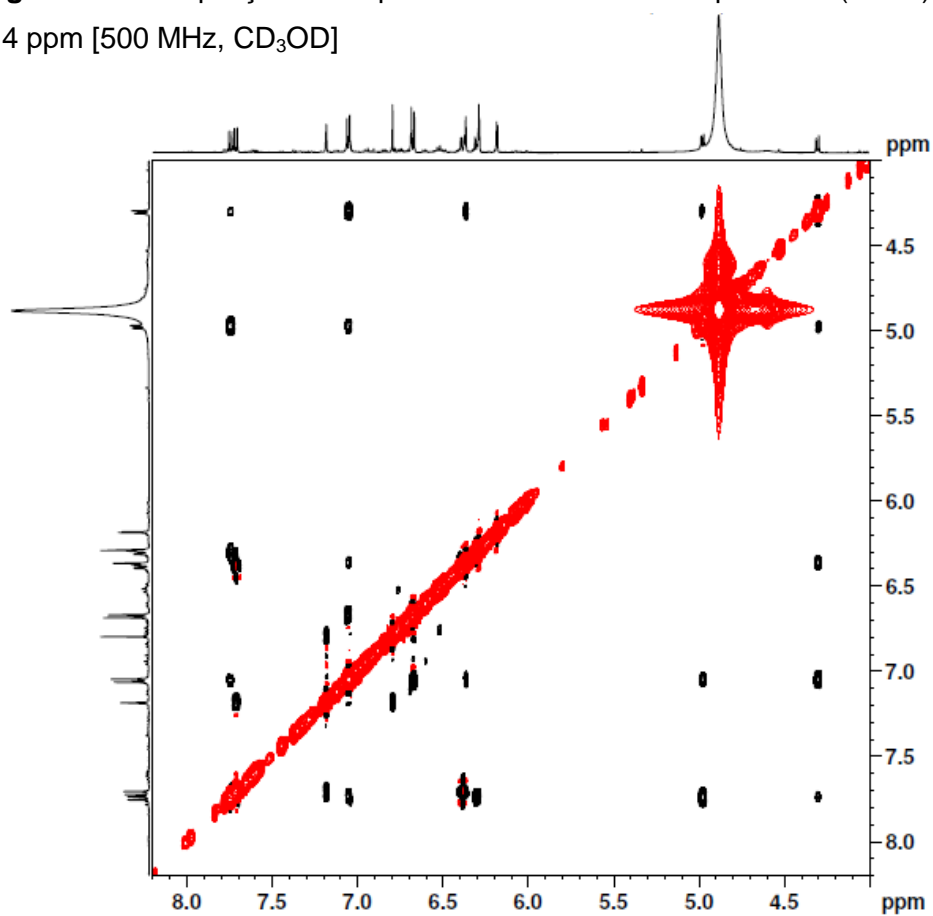


Figura 67 – Ampliação do espectro NOESY da schinopsona B (**SB10**) na região de 6,3 a 7,9 ppm [500 MHz, CD₃OD]

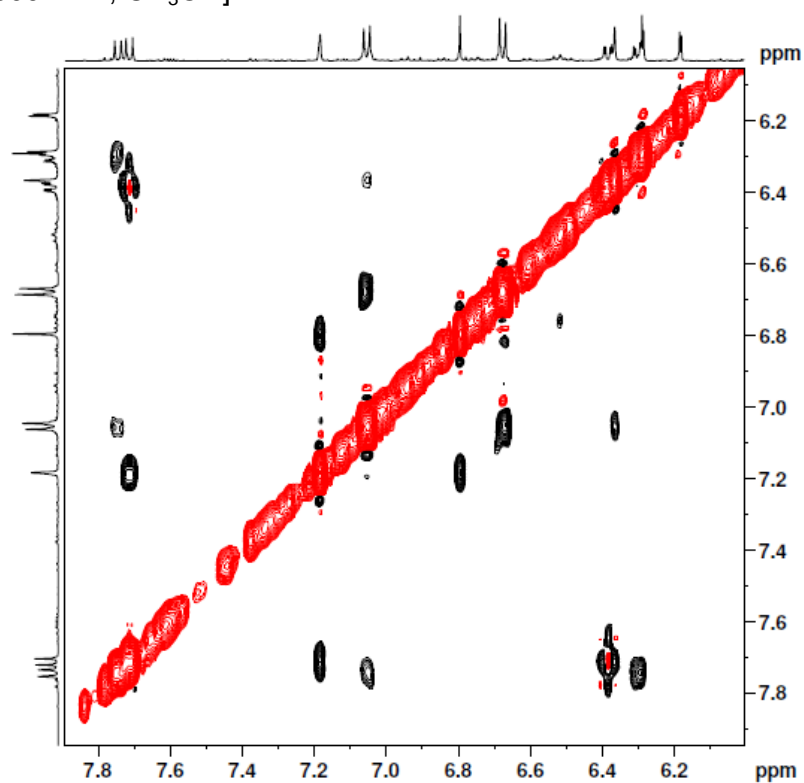


Figura 68 – Espectro de NOEdiff da schinopsona B (**SB10**), para irradiação em 4,98 e 4,31 ppm [500 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

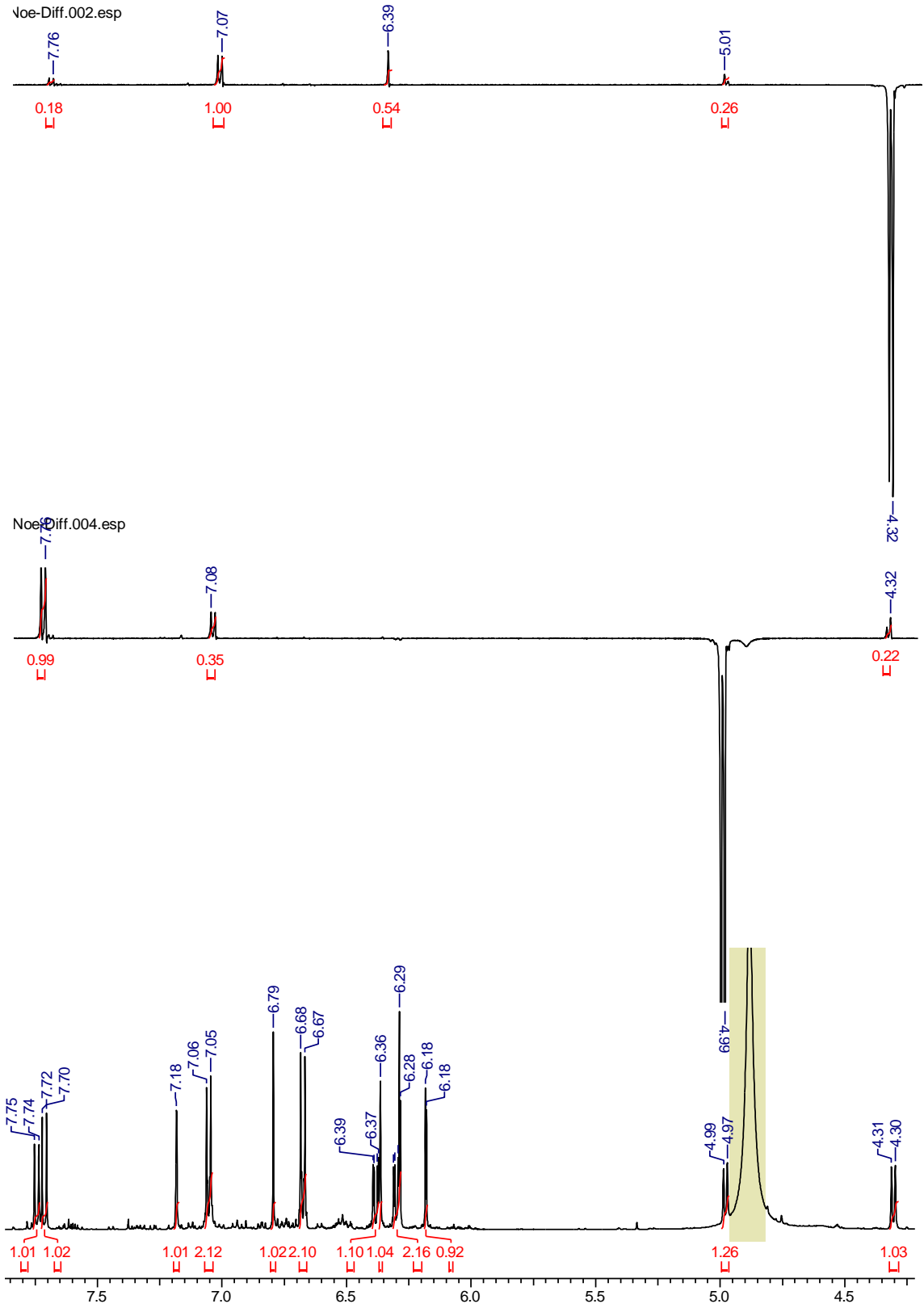


Tabela 23 – Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz), inclusive de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C $^nJ_{\text{C,H}}$ ($n=1$, HMQC; $n=2$ e 3 , HMBC) de **SB10** em CD_3OD [δ (ppm); mult.e J (Hz) entre parênteses] e comparação com valores da literatura*.

	schinopsona B			urundeuvína	
	HMQC		HMBC	A ¹	C ²
	δ_{C}	δ_{H}	$^{2,3}J_{\text{C,H}}$	δ_{C}	δ_{C}
C					
1	125,2	—	H-3	124,85	125,17
2	131,9	—	H-7, H-6	131,40	131,90
4	149,0	—	H-3, H-6	148,71	149,08
5	145,5	—	H-3, H-6	145,22	145,51
8	133,3	—	H-8''	124,85	133,24
9	199,9	—	H-7, H-6'	199,22	200,3
1'	114,0	—		113,39	114,48
2'	166,3	—		165,85	152,80
4'	166,7	—	H-6'	166,97	153,19
1''	134,3	—	H-7''	134,66	134,75
4''	157,5	—	2H-2'', 6'', 2H-5'', 3''	157,30	157,50
9''	206,3	—	H-7'', H-8'', H-6'''	204,75	206,19
1'''	113,9	—		113,06	113,85
2'''	166,0	—	H-6'''	165,70	166,34
4'''	166,1	—	H-3''', H-5'''	166,40	166,74
CH					
3	116,9	6,36 (s)		116,85	116,88
6	117,4	6,79 (s)		117,31	117,45
7	141,75	7,18 (s)	H-6	141,65	142,19
3'	103,7	6,18 (d, 2,2)		103,91	133,99

Tabela 23 – Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz), inclusive de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C $^nJ_{\text{C,H}}$ ($n=1$, HMQC; $n=2$ e 3 , HMBC) de **SB10** em CD_3OD [δ (ppm); mult.e J (Hz) entre parênteses] e comparação com valores da literatura*.

	schinopsona B			urundeuquina	
	HMQC		HMBC	A ¹	C ²
	δ_{C}	δ_{H}	$^{2,3}J_{\text{C,H}}$	δ_{C}	δ_{C}
CH					
5'	108,6	6,38 (<i>dd</i> , 2,2; 8,8)		108,57	108,14
6'	135,7	7,71 (<i>d</i> , 8,8)		135,66	125,67
2'',6''	130,6	7,06 (<i>d</i> , 8,7)	H-7'	130,17	130,61
3'',5''	116,5	6,68 (<i>d</i> , 8,7)	2H-2'', 6''	116,30	116,53
7''	49,5	4,31 (<i>d</i> , 7,7)	H-3, 2H-2'', 6'', H-8''	48,39	49,45
8''	52,2	4,98 (<i>d</i> , 7,7)	H-7, H-7''	51,12	52,14
3'''	104,1	6,28 (<i>d</i> , 2,2)		103,80	103,73
5'''	109,1	6,30 (<i>dd</i> , 2,2; 9,0)		108,96	109,07
6'''	134,7	7,74 (<i>d</i> , 9,0)		133,99	134,32

* BANDEIRA et al., 2003. ¹ urundeuquina A. ² urundeuquina C. Dados obtidos utilizando CD_3OD como solvente.

5.4. Testes de atividades biológicas

5.4.1. Avaliação da Atividade Antioxidante

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante (AA) *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, estes testes têm se tornado ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos, auxiliando na escolha de espécies vegetais para estudos químicos e farmacológicos (ALVES et al., 2010). Dentre as metodologias mais comuns para se determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido, reprodutível e sensível destacam-se as que envolvem um radical cromóforo, simulando as espécies reativas de oxigênio, sendo o radical livre DPPH um dos mais utilizados.

A atividade de sequestro de radicais livres DPPH foi realizada inicialmente usando as fases orgânicas e padrões nas concentrações variando de 50 a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, outros testes foram realizados, quando necessários, a fim de avaliar o intervalo de concentração adequado para cada fase ou padrão atingir o valor de EC_{50} . Nesse estudo foram utilizados como controle, os antioxidantes naturais ácido gálico e quercetina, bem como os antioxidantes sintéticos BHT, BHA e Trolox.

A Tabela 24 apresenta os valores de CE_{50} da atividade antioxidante das fases e do padrão obtidos pelo método do sequestro de radicais livres (DPPH) e a Figura 69 faz uma comparação entre os valores de CE_{50} encontrados. Segundo Melo e colaboradores (2010) a atividade antioxidante pelo método do DPPH pode ser classificada como: boa se a CE_{50} da fase for até três vezes a CE_{50} do padrão ($\text{CE}_{50} < 79,32 \mu\text{g mL}^{-1}$), média se o valor da CE_{50} encontrada for entre 3 a 7 vezes maior que a CE_{50} do padrão ($79,32 < \text{CE}_{50} < 185,08 \mu\text{g mL}^{-1}$) e baixa se a CE_{50} da fase for 7 vezes maior que a CE_{50} do padrão ($\text{CE}_{50} > 185,08 \mu\text{g mL}^{-1}$). Seguindo esse critério e considerando a quercetina como substância de referência, as fases AGSB, ACeRSB, ACaRSB, BCaRSB, DGSB e BCeRSB apresentaram uma boa AA, as fases CCeRSB, CCaRSB e HGSB apresentaram média AA. As fases HCeRSB e HCaRSB não apresentaram AA.

Ao realizar as análises estatísticas aplicando-se ANOVA seguida do teste *post hoc* de Bonferroni, aos resultados de AA, expressos como CE₅₀, das fases da raiz e dos galhos de *S. brasiliensis* verificou-se que a AA das fases AGSB, ACeRSB e ACaRSB não apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Também, não foi verificada diferenças estatisticamente significativas, ao nível de confiança avaliado, entre a AA das fases BCeRSB e DGSB e do padrão Trolox, bem como para AA da fase BCaRSB e do padrão BHA.

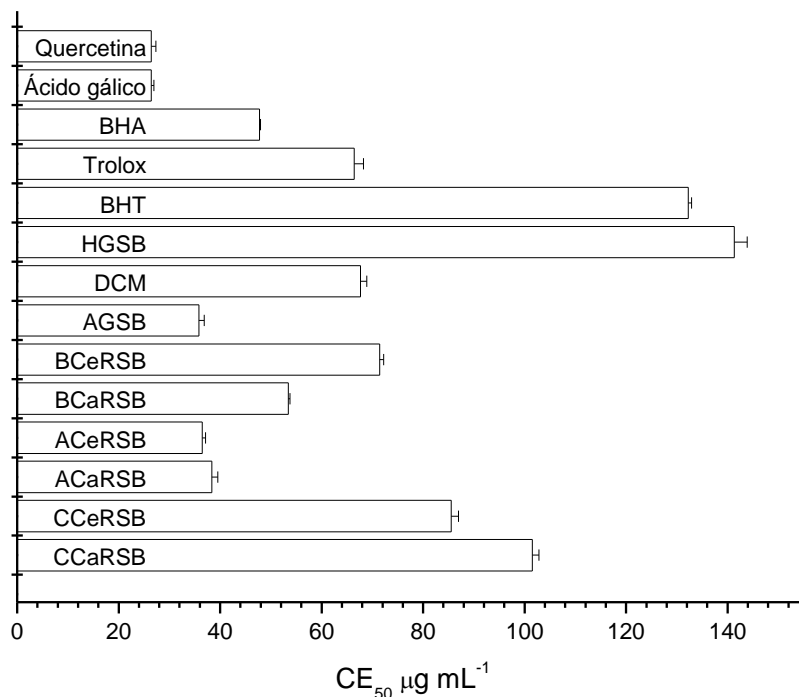
A boa atividade antioxidante apresentada pelas fases AGSB e DGSB pode ser devido à elevada quantidade de galato de metila e ácido gálico presentes nessas fases.

Tabela 24 – Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH) das fases orgânicas dos galhos e raiz de de *S. brasiliensis* e padrões.

Fase	CE ₅₀ (µg/mL) ± DP*	Fase/padrão	CE ₅₀ (µg/mL) ± DP*
HCaRSB	> 1000 ^l	HGSB	141,32 ± 2,56 ⁱ
HCeRSB	> 1000 ^m	DGSB	67,65 ± 1,28 ^{cf}
CCaRSB	101,53 ± 1,27 ^g	AGSB	35,85 ± 1,02 ^{ae}
CCeRSB	85,54 ± 1,43 ^H	Ácido gálico	26,45 ± 0,50 ^b
ACaRSB	38,37 ± 1,20 ^a	Quercetina	26,44 ± 0,88 ^b
ACeRSB	36,49 ± 0,62 ^{ae}	BHT	132,25 ± 0,66 ^j
BCaRSB	53,46 ± 0,33 ^d	BHA	47,75 ± 0,20 ^d
BCeRSB	71,43 ± 0,79 ^c	Trolox	66,45 ± 1,81 ^{cf}

* Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=3). Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significativa comparando os valores do padrão e fases, $p < 0,05$ (análise de variância de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni).

Figura 69 – Comparação dos resultados da AA pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH) das fases orgânicas dos galhos e raiz de *S. brasiliensis* e dos padrões*



* Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=3).

Também foi avaliada a capacidade antioxidante das fases orgânicas pelo sistema β -caroteno/ácido linolênico.

Esse método avalia a capacidade do extrato ou substância pura proteger um substrato lipídico da oxidação, enquanto que o método de sequestro do radical livre DPPH baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Optar por diferentes testes para a avaliação da atividade antioxidante é importante para a obtenção de resposta mais precisa sobre a interação das substâncias presentes na amostra com os diferentes radicais gerados durante o processo de oxidação (ROBARDS et al., 1999). Se compostos polares forem testados apenas pelo método do β -caroteno pode-se correr o risco de minimizar a atividade antioxidante desses compostos. Dessa forma, é necessário o uso de outros métodos, como o do DPPH que independe da polaridade do substrato (CARPES et al., 2008).

As fases e os padrões foram avaliados inicialmente nas concentrações variando de 50 a 250 μ g/mL. No entanto, outros testes foram realizados, quando necessários, a fim de averiguar o intervalo de concentração adequado para cada

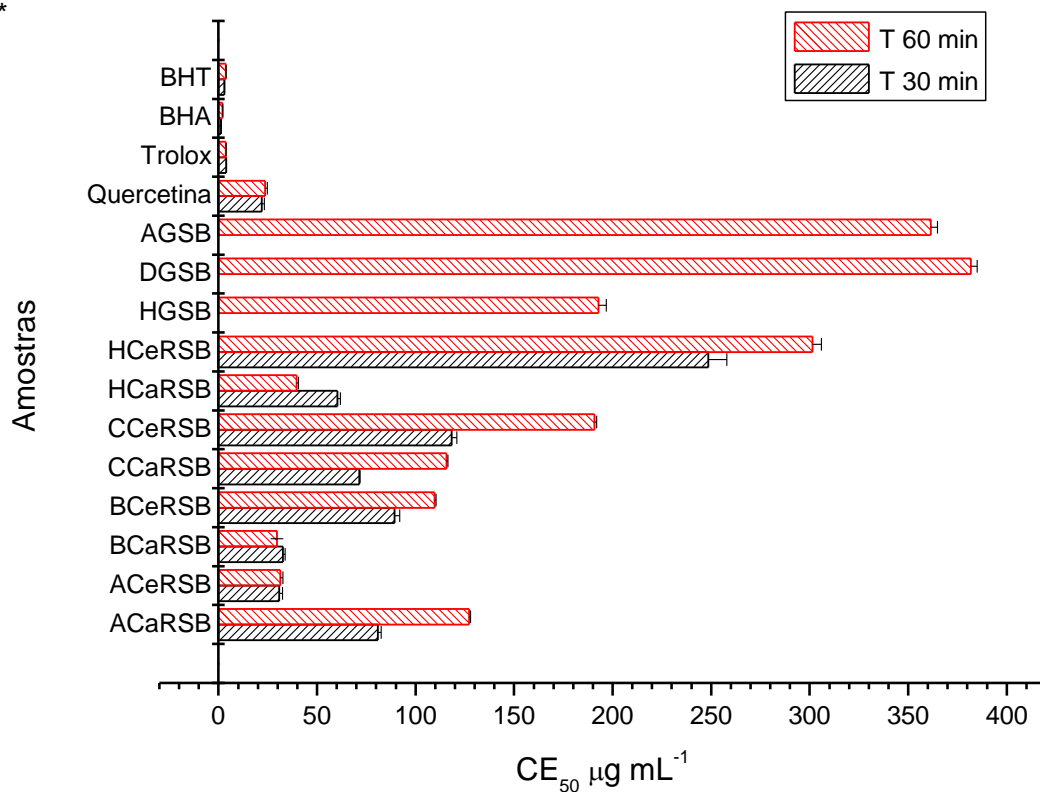
fase ou padrões atingir o valor de CE_{50} . Nesse estudo foram utilizados como controle os antioxidantes sintéticos BHT, BHA, Trolox e quercetina. Os resultados obtidos em 30 e 60 minutos de experimento podem ser observados na Tabela 25. A Figura 70 faz uma comparação entre os valores de CE_{50} encontrados.

Tabela 25 – Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linolênico das fases orgânicas dos galhos e raiz de *S. brasiliensis* e padrões.

Material	30 min	60 min
	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP*	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP*
HCaRSB	60,27 \pm 1,66 ^f	39,64 \pm 0,87 ^c
HCeRSB	248,50 \pm 9,54 ⁱ	301,51 \pm 4,53 ^j
CCaRSB	71,38 \pm 0,46 ^{bf}	115,74 \pm 0,65 ^{de}
CCeRSB	118,29 \pm 2,67 ^{de}	190,81 \pm 1,08 ^h
ACaRSB	80,92 \pm 1,67 ^b	127,16 \pm 0,75 ^e
ACeRSB	30,85 \pm 1,65 ^c	31,42 \pm 1,18 ^c
BCaRSB	32,60 \pm 1,15 ^c	29,65 \pm 0,10 ^c
BCeRSB	89,41 \pm 2,48 ^b	109,72 \pm 0,61 ^e
HGSB	—	192,78 \pm 4,03 ^h
DGSB	—	381,79 \pm 3,14 ^l
AGSB	—	361,40 \pm 3,52 ^m
Quercetina	21,93 \pm 1,27 ^{cg}	23,59 \pm 1,20 ^{cg}
Trolox	3,86 \pm 0,17 ^a	3,76 \pm 0,15 ^a
BHT	1,32 \pm 0,11 ^a	1,99 \pm 0,20 ^a
BHA	2,88 \pm 0,24 ^a	3,75 \pm 0,15 ^a

* Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=3). Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significativa comparando os valores do padrão e fases, $p < 0,05$ (análise de variância de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni). (—) Não foi realizado o experimento.

Figura 70 – Comparação dos valores de CE_{50} da AA pelo sistema β -caroteno/ácido linolênico das fases orgânicas dos galhos e raiz de *S. brasiliensis* e dos padrões em 30 e 60 min*



* Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=3).

As fases que apresentaram maior atividade antioxidante pelo método do β -caroteno foram BCaRSB e ACeRSB, nos dois tempos analisados, e a fase HCaRSB em 60 minutos. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a AA dessas fases e a do padrão quercetina, nos dois tempos analisados.

A atividade antioxidante determinada pelo teste do sequestro do radical DPPH (Tabela 24 e Figura 69) parece não estar relacionada com a atividade determinada pelo método de descoloração do β -caroteno, apresentado na Tabela 25 e Figura 70. Estas diferenças podem estar relacionadas com o fato de que em sistemas lipofílicos as taxas de reações de sequestro dos radicais podem ser influenciadas pelo coeficiente de partição dos compostos entre as fases aquosa e lipídica e, desta forma, reduzir a disponibilidade das substâncias polares para reação com o radical peróxido não-polar formado pela oxidação do ácido linolênico (CABRAL, 2009).

Esse é o primeiro relato da atividade antioxidante, tanto pelo método do sequestro de radicais livres DPPH quanto pelo sistema β -caroteno/ácido linolênico, das fases dos galhos e da raiz de *S. brasiliensis*. Os estudos sobre AA na espécie se concentram nas folhas (MOREIRA, 2007; SARAIVA, et al., 2011).

5.4.2. Avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase

Artigos recentes têm reportado que alguns extratos de plantas possuem atividade inibitória da AChE. Deste modo, visando o grande potencial de espécies vegetais na descoberta de novos fármacos, estudos fitoquímicos bio guiados por testes *in vitro*, tem acelerado a descoberta de novas substâncias anticolinesterásicas (HOUGHTON et al., 2004).

A atividade anticolinesterásica foi avaliada quantitativamente usando a eserina como controle positivo. Os resultados obtidos para as fases orgânicas da raiz de *S. brasiliensis* são apresentados na Tabela 26. A Figura 71 faz uma comparação entre os valores de %I encontrados para as fases.

Não há relatos na literatura sobre avaliação da atividade anticolinesterásica das raízes de *S. brasiliensis*. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, ao nível de confiança avaliado, entre a fase BCeRSB, nos dois tempos analisados, as fases ACeRSB e BCaRSB no tempo 60 minutos e o padrão. Esses resultados mostram que esses extratos apresentam excelente atividade anticolinesterásica. A fase CCaRSB foi a que apresentou a maior atividade anticolinesterásica nos dois tempos analisados, superando até mesmo a atividade apresentada pelo padrão, sendo verificadas diferenças estatisticamente significativas entre eles. Portanto, o estudo fitoquímico dessa fase pode levar ao isolamento de uma substância com potente atividade. Nessa perspectiva, a substância **SB10**, isolada desse extrato, foi submetida à avaliação da sua atividade anticolinesterásica. Os resultados podem ser observados na Tabela 27. A substância **SB10** não apresentou Cl_{50} comparável ao padrão eserina, nos dois tempos analisados. Desta forma, devem existir outras substâncias responsáveis pela excelente atividade da fase CCaRSB. Contudo, esse é o primeiro relato da avaliação da atividade anticolinesterásica da substância **SB10**.

Tabela 26 – Percentual de inibição da AChE (%) obtido para as fases orgânicas e eserina (padrão)

Fases/Padrão	30 min	60 min
	% I ± DP*	% I ± DP*
HCaRSB	-3,8 ± 1,04 ^a	-4,04 ± 1,33 ^a
HCeRSB	16,89 ± 2,03 ^c	10,68 ± 2,01 ^c
CCaRSB	108,09 ± 3,34 ^d	107,65 ± 3,77 ^d
CCeRSB	42,43 ± 1,87 ^e	39,33 ± 2,46 ^e
ACaRSB	50,42 ± 1,71 ^e	61,48 ± 2,28 ^f
ACeRSB	70,02 ± 2,69 ^g	84,14 ± 2,84 ^h
BCaRSB	61,19 ± 1,47 ^f	75,85 ± 2,08 ^{gh}
BCeRSB	77,21 ± 2,38 ^{gh}	88,52 ± 3,12 ^{bh}
Eserina	89,67 ± 2,15 ^{bh}	92,97 ± 2,41 ^b

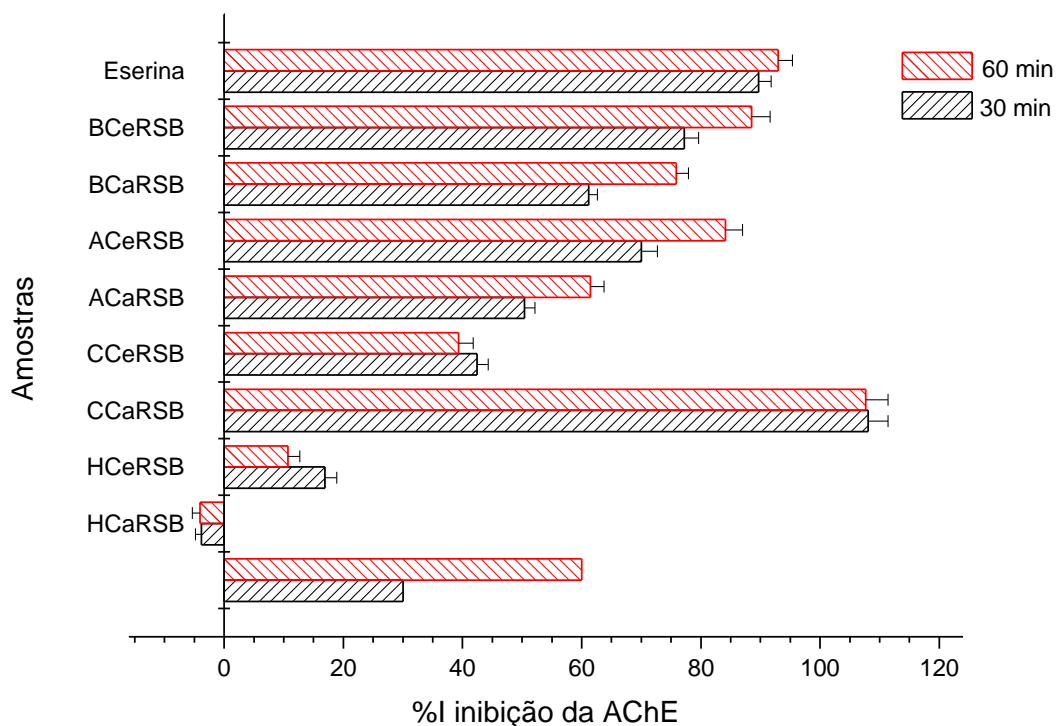
* Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=3). Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significativa comparando os valores do padrão e fases, p < 0,05 (análise de variância de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni).

Tabela 27 – Resultados de CI₅₀ encontrados para a substância **SB10** e eserina (padrão).

SB10/Padrão	30 min	60 min
	CI ₅₀ (µM) ± DP*	CI ₅₀ (µM) ± DP*
SB10	490,16 ± 4,87 ^b	344,49 ± 3,94 ^c
Eserina	2,49 ± 0,24 ^a	1,16 ± 0,27 ^a

* Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=3). Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significativa comparando os valores do padrão e da substância, p < 0,05 (análise de variância de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni).

Figura 71 - Comparação dos valores de %I inibição da AChE das fases orgânicas dos galhos e raiz de *S. brasiliensis* e do padrão em 30 e 60 min*



* Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=3).

5.4.3. Teste de letalidade frente a *Artemia Salina* Leach

O teste de letalidade da *Artemia salina* L. (BST) tem sido usado como bioensaio de laboratório a fim de determinar a toxicidade pela estimativa da dose letal média (DL₅₀), ou seja, a concentração que dizima metade de uma população. Este método, que determina o valor da DL₅₀ das substâncias ativas e das fases em meio salino, em $\mu\text{g ml}^{-1}$, é utilizado no estudo de plantas medicinais realizado em diferentes países com intuito de avaliar, principalmente, a atividade antitumoral. (ANDERSON et al., 1991; KANWAR, 2007; MEYER et al., 1982)

As fases orgânicas dos galhos e da raiz de *S. brasiliensis* foram submetidas ao teste de letalidade frente a *A. salina* em sete concentrações distintas (item 4.6.4., página 84). Os resultados podem ser observados na Tabela 28. Segundo dados da

literatura substâncias que apresentam $DL_{50} > 1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ são consideradas inativas frente a *A. salina* e aquelas que apresentam $DL_{50} < 100 \mu\text{g ml}^{-1}$ são consideradas muito ativas. Substâncias que apresentam o DL_{50} entre 100 e $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ são consideradas moderadamente ativas (ANDERSON et al., 1991; DAVID, et al., 2001).

Tabela 28 – Resultados do teste de letalidade frente *A. salina* para as fases orgânicas dos galhos e raízes de *S. brasiliensis*¹.

Fases	Letalidade frente <i>A. salina</i>	
	$DL_{50} (\mu\text{g mL}^{-1}) \pm DP^*$	Classificação da toxicidade
HCaRSB	$90,47 \pm 0,38^a$	Muito ativo
HCeRSB	$7,64 \pm 0,50^a$	Muito ativo
HGSB	$> 1000^b$	Inativo
CCaRSB	$75,50 \pm 1,63^a$	Muito ativo
CCeRSB	$48,58 \pm 0,33^a$	Muito ativo
DGSB	$368,00 \pm 2,51^c$	Moderadamente ativo
ACaRSB	$207,69 \pm 0,57^d$	Moderadamente ativo
ACeRSB	$302,44 \pm 1,63^{cd}$	Moderadamente ativo
AGSB	$> 1000^b$	Inativo
BCaRSB	$59,37 \pm 0,31^a$	Muito ativo
BCeRSB	$54,65 \pm 0,32^a$	Muito ativo

¹ Valores de DL_{50} apresentando 95% de confiança * Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=3). Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significativa comparando os valores das fases, $p < 0,05$ (análise de variância de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni).

Os resultados obtidos no ensaio com *A. salina* indicam uma elevada toxicidade das fases HCeRSB, CCeRSB, BCeRSB, BCaRSB, CCaRSB e HCaRSB, sendo que não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as DL_{50} encontradas para essas fases. As fases DGSB, ACaRSB e ACeRSB

apresentaram-se moderadamente ativos. Desta forma, o fracionamento dessas fases pode levar ao isolamento de substâncias com elevada atividade antitumoral.

Esse é o primeiro relato da avaliação da toxicidade dos galhos e das raízes de *S. brasiliensis*. No entanto, Saraiva e colaboradores (2011) relataram a avaliação da toxicidade do extrato metanólico das folhas de *S. brasiliensis*, empregando o teste da *A. salina*, o qual apresentou $DL_{50} = 705,54 \mu\text{g ml}^{-1}$ muito inferior ao resultado encontrado nesse estudo, evidenciando a potente atividade encontrada, para a maioria das fases.

5.4.4. Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória

A atividade antinociceptiva dos extratos metanólicos da casca (MCA_{RSB}) e do cerne (MCE_{RSB}) da raiz de *S. brasiliensis* foi avaliada por meio do ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético e a atividade anti-inflamatória foi avaliada através do teste de inibição da migração de neutrófilos induzida pela Cg para a cavidade peritoneal.

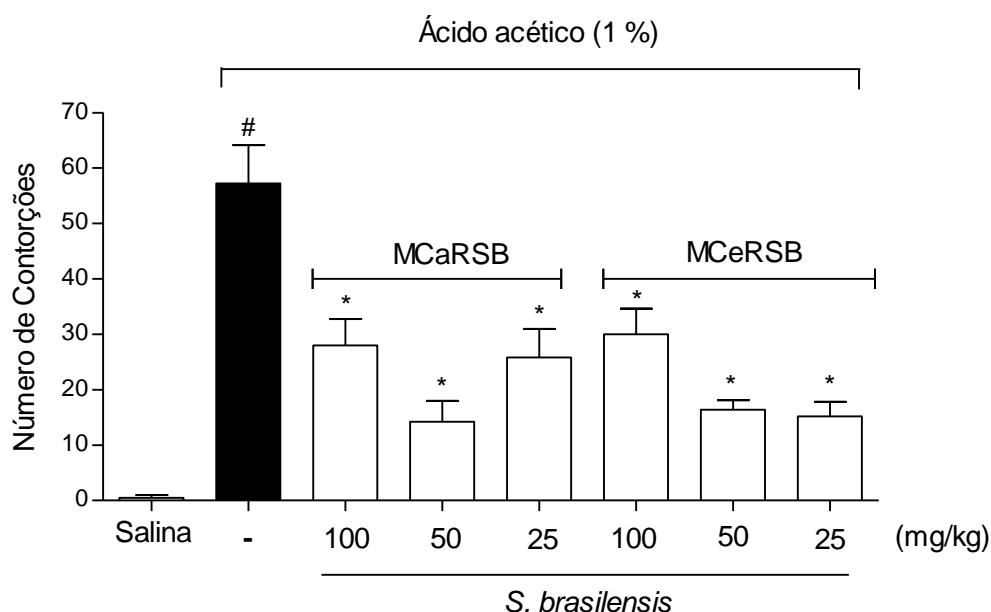
Entre os modelos de nocicepção utilizados, o teste das contorções abdominais, induzidas pelo ácido acético, é descrito como um típico modelo para avaliar a dor de origem inflamatória, pouco específico, mas com boa sensibilidade, sendo um recurso de triagem para avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de novos agentes (CRUZ, 2013). A resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético pode envolver uma estimulação direta das fibras aferentes nociceptivas ou ser resultado de uma reação inflamatória aguda, provocada pela liberação de mediadores endógenos, como os metabólitos do ácido araquidônico (pela via da COX), com consequente biossíntese de prostaglandina, que vão estimular os neurônios (ROCHA, 2010).

A administração intraperitoneal (i.p.) de ácido acético provoca no animal comportamentos estereotipados caracterizados por contorções intermitentes do abdômen, torção do tronco e estiramento das patas posteriores, sendo essa reação bastante característica. Esses comportamentos são considerados reflexos e evidenciam a dor visceral, que pode ser atenuada por anestésicos locais e substâncias analgésicas, justificando seu emprego para o ensaio de drogas que

apresentem essas atividades (LE BARS, GOZARIU & CADDEN, 2001; MICHEL, 2011).

A avaliação da nocicepção visceral dos extratos metanólicos da casca e do cerne da raiz de *S. brasiliensis*, nas doses de 100, 50 e 25 mg/Kg, foi realizada por meio do ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético. Tanto os extratos da casca quanto do cerne da raiz de *S. brasiliensis*, em todas as concentrações testadas, apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) do número de episódios de contorção em comparação ao grupo tratado com o veículo (etanol 10%, v/v), como pode ser observado na Figura 72. Esses resultados sugerem a presença de substâncias com alta atividade antinociceptiva nos extratos avaliados, uma vez que houve redução significativa no número de contorções quando foi utilizada uma dose relativamente baixa de 25 mg/Kg, em se tratando de extratos brutos.

Figura 72 – Efeito dos extratos MCaRSB e MCeRSB no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (1,0%) em camundongos¹

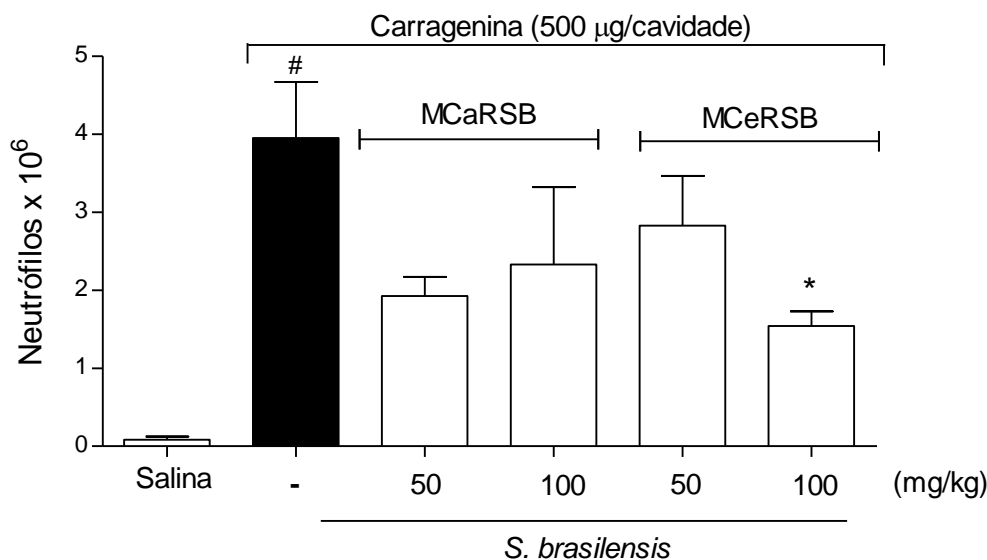


¹ Os animais foram pré-tratados com diferentes doses do extrato (100, 50 e 25 mg/Kg, s.c.) ou veículo (etanol 10%, v/v). Os resultados são apresentados como médias \pm D.P. da contorção abdominal em camundongos ($n = 6$). A análise estatística foi realizada por meio da ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo dos camundongos tratados com veículo (-) e tratados com o extrato, com indução posterior da nocicepção com ácido acético. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

Tem sido demonstrado que os neutrófilos desempenham um papel relevante na gênese da nocicepção inflamatória induzida por Cg, uma vez que estas células são fonte de citocinas ou mediadores hipernociceptivos de ação direta (CUNHA et al., 2008). Assim, para avaliar o efeito anti-inflamatório dos extratos metanólicos da casca e do cerne da raiz de *S. brasiliensis* foi realizado o testes de inibição da migração de neutrófilos induzida pela Cg para a cavidade peritoneal do camundongo. A peritonite é um modelo que provoca na cavidade peritoneal reação semelhante a que ocorre em consequência a infecções, inflamações ou doença neoplásica. Mediadores inflamatórios são liberados e podem ser difundidos para o sítio inflamado, resultando na ativação de células inflamatórias, causando aumento no número de células no espaço peritoneal. Esse modelo é considerado por muitos pesquisadores como o mais completo, uma vez que se pode avaliar o efeito de substâncias tanto sobre os eventos celulares quanto vasculares do processo inflamatório (RIBEIRO et al., 1997).

O pré-tratamento com os extratos MCaRSB e MCeRSB na concentração de 50 e 100 mg/Kg (s.c.) diminuiu a migração de neutrófilos nos camundongos induzida após 4h da injeção intraperitoneal de Cg (500 µg/cavidade), mas, apenas o extrato MCaRSB na concentração de 100 mg/Kg apresentou diminuição estatística significativa ($p < 0,05$) da quantidade de neutrófilos no lavado peritoneal quando comparado ao veículo (Figura 73).

Figura 73 – Efeito dos extratos MCaRSB e MCeRSB (50 e 100 mg/Kg) sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, pré-tratados por via subcutânea 30 min antes da Carragenina (500 µg/cavidade) induzir peritonite¹



¹ Cada valor representa a média \pm D.P (n = 6). A análise estatística foi realizada por meio da ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. (-) Veículo (etanol, 10% v/v). * $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

Os dados obtidos de atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dos extratos das raízes de *S. brasiliensis* são de grande relevância científica, pois, até o presente momento, não havia relatos na literatura sobre a avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória desses extratos.

A atividade antinociceptiva e anti-inflamatória superior do extrato MCaRSB pode ser devido à presença dos dímeros de chalcona nesse extrato, uma vez que a urundeuva A, um isômero da schinopsona B, apresenta reconhecida atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (VIANA,2003). Desta forma, se faz necessário em uma próxima etapa do trabalho, avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da fase clorofórmica da casca da raiz de *S. brasiliensis*, bem como da schinopsona B, visando elucidar os possíveis mecanismos de ação destes.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho contribuiu para o conhecimento da composição química e atividade biológica da espécie *Schinopsis brasiliensis*, uma vez que são encontrados poucos relatos na literatura sobre estudos fitoquímicos e avaliação da atividade biológica realizados com essa espécie. Este estudo tem sua importância maximizada por se tratar do primeiro estudo químico e avaliação da atividade biológica dos galhos e raízes de *S. brasiliensis*, uma espécie endêmica da flora brasileira, característica da caatinga, ameaçada de extinção e que apresenta uso na medicina popular.

O estudo fitoquímico das fases orgânicas dos galhos de *S. brasiliensis* possibilitou o isolamento de α -amirina, β -amirina, galato de metila, ácido gálico e quercetina-3-O- β -D-xilopiranosídeo. Ao passo que o estudo fitoquímico das fases orgânicas das raízes possibilitou o isolamento de β -sitosterol e seu derivado glicosilado, ácido elágico e os dímeros de chalcona 2',4,4',5-tetrahidroxichalcona-(2 \rightarrow 7'',8 \rightarrow 8'')-4''-hidroxietenilbenzeno (schinopsona A) e (7''*R, 8''*S) 2',4,4',5-tetrahidroxichalcona-(2 \rightarrow 7'',8 \rightarrow 8'')-2''',4'',4'''-trihidroxi-7'',8''-dihidrochalcona (schinopsona B), inéditos na literatura. O isolamento desses dímeros de chalcona comprova que essa classe de metabólitos está bem representada na família Anacardiaceae.

Em relação aos testes de atividade biológica, as fases AGSB, ACeRSB, ACaRSB, BCaRSB, DGSB e BCeRSB foram as que apresentaram as melhores atividades antioxidante no teste do sequestro do radical DPPH. A boa AA apresentada pelas fases AGSB e DGSB pode ser devido à elevada quantidade de galato de metila e ácido gálico presente nessas fases. Também foi avaliada a capacidade antioxidante das fases orgânicas pelo sistema β -caroteno/ácido linolênico. As fases que apresentaram maior atividade antioxidante por este método foram BCaRSB e ACeRSB, nos dois tempos analisados, e a fase HCaRSB em 60 minutos. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre a AA dessas fases e a AA do padrão quercetina, nos dois tempos analisados.

Quanto a avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase a fase CCaRSB foi a que apresentou a maior atividade anticolinesterásica, superando até

mesmo a atividade apresentada pelo padrão (eserina), sendo verificadas diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p < 0,05$). As fases BCeRSB, ACeRSB e BCaRSB apresentaram atividade semelhante ao padrão, não sendo encontradas diferenças estatisticamente significativas, ao nível de confiança avaliado, entre eles. A substância schinopsona B, isolada da fase CCaRSB, foi submetida à avaliação da sua atividade anticolinesterásica e não apresentou CI_{50} comparável ao padrão. Desta forma, deve haver outra substância responsável pela potente atividade dessa fase.

No teste de letalidade da *A. salina* os resultados obtidos indicaram uma elevada toxicidade das fases HCeRSB, CCeRSB, BCeRSB, BCaRSB, CCaRSB e HCaRSB, sendo que não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as DL_{50} encontradas para essas fases.

Também foi avaliada a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo* dos extratos metanólicos da casca e do cerne da raiz de *S. brasiliensis*, sendo que os dois extratos apresentaram resultados promissores.

Assim, esse estudo contribui para o conhecimento quimiosistemático da espécie *S. brasiliensis*. Além disso, os resultados dos testes de atividade biológica das fases orgânicas indicam esta espécie como fonte de substâncias bioativas, sendo essa a primeira etapa para a busca de novos fármacos.

7. REFERÊNCIAS

- ABAS, F. et al. Antioxidant and nitric oxide inhibition activities of selected Malay traditional vegetables. **Food Chemistry**, v. 95, n.4, p.566–573, 2006.
- AGRA, M.F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 111, n. 2, p. 383-395, 2007.
- AHN, M. R. et al. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, n. 24, p 7286–7292, 2004.
- AKINPELU, David A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. **Fitoterapia**. v. 72, n.3, p.286–287, 2001.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.
- ALMEIDA, A. L. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): um estudo de caso. **Interciencia**. v. 26, n. 6, p. 276-285, 2002.
- 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, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- Alzheimer's Disease International (ADI). Disponível em < <http://www.alz.co.uk/> >. Acesso em 16/07/2014.
- ANDERSON, J. E.; C. M. GOETZ, McLAUGHLIN, J. L.; SUFFNESS, M. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities and antitumour prescreens. **Phytochemical Analysis**, v. 2, n. 3, p. 107-111, 1991.
- AQUINO, A. B. **Avaliação do perfil antiinflamatório e antinociceptivo da casca do caule de *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae)**. 2010, 88f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.
- ARAÚJO, J. Q. **Estudos de docking e qsar-3d dependente do Receptor de inibidores da acetilcolinesterase**. 2010, 217f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- ASSAD, A. L. D.; FERRO, A. F. P. Biodiversidade e sua utilização na geração de fitoterápicos. **Fármacos e Medicamentos**. n.37, p.14-18, nov./dez., ano VI, 2005.
- ATTA-UR-RAHMAN et al. Acetyl and butyrylcholinesterase-inhibiting triterpenoid alkaloids from *Buxus papillosa*. **Phytochemistry**. v. 58, n. 6, p. 963-968, 2001.
- AZZAM, S. M. Chemical and biological investigation of essential oils of *Schinopsis* species cultivated in Egypt. **Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University)**. v. 42, p. 193-203, 2004a.

- AZZAM, S. M. Study of the alkaloidal content and cytotoxic activity of *Schinopsis* species cultivated in Egypt. **Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University)**. v. 42, p. 171-176, 2004b.
- BAHIA. Conselho Estadual de Meio Ambiente – CEPRAM. Resolução N° 1.009 DE 06 DE DEZEMBRO DE 1994. Dispõe sobre proibição do corte, armazenamento e comercialização das espécies nativas, "aroeira" *Astronium urundeuva* (Fr. Ali) Eng/, "Baraúna" *Schinopsis brasiliensis* Eng/. e "Angico" *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan, no Estado da Bahia. Salvador, Bahia.
- BAI, H. et. al. A novel Biflavonoid from roots of *Glycyrrhiza uralensis* cultivated in China. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. v. 51, n. 9, p.1095-1097, 2003.
- BANDEIRA, M. A. M. et al. Structural elucidation and total assignment of the ¹H and ¹³C NMR spectra of new chalcone dimmers. **Magnetic Resonance in Chemistry**. v. 41, p. 1009-1014, 2003.
- BANDEIRA, M. A. M; MATOS, F. J. de A. Matos, Braz-filho R. New Chalconoid Dimers from Myracrodruon urundeuva. **Natural Product Letters**. v. 4, n. 2, p. 113-120, 1994.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BARROS, C. S. R. F. **Compostos orgânicos de baixo peso molecular de Eucalyptus globulus: comportamento durante o cozimento kraft da madeira e branqueamento da pasta celulósica**. 2003. 222 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química. Universidade de Aveiro. Aveiro, 2003.
- BENZIE, I. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 233-261, 1996.
- BONATO, P. S. Cromatografia Gasosa. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Org.). **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006, cap. VIII, p. 203-270.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie**. v. 28, n.5, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa N° 06, de 21 de setembro de 2008. **Reconhece espécies da flora brasileira ameaçada de extinção**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 set. 2008.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**. v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**. v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.
- CARDOSO, M. P. **Estudo fitoquímico do caule de *Schinopsos brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae)**. 2007. 227f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

- CARDOSO, Manuela Pedra. **Contribuição ao Estudo Fitoquímico de *Schinopsis Brasiliensis* Engl. (Anacardeacea)**. 2001. 102 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2001.
- CARERI, M., ELVIRI, L., Liquid chromatography-UV determination and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric characterization of sitosterol and stigmasterol in soybean oil. **Journal of chromatography A**, v. 935, n.1-2, p. 249-257, 2001.
- CARPES, S. T. et al. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região Sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1660-1664, 2008.
- CESARIN, D.S.; FERREIRA, J.N.; BRAZ, R.F. Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalconas. **Química Nova**. v. 24, n. 5, p. 604-611, 2001.
- CHAVES, T. P. et al. Atividade antimicrobiana das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engler. **Revista de Biologia e Farmácia**. v. 05, n. 02, p. 11-17, 2011.
- CORREIA, S. de J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos Secundários de Espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**. v. 29, n. 6, p. 1287-1300, 2006.
- CRUZ, M. P. **Isolamento e identificação de compostos bioativos de *Mimosa hostilis* Benth**. 2013. 207f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química. Universidade Federal da Bahia. Salvador. 2014.
- CULTIVO do Cajueiro. **Embrapa Agroindústria Tropical: Sistemas de Produção**, Fortaleza, n.1, Jan. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Caju/CultivodoCajueiro/index.htm>> Acesso em: 17 de agosto de 2014.
- CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 4, p. 824-832, 2008.
- DAVID, J. P. et al. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**. v. 24, n. 6, p. 730-733, 2001.
- DHAR, D.N. **The chemistry of chalcones and related compounds**. New York, NY. Wiley-Interscience. 1981.
- DIMMOCK, J. R.; et al. Bioactivities of chalcones. **Current Medicinal Chemistry**. v.6, n.12, p.1125-1149, 1999.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.
- ESTEVAM, C. dos S. et al. Estudo do efeito antioxidante do extrato e partições da Baraúna contra a redução do radical do 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e determinação de polifenóis total. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2006, Águas de Lindóia, São Paulo. **Anais Eletrônicos...** São

Paluo: SBQ, 2006. Disponível em:
<<https://sec.s bq.org.br/resumos/29RA/T1955-2.pdf>> Acesso em: 03 de fev.
2009.

- FARIAS, D. F. et al. Antibacterial, Antioxidant, and Anticholinesterase Activities of Plant Seed Extracts from Brazilian Semiarid Region. **BioMed Research International**. v. 2013, p. 1-9, 2013.
- FICOSECO, M. E. A. et al. Antifungal and antimycotoxigenic metabolites in Anacardiaceae species from northwest Argentina: isolation, identification and potential for control of *Fusarium* species. **Journal of Applied Microbiology**. v. 116, n. 5, p. 1262-1273, 2014.
- GARRIDO, G. et al. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG®). **Pharmacological Research**. v. 50, n.2, p. 143–149, 2004.
- GIORDANI, R. B. et al. Investigação do potencial antioxidante e anticolinester sico de *Hippeastrum* (amaryllidaceae). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2042-2046, 2008.
- GONÇALVES, J. L. S. et al. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n.3, p.403–407, 2005.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**. v. 52, n.8, p. 253-265, 1994
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C., CROSS, C. E. Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: Where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. v. 119, n. 6, p. 598-620, 1992.
- HASAN, A. et al. Synthesis and inhibitory potential towards acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and lipoxygenase of some variably substituted chalcones. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 20, n. 1, p. 41-47, 2005.
- HIDALGO, M. E. et al. Antioxidant activity of depsides and depsidones. **Phytochemistry**, v. 37, n.6, p. 1585-1587, 1994.
- HOUGHTON, P. J.; AGBEDAHUNSI, J. M.; AGBEDAHUNSI, A. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. **Phytochemistry**. v. 65, n. 21, p. 2893, 2004.
- International Association for the Study of Pain (IASP), 1979. Disponível em:
<http://www.iasp-pain.org/terms-p.html>. Acesso em 16/07/2014.
- JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n.3, p.519-528, 2005.
- KAMTCHOUING, P. et al. Protective role of *Anacardium occidentale* extract against streptozotocin-induced diabetes in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 62, n.2, p.95–99, 1998.
- KANG, H. R.. Reactive Oxygen Species Scavenging Activities of Naturally Occurring Colorants. **Food Science and Biotechnology**. v. 22, n. 1, p. 225-231, 2013.

- KANWAR, A. S. Brine shrimp *Artemia salina*- a marine animal for simple and rapid biological assays. **Journal of Chinese Clinical Medicine**. v.2, n. 4, p. 236-240, 2007.
- KARDEL, M. et al. Different approaches to evaluate tannin content and structure of selected plant extracts – review and new aspects. **Journal of Applied Botany and Food Quality**. v. 86, p. 154-166, 2013.
- KING, H. G. C.; WHITE, T. Polyphenols and tannins of *Schinopsis* (quebracho) species: their genesis and interrelation. **Journal of the Society of leather Trades' Chemists**. v. 41, p.368-383, 1957a.
- KING, H. G. C.; WHITE, T. Polyphenols and tannins of *Schinopsis* (quebracho) spp. **Proceedings of the Chemical Society**. v. dezembro, p.341-342, 1957b
- KORNSTEINER, M.; WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. **Food Chemistry**, v. 98, n.2, p.381–387, 2006.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation proceedings**. v. 18, p. 412-416, 1959.
- KROGH, R. YUNES, R.A. ANDRICOPULO, A.D. Structure-activity relationships for the analgesic activity of gallic acid derivatives. **IL Farmaco**. v. 55, n. 11-12, p. 730-735, 2000.
- KUBO, I. et al. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**, v. 99, n.3, p.555–562, 2006.
- LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. A. e LIMA, T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. São Paulo. UNIFESP/EPM, 2007. 144p.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M. e CADDEN, S.W. Animals models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.
- LEBEAU, J. et al. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 29, n. 9, p. 900-912, 2000.
- LeOra Software. POLO-PC: A user's guide to Probit Logit analysis. Leora Software, Berkely, CA, 1987.
- LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**, Egland: Royal Botanic Gardens Kew p. 369, 1987
- LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 2, p. 158-163, 2006.
- LIMA, D. A. **Plantas das Caatingas**. Rio de Janeiro, RJ. Academia Brasileira de Ciências, 1989. p.243.
- LOESER, J.D.; MELZAC, R. Pain: An overview. **Lancet**, v.353, n.8, p. 1607-1609, 1999.
- LÓPEZ-ANDRÉS, P. Dietary quebracho tannins are not absorbed, but increase the antioxidant capacity of liver and plasma in sheep. **British Journal of Nutrition**. v. 110, n. 4, p. 632-639, 2013.

- MAHATO, S. B.; KANDU, A. P. ^{13}C RMN spectra of pentacyclitriterpenoids – A compilation and some salient features. **Phytochemistry**. v.37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.
- MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 78, n.2-3, p.133–137, 2001.
- MANN, J. **Chemical aspects of biosynthesis**. New York, NY: Oxford University Press Inc. 1994, cap.05, p. 53 a 61.
- MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 45, n.9, p. 594-598, 1968.
- MARSTON, A., KISSLING, J., HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v.13, n. 1, p.51-54, 2002.
- MARTINEZ, R. M. et al. Antimutagenic and antioxidant activities of quebracho phenolics (*Schinopsis balansae*) recovered from tannery wastewaters. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 434–439, 2009.
- MASESANE, et al. A Bichalcone from the Twigs of *Rhus Pyroides*. **Phytochemistry**. v. 53, n. 8, p. 1005-1008, 2000.
- MEDEIROS, J. D. A biotecnologia e a extinção de espécies, Crise da Modernidade. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 30. ed., jan./jun., 2003.
- MELO, J. G. et al. Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil. **Molecules**. v. 15, n. 12, p. 8534-8542, 2010.
- MEYER, B. N; FERRIGNI, N. R; PUTNAM, J. E; JACOBSEN, L. B; NICHOLS, D. E. ; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp- A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.
- MICHEL, M. C. de P. **Estudo fitoquímico da fração metanólica do extrato etanólico das folhas e avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de *Campomanesia velutina* (Cambess.) O. Berg.** 2011. 118f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Farmácia. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto. 2011.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 161-164, 1999.
- MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v.48, n.2, p. 91, 1971.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. da S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n.1, p.105-111, 2001.
- MORAIS, S. M. de. et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n.2, p.169-177, 2005.
- MOREIRA, B. O. **Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antioxidante dos Extratos Hexânico e Diclorometânico das Folhas de *Schinopsis brasiliensis* ENGL. (Anacardiaceae).** 2007. 127f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

- MOREIRA, B. O. et al. Screening of radical scavenging activity of extracts of three plant from the caatinga of northeast. In: 2nd Brazilian Conference of Natural Products & XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematic and Ecology (RESEM), 2009, São Pedro. São Paulo. **Anais 2nd Brazilian Conference of Natural Products & XXVIII RESEM**. Sociedade Brasileira de Química, 2009.
- MOTA, M. L. R.; THOMAS, G.; BARBOSA FILHO, J. M. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 13, n.3, p.289–300, 1985.
- MUELLER, L.; BOEHM, V. Antioxidant Activity of β -carotene compounds in different in vitro assays. *Molecules*.v. 16, n. 2, p. 1055-1069, 2011.
- NELSON, K. E. et al. Chemical and biological assays to evaluate bacterial inhibition by tannins. **Journal of Chemical Ecology**. v. 23, n. 4, p. 1175- 1194,1997.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the past 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, n.3, p.461-477, 2007.
- NI, L., MENG, Q. M., SIROSKI, J. A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opinion**, v.14. n. 12. p. 1669-1691, 2004.
- NOWAKOWSKA, Z. et al. Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial evaluation of new (E)-chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 43, n.4, p. 707-713, 2007.
- NUNES, B. S. et. al. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 379, n. 6, p. 609-616, 2009.
- NUNES, V. V. A. **Avaliação do efeito do extrato hidroalcóólico de *myrcia bella* cambess na dor aguda e na inflamação em modelos experimentais de roedores**. 2012, 79f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2012.
- NUNES, X. P. et al. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, suplemento, p. 718-723, 2008.
- OLIVEIRA, M. da C. P. de; OLIVEIRA, G. J. de. Superação da dormência de sementes de *Schinopsis brasiliensis*. **Ciência Rural**. v. 38, n. 1, p. 251-254, 2008.
- PAES, J. B.; MORAIS, V. de M.; LIMA C. R. de. Resistência natural de nove madeiras do semi-árido brasileiro a fungos xilófagos em condições de laboratório. **Revista Árvore**, v. 28, n. 2, p. 275-282, 2004.
- PEREIRA, A. B. D. **Contribuição para a padronização química de *hancornia speciosa* gomes: desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação de marcadores químicos**. 2012. 150 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, Suplemento 1, p.45-61, 2002.

- PRAGER, N. et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Determine the Effectiveness of Botanically Derived Inhibitors of 5- α -Reductase in the Treatment of Androgenetic Alopecia. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**. v. 8 n.2, p.143–152, 2002.
- PRASHANTH, D. et al. Glucosidase inhibitory activity of *Mangifera indica* bark. **Fitoterapia**. v. 72, n.6, p.686–688, 2001.
- QUEIROZ, L. P. **Distribuição das espécies de leguminosae na caatinga**. In: EVSB Sampaio et al. (eds). *Vegetação e flora da caatinga*. Recife: Associação Plantas do Nordeste-APNE/ Centro Nordestino de informações sobre Plantas-CNIP, 2002
- RAZALI, N. et al. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). **Food Chemistry**. v. 111, n. 1, p. 38-44, 2008.
- REDDY, M. V. B. New bichalcone analogs as NF-KB inhibitors and as cytotoxic agents inducing Fas/CD95-dependent apoptosis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 19, n. 6, p. 1895-1906, 2011.
- REIS, M. S. Manejo sustentado de plantas em ecossistemas tropicais. p. 199-215. In: Di STASI, L. C. (org.). **Plantas medicinais: arte e ciência – um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo, SP: Editora da UNESP, 1996.
- RIBEIRO, R. A. et al. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. **International Archives Allergy and Immunology**, v. 112, n. 1, p. 27-35, 1997.
- ROACH, P. D. et al. Inhibition of low density lipoprotein oxidation and upregulation of the low density lipoprotein receptor of human liver HEPG2 cells by tropical plant extracts. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 30, n.5-6, p. A8, 2003.
- ROBARDS, K. et al. Phenolic compounds and their role in processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 401-436, 1999.
- ROCHA, M. L. da. **Estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do monoterpeno α,β -Epoxi-carvona e seu efeito sobre a neurotransmissão glutamatérgica**. 2010, 11f. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2010.
- ROUX, D. G. Identification of anthocyanidins, leuco-anthocyanins and 2,3-dihydroflavanols in plant tissues. **Nature**. v. 179, n. 4554, p. 305-306, 1957.
- ROUX, D. G.; PAULUS, E. Condensed tannins. VIII. The isolation and distribution of interrelated heartwood components of *Schinopsis* species. **Biochemical Journal**. v. 78, n.4, p.785-789, 1994.
- RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema β -caroteno/ácido linoléico. **Embrapa - Comunicado Técnico on line 126**, Fortaleza, CE, 2006.
- SALVAT, A. et al. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**. v. 32, n. 5, p. 293-297, 2001.

- SANTOS, R. F. A. **Estudo químico e avaliação biológica dos flavonoides isolados de *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard**. 2014. 137 f. Tese (Doutorado) Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.
- SARAIVA, A. M. **Estudo Farmacognóstico e Determinação da Atividade Biológica de *Caelsalpinia pyramidalis* Tull. e *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA Multirresistentes**. 2007. 185 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.
- SARAIVA, A. M. et al. Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 15, n. 2, p. 199-207, 2013.
- SARAIVA, A. M. et al. *In vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 5, n. 14, p. 1724-1731, 2011.
- SCARTEZZINI, P.; SPERONI, E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 71. n.1-2, p. 23-43, 2000.
- SCHMOURLO, G. et al. Screening of anti-fungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 96, n.3, p.563-568, 2005.
- SERVIÇO brasileiro de resposta técnica. **Resposta Técnica**. Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br>>. Acesso em: 18 de ago. 2009.
- SILVA, I. M. M. S. et al. Use and knowledge of fuelwood in three rural caatinga (dryland) communities in NE Brazil. **Environment Development and Sustainability**. 2008.
- SILVA, M. S. S. **Alcalóides de Plantas da Família Amaryllidaceae: Isolamento Caracterização e Testes de Inibição de Acetilcolinesterase**. 2009, 234f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- SILVA, O. N., CHINALIA L. A., PAIVA, J. G. A. de. Caracterização histoquímica dos folíolos de *Spondias tuberosa* arruda (Anacardiaceae lindl.). **Revista Caatinga**. v. 21, n. 3, p. 62-68, 2008.
- SOUSA, C. M. de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. v. 30, n.2, p. 351-355, 2007.
- SOUSA, O.V. et al. Investigação das atividades antinociceptiva e antiedematogênica do extrato etanólico das folhas de *Joannesia princeps* Vellozo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.30, n. 1, p. 91-97, 2009.
- SOUZA, F. X. de. et al. Aspectos Morfológicos da Unidade de Dispersão de Cajazeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 35 n. 1, p. 215-220, 2000.
- STREIT, W.; FENGEL, D. Purified tannins from quebracho colorado. **Phytochemistry**. v. 36, n. 2, p. 481-484, 1994.

- TAKAGI, Keiji; MITSUNAGA, Tohru. Tyrosinase inhibitory activity of proanthocyanidins from woody plants. **Journal of Wood Science**. v. 49, n. 6, p. 461–465, 2003.
- TASCIOGLU, C. et al. Antifungal properties of some plant extracts used as wood preservatives. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 85, p. 23-28, 2013.
- TERPINC, P.; BEZJAK M.; ABRAMOVIC, H. A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. **Food Chemistry**. v. 115, n. 2, p. 740-744, 2009.
- TONA, L. et al. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 61, n.1, p. 57–658, 1998.
- TREVISAN, M. T. S. et al. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n.2, p.188–197, 2006.
- VACHER, J.; DUCHÊNE-MARULLAZ, P.; BARRAT, P. A propos de quelques produits usuels. Comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 11, n. 1, p. 51-58, 1964.
- VASTA, V. et al. Ruminant biohydrogenation as affected by tannins in vitro. **British Journal of Nutrition**. v. 102, n. 1, p. 82-92, 2009.
- VIANA, G. S. B. et al. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**. v. 10, n 2-3, p. 189-195, 2003.
- VIEGAS Jr., C.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- VOGL, O.; MITCHELL. Oriental Lacquer. 11. Botany and Chemistry of the Active components of Poisonous Anacardiaceae. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**. v. 33, n. 10, p. 1581-1599, 1996.
- WALKER, C. H. **Organophosphorous and carbamate insecticides. Organic Pollutants: An ecotoxicological Perspective**. New York: Taylor & Francis, 2001. 304 p.
- WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. **Food Chemistry**. v. 67, n.2, p. 399-414, 1999.
- WOLFENDER, J. L.; RODRIGUEZ, S.; HOSTETTMANN, K.; Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents. **Journal of Chromatography A**. v.794, n.1-2, p. 299-316, 1998.
- ZHI, N. A. Study on the chemical constituents of the essential oil from leaves of *Schinopsis balansae* Engl. **Flavour Fragrance Cosmetics**. v. 6, n.3, p. 26-27, 2008.
- ZUANAZZI, J. A. S.; MOTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M O; SCHENKEL, E. P; GOSMANN, G.; MELLO, J. C P de; MENTZ, Lilian A.;

PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 6^a ed. Porto Alegre: Editora da Universidade, 2000, cap. 23, p. 577-614.

Capítulo 2

**Quantificação de bioativos por CLAE-DAD e avaliação da
atividade biológica dos extratos padronizados de
Cenostigma macrophyllum Tul. (Leguminosae)**

1. INTRODUÇÃO

Plantas medicinais possuem princípios ativos que as tornam capazes de proporcionar seu uso terapêutico, por isso são utilizadas, ao longo dos anos, por diversas comunidades tradicionais e esse conhecimento muitas vezes é transmitido para a população em geral (COSTA, 2012).

A busca por produtos naturais bioativos, nos últimos anos, tomou caráter de urgência em resposta à grande expansão da população humana e sua conseqüente demanda por saúde e alimentos. A escassez e extinção de plantas e espécies animais pela invasão humana nos *habitats* naturais representam perda irrecuperável de recursos naturais (BRANDÃO, 2010).

No Brasil a diversidade dos biomas ainda é pouco explorada como fonte de novas substâncias de interesse farmacêutico. Entretanto, pesquisas para descoberta de protótipos de fármacos e também de fitofármacos, propiciaram além do avanço da pesquisa, o desenvolvimento tecnológico do país (ZANUTTO, 2013).

Nos últimos anos o uso de produtos medicinais à base de plantas vem apresentando um crescimento marcante, como tratamento alternativo aos medicamentos da medicina convencional (BEZERRA, 2007). As plantas medicinais são utilizadas na forma de preparações caseiras a partir de plantas *in natura* e como medicamentos fitoterápicos industrializados ou manipulados em farmácias magistrais (BAIER, 2011).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 65 a 80% da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento, confiam nos produtos a base de plantas medicinais para o tratamento de doenças, ou utiliza a medicina tradicional na atenção primária à saúde (ZANUTTO, 2013).

No Brasil, como em diversos países, as plantas medicinais e os medicamentos fitoterápicos são extensamente utilizados pela população. Diversos são os fatores que propiciaram o interesse da população por estes produtos, destacando-se: a preferência por tratamentos preventivos e terapias complementares em relação aos tratamentos convencionais; a preocupação com os efeitos colaterais, frequentemente observados com o uso de medicamentos sintéticos, associada à crença de que os fitomedicamentos não os possuem; a tendência à automedicação;

o maior volume e divulgação de estudos científicos que comprovam a eficácia e a segurança de espécies vegetais (CALIXTO, 2001).

Em 2011, o mercado global de medicamentos (sintéticos e naturais) alcançou a cifra de U\$ 800 bilhões, enquanto o mercado para os fitoterápicos atingiu o patamar de U\$ 26 bilhões. O maior mercado encontra-se na Europa, sendo que cerca de 50% desse, encontra-se na Alemanha. Neste mesmo ano, o mercado de fitoterápicos movimentou cerca de R\$ 1,1 bilhão no Brasil, quando foram comercializados 43 milhões de unidades desse tipo de medicamento, representando um aumento de 13% em relação ao ano anterior. A receita total do setor farmacêutico no país foi de R\$ 43 bilhões em 2011 (ALVES, 2013a).

A legislação brasileira através da Resolução – RDC nº 17 de 16 de abril de 2010 definiu medicamento fitoterápico como todo produto obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. Sendo caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2010a).

Uma das abordagens iniciais para se avaliar a qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos é a definição dos marcadores químicos e o estabelecimento de métodos para sua análise (SONAGLIO et al., 2004). Atualmente, a padronização de fitoterápicos é realizada com base na concentração de uma substância marcadora presente no extrato (DAVID, NASCIMENTO & DAVID, 2004). No que se refere ao controle de qualidade de drogas vegetais e de seus derivados, a RDC Nº 14/2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), define o conceito de marcador como “composto ou classe de compostos químicos (ex: alcaloides, flavonoides, ácidos graxos, etc.) presentes na matéria prima vegetal, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento fitoterápico (BRASIL, 2010b).

No caso da padronização, através de uma substância marcadora, assume-se que se a mesma está presente numa quantidade apropriada também todos os

demais componentes necessários estão igualmente representados, assegurando-se, com isto, uma atividade uniforme.

Outro método capaz de assegurar a uniformidade de ação de um fitoterápico, no qual a atividade pode ser devida a vários constituintes, é determinar a atividade do extrato, através de métodos farmacológicos e clínicos e, logo em seguida, obter o perfil químico qualitativo e quantitativo dos constituintes mais significantes. Assim, espera-se que outros extratos com o mesmo perfil tenham atividades fisiológicas idênticas (DAVID, NASCIMENTO & DAVID, 2004). Contudo, é preciso bastante cuidado nas análises, uma vez que as plantas constituem misturas complexas de várias substâncias químicas cuja atividade biológica pode, em muitos casos, ser atribuída aos efeitos sinérgicos das mesmas, sendo que, muitas vezes, essas substâncias responsáveis pela atividade farmacológica não estão suficientemente estabelecidas. Desta forma, o controle de qualidade, a padronização e a determinação da estabilidade de fitoterápicos se tornam tarefas bastante complexas (GOMES, 2013).

Para assegurar a reprodutibilidade e a qualidade de qualquer produto farmacêutico são adotadas resoluções oficiais que dispõem de requisitos mínimos para validação de métodos que conferem segurança ao emprego dos procedimentos analíticos. Entretanto, os compêndios oficiais não abrangem a diversidade de plantas medicinais utilizadas pela medicina tradicional e para algumas espécies ainda não está descrito qualquer parâmetro de qualidade. Portanto, o desenvolvimento e validação de métodos analíticos aplicados ao controle de qualidade de drogas vegetais utilizadas na cultura popular são fundamentais para que as especificações técnicas possam intervir na melhora da qualidade de matérias primas e de produtos derivados das mesmas (COSTA, 2012).

Diante do exposto, torna-se evidente a necessidade de um estudo detalhado sobre as espécies vegetais usadas pela população com fins terapêuticos, pois a maioria das plantas consumidas ainda não possui informações científicas detalhadas sobre sua composição química, sua atividade farmacológica e toxicológica. Nesse cenário de plantas medicinais com uso tradicional, pode-se destacar a *Cenostigma macrophyllum* Tul. (Leguminosae), objeto desse estudo. As cascas do caule, as folhas e flores dessa espécie são utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças estomacais e intestinais (SOUZA et al., 2007). Assim, são necessários

estudos que auxiliem no controle de qualidade desse produto de origem vegetal, considerando sua complexidade e todos os fatores inerentes aos fitomedicamentos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. O Gênero *Cenostigma*

A família Leguminosae (Fabaceae) pertence à divisão das Angiospermas, classe Dicotiledônea e da ordem das Rosales, sendo tradicionalmente dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae. Esta família compreende cerca de 650 gêneros e 18000 espécies espalhadas em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. É a terceira maior família entre as dicotiledôneas, sendo superada apenas por Asteraceae e Orchidaceae, e é a maior família dentro da ordem Rosales (LEWIS, 1987).

O gênero *Cenostigma* pertence à subfamília *Caesalpinioideae* a qual compreende cerca de 150 gêneros, estando bem representada no Brasil. O gênero *Cenostigma* é constituído por três espécies de hábitos arbóreos e arbustivos: *C. macrophyllum* Tul. (sinonímia *C. gardnerianum*), *C. tocantinum* Ducke, e *C. sclerophyllum*; onde somente esta última não é exclusivamente brasileira, ocorrendo também no Chaco paraguaio. A espécie *C. macrophyllum* do bioma Caatinga foi classificada até recentemente como sendo outra espécie: *Cenostigma gardnerianum* Tul. (LEWIS, 1987). Elas foram consideradas como a mesma espécie após uma análise da variação morfológica realizada ao longo de toda a área de distribuição. O estudo foi realizado em populações da Caatinga que seriam consistente com *C. gardnerianum*, do sistema antigo, entretanto o polimorfismo taxonômico nas características químicas demonstradas propõe uma reavaliação da equação taxonômica desta espécie (ALVES, 2012a).

2.2. *Cenostigma macrophyllum* Tul.

Cenostigma macrophyllum (Figura 1) é popularmente conhecida como “canela-de-velho”, “caneleiro” e “catingueira” (SILVA et al., 2004), e pode ser encontrada na região do cerrado e caatinga baianos, além dos estados de Mato Grosso, Pará, Rondônia, Tocantins, Goiás, Minas Gerais, Maranhão, Ceará, Pernambuco e Piauí (FREIRE, 1994; QUEIROZ, 2002). Apresenta-se como uma árvore que pode atingir até 20 m, com a superfície do caule provida de sulcos. Sua floração ocorre de agosto a fevereiro, exibindo flores amarelas e discretamente perfumadas, reunidas em inflorescências, com uma pétala inferior mediana menor, lembrando uma orquídea, por isso é extensivamente utilizada como ornamental (WARWICK & LEWIS, 2003). Na cidade de Teresina, capital do Piauí foi escolhida, através de decreto municipal nº 2.407, de 13.08.93, como a árvore símbolo da cidade.

Figura 1 – Foto do caule, flores e folhas de um espécimen de *C. macrophyllum*



Fonte: <http://herbologiamistica.blogspot.com.br/2011/04/canela-de-velho-caneleiro.html>

2.3. Composição química e atividade biológica

Estudos com extratos e frações das folhas, casca do caule e sementes de *C. macrophyllum* revelaram diversas atividades biológicas. Com relação às folhas a literatura reporta estudos sobre a atividade antioxidante do extrato etanólico (SOUZA et al., 2007), sobre o efeito do extrato AcOEt na inibição da glicação protéica na neuropatia diabética em ratos e atividades antioxidante e antinociceptiva de uma fração enriquecida com uma mistura de biflavonas (CARVALHO, 2009), avaliação da atividade gastroprotetora da fração hidroalcoólica (VIANA et al., 2013) e avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico (SANTOS et al., 2012). Em relação à casca do caule, o extrato etanólico e a fração acetato de etila apresentaram efeito analgésico em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (PIAULINO et al., 2013) e o extrato etanólico apresentou atividade antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2012). Uma emulsão elaborada a partir do extrato hexânico das sementes de *C. macrophyllum* acelerou a cicatrização de feridas, induzida experimentalmente, em ratos com *diabetes mellitus* (COELHO et al., 2013).

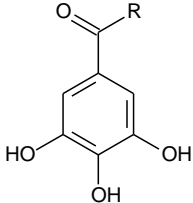
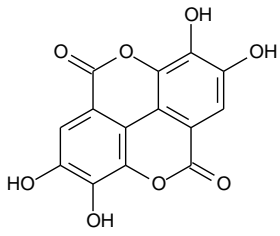
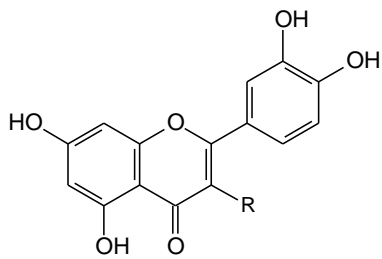
Em relação à atividade biológica de substâncias isoladas de *C. macrophyllum* encontra-se relatado na literatura a avaliação da atividade antinociceptiva da bergenina isolada do extrato AcOEt da casca do caule (Alves et al., 2012b), a avaliação da atividade antioxidante das substâncias bergenina, quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo, quercetina-3-O-(6''-O-galoil)- β -D-glicopiranosídeo, agatisflavona e quercetina-3-O-(6''-O-E-*p*-cumaroil)- β -D-glicopiranosídeo (Quadro 01) isoladas das folhas (Alves, 2007). Do extrato CHCl₃ das folhas foram isolados aurentiamida e acetato de aurentiamida que apresentaram atividade anticolinesterase *in vitro* (ALVES, 2013b).

Estudos fitoquímicos realizados com *C. macrophyllum* conduziram ao isolamento e identificação de diversas substâncias, conforme pode ser observado no Quadro 1.

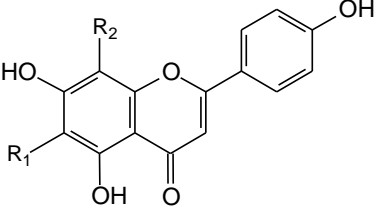
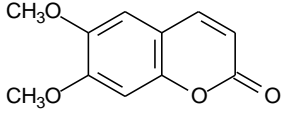
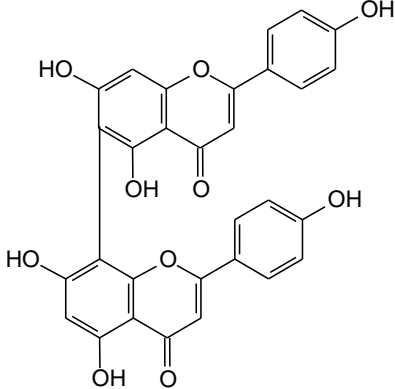
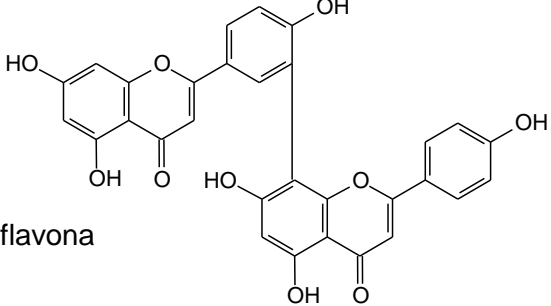
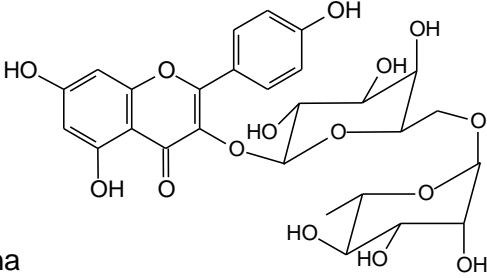
No entanto, não foram encontrados na literatura estudos sobre o perfil cromatográfico dos extratos de *C. macrophyllum*, ou trabalhos voltados à quantificação de princípios ativos presentes nesta espécie. Como *C. macrophyllum* é usada, segundo estudos etnobotânicos, na medicina popular, torna-se necessário o

desenvolvimento de métodos cromatográficos para auxiliar no controle de qualidade caso essa espécie venha a ter sua atividade biológica validada e torne-se um fitoterápico. Nesse sentido, é proposto nesse estudo o desenvolvimento de um método cromatográfico visando a quantificação de substâncias bioativas em *C. macrophyllum*.

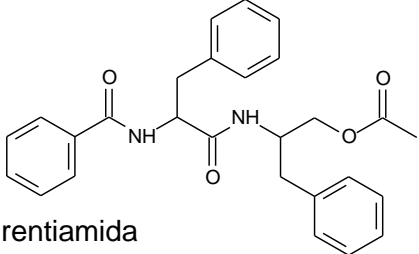
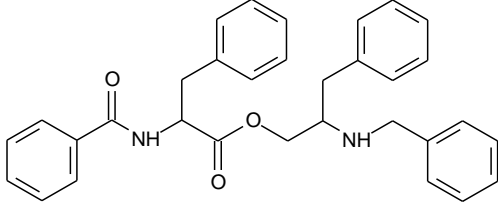
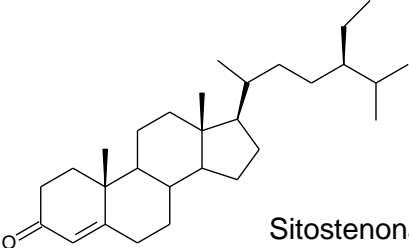
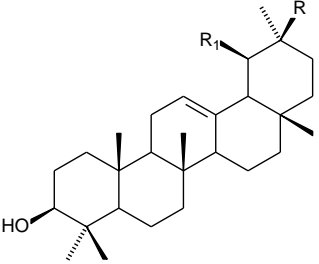
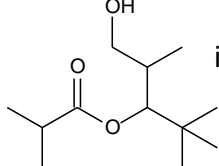
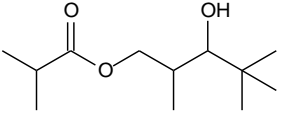
Quadro 1 – Substâncias isoladas de *Cenostigma macrophyllum*.

Substância	Parte da planta	Referências
 <p>R = OH. Ácido gálico R = OCH₃. Galato de metila</p>	Folhas	(ALVES, 2012b)
<p>Ácido elágico</p> 	Folhas Casca do caule	(ALVES, 2012b) (SILVA, 2007)
 <p>R = OH. Quercetina R = O-β-D-glicopiranosídeo. R = O-(6''-O-galoil)-β-D-glicopiranosídeo R = O-(6''-O-E-p-cumaroil)-β-D-glicopiranosídeo</p>	Folhas	(ALVES, 2012b)

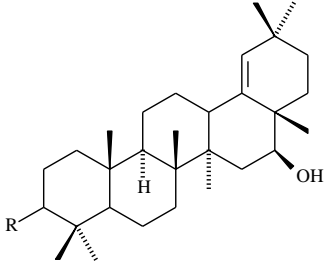
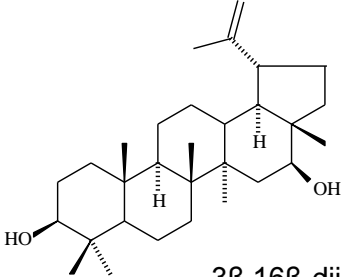
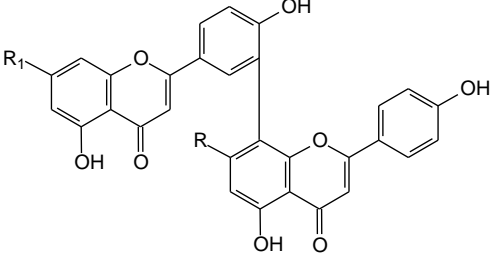
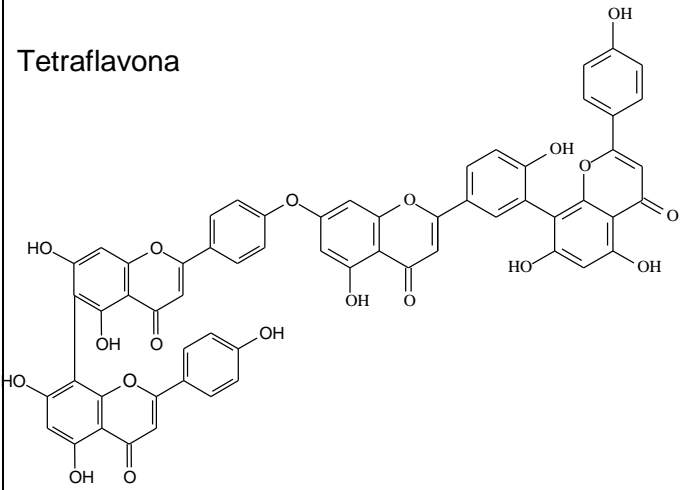
Quadro 1 – Substâncias isoladas de *Cenostigma macrophyllum*.

Substância	Parte da planta	Referências
 <p>R₁ = H, R₂ = β-D-glicose. Vitexina R₂ = H, R₁ = β-D-glicose. Isovitexina R₂ = H, R₁ = (2''-O-galoil)-β-D-glicose. Isovitexina (2''-O-galoil)</p>	Folhas	(ALVES, 2012b) (ALVES, 2012a)
<p>Escoparona</p> 	Folhas	(ALVES, 2012b)
<p>Agathisflavona</p> 	Folhas	(ALVES, 2012b) (VIANA, 2013) (COSTA, 2005)
<p>Amentoflavona</p> 	Folhas	(VIANA, 2013) (COSTA, 2005)
<p>Nicotiflorina</p> 	Folhas	(ALVES, 2012a)

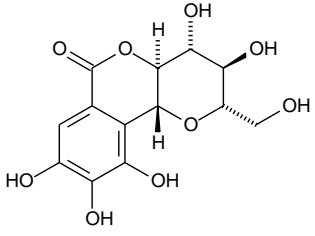
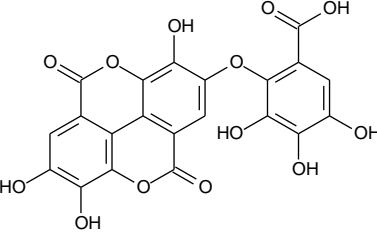
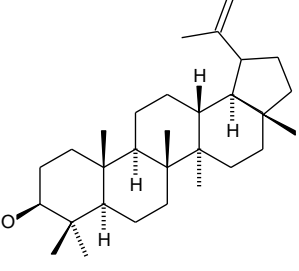
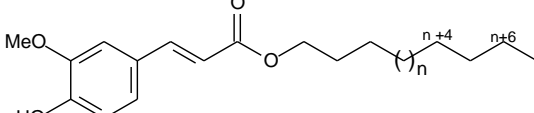
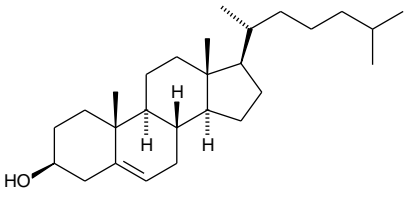
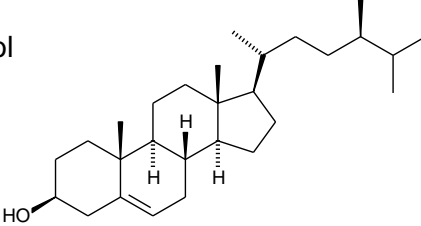
Quadro 1 – Substâncias isoladas de *Cenostigma macrophyllum*.

Substância	Parte da planta	Referências
 <p>Acetato de aurentiamida</p>	Folhas	(ALVES, 2012a)
 <p>Aurentiamida</p>	Folhas	(ALVES, 2012a)
 <p>Sitostenona</p>	Folhas	(ALVES, 2012a)
 <p>R = H, R₁ = CH₃. α-amirina R = CH₃, R₁ = H. β-amirina</p>	Folhas	(ALVES, 2012a)
 <p>isopropanoato de 2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metiletil)propila</p>	Folhas	(ALVES, 2012a)
 <p>isopropanoato de 3-hidroxi-2,4,4-trimetilpentila</p>	Folhas	(ALVES, 2012a)

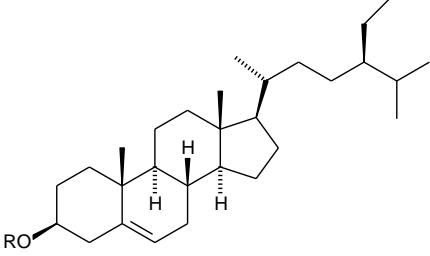
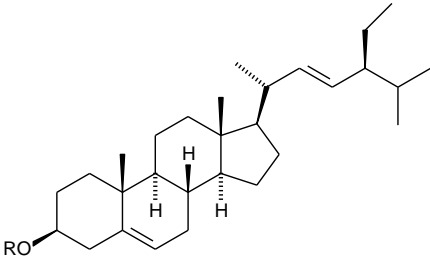
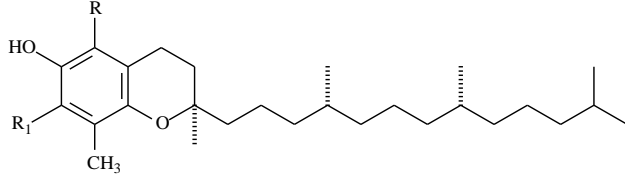
Quadro 1 – Substâncias isoladas de *Cenostigma macrophyllum*.

Substância	Parte da planta	Referências
 <p>R = OH. 3β,16β-dihidroiolean-18-eno R = =O. 16β-hidroiolean-18-en-3-ona</p>	Folhas	(COSTA, 2005)
 <p>3β,16β-diidroxilup-20(29)-eno</p>	Folhas	(COSTA, 2005)
 <p>R = OCH₃, R₁ = OH. 7''-metoxi- amentoflavona R = H, R₁ = OCH₃. 7-metoxi- amentoflavona</p>	Folhas	(COSTA, 2005)
<p>Tetraflavona</p> 	Folhas	(COSTA, 2005)

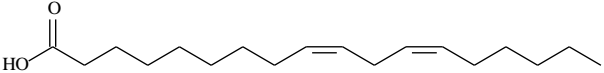
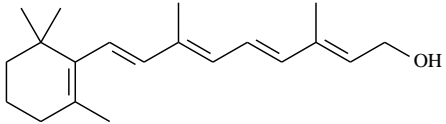
Quadro 1 – Substâncias isoladas de *Cenostigma macrophyllum*.

Substância	Parte da planta	Referências
Bergenina 	Casca do caule	(ALVES, 2012b)
Dilactona do ácido valônico 	Casca do caule	(SILVA, 2007)
Lupeol 	Casca do caule Folhas Casa do fruto	(SILVA, 2007) (ALVES, 2012a) (COSTA, 2005)
 Ferulato de alquila	Casca do caule	(SILVA, 2007)
Colesterol 	Casca do caule	(SILVA, 2007)
Campesterol 	Casca do caule	(SILVA, 2007)

Quadro 1 – Substâncias isoladas de *Cenostigma macrophyllum*.

Substância	Parte da planta	Referências
 <p>1- R = H. β-sitosterol R = β-D-glicose R = C12:0; R = 14:0; R = C16:1(Δ^9); R = C16:0; R = C18:2($\Delta^{9,12}$); R = C18:1(Δ^9); R = C18:0; R = C20:0; R = C24:0;</p>	<p>Casca do caule</p> <p>1- Casca do fruto</p>	<p>(SILVA, 2007)</p> <p>(COSTA, 2005)</p>
 <p>1- R = H. Estigmasterol 2- R = β-D-glicose</p>	<p>Casca do caule</p> <p>1- Casca do fruto</p>	<p>(SILVA, 2007)</p> <p>(COSTA, 2005)</p>
<p>Ácido palmítico (C16:0) Ácido palmitoleico (C16:1, Δ^9) Ácido oleico (C18:1; Δ^9) Ácido <i>cis</i>-vacênico (C18:1; Δ^{11}) Ácido esteárico (C18:0) Ácido araquídico (C20:0) Ácido behênico (C22:0) Ácido lignocérico (C24:0).</p>	<p>Casca do caule</p>	<p>(SILVA, 2007)</p>
 <p>R e R₁ = CH₃. α-tocoferol R = CH₃, R₁ = H. β-tocoferol R = H, R₁ = CH₃. γ-tocoferol R e R₁ = H. δ-tocoferol</p>	<p>Sementes</p>	<p>(COSTA, 2005)</p>

Quadro 1 – Substâncias isoladas de *Cenostigma macrophyllum*.

Substância	Parte da planta	Referências
 Ácido linoleico	Sementes	(COSTA, 2005)
 Vitamina A (retinol)	Sementes	(COSTA, 2005)

2.4. Validação de métodos analíticos

A validação de determinado procedimento analítico objetiva demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação preconizados. Assim, a validação analítica garante a credibilidade da metodologia a ser aplicada rotineiramente no laboratório, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser validado (RIBANI et al., 2004).

São descritas na literatura várias definições para validação. A Organização Mundial de Saúde (WHO, 1992) define validação como avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado. A ANVISA afirma, na Resolução-RE nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), que a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Por outro lado, a International Standard Organization

(1999) afirma que validação é a confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional.

De qualquer forma, o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semiquantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003).

Diversas organizações nacionais e internacionais disponibilizam instruções para a validação de métodos analíticos. Órgãos como International Conference on Harmonization (ICH), International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), International Standard Organization (ISO), entre outros, exigem o item validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica (BRASIL, 2003; ICH, 1995a; ICH, 1995b; INMETRO, 2003; THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; US-FDA, 1994; US-FDA, 2000; US-FDA, 2001;).

O que se pode observar é que não há um procedimento normatizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação. Como há diversas entidades responsáveis por acompanhar e credenciar a competência de laboratórios de ensaios é importante ressaltar que as diferentes terminologias e até algumas características de desempenho do método têm, em sua maior parte, o mesmo significado, porém descrito de uma maneira distinta, para aplicações diferentes (RIBANI et al., 2004).

No Brasil, existem duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de fevereiro/2010.

Para realização da validação de um método analítico, alguns parâmetros analíticos ou características de desempenho devem ser atendidos de acordo com o método a ser analisado. Dentre eles temos: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez (BRASIL, 2003; BRITO et al., 2003; INMETRO, 2010; RIBANI et al., 2004).

A seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Este parâmetro analítico avalia o grau de interferência de espécies como outro princípio ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se essa característica de desempenho não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

Muitos autores utilizam os termos seletividade e especificidade como sinônimos. No entanto, estes diferem entre si de acordo com o tipo de resposta que produzem. Um método é dito específico quando consegue fornecer uma resposta para somente um analito (VESSMAN et al., 2001). Quando o método desenvolvido consegue produzir resposta para diversos analitos, distinguindo-os entre si, é chamado seletivo (INMETRO, 2010)

A linearidade é a capacidade do método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). A correlação entre o sinal medido, área ou altura do pico, e a massa ou concentração da substância a ser quantificada muito raramente é inicialmente conhecida. A relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada experimentalmente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (RIBANI et al., 2004). A resolução RE N° 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA recomenda que sejam analisadas no mínimo cinco concentrações diferentes na construção da curva analítica, variando de 80 a 120% da concentração teórica do teste para determinação quantitativa do analito em matérias-primas e formas farmacêuticas.

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear (cuja equação é dada pela fórmula: $y = ax + b$) determinada pelo método dos mínimos quadrados. Para tal, deve ser verificada a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração e a

homocedasticidade dos dados, isto é, homogeneidade da variância dos resíduos, antes de fazer a regressão linear. (CUSTODIO, ANDRADE & AUGUSTO, 1997; INMETRO, 2010).

Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (R). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida. Quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado uma evidência do ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI et al., 2004). A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010). De acordo com a ICH uma representação gráfica dos resíduos é recomendada. Uma alternativa para avaliar a linearidade seria a realização da análise de variância (ANOVA) na regressão (INMETRO, 2010).

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: repetitividade; precisão intermediária; reprodutibilidade (BRASIL, 2003).

A repetitividade, também denominada de precisão intra-corrída ou intra-ensaio, representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, ou seja, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local, repetições em um curto intervalo de tempo. A ANVISA utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade. (RIBANI et al., 2004). O resultado pode ser expresso através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) também conhecido como coeficiente de variação (CV), de uma série de medidas, segundo a equação 1.

Equação 1:

$$RSD(\%) \text{ ou } CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

onde S é o desvio padrão e \bar{x} , a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003).

Para a repetitividade, o INMETRO recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão. A ICH e ANVISA sugerem que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (por exemplo: três concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas cada), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado. (BRASIL, 2003; ICH, 1995a; INMETRO, 2010).

Deve-se ter o cuidado para não confundir repetitividade com precisão instrumental, a qual é medida pelas injeções repetitivas, sequenciais da mesma amostra (tipicamente 10 ou mais vezes), seguida pela média dos valores da área do pico ou altura do pico e determinação da estimativa do desvio padrão relativo de todas as injeções (RIBANI et al., 2004).

A precisão intermediária, também denominada de precisão inter-corridas, indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. O número de ensaios necessários para se avaliar a precisão intermediária segue a mesma recomendação da ICH e ANVISA para o cálculo de repetitividade descrita anteriormente. (BRASIL, 2003; ICH, 1995a; RIBANI et al., 2004).

A reprodutibilidade, também denominada de precisão inter-laboratorial, representa a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. (BRASIL, 2003).

O Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. No caso de métodos instrumentais (como

CLAE), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3,3 vezes a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação dividido pela inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

O Limite de Quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra. O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. A ICH, a ANVISA e o INMETRO estabelecem que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido. Por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração (BRASIL, 2003; ICH, 1995a; INMETRO, 2010).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão.

A recuperação é o principal método aplicado no estudo de exatidão, e é definida como a proporção da quantidade do analito, presente ou adicionada em uma parcela analítica do material analisado, que é extraída e passível de ser quantificada (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 1999). A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra (BRASIL, 2003).

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança

durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. Os fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico em cromatografia líquida de alta eficiência são: variação do pH da fase móvel, variação na composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e fluxo da fase móvel (BRASIL, 2003).

É importante salientar que, segundo a RE Nº 899/2003, uma metodologia descrita em farmacopeias ou formulários oficiais reconhecidos pela ANVISA, é considerada validada, enquanto que para as metodologias analíticas que não são descritas em compêndios oficiais, é necessário validar seguindo um conjunto de parâmetros propostos pela ANVISA para cada categoria de métodos analíticos (BRASIL, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Apesar da vasta utilização de *C. macrophyllum* na medicina tradicional e de alguns trabalhos mostrando sua diversidade de atividade biológica ainda não há, segundo a literatura, estudos sobre o perfil cromatográficos e quantificação de substâncias presentes nos extratos de *C. macrophyllum*. Assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE–UV/DAD) para a quantificação de substâncias bioativas presentes nos extratos hidrometanólicos da casca do caule e das folhas de *C. macrophyllum*, bem como traçar o perfil cromatográfico (*fingerprint*) visando à caracterização de substâncias bioativas presentes nesses extratos.

3.2. Objetivos Específicos

- Traçar o perfil cromatográfico (*fingerprint*) dos extratos hidrometanólicos das folhas e casca do caule de *C. macrophyllum*;
- Desenvolver e validar um método cromatográfico, utilizando CLAE-DAD, visando a caracterização química e quantificação de substâncias bioativas presentes em *C. macrophyllum*;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos hidrometanólicos, padronizados, das folhas e casca do caule de *C. macrophyllum* através do método do sequestro do radical livre DPPH e do sistema β -caroteno/ácido linolênico;
- Avaliar a atividade inibidora da acetilcolinesterase *in vitro* dos extratos hidrometanólicos, padronizados, das folhas e casca do caule da espécie;

- Avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva *in vivo* dos extratos hidrometanólicos, padronizados, das folhas e casca do caule da espécie;
- Contribuir com o conhecimento quimiotaxinômico da espécie.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiais, equipamentos, reagentes e padrões analíticos

As determinações cromatográficas foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Dionex®, modelo UltiMate 3000, composto por uma bomba quaternária com desgaseificador “on-line” a vácuo de quatro canais, tolerante a vazões de até 10 mL/min. Esse equipamento dispõe de um mecanismo de duplo pistão em série com deslocamento variável de 20 a 100 µL, auto-injetor, controle de temperatura da coluna e detector UV com arranjo de diodos. O equipamento foi gerenciado pelo *software* Chromeleon®.

As colunas cromatográficas analíticas utilizadas foram: Waters® XBridge™, BEH C₁₈ (100 x 3,0 mm d.i., 2,5 µm de diâmetro de partícula) e DIONEX Acclaim® RSLC 120 C₁₈, 5µm, 120Å, 2.1X 100mm.

Os solventes metanol e o diclorometano utilizados no preparo dos extratos foram de grau analítico e da marca Qhemis®.

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas foram grau CLAE (TEDIA® ou J. T. Baker®), filtrados à vácuo em membrana de nylon de 0,45 µm de porosidade.

O ácido fórmico 98-100% utilizado no preparo da fase móvel foi grau analítico (Emsure®). O ácido acético, também utilizado no preparo da fase móvel foi grau CLAE, TEDIA®.

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

As substâncias padrão utilizadas na validação do método analítico foram ácido elágico (Sigma®, ≥ 95%), ácido gálico (Sigma®, ≥ 99%), amentoflavona (Sigma®, ≥ 99%), além de galato de metila (MOREIRA, 2009) e agathisflavona (ALVES et al., 2012), substâncias isoladas e identificadas em trabalhos desenvolvidos no GPPN-IQ-UFBA.

A homogeneização das amostras foi feita em agitador Vórtex de tubos, microtubos e frascos (Arsec[®]).

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

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

Para o preparo das soluções, os volumes de diluentes e reagentes foram medidos com pipetas automáticas 2-20 µL (Eppendorf[®]), 20-200 µL (HTL[®]), 100-1000 µL e 1000-5000 µL (Tedia Pet[®]).

Os evaporadores rotatórios utilizados para evaporação de solventes à pressão reduzida foram das marcas Büchi[®] e IKA[®] LABORTECHNIK HB4 basic, com temperatura em geral entre 35°C e 60°C.

Os detalhes sobre materiais, equipamento e reagentes utilizados na avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH e β-caroteno, avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase e da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória foram descritos na seção 4.6 (páginas 81 a 87) do Capítulo 01.

4.2. Coleta do material vegetal e preparo dos extratos

As folhas e a casca do caule de *C. macrophyllum* foram coletadas no campus Ministro Petrônio Portella da Universidade Federal do Piauí, em Teresina, pelo Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior. As folhas e a casca do caule de *C. macrophyllum* foram submetidas à moagem, separadamente, após secagem em estufa a 40°C com ventilação. O material pulverizado, 10,0 g das folhas e 10,0 g da casca do caule, foi então submetido à maceração em MeOH separadamente, por três extrações consecutivas, sob agitação à 40 °C, com cerca de 48 h cada, e o filtrado obtido em cada etapa foi reunido e concentrado sob pressão reduzida, originando os extratos metanólicos das folhas (2,14 g) e da casca do caule (1,81 g).

Os extratos metanólicos das folhas e da casca do caule de *C. macrophyllum* foram dissolvidos, separadamente, em H₂O/MeOH (4:6) e particionado com diclorometano, dando origem a duas fases, a diclorometânica e a hidrometanólica. Essas fases foram concentradas no rotaevaporador e suas massas são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Massas dos extratos obtidos das folhas e da casca do caule de *C. macrophyllum*.

Extratos das folhas	Massa (g)
CH ₂ Cl ₂ (DFCM)	0,4018
Hidrometanólico (MFCM)	1,6907
Extratos da casca do caule	Massa (g)
CH ₂ Cl ₂ (DCCM)	0,1194
Hidrometanólico (MCCM)	1,6902

Os extratos MFCM (hidrometanólicos das folhas de *C. macrophyllum*) e MCCM (hidrometanólicos da casca do caule de *C. macrophyllum*) foram utilizados, posteriormente, nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência.

4.3. Condições Cromatográficas

Visando a melhor separação das substâncias presentes nos extratos, foram realizados vários estudos de otimização das condições cromatográficas, modificando-se solventes, gradiente de eluição, fluxo, colunas analíticas e a temperatura do forno. Após a otimização do método, a separação cromatográfica foi realizada empregando-se uma coluna analítica Waters® XBridge™, BEH C₁₈ (100 x

3,0 mm d.i., 2,5 µm de diâmetro de partícula) e o gradiente de eluição foi feito no modo reverso, com fase móvel constituída de acetonitrila (**B**) e água acidificada com ácido fórmico 0,2% (v/v) (**A**), como mostrado na Tabela 2. O fluxo empregado na fase móvel foi de 0,6 mL min⁻¹, o volume de injeção de 10 µL e temperatura de 30 °C. A coluna foi condicionada em 0,1% de **B** por cinco minutos entre cada análise e o tempo total de corrida foi de 60 minutos.

Tabela 2 – Gradiente de eluição após a otimização do método.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0,0 - 4,0	99,9	0,1
4,0 - 20	92,0	8,0
20 - 40	90,0	10,0
40 - 55	70,0	30,0
55 - 59	0,0	100,0
59 -60	0,0	100,0

Os cromatogramas foram registrados com detector de arranjo de diodos em varredura de 190-400 nm e todos os perfis cromatográficos por CLAE foram obtidos em 254, 265, 290 e 330 nm. No entanto, o comprimento de onda utilizado para a aquisição cromatográfica durante a validação do método foi 265 nm. A identificação de ácido gálico, galato de metila, ácido elágico, agathisflavona e amentoflavona foram realizadas pela avaliação dos tempos de retenção, dos espectros no UV e comparação com os espectros correspondentes aos picos dos padrões de referência.

Todas as amostras foram filtradas em membranas de filtração millipore com poros de 0,22 µm de diâmetro (Supelco, USA) antes das análises.

4.4. Validação do método analítico

Para a validação do método foram determinados os seguintes parâmetros analíticos: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez, segundo os protocolos da ANVISA e INMETRO (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

4.4.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela homogeneidade espectral dos picos cromatográficos, pela comparação dos tempos de retenção dos padrões com os picos cromatográficos referentes às substâncias analisadas, pela sobreposição dos cromatogramas e dos espectros de UV obtidos dos padrões e extrato. A análise da homogeneidade espectral dos picos foi realizada pela observação dos espectros registrados nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos, sendo considerados puros quando apresentaram exata sobreposição.

4.4.2. Linearidade

A linearidade foi determinada a partir da construção de curvas analíticas empregando o método da padronização externa, utilizando-se cinco concentrações distintas dos padrões: ácido gálico, galato de metila, ácido elágico, agathisflavona e amentoflavona. As soluções estoque dos padrões ácido gálico e galato de metila foram preparadas na concentração de 400 mg L⁻¹. Já para o ácido elágico e agathisflavona preparou-se uma solução na concentração de 200 mg L⁻¹, enquanto que, para amentoflavona foi preparada uma solução estoque na concentração de 24 mg L⁻¹. Todas as soluções estoque foram preparadas em metanol.

4.4.2.1 Construção da curva analítica por padronização externa

Para a construção das curvas analíticas, foram realizadas diluições a partir da solução estoque de cada padrão, em metanol, obtendo-se cinco concentrações, em triplicata, como pode ser observado na Tabela a seguir.

Tabela 3 – Concentrações dos padrões utilizadas na construção das curvas analíticas.

Padrão	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
Ácido gálico	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
Galato de metila	2,0	3,5	5,0	6,5	8,0
Ácido elágico	7,5	10	12,5	15,0	17,5
Agathisflavona	3,0	6,0	9,0	12,0	16,0
Amentoflavona	1,0	3,0	5,0	7,0	9,0

As curvas analíticas foram construídas relacionando-se as áreas integradas dos picos cromatográficos de interesse e as respectivas concentrações dos padrões.

A linearidade foi avaliada através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de correlação foram determinados. Como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão, foi considerado um coeficiente de correlação maior que 0,9900, como preconizado pela ANVISA. A linearidade, também foi avaliada pela distribuição gráfica dos resíduos dos modelos lineares construídos. Para verificar a qualidade do ajuste desses modelos às respostas obtidas, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), com $p < 0,05$.

4.4.3 Precisão

4.4.3.1. Repetibilidade

A repetibilidade ou precisão intra-corrída foi avaliada em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e analista, mediante análise em quadruplicata das soluções-padrão em diferentes níveis de concentração: baixa, média e alta. Como apresentado na Tabela 4.

Esse parâmetro foi expresso como coeficiente de variação (CV), segundo a equação 1 (p. 185), correspondente a cada nível de concentração.

Tabela 4 – Concentrações dos padrões utilizadas na avaliação da repetibilidade.

Padrão	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Baixa	Média	Alta
Ácido gálico	2,0	3,0	4,0
Galato de metila	2,0	5,0	8,0
Ácido elágico	7,5	12,5	17,5
Agathisflavona	3,0	9,0	16,0
Amentoflavona	1,0	5,0	9,0

4.4.3.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada realizando-se análises em triplicata, em quatro dias não consecutivos, das soluções-padrão nas mesmas concentrações utilizadas no item 4.4.3.1 (Tabela 4), para os padrões ácido gálico, galato de metila, ácido elágico, agathisflavona e amentoflavona, correspondentes a três níveis de concentração baixa, média e alta. O coeficiente de variação (CV) foi estimado ao final das sucessivas repetições.

4.4.4. Exatidão

A exatidão foi determinada por meio de ensaios de recuperação utilizando os extratos hidrometanólico da casca do caule e das folhas de *C. macrophyllum*, sendo o extrato hidrometanólico da casca do caule fortificado com os padrões ácido gálico, galato de metila e ácido elágico e o extrato hidrometanólico das folhas fortificado com os padrões agathisflavona e amentoflavona. Todas as fortificações foram realizadas em triplicata e em três níveis diferentes de concentração (baixa, média e alta), para cada padrão, conforme o item 4.4.3.1. A recuperação foi determinada considerando os resultados obtidos para cada analito estudado, utilizando a seguinte equação matemática (INMETRO, 2010):

$$\% \text{ Recuperação} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

Onde C_1 é a concentração do analito na amostra fortificada, C_2 é a concentração do analito na amostra não fortificada e C_3 a concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

4.4.5. Limite de detecção

Para a determinação do limite de detecção (LD), foram considerados os parâmetros relativos a cada curva analítica construída, utilizando a seguinte relação matemática:

$$LD = 3,3 \times \left(\frac{DPe}{ca} \right)$$

em que, DPe é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e ca é o coeficiente angular da curva analítica.

4.4.6. Limite de quantificação

Para a determinação do limite de quantificação (LQ), foram considerados os parâmetros relativos a cada curva analítica construída, utilizando a seguinte relação matemática:

$$LQ = 10 \times \left(\frac{DPe}{ca} \right)$$

em que, DPe é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e ca é o coeficiente angular da curva analítica.

4.4.7. Robustez

Para avaliar o comportamento do sistema analítico, quando realizadas pequenas mudanças nas condições ótimas de operação, foi feito o ensaio de robustez. Nesse ensaio foi utilizada, em todos os experimentos, uma solução-padrão de ácido elágico 12,5 µg mL⁻¹. Essa solução foi analisada empregando-se as condições cromatográficas anteriormente otimizadas (item 4.3 Tabela 2).

Na avaliação da robustez foram realizadas alterações deliberadas nas condições ótimas de análise, dos seguintes parâmetros: fluxo (0,55 e 0,65), percentagem de ácido fórmico em água (0,1% e 0,3%) e temperatura do forno (25 a 35 °C).

A avaliação da robustez após as alterações nas condições ótimas dos parâmetros avaliados para determinação de ácido gálico, galato de metila, ácido elágico, agathisflavona e amentoflavona nos extratos hidrometanólico da casca do caule e das folhas de *C. macrophyllum* foi realizada através de um planejamento fatorial completo (2³) e os resultados interpretados a partir da análise de variância (ANOVA). O ponto central do planejamento foi analisado em triplicata para possibilitar uma estimativa do erro e para verificar se as modificações causam curvatura no modelo e os outros experimentos foram realizados em duplicata. Todos os experimentos foram realizados aleatoriamente.

A Tabela 5 apresenta as variáveis experimentais e seus valores, obtidos através das alterações deliberadas nas condições ótimas de análise, ou seja, em torno dos valores críticos.

Tabela 5 – Níveis das variáveis experimentais para o estudo da robustez.

Variável	Valor Mínimo (-)	Valor Máximo (+)	Ponto central
Fluxo (mL)	0,55	0,65	0,60
Concentração da solução de ácido fórmico (%)	0,1	0,3	0,2
Temperatura do forno (°C)	25	35	30

A Tabela 6 apresenta a matriz do planejamento. Os resultados foram tratados no programa *STATISTICA 8.0* com nível de confiança a 95 %.

Tabela 6 – Matriz do planejamento fatorial completo (2^3) com valores reais e codificados.

Experimento	Fluxo (mL)	Concentração da solução de ácido fórmico (%)	Temperatura do forno (°C)
1	+ (0,65)	+ (0,3)	+ (35)
2	+ (0,65)	+ (0,3)	- (25)
3	+ (0,65)	- (0,1)	+ (35)
4	+ (0,65)	-(0,1)	- (25)
5	- (0,55)	+ (0,3)	+ (35)
6	- (0,55)	+ (0,3)	- (25)
7	- (0,55)	- (0,1)	+ (35)
8	- (0,55)	- (0,1)	- (25)
Ponto central			
9	0 (0,60)	0 (0,2)	0 (30)
10	0 (0,60)	0 (0,2)	0 (30)
11	0 (0,60)	0 (0,2)	0 (30)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização das condições cromatográficas

Para a otimização das condições cromatográficas de separação das substâncias de interesse foram avaliadas a influência dos seguintes fatores: diferentes fases estacionárias, diferentes fases móveis, alterações no gradiente de eluição, vazão da fase móvel e temperatura da coluna. As otimizações foram feitas com o extrato MCCM obtido conforme o item 4.2 (p. 192) e estão apresentados na Tabela 7 (p. 202).

O desenvolvimento de um método cromatográfico utilizando CLAE no modo reverso é melhor iniciado quando se emprega uma eluição gradiente exploratória, em condições de ampla faixa de força de fase móvel, para fornecer um cromatograma do tipo *fingerprint* (impressão digital) da amostra em análise (SYNDER & DOLAN, 1996). O desenvolvimento do método foi iniciado utilizando um gradiente exploratório binário composto de uma mistura de água e metanol (MeOH) como solventes, sendo a concentração do modificador orgânico (MeOH) variada de 5% a 100% durante 40 minutos, com vazão de 0,500 mL min⁻¹ (condição 1, Tabela 7). A análise foi acompanhada pelo detector de arranjo de diodos com seleção da faixa de comprimento de onda entre 190-400 nm na região do UV para determinação das absorvâncias das substâncias presentes na amostra (Figura 2, p. 204). Nessa análise foi utilizada como fase estacionária a coluna C₁₈ DIONEX Acclaim[®] (5µm, 120Å, 2.1X 100mm).

Tabela 7 – Condições cromatográficas utilizadas para avaliar o desenvolvimento e otimização da análise do extrato MCCM.

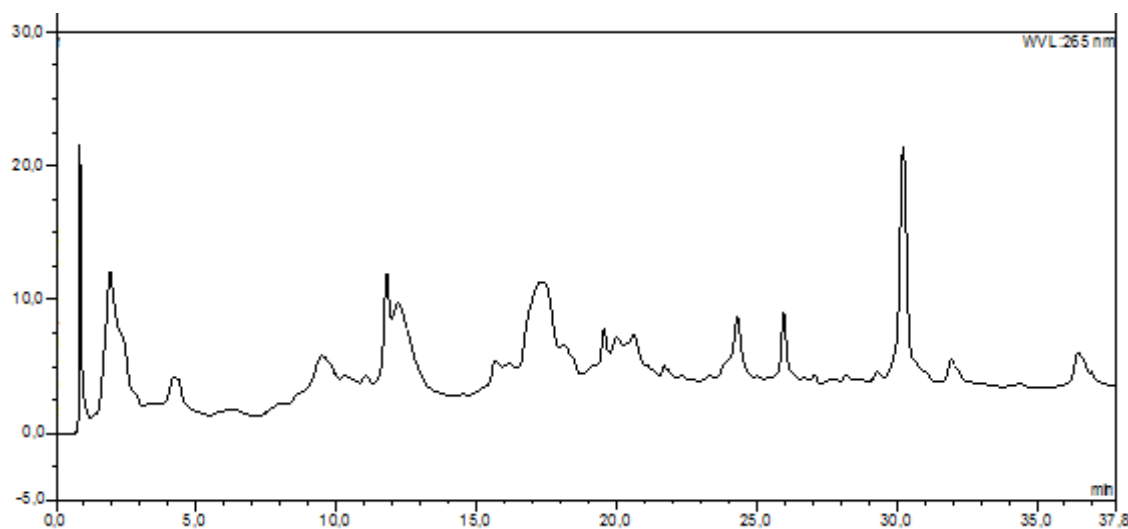
Fase estacionária	Condições Cromatográficas	
C ₁₈ DIONEX Acclaim® (100 X 2.1 mm, 5 µm)	1	5-100% de MeOH (B) em água (A) por 40 min. (0-25 min.: de 5 a 32% de B; 25-40 min.: 32 a 100% de B). vol. inj. 10,0 µL. Vazão = 0,5 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	2	5-100% de MeOH (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 40 min. (0-25 min.: de 5 a 32% de B; 25-40 min.: 32 a 100% de B). vol. inj. 10,0 µL. Vazão = 0,5 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	3	5-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 40 min. (0-25 min.: de 5 a 32% de B; 25-40 min.: 32 a 100% de B). vol. inj. 10,0 µL. Vazão = 0,5 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	4	1-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 40 min. (0-5 min.: 1% de B; 5-35 min.: 1 a 25% de B; 35-40 min.: 25 a 100% de B). vol. inj. 10,0 µL. Vazão = 0,5 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	5	0,2-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 45 min. (0-5 min.: 0,2% de B; 5-8 min.: 0,2 a 10% de B; 8-40 min.: 10 a 25% de B; 40-45 min.: 25 a 100% de B). vol. inj. 10,0 µL. Vazão = 0,5 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	6	0,1-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 45 min. (0-4 min.: 0,1% de B; 4-40 min.: 0,1 a 25% de B; 40-45 min.: 25 a 100% de B). vol. inj. 10 µL. Vazão = 0,5 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	7	0,1-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 45 min. (0-4 min.: 0,1% de B; 4-40 min.: 0,1 a 25% de B; 40-45 min.: 25 a 100% de B). vol. inj. 10,0 µL. Vazão = 0,6 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	8	0,1-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 45 min. (0-4 min.: 0,1% de B; 4-40 min.: 0,1 a 25% de B; 40-45 min.: 25 a 100% de B). vol. inj. 10,0 µL. Vazão = 0,7 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	9	0,1-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 45 min. (0-4 min.: 0,1% de B; 4-40 min.: 0,1 a 25% de B; 40-45 min.: 25 a 100% de B). vol. inj. 10,0 µL. Vazão = 0,8 mL min ⁻¹ . T = 30 °C

Tabela 7 – Condições cromatográficas utilizadas para avaliar o desenvolvimento e otimização da análise do extrato MCCM.

Fase estacionária	Condições Cromatográficas	
BEH C ₁₈ Waters® XBridge™ (100 x 3,0 mm, 2,5 μm)	7	0,1-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 45 min. (0-4 min.: 0,1% de B; 4-40 min.: 0,1 a 25% de B; 40-45 min.: 25 a 100% de B). vol. inj. 10,0 μL. Vazão = 0,6 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	10	0,1-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 45 min. (0-4 min.: 0,1% de B; 4-20 min.: 0,1 a 12% de B; 20-30 min.: 12 a 16% de B; 30-40 min.: 16 a 25% de B; 40-45 min.: 25 a 100% de B). vol. inj. 10,0 μL. Vazão = 0,6 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	11	0,1-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 45 min. (0-4 min.: 0,1% de B; 4-20 min.: 0,1 a 10% de B; 20-30 min.: 10 a 14% de B; 30-40 min.: 14 a 25% de B; 40-45 min.: 25 a 100% de B). vol. inj. 10,0 μL. Vazão = 0,6 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	12	0,1-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 45 min. (0-4 min.: 0,1% de B; 4-6 min.: 0,1 a 4% de B; 6-40 min.: 4 a 14% de B; 40-45 min.: 14 a 75% de B). vol. inj. 10,0 μL. Vazão = 0,6 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	13	0,1-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 55 min. (0-4 min.: 0,1% de B; 4-40 min.: 0,1 a 14% de B; 40-50 min.: 14 a 25% de B; 50-55 min.: 25 a 100% de B). vol. inj. 10,0 μL. Vazão = 0,6 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	14	0,1-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 50 min. (0-4 min.: 0,1% de B; 4-20 min.: 0,1 a 10% de B; 20-40 min.: 10 a 13% de B; 40-45 min.: 13 a 25% de B; 45-50 min.: 25 a 100% de B). vol. inj. 10,0 μL. Vazão = 0,6 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	15	0,1-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 55 min. (0-4 min.: 0,1% de B; 4-20 min.: 0,1 a 10% de B; 20-40 min.: 10 a 11% de B; 40-50 min.: 11 a 25% de B; 50-55 min.: 25 a 100% de B). vol. inj. 10,0 μL. Vazão = 0,6 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	16	0,1-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 55 min. (0-4 min.: 0,1% de B; 4-20 min.: 0,1 a 10% de B; 20-40 min.: 10 a 11% de B; 40-50 min.: 11 a 25% de B; 50-55 min.: 25 a 100% de B). vol. inj. 10,0 μL. Vazão = 0,6 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	17	0,1-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 60 min. (0-4 min.: 0,1% de B; 4-20 min.: 0,1 a 8% de B; 20-40 min.: 8 a 10% de B; 40-55 min.: 10 a 30% de B; 55-59 min.: 30 a 100% de B; 59-60 min.: 100% de B). vol. inj. 10,0 μL. Vazão = 0,6 mL min ⁻¹ . T = 30 °C
	18	0,1-100% de ACN (B) em HCO ₂ H 0,2% (A) por 60 min. (0-4 min.: 0,1% de B; 4-20 min.: 0,1 a 8% de B; 20-40 min.: 8 a 10% de B; 40-55 min.: 10 a 30% de B; 55-59 min.: 30 a 100% de B; 59-60 min.: 100% de B). vol. inj. 10,0 μL. Vazão = 0,6 mL min ⁻¹ . T = 40 °C

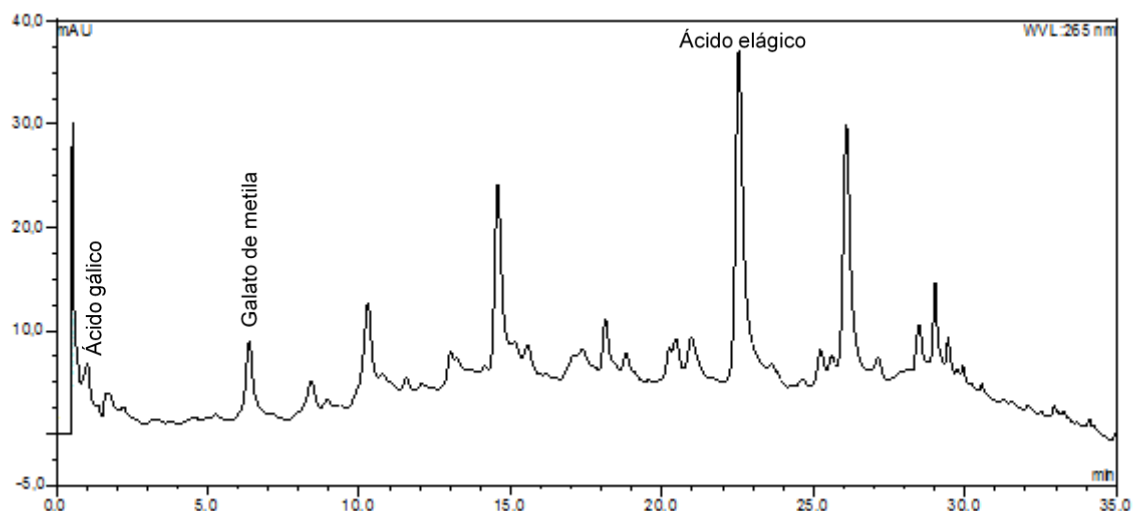
min. = minutos; vol. inj. = volume de injeção; T = temperatura

Figura 2 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do extrato MCCM, referente à condição 1 da Tabela 7



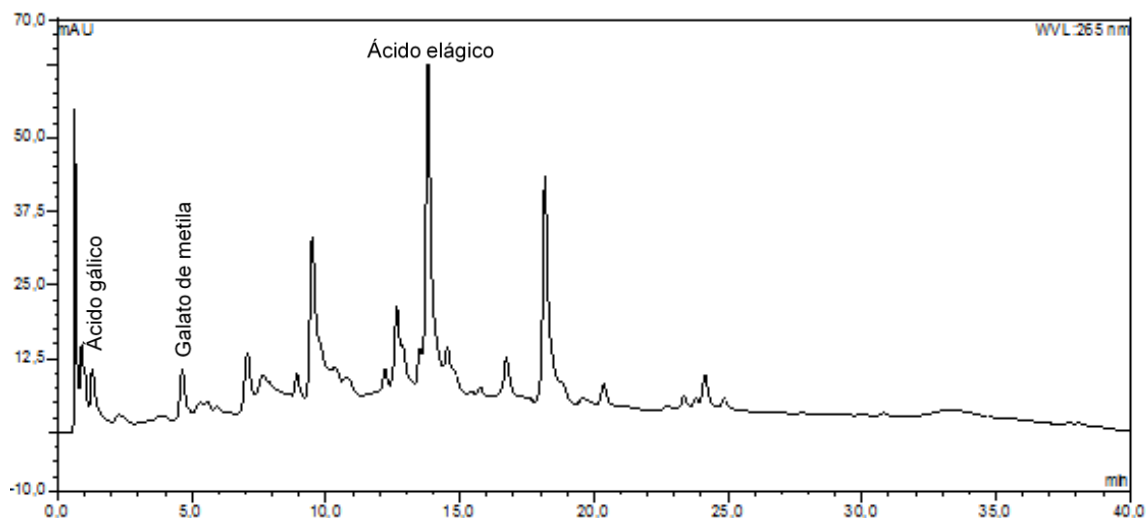
Como pode ser observada na Figura 2, essa condição cromatográfica não apresentou uma boa resolução, pois os picos ficaram arredondados. Foi proposta a utilização de uma solução ácida na composição da fase móvel, uma vez que em extratos vegetais obtidos a partir de solventes polares é comum a presença de flavonoides, substâncias fenólicas diversas e ácidos carboxílicos, que podem estar parcial ou totalmente ionizados em solução aquosa. Nesses casos, a supressão da ionização é uma condição muitas vezes desejável, pois as tornam mais hidrofóbicas, aumentando a sua retenção. Assim, a adição de uma solução ácida à fase móvel favorece a eliminação de “caudas” dos picos cromatográficos devido à interação com os sítios residuais da sílica (BIDLINGMEYER, 1992; GOMES, 2013). Desta forma, as análises cromatográficas posteriores foram feitas usando como fase móvel água acidificada (0,2% de ácido fórmico (v/v)), visando obter melhor retenção e resolução das substâncias presentes no extrato. Na Figura 3 é mostrado o cromatograma obtido ao utilizar-se MeOH:água acidificada com 0,2% de ácido fórmico (v/v), sendo a concentração do MeOH variada de 5% a 100% durante 40 minutos, com vazão de $0,500 \text{ mL min}^{-1}$ (condição 2, Tabela 7).

Figura 3 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do extrato MCCM, referente à condição 2 da Tabela 7



Apesar da melhora na resolução do cromatograma obtido, este não apresentou uma resolução adequada dos picos de interesse. Visando a solução deste problema, foi proposta a mudança do MeOH pela acetonitrila (ACN) (cromatograma mostrado na Figura 4), uma vez que a ACN gera picos mais estreitos e com melhor separação, com um número maior de pratos teóricos devido à sua baixa viscosidade (0,37), quando comparada ao metanol (0,6). Além de permitir a utilização de valores baixos de comprimento de onda no UV para a detecção das substâncias (PEREIRA, et al., 2004).

Figura 4 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do extrato MCCM, referente à condição 3 da Tabela 7



Essa condição cromatográfica também não apresentou uma resolução aceitável dos picos referentes às substâncias de interesse. Por isso, foram realizadas modificações no gradiente de eluição a partir da condição 3 (Tabela 7). A primeira modificação realizada foi a diminuição da porcentagem inicial da acetonitrila, visando à diminuição da força do eluente o que resulta em uma melhor separação dos picos no início do cromatograma. Também foi alterada a porcentagem de aumento da proporção de ACN por unidade de tempo, obtendo-se uma melhora na resolução entre os picos (Figuras 5 e 6). A partir da condição cinco foi necessário um pequeno aumento no tempo de análise. O fluxo foi fixado em $0,500 \text{ mL min}^{-1}$.

Figura 5 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265 \text{ nm}$ do extrato MCCM, referente às condições da Tabela 7. A) condição 4. B) condição 5

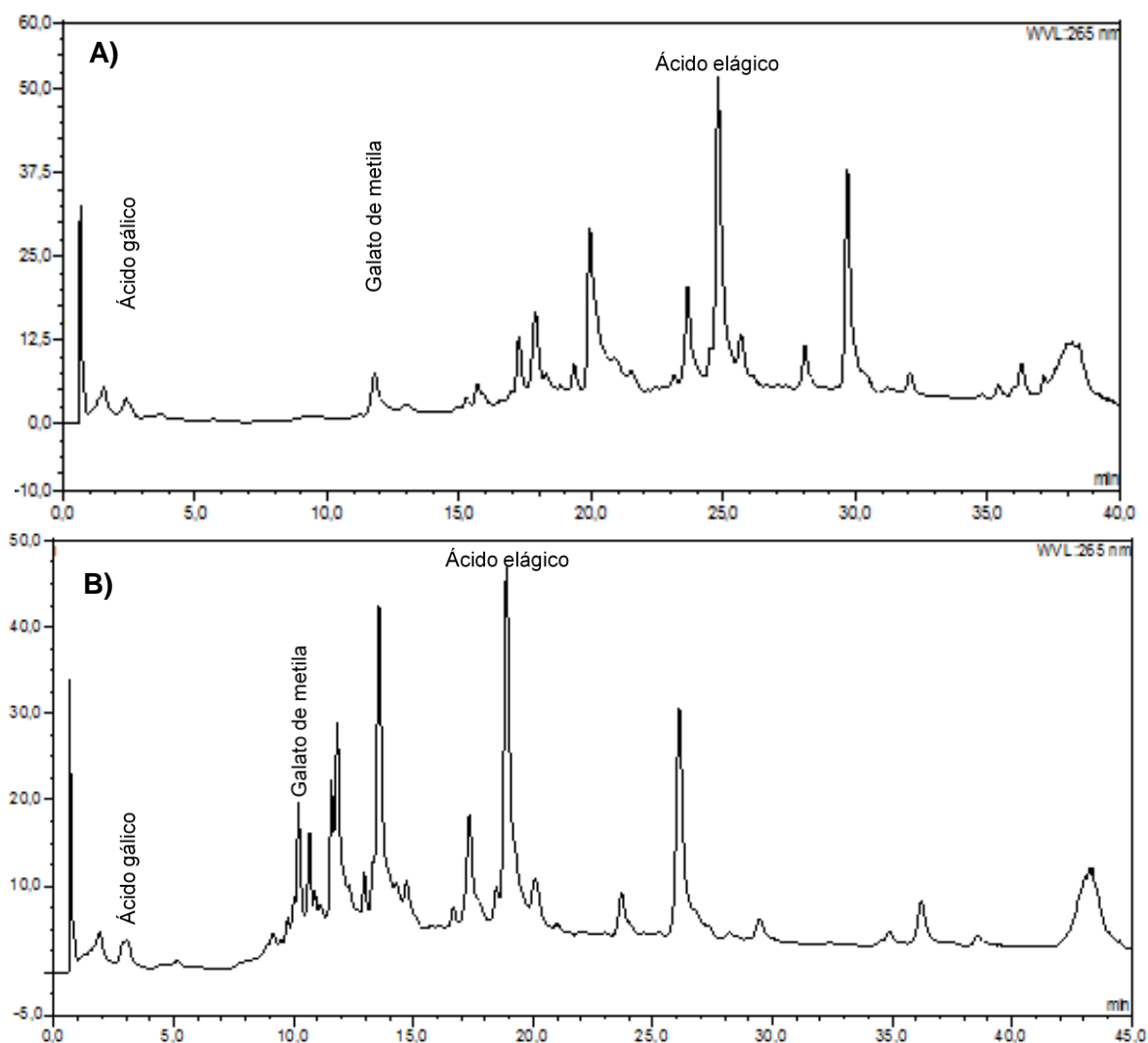
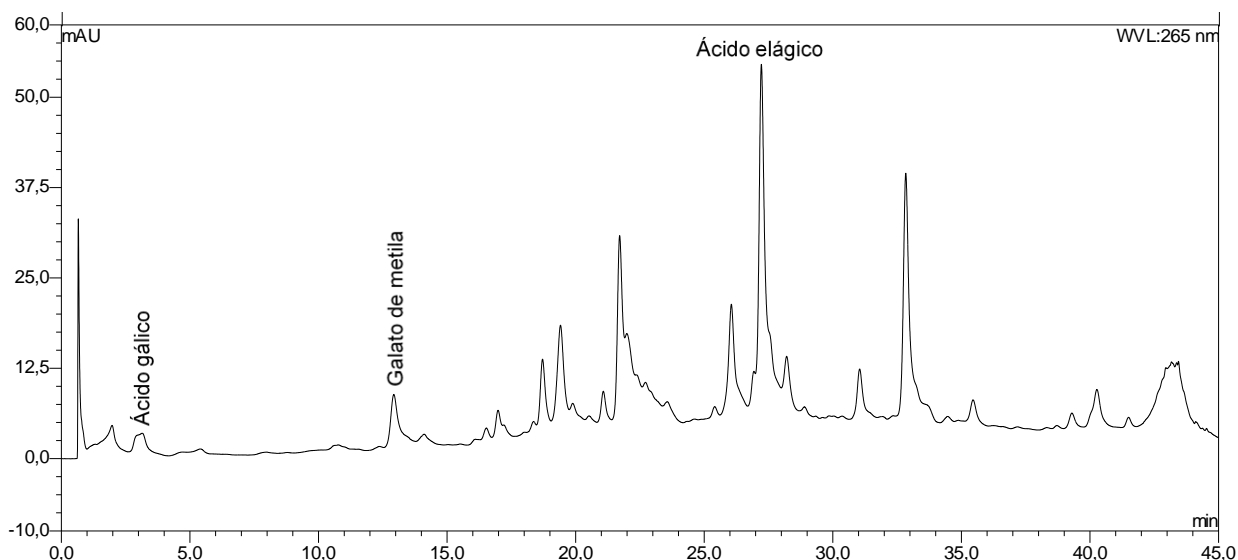


Figura 6 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do extrato MCCM, referente à condição 6 da Tabela 7



O próximo passo da otimização foi a modificação da vazão da fase móvel, partindo da condição 6 cuja a vazão da fase móvel foi $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, testou-se os fluxos: $0,6$; $0,7$ e $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ (Figuras 7 e 8).

Figura 7 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do extrato MCCM, referente à condição 7 da Tabela 7

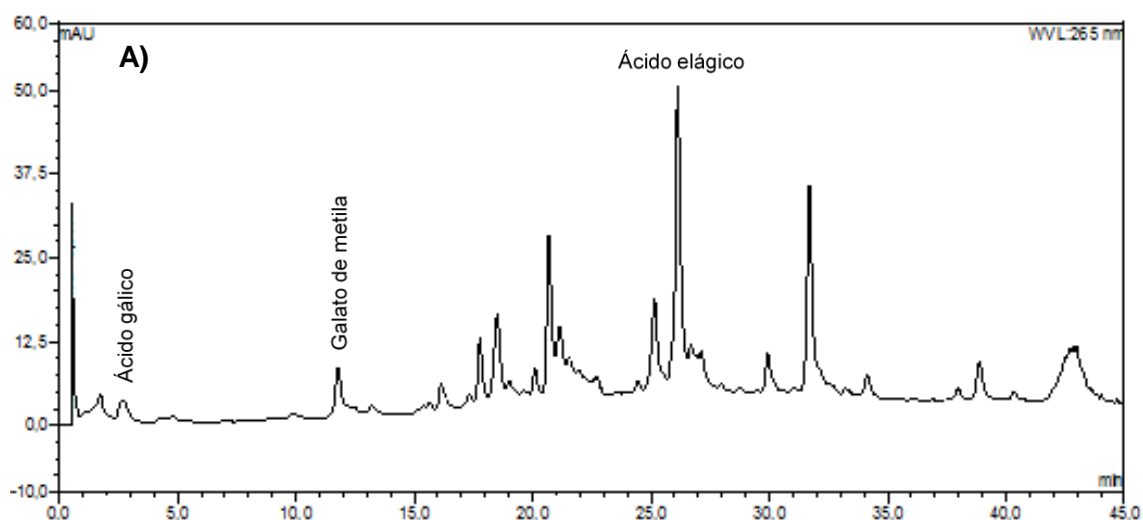
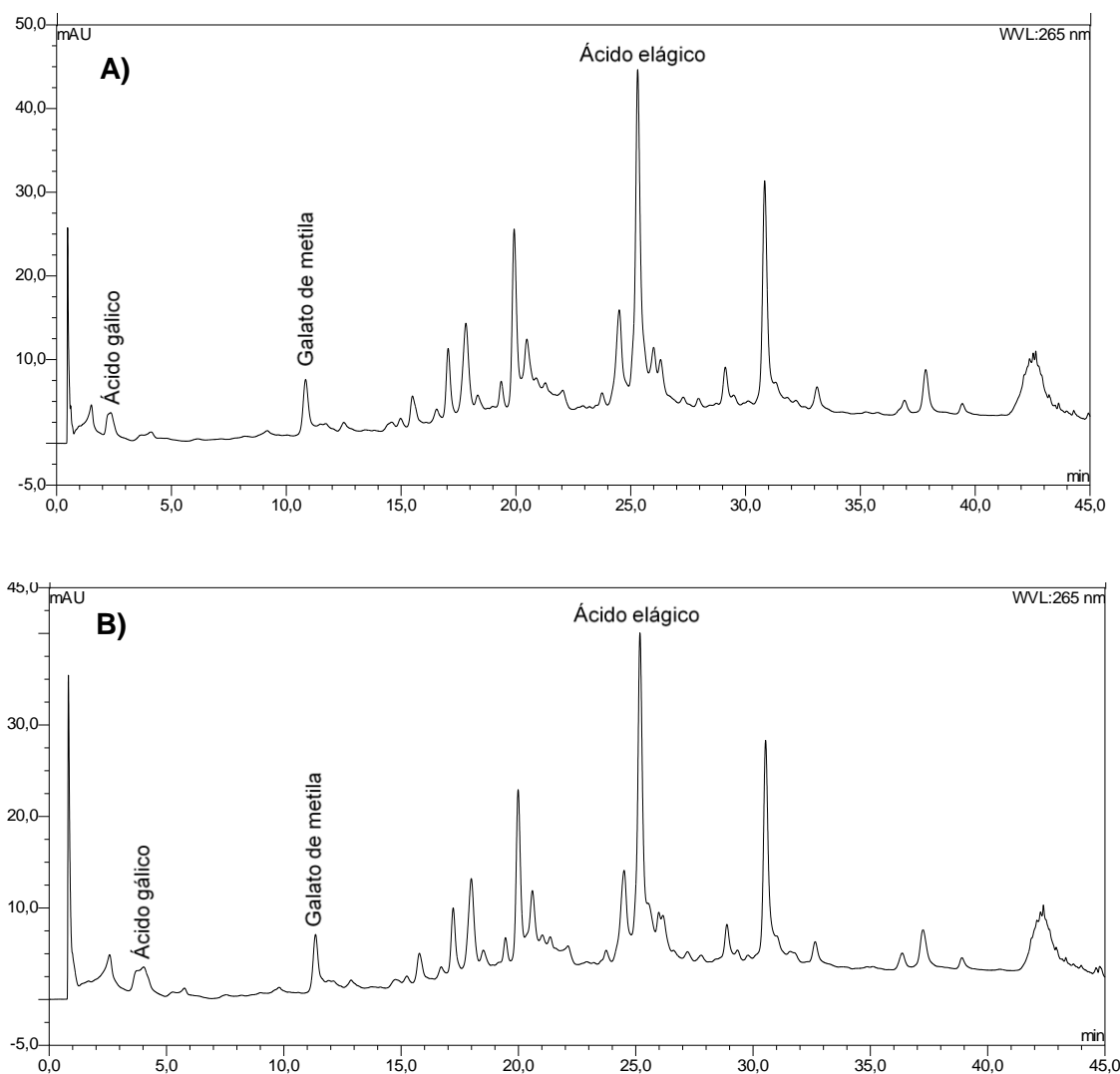


Figura 8 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do extrato MCCM, referente às condições da Tabela 7. A) condição 8. B) condição 9

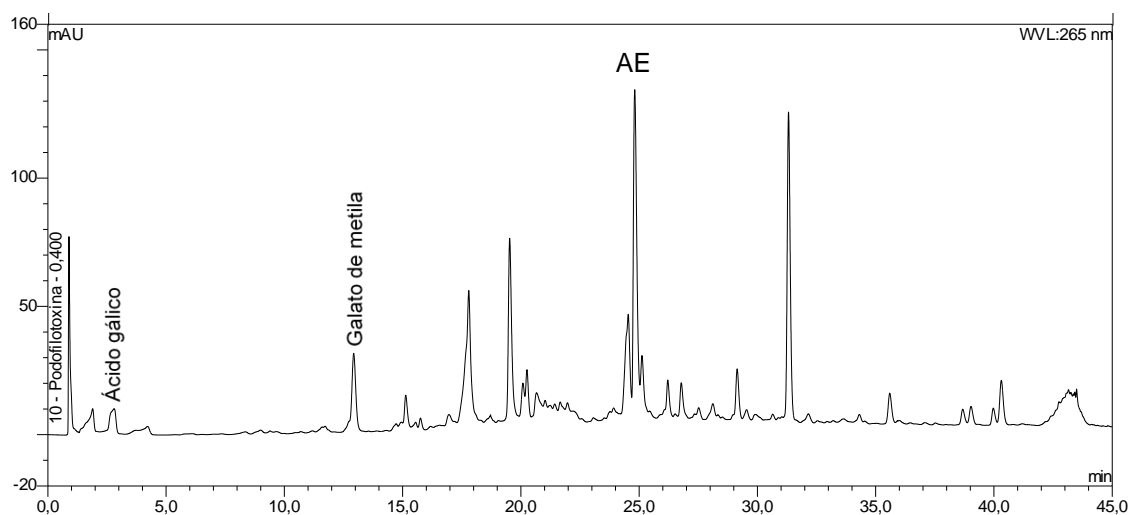


Mesmo com todas essas alterações nas condições cromatográficas, observou-se que a separação dos picos de interesse não ocorreu de forma mais satisfatória utilizando-se a coluna C₁₈ DIONEX Acclaim[®] como fase estacionária.

Com o intuito de melhorar a seletividade, a eficiência e a resolução na análise cromatográfica foram realizadas análises em coluna de fase estacionária com partículas híbridas de segunda geração de 2,5 μm da Waters[®], denominadas XBridge[™] BEH (BEH – *ethylene bridged hybrid*), as quais são produzidas pela reação de bis(trietoxissililetano) e tetraetoxissilano, que possui partícula de sílica com pontes de etano (Si-CH₂-CH₂-Si) inseridas na sua estrutura (polietoxissilano). Essas partículas XBridge[™] fornecem boa simetria de pico devido à quantidade

reduzida de silanóis residuais e, portanto, eficiências mais altas (GOMES, 2013; MALDANER & JARDIM, 2009). Na Figura 9 é possível perceber uma melhora significativa na separação e distribuição das substâncias de interesse no cromatograma, quando foi utilizado esse tipo de fase estacionária e a condição cromatográfica 7.

Figura 9 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm, eluição gradiente do extrato MCCM, referente à condição 7 da Tabela 7, $t_R = 24,9$ minutos para o ácido elágico (AE)



Esta condição apresentou melhores resultados do que os obtidos anteriormente com a coluna C_{18} Dionex Acclaim[®]. Desta forma, diferentes otimizações de condições de separação usando a coluna BEH XBridge[™] (Waters[®]) foram testadas variando os fatores: gradiente de eluição (principalmente), tempo de análise e temperatura da coluna, com o intuito de melhorar a separação das substâncias (as condições utilizadas encontram-se na Tabela 7 e os cromatogramas resultantes de cada condição nas Figuras 10 a 12). Essas variações nas condições de otimização visaram, sobretudo remover impurezas que co-eluíam junto com o ácido elágico ($t_R = 24,9$ min), uma das substâncias de interesse (cromatograma mostrado na Figura 9).

Figura 10 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm, eluição gradiente do extrato MCCM, referente às condições da Tabela 7. A) condição 10. B) condição 11. C) condição 12

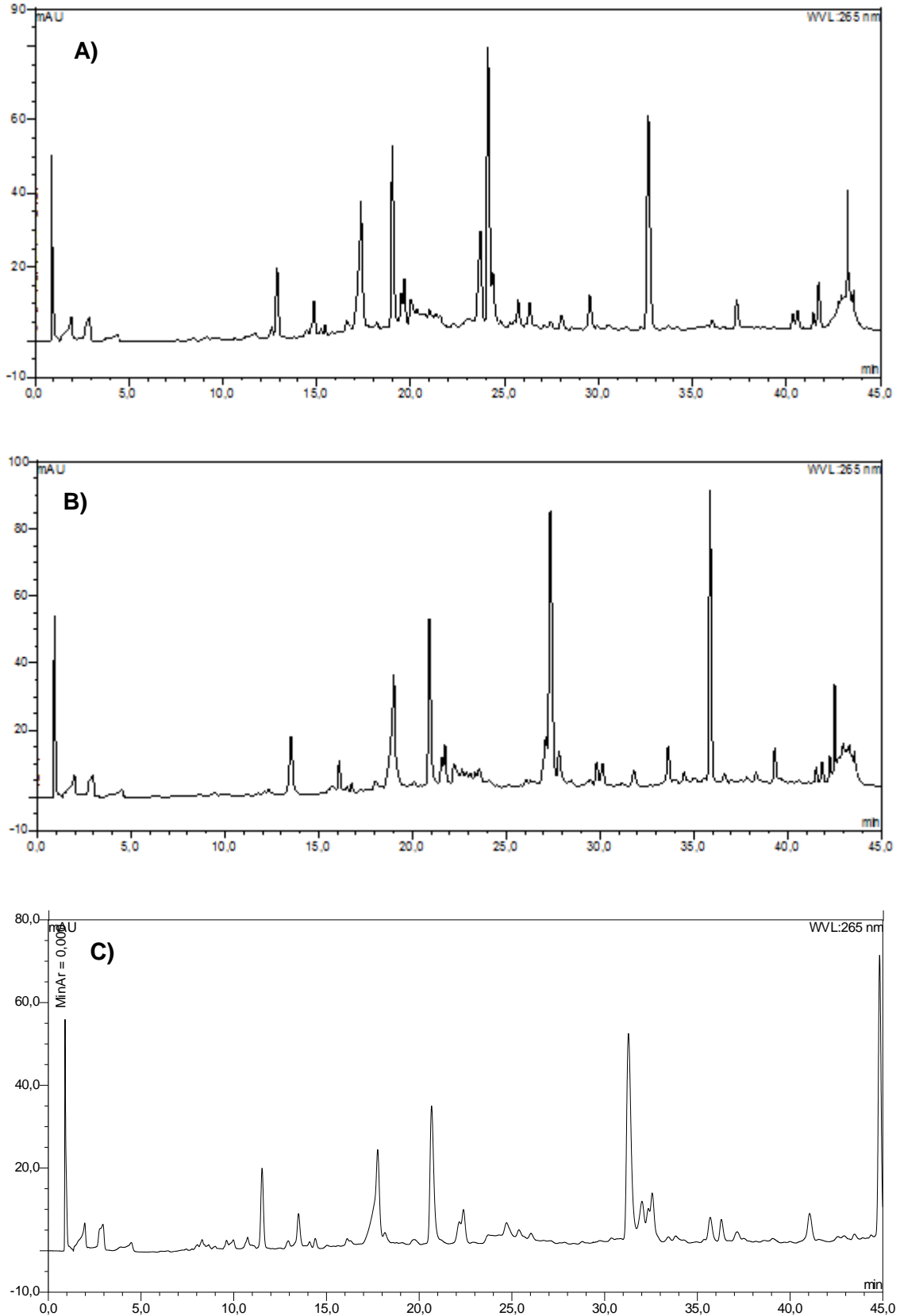


Figura 11 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm, eluição gradiente do extrato MCCM, referente às condições da Tabela 7. A) condição 13. B) condição 14. C) condição 15

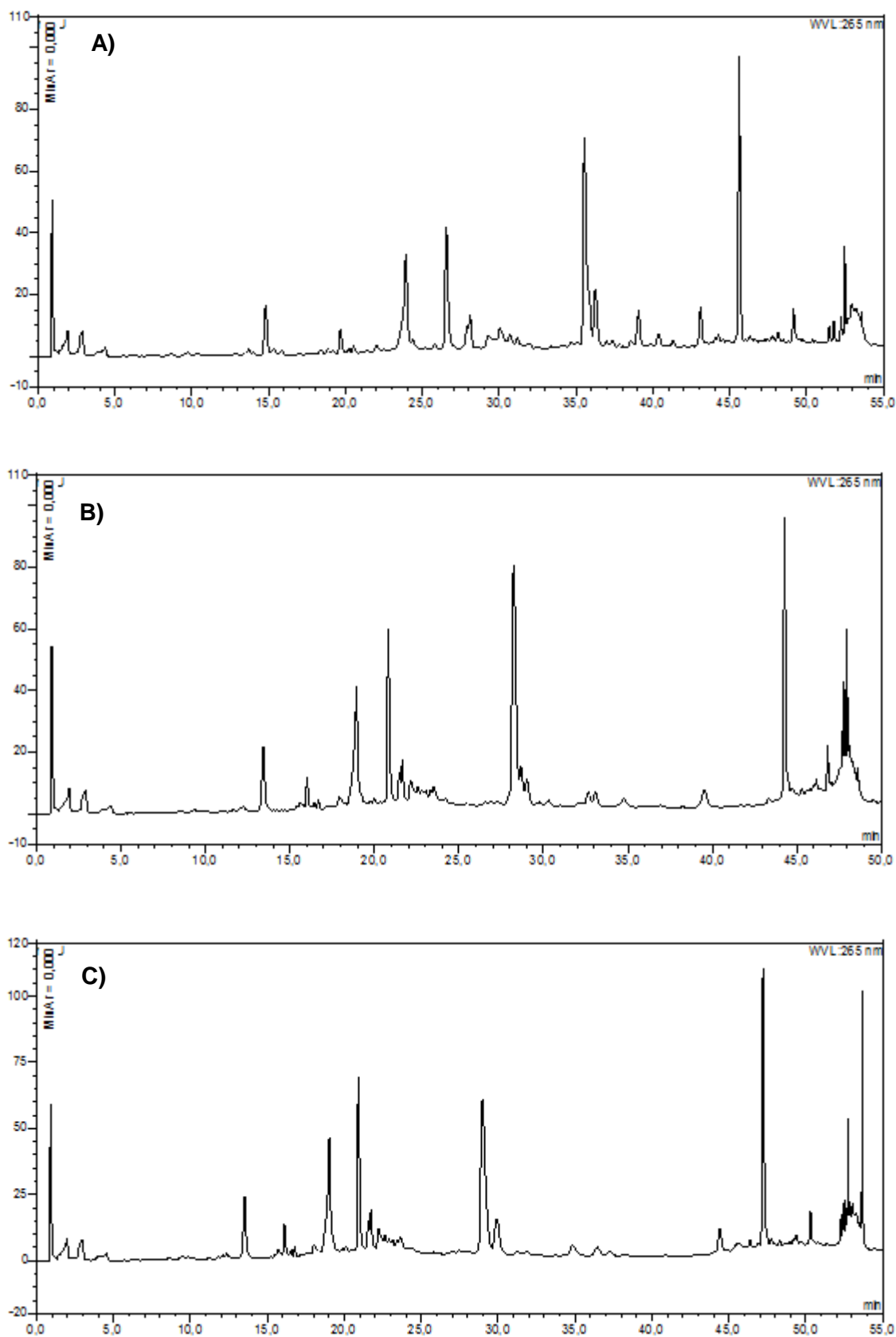
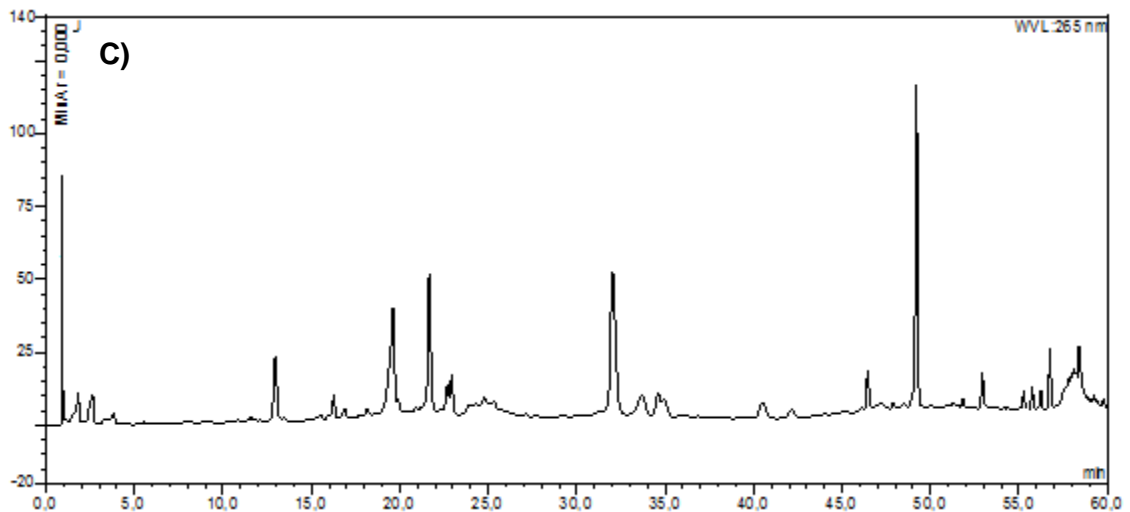
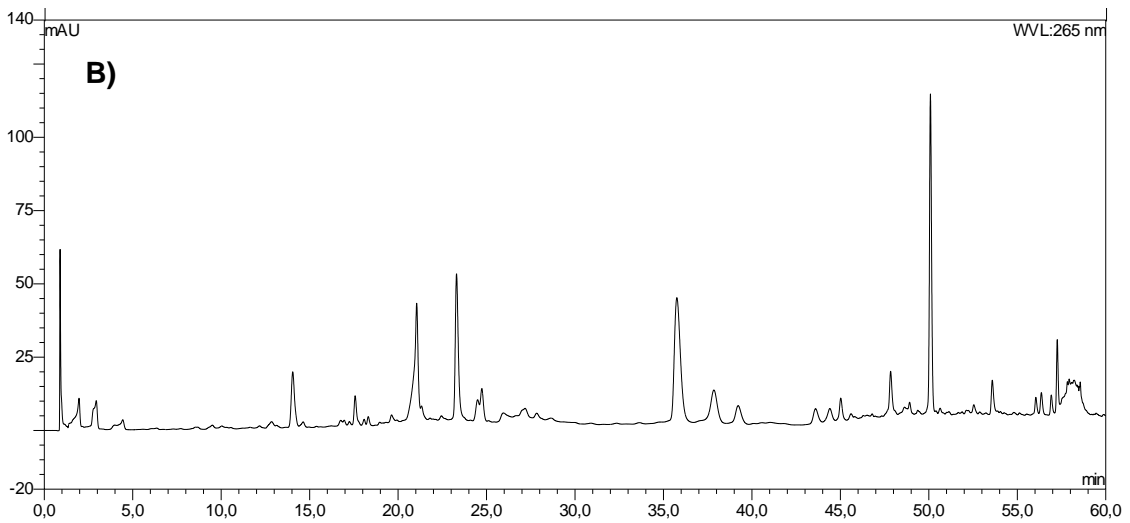
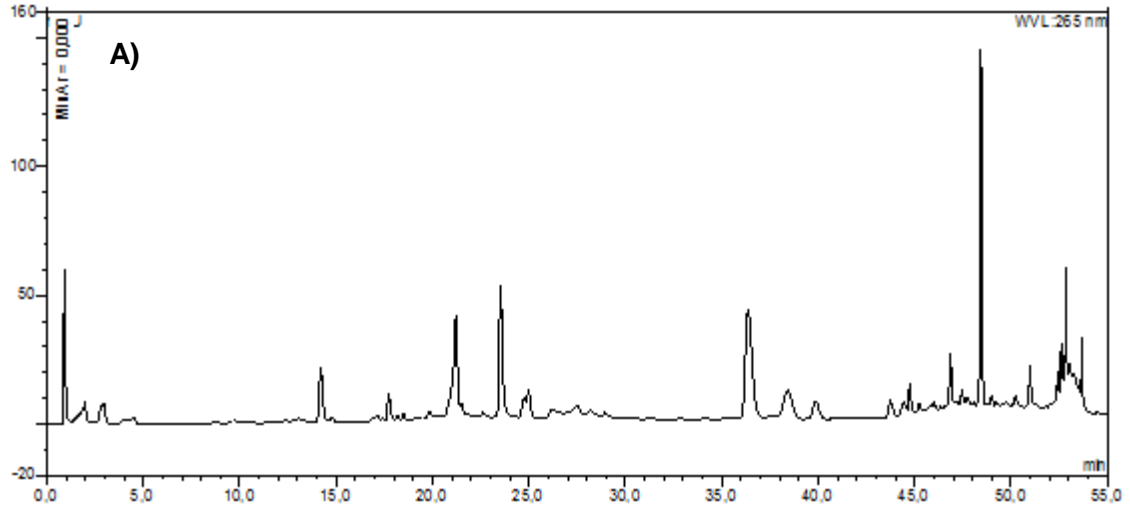


Figura 12 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm, eluição gradiente do extrato MCCM, referente às condições da Tabela 7. A) condição 16. B) condição 17. C) condição 18



Dentre as diversas condições testadas, a condição que apresentou o melhor perfil cromatográfico para análise do extrato MCCM foi coluna BEH C₁₈ XBridge™ (Waters®), como fase estacionária, utilizando vazão de 0,6 mL min⁻¹, volume de injeção 10 µL, temperatura do forno da coluna em 30 °C e gradiente de eluição no modo reverso, com fase móvel constituída de ACN (**B**) e água acidificada com ácido fórmico 0,2% (v/v) (**A**): 0 a 4 minutos: 0,1% de B em A; 4 a 20 minutos: 0,1 a 8% de B em A; 20 a 40 minutos: 8 a 10% de B em A; 40 a 55 minutos: 10 a 30% de B em A; 55 a 59 minutos: 30 a 100% de B em A; 59 a 60 minutos: 100% de B (condição 17). A coluna foi condicionada com 0,1% de B em A por cinco minutos entre cada análise.

A escolha do melhor comprimento de onda para a análise das substâncias de interesse foi realizada através do monitoramento da faixa de comprimento de onda de 190 a 400 nm, por meio do sistema de detecção por arranjo de diodos. Assim foi possível determinar o espectro de absorção no UV de cada pico. O comprimento de onda selecionado para as análises foi de 265 nm, no qual obteve-se boa sensibilidade para a maioria das substâncias presentes no extrato.

Após as otimizações das condições cromatográficas de análise, os extratos MCCM e MFCM foram analisados para obtenção do perfil cromatográfico, como mostrado nas Figuras 13 e 14.

Figura 13 – Cromatograma CLAE – UV/DAD ($\lambda = 265$ nm) obtido do extrato MCCM. Condição cromatográfica 17. Picos cromatográficos: **1**- ácido gálico (AG), $t_{R1} = 2,94$ min; **2**- galato de metila (GM), $t_{R2} = 14,04$ min; **3**- ácido elágico (AE), $t_{R3} = 35,56$ min e seus espectros no UV obtidos pelo detector DAD nas regiões ascendente, apical e descendente

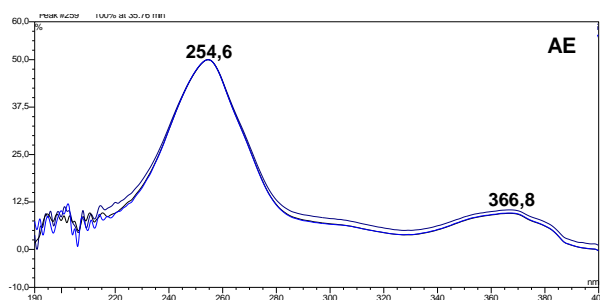
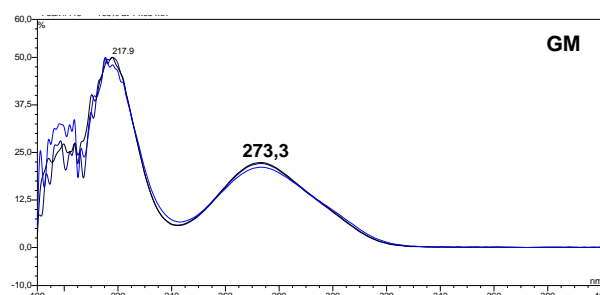
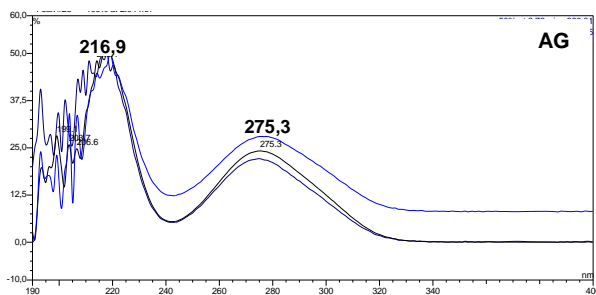
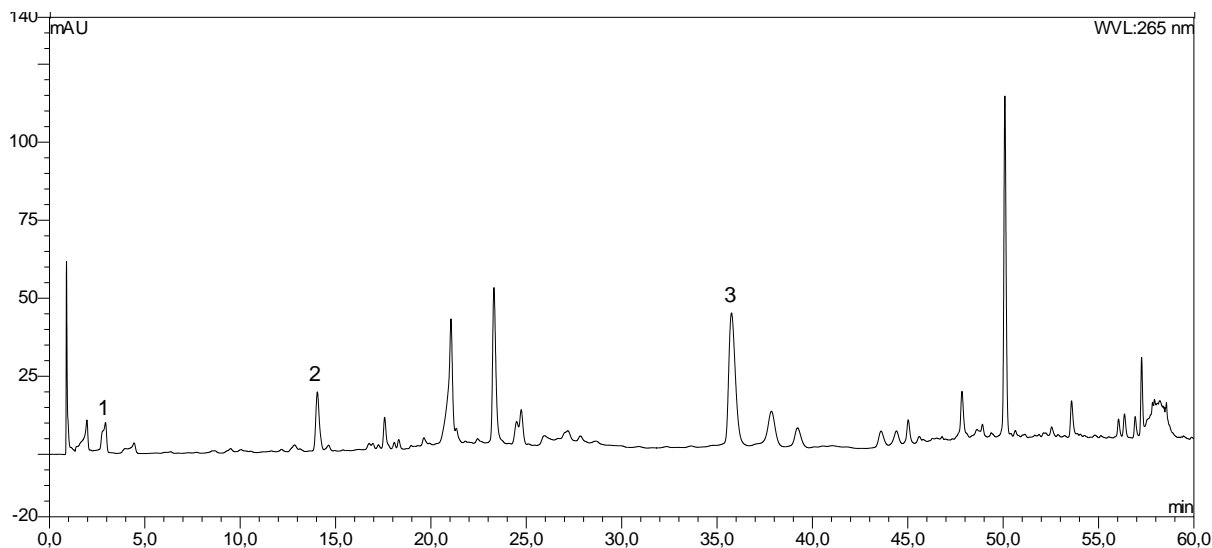
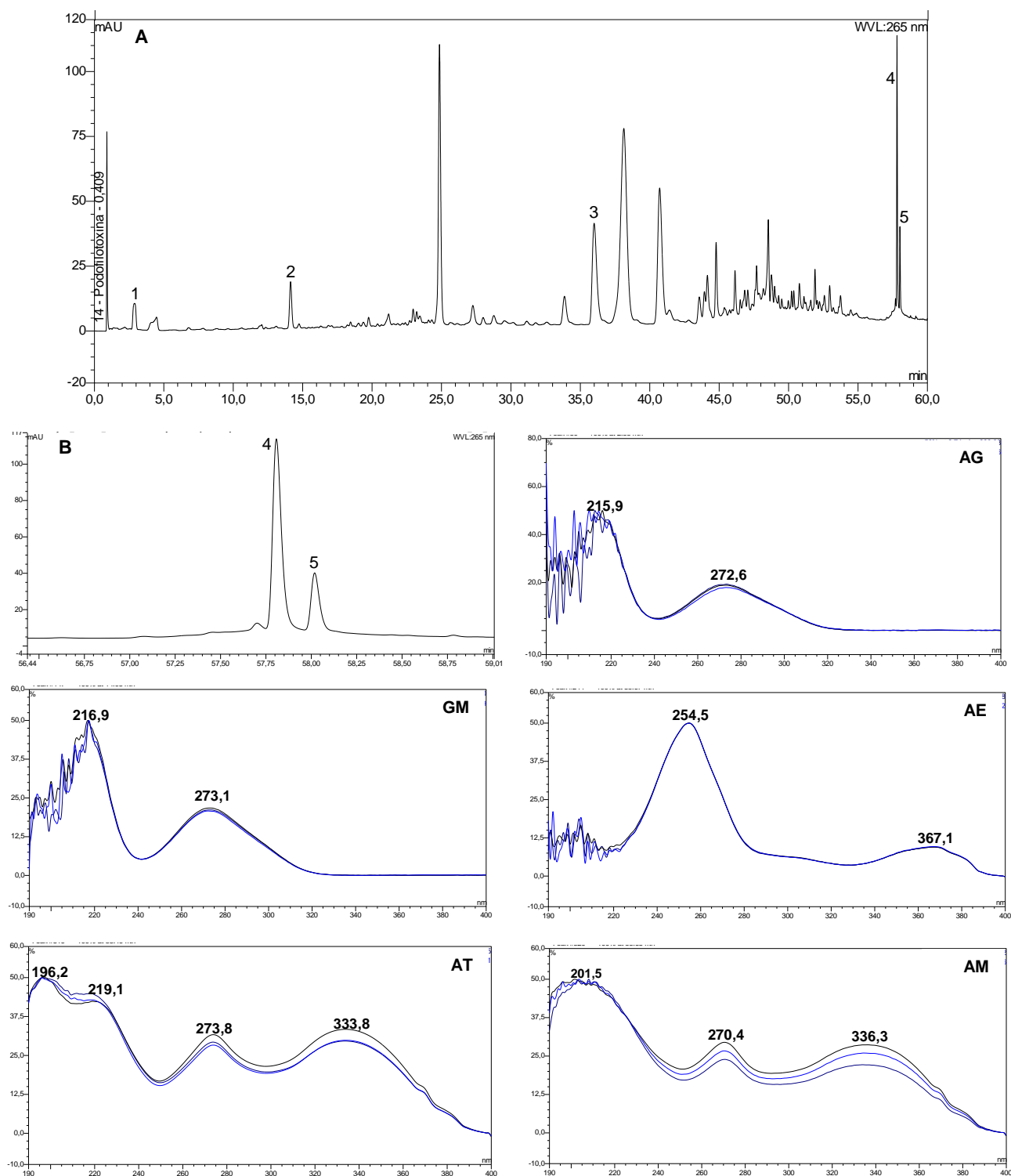


Figura 14 – (A) Cromatograma CLAE – UV/DAD ($\lambda = 265 \text{ nm}$) obtido do extrato MFCM. Condição cromatográfica 17. **(B)** Ampliação do cromatograma na região de 56 a 59 minutos. Picos cromatográficos: **1**- ácido gálico (AG), $t_{R1} = 2,90 \text{ min}$; **2**- galato de metila (GM), $t_{R2} = 14,03 \text{ min}$; **3**- ácido elágico (AE), $t_{R3} = 35,57 \text{ min}$; **4**- agathisflavona (AT), $t_{R4} = 58,49 \text{ min}$; **5**- amentoflavona (AM), $t_{R5} = 58,63 \text{ min}$ e seus espectros no UV obtidos pelo detector DAD nas regiões ascendente, apical e descendente

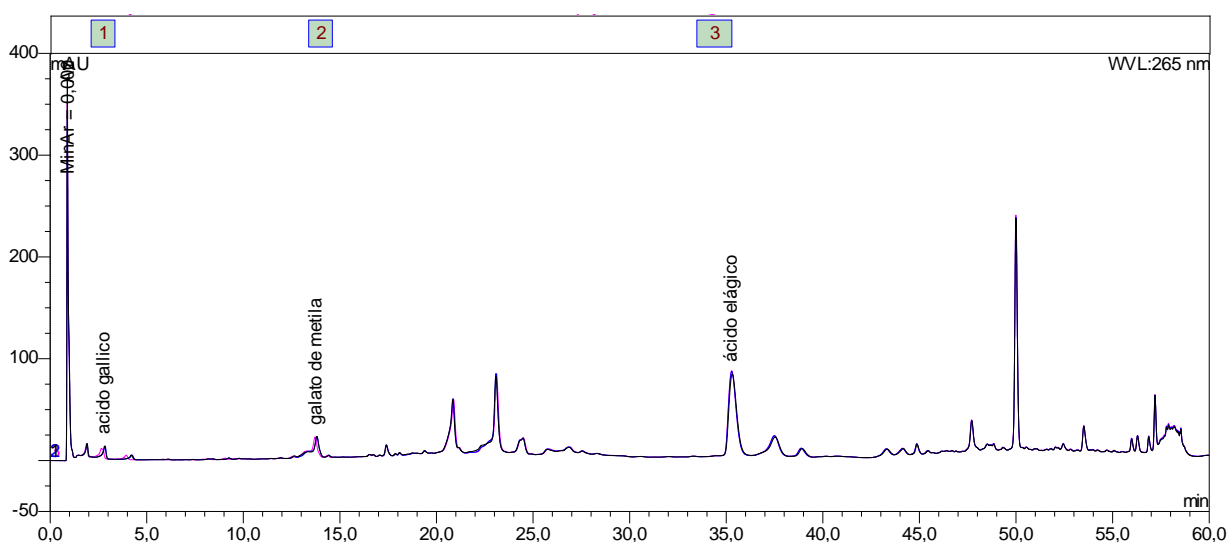


5.2. Avaliação dos parâmetros de desempenho do método analítico: repetibilidade e precisão de injeção

Uma vez que os perfis cromatográficos são métodos qualitativos, para que seja possível validar tais métodos, alguns parâmetros precisam ser avaliados, como por exemplo, a repetibilidade e a precisão de injeção (FAN, 2006; GOMES, 2013).

Desta forma, foram preparadas em triplicata ($n=3$), soluções de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ do extrato MCCM obtido conforme procedimento experimental no item 4.2. Essas amostras foram analisadas no sistema CLAE-UV-DAD e podem ser visualizadas na Figura 15.

Figura 15 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) sobrepostos em $\lambda = 265 \text{ nm}$ de três soluções ($2,0 \text{ mg mL}^{-1}$) do extrato MCCM



Com as análises obtidas a partir das triplicatas avaliou-se a repetibilidade, baseado nos valores de tempo de retenção (t_R) e área dos picos do ácido gálico (AG), galato de metila (GM) e ácido elágico (AE). Além disso, uma das amostras foi analisada em replicata ($n=10$), para que fosse avaliada a precisão da injeção, a qual foi medida pelas injeções repetitivas, sequenciais da mesma amostra.

Neste estudo foi estabelecido como critério de aceitação da repetibilidade um coeficiente de variação (CV) menor ou igual a 15%, que está de acordo com o que

preconiza o Guia da Anvisa, para quantificação em métodos bioanalítico (BRASIL, 2003).

Pelos resultados obtidos, apresentados na Tabela 8, os valores encontrados para o coeficientes de variação estão abaixo do limite de 15% para todas as substâncias analisadas, conforme é recomendado. Esses valores representam tanto a variabilidade instrumental quanto a reprodutibilidade do preparo de amostras.

Tabela 8 – Valores da média \pm desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos tempos de retenção (t_R) e das áreas dos picos cromatográficos de interesse mostrado na Figura 15, onde foi analisada amostras do extrato MCCM (repetibilidade).

Pico cromatográfico		Média (n=3) \pm DP	CV (%)
AG	t_R	2,834 \pm 0,010	0,37
	área	3,724 \pm 0,089	2,38
GM	t_R	13,763 \pm 0,025	0,18
	área	9,015 \pm 0,036	0,40
AE	t_R	34,920 \pm 0,142	0,41
	área	44,785 \pm 0,046	0,10

Nas análises de precisão de injeção (n=10), foram avaliados os três picos cromatográficos de interesse (Figura 16), do extrato MCCM. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

A análise dos resultados da repetibilidade e precisão de injeção demonstraram que o preparo das amostras apresentam boa reprodutibilidade e que o método qualitativo de análise oferece boa precisão e desempenho analítico satisfatório.

Figura 16 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) sobrepostos em $\lambda = 265$ nm de injeções repetitivas (n=10) de uma solução do extrato MCCM ($2,0 \text{ mg mL}^{-1}$)

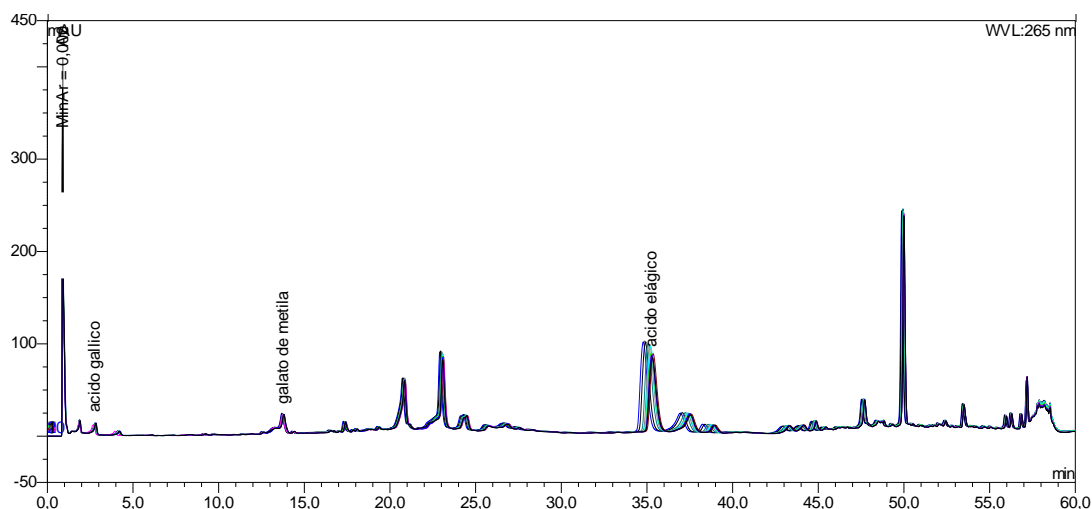


Tabela 9 – Valores da média \pm desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos tempos de retenção (t_R) e das áreas dos picos cromatográficos de interesse mostrado na Figura 16, onde foi analisada a precisão de injeção.

Pico cromatográfico		Média (n=10) \pm DP	CV (%)
AG	t_R	$2,786 \pm 0,055$	1,96
	área	$3,767 \pm 0,155$	4,11
GM	t_R	$13,749 \pm 0,044$	0,32
	área	$9,039 \pm 0,418$	4,62
AE	t_R	$35,163 \pm 0,188$	0,53
	área	$42,201 \pm 2,556$	6,06

5.3. Validação do método analítico

Segundo a ANVISA a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

O método otimizado para análise por CLAE–UV/DAD dos extratos hidrometanólicos da casca do caule e das folhas de *C. macrophyllum* foi validado segundo os protocolos da ANVISA e do INMETRO (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010), os quais estabelecem os seguintes parâmetros analíticos: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez.

5.3.1 Seletividade

A seletividade da condição cromatográfica estabelecida (item 5.1) foi avaliada para os extratos MCCM e MFCM. Nas Figuras 13 e 14 (páginas 214 e 215, respectivamente) foram apresentadas as sobreposições dos espectros obtidos pelo detector DAD nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos correspondentes ao ácido gálico, galato de metila, ácido elágico, agathisflavona e amentoflavona. Observa-se que os espectros apresentam grande similaridade entre si, indicando a seletividade do método e, portanto, que ele não está sujeito a interferências de componentes presentes na matriz (RIBANI et al., 2004).

Outro método que pode ser utilizado para auxiliar na avaliação da seletividade é a sobreposição dos cromatogramas obtidos para os padrões e para as amostras, comparando-se o tempo de retenção e o espectro no UV de ambos. As Figuras 17 a 21 mostram a sobreposição dos cromatogramas e a comparação espectral dos picos cromatográficos de interesse com os seus padrões.

Através da análise destas figuras foi possível constatar que os tempos de retenção e os espectros no UV dos picos cromatográficos de interesse nas amostras quando comparados aos dos respectivos padrões apresentaram-se coincidentes, confirmando a seletividade do método.

Figura 17 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) sobrepostos em $\lambda = 265$ nm do padrão (ácido gálico - vermelho) e da amostra (azul) e comparação dos espectros no UV

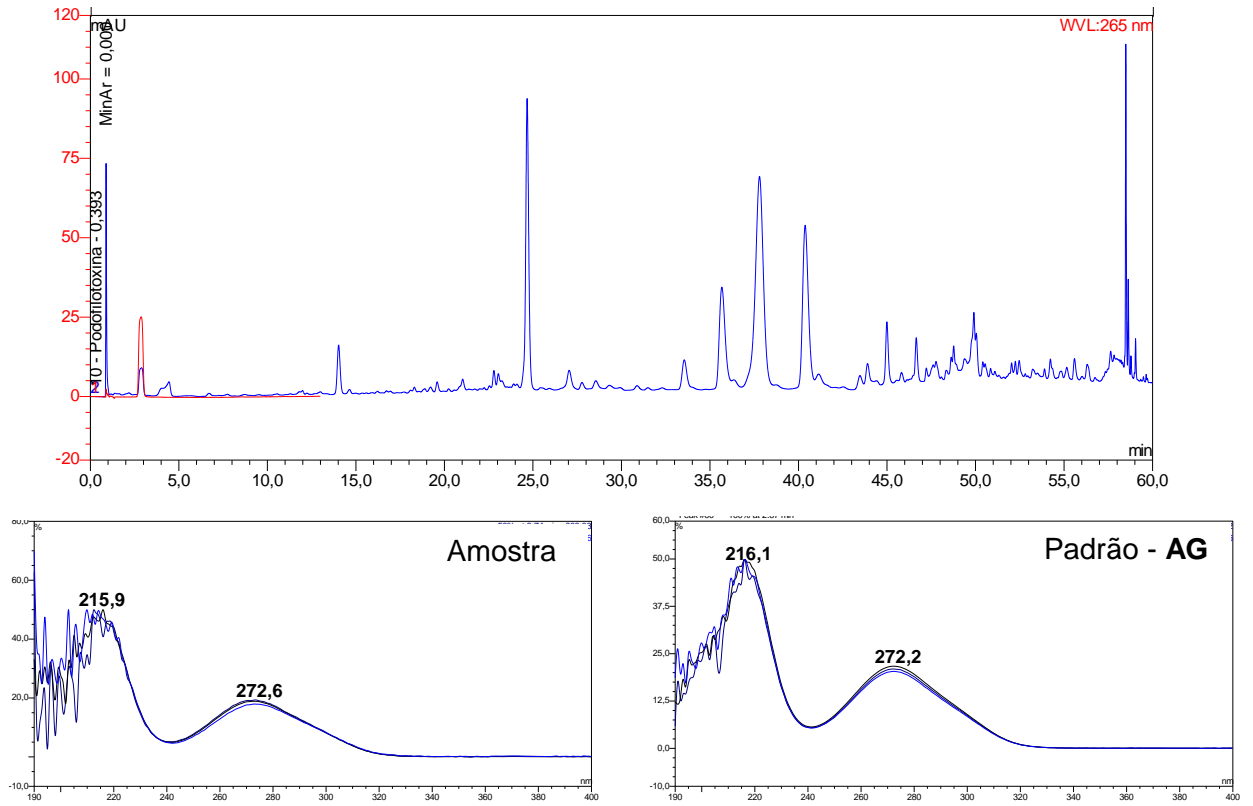


Figura 18 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) sobrepostos em $\lambda = 265$ nm do padrão (galato de metila - azul) e da amostra (preto)

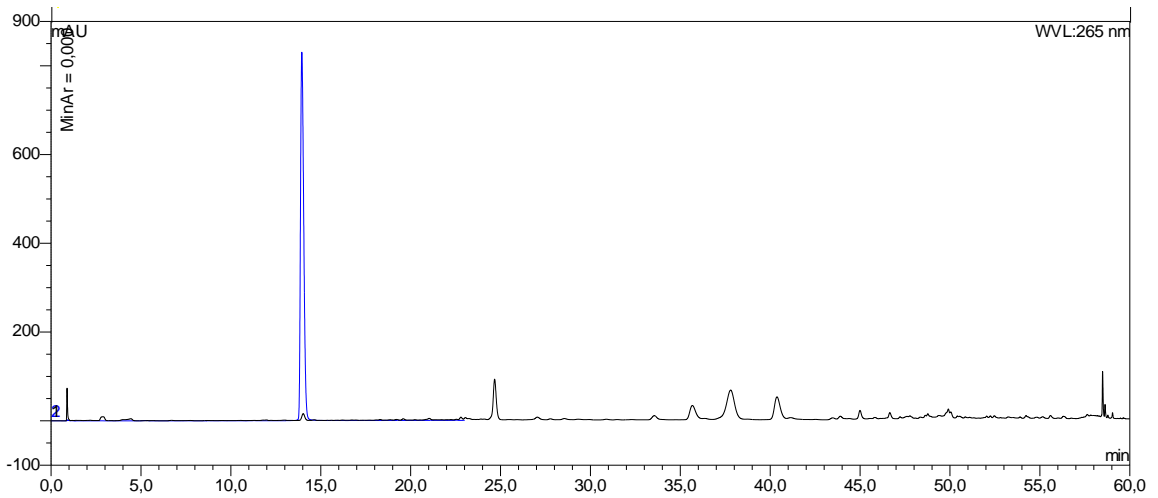


Figura 19 – Comparação dos espectros no UV do padrão (galato de metila) e da amostra do cromatograma anterior (Figura 18)

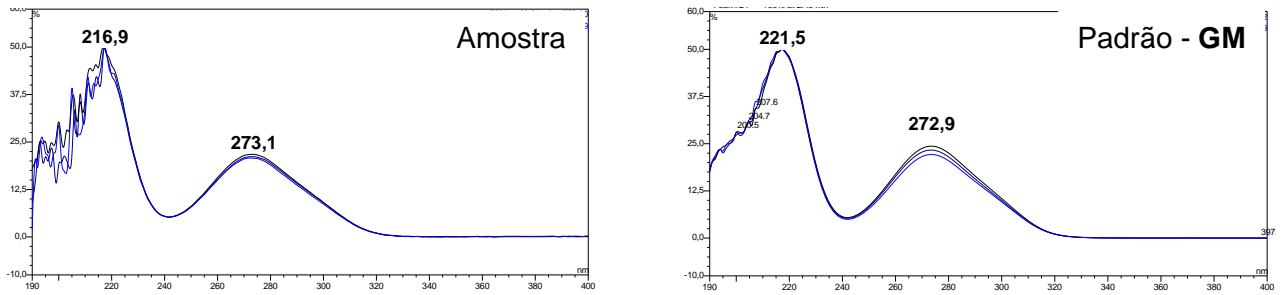


Figura 20 – Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) sobrepostos em $\lambda = 265$ nm do padrão (ácido elágico - preto) e da amostra (azul) e comparação dos espectros no UV

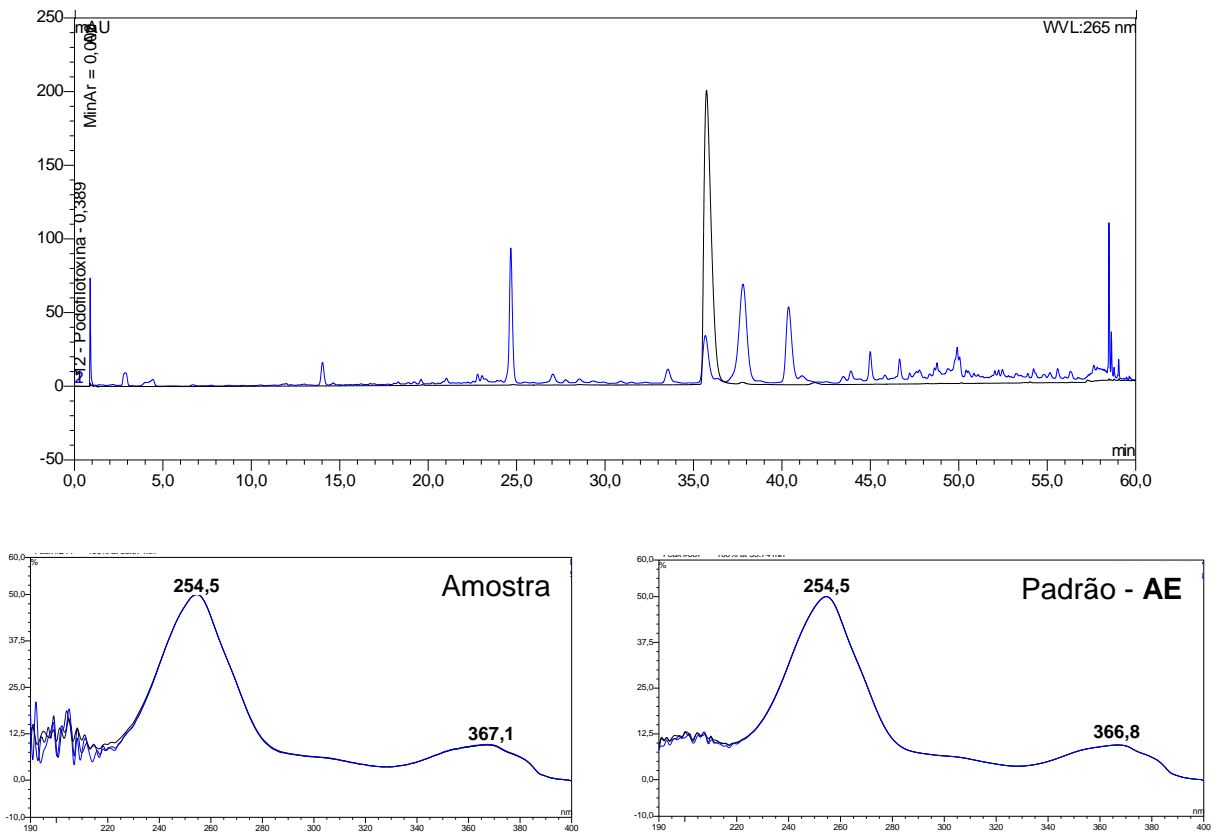
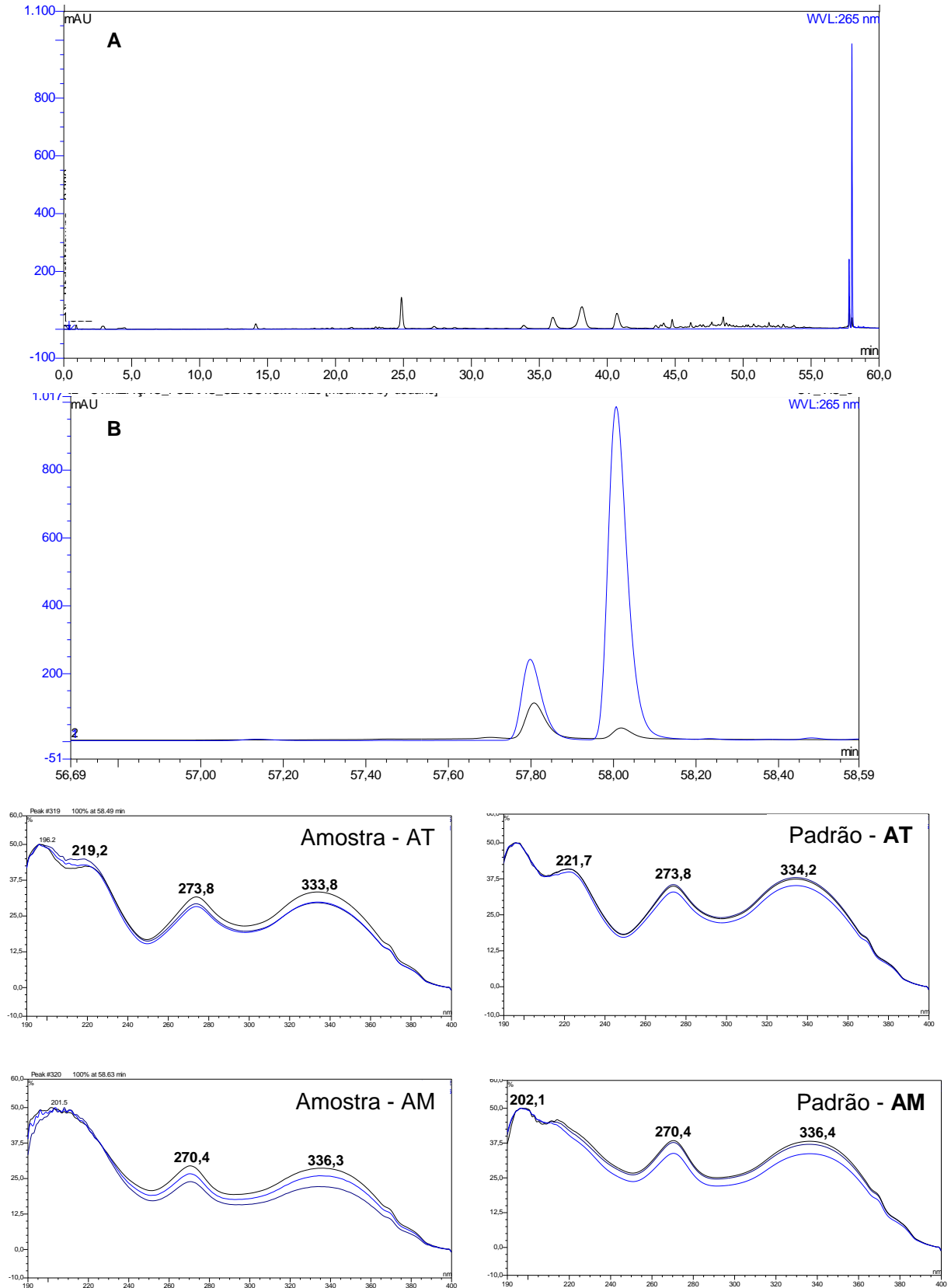


Figura 21 – (A) Cromatogramas (CLAE – UV/DAD) sobrepostos em $\lambda = 265 \text{ nm}$ dos padrões (agathisflavona e amentoflavona - azul) e da amostra (preto). **(B)** Ampliação do cromatograma na região de 56 a 59 minutos e comparação dos espectros no UV



5.3.2 Linearidade

As curvas analíticas foram construídas utilizando a padronização externa, a partir do preparo e análise de cinco concentrações das soluções padrão dos analitos (ácido gálico, galato de metila, ácido elágico, agathisflavona e amentoflavona), em triplicata. O preparo da solução estoque e soluções padrão estão descritos nos itens 4.4.2 e 4.4.2.1. A regressão foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, a partir da relação entre as áreas dos picos cromatográficos e as concentrações das amostras, conforme é mostrado nas Figuras 22 e 23.

Figura 22 – Curvas analíticas e seus parâmetros obtidos por padronização externa utilizando o método proposto para quantificação de **AG**, **GM**, **AE** e **AT** nos extratos MCCM e MFCCM por CLAE – UV/DAD

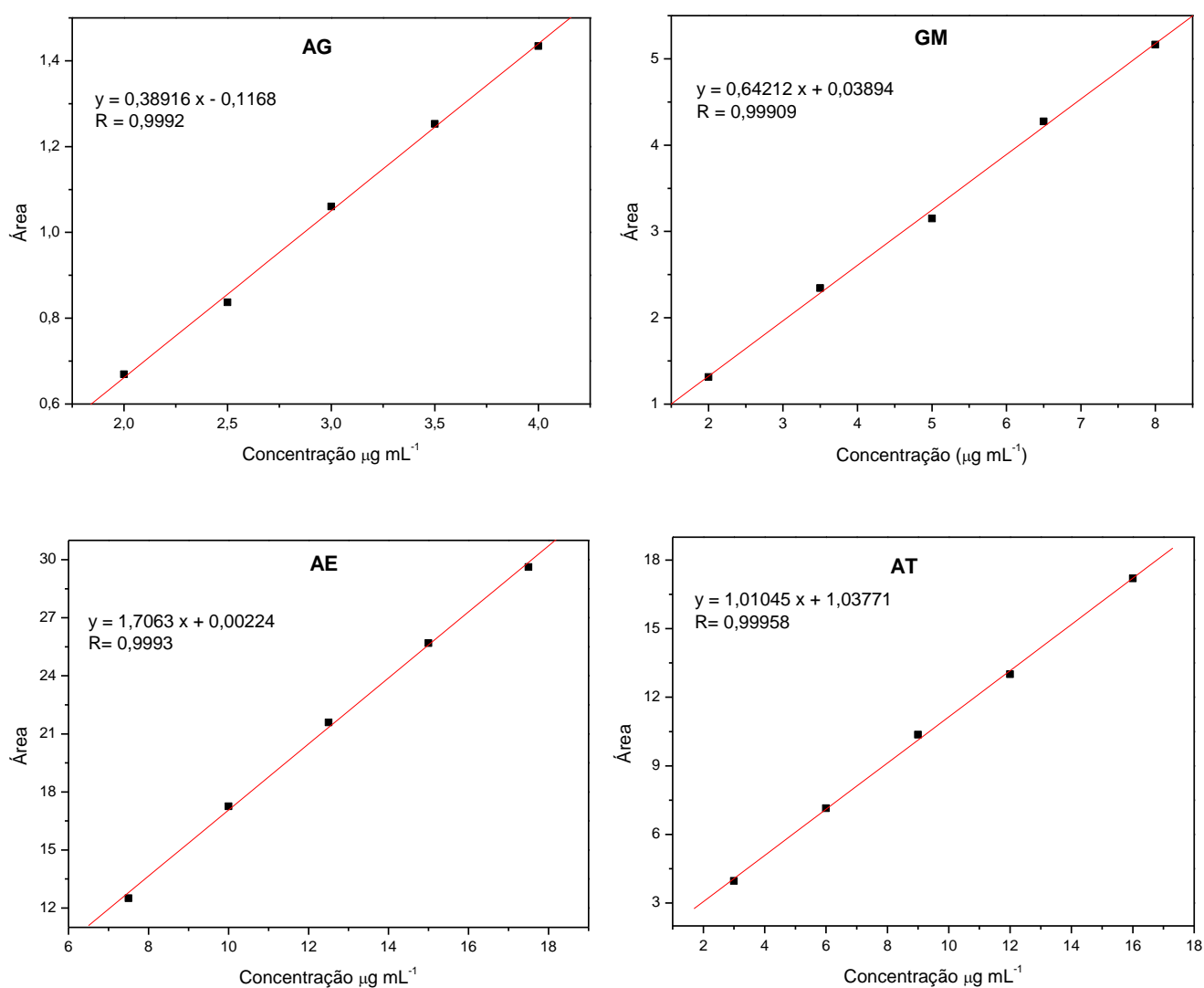
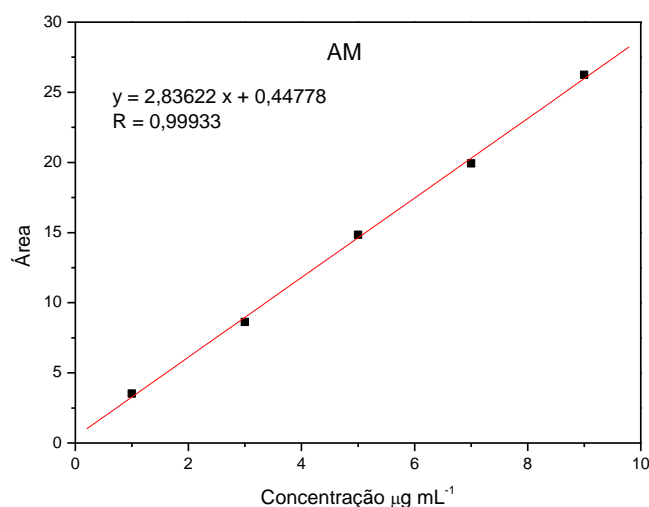


Figura 23 – Curva analítica e seus parâmetros obtidos por padronização externa utilizando o método proposto para quantificação de **AM** nos extratos MCCM e MFCM por CLAE – UV/DAD



Como pode ser observado nas Figuras 22 e 23, os coeficientes de correlação (R) obtidos na padronização externa foram 0,9992, 0,99909, 0,9993, 0,99958 e 0,99933, para ácido gálico, galato de metila, ácido elágico, agathisflavona e amentoflavona, respectivamente. Esses valores demonstram a forte correlação linear entre a concentração das substâncias analisadas e as áreas dos picos cromatográficos, uma vez que um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI et al., 2004). Todos os coeficientes de correlação foram maiores que 0,99, conforme preconizado pela Anvisa (BRASIL, 2003). Desta forma, o método cromatográfico é linear para a quantificação dos analitos na faixa de concentração avaliada.

No entanto, apenas o valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva analítica (RIBEIRO et al., 2008). Assim, a regressão obtida por padronização externa foi avaliada quanto a sua validade, ajuste e eficiência, através dos gráficos de distribuição de resíduos e através de testes estatísticos de análise de variância (ANOVA) (BARROS, SCARMINIO & BRUNS, 2007).

Tão importante quanto fazer os testes F é examinar cuidadosamente os resíduos deixados pelo modelo. O exame dos resíduos é fundamental para a avaliação da qualidade do ajuste de qualquer modelo. A análise do gráfico dos

resíduos permite detectar problemas no ajuste da curva. Num modelo bem ajustado esses resíduos devem apresentar erros com distribuição uniforme, sem apresentar nenhum indício de anormalidade (PIMENTEL, 1996; RIBEIRO et al., 2008).

Através da análise dos gráficos de distribuição dos resíduos (Figuras 24 e 25) percebe-se que a dispersão dos resíduos de todos os analitos segue um padrão aleatório de distribuição, indicando a adequação dos modelos lineares aplicados às respostas obtidas, o que confirma o ajuste linear da curva analítica.

Figura 24 – Gráfico de distribuição dos resíduos das curvas analíticas construídas para o **AG, GM, AE e AT**

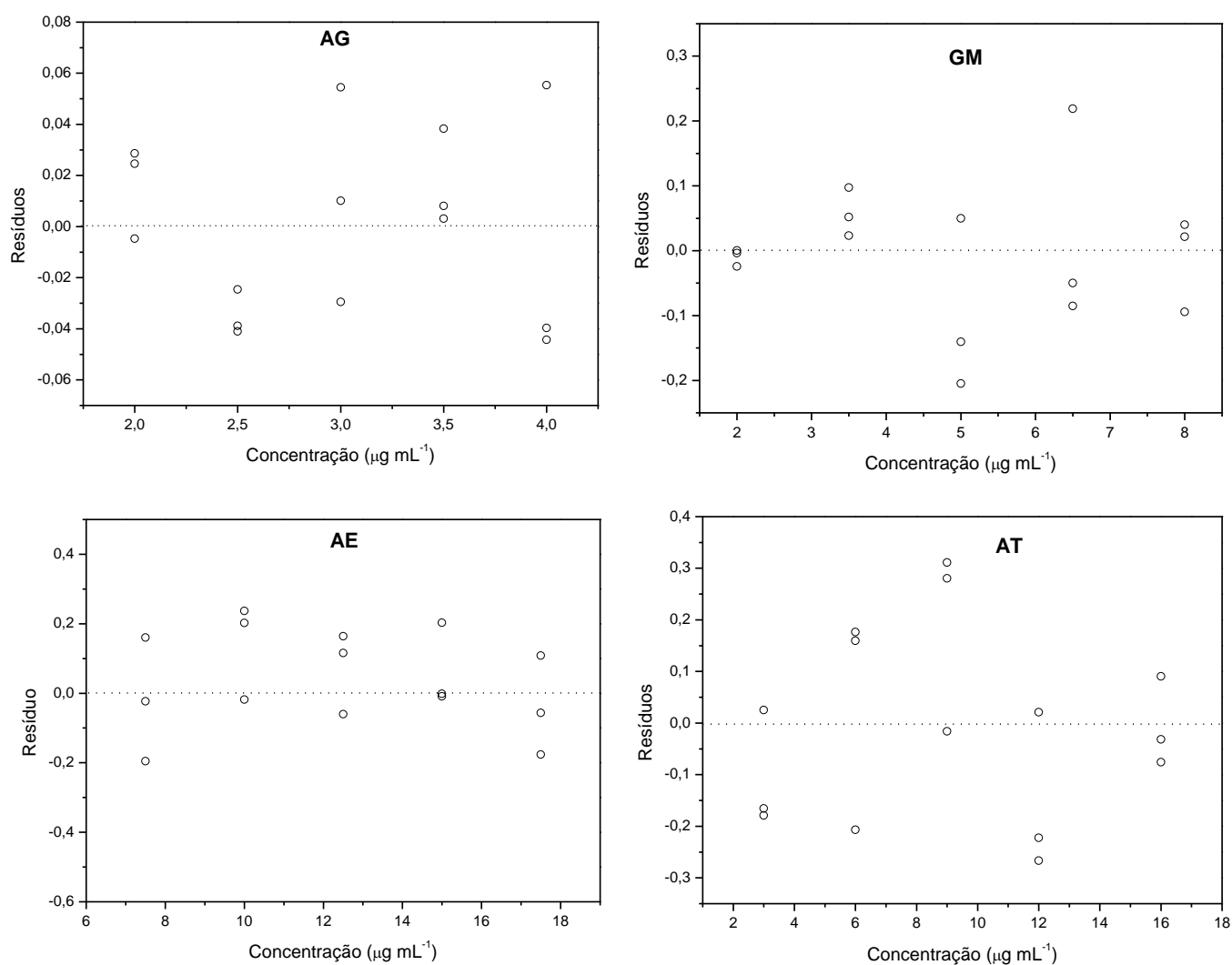
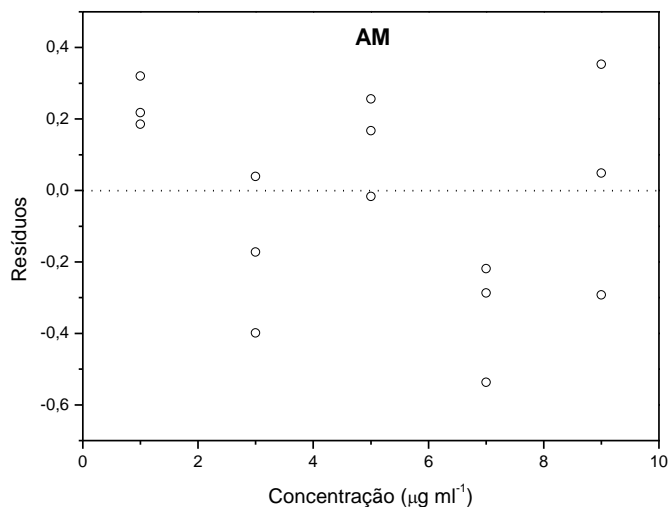


Figura 25 – Gráfico de distribuição dos resíduos da curva analítica construída para a amentoflavona



O método mais usado para se avaliar numericamente a qualidade do ajuste de um modelo é a análise de variância.

As Tabelas 10 a 15 apresentam os resultados da análise de variância das curvas analíticas de ácido gálico, galato de metila, ácido elágico, agathisflavona e amentoflavona para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, do modelo linear proposto para o método de padronização externa. A princípio, será apresentado um modelo de tabela (Tabela 10) com todas as informações e códigos utilizados nesse tipo de análise para melhor entendimento das tabelas posteriores.

Tabela 10 – Modelo de tabela de análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear dos parâmetros.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g.l.	Média quadrática
Regressão	SQ_R	$p - 1$	$MQ_R = SQ_R / p - 1$
Resíduos	SQ_r	$n - p$	$MQ_r = SQ_r / n - p$
Falta de ajuste	SQ_{faj}	$m - p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj} / m - p$
Erro puro	SQ_{ep}	$n - m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / n - m$
Total	SQ_T	$n - 1$	

Tabela 10 – Modelo de uma tabela de análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear nos parâmetros.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g.l.	Média quadrática
% de variação explicada	SQ_R / SQ_T		
% máxima de variação explicável	$(SQ_T - SQ_{ep}) / SQ_T$		

p = número de parâmetros do modelo, n = número total de observações, m = número de níveis distintos da variável independente e g.l. = graus de liberdade.

Tabela 11 – Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear para curva analítica do ácido gálico.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g.l.	Média quadrática
Regressão	1,1724	1	1,1724
Resíduos	0,0173	13	0,0013
Falta de ajuste	0,0059	3	0,0020
Erro puro	0,0114	10	0,0011
Total	1,1897	14	
% de variação explicada	98,54		
% máxima de variação explicável	99,04		

Tabela 12 – Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear para curva analítica do galato de metila.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g.l.	Média quadrática
Regressão	27,8315	1	27,8315
Resíduos	0,1999	13	0,0154
Falta de ajuste	0,0509	3	0,0170
Erro puro	0,1489	10	0,0149
Total	28,0313	14	
% de variação explicada	99,29		
% máxima de variação explicável	99,47		

Tabela 13 – Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear para curva analítica do ácido elágico.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g.l.	Média quadrática
Regressão	545,8970	1	545,8970
Resíduos	1,5025	13	0,1156
Falta de ajuste	0,7612	3	0,2537
Erro puro	0,7413	10	0,0741
Total	547,3994	14	
% de variação explicada	99,73		
% máxima de variação explicável	99,86		

Tabela 14 – Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear para curva analítica da agathisflavona.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g.l.	Média quadrática
Regressão	314,8798	1	314,8798
Resíduos	0,5371	13	0,0413
Falta de ajuste	0,2648	3	0,0883
Erro puro	0,2723	10	0,0272
Total	315,4169	14	
% de variação explicada	99,83		
% máxima de variação explicável	99,91		

Tabela 15 – Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear para curva analítica da amentoflavona.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g.l.	Média quadrática
Regressão	965,3045	1	965,3045
Resíduos	2,6485	13	0,2037
Falta de ajuste	1,2937	3	0,4312
Erro puro	1,3549	10	0,1355
Total	967,9531	14	
% de variação explicada	99,73		

% máxima de variação explicável 99,86

Uma maneira de verificar a validade da regressão é através da comparação entre os valores de $F_{\text{calculado}}$ ($F = MQ_R/MQ_r$) e F_{tabelado} . Se for verificado que MQ_R/MQ_r é maior que o F_{tabelado} tem-se, então, evidência estatística suficiente para acreditar na existência de uma relação linear entre as variáveis y e x . E quanto maior o valor de MQ_R/MQ_r , melhor. Uma regra prática empregada é considerar a regressão como útil para fins de previsão se o valor de MQ_R/MQ_r for, pelo menos, cerca de 10 vezes o valor do ponto da distribuição F com o número apropriado de graus de liberdade no nível, de confiança escolhido (BARROS, SCARMINIO & BRUNS, 2007).

Para a análise da validade da regressão, ou seja, testar se a equação de regressão é estaticamente significativa, os valores de $F_{\text{calculado}}$ foram 880,04; 1810,27; 4723,36; 7621,22 e 4738,07 para os dados obtidos na construção das curvas analíticas de ácido gálico, galato de metila, ácido elágico, agathisflavona e amentoflavona, respectivamente, os quais são bastante superiores ao F_{tabelado} ($F_{1,13} = 4,67$) com 95% de confiança. Portanto, a linearidade do método é aceita e a regressão pode ser considerada significativa.

Uma forma de verificar o ajuste do modelo linear é através da comparação entre os valores de $F_{\text{calculado}}$ ($F = MQ_{\text{faj}}/MQ_{\text{ep}}$) e F_{tabelado} . Valores altos de $MQ_{\text{faj}}/MQ_{\text{ep}}$ significa muita falta de ajuste. Assim, valores inferiores de $F_{\text{calculado}}$ quando comparados ao F_{tabelado} indica que o modelo está bem ajustado às observações (BARROS, SCARMINIO & BRUNS, 2007).

Na avaliação do ajuste do modelo, os valores de $F_{\text{calculado}}$ foram 1,73; 1,14; 3,42; 3,24 e 3,18 para os os dados obtidos na construção das curvas analíticas de ácido gálico, galato de metila, ácido elágico, agathisflavona e amentoflavona, respectivamente, os quais são inferiores ao F_{tabelado} ($F_{3,10} = 3,71$) com 95% de confiança. Portanto, o modelo está bem ajustado às observações.

A ANOVA ainda sugere a análise da percentagem de variação explicada pela regressão (BARROS, SCARMINIO & BRUNS, 2007). Sendo que o valor dessa não deve ser comparado com 100% por causa da contribuição devida ao erro puro, uma vez que nenhum modelo pode reproduzir a soma quadrática do erro puro. Assim, a

diferença entre a percentagem de variação explicada pela regressão e a percentagem máxima de variação explicável deve ser pequena, porque a contribuição do erro puro é relativamente pequena. Logo, os valores dessas fontes de variação devem ser comparáveis.

Como os valores da percentagem de variação explicada pela regressão e da percentagem máxima de variação explicável foram comparáveis para os dados obtidos na construção das curvas analíticas de todos os analitos (Tabelas 10 a 15), o método proposto apresentou um modelo totalmente adequado à análise de variância.

5.3.3. Precisão

A precisão é avaliação da proximidade dos resultados obtidos de uma mesma amostra, sendo avaliada através da análise da repetibilidade ou precisão intra-corrída e precisão intermediária ou precisão inter-corrídas. A precisão foi determinada pelo cálculo do coeficiente de variação (CV), obtido conforme equação 1 (p. 185 na introdução).

5.3.3.1. Repetibilidade

Encontram-se apresentados na Tabela 16 os resultados obtidos seguindo o procedimento descrito no item 4.4.3.1 (p.196) para a repetibilidade.

Tabela 16 – Coeficientes de variação (CV) obtidos para as diferentes concentrações das substâncias utilizadas na avaliação da repetibilidade do método (n=4).

Substância	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)
Ácido gálico	2,0	1,85
	3,0	1,57
	4,0	1,63
Galato de metila	2,0	2,53
	5,0	1,53
	8,0	1,81
Ácido elágico	7,5	1,89
	12,5	0,76
	17,5	1,59
Agathisflavona	3,0	2,88
	9,0	2,04
	16,0	0,50
Amentoflavona	1,0	1,99
	5,0	1,51
	9,0	1,66

Segundo a ANVISA o valor máximo aceitável do CV deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003). Após análise das amostras para avaliação da repetibilidade, percebe-se que todos os valores do CV se mantiveram dentro dos limites especificados pela legislação vigente.

5.3.3.2. Precisão intermediária

Encontram-se apresentados na Tabela 17 os resultados obtidos seguindo o procedimento descrito no item 4.4.3.2 para a precisão intermediária. Como podem ser observados nessa tabela, os valores dos coeficientes de variação para a precisão intermediária do método estão abaixo do limite de 5%, conforme é recomendado pela ANVISA.

Tabela 17 – Coeficientes de variação (CV) obtidos para as diferentes concentrações das substâncias utilizadas na avaliação da precisão intermediária (n=3).

Substância	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1º dia CV (%)	2º dia CV (%)	3º dia CV (%)	4º dia CV (%)	Média CV (%)
Ácido gálico	2,0	2,71	2,72	4,26	3,81	3,38
	3,0	4,29	4,01	3,96	1,57	3,46
	4,0	1,81	1,64	3,71	4,04	2,80
Galato de metila	2,0	0,92	0,70	0,58	2,72	1,23
	5,0	2,58	2,28	1,60	1,68	2,04
	8,0	1,22	1,01	1,41	3,44	1,77
Ácido elágico	7,5	1,79	1,92	3,64	1,85	2,30
	12,5	1,53	3,18	0,52	1,24	1,62
	17,5	1,13	1,33	1,24	0,46	1,04
Agathisflavona	3,0	0,20	2,52	3,00	1,43	1,79
	9,0	2,58	2,97	0,63	0,14	1,58
	16,0	0,23	0,88	1,74	0,63	0,87
Amentoflavona	1,0	1,21	1,76	2,41	0,20	1,40
	5,0	1,02	1,49	0,39	0,52	0,86
	9,0	0,08	0,48	1,76	0,76	0,77

5.3.4. Exatidão

A exatidão é determinada pela medida de quão próximo o valor experimental está do valor verdadeiro e foi avaliada por meio de ensaios de recuperação seguindo o procedimento descrito no item 4.4.4. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 – Resultados do ensaio de recuperação dos padrões nos extratos MCCM e MFCM para avaliar a exatidão do método (n=3).

Substância	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			Recuperação (%) ^a	CV
	Amostra ^a	Adicionado	Encontrado ^a		
Ácido gálico	3,49	2,0	4,62	84,12	0,55
	3,49	3,0	5,69	87,75	1,80
	3,49	4,0	6,91	92,31	1,90
Galato de metila	5,15	2,0	7,58	106,08	1,44
	5,15	5,0	10,82	106,64	0,84
	5,15	8,0	13,40	101,92	0,78
Ácido elágico	13,52	7,5	20,60	97,98	1,47
	13,52	12,5	24,90	95,70	0,17
	13,52	17,5	31,57	101,77	0,24
Agathisflavona	11,49	3,0	14,79	102,07	0,50
	11,49	9,0	17,59	85,87	0,94
	11,49	16,0	27,35	99,48	3,62
Amentoflavona	4,12	1,0	4,94	96,51	2,78
	4,12	5,0	8,71	95,53	0,22
	4,12	9,0	11,64	88,74	0,48

^a Os ensaios foram realizados em triplicata, para cada nível de concentração e os resultados expressos como média.

A ANVISA não determina valor ou faixa de referência para recuperação. Entretanto, segundo Ribani (2004) os intervalos aceitáveis de recuperação para alguns tipos de análise estão geralmente compreendidos entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, em amostras mais complexas, esta faixa pode ser ampliada para 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$. Através da análise dos resultados do ensaio de recuperação apresentados na Tabela 18 percebe-se que o método proposto no presente estudo apresentou uma boa recuperação para todas as substâncias nos três níveis de concentração, variando de 84,12 a 106,64% e com valores de coeficiente de variação menores que 5%, ficando todos os valores dentro dos limites aceitáveis.

5.3.5. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) são parâmetros importantes, pois indicam a partir de que concentração a substância em análise pode ser detectada e quantificada, respectivamente. Esses parâmetros foram calculados de acordo as relações matemáticas apresentadas nos itens 4.4.5 e 4.4.6.

Os LD e LQ obtidos para o método analítico de quantificação, apresentados na Tabela 19, variaram de 0,21 a 0,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,65 a 1,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 19 – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para as substâncias avaliadas.

Substância	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ácido gálico	0,21	0,65
Galato de metila	0,39	1,17
Ácido elágico	0,56	1,70
Agathisflavona	0,56	1,70
Amentoflavona	0,44	1,34

5.3.6. Robustez

O método cromatográfico desenvolvido apresentou melhores condições de análise quando foram utilizadas as seguintes condições: vazão de 0,6 mL min⁻¹, temperatura do forno da coluna em 30 °C, água acidificada com ácido fórmico a 0,2% (v/v). Assim, para avaliar o comportamento do sistema analítico, quando realizadas pequenas mudanças nas condições ótimas de operação, foi feito o ensaio de robustez.

A Tabela 20 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo (2³) com as respostas em termos de tempo de retenção e área do pico. Os resultados obtidos foram tratados no programa *STATISTICA 8.0* com nível de confiança a 95 %.

Os diagramas de Pareto (Figuras 26 e 27, p. 237) indicaram que as modificações realizadas nas condições ótimas do método cromatográfico não apresentaram efeitos significativos para as variáveis fluxo, temperatura do forno e porcentagem de ácido fórmico em água. Revelando, assim, que essas variáveis são robustas nas condições avaliadas.

Tabela 20 – Matriz do planejamento fatorial completo (2^3) com valores reais e codificados e respostas obtidas na realização do experimento.

Experimento	Fluxo (mL)	Concentração da solução de ácido fórmico (%)	Temperatura do forno (°C)	Resposta	
				t_R	área
1	+ (0,65)	+ (0,3)	+ (35)	35,559	24,1565
				35,880	26,0040
2	+ (0,65)	+ (0,3)	- (25)	37,890	25,2578
				37,935	25,3579
3	+ (0,65)	- (0,1)	+ (35)	37,419	16,2218
				36,427	15,1045
4	+ (0,65)	-(0,1)	- (25)	37,993	15,0967
				38,017	15,2856
5	- (0,55)	+ (0,3)	+ (35)	37,649	30,8812
				37,825	28,5862
6	- (0,55)	+ (0,3)	- (25)	40,015	28,6600
				40,145	28,0132
7	- (0,55)	- (0,1)	+ (35)	37,388	20,4211
				37,314	20,1353
8	- (0,55)	- (0,1)	- (25)	40,825	15,3884
				41,824	15,9604
Ponto central					
9	0 (0,60)	0 (0,2)	0 (30)	34,904	26,3623
10	0 (0,60)	0 (0,2)	0 (30)	35,083	26,4160
11	0 (0,60)	0 (0,2)	0 (30)	34,973	26,3994

Figura 26 – Diagrama de Pareto para avaliação da robustez, utilizando área do pico como variável independente

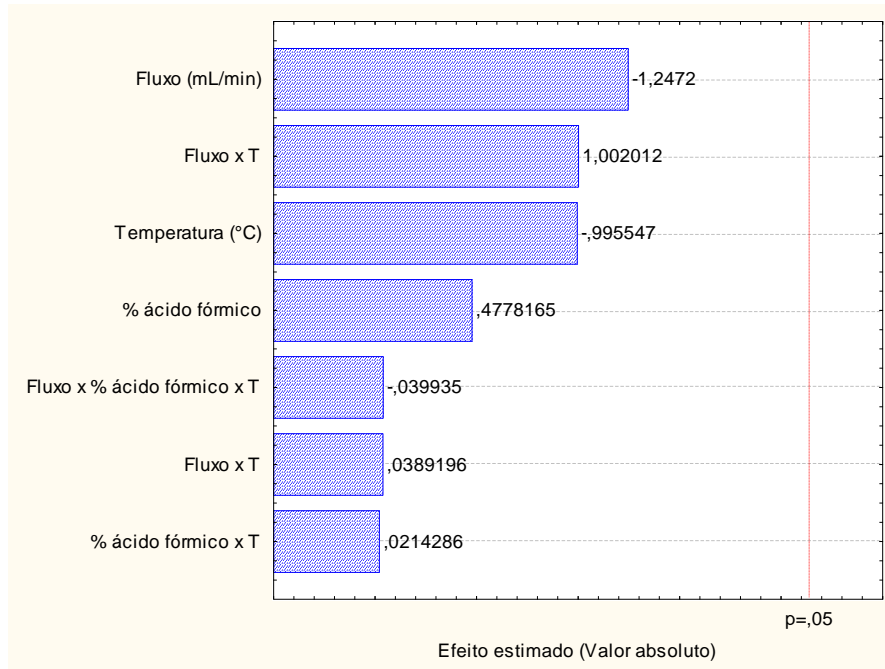
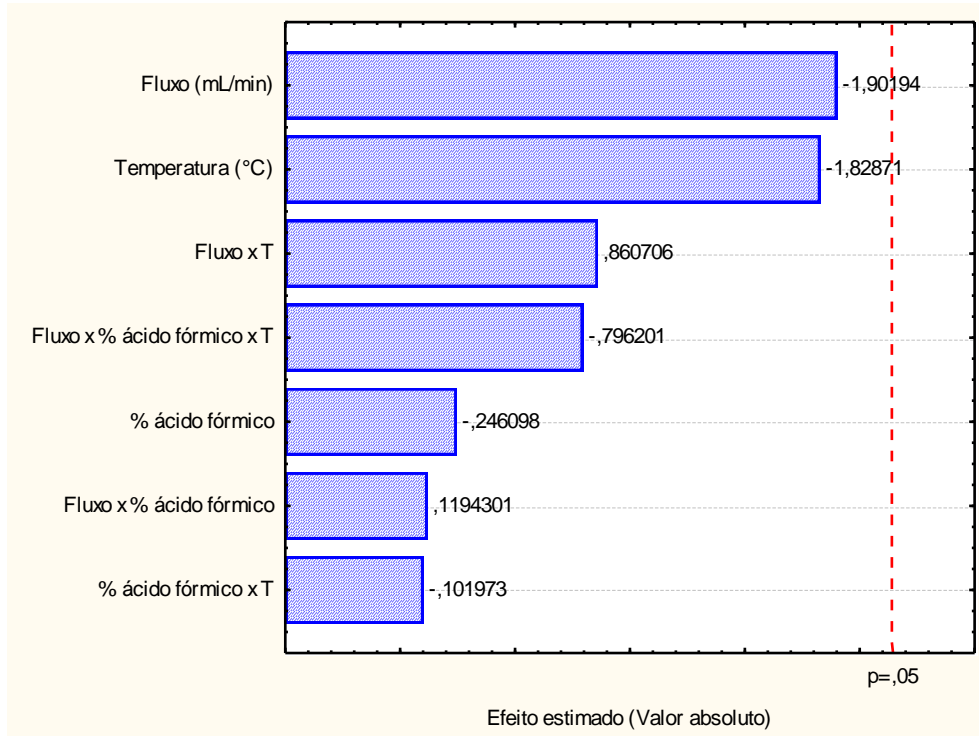


Figura 27 – Diagrama de Pareto para avaliação da robustez, utilizando tempo de retenção como variável independente



5.4. Análise quantitativa

O método cromatográfico validado foi aplicado na quantificação das substâncias ácido gálico, galato de metila, ácido elágico, agathisflavona e amentoflavona nos extratos MCCM e MFCM preparados conforme procedimento experimental (item 4.2).

A quantificação das substâncias de interesse nos extratos de *C. macrophyllum* foi realizada através do método de padronização externa, utilizando-se as curvas analíticas construídas para os padrões (itens 4.4.2.1 e 5.3.2).

A presença das substâncias de interesse foi investigada nos perfis cromatográficos por CLAE-DAD dos extratos MCCM e MFCM, através da comparação do tempo de retenção do pico referente à substância de interesse com o t_R do padrão. Assim como a comparação dos espectros de UV e a verificação de sua pureza, através das sobreposições dos espectros obtidos pelo detector DAD ($\lambda = 265$ nm) nas regiões ascendente, apical e descendente do pico cromatográfico com o padrão (Figuras 13, 14 e 17 a 21).

As Figuras 28 e 29 mostram os perfis cromatográficos dos extratos, onde estão assinalados os picos cromatográficos referentes a cada substância. A Tabela 21 apresenta as concentrações determinadas de ácido gálico, galato de metila, ácido elágico, agathisflavona e amentoflavona nos dois extratos, expressas em mg g^{-1} de extrato.

Figura 28 – Cromatograma CLAE – UV/DAD ($\lambda = 265$ nm) do extrato MCCM. **1**- ácido gálico, $t_{R1} = 2,94$ min; **2**- galato de metila, $t_{R2} = 14,04$ min; **3**- ácido elágico, $t_{R3} = 35,56$ min

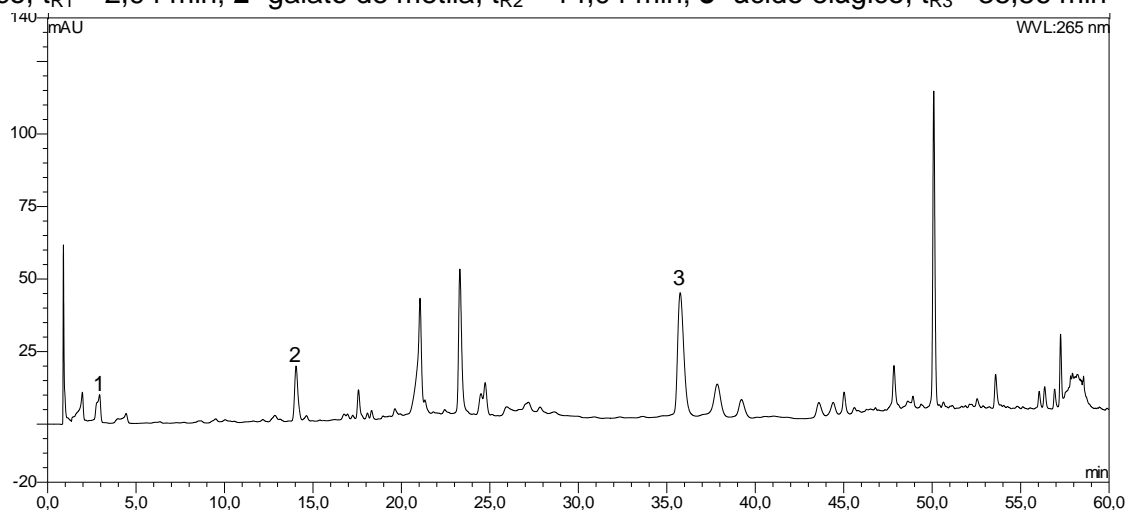


Figura 29 – Cromatograma CLAE – UV/DAD ($\lambda = 265$ nm) do extrato MFCM. 1- ácido gálico, $t_{R1} = 2,90$ min; 2- galato de metila, $t_{R2} = 14,03$ min; 3- ácido elágico, $t_{R3} = 35,57$ min; 4- agathisflavona, $t_{R4} = 58,49$ min; 5- amentoflavona, $t_{R5} = 58,63$ min

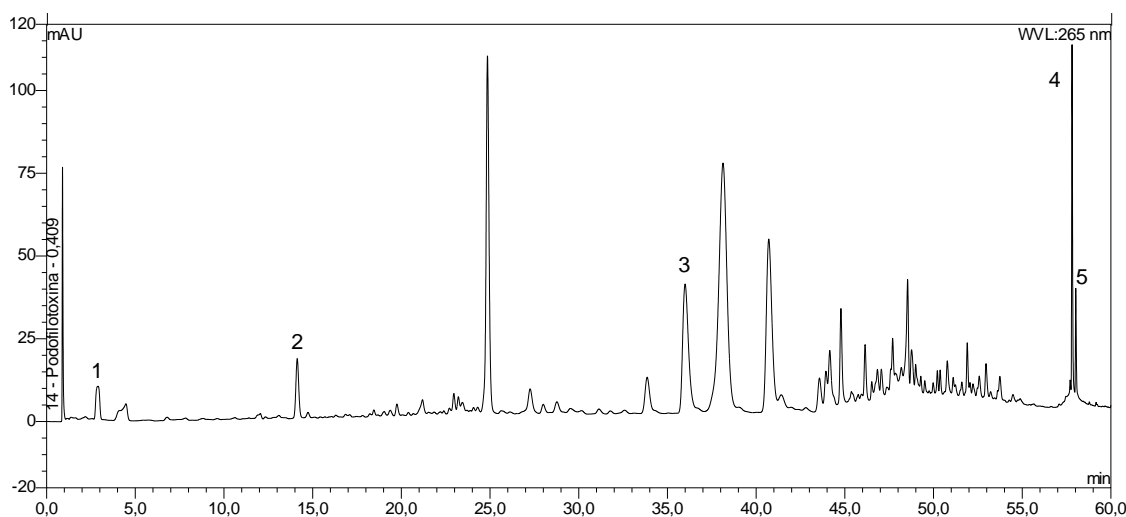


Tabela 21 – Concentração das substâncias de interesse nos extratos de *C. macrophyllum* em $\text{mg g}^{-1} \pm \text{DP}^*$.

Substância	MCCM	MFCM
Ácido gálico	$3,49 \pm 0,093$	$2,23 \pm 0,034$
Galato de metila	$5,15 \pm 0,121$	$3,52 \pm 0,203$
Ácido elágico	$13,52 \pm 0,098$	$12,34 \pm 0,357$
Agathisflavona	ND	$7,01 \pm 0,125$
Amentoflavona	ND	$2,23 \pm 0,081$

* DP = desvio padrão (n=3). ND – não detectado.

Observa-se através da análise da Tabela 21 que das substâncias analisadas a que está presente em maior quantidade, nas duas partes estudadas da planta, é o ácido elágico. Nota-se também que agathisflavona e amentoflavona só estão presentes nas folhas dessa espécie, estando ausente na casca do caule. Esses resultados são compatíveis com a literatura, uma vez que agathisflavona e amentoflavona foram isoladas apenas das folhas de *C. macrophyllum* (ALVES,

2012b; COSTA, 2005; VIANA, 2013), ao passo que o ácido elágico foi isolado tanto das folhas quanto da casca do caule (ALVES, 2012b; SILVA, 2007). Esse é o primeiro relato de ácido gálico e galato de metila na casca do caule dessa espécie. No entanto, ambos já foram isolados das folhas (ALVES, 2012b).

Vale destacar que na literatura não há relatos de um método cromatográfico descrito e/ou validado para análises dos extratos de *C. macrophyllum*. Os estudos realizados com essa espécie são voltados para a investigação da atividade biológica (CARVALHO, 2009; COELHO et al., 2013; PIAULINO, 2013; SOUZA et al., 2007; VIANA, 2013) e algumas pesquisas voltadas para o isolamento e identificação das substâncias presentes nos extratos orgânicos (ALVES, 2012b e 2012a; COSTA, 2005; SILVA, 2007; VIANA, 2013). As substâncias quantificadas neste trabalho são farmacologicamente ativas e mesmo que não sejam responsáveis diretas pelo uso da espécie na medicina tradicional, espera-se, com essa metodologia analítica, contribuir para uma futura aplicação no controle de qualidade de matéria prima vegetal e fitoterápico da espécie.

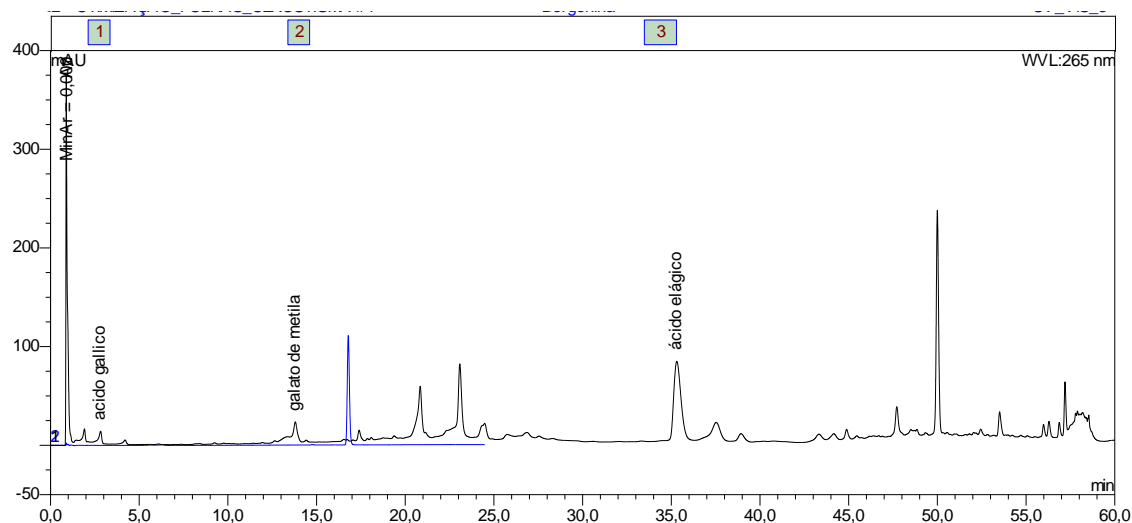
Os extratos MCCM e MFCM padronizados foram submetidos à avaliação das atividades antioxidantes, anticolinesterásica, antinociceptiva e anti-inflamatória.

5.5. Análise qualitativa

O método cromatográfico proposto permitiu a obtenção do perfil cromatográfico (*fingerprint*) dos extratos hidrometanólicos das folhas e da casca do caule de *C. macrophyllum*. Através da análise desses perfis cromatográficos foi possível obter algumas informações qualitativas sobre as substâncias presentes na espécie coletada, bem como informações sobre a ausência de substâncias isoladas anteriormente em outro espécime da planta.

Alves e colaboradores (2012b) isolaram bergenina em grande quantidade do extrato AcOEt da casca do caule de um espécime de *C. macrophyllum* coletado no bioma Caatinga da Bahia. Esperava-se a detecção dessa substância no extrato hidrometanólico da casca do caule do espécime coletado no Piauí. No entanto, como pode ser observado na Figura 30, não foi detectada a presença de bergenina no extrato MCCM.

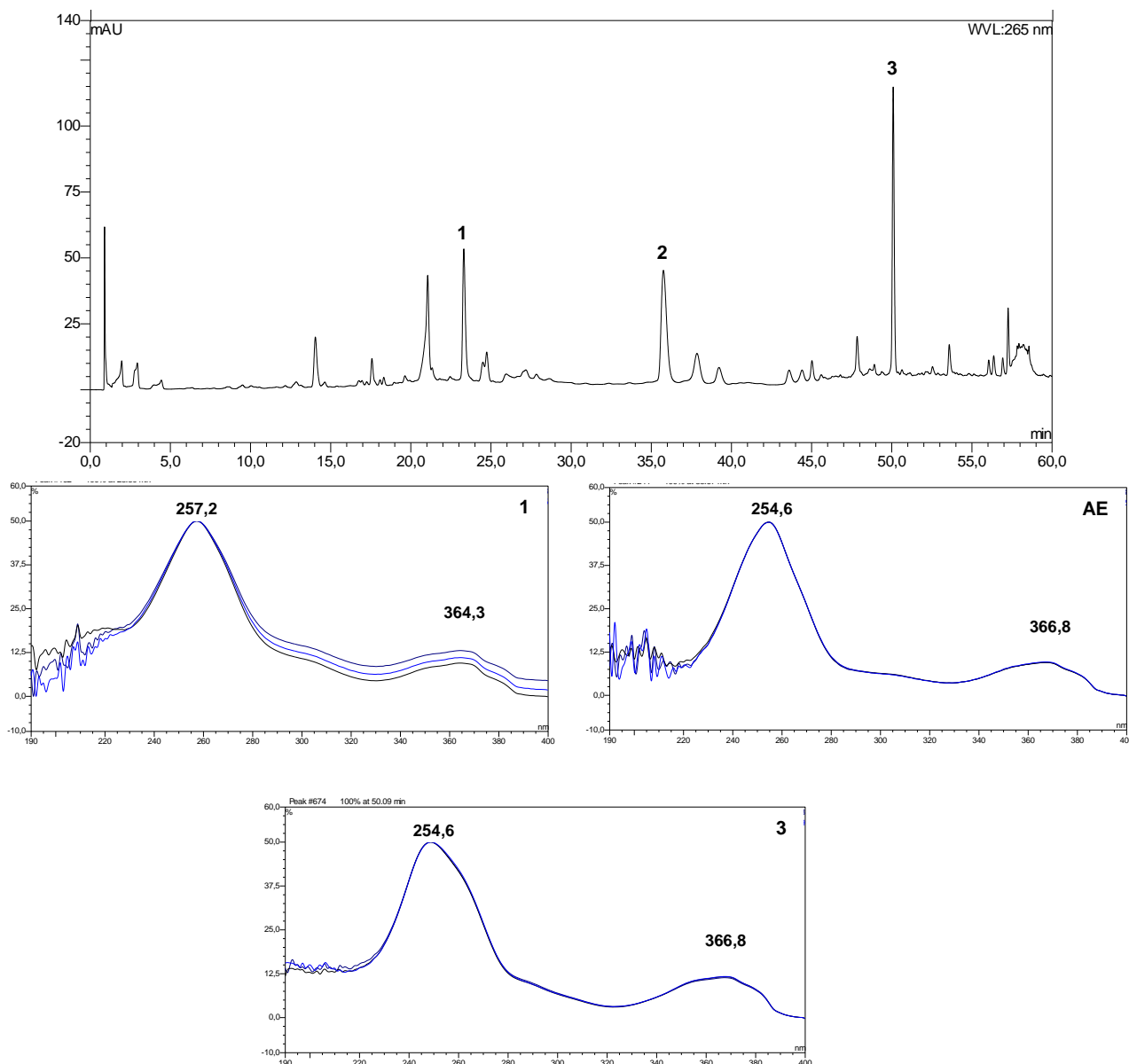
Figura 30 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) sobrepostos em $\lambda = 265$ nm do extrato MCCM (na cor preta) e bergenina (azul)



Também foi observado no perfil cromatográfico do extrato MCCM a presença de derivados do ácido elágico, os quais foram constatados pela análise dos espectros no UV dos picos mostrados na Figura 31. Silva e colaboradores (2007) relataram o isolamento e identificação da dilactona do ácido valoneico (Quadro 1, p.

182), um derivado do ácido elágico. Os derivados do ácido elágico não foram caracterizados e quantificados nesse estudo devido à ausência dos padrões.

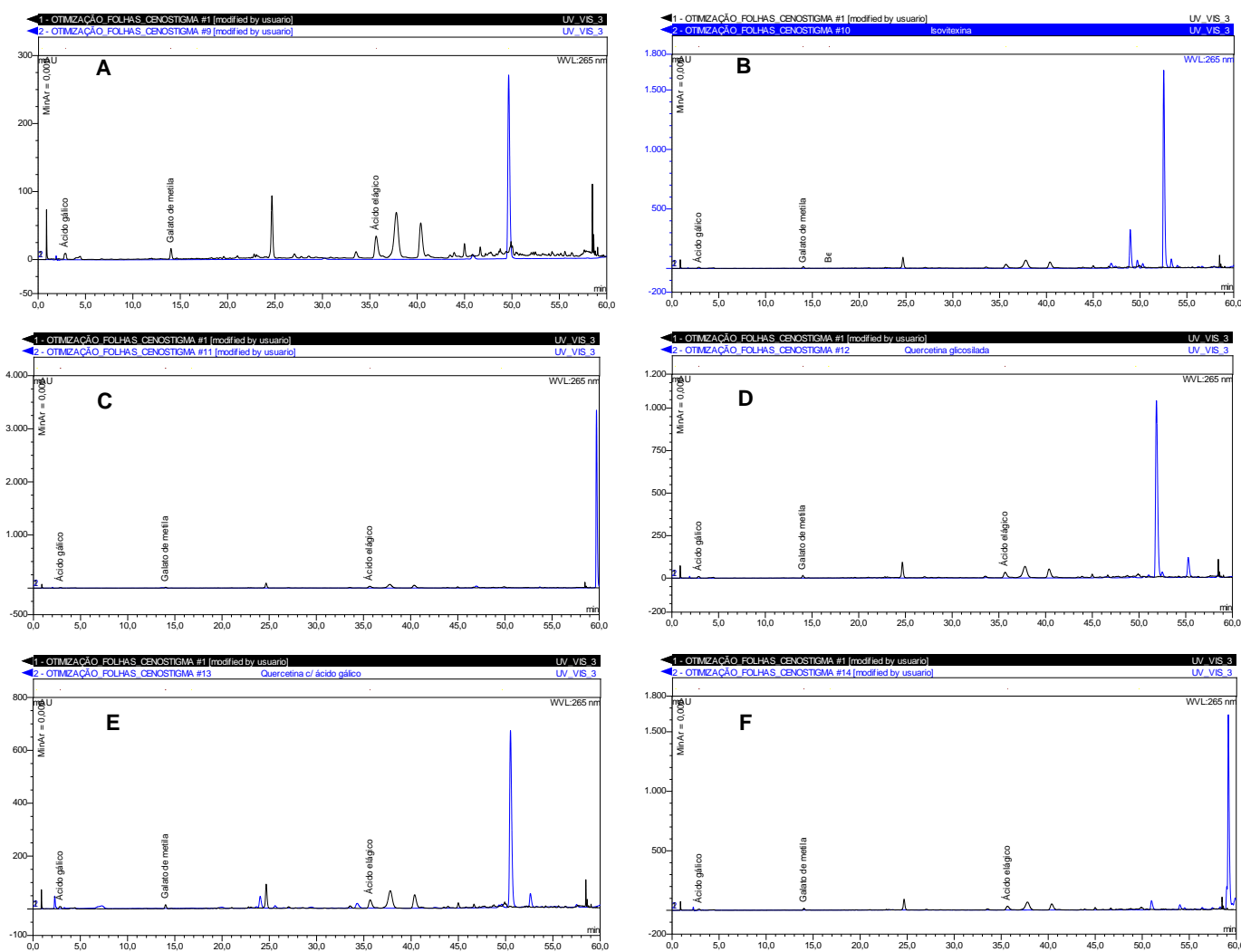
Figura 31 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) em $\lambda = 265$ nm do extrato MCM. **1**- derivado ácido elágico (não identificado), $t_{R1} = 23,30$ min; **2**- ácido elágico, $t_{R2} = 35,56$ min **3**- derivado ácido elágico (não identificado), $t_{R3} = 50,09$ min e comparação dos espectros no UV



Além de ácido gálico, galato de metila, ácido elágico, amentoflavona e agathisflavona, substâncias que foram quantificadas no presente trabalho, Alves (2012a, 2012b) isolou das folhas de *C. macrophyllum* coletadas na região da Caatinga baiana a vitexina, isovitexina, quercetina, quercetina-3-O- β -D-

glicopiranosídeo, quercetina-3-*O*-(6''-*O*-galoil)- β -*D*-glicopiranosídeo e quercetina-3-*O*-(6''-*O*-*E*-*p*-cumaroil)- β -*D*-glicopiranosídeo. No entanto, nenhuma dessas substâncias foi detectada no *fingerprint* do MFCM, como pode ser observado na Figura 32. Vale ressaltar que houve eluição em outras condições cromatográficas para confirmar a ausência dessas substâncias nas folhas do espécime coletado no Piauí.

Figura 32 – Cromatograma (CLAE – UV/DAD) sobrepostos em $\lambda = 265$ nm do extrato MFCM (na cor preta) com: A) Vitexina. B) Isovitexina. C) Quercetina. D) Quercetina-3-*O*- β -*D*-glicopiranosídeo. E) quercetina-3-*O*-(6''-*O*-galoil)- β -*D*-glicopiranosídeo e F) Quercetina-3-*O*-(6''-*O*-*E*-*p*-cumaroil)- β -*D*-glicopiranosídeo (todos na cor azul)



Diante de tantas diferenças nas substâncias encontradas em espécimes da mesma espécie, coletadas em locais diferentes e tendo em vista que a espécie *C. macrophyllum* do bioma Caatinga foi classificada até recentemente como sendo outra espécie, *C. gardnerianum* Tul (LEWIS, 1987), posteriormente foi considerada uma sinonímia de *C. macrophyllum*. É necessário um estudo mais aprofundado para averiguar se é a interação com o *habitat* que promove uma mudança tão brusca nos metabolitos especiais produzidos pela planta ou é preciso uma reavaliação para a distinção entre *Cenostigma macrophyllum* e *Cenostigma gardnerianum* Tul. (do bioma caatinga) como ocorria até recentemente. Nesse sentido, uma perspectiva de continuação desse trabalho é traçar o perfil cromatográfico de um espécime de *C. macrophyllum* coletado no bioma caatinga da Bahia e comparar com o *fingerprint* do espécime coletado em Piauí. Desta forma, através da análise criteriosa dos resultados obtidos será possível contribuir, em um trabalho interdisciplinar com a colaboração de um botânico, para a quimiotaxonômia da espécie.

5.6. Teste de atividade biológica

5.6.1. Avaliação da Atividade Antioxidante

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas. Estes testes têm se tornado ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos, auxiliando na escolha de espécies vegetais para estudos químicos e farmacológicos (ALVES et al., 2010). Dentre as metodologias mais comuns para se determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido, reprodutível e sensível destacam-se as que envolvem um radical cromóforo, simulando as espécies reativas de oxigênio, sendo o radical livre DPPH um dos mais utilizados.

A atividade de sequestro de radicais livres do DPPH foi realizada inicialmente usando os extratos e padrão nas concentrações variando de 50 a 250 µg/mL. No

entanto, outros testes foram realizados a fim de avaliar o intervalo de concentração adequado para cada extrato ou padrão atingir o valor de EC₅₀. Nesse estudo foi utilizado como controle, o antioxidante natural quercetina.

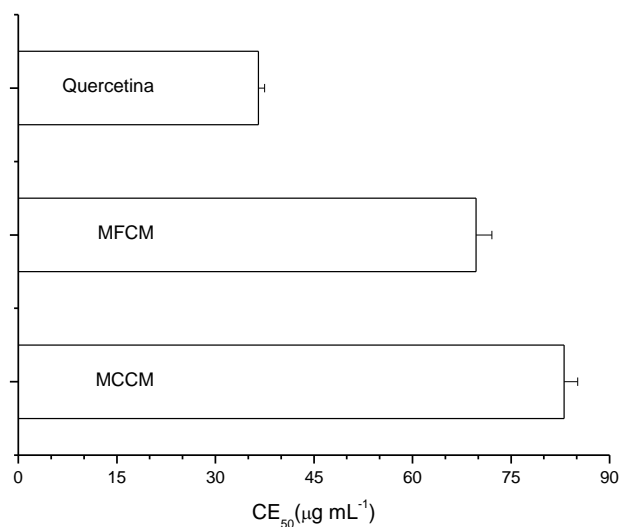
A Tabela 22 apresenta os valores de CE₅₀ da atividade antioxidante dos extratos e do padrão obtidos pelo método do sequestro de radicais livres (DPPH) e a Figura 33 faz uma comparação entre os valores de CE₅₀ encontrados. Segundo Melo e colaboradores (2010) a atividade antioxidante pelo método do DPPH pode ser classificada como boa se a CE₅₀ do extrato for até três vezes a EC₅₀ do padrão. Assim, seguindo esse critério, os dois extratos apresentaram uma boa atividade antioxidante. Levando-se em consideração a análise estatística dos dados de CE₅₀, em relação à atividade antioxidante dos extratos das folhas e da casca do caule de *C. macrophyllum*, aplicando-se ANOVA e teste de Bonferroni, verificou-se que o extrato MFCM apresentou uma maior atividade sequestradora de radicais livres em relação ao extrato MCCM, sendo que apresentaram diferenças significativas entre si ($P < 0,05$). Esse resultado pode ser justificado pela presença dos flavonoides agathisflavona e amentoflavona nesse extrato. Souza e colaboradores (2007) relataram a avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *C. macrophyllum*, encontrando um valor de CE₅₀ = 78,45 µg/mL ligeiramente maior do que o encontrado no extrato MFCM. No entanto, em seu estudo Souza e colaboradores não realizaram nenhum estudo de identificação das substâncias presentes no extrato.

Tabela 22 – Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH) dos extratos MCCM e MFCM e do padrão.

Material	CE₅₀ (µg/mL) ± DP*
MCCM	83,06 ± 2,09 ^a
MFCM	69,09 ± 2,38 ^b
Quercetina	36,56 ± 0,93 ^c

* Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=3). Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significativa comparando os valores do padrão e extratos, $p < 0,05$ (análise de variância de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni).

Figura 33 – Comparação dos valores de CE_{50} dos extratos MFCM e MFCM e do padrão quercetina. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=3)



Também foi avaliada a capacidade antioxidante dos extratos pelo sistema β -caroteno/ácido linolênico. Esse método determina a atividade de uma amostra ou composto proteger um substrato lipídico da oxidação, enquanto que o método de sequestro do radical livre DPPH baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Optar por diferentes testes para a avaliação da atividade antioxidante é importante para a obtenção de resposta mais precisa sobre a interação dos compostos presentes na amostra com os diferentes radicais gerados durante a reação (ROBARDS et al., 1999). Se compostos polares forem testados apenas pelo método do β -caroteno pode-se correr o risco de subestimar a atividade antioxidante desses compostos. Dessa forma, é necessário o uso de outros métodos, como o do DPPH que independe da polaridade do substrato (CARPES et al., 2008).

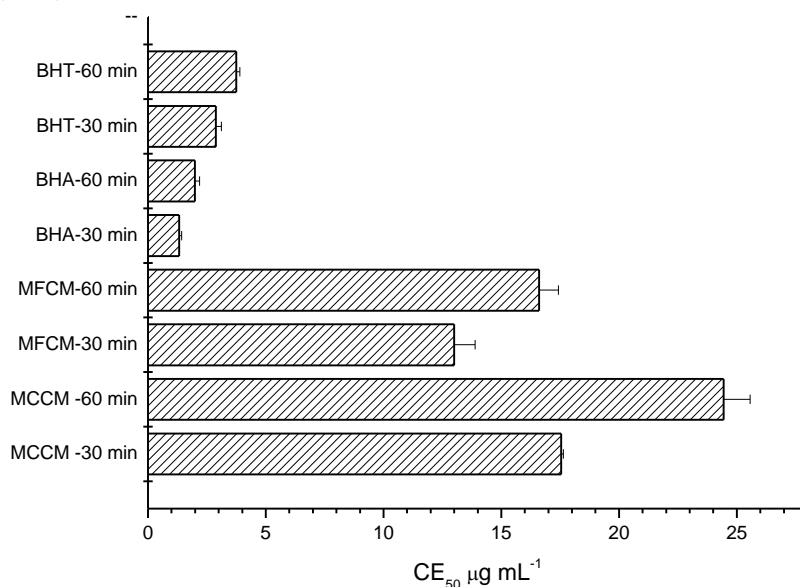
Os extratos e os padrões foram avaliados inicialmente nas concentrações variando de 50 a 250 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, outros testes foram realizados a fim de verificar o intervalo de concentração adequado para cada extrato ou padrões atingir o valor de CE_{50} . Nesse estudo foram utilizados como controle os antioxidantes sintéticos BHT e BHA. Os resultados obtidos em 30 e 60 minutos de experimento podem ser observados na Tabela 23. A Figura 34 faz uma comparação entre os valores de CE_{50} encontrados.

Tabela 23 – Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linolênico dos extratos MCCM e MFCM.

Material	30 min	60 min
	CE ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP*	CE ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP*
MCCM	17,54 \pm 0,10 ^a	24,44 \pm 1,13 ^d
MFCM	13,00 \pm 0,89 ^e	16,61 \pm 0,82 ^a
BHA	1,32 \pm 0,11 ^c	1,99 \pm 0,20 ^c
BHT	2,88 \pm 0,24 ^{bc}	3,75 \pm 0,15 ^b

* Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=3). Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significativa comparando os valores do padrão e extratos, $p < 0,05$ (análise de variância de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni).

Figura 34 – Comparação dos valores de CE₅₀ dos extratos MCCM e MFCM e dos padrões BHT e BHA em 30 e 60 min. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=3)



O extrato MFCM apresentou uma maior atividade antioxidante em relação ao extrato MCCM nos dois tempos analisados, foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), o que corrobora com os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH. A análise dos resultados mostrou que houve uma diminuição da atividade no decorrer do tempo

tanto para os extratos quanto para os padrões, sendo esse resultado significativo para os extratos e não significativo para os padrões ($p < 0,05$). A atividade antioxidante dos padrões foi estatisticamente maior que a atividade antioxidante dos extratos. Esse é o primeiro relato da avaliação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linolênico dos extratos de *C. macrophyllum*.

5.6.2. Avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase

Artigos recentes têm reportado que alguns extratos de plantas possuem atividade inibitória da AChE. Deste modo, visando o grande potencial de plantas na descoberta de novas drogas, estudos fitoquímicos, juntamente com testes *in vitro*, tem acelerado a busca por novas substâncias anticolinesterásicas (Houghton et al., 2004). Silva e colaboradores (2007) realizaram um estudo qualitativo sobre a atividade anticolinesterásica com o extrato AcOEt e metanólico de 34 espécies vegetais, entre as quais *C. macrophyllum*, que apresentou atividade. No entanto, esse é o primeiro relato da avaliação quantitativa da atividade inibitória da AChE.

A atividade anticolinesterásica foi avaliada quantitativamente usando a eserina como controle positivo. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 24, a Figura 35 faz uma comparação entre os valores de %I da AChE encontrados. O extrato hidrometanólico do caule apresentou maior atividade anticolinesterásica do que o extrato hidrometanólico das folhas nos dois tempos analisados, sendo verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os extratos. Não houve diferença significativa, ao nível de confiança averiguado nos resultados de %I da AChE nos dois tempos analisados para o MCCM. A atividade anticolinesterásica do MCCM em 60 minutos não apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação ao padrão utilizado ($p < 0,05$). Esse resultado evidencia uma excelente atividade desse extrato podendo ser comparado à atividade da eserina.

Não há relatos na literatura sobre substâncias isoladas da casca do caule de *C. macrophyllum* que apresentaram atividade anticolinesterásica. Portanto, o estudo fitoquímico biomonitorado desse extrato pode levar ao isolamento de substâncias com potente atividade. Alves e colaboradores (2013b) relataram a identificação e a avaliação da atividade anticolinesterásica de dois derivados de peptídeos,

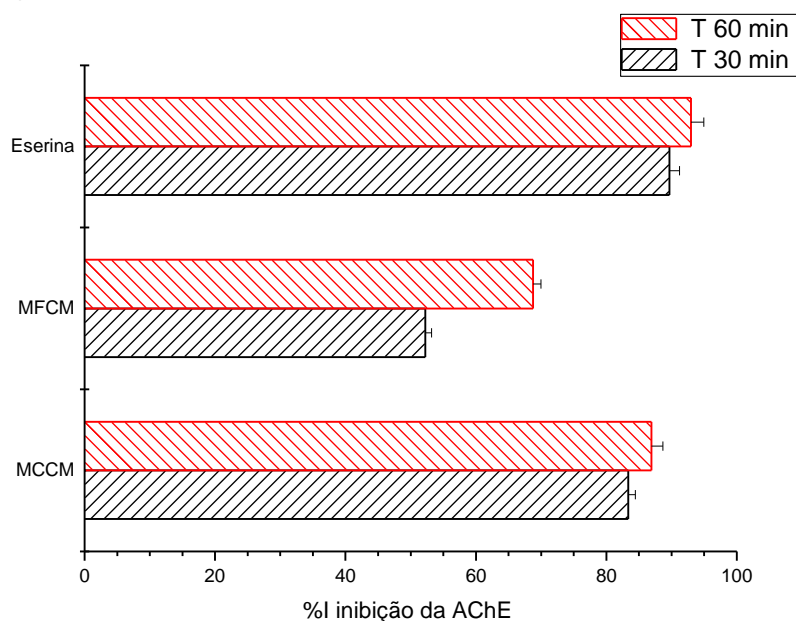
aurentiamida e acetato de aurentiamida, isolados das folhas de um espécime de *C. macrophyllum* coletado no bioma caatinga na Bahia. Portanto, a atividade encontrada para o extrato MFCM pode ser devido a essas substâncias, presentes em pequenas quantidades, que não foram identificadas (pela ausência de padrões) no presente trabalho.

Tabela 24 – Percentual de inibição da AChE (%) obtido para os extratos e eserina (padrão).

Material	30 min	60 min
	% I \pm DP*	% I \pm DP*
MCCM	83,36 \pm 1,07 ^a	86,91 \pm 1,76 ^{ab}
MFCM	52,23 \pm 0,99 ^c	68,77 \pm 1,20 ^d
Eserina	89,67 \pm 1,54 ^b	92,97 \pm 1,98 ^b

* Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=3). Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significativa comparando os valores do padrão e extratos, $p < 0,05$ (análise de variância de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni).

Figura 35 - Comparação dos valores de %I inibição da AChE dos extratos MCCM e MFCM e do padrões em 30 e 60 min. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=3)



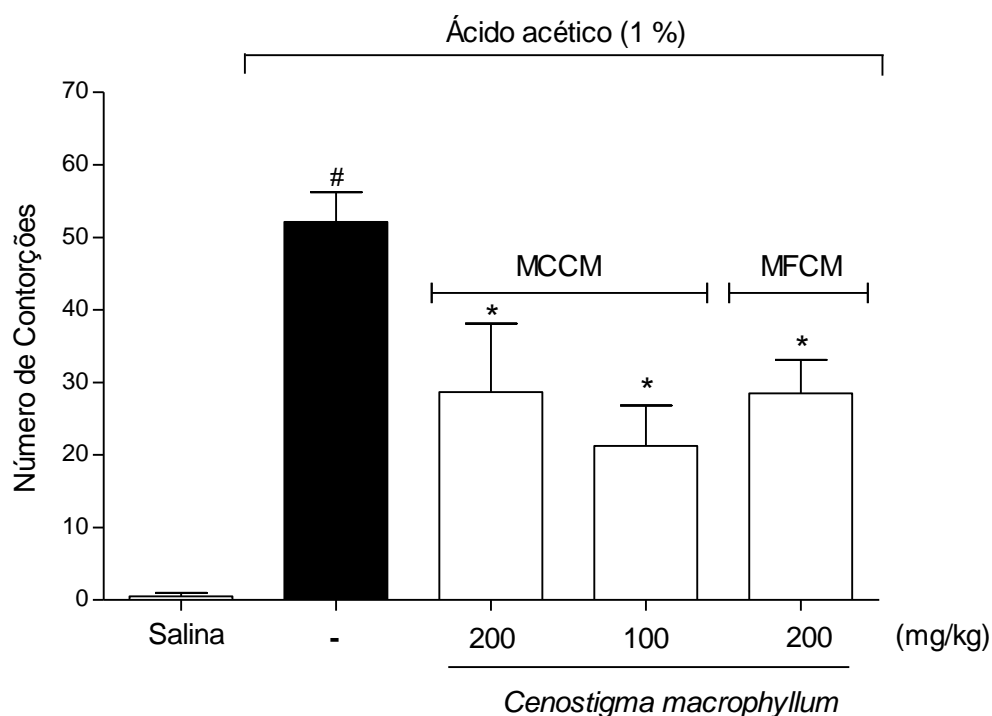
5.6.3. Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória

A atividade antinociceptiva dos extratos MCCM e MFCM foi avaliada por meio do ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético e a atividade anti-inflamatória foi avaliada através do teste de inibição da migração de neutrófilos induzida pela Cg para a cavidade peritoneal.

O modelo experimental de nocicepção realizado no presente trabalho foi o de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Apesar desse teste não ser muito específico, sua resposta é altamente sensível, sendo um modelo bastante utilizado para screening de novas drogas a serem testadas, como extratos de plantas e também substâncias isoladas, com possíveis propriedades analgésicas e/ou anti-inflamatórias (TJOLSEN & HOLE, 1997; COLLIER et al., 1968). Esse ensaio apresenta boa sensibilidade às drogas analgésicas e anti-inflamatórias não esteroidais, bem como a drogas semelhantes à morfina e outros analgésicos que atuam centralmente (KOSTER et al., 1959; IKEDA et al., 2001).

A avaliação de nocicepção visceral através do ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético foi realizado com doses de 200 e 100 mg/Kg do extrato hidrometanólico da casca de *C. macrophyllum* e 200 mg/Kg do extrato hidrometanólico das folhas de *C. macrophyllum*. O extrato MFCM na dose de 200 mg/kg reduziu significativamente ($p < 0,05$) o número de episódios de contorção em relação ao grupo controle tratado com o veículo (etanol 10%, v/v). Ao passo que o extrato MCCM promoveu redução significativa no número de contorções em ambas as doses avaliadas (200 e 100 mg/kg) em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$) (Figura 36). A redução significativa no número de episódios de contorção abdominais produzida pelos extratos MCCM e MFCM nas doses testadas indica a presença de substâncias com atividade antinociceptiva nesses extratos.

Figura 36 – Efeito dos extratos MCCM e MFCM no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (1,0%) em camundongos¹



¹ Os animais foram pré-tratados com diferentes doses do extrato (100 e 200 mg/Kg, s.c.) ou veículo (etanol 10%, v/v). Os resultados são apresentados como médias ± D.P. da contorção em camundongos (n = 6). A análise estatística foi realizada por meio da ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * p < 0,05 quando comparado o grupo dos camundongos tratados com veículo (-) com os tratados com o extrato, com indução posterior da nocicepção com ácido acético. # p < 0,05 comparado ao grupo salina.

Alves e colaboradores (2012) relataram a atividade antinociceptiva de bergenina, isolada da casca do caule de um espécime de *C. macrophyllum* coletado na caatinga da Bahia. No entanto, essa não é a substância responsável pela atividade apresentada pelo extrato MCCM, visto que bergenina não foi encontrada no espécime estudado (ver item 5.5.). Piaulino e colaboradores (2013) relataram o efeito analgésico em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina do extrato etanólico e da fração acetato de etila da casca do caule de um espécime de *C. macrophyllum* coletado no Piauí. Nesse trabalho, análise feita por CCD do extrato AcOEt indicou a presença de ácido elágico e da dilactona do ácido vanoleico, um derivado do ácido elágico (Quadro 1, p. 180). Desta forma, os resultados sobre atividade antinociceptiva apresentados no presente estudo corroboram com os resultados relatados na literatura, uma vez que no extrato MCCM o ácido elágico foi

encontrado em grande quantidade. Além disso, a análise qualitativa do perfil cromatográfico do extrato MCCM mostrou a presença de derivados do ácido elágico. Adicionalmente, foi encontrado nesse extrato o ácido gálico substância que apresenta reconhecida atividade antinociceptiva (PIAULINO et al., 2013; KROGH, YUNES & ANDRICOPULO, 2000; TREVISAN et al., 2014).

Com relação à atividade antinociceptiva apresentada por extratos obtidos das folhas, Carvalho (2009) relatou atividade antinociceptiva em ratos diabéticos de uma fração enriquecida com uma mistura de biflavonas, amentoflavona e agathisflavona. Assim, sugere-se que a atividade antinociceptiva do extrato MFCM está relacionada com a presença desses biflanoides, bem como pela presença de ácido gálico e ácido elágico, em maior quantidade.

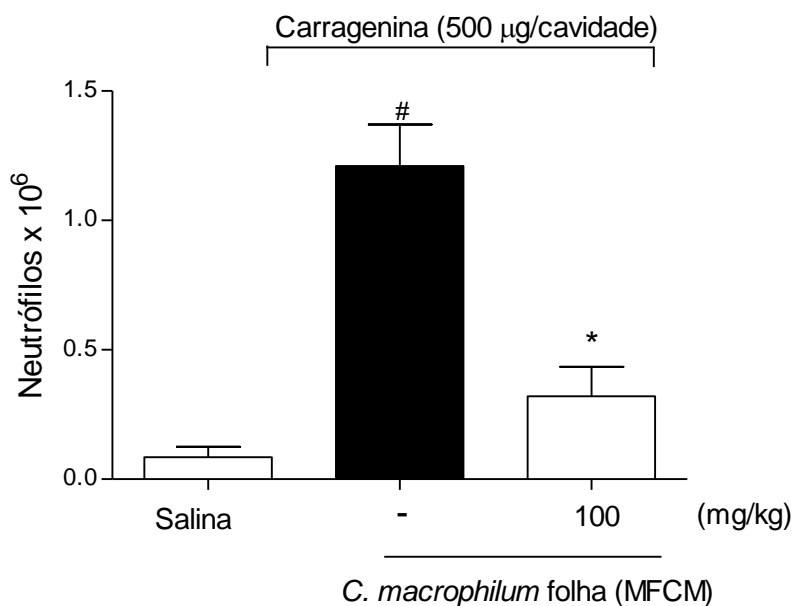
Com o reconhecimento do importante papel dos leucócitos, tanto nos processos inflamatórios agudos quanto nos processos inflamatórios crônicos, muita atenção tem sido atribuída a modelos animais de inflamação aguda que permitam a quantificação estimada da migração desses leucócitos. Os modelos animais envolvendo a cavidade pleural ou peritoneal permitem que a migração celular, a quantidade de mediadores inflamatórios e o extravasamento plasmático sejam quantitativamente mensurados após um processo inflamatório agudo, induzido por diferentes agentes irritantes aplicados no interior da cavidade (SEDGWICK & LEES, 1986). A peritonite é um modelo que provoca na cavidade peritoneal reação semelhante a que ocorre em consequência a infecções, inflamações ou doença neoplásica. Mediadores inflamatórios são liberados e podem ser difundidos para o sítio inflamado, resultando na ativação de células inflamatórias, causando aumento no número de células no espaço peritoneal. Esse modelo é considerado por muitos pesquisadores como o mais completo, uma vez que se pode avaliar o efeito de substâncias tanto sobre os eventos celulares quanto vasculares do processo inflamatório (HURLEY et al., 1983).

Assim, para verificar o efeito anti-inflamatório do extrato hidrometanólico das folhas de *C. macrophyllum*, foi avaliado o efeito na migração de neutrófilos induzida pela Cg na cavidade peritoneal do camundongo. A peritonite é um modelo que provoca na cavidade peritoneal reação semelhante a que ocorre em consequência a infecções, inflamações ou doença neoplásica. Mediadores inflamatórios são liberados e podem ser difundidos para o sítio inflamado, resultando na ativação de

células inflamatórias, causando aumento no número de células no espaço peritoneal. Esse modelo é considerado por muitos pesquisadores como o mais completo, uma vez que se pode avaliar o efeito de substâncias tanto sobre os eventos celulares quanto vasculares do processo inflamatório (RIBEIRO et al., 1997).

O pré-tratamento com o extrato MFCM na concentração 100 mg/Kg (s.c.) diminuiu a migração de neutrófilos nos camundongos ($p < 0,05$), induzida pela injeção intraperitoneal de Cg (500 $\mu\text{g}/\text{cavidade}$) (Figura 37). Esse é o primeiro relato de avaliação da atividade anti-inflamatória pela migração de neutrófilos de *C. macrophyllum*. No entanto, é necessário a realização de testes adicionais para elucidar o mecanismo de ação do extrato e identificação dos compostos bioativos.

Figura 37 – Efeito do extrato MFCM (100 mg/Kg) sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos pré-tratados por via subcutânea 30 min antes da Carragenina (500 $\mu\text{g}/\text{cavidade}$) induzir peritonite¹



¹ Cada valor representa a média \pm D.P (n = 6). A análise estatística foi realizada por meio da ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. (-) Veículo (etanol, 10% v/v). * $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

6. CONCLUSÕES

O método cromatográfico desenvolvido para o *fingerprint* dos extratos hidrometanólicos das folhas e da casca do caule de *C. macrophyllum*, apresentou-se apropriado para a separação dos picos cromatográficos tonando o método capaz de caracterizar e distinguir substâncias bioativas presentes nesses extratos, possibilitando análises cromatográficas qualitativas de partes do vegetal.

O método desenvolvido e validado por CLAE – UV/DAD mostrou-se adequado e confiável para a análise de ácido gálico, galato de metila, ácido elágico, agathisflavona e amentoflavona nas folhas e casca do caule de *C. macrophyllum*. Os parâmetros analíticos avaliados mostraram que o método possui boa especificidade, linearidade na faixa escolhida, exatidão e precisão dentro dos limites recomendados pelos órgãos competentes, além de LD e LQ que indicam a eficiência do método na quantificação das substâncias analisadas. O método apresentou-se robusto quando realizadas pequenas mudanças em suas condições ótimas de análise.

A aplicação do método cromatográfico validado na quantificação das substâncias AG, GM, AE, AT e AM em *C. macrophyllum*, demonstrou que existem variações na concentração dessas substâncias nas partes estudadas da planta. O ácido elágico foi a substância encontrada em maior concentração, tanto nas folhas ($12,34 \pm 0,357 \text{ mg g}^{-1}$) quanto na casca do caule ($13,52 \pm 0,098 \text{ mg g}^{-1}$). No entanto, os flavonoides agathisflavona e amentoflavona só foram encontrados nas folhas ($7,01 \pm 0,125$ e $2,23 \pm 0,081 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente), ao passo que, ácido gálico e galato de metila foram quantificados nas duas partes estudadas da planta.

Espera-se, com o método analítico desenvolvido, contribuir para uma futura aplicação no controle de qualidade de matéria prima vegetal e fitoterápico da espécie, uma vez que essa planta apresenta uso na medicina tradicional e há diversos relatos na literatura sobre suas atividades biológicas.

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos utilizando a metodologia do sequestro do radical estável DPPH indicou que os dois extratos apresentaram, segundo a classificação sugerida por Melo (2010), uma boa atividade em sequestrar o radical livre. Entretanto, a atividade do extrato MFCM foi superior, apresentando diferenças estatisticamente significativas em relação ao extrato MCCM ($p < 0,05$). O

sistema β -caroteno/ácido linolênico também revelou uma maior atividade antioxidante do extrato MFCM em relação ao extrato MCCM, nos tempos analisados, sendo observadas diferenças significativas ao nível de confiança estudado ($p < 0,05$).

No teste da atividade anticolinesterásica o extrato MCCM apresentou maior atividade do que o extrato MFCM nos dois tempos analisados, sendo verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os extratos. Além disso, o extrato MCCM apresentou atividade comparável ao padrão eserina ao nível de confiança averiguado estatisticamente. Os dois extratos apresentaram atividade antinoceptiva, uma vez que foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de episódios de contorção abdominais em relação ao grupo controle. Foi avaliada a atividade anti-inflamatória apenas do extrato MFCM e este apresentou atividade na concentração de 100 mg/Kg.

Levando em consideração que a espécie *C. macrophyllum* Tul do bioma Caatinga foi classificada até recentemente como sendo outra espécie, *C. gardnerianum* Tul., este trabalho pode contribuir para o conhecimento quimiotaxônomico da espécie já que foi desenvolvido um método de obtenção de *fingerprint* de extratos obtidos de partes da planta que podem servir para uma análise cromatográfica criteriosa de marcadores químicos presentes em espécimes coletadas em diferentes localidades para auxiliar na avaliação da classificação da espécie.

7. REFERÊNCIAS

- ALVES, C. Q. **Estudo químico e avaliação biológica de duas Espécies de Leguminosae: *Dioclea virgata* e *Cenostigma macrophyllum***. 2012. 227f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012a.
- ALVES, C. Q. et al. Flavonoids and other bioactive phenolics isolated from *Cenostigma macrophyllum* (Leguminosae). **Química Nova**. v. 35, n. 6, p. 1137-1140, 2012b.
- ALVES, C. Q. et. al. In vitro acetylcholinesterase activity of peptide derivatives isolated from two species of Leguminosae. **Pharmaceutical Biology**. v. 51, n. 7, p. 936-939, 2013b.
- ALVES, C. Q. **Flavonóides antioxidantes e derivados de ácido gálico isolados de *cenostigma gardnerianum* tul. (leguminosae)** 2017. 108f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**. v. 5, n. 3, p. 450-513, 2013a.
- ASSAD, A. L. D.; FERRO, A. F. P. Biodiversidade e sua utilização na geração de fitoterápicos. **Fármacos e Medicamentos**. n.37, p.14-18, nov./dez., ano VI, 2005.
- BAIER, K. P. **Composição química quantitativa e avaliação da potencial atividade vasodilatadora de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) MacBride**. 2011. 211 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. 2011.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como construir modelos empíricos. In: Como fazer experimentos**. Campinas, SP: UNICAMP, 2007.
- BEZERRA, A. C. et al. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**. v. 5, n. 11, p. 26-32, 2007.
- BIDLINGMEYER, B. A. **Practical HPLC methodology and applications**. New York. John Wiley & Sons, 1992. 452 p.
- BRANDÃO, H. N. **Determinação de podofilotoxina e outras Lignanas em espécies dos gêneros *Eriope* e *Hyptis* (Lamiaceae) por CLAE-DAD**. 2010. 143f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Savador, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 jun. 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC Nº 17, de 16 de abril de 2010. **Dispõe sobre as Boas Práticas de**

- Fabricação de Medicamentos.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 abr. 2010a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada RDC Nº 14, de 31 de março de 2010. **Dispõe sobre o registro de medicamentos Fitoterápicos.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 05 abr. 2010b.
- BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, n. 0, p.129-146, 2003.
- CALIXTO, J. B. **Medicamentos fitoterápicos. Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna.** Chapecó, SC: Editora Argos; 2001.
- CARPES, S. T. et al. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região Sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1660-1664, 2008.
- CARVALHO, F. C. B. **Avaliação dos efeitos de *cenostigma macrophyllum* na neuropatia diabética.** 2009, 81f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.
- COELHO, N. P. M. de F. et. al. *Cenostigma macrophyllum Tul.* on the healing of skin wounds in rats with *Diabetes mellitus*. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 28, n. 8, p. 594-600, 2013.
- COLLIER, H. D. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.
- COSTA, A. C. de O. **Caracterização e quantificação de marcadores químicos do extrato hidroetanólico das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess.** 2012. 122f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.
- COSTA, C. L. S. **Constituintes Químicos e atividades antibacteriana, antiulcerogênica e hepatoprotetora da *Cenostigma macrophyllum* Tull var. *acuminata* Teles Freire (Leguminosae-Caesalpinioideae),** 2005. 137f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2005.
- CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 4, p. 824-832, 2008.
- CUSTODIO, R.; DE ANDRADE, J. C.; AUGUSTO, F. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. **Química Nova**, v.20, n.2, p. 219-226, 1997.
- DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**. v. 16, n. 9/10, p. 71-76, 2004.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

- FAN, X. H. et. al. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, n. 2, p. 217-224, 2006.
- FREIRE, F. M. T. **Revisão Taxonômica do Gênero Cenostigma Tul. (Leguminosae-Caesalpinioideae)**. 1994. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1994.
- GOMES, S. F. V. **Aplicação do planejamento box-behnken na otimização de método de extração de flavonoides usando extração acelerada com solventes (ASE) e quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD-UV em espécies do gênero *passiflora***. 2013. 161f. Tese (DOUTORADO) - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.
- HOUGHTON, P. J.; AGBEDAHUNSI, J. M.; AGBEDAHUNSI, A. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian Crinum species. **Phytochemistry**. v. 65, n. 21, p. 2893-2896, 2004.
- HURLEY, J. V. Endogenous chemical mediators of inflammation: acute inflammation. 2. ed. London: Churchill Livingstone, p. 102-108, 1983.
- IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acetic acid-induced writhing response of mice. **Life Sciences**, v. 69, n. 25, p. 2911-2919, 2001.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industria (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos e ensaios químicos DOQ-CGCRE-008**. Revisão 03, fevereiro, 2010.
- International Conference on Harmonisation (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology**. Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995a.
- International Conference on Harmonisation (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Methodology**. Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995b.
- International Standard Organization (ISO). **General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories**. ISO/IEC 17025, 1999.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation proceedings**. v. 18, p. 412-416, 1959.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation proceedings**, v. 18, p. 412-416, 1959.
- KROGH, R. YUNES, R.A. ANDRICOPULO, A.D. Structure-activity relationships for the analgesic activity of gallic acid derivatives. **IL Farmaco**. v. 55, n. 11-12, p. 730-735, 2000.
- LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**, Eglant: Royal Botanic Gardens Kew p. 369, 1987
- MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.
- MELO, J. G. et al. Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil. **Molecules**. v. 15, n. 12, p. 8534-8542, 2010.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. da S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n.1, p.105-111, 2001.

- OLIVEIRA, A. A. et al. Antimicrobial activity of crude extract of bark and branch of *Cenostigma cf. macrophyllum* (Caesalpinioideae) against *Streptococcus of mutans* group. In: XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 22, 2012, Bento Gonçalves. **Anais eletrônicos...** Bento Gonçalves, 2012. Disponível em http://www.ufrgs.br/spmb2012/Trabalhos/3430_1336407035_Andressa_ResumoSimposio2012.pdf Acesso em: 07 ago. 2014.
- PEREIRA, C. A. et al. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**. v. 15, n. 4, p. 241-248, 2004.
- PIAULINO, C. A. et. al. The stem bark extracts of *Cenostigma macrophyllum* attenuates tactile allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**. v.51, n. 10, p.1243-1248, 2013.
- PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**. v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.
- QUEIROZ, L. P. **Distribuição das espécies de leguminosae na caatinga**. In: EVSB Sampaio et al. (eds). *Vegetação e flora da caatinga*. Recife: Associação Plantas do Nordeste-APNE/ Centro Nordestino de informações sobre Plantas-CNIP, 2002
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, F. A. L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**. v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.
- RIBEIRO, R. A. et al. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. **International Archives Allergy and Immunology**, v. 112, n. 1, p. 27-35, 1997.
- ROBARDS, K. et al. Phenolic compounds and their role in processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 401-436, 1999.
- SANTOS, G. S. et al. Phytochemical study and evaluation of antimicrobial activity of crude extract and fractions of leaves of *Cenostigma cf. macrophyllum* (Leguminosae) collected at National Forest Contendas do Sincorá (BA). In: XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 22, 2012, Bento Gonçalves. **Anais eletrônicos...** Bento Gonçalves, 2012. Disponível em http://www.ufrgs.br/spmb2012/Trabalhos/3430_1342047584_GeysaResumoSimposio2012.pdf Acesso em: 07 ago. 2014.
- SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents Actions**, v. 18, n. 3-4, p. 439-446, 1986.
- SILVA, D. da S. et al. Busca de novos inibidores da enzima acetilcolinesterase em plantas medicinais do Nordeste do Brasil. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 30, 2007, Águas de Lindóia. **Anais eletrônicos...** Águas de Lindóia, Sociedade Brasileira de Química, 2007. Disponível em <https://sec.sbq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T1365-1.pdf> Acesso em: 07 ago. 2014.

- SILVA, H. R. et al. Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. **Química Nova**. v. 30, n. 8, p.1877-1881, 2007.
- SILVA, M. F. SOUZA, L. A. G. CARREIRA, L. M. de M. **Nomes populares das Leguminosas do Brasil**; Manaus: EDUA/IMPA/FAPEAM, 2004.
- SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L.
Desenvolvimento tecnologico e producao de fitoterapicos. In: SIMOES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianopolis: UFRGS/UFSC, 2004. p. 221-258.
- SYNDER, L. R.; DOLAN, J. W. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development. I. Use of a starting gradient run. **Journal of Chromatography A**, v. 721, n. 1, p. 3-14, 1996.
- THOMPSON, M. et al. Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. **Pure and Applied Chemistry**. v. 71, n.2, p. 337-348, 1999.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R.; Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**. v.74, n.5, p.835-856, 2002.
- TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animais models of analgesia. In: **The pharmacology of Pain**, Berlin: Springer, p. 1-20, 1997.
- TREVISAN, G. et al. Gallic acid functions as a TRPA1 antagonist with relevant antinociceptive and antiedematogenic effects in mice. **Naunyn-chmiedeberg's Arch Pharmacol**. v. 387, n. 7, p. 679-89, 2014.
- United States Food and Drug Administration (US-FDA). **Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation**. 2001.
- United States Food and Drug Administration (US-FDA). **Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation**. 2000.
- United States Food and Drug Administration (US-FDA). **Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods**. 1994.
- VACHER, J.; DUCHÊNE-MARULLAZ, P.; BARRAT, P. A propos de quelques produits usuels. Comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 11, n. 1, p. 51-58, 1964.
- VESSMAN, J. et al. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). **Pure and Applied Chemistry**. v. 73, n. 8, p. 1381–1386, 2001.
- VIANA, A.F.S.C. et.al. Gastro protective activityof *Cenostigma macrophyllum* Tul.var. acuminata TelesFreire leaves on experimental ulce rmodels. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 150, n. 1, p. 316-323, 2013.
- World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations; *Thirty-second report*, WHO Technical Report Series, Nº 823, Geneva, 1992.
- ZANUTTO, F. V. **Estudo Químico e Atividades Mutagênica e Antiradicalar de Paepalanthus chiquitensis Herzog (ERIOCAULACEAE)**. 2013. 175f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara. 2013.

ANEXO 1



Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-173/2009

Uberaba, 21 de dezembro de 2009

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 0107/2009 relativo ao projeto intitulado "**Avaliação da atividade biológica de compostos isolados de plantas medicinais do semi-árido da Bahia**" que tem como responsável **Profª Regiane Yatsuda**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.704/09.

CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol nº 0107/2009 related to the project entitled "**Evaluation of biological activit of compounds isolated from medicinal plants of the semi-arid of Bahia**", under the supervision of **Profª Regiane Yatsuda**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law nº 11.704/09.

Atenciosamente,


Profª Joely S. Figueiredo Bittar
Vice-Coordenadora do CEEA-UNIUBE