



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

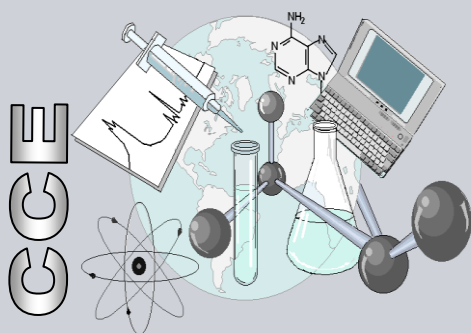
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Estudo Fitoquímico e Avaliação das Atividades Antioxidante e Anti-inflamatória das Raízes de *Sabicea brasiliensis* Wernh (Rubiaceae)”

Dissertação apresentada por **Jucilene Cavalini Batista** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, AGOSTO/2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**“Estudo Fitoquímico e Avaliação
das Atividades Antioxidante e Anti-inflamatória das
Raízes de *Sabicea brasiliensis* Wernh (Rubiaceae)”**

JUCILENE CAVALINI BATISTA

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cleuza Conceição da Silva

MARINGÁ, AGOSTO/2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Batista, Jucilene Cavalini
B333e Estudo fitoquímico e avaliação das atividades
antioxidante e anti-inflamatória das raízes de *Sabicea*
brasiliensis Wernh (Rubiaceae) / Jucilene Cavalini
Batista. -- Maringá, 2013.
146f.: figs., tabs., esq.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Cleuza Conceição da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá,
Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química,
Programa de Pós-Graduação em Química, 2013.

1. Rubiaceae. 2. *Sabicea brasiliensis*. 3. Cumarina. 4. Ácido
cafeoilquímico. 5. Triterpenos. 6. Atividade
antioxidante. 7. Atividade anti-inflamatória. I.
Silva, Cleuza Conceição da, orient. II. Universidade
Estadual de Maringá. III. Título.

CDD 21.ed.





Universidade Estadual de Maringá


Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Jucilene Cavalini Batista**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 20 de agosto de 2013.

COMISSÃO JULGADORA:


Profa. Dra. Cleuza Conceição da Silva
Presidente - DQI/UEM


Profa. Dra. Silvana Maria de Oliveira Santin
Membro - DQI/UEM


Profa. Dra. Lucilia Kato
Membro - UFG

*Dedico este trabalho a Gustavo Henrique Soares,
meu filho amado, razão pela qual eu vivo, estudo e não desisto!
Através de seu sorriso aprendi a sonhar,
a comemorar meus acertos e rir de meus erros,
a levantar após cada queda e prosseguir, a acreditar num futuro
melhor e a amar com a simplicidade e a intensidade na sua mais
pura forma.
Sem você nada disso faria sentido...*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por me dar forças para continuar.

À minha mãe, Cleuza Ap. Cavalini Batista, pela paciência e apoio imparcial em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

À Universidade Estadual de Maringá - UEM e ao Departamento de Química – DQI pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPQ e a Capes pelo apoio financeiro.

À minha Orientadora Prof^a Dr^a Cleuza Conceição da Silva, pela oportunidade, orientação, incentivo e liberdade de trabalho que proporcionou todas as condições pra o meu desenvolvimento intelectual.

Aos professores Dr^a Silvana M. de Oliveira Santin e Dr. Armando Mateus Pomini pelos conhecimentos transmitidos.

Às professoras Silvana M. de Oliveira Santin, Débora Cristina Baldoqui, Lucília Kato, Cecília M. Alves de Oliveira e Maria Helena Sarragiotto, membros da banca examinadora da qualificação e/ou defesa, por gentilmente aceitar o convite para avaliar e contribuir com o trabalho.

À prof^a Dr^a Ciomar A. Bersani Amado e sua aluna de mestrado, Laura Arruda, pela realização da atividade anti-inflamatória.

À prof^a Dr^a Cecília Maria Alves de Oliveirae prof. Dr. Heleno Dias Ferreira pela coleta e envio do material vegetal.

Aos demais professores do Departamento de Química que contribuíram para minha formação acadêmica.

À Ivânia T. Albrecht Schuquel, pela agilidade e perfeição na realização dos experimentos de RMN, além da disponibilidade e amizade.

À Ana Maria Barelli, por também se dedicar à realização de experimentos de RMN.

À Beatriz Moreno e Marcos Andrea, pelo auxílio na realização dos testes antioxidantes.

À Lucas Ulisses Chiavelli, pela amizade e por realizar as análises no CG-MS

À Thiago Luiz Almeida, amigo que conheci na faculdade e que esteve comigo durante o mestrado, por estar sempre ao meu lado e por ser o irmão que escolhi.

À Hugo Falzirolli, pela amizade e por me ajudar em tudo o que estava dentro (e até mesmo fora) do seu alcance.

À Rebeca Medina e Manu Martini, pelo auxílio e amizade.

À Leonardo Bávaro Pereira, aluno de iniciação científica, pelas conversas, rizadas, esforço dedicado a meu trabalho e, principalmente, pela amizade.

À Álika Sanchez Américo e Mariana Dal Bello, alunas de iniciação científica, pela ajuda e amizade.

À Ane Vanini, pela amizade e bons momentos vividos.

Aos demais colegas de laboratório.

À Lila (Elizangela M. S. de Almeida) pela amizade, desabafos, conversas até a madrugada e por abrir as portas de sua casa para mim durante esse tempo.

À Claudemir e Moacir, funcionários do departamento de química, pelo auxílio prestado.

Ao animal experimental.

Obrigada pela ajuda, sem a qual a realização deste trabalho não seria possível.

*"É preciso a certeza de que tudo vai mudar;
É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós:
onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão.
O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração;
Pois a vida está nos olhos de quem sabe ver ...
Se não houve frutos, valeu a beleza das flores.
Se não houve flores, valeu a sombra das folhas.
Se não houve folhas, valeu a intenção da semente".*
(Henfil)

RESUMO

O gênero *Sabicea* - pertencente à família Rubiaceae, à subfamília *Ixoroideae* e à tribo *Sabiceae* - é composto de cerca de 100 espécies distribuídas pela América Tropical e África, sendo que cerca de 45 a 50 espécies estão presentes na região neotropical. Espécies deste gênero são usadas na medicina popular para o tratamento da dor de estômago, disenteria, malária, reumatismo, dor de dentes, depurativo do sangue, tratamento de doenças venéreas, prisão de ventre, epilepsia, febre, vômitos, insônia, além de uso como adocçante. A espécie *Sabicea brasiliensis*, conhecida popularmente como sangue de cristo, se caracteriza por ser um arbusto com aproximadamente 80cm de altura, ocorrendo nas regiões de cerrado do Brasil sendo que seu uso popular é essencialmente alimentício mas também é empregado no tratamento de infecções nos órgãos genitais de mulheres. Estudos químicos feitos com suas folhas revelaram a presença dos flavonoides canferol-3-*O*-robinobiosídeo, variabilosídeo G e β -sitosterol, sendo que o extrato bruto da mesma mostrou ativo contra oviposição do bichomineiro. A escassez de estudos químicos com espécies do gênero *Sabicea*, mais especificamente com a espécie *S. brasiliensis*, assim como os interessantes usos populares que tais plantas possuem motivaram a realização do presente trabalho que tem como objetivo isolar e caracterizar por métodos espectroscópicos de RMN uni e bidimensionais os principais metabólitos secundários presentes nas raízes da espécie vegetal *Sabicea brasiliensis*, assim como avaliar os potenciais antioxidante e anti-inflamatório do extrato bruto, frações e compostos isolados. Desta forma, o extrato bruto foi submetido à partição com solventes e/ou extração ácido-base e estudos cromatográficos em colunas Sephadex LH 20 e/ou de sílica-gel, conduzindo ao isolamento da cumarina escopoletina, dos ácidos fenólicos 5-*O*-cafeoilquínico, assim como 3,5 e 4,5-*O*-dicafeoilquínico, dos esteroides sitosterol, estigmasterol e campesterol, do esteroide glicosilado daucosterol, do triterpeno ácido ursólico e do dissacarídeo sacarose. Tais compostos tiveram suas estruturas elucidadas a partir de análise dos dados espectrais de RMN uni e bidimensionais e por comparação com os dados constantes na literatura. Na verificação da atividade antioxidante, apenas o extrato bruto e a fração acetato de etila tiveram bom efeito quando comparado ao padrão BHT. Na realização do teste antiedematogênico, o extrato bruto e as frações não tiveram sucesso, porém na avaliação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) as frações

hexânica, acetato de etila e butanólica das raízes de *Sabicea brasiliensis* apresentam uma atividade anti-inflamatória significativa no modelo de migração celular.

Palavras-Chave: Rubiaceae. *Sabicea brasiliensis*. Cumarina. Ácido cafeoilquínico. Triterpenos. Atividade Antioxidante. Atividade Anti-inflamatória.

ABSTRACT

The genus *Sabicea* - belonging to the family Rubiaceae, the subfamily and tribe Ixoroideae Sabiceae –is consists of about 100 species distributed throughout tropical America and Africa, with about 45-50 species are present in the Neotropics. Species of this genus are used in folk medicine for the treatment of stomach pain, dysentery, malaria, rheumatism, toothache, blood cleanser, treating venereal diseases, constipation, epilepsy, fever, vomiting, insomnia, and use as a sweetener. The species *Sabicea brasiliensis*, popularly known as the Sangue-de-cristo, is characterized by a bush with approximately 80cm tall, occurring in the Cerrado regions of Brazil and its use is popular mainly food but also is used to treat infections of the genitals women. Chemical studies made with the leaves revealed the presence of flavonoids kaempferol-3-O-robinobioside, variabilosídeo G and β -sitosterol, and the crude extract just proved active against oviposition leaf miner. The scarcity of studies with chemical species of the genus *Sabicea*, more specifically to the species *S. brasiliensis*, as well as the interesting plants such popular uses that have motivated the present work aims to isolate and characterize by NMR spectroscopic methods and uni-dimensional major secondary metabolites in the roots of the plant species *Sabicea brasiliensis*, as well as evaluating the potential antioxidant and anti-inflammatory effects of crude extract, fractions and isolated compounds. Thus, the crude extract was partitioned with solvents and/or acid-base extraction and chromatographic studies on Sephadex LH 20 column and/or silica gel, leading to the isolation of coumarin scopoletin, phenolic acids 5-O-caffeoylquinic as well as 3,5 and 4,5-O-dicaffeoylquinic, of steroids sitosterol, stigmasterol and campesterol, the glycosylated steroid daucosterol, of triterpene ursolic acid and disaccharide sucrose. Such compounds had their structures elucidated from analysis of NMR spectral data uni and bi dimensional and by comparison with the data in the literature. When verifying the antioxidant activity, only the crude extract and ethyl acetate fraction had good effect when compared to standard BHT. For testing anti-edematogenic, the crude extract and the fractions were not successful, but in assessing the activity of the enzyme Myeloperoxidase (MPO), the fractions hexanic, ethyl acetate and butanol of roots of *Sabicea brasiliensis* present a significant anti-inflammatory activity in the model cell migration

Keywords: Rubiaceae. *Sabicea brasiliensis*. Coumarin. Caffeoylquinic Acid. Triterpens. Antioxidant Activity. Anti-inflammatory Activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização do Bioma Cerrado no Brasil.	1
Figura 2: Comparação entre o número de espécies nas famílias: A- Asteraceae (21.000 espécies); B- Orchidaceae (17.500 espécies); C- Fabaceae (16.500 espécies); D- Rubiaceae (13.000 espécies); E- Rutaceae (8.000 espécies) e F- Mammalia (5.000 espécies).	4
Figura 3: Rota biossintética de ácidos fenólicos.	19
Figura 4: Rota biossintética do ácido quínico.	21
Figura 5: Rota biossintética de cumarinas.	24
Figura 6: Biossíntese do ácido mevalônico sua conversão em Pirofosfato de Isopentenila (IPP) e Pirofosfato de Dimetil-Alila (DMAPP).	26
Figura 7: Formação do Pirofosfato de Geranila (GPP)	27
Figura 8: Formação do pirofosfato de farnesila (FPP) a partir do GPP.	27
Figura 9: Formação do esqualeno a partir do FPP.	28
Figura 10: Formação de esteroides e triterpenos a partir do Esqualeno.	29
Figura 11: Formação de triterpenos a partir do 2,3-epoxi-esqualeno.	30
Figura 12: Esquema resumido da biossíntese dos esteroides.	31
Figura 13: Fotos da espécie vegetal <i>Sabicea brasiliensis</i> .	33
Figura 14: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,06 MHz) da substância S4 .	55
Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 75,45 MHz) da substância S4 .	56
Figura 16: Mapa de correlação heteronuclear HSQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) da substância S4 .	57
Figura 17: Mapa de correlação heteronuclear HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) da substância S4 .	58
Figura 18: Expansões do mapa de correlação heteronuclear HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) da substância S4 .	59
Figura 19: Mapa de correlação homonuclear COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) da substância S4 .	60
Figura 20: Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC e COSY para S4 .	60
Figura 21: Espectro de diferença de NOE da substância S4 com irradiação em δ_{H} 3,96.	61
Figura 22: Espectro de diferença de NOE da substância S4 com irradiação em δ_{H} 7,62.	61

Figura 23: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06MHz) da substância S6 .	65
Figura 24: Expansão dos sinais do espectro de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) da substância S6 .	66
Figura 25: Espectro de RMN de ^{13}C (a), DEPT 135° (b) e DEPT 90° (c) (CD_3OD ; 75,45MHz) da substância S6 .	67
Figura 26: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (^1H x ^{13}C) da substância S6 .	68
Figura 27: Expansões do mapa de correlação heteronuclear HSQC (^1H x ^{13}C) da substância S6 .	69
Figura 28: Mapa de correlação homonuclear COSY (^1H x ^1H) (a) e expansão (b) para a substância S6 .	70
Figura 29: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (^1H x ^{13}C) da substância S6 .	72
Figura 30: Expansões do mapa de correlação heteronuclear HMBC (^1H x ^{13}C) da substância S6 .	73
Figura 31: Principais correlações observadas no mapa correlação heteronuclear HMBC (^1H x ^{13}C) e homonuclear COSY (^1H x ^1H) de S6 .	74
Figura 32: Mapa de correlação espacial NOESY (^1H x ^1H) da substância S6 .	75
Figura 33: Principais correlações observadas no mapa de contornos NOESY para S6 .	76
Figura 34: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) das substâncias S7 e S8 .	82
Figura 35: Expansão dos sinais do espectro de ^1H da substância S7 .	83
Figura 36: Espectro de RMN de ^{13}C (a), DEPT 135° (b) e DEPT 90° (c) (CD_3OD ; 75,45MHz) das substâncias S7 e S8 .	84
Figura 37: Expansão do espectro de ^{13}C na região do grupo cafeoil de S7 .	85
Figura 38: Expansão do espectro de ^{13}C na região do grupo quínico da substância S7 .	86
Figura 39: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (^1H x ^{13}C) das substâncias S7 e S8 .	87
Figura 40: Expansões do mapa de correlação heteronuclear HSQC (^1H x ^{13}C) das substâncias S7 e S8 .	88
Figura 41: Expansões do mapa de correlação heteronuclear HSQC (^1H x ^{13}C) das substâncias S7 e S8 .	89
Figura 42: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (^1H x ^{13}C) das substâncias S7 e S8 .	90
Figura 43: Expansões do mapa de correlação heteronuclear HMBC	91

$(^1\text{H} \times ^{13}\text{C})$ das substâncias S7 e S8 .	
Figura 44: Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) das substâncias S7 e S8 .	92
Figura 45: Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) das substâncias S7 e S8 .	93
Figura 46: Mapa de correlação homonuclear COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) das substâncias S7 e S8 .	95
Figura 47: Expansão do mapa de correlação homonuclear COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) das substâncias S7 e S8 .	96
Figura 48: Expansão dos sinais do espectro de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) da substância S8 .	98
Figura 49: Expansão do espectro de ^{13}C na região do grupo cafeoil da substância S8 .	99
Figura 50: Expansões dos sinais do espectro de ^{13}C na região do grupo quínico da substância S8 .	100
Figura 51: Principais correlações espaciais observadas nos mapas de correlação heteronuclear HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) e homonuclear COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) das substâncias S7 e S8 .	102
Figura 52: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,06 MHz) das substâncias S1 , S2 e S3 .	107
Figura 53: Espectro de RMN de ^{13}C (a), DEPT 135° (b) e DEPT 90° (c) (CDCl_3 ; 75,45MHz) das substâncias S1 , S2 e S3 .	108
Figura 54: Expansão dos sinais do espectro de ^{13}C das substâncias S1 , S2 e S3 .	109
Figura 55: Cromatograma obtido na análise por CG-EM para a mistura de substâncias S1 , S2 e S3 .	110
Figura 56: Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) da substância S1 .	110
Figura 57: Esquema de fragmentação da substância S1 .	111
Figura 58: Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) da substância S3 .	113
Figura 59: Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) da substância S2 .	114
Figura 60: Espectro de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 300,06MHz) da substância S9 .	117
Figura 61: Expansão dos sinais do espectro de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 300,06 MHz) da substância S9 .	118
Figura 62: Espectro de RMN de ^{13}C (a), DEPT 135° (b) e DEPT 90° (c) ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 75,45MHz) de S9 .	119
Figura 63: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,06MHz) da substância S5	122

Figura 64: Expansão dos sinais do espectro de ^1H (CDCl_3 ; 300,06 MHz) da substância S5 .	123
Figura 65: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 75,45 MHz) das substâncias S5 .	124
Figura 66: Expansões dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 75,45 MHz) da substância S5 .	125
Figura 67: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) da substância S10 .	128
Figura 68: Espectro de RMN de ^{13}C (a), DEPT 135° (b) e DEPT 90° (c) (CD_3OD ; 75,45 MHz) da substância S10 .	129
Figura 69: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (a), DEPT 135° (b) e DEPT 90° (c) (CD_3OD ; 75,45 MHz) da substância S10 .	130
Figura 70: Estabilização do radical livre DPPH.	132
Figura 71: Atividade antioxidante do extrato bruto de <i>Sabicea brasiliensis</i> .	133
Figura 72: Atividade antioxidante da fração Acetato de Etila de <i>Sabicea brasiliensis</i> .	133
Figura 73: Edema de orelha induzido pelo Óleo de Cróton (OC) (200mg) em camundongos Swiss, machos (30-40 g). A acetona 70%, o clorofórmio, o extrato bruto, as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, butanólica e hidrometanólica (5 mg/orelha) foram aplicadas topicamente, após a aplicação do Óleo de Cróton (20 ml/orelha). A acetona 70% e o clorofórmio foram utilizados como veículo (20ml/orelha). Cada barra representa o peso médio das orelhas \pm E.P.M., 6 h após aplicação do Óleo de Cróton. (ANOVA, seguido do teste de Tukey.	134
Figura 74: Atividade da MPO no tecido das orelhas de camundongos Swiss, machos (30-40 g). Os animais foram tratados por via tópica com os veículos (acetona/água e clorofórmio), o extrato bruto, as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, butanólica e hidrometanólica (5mg/orelha), imediatamente após a aplicação do óleo de cróton (OC). Outro grupo recebeu apenas a aplicação dos veículos (acetona/água e clorofórmio). Cada coluna representa a atividade média da MPO \pm E.P.M. * $P < 0.05$ comparado ao grupo OC+Veículo acetona/água (ANOVA, seguida do teste de Tukey, com 5% de nível de significância).	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidade de espécies animais catalogadas no cerrado.	2
Tabela 2: Substâncias isoladas de espécies da subfamília Ixoroideae.	9
Tabela 3: Dados do fracionamento em gel de sílica da fração SBH.	38
Tabela 4: Dados do fracionamento em gel de sílica da fração SBC.	41
Tabela 5: Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração C8.	41
Tabela 6: Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SBA.	43
Tabela 7: Dados do fracionamento em gel de sílica da fração A6.	43
Tabela 8: Dados do fracionamento em Sephadex LH 20 da fração A7.	44
Tabela 9: Dados do fracionamento em Sephadex LH 20 da fração A8.	45
Tabela 10: Dados do fracionamento em Sephadex LH 20 da fração SBA'.	46
Tabela 11: Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SBB.	47
Tabela 12: Dados do fracionamento em gel de sílica da fração SBB'.	49
Tabela 13: Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração Clorofórmica Básica Alcalóidal.	52
Tabela 14: Correlações observadas no mapa de contornos HMBC para S4.	59
Tabela 15: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para S4 e para a Escopoletina.	62
Tabela 16: Correlações observadas no mapa de contornos ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) COSY para S6	71
Tabela 17: Correlações observadas no mapa de contornos HMBC para S6	74
Tabela 18: Correlações observadas no mapa de contornos NOESY para S6	76
Tabela 19: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S6 e para os isômeros dos ácidos 3- <i>O</i> -cafeoilquínico, 4- <i>O</i> -cafeoilquínico e 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (Região do Grupo Quínico).	77
Tabela 20: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S6 e para os isômeros dos ácidos 3- <i>O</i> -cafeoilquínico, 4- <i>O</i> -cafeoilquínico e 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (Região do grupo cafeeiro).	78
Tabela 21: Correlações observadas no mapa de contornos HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) para S7.	94

Tabela 22: Correlações observadas no mapa de contornos ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) COSY para S7 .	97
Tabela 23: Correlações observadas no mapa de contornos HMBC para S8 .	101
Tabela 24: Correlações observadas no mapa de contornos ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) COSY para S8 .	101
Tabela 25: Dados de RMN de ^1H para a mistura das substâncias S7 e S8 e para os isômeros do ácido <i>O</i> -cafeoilquínico.	103
Tabela 26: Dados de RMN de ^{13}C /DEPT de S7 e S8 e isômeros do ácido <i>O</i> -dicafeoilquínico.	104
Tabela 27: Principais fragmentações observadas nos espectros de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para as substâncias S1 , S2 e S3 .	112
Tabela 28: Dados de RMN de ^{13}C / DEPT para a mistura de substâncias S1 , S2 e S3 e para os esteroides sitosterol, estigmasterol e campesterol.	115
Tabela 29: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C /DEPT para S10 e para o daucosterol.	120
Tabela 30: Dados de RMN de ^{13}C para a substância S5 e para o ácido ursólico.	126
Tabela 31: Dados de RMN de ^{13}C /DEPT de S11 e da Sacarose.	131

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Fracionamento líquido-líquido do extrato bruto de <i>Sabicea brasiliensis</i> .	37
Esquema 2: Estudo da fração hexânica SBH.	38
Esquema 3: Estudo da fração clorofórmica (SBC).	40
Esquema 4: Estudo da fração acetato de etila (SBA).	42
Esquema 5: Estudo da segunda parte da fração acetato de etila (SBA').	45
Esquema 6: Estudo da fração butanólica a) SBB e b)SBB'.	47
Esquema 7: Procedimento empregado para o fracionamento por extração ácido-base do extrato bruto de <i>Sabicea brasiliensis</i> .	51
Esquema 8: Estudo da fração Clorofórmica Básica Alcaloídica (Alc).	52

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

δ	Deslocamento químico (em ppm)
δ_C	Deslocamento químico de carbono-13
δ_H	Deslocamento químico de hidrogênio
^{13}C	Carbono 13
^1H	Hidrogênio 1
ATP	Adenosina Trifosfato
CC	Coluna cromatográfica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
Coa	Coenzima A
COSY	Espectroscopia de correlação ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$)
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo duplete
<i>ddd</i>	Duplo duplo duplete
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DAHPh	Ácido 3-desoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato sintase
DMAPP	Dimetil Pirofosfato
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
FPP	Pirofosfato de Farnesila
Enz	Enzima
Gli	Glicose
GPP	Pirofosfato de Geranila
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril CoA
HSQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
Hz	Hertz
IC	Concentração inibitória
IPP	Pirofosfato de Isopentenila
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MHz	Megahertz
MPO	Mieloperoxidase

NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NOE	Efeito nuclear Overhauser
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
PEP	Fosfoenolpiruvato
PP	Difosfato
ppm	Partes por milhão
<i>q</i>	Quarteto
RMN	Ressonância magnética nuclear
<i>s</i>	Simpleto
SAM	S-adenosil metionina
<i>t</i>	Tripleto

1	Introdução.....	1
1.1	Aspectos Gerais.....	1
1.2	O Cerrado.....	1
1.3	Família Rubiaceae.....	3
1.4	Subfamília Ixoroideae.....	9
1.5	Considerações Sobre Ácidos Fenólicos.....	17
1.5.1	Biossíntese de Ácido Fenólicos.....	18
1.5.2	Atividades Antioxidantes de Ácidos Fenólicos.....	19
1.5.3	Considerações Sobre o Ácido Quínico.....	20
1.6	Considerações Sobre Cumarinas.....	21
1.6.1	Biossíntese de Cumarinas.....	23
1.7	Considerações Sobre Triterpenos e Esteroides.....	25
1.7.1	Biossíntese de Triterpenos.....	25
1.7.2	Biossíntese de Esteroides.....	31
1.8	Gênero <i>Sabicea</i>	32
1.9	Espécie Vegetal <i>Sabicea Brasiliensis</i>	32
2	Objetivos.....	34
3	Material Vegetal.....	34
4	Parte Experimental.....	35
4.1	Materiais e Métodos.....	35
4.2	Estudo Fitoquímico das Raízes de <i>Sabicea Brasiliensis</i>	36
4.2.1	Obtenção do Extrato Bruto Metanólico das Raízes de <i>S. Brasiliensis</i>	36
4.2.2	Fracionamento do Extrato Bruto Metanólico de <i>S. Brasiliensis</i>	36
4.2.2.1	Estudo da Fração Hexânica (SBH).....	37
4.2.2.2	Estudo da Fração Clorofórmica (SBC).....	39
4.2.2.3	Estudo da Fração Acetato de Etila (SBA).....	42
4.2.2.4	Estudo da Fração Butanólica (SBB).....	47
4.2.2.5	Estudo da Fração Hidrometanólica (SBHM).....	50
4.2.3	Extração Ácido-Base.....	50
4.3	Determinação da Atividade Antioxidante.....	52
4.4	Bioensaio para a Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória.....	53
4.4.1	Teste Antiendematogênico.....	53
4.4.2	Atividade da Mieloperoxidase.....	53
5	Resultados E Discussão.....	54
5.1	Elucidação Estrutural de S4.....	54
5.2	Elucidação Estrutural de S6.....	63
5.3	Elucidação Estrutural de S7 e S8.....	79
5.4	Elucidação Estrutural de S1, S2 e S3.....	105
5.5	Elucidação Estrutural de S9.....	116
5.6	Elucidação Estrutural de S5.....	121
5.7	Elucidação Estrutural de S10.....	127
5.8	Avaliação da Atividade Antioxidante.....	131
5.9	Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória.....	134
5.9.1	Teste Antiedematogênico.....	134
5.9.2	Atividade da Mieloperoxidase.....	135
6	Conclusão.....	136
7	Referências.....	138

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

Ao longo dos anos a humanidade tem extraído das plantas muitas substâncias que possuem os mais variados usos, sendo empregadas como perfumes, pigmentos, venenos e remédios. Conhecendo o poder medicinal das plantas e em busca de se determinar os constituintes químicos das mesmas são realizados estudos fitoquímicos que possibilitam a obtenção de inúmeros compostos (CECHINEL, 1997).

Por mais de dois séculos a química e a biologia tem dado atenção ao isolamento e estudo de substâncias naturais, sendo que a Química de Produtos Naturais tornou-se responsável pelo estudo dos metabólitos secundários; a importância destes é indiscutível estando, juntamente com metabolismos primários, intimamente ligados aos processos de nascimento, crescimento, reprodução, envelhecimento e morte dos organismos vivos (BRAZ-FILHO, 1994). Nesse contexto, tem grande importância o desenvolvimento de novos fármacos a partir do isolamento de constituintes químicos de vegetais ou animais que possuem atividade fisiológica e biológica significativa no organismo humano (CECHINEL, 1997).

1.2 O CERRADO

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2013), o Cerrado ocupa cerca de 22% do território nacional (2.036.448 km²) e é o segundo maior bioma da América do Sul abrangendo os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos enclaves no Amapá, Roraima e Amazonas (**Figura 1**).

Figura 1: Localização do Bioma Cerrado no Brasil



Fonte: SANO, 2007.

O cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo com grande diversidade fauna, como pode ser observado pela **Tabela 1**.

Tabela 1: Quantidade de espécies animais catalogadas no cerrado (KLINK, 2005).

Quantidade de espécies catalogadas	
Mamíferos	199
Aves	837
Peixes	1200
Répteis	180
Anfíbios	150

No que diz respeito à flora, esse bioma é composto por três tipos de formações vegetais (SANO, 2007):

- Campestre: áreas com predomínio de herbáceas e algumas plantas arbustivas, porém sem a presença de árvores;
- Savânica: áreas com árvores e arbustos espalhados sobre um estrato gramíneo;
- Florestal: área com predomínio de espécies arbóreas.

O Cerrado abriga 11.627 espécies de plantas nativas, sendo que mais de 220 espécies têm uso medicinal, podendo ser citadas a *Psychotria ipecacuanha* (Poiaia), *Palicourea rigida* (douradão) e *Genipa americana* (jenipapo) pertencentes à família Rubiaceae e que apresentam potenciais biológicos e químicos. Na recuperação de solos degradados, 416 espécies podem ser usadas como barreiras contra o vento, proteção contra a erosão, ou para criar habitat de predadores naturais de pragas. Mais de 10 tipos de frutos comestíveis são consumidos pela população local e vendidos nos centros urbanos, como os frutos do Pequi (*Caryocar brasiliense*), Buriti (*Mauritia flexuosa*), Mangaba (*Hancornia speciosa*), Cagaita (*Eugenia dysenterica*), Bacupari (*Salacia crassifolia*), Cajuzinho do cerrado (*Anacardium humile*), Araticum (*Annona crassifolia*) e as sementes do Barú (*Dipteryx alata*) (Ministério do Meio Ambiente, 2013) (GUARIM, 2003).

Com tantas espécies presentes, tem-se uma produção de diversos metabólitos secundários, sendo que vários destes têm atividades biológicas. Essa diversidade pode estar relacionada ao clima quente e seco e à aridez do solo, como tentativa das plantas em se adaptar a condições tão extremas. Estudos fitoquímicos realizados com espécies

desta região aliados a bioensaios podem auxiliar na descoberta de novos fármacos e auxiliar nas classificações taxonômicas (OLIVEIRA, 2009).

Ainda de acordo o Ministério do Meio Ambiente (2013), além dos aspectos ambientais o Cerrado tem grande importância social, visto que muitas populações sobrevivem de seus recursos naturais incluindo etnias indígenas, quilombolas, ribeirinhos, babaqueiros e vazanteiros. Contudo, inúmeras espécies de plantas e animais correm risco de extinção; estima-se que 20% das espécies nativas e endêmicas já não ocorram em áreas protegidas e que pelo menos 137 espécies de animais que ocorrem no Cerrado estão ameaçadas de extinção. Desta forma, a conservação do cerrado tem se tornado motivo de preocupação, visto que apenas 60 % da área total é constituída por cobertura vegetal natural sendo as demais áreas destinadas à agricultura, pastagens e áreas urbanas.

Quanto às ameaças à biodiversidade podem ser considerados os seguintes fatores (KLINK, 2005):

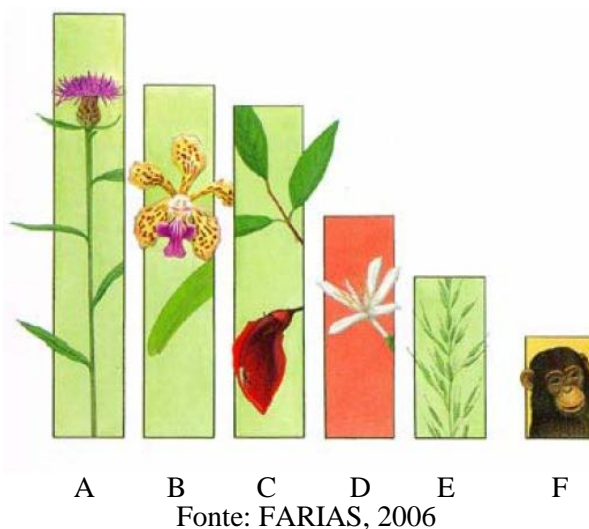
- A degradação do solo e dos ecossistemas nativos (desmatamento);
- A dispersão de espécies exóticas;
- O uso extensivo de fertilizantes e calcário (poluem córregos e rios);
- Amplo uso de gramíneas africanas para a formação de pastagens (prejudicial à biodiversidade);
- Queimadas (afetam negativamente o estabelecimento de árvores e arbustos e liberam para a atmosfera dióxido de carbono - CO₂ - e outros gases causadores do efeito estufa).

Nesse contexto, o conhecimento sólido do Cerrado é importante para implementar estratégias governamentais de preservação, garantindo a sobrevivência da fauna e flora deste bioma tão rico.

1.3 FAMÍLIA RUBIACEAE

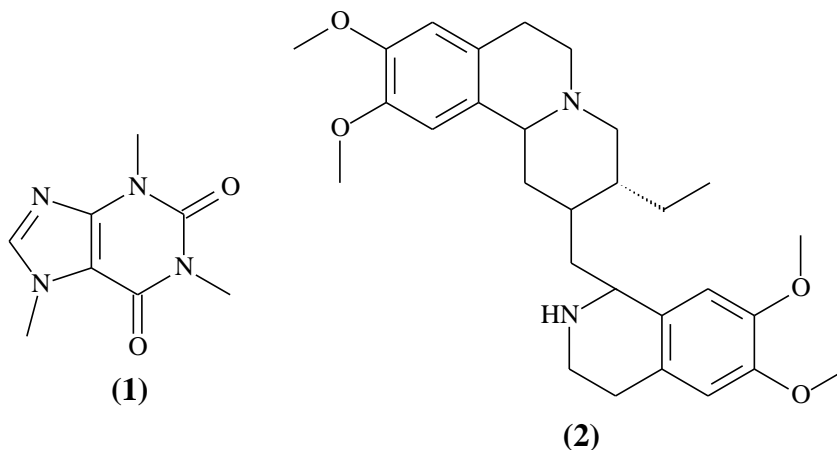
A família Rubiaceae ocupa o quarto lugar em diversidade de espécies entre as Angiospermas (MABBERLY, 1997; ROBBRECHT, 2005) (**Figura 2**), sendo constituída por quatro subfamílias (*Rubioideae*, *Cinchonoideae*, *Ixoroideae* e *Antirheoideae*) e quarenta e quatro tribos, cerca de 650 gêneros e aproximadamente 13.000 espécies que se apresentam como árvores de grande, médio e pequeno porte, arbustos, subarbustos e ervas distribuídas em regiões quentes, principalmente tropicais (DELPRETE, 2004a).

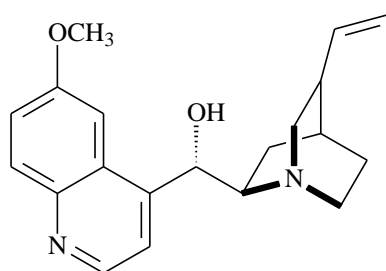
Figura 2: Comparação entre o número de espécies nas famílias: **A**-Asteraceae (21.000 espécies); **B**-Orchidaceae (17.500 espécies); **C**-Fabaceae (16.500 espécies); **D**-Rubiaceae (13.000 espécies); **E**-Rutaceae (8.000 espécies) e **F**-Mammalia (5.000 espécies)



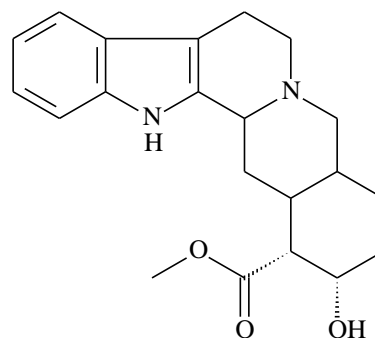
Segundo CORDELL (2001) até o ano de 2001 haviam sido estudados 57 gêneros e 181 espécies da família Rubiaceae, com isolamento de 677 alcaloides de doze classes diferentes, com destaque para os alcaloides indólicos (391), quinolínicos (70) e isoquinolínicos (44), que detêm a maior parte das estruturas.

Com base nos compostos isolados desta família, detentores de alta diversidade de usos e de atividades farmacológicas, vários estudos com interesse industrial para os mesmos vem sendo desenvolvidos. No que diz respeito aos alcalóides, muitas dessas substâncias são empregadas no tratamento de diferentes doenças, podendo ser destacadas a cafeína (1) isolada de *Coffea arábica* e utilizada em vários medicamentos; a ementina (2), isolada da *Cephaelis ipecacuanha*, com propriedades emética e antiamebicida; quinina (3) (*Chincona ledgeriana*) com atividade antimalárica e a ioimbina (4), isolada de *Pausinystalia yoimba*, com efeito afrodisíaco (CORDELL, 2001).



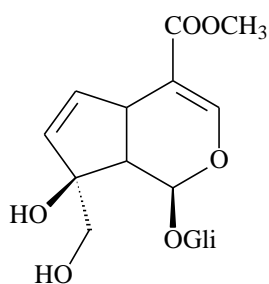


(3)

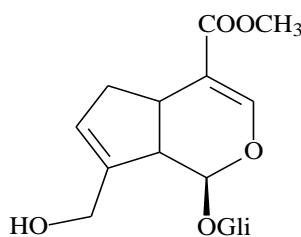


(4)

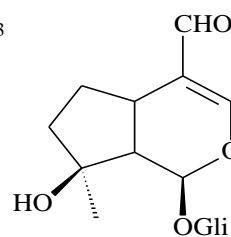
Os iridoides também estão presentes nas Rubiáceas, sendo considerados como marcadores quimiotaxonômicos desta família. A subfamília *Ixoroideae* é caracterizada pela produção de gardenosídeo (5), geniposídeo (6) e ixorosídeo (7); na subfamília *Rubioideae* estão constantemente presentes o deacetilasperulosídeo (8) e as subfamílias *Antirheoideae* e *Cinchonoideae* apresentam loganinas ou seco-iridoides (INOUE, 1988).



(5)



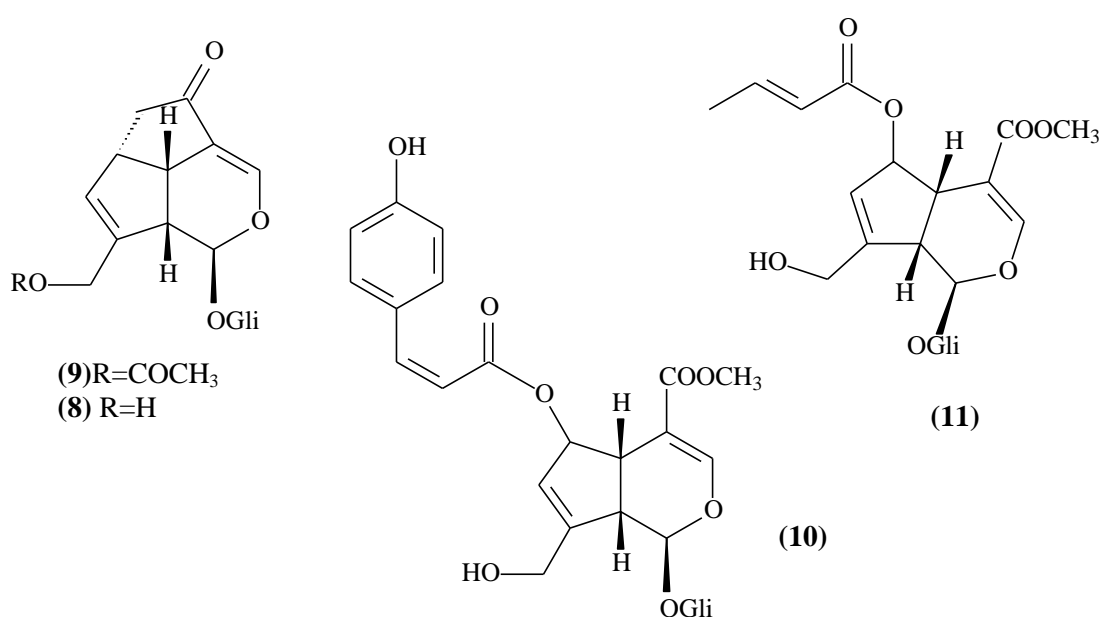
(6)



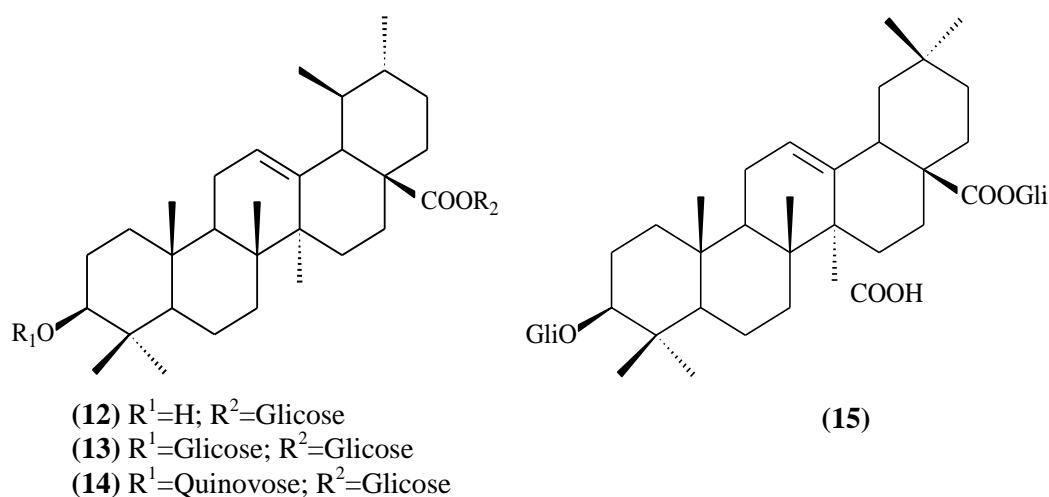
(7)

A impressionante capacidade das Rubiaceae em produzir metabólitos secundários diversificados justifica o interesse em se estudar espécies desta família; assim sendo, o Grupo FitoSin - Produtos Naturais e Síntese Orgânica da UEM- vem se preocupando em examinar, entre outras, espécies desta família. Nesse contexto, diversos trabalhos já foram concluídos e evidenciaram, mais uma vez, essa pluralidade de substâncias presentes na família, sendo que alguns desses estudos estão descritos abaixo.

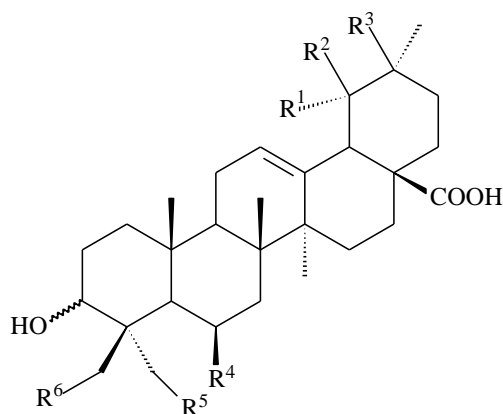
Das partes aéreas de *Galianthe brasiliensis* (MOURA, 2006), os iridoides glicosilados asperalusídeo (9), deacetilasperalusídeo (8) e uma mistura dos ésteres metílicos dos isômeros Z- e E-6- *O-p*-coumaroilescandosídeo (10 e 11) foram isolados.



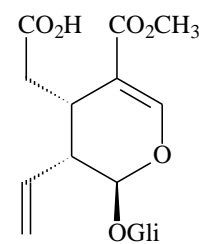
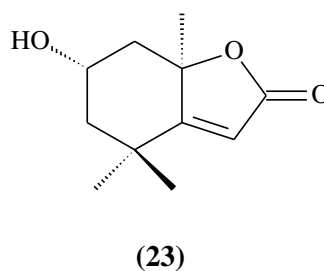
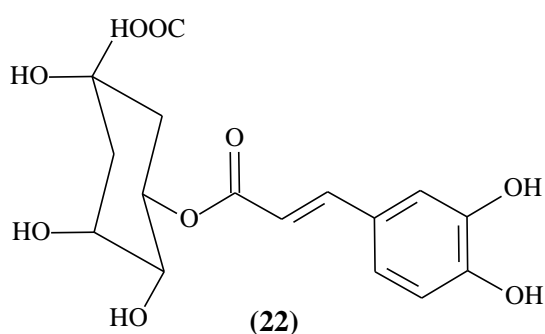
As raízes de *Guettarda pohliana* foram estudadas e delas foram isoladas as saponinas 28-*O*-β-D-glicopiranosilquinóvico (12), 3-*O*-β-D-glicopiranosil-28-*O*-β-D-glicopiranosilquinóvico (13), 3-*O*-β-D-quinovopiranosil-28-*O*-β-D-glicopiranosilquinóvico (14) e 3-*O*-β-D-glicopiranosil-28-*O*-β-D-glicopiranosilcincólíco (15) (OLIVEIRA, 2008).



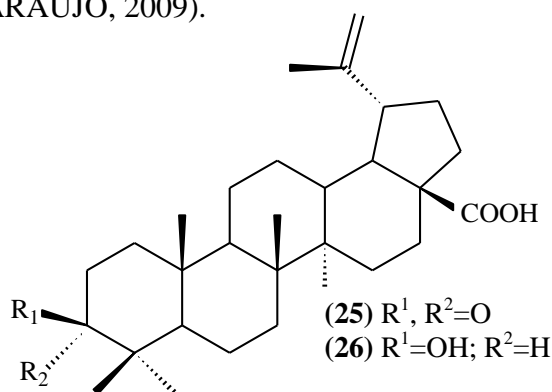
O estudo fitoquímico das folhas desta mesma espécie resultou no isolamento dos ácidos ursólico (16), oleanólico (17), pomólico (18), rotúndico (19), 3b,6b,19a,23-tetra-hidroxiurs-12-en-28-óico (20), clétrico (21) e 5-*O*-cafeoilquínico (22), assim como da loliolida (23) e do secoiridoide secoxiloganina (24) (TESTA, 2012).



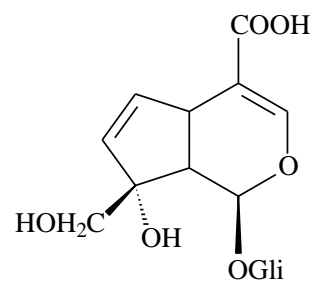
- (16) $3\beta\text{-OH}$, $R^2=\text{CH}_3$; $R^1=R^3=R^4=R^5=R^6=\text{H}$
 (17) $3\beta\text{-OH}$, $R^3=\text{CH}_3$; $R^1=R^2=R^4=R^5=R^6=\text{H}$
 (18) $3\beta\text{-OH}$, $R^1=\text{OH}$; $R^2=\text{CH}_3$; $R^3=R^4=R^5=R^6=\text{H}$
 (19) $3\beta\text{-OH}$, $R^1=R^5=\text{OH}$; $R^2=\text{CH}_3$; $R^3=R^4=R^6=\text{H}$
 (20) $3\beta\text{-OH}$, $R^1=R^5=\text{OH}$; $R^2=R^3=R^4=R^6=\text{H}$
 (21) $3\alpha\text{-OH}$, $R^1=R^5=R^6=\text{OH}$; $R^2=R^3=R^4=\text{H}$



Das folhas e galhos da espécie *Coussarea plathyphylla* foram isolados os triterpenos ácido betulônico (25), ácido betulínico (26) e o iridoide monotropeína (27) (ARAÚJO, 2009).

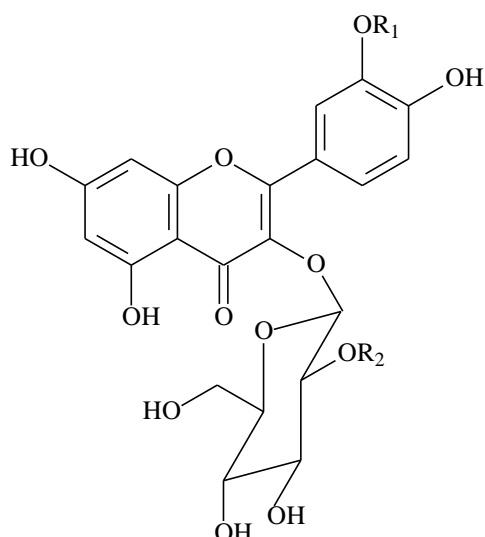


- (25) $R^1, R^2=\text{O}$
 (26) $R^1=\text{OH}$; $R^2=\text{H}$



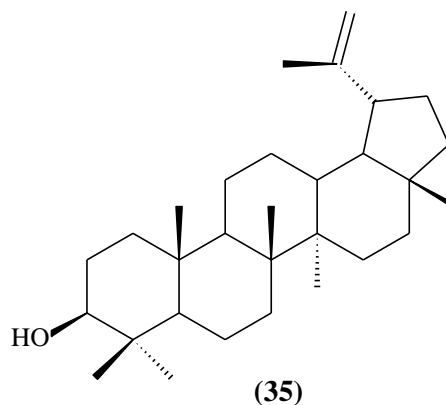
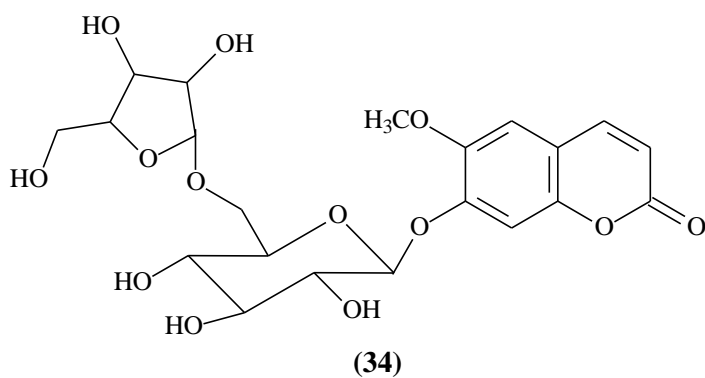
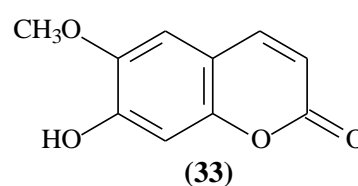
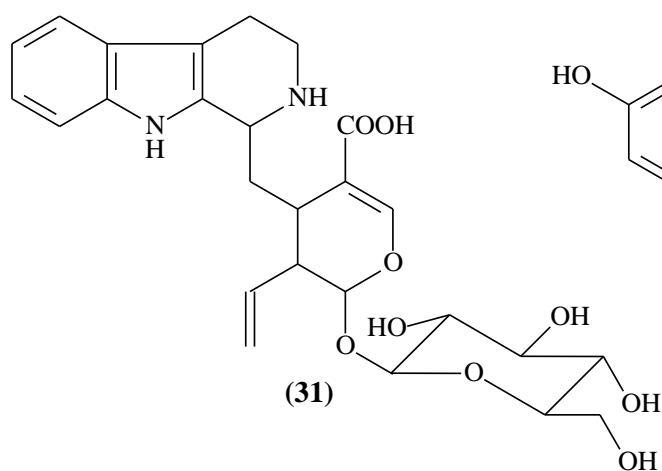
(27)

O isolamento dos flavonoides quercetina 3-*O*- β -D-glicosídeo (28), isoraminetina 3-glicosídeo (29) e quercetina 3-*O*-soforosídeo (30) foi conseguido através do estudo das folhas de *Palicourea rigida* (ROSA, 2010).

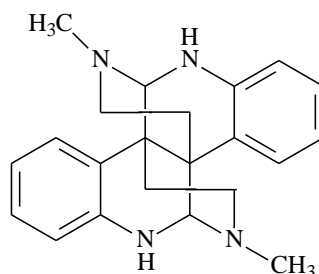
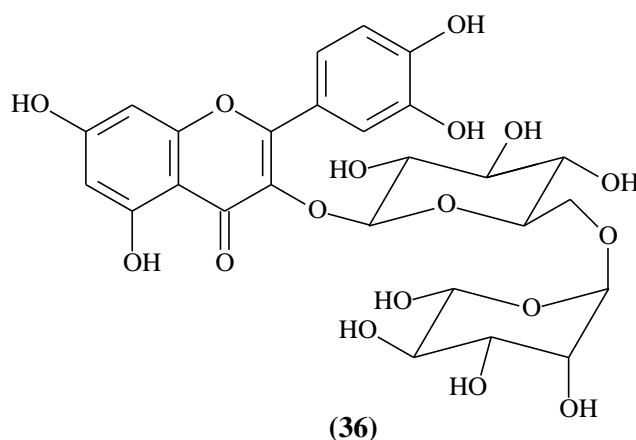


- (28) $R^1=H$; $R^2=H$
 (29) $R^1=CH_3$; $R^2=H$
 (30) $R^1=H$; $R^2=Glicose$

Das flores desta planta foram isolados o alcaloide ácido strictosidínico (31), a antraquinona tectoquinona (32) e a cumarina escopoletina (33) (ROSA, 2009), sendo esta última também encontrada nas raízes de *P. rigida*, juntamente com a cumarina himexelsina (34) e os triterpenos ácido betulínico (26) e lupeol (35) (ALVES, 2011).



Da espécie vegetal *Palicourea coriacea* foram isoladas a rutina (36) das flores e a calincantina (37) das folhas (ROSA, 2009).



1.4 SUBFAMÍLIA IXOROIDEAE

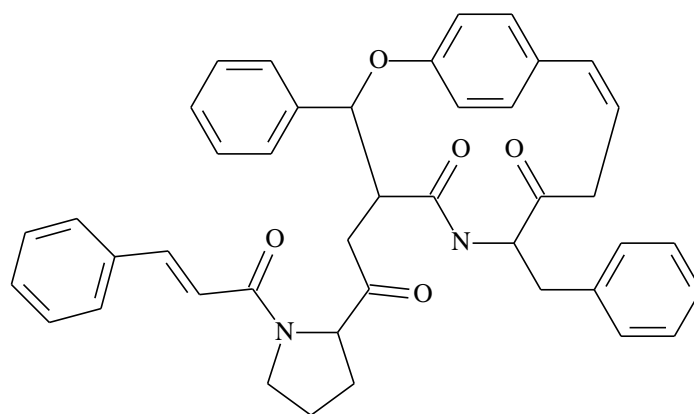
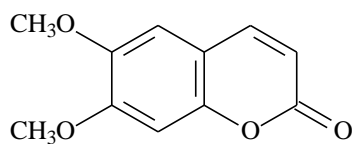
Na subfamília Ixoroideae, os iridoides chamam a atenção por estarem sempre presentes em espécies desta subfamília; mesmo assim, as mesmas não deixam de apresentar uma grande variedade de classes de metabólitos, como terpenos, flavonoides, cumarinas, ácido fenólicos e alcaloides, como pode ser observado na **Tabela 2**.

Tabela 2: Substâncias isoladas de espécies da subfamília Ixoroideae.

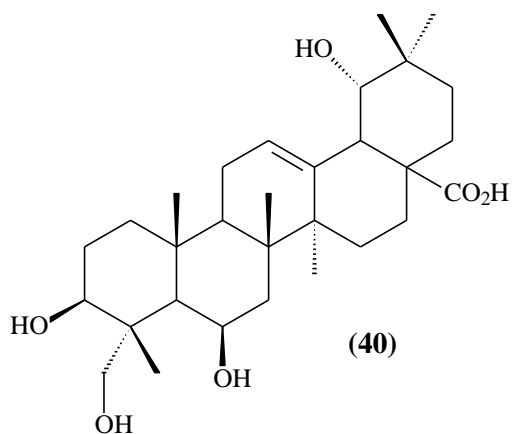
<i>Espécie</i>	Tribo	Substância isolada	Referência
<i>Amaioua guianensis</i>	Gardenieae	Escoparona (38)	VIEIRA, 2010
		Amaiouina (39)	
		3β-6β-19α-23-tetrahidroxiolean-12-em-28-oico (40)	
		3β-6β-19α-23-tetrahidroxiurs-12-em-28-oico (41)	
		Ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico (42)	
		Ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquinato de metila (43)	
<i>Augusta longifolia</i>	Rondeletieae	Gardenosídeo (5)	CHOZE, 2010
		Plumericina (44)	
		Acil lupeols (45 e 46)	
		Escopoletina (33)	

		Naringenina (47)	
		Canferol (48)	
		Quercertina (49)	
		Rutina (36)	
		Miricitrina (50)	
		Ácido 2-metoxi-4-hidroxibenzóico (51)	
<i>Canthium anorldianum</i>	Condamineae	Anorldianina (52)	DONGO, 1989
<i>Duroia macrophylla</i>	Gardenieae	Ácido Ursólico (16) Ácido Oleanólico (17)	MARTINS, 2013
<i>Gardenia jasminoides</i>	Gardenieae	Gardenosídeo (5) Geniposídeo (6) Shanzhideo (53) Gardosídeo (54) Lupeol (35) Daucosterol (55) 3-β-palmitato de lupeonila (56) 3-β-estearato de lupeonila (57) 3-β-eicosanato de lupeonila (58)	INOUYE, 1988
<i>Ixora brevifolia</i>	Ixoreae	α-amirina (59) β-amirina (60) 30-hidroxifriedelan-3-ona (61) Quercertina (49) Manitol (62) Cinantanina B1 (63) (+)-seringaresinol (64) Frangulanina (65)	SILVA, 2007 MEDINA, 2011
<i>Ixora coccinea</i>	Ixoreae	Epicatequina (66) Procianidina A2 (67) Ixoratanina A2 (68) Cinantanina B1 (63) Ixorapeptídeo I (69) e II (70)	IDOWU, 2010
<i>Ixora javanica</i>	Ixoreae	Ácido ferúlico (71) Ácido cafeico (72) Ácido protocatecuico (73)	LEE, 2010
<i>Randia canthioides</i>	Gardenieae	10-deidrogardenosídeo (74)	YNOUYE, 1988

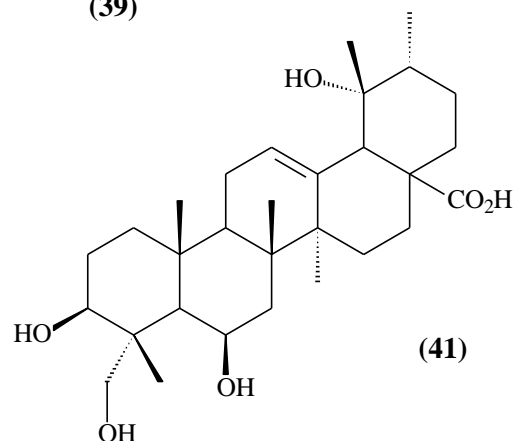
<i>Randia spinosa</i>	Gardenieae	Randinosídeo (75)	HAMERSKI, 2003
		Galiosídeo (76)	
		Gardenosídeo (5)	
		Geniposídeo (6)	
<i>Tocoyena brasiliensis</i>	Gardenieae	Ácido 3-O- β -D-quinovopiranosídeo-quinóvico (77)	HAMERSKI, 2005
		Ácido 3-O- β -D-quinovopiranosídeo-cinchólico (78)	
		Ácido 3-O- β -D-quinovopiranosídeo-quinóvico (79)	
		Ácido 28-O- β -D-glucopiranosídeo-quinóvico (80)	
		Ramanzina-3-O-rutinosídeo (81)	
<i>Tocoyena formosa</i>	Gardenieae	α -gardiol (82)	BOLZANI, 1997
		β -gardiol (83)	
		Formosinisídeo (84)	



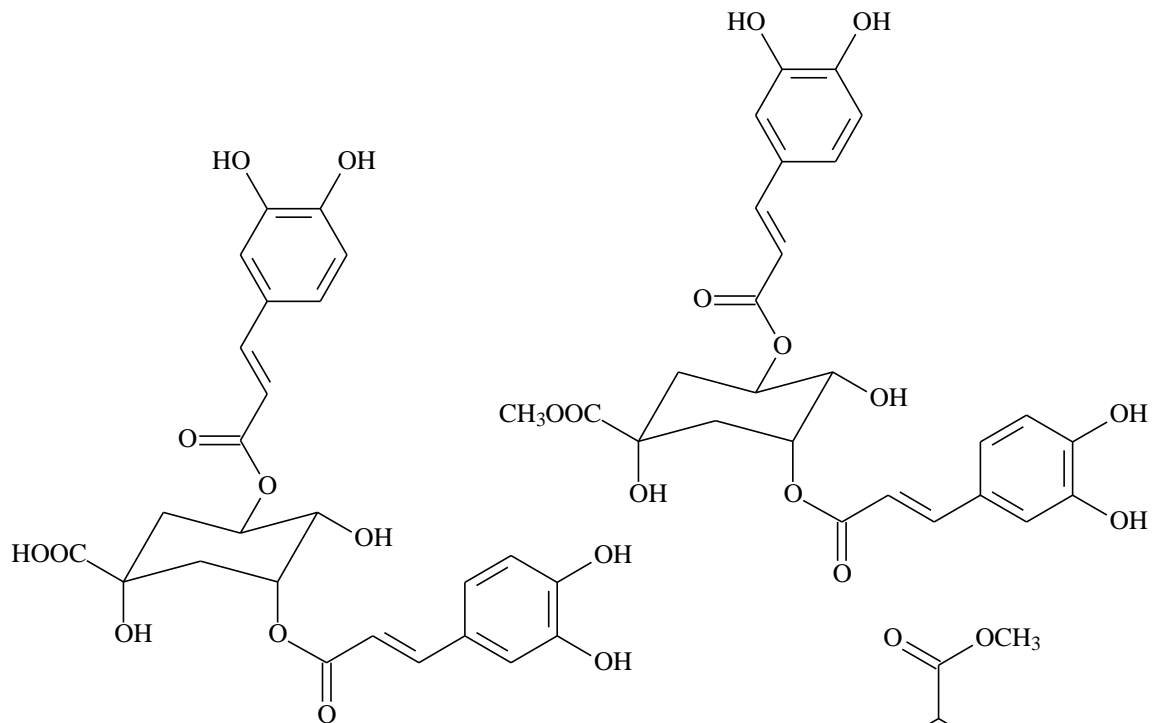
(39)



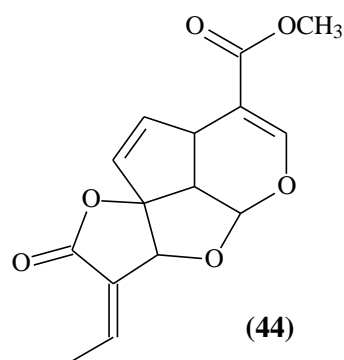
(40)



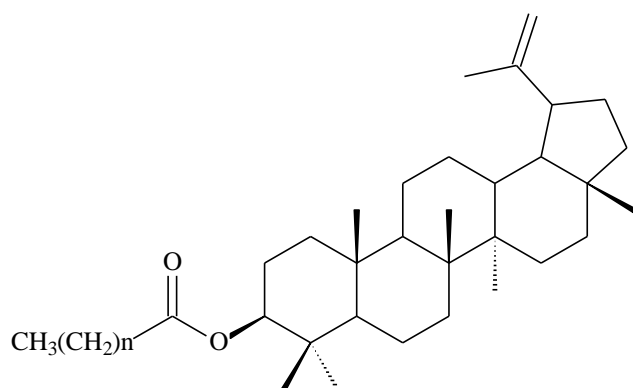
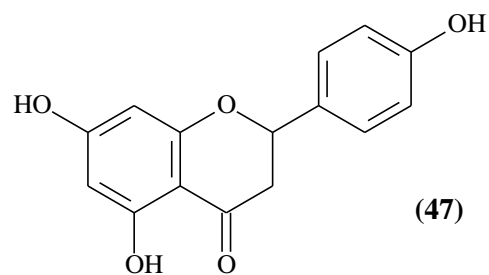
(41)



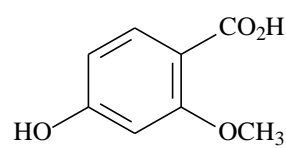
(42)



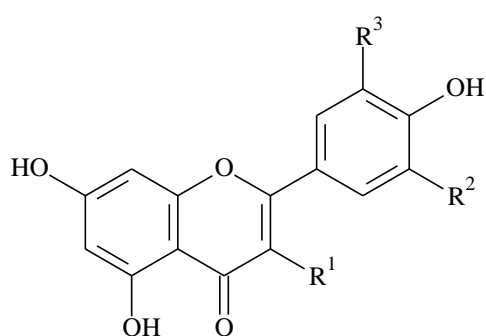
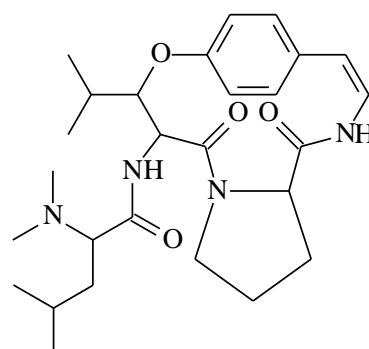
(44)

(45): $n=8$ (46): $n=10$ 

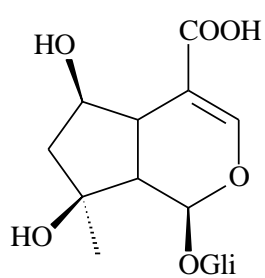
(47)



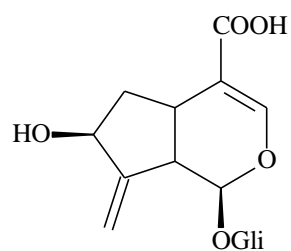
(51)

(48): $R^1=OH; R^2=R^3=H$ (49): $R^1=R^3=OH; R^2=H$ (50): $R^1=O\text{-Rannose}; R^2=R^3=OH$ 

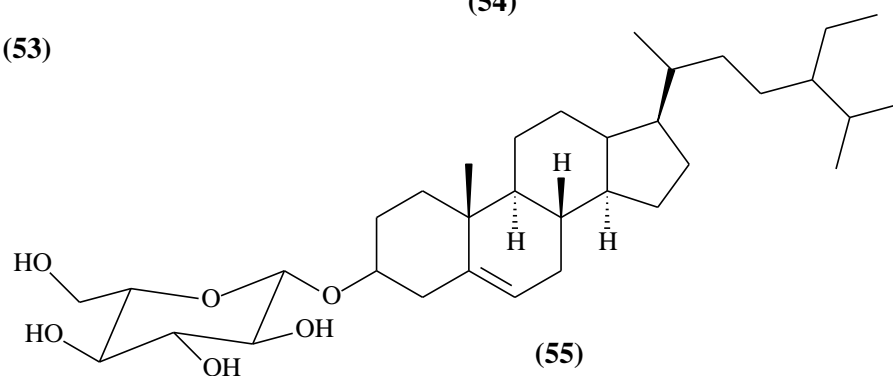
(52)



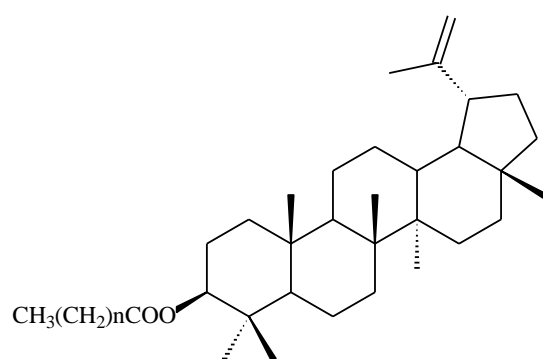
(53)



(54)



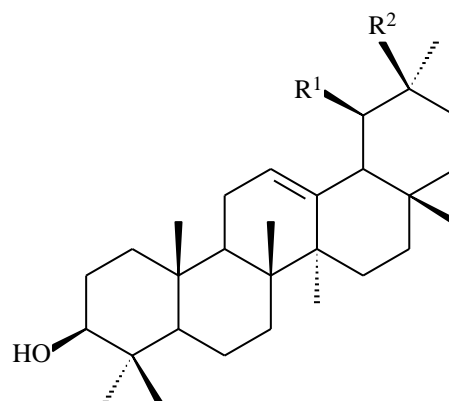
(55)



(56): $n=14$

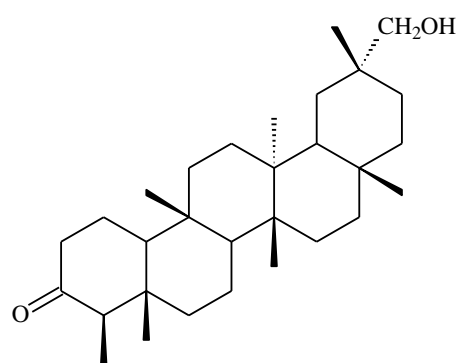
(57): $n=16$

(58): $n=18$

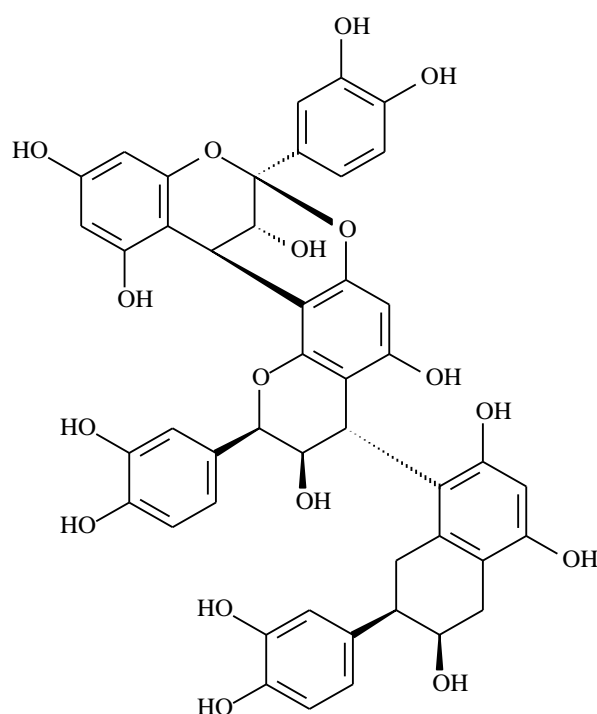


(59): $R^1=CH_3, R^2=H$

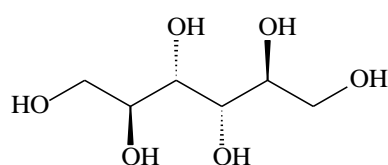
(60): $R^1=H, R^2=CH_3$



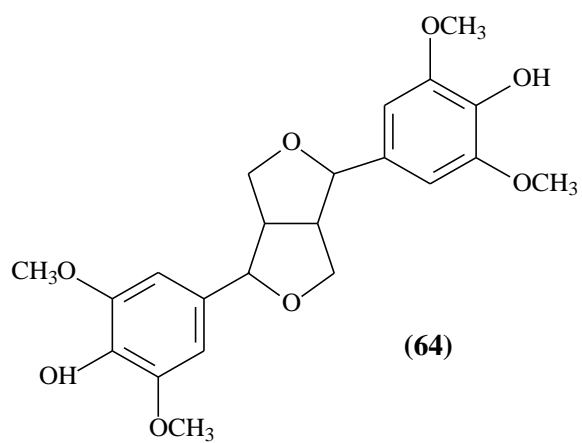
(61)



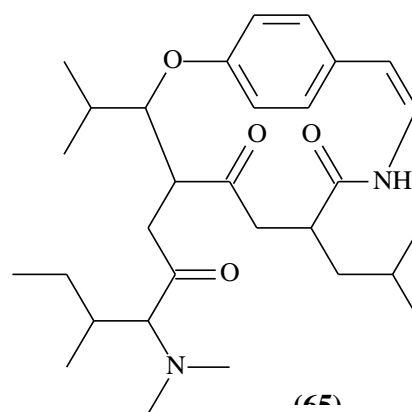
(63)



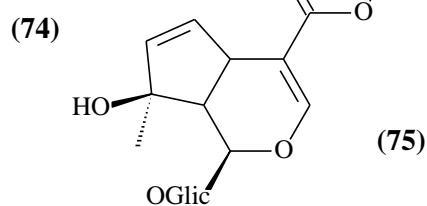
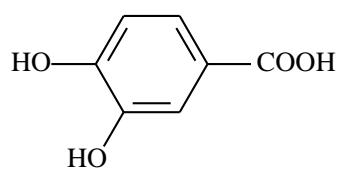
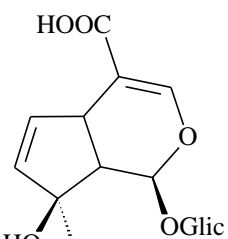
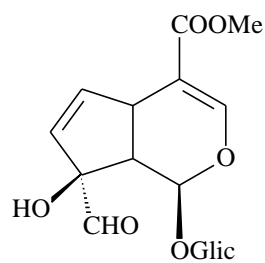
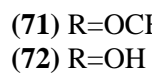
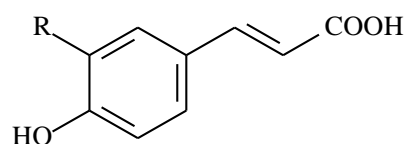
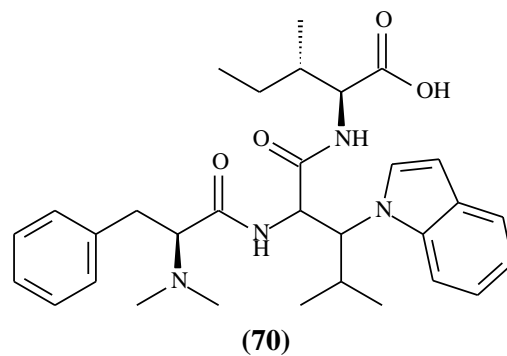
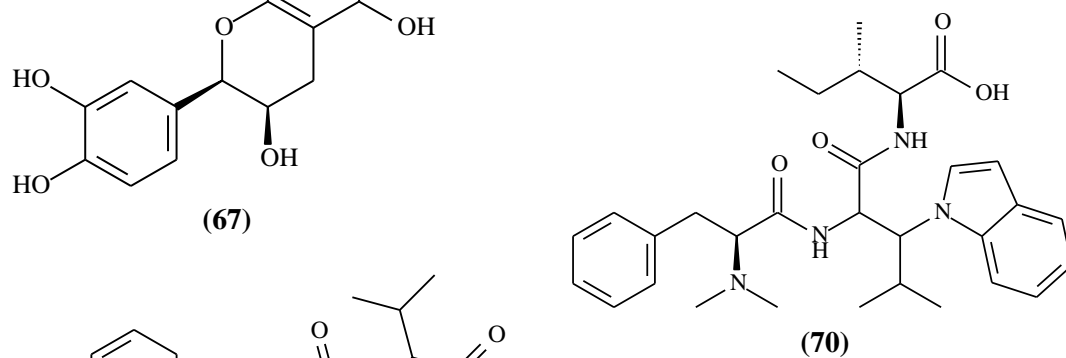
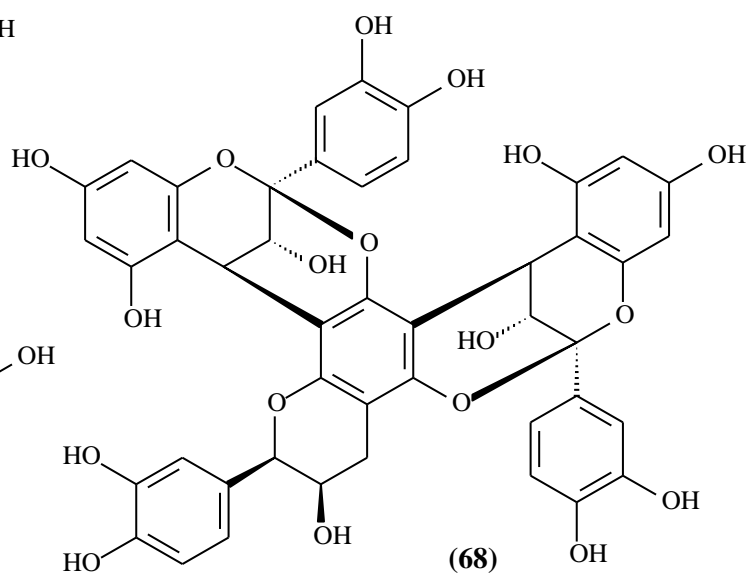
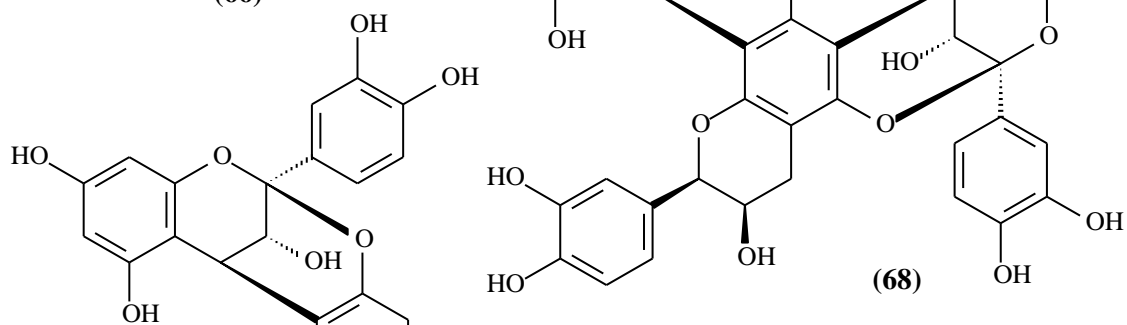
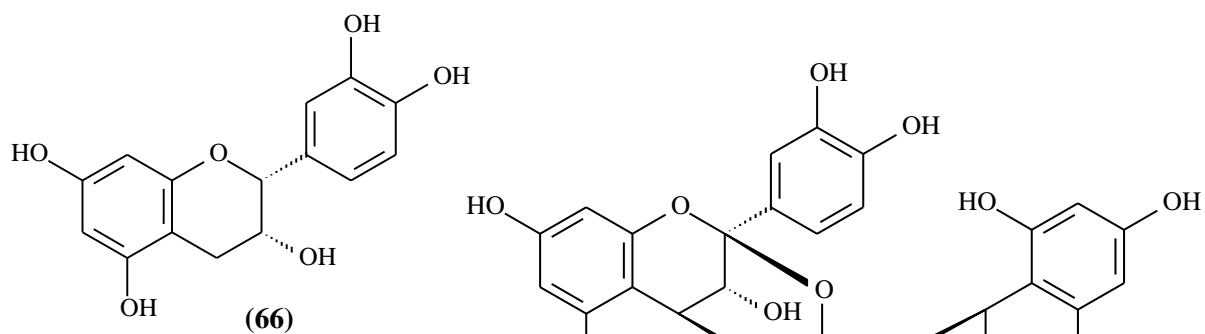
(62)

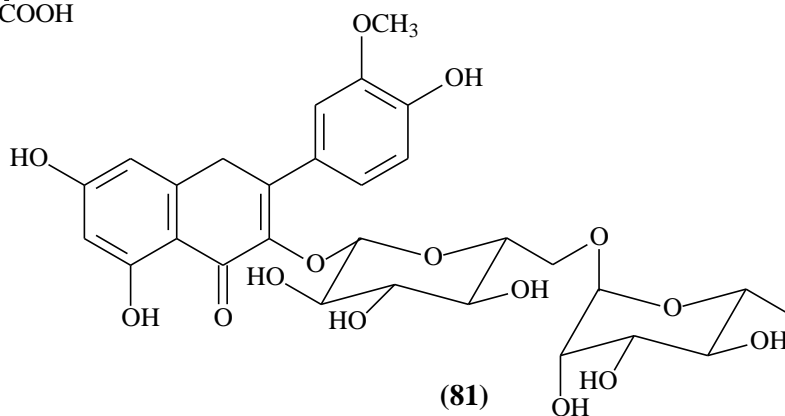
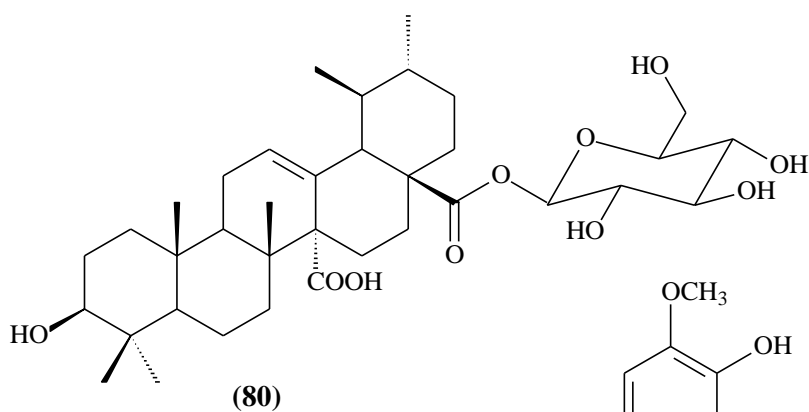
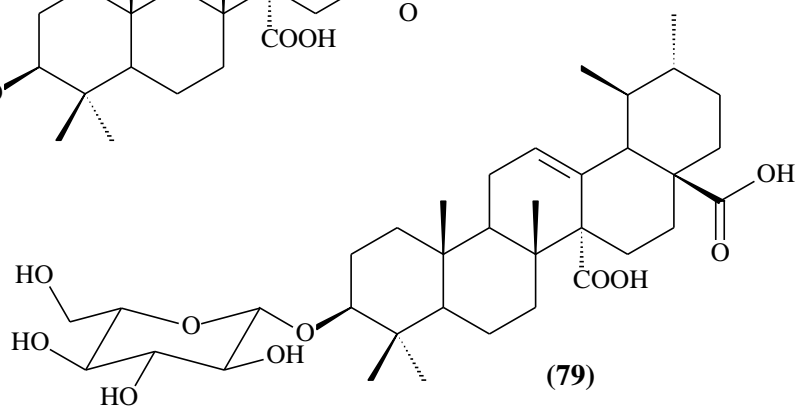
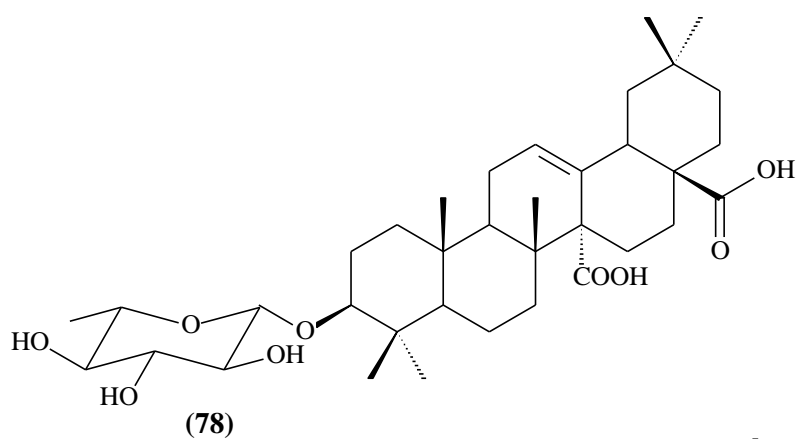
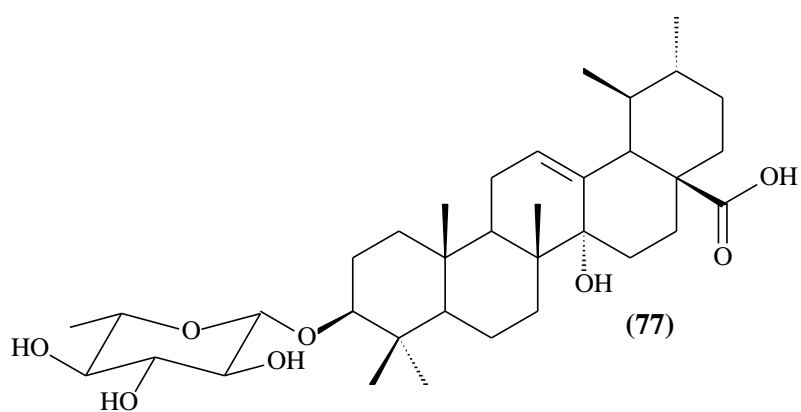
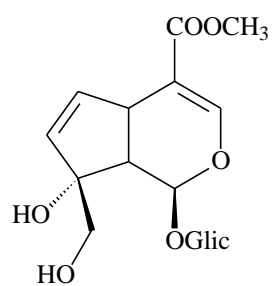


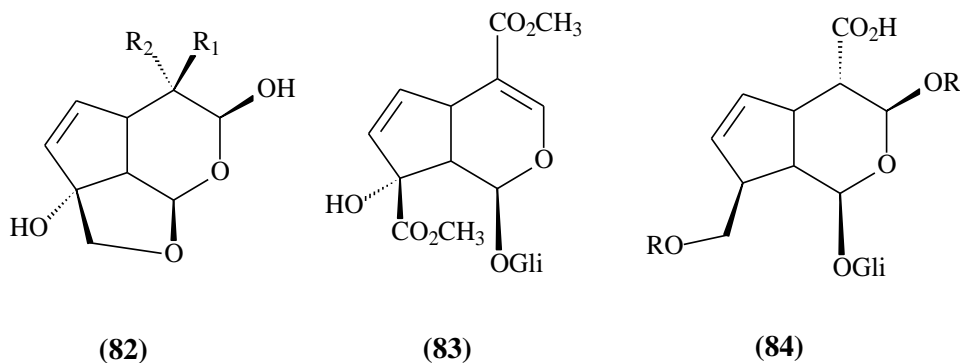
(64)



(65)





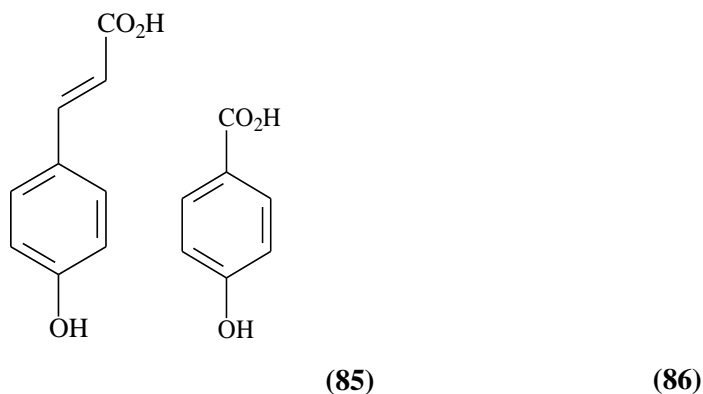


Considerando o exposto acima, percebe-se que algumas classes de compostos tem presença recorrente nas espécies da subfamília *Ixoroideae*, como ácidos fenólicos, cumarinas, triterpenos e esteroides; neste caso, faz-se necessário considerar alguns aspectos sobre os mesmos.

1.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE ÁCIDOS FENÓLICOS

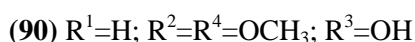
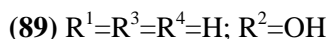
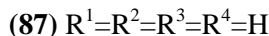
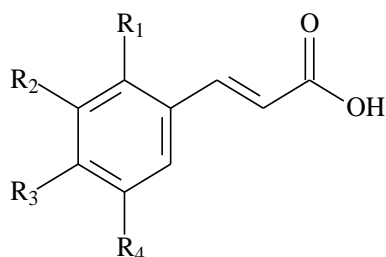
Analisando-se o exposto anteriormente, verifica-se que a presença de compostos fenólicos, especialmente fenilpropanoides, é evidente nas espécies da sub-família *Ixoroideae*, como pode ser observado pelas substâncias ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico (42), ácido 3,5-*O*-dicafeoilquinato de metila (43), ácido ferúlico (71) e ácido cafeico (72).

Esses compostos estão presentes em diversas plantas, sendo abundantes em legumes, frutas, grãos, vegetais e também no chocolate, vinho tinto, azeite de oliva, chá verde, café e própolis. Eles estão divididos em dois grupos: derivados do ácido *p*-hidroxicinâmico (ou *p*-cumárico) (85) e derivados do ácido *p*-hidroxibenzóico (86) (DEGÁSPARI, 2004).



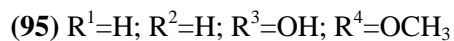
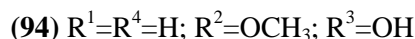
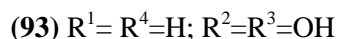
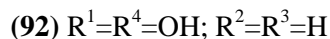
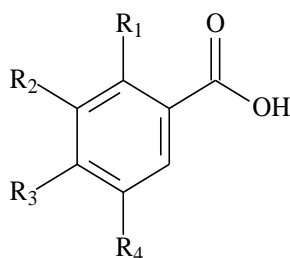
Os primeiros são compostos fenólicos de ocorrência natural que possuem um anel aromático com uma cadeia carbônica, constituída por 3 carbonos ligada ao anel.

Alguns exemplos de derivados do ácido *p*-cumárico muito comuns na natureza são o cafeico (72), cinâmico (87), *o*, *m* e *p*-cumárico (88, 89 e 85), ferúlico(71) e sinápico (90)(DEGÁSPARI, 2004; MESSIAS, 2009).



Estes ácidos existem nas plantas, usualmente na forma de ésteres, a exemplo do ácido clorogênico 5-*O*-cafeoilquinico (22), éster do ácido quínico, cuja molécula é constituída pelo ácido quínico esterificado ao ácido cafeico. Também são encontrados na forma de glicosídeos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular e, raramente, como ácidos livres (DEWICK, 2002).

No grupo dos ácidos hidroxibenzóicos, compostos que possuem grupo carboxílico ligado ao anel aromático, os isolados de espécies da sub-família *Ixoroideae*, são o ácido 2-metoxi-4-hidroxibenzóico (51) e ácido protocatecuico (73). Outros ácidos hidroxibenzóico bastante conhecidos são os ácidos salicílico (91), gentísico (92), *p*-hidroxibenzóico (86), 3,4-diidroxibenzóico (93), vanílico (94) e siríngico (95) (DEGÁSPARI, 2004; MESSIAS, 2009).

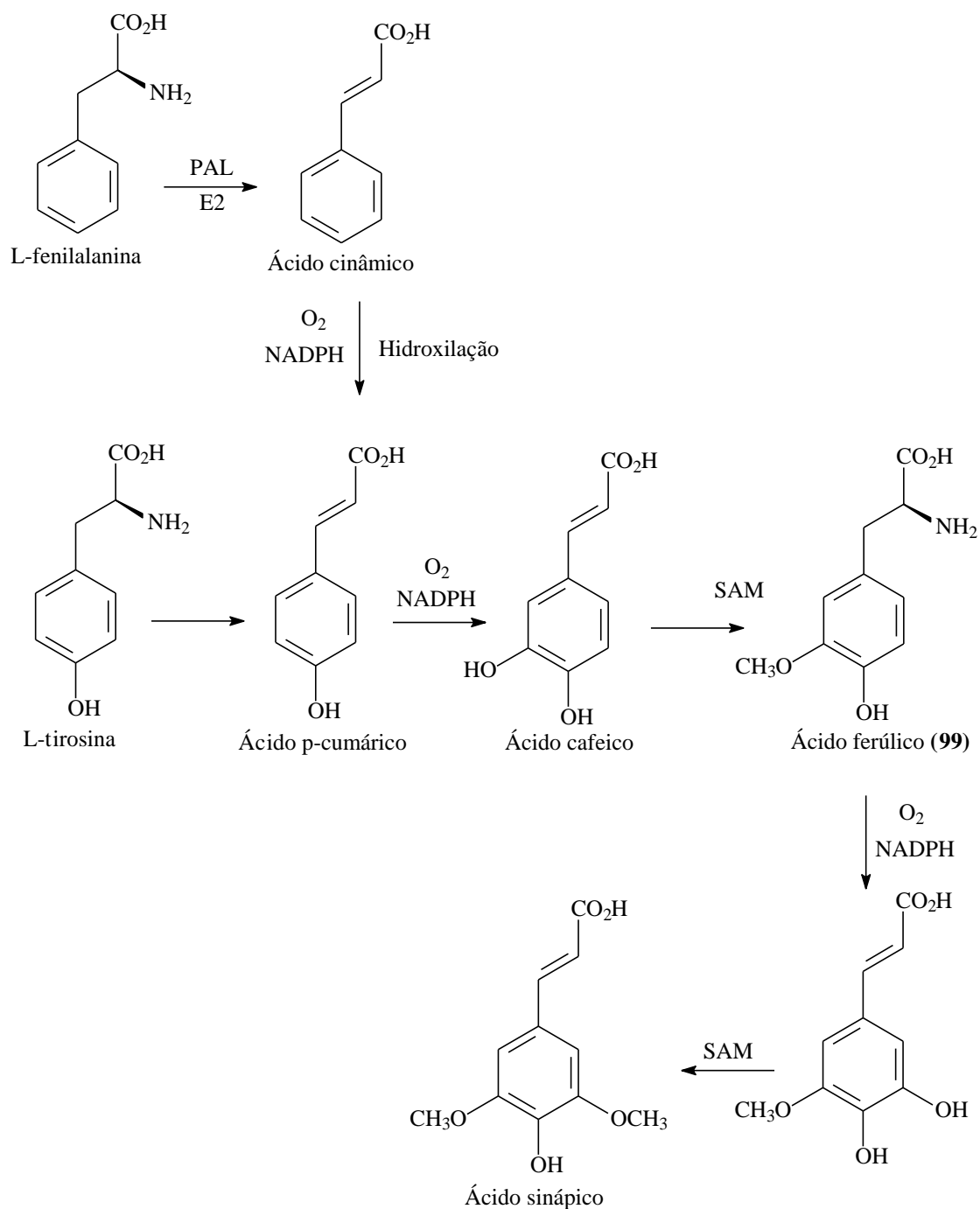


1.5.1 BIOSÍNTESE DE ÁCIDO FENÓLICOS.

Os ácidos fenólicos são biossintetizados a partir dos aminoácidos L-fenilalanina e L-tirosina (Figura 3) que são blocos de construção C6-C3. Inicialmente ocorre a eliminação de amônia a partir da cadeia lateral, gerando o *trans* (E) ácido cinâmico com auxílio da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), no caso da L-fenilalanina. A transformação correspondente da L-tirosina é mais restrita, sendo limitada sobretudo aos membros da família de grama (Graminae). Em reações de

hidroxilação e metilação subsequentes, há a formação dos ácidos cinâmicos que servirão de substrato para a biossíntese de cumarinas, ligninas, flavonoides, cumarinas, etc. (DEWICK, 2002).

Figura 3: Rota biossintética de ácidos fenólicos



Fonte: DEWICK, 2002.

1.5.2 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE ÁCIDOS FENÓLICOS

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004), antioxidantes são substâncias químicas que retardam o aparecimento de alteração oxidativa nos alimentos. De uma forma mais abrangente, podem ser considerados um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais. O termo “oxidante” significa que impede a oxidação de outras substâncias químicas, que ocorrem nas reações metabólicas ou por fatores exógenos, como as radiações ionizantes (MESSIAS, 2009).

Os antioxidantes fenólicos agem como sequestradores de radicais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários formados pela ação destes antioxidantes são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (RAMALHO, 2006).

Em estudos comparativos sobre os fatores que influenciam o poder antioxidante dos fenilpropanóides, a presença do grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ nos ácidos cinâmicos demonstra maior eficiência que o grupo $-\text{COOH}$ dos ácidos benzoicos. Tal efeito pode ser confirmado pela comparação entre os ácidos cafeico (72), sinápico (90) e ferúlico (71), que tem maior atividade que os ácidos 3,4-diidroxibenzóico (93), vanílico (94) e *p*-hidroxibenzóico (86). Isso pode ser explicado pelo poder da dupla ligação estabilizar o radical por ressonância (CUVELIER, 1992).

A presença de grupamentos hidroxila também influencia, sendo que se estes grupos aparecem nas posições 3 e 4, o potencial antioxidante é aumentado, como no caso dos ácidos cafeico (72) e 3,4-diidroxibenzóico (93); desta forma, a atividade antioxidante dos compostos estudados apresentou a seguinte ordem: ácido cafeico (72) > 3,4-diidroxibenzóico (93) > sinápico (90) > ferúlico (71) > siríngico (95) > *p*-cumárico (85) > vanílico (94) (RAMALHO, 2006; CUVELIER, 1992).

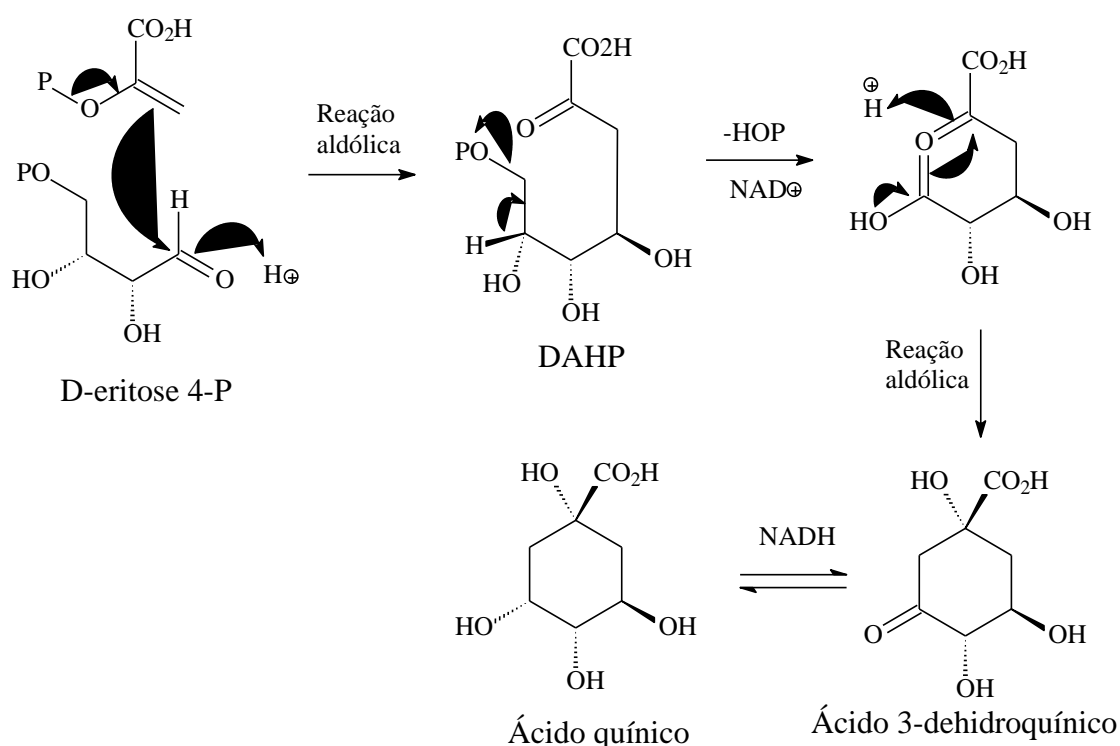
Na comparação entre a atividade oxidante do ácido cafeico (72) e do ácido 5-*O*-cafeoilquinico (22) observa-se que a esterificação pelo ácido quínico diminuiu a atividade do ácido cafeico (CUVELIER, 1992).

1.5.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ÁCIDO QUÍNICO

Como dito anteriormente, é comum a existência de ácidos fenólicos na forma de ésteres, como o ácido clorogênico 5-*O*-cafeoilquinico (22), éster do ácido quínico, cuja molécula é constituída pelo ácido quínico esterificado ao ácido cafeico. O ácido quínico

segue a via chiquimato, que fornece uma rota alternativa para compostos aromáticos. Ela se inicia com um acoplamento de fosfoenolpiruvato (PEP) e D-eritrose-4-fosfato para dar o ácido 3-desoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato sintase(DAHP) com sete carbonos (**Figura 4**). A eliminação de ácido fosfórico a partir do DAHP seguido por uma reação aldólica intramolecular gera o primeiro carbocíclico intermediário ácido 3-deidroquinico. A redução deste conduz ao ácido quínico, um produto natural bastante comum encontrado na forma livre ou na forma de ésteres.

Figura 4: Biossíntese do ácido quínico

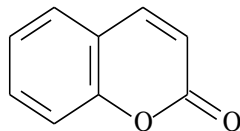


Fonte: DEWICK, 2002.

1.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE CUMARINAS

As cumarinas são compostos heterocíclicos contendo um átomo de oxigênio e estão presentes em diferentes partes das plantas tanto nas raízes como nas flores e frutos e podem ser encontradas em diversas famílias de Angiospermae, como Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae nas quais são encontradas com ampla ocorrência. Também estão presentes em Rubiaceae, Fabaceae, Oleaceae, Moraceae, entre outras, onde suas ocorrências são menos intensas. Essas substâncias podem ser biossintetizadas por árvores, arbustos e ervas (MONTAGNER, 2007).

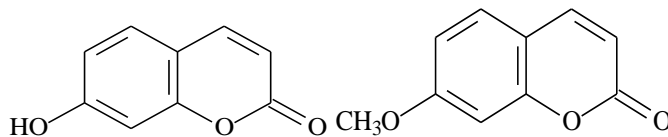
A primeira cumarina foi isolada por Vogel, em 1820, da espécie *Coumarona odorata* e é conhecida como cumarina *per se*(96), sendo que até hoje mais de 3.400 cumarinas já foram isoladas e seu sistema de anéis é útil na síntese de compostos heterociclos e fármacos (GUEOGJIAN, 2011).



(96)

As cumarinas podem ser classificadas como (RIBEIRO, 2002 e MONTAGNER, 2007):

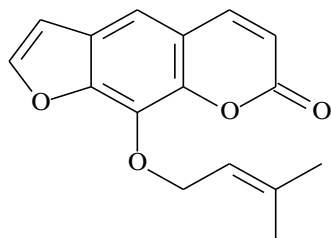
- **Cumarinas simples:** contem grupos substituintes hidróxi, alcóxi, acetóxi, alquil, entre outros. Pode ser exemplificadas através da cumarina *per se*(96), 7-hidroxycumarina (97) e isoescooletina (98).



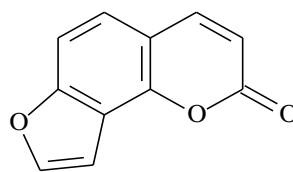
(97)

(98)

- **Furanocumarinas:** possuem um anel furano condensado ao núcleo cumarínico e podem ser lineares, como a imperatorina (99) ou angulares, como a angelicina (100)

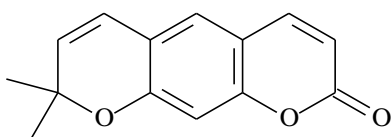


(99)

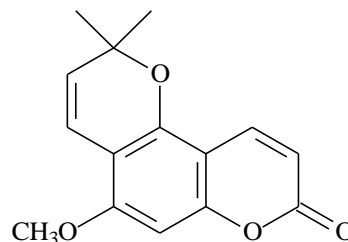


(100)

- **Piranocumarinas:** apresentam um anel pirano condensado ao núcleo cumarínico e também se apresentam na forma linear, sendo exemplificada pela xantiletina (101) ou na forma angular, como é o caso da aloxantoxiletina (102).

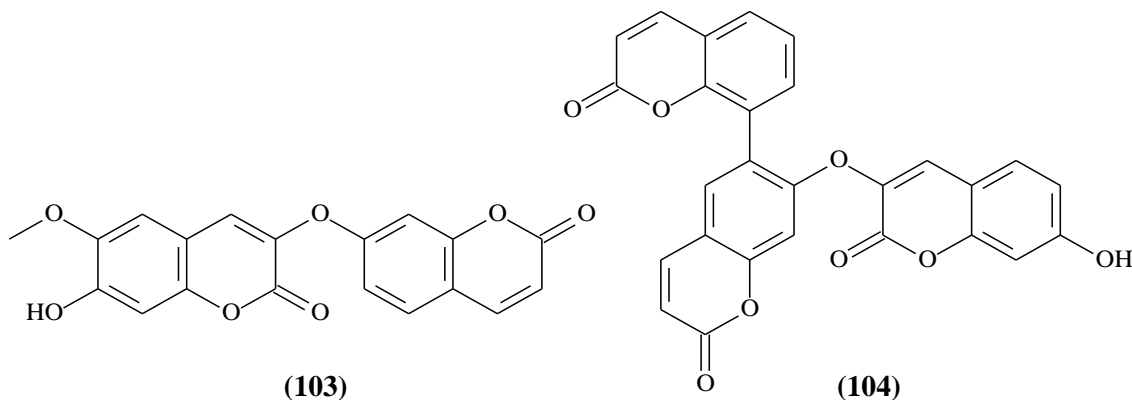


(101)



(102)

- **Biscumarinas e triscumarinas:** apresentam o acoplamento de duas ou três moléculas de cumarinas. Exemplos dessas classes são a daphnoretina (**103**) e a wikstosina (**104**) que representam a biscumarina e triscumarina, respectivamente.

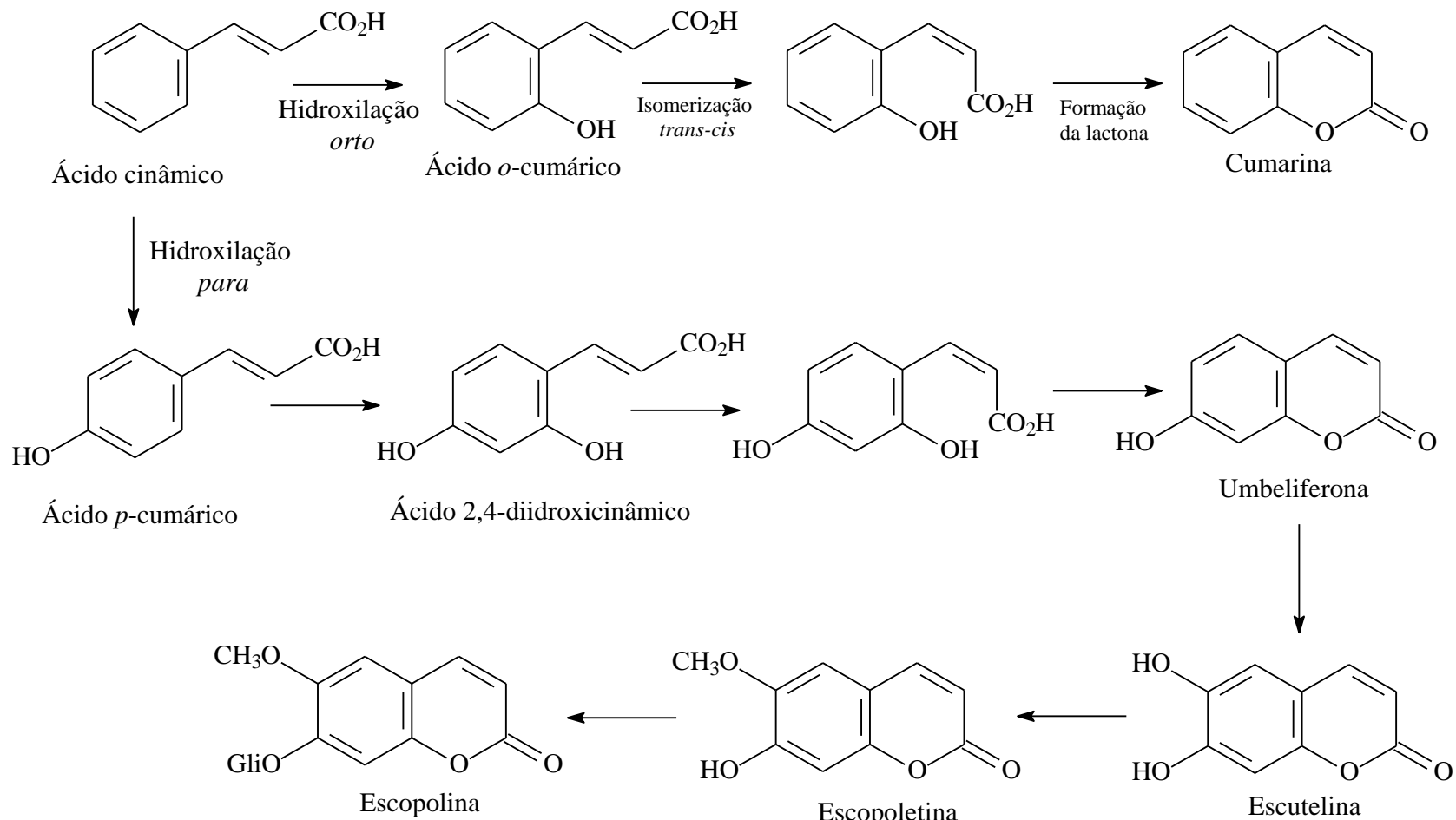


As cumarinas são bastante estudadas por possuírem variadas atividades biológicas, como anti-inflamatória, anticoagulante, estrogênica, fotossensibilizante, antimicrobiana, vasodilatadora, sedativa, hipnótica, analgésica e hipotérmica (OJALA, 2001).

1.6.1 BIOSÍNTESE DE CUMARINAS

As cumarinas são biossintetizadas a partir da L-fenilalanina através do ácido cinâmico que passa por etapas de hidroxilação, isomerização *trans-cis* e formação de lactona (**Figura 5**)(DEWICK, 2002).

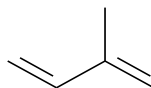
Figura 5: Rota biossintética de cumarinas.



Fonte: DEWICK, 2002.

1.7 CONSIDERAÇÕES SOBRE TRITERPENOS E ESTEROIDES

Os terpenoides são compostos derivados de unidades de isopreno **(105)** e tem ampla distribuição entre as plantas, podendo ser divididos em hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (DEWICK, 2002).



(105)

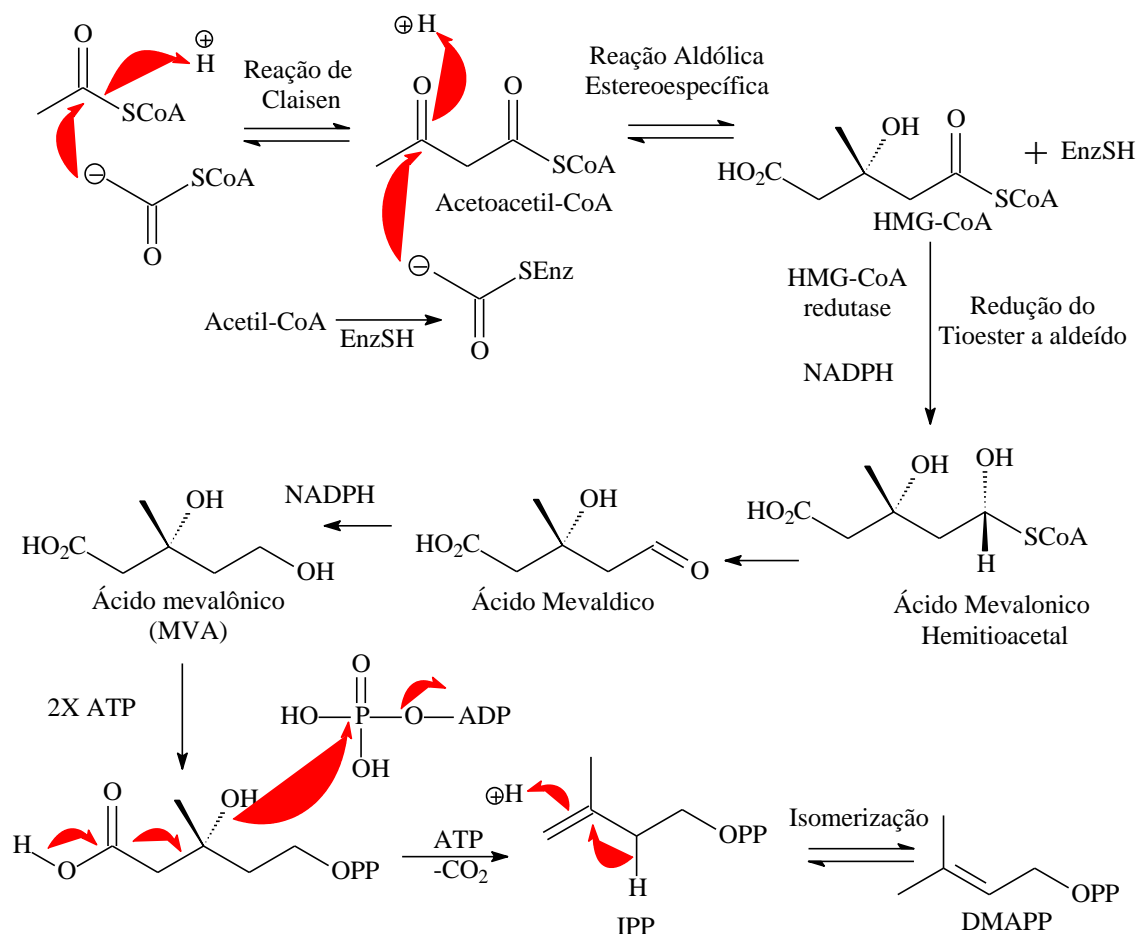
Os triterpenos possuem diversas propriedades medicinais, destacando-se anti-inflamatórias, analgésicas, cardiovasculares e antitumorais (GOMES, 2010).

1.7.1 BIOSÍNTESE DE TRITERPENOS

Segundo DEWICK (2002), as unidades de isopreno não participam ativamente da biossíntese: os esqueletos terpênicos são derivados de condensação do dimetil pirofosfato (DMAPP) com o isoprenil pirofosfato (IPP); estes, por sua vez, são formados a partir do ácido mevalônico.

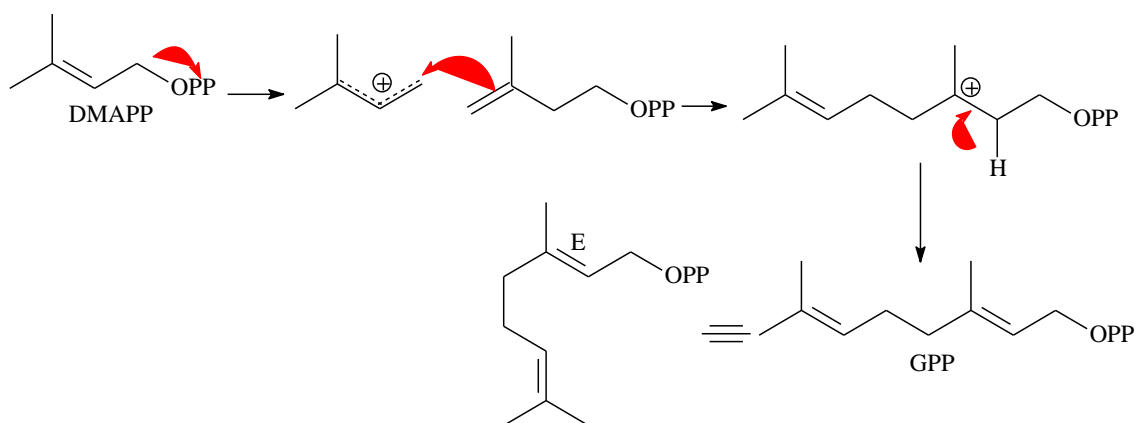
Inicialmente ocorre formação do acetoacetil CoA através de condensação do tipo cabeça-cauda de duas moléculas de acetil CoA; uma terceira molécula de acetil CoA adiciona-se ao grupo carbonila do acetoacetil CoA para formar o 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA); este é, então, reduzido a ácido mevalônico que é o precursor direto para compostos isoprenóides. O ácido mevalônico sofre ação da Adenosina trifosfato (ATP) e após passar por processos de eliminação de água e descarboxilação, chega-se então ao pirofosfato de isopentenila (IPP); este sofre isomerização para gerar o Pirofosfato de Dimetil-Alila (DMAPP)(**Figura 6**).

Figura 6: Biossíntese do ácido mevalônico sua conversão em Pirofosfato de Isopentenila (IPP) e Pirofosfato de Dimetil-Alila (DMAPP).



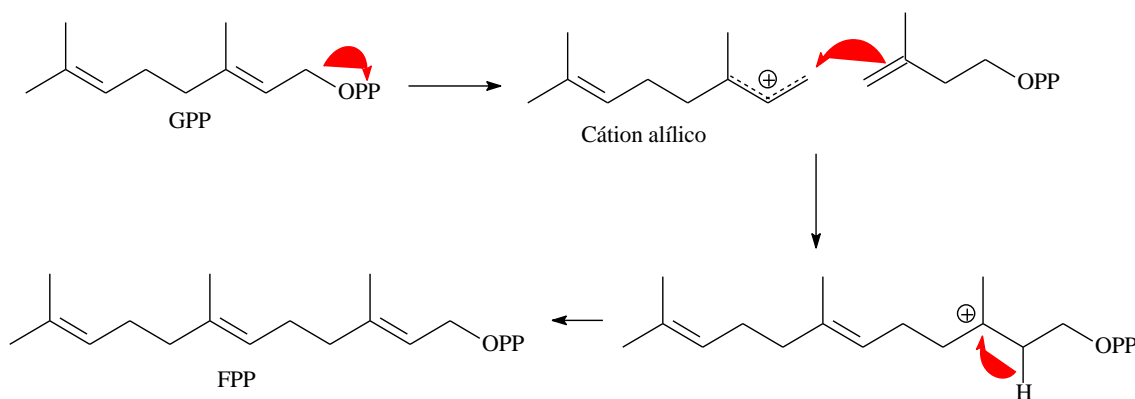
Fonte: DEWICK, 2002

A polimerização do IPP inicia-se com a ionização da ligação C-O do DMAPP, resultando em um centro catiônico que sofre adição de uma molécula de IPP, gerando o pirofosfato de geranila (GPP)(Figura 7). Neste ponto, através de rearranjos e de reações de ciclização, são biossintetizados os monoterpenos (C-10).

Figura 7: Formação do Pirofosfato de Geranila (GPP).

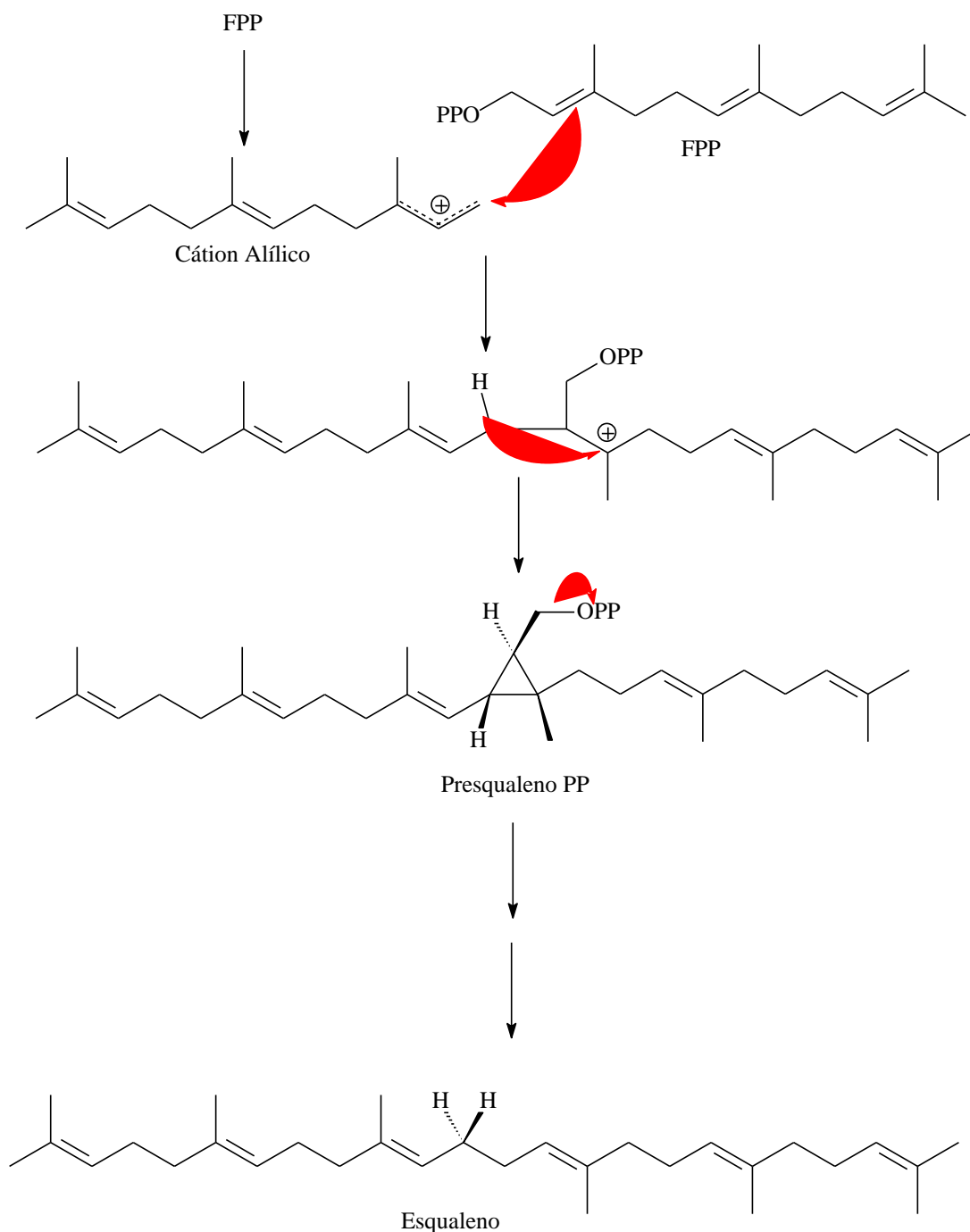
Fonte: DEWICK, 2002.

Em etapa posterior o GPP recebe outra molécula de IPP, produzindo o pirofosfato de farnesila (FPP)(**Figura 8**); tem-se então o precursor dos sesquiterpenos (C-15).

Figura 8: Formação do pirofosfato de farnesila (FPP) a partir do GPP.

Fonte: DEWICK, 2002.

A biossíntese dos esteroides e triterpenos começa com a condensação cauda-cauda de duas unidades de FPP para dar origem a um outro composto, o esqualeno, que segue de um mecanismo complexo com vários intermediários cíclicos e migrações de ligações ou de grupos alquila. A formação de sistemas de anéis triterpênicos a partir do esqualeno inicia-se com a oxidação do composto isoprenoide a óxido de Esqualeno (**Figura 9**). O anel epóxido é rompido, formando o grupo hidroxila no carbono 3 e uma carga positiva no carbono 2; o 3-hidroxisqualeno cicliza espontaneamente.

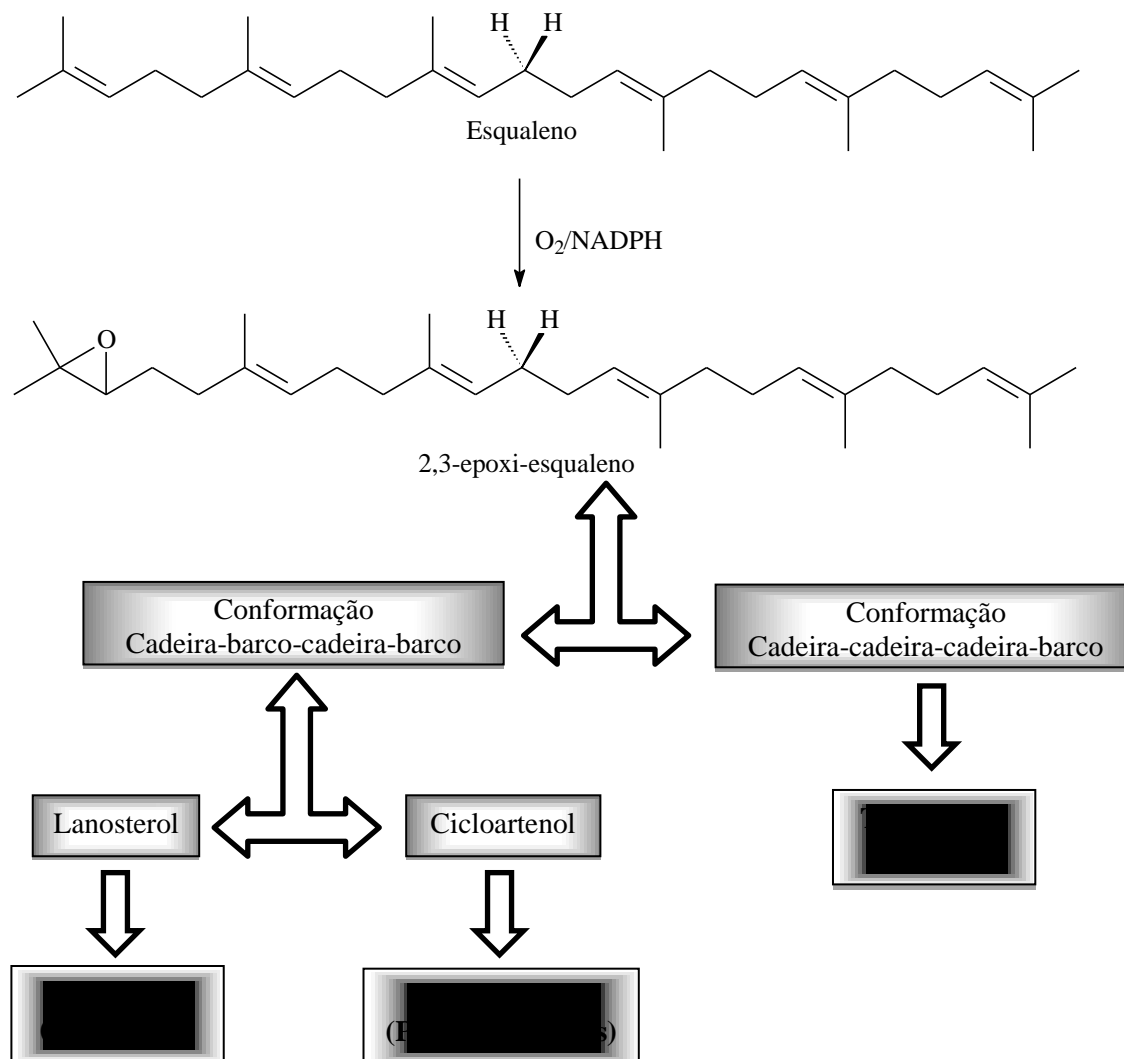
Figura 9: Formação do esqualeno a partir do FPP.

Fonte: DEWICK, 2002.

A biossíntese dos esteroides e triterpenos utiliza como precursor não o esqualeno, mas um derivado que resulta da epoxidação nas posições 2 e 3. Este composto, o 2,3 óxido de esqualeno (2,3 epoxi-esqualeno) pode tomar várias conformações. Se tomar uma disposição tal que sugira uma conformação “cadeira-barco-cadeira-barco” vai ser o substrato de enzimas específicos, ciclases, que o

transformam no lanosterol, no caso dos animais, ou no cicloartenol, no caso das plantas (Figura 10).

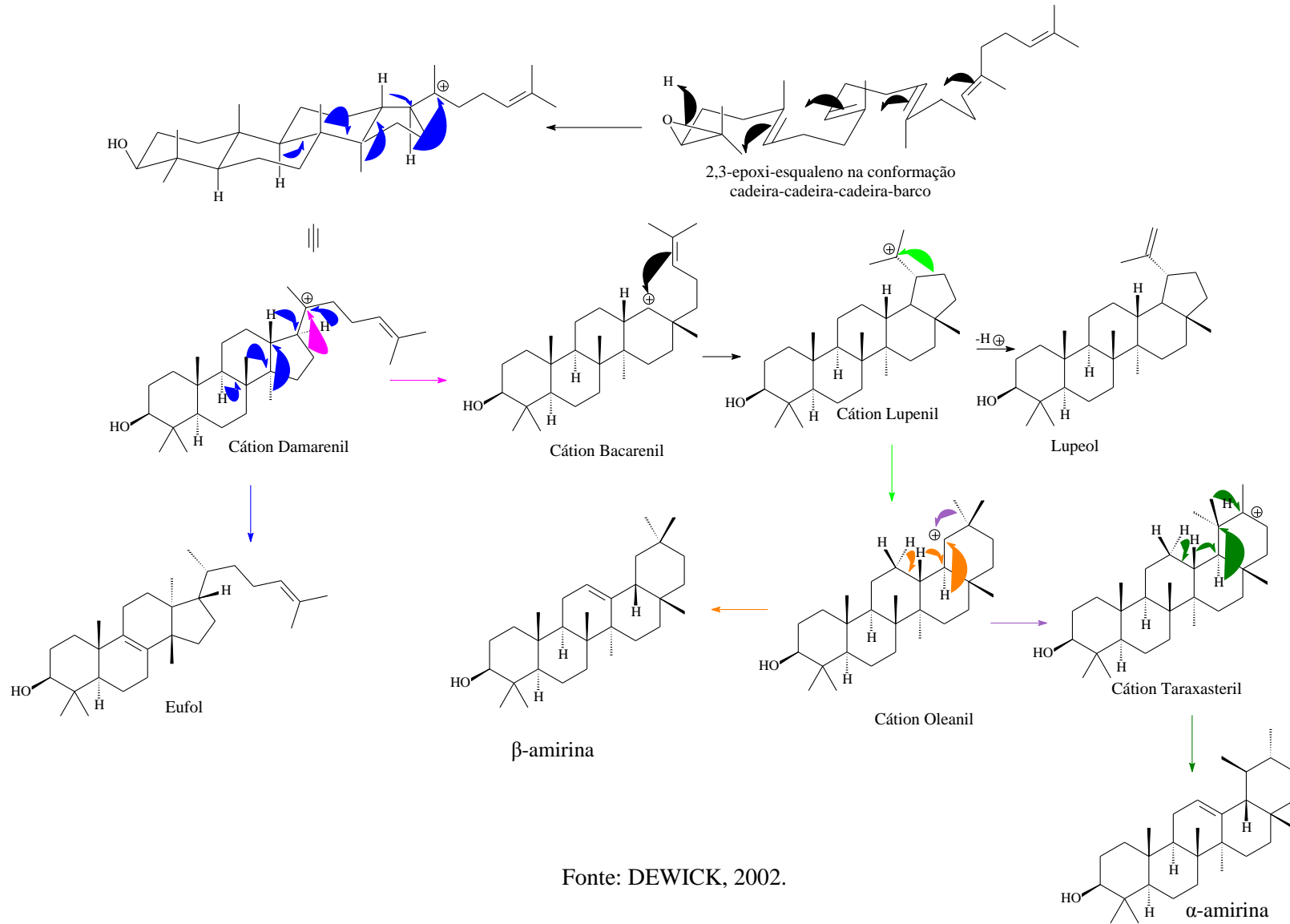
Figura 10: Formação de esteroides e triterpenos a partir do esqualeno



Fonte: DEWICK, 2002.

As enzimas ciclases que estão envolvidas na biossíntese dos triterpenos utilizam igualmente o 2,3 óxido de esqualeno como substrato. Mas neste caso é preciso que este metabolito tome uma disposição que se assemelhe a uma conformação cadeira-cadeira-cadeira-barco (Figura 11).

Figura 11: Formação de triterpenos a partir do 2,3-epoxi-esqualeno

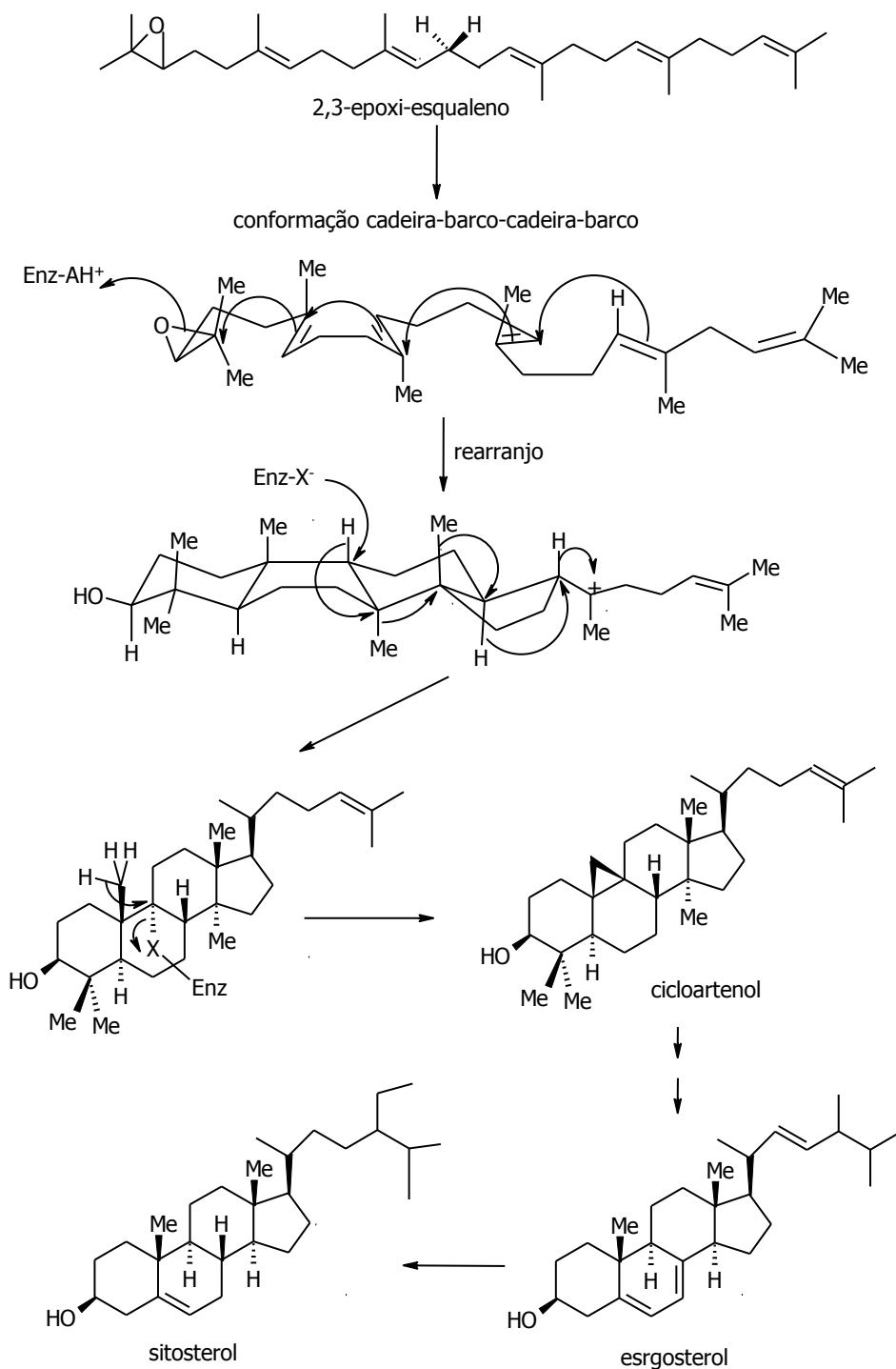


Fonte: DEWICK, 2002.

1.7.2 BIOSÍNTESE DE ESTEROIDES

A biossíntese dos esteroides tem igualmente como precursor o óxido de esqualeno que toma uma conformação inicial cadeira-barco-cadeira-barco(**Figura 12**)(DEWICK, 2002).

Figura 12:Esquema resumido da biossíntese dos esteroides.



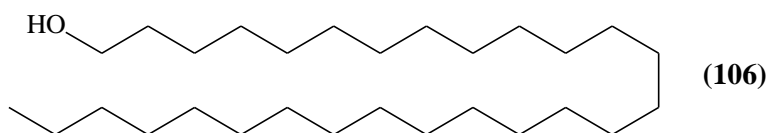
Fonte: DEWICK, 2002.

1.8 GÊNERO SABICEA

O gênero *Sabicea* - pertencente à família Rubiaceae, à subfamília *Ixoroideae* e à tribo *Sabiceae* - é composto de cerca de 100 espécies distribuídas pela América Tropical e África, sendo que na região neotropical (que inclui a América Central, a América do Sul, parte do México e do Caribe) estão presentes cerca de 45 a 50 espécies (DELPRETE,2005).

Espécies deste gênero são usadas na medicina popular para o tratamento da epilepsia (AWAD, 2009), febre, vômitos e insônia (VALADEAU, 2010), sendo que *Sabicea villosa* tem seu uso tradicional voltado para o tratamento de dor de estômago, disenteria e malária através da ingestão de uma infusão preparada com suas folhas (ROUMY, 2007) e também contra reumatismo (JOLY, 1990). Para a dor de dentes e como depurativo do sangue, uma infusão preparada a partir da raiz e/ou folhas de *S. cana* é ingerida (HIRSCHMANN, 1990). Essa planta também é utilizada no tratamento de doenças venéreas e na prisão de ventre (RODRIGUES, 2001). Uma bebida alucinógena utilizada por índios da Amazônia conhecida como “Ayahoasca” é obtida a partir de uma mistura de plantas, entre as quais *Sabicea amazonensis* é utilizada como um tipo de adoçante nesta bebida (SCHULTES, 1985; POMILIO, 1999).

A partir do estudo químico das folhas de *Sabicea grisea* foi isolado o octacosanol (**106**) que possui atividades biológicas importantes, incluindo antioxidante, ergogênica e antiparkinsoniana (WANG, 2010). O extrato bruto etanólico, a fração hexânica desta planta e o octacosanol isolado produziram uma inibição da dor induzida por ácido acético em camundongos. Sendo assim, as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória proporcionadas por este composto poderiam ser relevantes para o controle farmacológico de dor e de processos inflamatórios (OLIVEIRA, 2012).



1.9 ESPÉCIE VEGETAL *Sabicea brasiliensis*

Esta espécie, conhecida popularmente como sangue-de-cristo, se caracteriza por ser um arbusto com aproximadamente 80cm de altura, ocorrendo nas regiões de cerrado do Brasil. Seus frutos têm até 0,8cm de diâmetro, com aparência rósea quando maduro, carnoso, com polpa esponjosa branca e adocicada. Suas sementes tem cerca de 0,06 cm

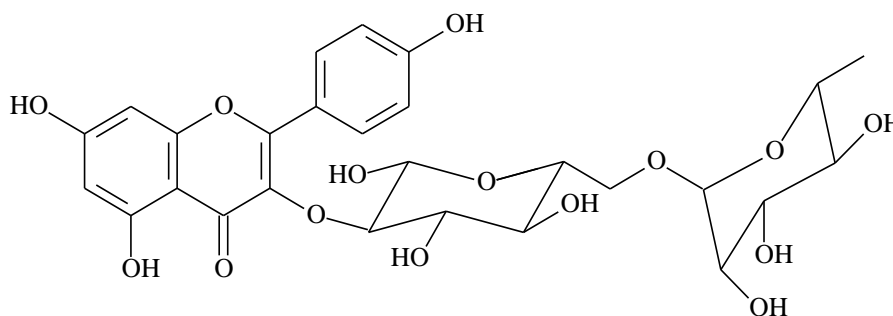
de comprimento, irregular, com tegumento enrugado e rígido de cor marrom, sendo que cada fruto é capaz de gerar até 20 sementes (**Figura 13**). Seu uso popular é essencialmente alimentício (HERINGERIANA, 2007), sendo que também é empregado no tratamento de infecções nos órgãos genitais de mulheres (ALMEIDA, 2003).

Figura 13: Fotos da espécie vegetal *Sabicea brasiliensis*.

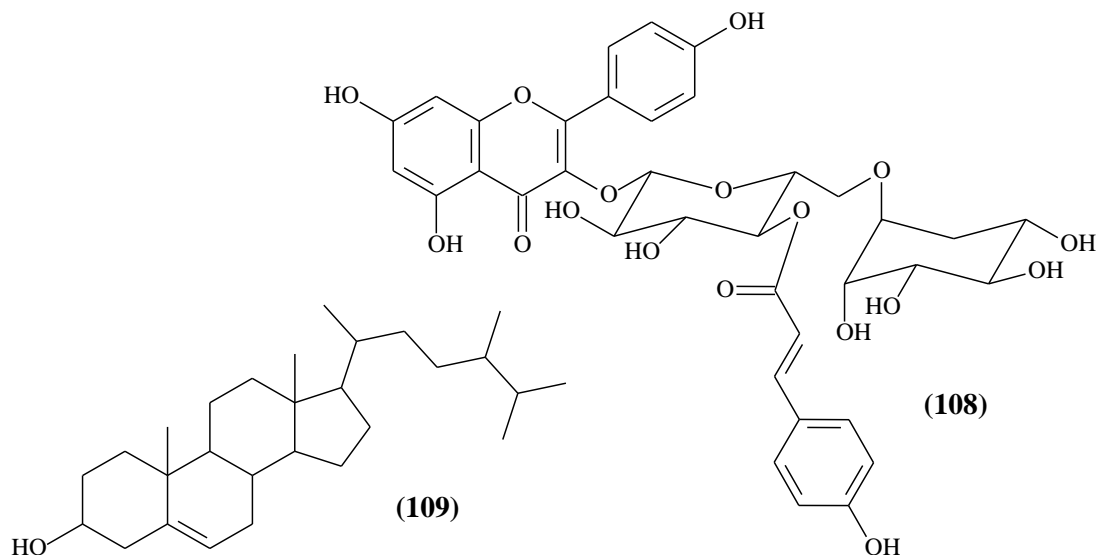


Fonte: <http://frutosatrativosdocerrado.bio.br>

O estudo químico feito com as folhas de *S. brasiliensis* revelou a presença dos flavonoides canferol-3-*O*-robinobiosídeo (**107**) e variabilosídeo G (**108**) (SANTOS, 2007), sendo que o extrato bruto desta planta se mostrou ativo contra oviposição do bicho-mineiro (SANTOS, 2008). Em outro estudo utilizando também as folhas dessa planta foi isolado o β -sitosterol (**109**) (MOREIRA, 2006).



(107)



Considerando a escassez de estudos químicos realizados especificamente com a espécie *Sabicea brasiliensis*, assim como com as demais espécies do gênero *Sabicea* e analisando as atividades biológicas e usos populares das mesmas, este trabalho foi dedicado ao estudo químico e avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória de tal planta.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo isolar e caracterizar por métodos espectroscópicos de RMN uni e bidimensionais os principais metabólitos secundários presentes nas raízes da espécie vegetal *Sabicea brasiliensis*, assim como avaliar os potenciais antioxidante e anti-inflamatório do extrato bruto, frações e compostos isolados.

3 MATERIAL VEGETAL

As raízes de *Sabicea brasiliensis* foram coletadas em Goiânia, no Morro das Antenas, em maio de 2010 pelo professor Heleno Dias Ferreira da Universidade Federal de Goiás – UFG; o material vegetal foi enviado para o laboratório FitoSin - Produtos Naturais e Síntese Orgânica - da UEM já seco para que fosse iniciada a pesquisa, sendo então submetido aos procedimentos descritos posteriormente.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

As cromatografias em coluna foram realizadas utilizando sílica-gel 60 (0,063-0,2 mm) da Merck ou Fluka e as filtrações foram feitas em Sephadex LH-20 da Sigma Aldrich. Os diâmetros das colunas utilizadas variaram de acordo com a massa da amostra a ser purificada.

O acompanhamento das cromatografias e filtrações em coluna foi feito através de cromatografia em camada delgada (CCD), sendo que as placas cromatográficas foram preparadas em fase estacionária sílica-gel 60 G e sílica-gel 60 GF, com 0,25mm de espessura. As substâncias fluorescentes presentes nas CCD foram visualizadas sob luz UV no comprimento de onda de 366nm e as substâncias separadas nas placas cromatográficas foram visualizadas através do revelador anisaldeído para terpenos ou Dragendorff para alcaloides.

Os solventes orgânicos (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) utilizados na fase móvel nas cromatografias e filtrações apresentavam grau de pureza P.A ou foram destilados. O processo de evaporação de solventes foi realizado utilizando evaporador rotativo.

Os espectros de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C foram obtidos em espectrômetros VARIAN Mercury Plus, operando a 300,06 MHz para ^1H e 75,45 MHz para ^{13}C . Também foram obtidos os espectros pela técnica DEPT e correlações bidimensionais a partir dos mapas de contornos COSY, HSQC e HMBC. A detecção de Efeito Nuclear Overhauser (NOE) entre prótons foi verificado através dos espectros de NOESY 1D. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o tetrametilsilano (δ_{H} 0,0) e os solventes utilizados foram: CDCl_3 , CD_3OD e D_2O (Aldrich ou Isotec).

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos através de um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas modelo Focus GC (Thermo-Finnigan), equipado com: amostrador automático com forno para extração headspace, modelo Triplus, sistema de injeção split/splitless com insersor (liner) de vidro silanizado com diâmetro interno (d.i.) de 3 mm; espectrômetro de massas modelo DSQ II (Thermo-Finnigan), equipado com fonte de ionização por elétrons (EI), analisador de massas do tipo quadrupolo e um multiplicador de elétrons (diodo) como detector; sistema de aquisição de dados através do software Xcalibur que acompanha

base de dados de espectros contidos na biblioteca espectral NIST MS Search Version 2.0. O gás de arraste utilizado, foi o gás hélio com grau de pureza 99,999% (5.0) (White Martins) com vazão de 1,0 mL/min. A coluna capilar utilizada foi DB-5 (5% fenil-95% metilpolissiloxano) de sílica fundida, 30m de comprimento, 0,25 mm d.i. e 0,25 µm de espessura de filme da fase estacionária (J & W Scientific). A temperatura da fonte de ionização e do injetor utilizada nas análises foi de 250 °C em modo de injeção splitless. O volume de injeção foi de 1,0 µL e a temperatura inicial do forno foi de 50 °C, sendo elevado até 290 °C a uma taxa de 3°C/min mantendo na temperatura final por 15 min. Os pontos de fusão (p. f.) das substâncias isoladas foram determinados em um aparelho de ponto de fusão Microquímica, modelo MQAPF-301. A avaliação da atividade antioxidante foi feita em um aparelho de UV/VIS-Cary 50, VARIAN, em 515,5 nm.

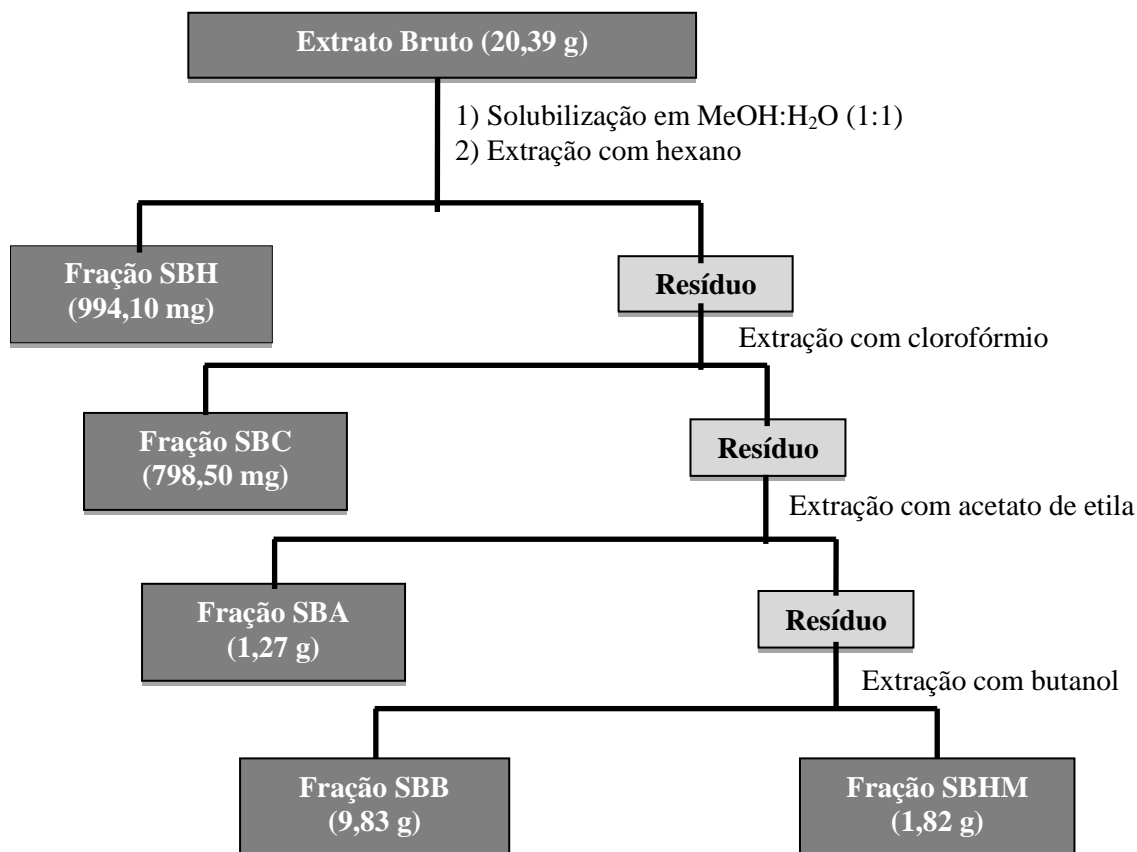
4.2 ESTUDO FITOQUÍMICO DAS RAÍZES DE *SABICEA BRASILIENSIS*

4.2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DAS RAÍZES DE *S. brasiliensis*

As raízes da planta (304,5 g) foram cortadas e submetidas à extração exaustiva com metanol com posterior evaporação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo, fornecendo 25,41 g de extrato bruto (SB).

4.2.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE *S. brasiliensis*

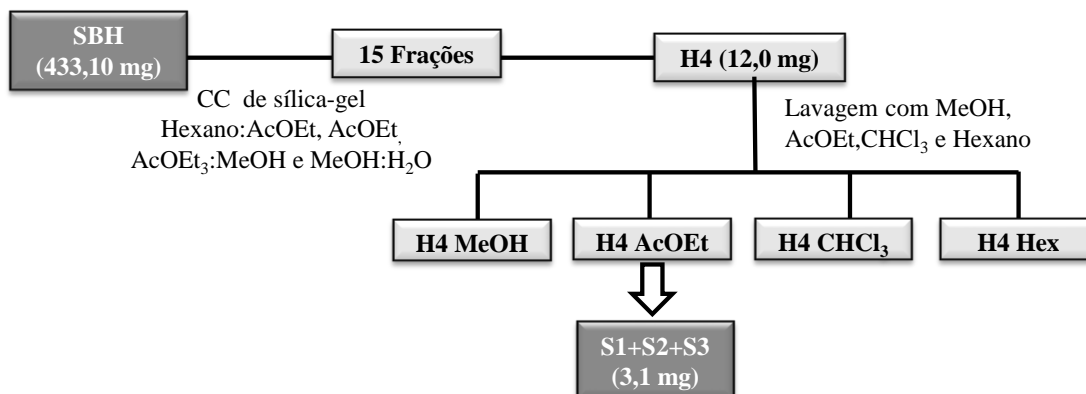
Parte do extrato bruto metanólico SB (20,39 g) foi dissolvido em MeOH:H₂O 1:1 e particionado em funil de separação com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol em ordem crescente de polaridade, conforme o **Esquema 1**. A partir deste procedimento obteve-se as frações hexânica (SBH; 994,10mg), clorofórmica (SBC; 798,50 mg), acetato de etila (SBA; 1,27 g), butanólica (SBB; 9,83 g) e a remanescente hidrometanólica (SBHM; 1,82 g).

Esquema 1: Fracionamento líquido-líquido do extrato bruto de *Sabicea brasiliensis*.

A massa final (14,71 g) obtida pela soma das massas das frações teve uma diminuição de 5,68 g em comparação com a massa de extrato bruto inicialmente pesada e utilizada para o fracionamento sólido-líquido; esta diferença pode ser explicada pela presença de umidade no extrato bruto, além de perdas ocorridas durante o procedimento devido à formação de emulsão, o que levou a uma massa final inferior à inicial.

4.2.2.1 ESTUDO DA FRAÇÃO HEXÂNICA (SBH).

Como pode ser observado pelo **Esquema 2**, parte da fração hexânica SBH (433,10 mg) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica de sílica-gel (20,70 g; Ø= 1,5 cm), empacotada com hexano e eluída com Hexano, Hexano:AcOEt, AcOEt e AcOEt:MeOH, MeOH e MeOH:H₂O em gradiente crescente de polaridade. As 100 frações coletadas foram agrupadas em 15 subfrações de acordo com as semelhanças observadas em CCD (**Tabela 3**).

Esquema 2: Estudo da fração hexânica SBH.**Tabela 3: Dados do fracionamento em sílica-gel da fração SBH.**

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)
Hexano 100% e Hexano:AcOEt 5%	1-10	H1	0,7
Hexano:AcOEt 5%	11-14	H2	100,2
Hexano:AcOEt 10%	15-18	H3	30,1
Hexano:AcOEt 10%	19	H4	12,0
Hexano:AcOEt 10%	20	H5	4,5
Hexano:AcOEt 10% e Hexano:AcOEt 15%	21-29	H6	22,3
Hexano:AcOEt 15% e Hexano:AcOEt 20%	30-39	H7	40,2
Hexano:AcOEt 30% a Hexano:AcOEt 55%	40-50	H8	9,6
Hexano:AcOEt 60% a Hexano:AcOEt 95%	51-60	H9	63,3
AcOEt 100% a AcOEt:MeOH 10	61-67	H10	74,9
AcOEt:MeOH 15% a AcOEt:MeOH 30%	68-71	H11	8,3
AcOEt:MeOH 35% a AcOEt:MeOH 65%	72-80	H12	15,7
AcOEt:MeOH 70% a MeOH 100%	81-90	H13	17,4
MeOH 100% a MeOH: H ₂ O 5%	91-96	H14	7,5
MeOH: H ₂ O 5%	97-100	H15	0,7

Porcentagem de recuperação da amostra: 94%

A fração H4 (12,0 mg) apresentou perfil cromatográfico simples em CCD e foi lavada sucessivamente com metanol, acetato de etila, clorofórmio e hexano resultando nas frações H4MeOH (3,7 mg), H4AcOEt (3,1 mg), H4CHCl₃ (2,9 mg) e H4Hex (2,3 mg) com o consequente isolamento da mistura de substâncias **S1**, **S2** e **S3** (3,1 mg) da fração H4AcOEt, em mistura.

A fração H2 (100,2 mg) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica de sílica-gel (20,70 g; Ø= 1,5 cm), empacotada com hexano e eluída com hexano, hexano:AcOEt, AcOEt e AcOEt:MeOH, MeOH e MeOH:H₂O em gradiente crescente de polaridade, sem que substâncias puras fossem isoladas.

A fração H3 (30,1 mg) apresentou perfil complexo em CCD, não sendo submetida a análises posteriores, apesar de deter uma massa considerada, por vezes, suficiente. A fração H7, por sua vez, apresentou dificuldade de solubilização nos solventes testados (hexano, clorofórmio, Acetato de Etila e Metanol e em mistura dos mesmos), impossibilitando seu estudo. As frações H9 e H10 foram submetidas a procedimento de lavagem e recristalização, sem que substâncias fossem isoladas.

As demais frações de SBH apresentaram perfil cromatográfico complexo em CCD aliado a uma baixa quantidade de massa que resultou na incapacidade de seus estudos.

4.2.2.2 ESTUDO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA (SBC)

Como demonstrado pelo **Esquema 3**, parte da fração clorofórmica SBC (747,9 mg) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica de sílica-gel (22,72 g; Ø= 1,5 cm), empacotada com hexano e eluída com Hexano, Hexano:AcOEt, AcOEt e AcOEt:MeOH em gradiente crescente de polaridade. As 162 frações coletadas foram reunidas em 19 subfrações de acordo com as semelhanças observadas em CCD, como mostra a **Tabela 4**. A partir deste fracionamento pode-se isolar novamente as substâncias **S1**, **S2** e **S3** (6,3 mg) da fração C6.

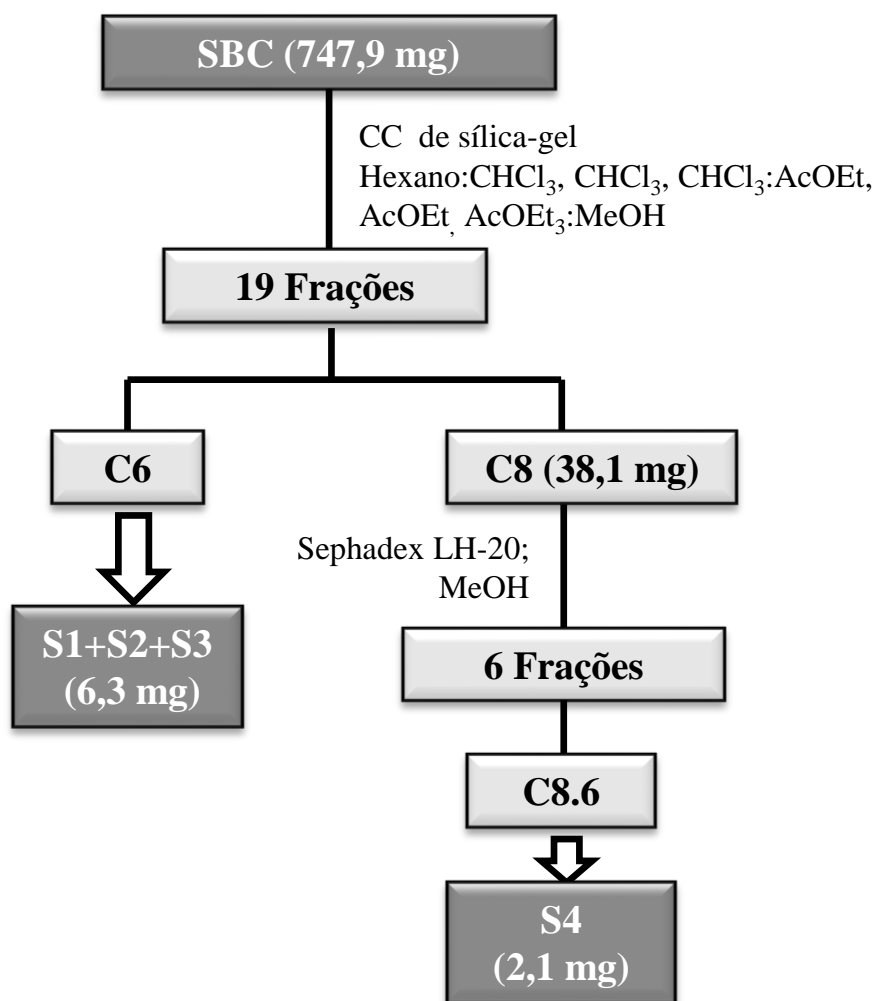
Esquema 3: Estudo da fração clorofórmica (SBC).

Tabela 4: Dados do fracionamento em sílica-gel da fração SBC.

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)	Substância isolada
Hexano 100% a Hexano:CHCl ₃ 20%	1-19	C1	2,3	
Hexano:CHCl ₃ 20%	20-21	C2	0,9	
Hexano:CHCl ₃ 20% a Hexano:CHCl ₃ 30%	22-28	C3	3,4	
Hexano:CHCl ₃ 30% a Hexano:CHCl ₃ 40%	29-38	C4	1,7	
Hexano:CHCl ₃ 40% a Hexano:CHCl ₃ 60%	39-49	C5	0,4	
Hexano:CHCl ₃ 60% a Hexano:CHCl ₃ 75%	50-57	C6	6,3	S1+S2+S3
Hexano:CHCl ₃ 75% a CHCl ₃ 100%	58-68	C7	3,5	
CHCl ₃ 100% a CHCl ₃ :AcOEt15%	69-79	C8	38,1	
CHCl ₃ :AcOEt 20%	80-84	C9	27,0	
CHCl ₃ :AcOEt 25%	85	C10	10,3	
CHCl ₃ :AcOEt25% a CHCl ₃ :AcOEt30%	86-88	C11	29,4	
CHCl ₃ :AcOEt 30%	89	C12	8,7	
CHCl ₃ :AcOEt30% e CHCl ₃ :AcOEt 35%	90-99	C13	53,3	
CHCl ₃ :AcOEt45% e CHCl ₃ :AcOEt 50%	100-104	C14	26,8	
CHCl ₃ :AcOEt50% a CHCl ₃ :AcOEt90%	105-128	C15	83,4	
CHCl ₃ :AcOEt95% a AcOEt:MeOH 5%	129-134	C16	18,2	
AcOEt:MeOH 5% a AcOEt:MeOH 15%	135-152	C17	203,4	
AcOEt:MeOH 35% a AcOEt:MeOH 50%	153-158	C18	27,2	
AcOEt:MeOH 60% a MeOH 100%	159-162	C19	31,3	

Porcentagem de recuperação da amostra: 80%

A fração C8 (38,1 mg) foi submetida à filtração em Sephadex LH 20 ($\varnothing=1,0$ cm) com MeOH, obtendo-se 46 frações de aproximadamente 2 mL que foram agrupadas em 6 subfrações de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico observado em CCD (**Tabela 5**), resultando no isolamento da substância **S4**(2,1 mg) a partir da subfração C8.6.

Tabela 5: Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração C8.

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa(mg)	Substância isolada
MeOH	1-13	C8.1	4,2	
MeOH	14-15	C8.2	9,8	
MeOH	16-20	C8.3	6,0	
MeOH	21-23	C8.4	3,9	
MeOH	24-25	C8.5	6,8	
MeOH	26-46	C8.6	2,1	S4

Porcentagem de recuperação da amostra: 86,0%

As frações C9 (27,0 mg), C11 (29,4 mg), C13 (53,3 mg), C15 (82,4 mg) e C17 (m=203,4 mg) foram submetidas a procedimentos cromatográficos em coluna de sílica-gel, sem isolamento de substâncias. As frações C18 (27,2 mg) e C19 (31,3 mg) apresentaram problemas de solubilidade, o que tornou impraticável a continuação de seus estudos. As demais frações de SBC exibiram perfil cromatográfico complexo em CCD, assim como uma baixa quantidade de massa que acarretou a impossibilidade de seus estudos.

4.2.2.3 ESTUDO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (SBA)

Observando-se o **Esquema 4**, nota-se que parte da fração SBA (593,0 mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH 20 ($\varnothing=1,5$ cm) com metanol, resultando em 93 frações de aproximadamente 2 mL que foram agrupadas em 12 novas frações de acordo com semelhança observada em CCD (**Tabela 6**). Nesse procedimento foi possível o isolamento da substância S5 (7,2 mg) da fração A4.

Esquema 4: Estudo da fração acetato de etila (SBA).

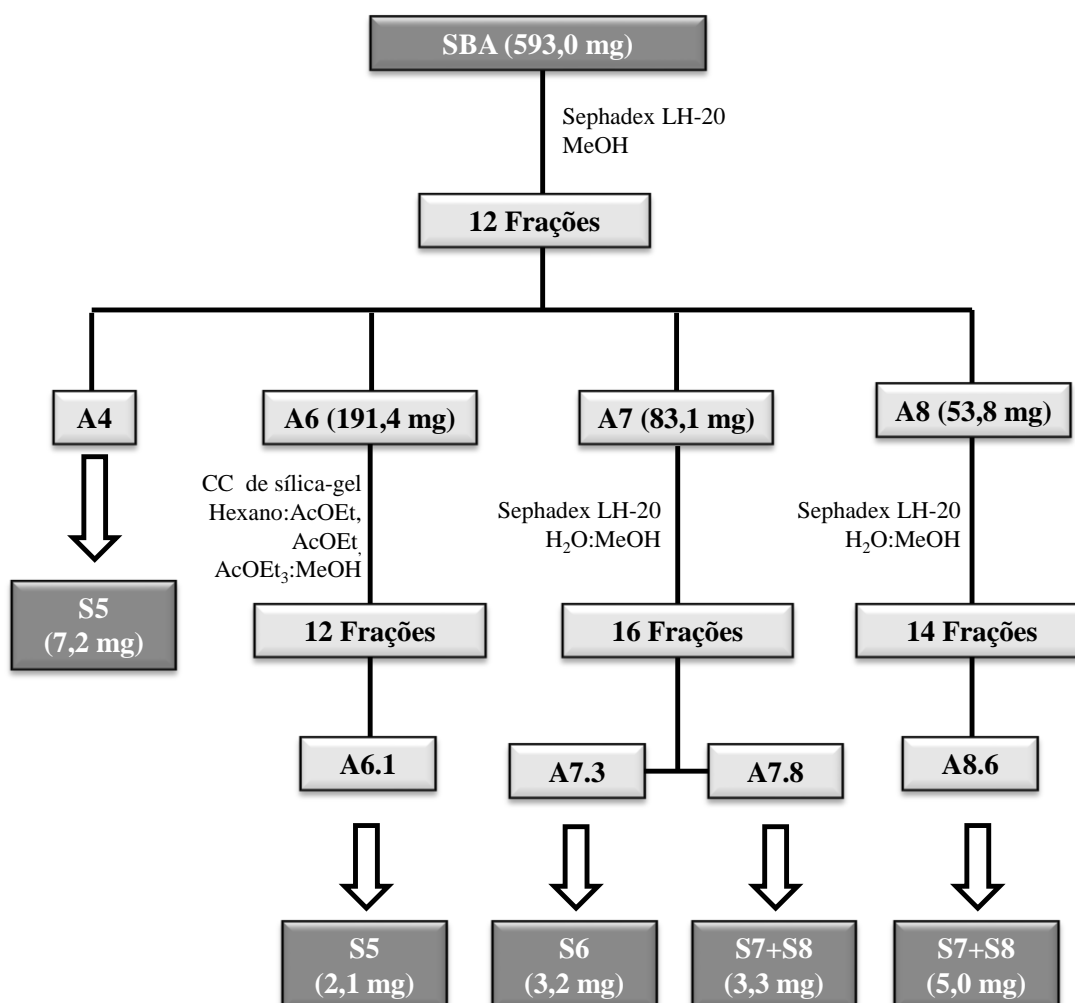


Tabela 6: Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SBA.

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)	Substância isolada
MeOH	1-7	A1	1,3	
MeOH	8-14	A2	12,5	
MeOH	15-20	A3	8,4	
MeOH	21-22	A4	7,2	S5
MeOH	23	A5	0,3	
MeOH	24-33	A6	191,4	
MeOH	34-41	A7	83,1	
MeOH	42-50	A8	53,8	
MeOH	51-53	A9	7,9	
MeOH	54-62	A10	7,4	
MeOH	63-85	A11	147,1	
MeOH	86-93	A12	0,6	

Porcentagem de recuperação da amostra: 88,0%

A fração A6 (191,4 mg) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica de sílica-gel (5,75 g; Ø= 1,0 cm), empacotada com Hexano e eluída com Hexano, Hexano:AcOEt, AcOEt e AcOEt:MeOH em gradiente crescente de polaridade. As 156 frações coletadas foram reunidas em 13 subfrações de acordo com as semelhanças observadas em CCD, como mostra a **Tabela 7**. A partir deste fracionamento pode-se isolar novamente a substância **S5** (2,5 mg) da fração A6.1.

Tabela 7: Dados do fracionamento em sílica-gel da fração A6.

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)	Substância isolada
Hexano 100% a Hexano:AcOEt 18%	1-12	A6.1	2,5	S5
Hexano:AcOEt 20% a Hexano:AcOEt 25%	13-19	A6.2	12,5	
Hexano:AcOEt 25% a Hexano:AcOEt 55%	20-38	A6.3	4,0	
Hexano:AcOEt 60% a Hexano:AcOEt 66%	39-49	A6.4	8,8	
Hexano:AcOEt 66% a Hexano:AcOEt 82%	50-77	A6.5	25,7	
Hexano:AcOEt 82% a Hexano:AcOEt 95%	78-88	A6.6	6,2	
AcOEt 100% a AcOEt:MeOH 10%	89-94	A6.7	22,3	
AcOEt 15% a AcOEt:MeOH 22%	95-100	A6.8	7,0	
AcOEt:MeOH 22% a AcOEt:MeOH 35%	101-109	A6.9	0,9	
AcOEt:MeOH 35% a AcOEt:MeOH 50%	110-118	A6.10	4,0	
AcOEt:MeOH 50% a AcOEt:MeOH 75%	119-136	A6.11	4,4	
AcOEt:MeOH 80% e AcOEt:MeOH 85%	137-144	A6.12	2,0	
AcOEt:MeOH 90% a MeOH 100%	145-156	A6.13	2,3	

Porcentagem de recuperação da amostra: 53,5%.

A fração A7 (83,1 mg) foi submetida a um fracionamento em Sephadex LH 20 ($\varnothing=1,0$ cm) usando como eluentes água e metanol em gradiente decrescente de polaridade, resultando em 16 frações que foram reunidas em 16 frações de acordo com as semelhanças observadas em CCD (**Tabela 8**). Nesse processo foi isolada a substância **S6** (3,2 mg; fração A7.3) e mistura de substâncias **S7** e **S8** (3,3 mg; fração A7.8).

Tabela 8: Dados do fracionamento em Sephadex LH 20 da fração A7.

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)	Substância isolada
H ₂ O 100%	1-20	A7.1	0,4	
H ₂ O 100%	21-29	A7.2	2,0	
H ₂ O 100% a H ₂ O:MeOH 25%	30-35	A7.3	3,2	S6
H ₂ O:MeOH 25%	36-46	A7.4	0,4	
H ₂ O:MeOH 25%	47-55	A7.5	0,1	
H ₂ O:MeOH 25% a H ₂ O:MeOH 50%	56-66	A7.6	0,5	
H ₂ O:MeOH 50%	67-76	A7.7	0,7	
H ₂ O:MeOH 50%	77-85	A7.8	3,3	S7+S8
H ₂ O:MeOH 75%	86-95	A7.9	1,4	
H ₂ O:MeOH 75%	96-102	A7.10	1,6	
H ₂ O:MeOH 75% a MeOH 100%	103-105	A7.11	0,2	
MeOH 100%	106-112	A7.12	6,6	
MeOH 100%	113-117	A7.13	16,3	
MeOH 100%	118-129	A7.14	21,3	
MeOH 100%	130-141	A7.15	11,1	
MeOH 100%	142-160	A7.16	0,6	

Porcentagem de recuperação da amostra: 83,9%.

A fração A8 (53,8 mg) foi submetida a um fracionamento em Sephadex LH 20 ($\varnothing=1,0$ cm) usando como eluentes água e metanol MeOH em gradiente decrescente de polaridade. As 189 frações coletadas foram reunidas em 14 frações de acordo com as semelhanças observadas em CCD (**Tabela 9**), que levou ao isolamento das substâncias **S7** e **S8**, em mistura (5,0 mg; fração A8.6).

Tabela 9: Dados do fracionamento em Sephadex LH 20 da fração A8.

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)	Substância isolada
H ₂ O 100%	1-16	A8.1	1,9	
H ₂ O 100%	17-46	A8.2	1,7	
H ₂ O 100% a H ₂ O:MeOH 50%	47-77	A8.3	2,5	
H ₂ O:MeOH 50%	78-96	A8.4	2,9	
H ₂ O:MeOH 50%	97-118	A8.5	4,9	
H ₂ O:MeOH 50%	119-126	A8.6	5,0	S7+S8
H ₂ O:MeOH 50%	127-131	A8.7	4,5	
H ₂ O:MeOH 50%	132-136	A8.8	1,9	
H ₂ O:MeOH 50% e H ₂ O:MeOH 75%	137-142	A8.9	3,6	
H ₂ O:MeOH 75% e MeOH 100%	143-158	A8.10	6,1	
MeOH 100%	159-168	A8.11	5,8	
MeOH 100%	169-174	A8.12	3,8	
MeOH 100%	175-182	A8.13	2,7	
MeOH 100%	183-189	A8.14	2,2	

Porcentagem de recuperação da amostra: 92,0%.

A Fração A11 (147,1 mg) foi submetida ao mesmo procedimento descrito para A8, sem obtenção de resultados.

As demais frações de SBA expuseram perfil cromatográfico complexo em CCD e uma baixa quantidade de massa, o que ocasionou a impossibilidade de seus estudos.

Outra parte da fração acetato de etila (SBA', 473,5mg) foi submetida a um fracionamento em Sephadex LH 20 ($\varnothing=1,5$ cm) usando como eluentes água e metanol em gradiente decrescente de polaridade com o recolhimento de 289 frações que foram reunidas em 39 subfrações de acordo com as semelhanças cromatográficas observadas em CCD (**Tabela 10**), que levou ao isolamento das substâncias **S9**(5,1 mg; fração A'15), **S7 e S8**, sendo as duas últimas em mistura (20,8 mg; fração A'32) (**Esquema 5**).

Esquema 5: Estudo da segunda parte da fração acetato de etila (SBA').

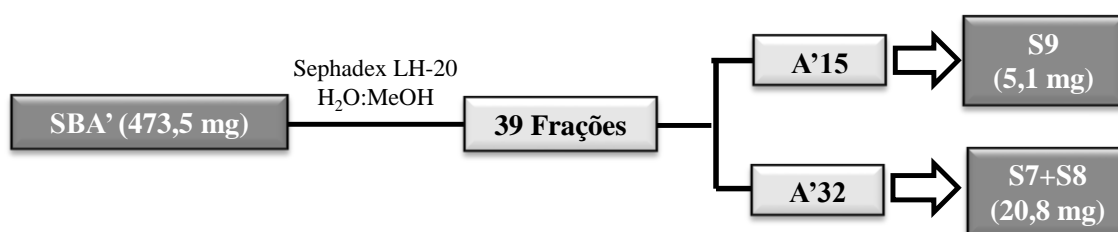


Tabela 10: Dados do fracionamento em Sephadex LH 20 da fração SBA'

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)	Substância isolada
H ₂ O 100%	1-11	A'1	5,2	
H ₂ O 100%	12-20	A'2	0,3	
H ₂ O 100%	21-28	A'3	4,7	
H ₂ O 100%	29-37	A'4	8,5	
H ₂ O 100%	38-46	A'5	4,2	
H ₂ O 100% a H ₂ O:MeOH 25%	47-56	A'6	3,6	
H ₂ O:MeOH 25%	57-70	A'7	2,6	
H ₂ O:MeOH 25%	71-95	A'8	5,2	
H ₂ O:MeOH 25%	96-115	A'9	6,2	
H ₂ O:MeOH 25%	116-119	A'10	2,5	
H ₂ O:MeOH 25% e H ₂ O:MeOH 50%	120-128	A'11	5,2	
H ₂ O:MeOH 50%	129-136	A'12	4,2	
H ₂ O:MeOH 50%	137-140	A'13	2,9	
H ₂ O:MeOH 50%	141-143	A'14	1,6	
H ₂ O:MeOH 50%	144-146	A'15	5,1	S9
H ₂ O:MeOH 50%	147-149	A'16	4,5	
H ₂ O:MeOH 50%	150	A'17	7,2	
H ₂ O:MeOH 50%	151	A'18	3,7	
H ₂ O:MeOH 50%	152-159	A'19	13,4	
H ₂ O:MeOH 50% e H ₂ O:MeOH 75%	160-165	A'20	6,0	
H ₂ O:MeOH 75%	166-168	A'21	16,0	
H ₂ O:MeOH 75%	169-177	A'22	6,1	
H ₂ O:MeOH 75%	178-182	A'23	5,5	
H ₂ O:MeOH 75%	183-185	A'24	3,5	
H ₂ O:MeOH 75%	186-194	A'25	6,5	
H ₂ O:MeOH 75%	195-197	A'26	3,5	
H ₂ O:MeOH 75%	198-203	A'27	20,3	
H ₂ O:MeOH 75%	204-215	A'28	45,4	
H ₂ O:MeOH 75% e MeOH 100%	216-224	A'29	13,0	
MeOH 100%	225-234	A'30	32,5	
MeOH 100%	235-241	A'31	31,1	
MeOH 100%	242-247	A'32	20,8	S7+S8
MeOH 100%	248-249	A'33	9,5	
MeOH 100%	250-254	A'34	5,8	
MeOH 100%	255-263	A'35	6,0	
MeOH 100%	264-267	A'36	3,3	
MeOH 100%	268-272	A'37	4,0	
MeOH 100%	273-278	A'38	6,1	
MeOH 100%	279-289	A'39	3,8	

Porcentagem de recuperação da amostra: 71,7%

4.2.2.4 ESTUDO DA FRAÇÃO BUTANÓLICA (SBB)

Como percebido pelo **Esquema 6 (a)**, parte da fração SBB (600,0mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH-20 ($\varnothing=1,5\text{cm}$) com metanol, sendo recolhidas 117 subfrações reunidas em 13 subfrações de acordo com as semelhanças observadas em CCD (**Tabela 11**), resultando novamente no isolamento de 3,6 mg da substância **S6**(fração B10).

Esquema 6: Estudo da fração butanólica a) SBB e b)SBB'.

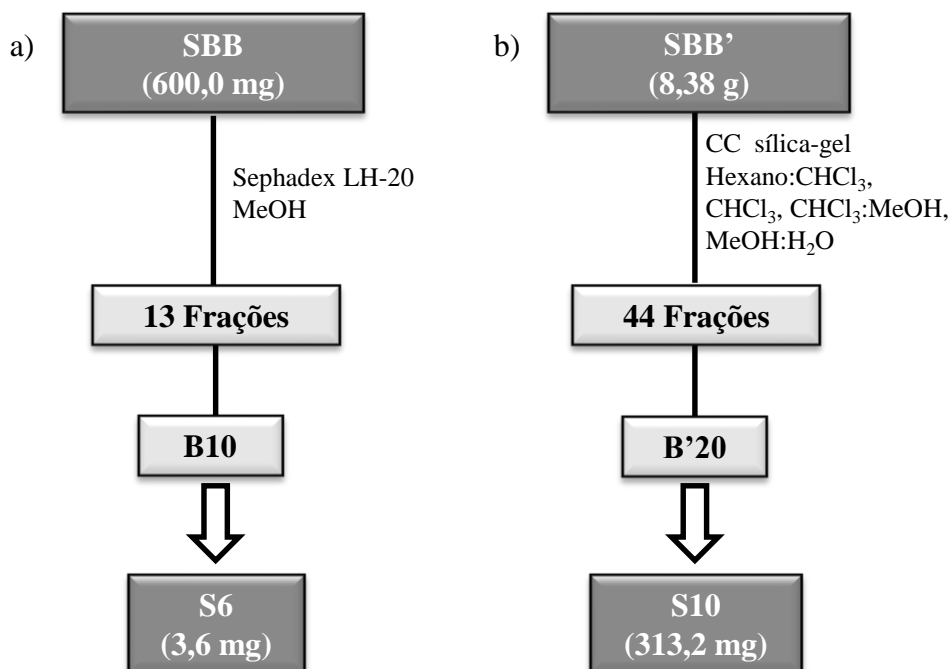


Tabela 11: Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração SBB.

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa(mg)	Substância isolada
MeOH	1-6	B1	7,2	
MeOH	7-13	B2	3,5	
MeOH	14-16	B3	7,4	
MeOH	17-27	B4	68,3	
MeOH	28-31	B5	33,9	
MeOH	32-42	B6	122,6	
MeOH	43-52	B7	120,6	
MeOH	53-61	B8	58,2	
MeOH	62-72	B9	21,4	
MeOH	73-81	B10	3,6	S6
MeOH	82-92	B11	7,7	
MeOH	93-110	B12	4,9	
MeOH	111-117	B13	6,3	

Porcentagem de recuperação da amostra: 77,6%

As frações B6, B7 e B8 foram submetidas a procedimentos em Sephadex LH-20, sem sucesso no isolamento de substâncias, ao passo que a fração B5 não pode ser estudada por apresentar problemas de solubilidade nos solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol, água e na mistura dos mesmos; as demais frações detiveram uma quantidade minoritária de massa e/ou apresentaram manchas pretas em CCD ao serem reveladas com anisaldeído, com esta característica de açúcar, o que inviabilizou suas análises.

Como a fração Butanólica apresentava manchas alaranjadas em CCD ao ser revelada com Dragendorff, poderiam estar presentes substâncias nitrogenadas, como alcaloides. Na busca por esses compostos e, após verificar a dificuldade em se isolar compostos na coluna de Sephadex LH-20, outra parte da fração Butanólica (SBB', m=8,3971 g) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica de sílica-gel (255,90 g; Ø=5,0 cm) empacotada com hexano, dopada com NH₄OH e eluída com Hexano, Hexano:CHCl₃, CHCl₃ e CHCl₃:MeOH em gradiente crescente de polaridade (**Esquema 6 (b)**). As 525 frações coletadas foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD em 44 novas frações, como mostra a **Tabela 12**; a partir deste fracionamento pode-se isolar 313,2 mg da substância **S10**(subfração B20).

Tabela 12: Dados do fracionamento em sílica-gel da fração SBB'.

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa (mg)	Substância isolada
Hexano:CHCl ₃ 50% e Hexano:CHCl ₃ 55%	1-6	B'1	19,6	
Hexano:CHCl ₃ 55%	7-9	B'2	23,8	
Hexano:CHCl ₃ 55%	10-14	B'3	17,3	
Hexano:CHCl ₃ 55%	15-17	B'4	8,3	
Hexano:CHCl ₃ 55% e Hexano:CHCl ₃ 60%	18-26	B'5	19,3	
Hexano:CHCl ₃ 55% a Hexano:CHCl ₃ 70%	27-35	B'6	18,4	
Hexano:CHCl ₃ 70%	36-43	B'7	25,5	
Hexano:CHCl ₃ 80%	44-52	B'8	18,3	
Hexano:CHCl ₃ 80% e Hexano:CHCl ₃ 90%	53-63	B'9	18,6	
Hexano:CHCl ₃ 90% e CHCl ₃ 100%	64-74	B'10	13,9	
CHCl ₃ 100%	75-87	B'11	14,2	
CHCl ₃ 100% e CHCl ₃ :MeOH 10%	88-115	B'12	17,1	
CHCl ₃ :MeOH 10% e CHCl ₃ :MeOH 15%	116-132	B'13	14,8	
CHCl ₃ :MeOH 15%	133-153	B'14	16,3	
CHCl ₃ :MeOH 15%	154-163	B'15	18,4	
CHCl ₃ :MeOH 15%	164-172	B'16	12,3	
CHCl ₃ :MeOH 15%	173-181	B'17	28,3	
CHCl ₃ :MeOH 15% e CHCl ₃ :MeOH 20%	182-218	B'18	31,1	
CHCl ₃ :MeOH 20% a CHCl ₃ :MeOH 30%	219-261	B'19	102,0	
CHCl ₃ :MeOH 30% a CHCl ₃ :MeOH 50%	262-298	B'20	313,2	S10
CHCl ₃ :MeOH 50%	299-304	B'21	107,7	
CHCl ₃ :MeOH 50% e CHCl ₃ :MeOH 60%	305-311	B'22	236,3	
CHCl ₃ :MeOH 60%	312-316	B'23	416,7	
CHCl ₃ :MeOH 60%	317	B'24	163,3	
CHCl ₃ :MeOH 60% e CHCl ₃ :MeOH 65%	318-319	B'25	81,3	
CHCl ₃ :MeOH 65%	320-322	B'26	212,2	
CHCl ₃ :MeOH 65%	323-325	B'27	123,6	
CHCl ₃ :MeOH 65%	326	B'28	41,9	
CHCl ₃ :MeOH 65% e CHCl ₃ :MeOH 70%	327-343	B'29	186,0	
CHCl ₃ :MeOH 70% e CHCl ₃ :MeOH 75%	344-347	B'30	52,3	
CHCl ₃ :MeOH 75%	348-352	B'31	84,4	
CHCl ₃ :MeOH 75%	353-364	B'32	85,8	
CHCl ₃ :MeOH 75% e CHCl ₃ :MeOH 80%	365-372	B'33	38,5	
CHCl ₃ :MeOH 80%	373-384	B'34	73,6	
CHCl ₃ :MeOH 80% e CHCl ₃ :MeOH 85%	385-397	B'35	42,9	
CHCl ₃ :MeOH 85%	398-407	B'36	32,0	
CHCl ₃ :MeOH 85% e CHCl ₃ :MeOH 90%	408-419	B'37	28,5	
MeOH 100%	420-451	B'38	41,0	
MeOH 100% a MeOH:H ₂ O 10%	452-459	B'39	20,5	
MeOH:H ₂ O 10% e MeOH:H ₂ O 20%	460-489	B'40	115,7	
MeOH:H ₂ O 20%	490-499	B'41	31,6	
MeOH:H ₂ O 20% a MeOH:H ₂ O 30%	500-520	B'42	88,3	
MeOH:H ₂ O 30%	521-523	B'43	45,9	
MeOH:H ₂ O 30%	524-525	B'44	33,6	

Porcentagem de recuperação da amostra: 37,3%

4.2.2.5 ESTUDO DA FRAÇÃO HIDROMETANÓLICA (SBHM)

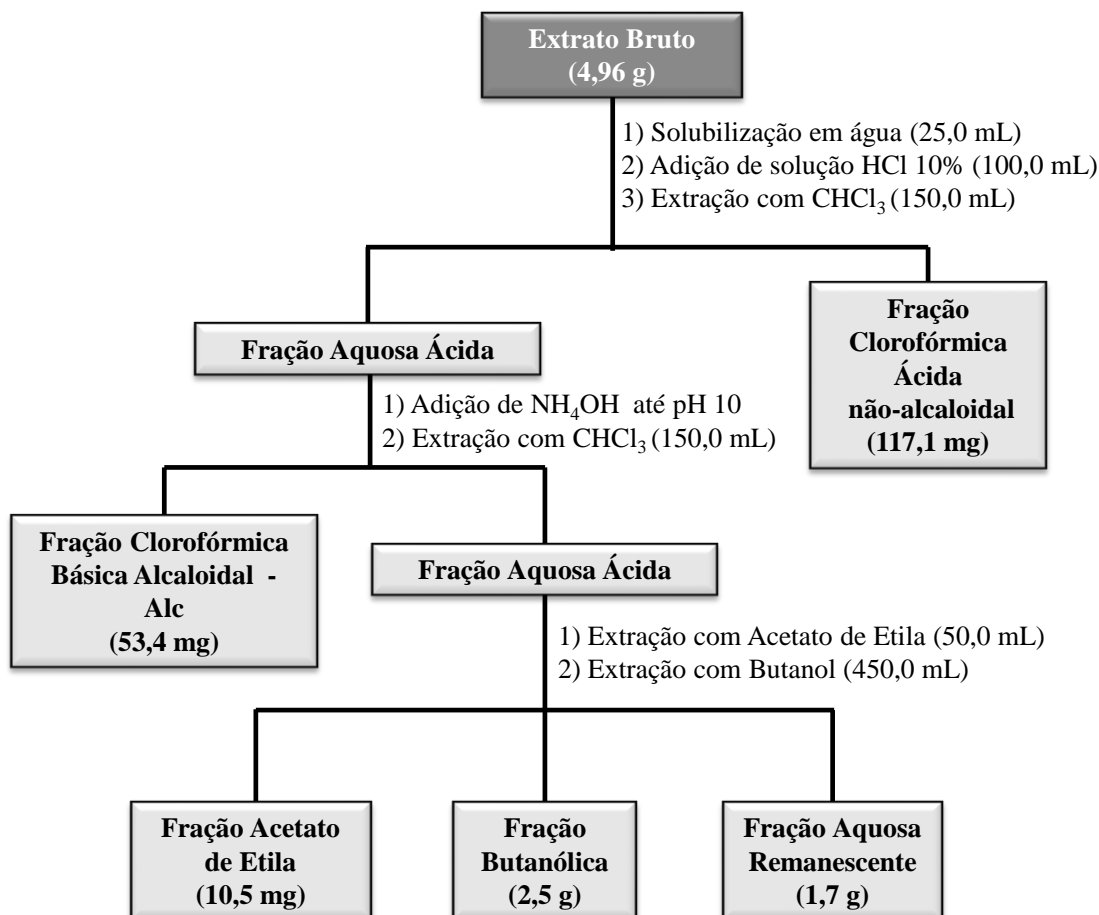
Parte da fração hidrometanólica (SBHM, 655,8 mg) foi submetida a um fracionamento em Sephadex LH-20 usando como eluentes água e metanol em gradiente crescente de polaridade, sem obtenção de substâncias puras devido a presença constante de açúcar observada em CCD.

Outra parte desta fração (SBHM', 421,1 mg) foi submetida a um fracionamento em coluna de sílica-gel (12,63 g; Ø=1,3 cm), empacotada com hexano e eluída com Hexano, Hexano:CHCl₃, CHCl₃ e CHCl₃:MeOH em gradiente crescente de polaridade. Devido aos motivos expostos anteriormente, deste procedimento também não foram obtidos compostos puros.

4.2.3 EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE

A parte restante do extrato bruto SB (4,96 g) foi solubilizada em 25 mL de água e acidificada com uma solução de HCl 10% (100 mL). Após isso, a solução foi extraída com clorofórmio, o que gerou a fração clorofórmica ácida não-alcaloídica (117,10 mg) e a fração aquosa ácida remanescente; nesta última adicionou-se NH₄OH até atingir o pH 10, com subsequente extração com clorofórmio, acetato de etila e butanol, obtendo-se as frações clorofórmica básica-alcaloídica (53,40 mg), acetato de etila (10,50 mg), butanólica (2,50 g) e a fração aquosa básica remanescente (1,70 g) como demonstrado no **Esquema 7**.

Esquema 7: Procedimento empregado para o fracionamento por extração ácido-base do extrato bruto de *Sabicea brasiliensis*.



A fração Clorofórmica Básica Alcaloídica (Alc; 53,4 mg) foi submetida à filtração em Sephadex LH 20 ($\varnothing=1,0$ cm) com MeOH (**Esquema 8**), obtendo-se 30 frações de aproximadamente 2 mL que foram agrupadas em 8 subfrações de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico observado em CCD (**Tabela 13**), resultando no isolamento da mistura de substâncias **S7 e S8**(3,2 mg) da fração Alc-4.

Esquema 8: Estudo da fração Clorofórmica Básica Alcaloídica (Alc).

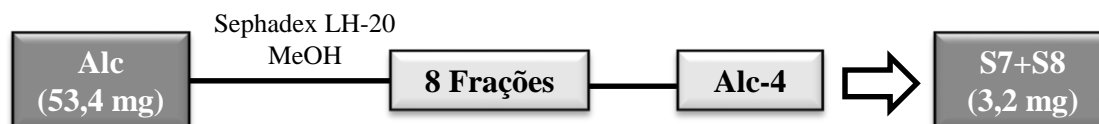


Tabela 13: Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração Clorofórmica Básica Alcaloídai.

Eluente	Frações reunidas	Código	Massa(mg)	Substância isolada
MeOH	1-10	Alc-1	5,2	
MeOH	12-14	Alc-2	9,8	
MeOH	16-16	Alc-3	4,3	
MeOH	17-19	Alc-4	3,2	S7+S8
MeOH	20-23	Alc-5	5,7	
MeOH	24-26	Alc-6	6,8	
MeOH	27-28	Alc-7	5,4	
MeOH	29-30	Alc-8	7,1	

Porcentagem de recuperação da amostra: 90,0%

As demais frações desta coluna demonstraram ser misturas complexas em CCD e, por possuírem massa reduzida, não tiveram seu estudo continuado.

As frações clorofórmica ácida não-alcaloídai (117,10 mg) e butanólica (2,50 g) foram submetidas a procedimentos de purificação sem isolamento de compostos; as frações acetato de etila (10,50 mg) e aquosa básica remanescente (1,70 g) não foram estudadas por possuir pouca massa (no caso da primeira) e se apresentarem como misturas complexas em CCD (no caso de ambas).

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada no Departamento de Química /UEM. Os testes foram realizados com o extrato bruto e frações de *Sabicea brasiliensis*. Os potenciais de atividade antioxidante dos extratos e frações foram determinados com base na atividade sequestradora de radical livre do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (EL MASSRY, 2002). As amostras (20,0 mg) e o padrão em metanol (10,0 mL) foram adicionados em diferentes volumes à 2 mL de uma solução de DPPH (4,7 mg) em metanol (75 mL) preparado em frasco escuro. Após 30 minutos, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV-visível (Varian, modelo Carey 50), a 515,5 nm, empregando metanol como branco. Todos os testes foram realizados em triplicata. Como solução controle foi utilizada a solução de DPPH sem adição das amostras. Como padrão foi utilizado o BHTe sua absorbância foi determinada para 5, 10, 25 e 50 µL.

A porcentagem de inibição do radical livre DPPH, foi calculada pela **Equação 01**.

$$%I = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \text{ (Equação 01)}$$

Onde: A_0 = absorbância da reação controle;

A_1 =absorbância na presença das amostras.

A porcentagem de inibição contra a concentração ($\mu\text{g/mL}$) da amostra foi plotada para se obter a quantidade de antioxidante necessária para um decréscimo de 50% da concentração inicial (IC_{50}). O IC_{50} foi obtido pela aplicação de regressão linear.

4.4 BIOENSAIO PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

A atividade anti-inflamatória foi realizada no Departamento de Farmácia e Farmacologia da UEM, sob orientação da Professora Dr^a Ciomar A. Bersani Amado, segundo a metodologia descrita em Van Harman (1974).

4.4.1 TESTE ANTIENDEMATOGÊNICO

No modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC- 200 μg), o EB e as frações acetato de etila (SBA), butanólica (SBB) e hidrometanólica (SBHM) foram diluídas em acetona 70%, e as frações hexânica (SBH) e clorofórmica (SBC) foram diluídas em clorofórmio, imediatamente antes do uso. Depois da aplicação do OC, grupos de camundongos Swiss (30-40 g) receberam o extrato bruto e as frações SBH, SBC, SBA, SBB e SBHM (5,0 mg/orelha) na orelha esquerda. Na orelha direita foi aplicado apenas o veículo (acetona 70% ou clorofórmio) (VAN ARMAN, 1974). Após 6 horas, os animais foram anestesiados, submetidos à eutanásia, as orelhas seccionadas em discos circulares de 7,0 mm de diâmetro e pesadas (mg) em balança analítica. A porcentagem de inibição foi calculada.

4.4.2 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi avaliada no sobrenadante de homogenados das secções de orelhas, que foram colocadas em tampão fosfato de potássio, contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio em homogeneizador de Potter (BRADLEY, 1982). O homogenado foi agitado em vórtex e centrifugado; 10ml do sobrenadante obtido foram adicionados em microplaca de 96 cavidades, em triplicada, sendo a seguir, adicionada uma solução tampão contendo dihidrocloreto de o-dianisidina, água bidestilada, tampão fosfato de potássio e H_2O_2 1%. A reação foi interrompida com solução de acetato de sódio e a atividade da enzima foi determinada pela técnica de ponto final através da medida de absorbância em comprimento de onda de 460 nm.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

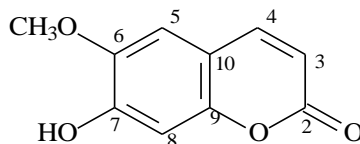
O estudo químico das raízes de *Sabicea brasiliensis* resultou no isolamento de 10 compostos sendo três pertencentes à classe dos derivados do ácido cafeoilquínico (**S6**, **S7** e **S8**), uma cumarina (**S4**), um triterpeno (**S5**), três esteroides (**S1**, **S2** e **S3**), um esteroide glicosilado (**S9**) e um dissacarídeo (**S10**).

A elucidação estrutural das substâncias isoladas foi realizada através da análise de seus dados espectroscópicos de RMN uni e bidimensionais e de massas, além de comparação com dados obtidos da literatura.

Na realização da atividade antioxidante, apenas o extrato bruto e a fração acetato de etila tiveram efeito moderado quando comparado ao padrão BHT.

Na realização do teste anti-edematogênico, o extrato bruto e as frações não tiveram sucesso, porém na avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) as frações acetato de etila e butanólica das raízes de *Sabicea brasiliensis* apresentam uma atividade anti-inflamatória significativa no modelo de migração celular.

5.1 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE S4

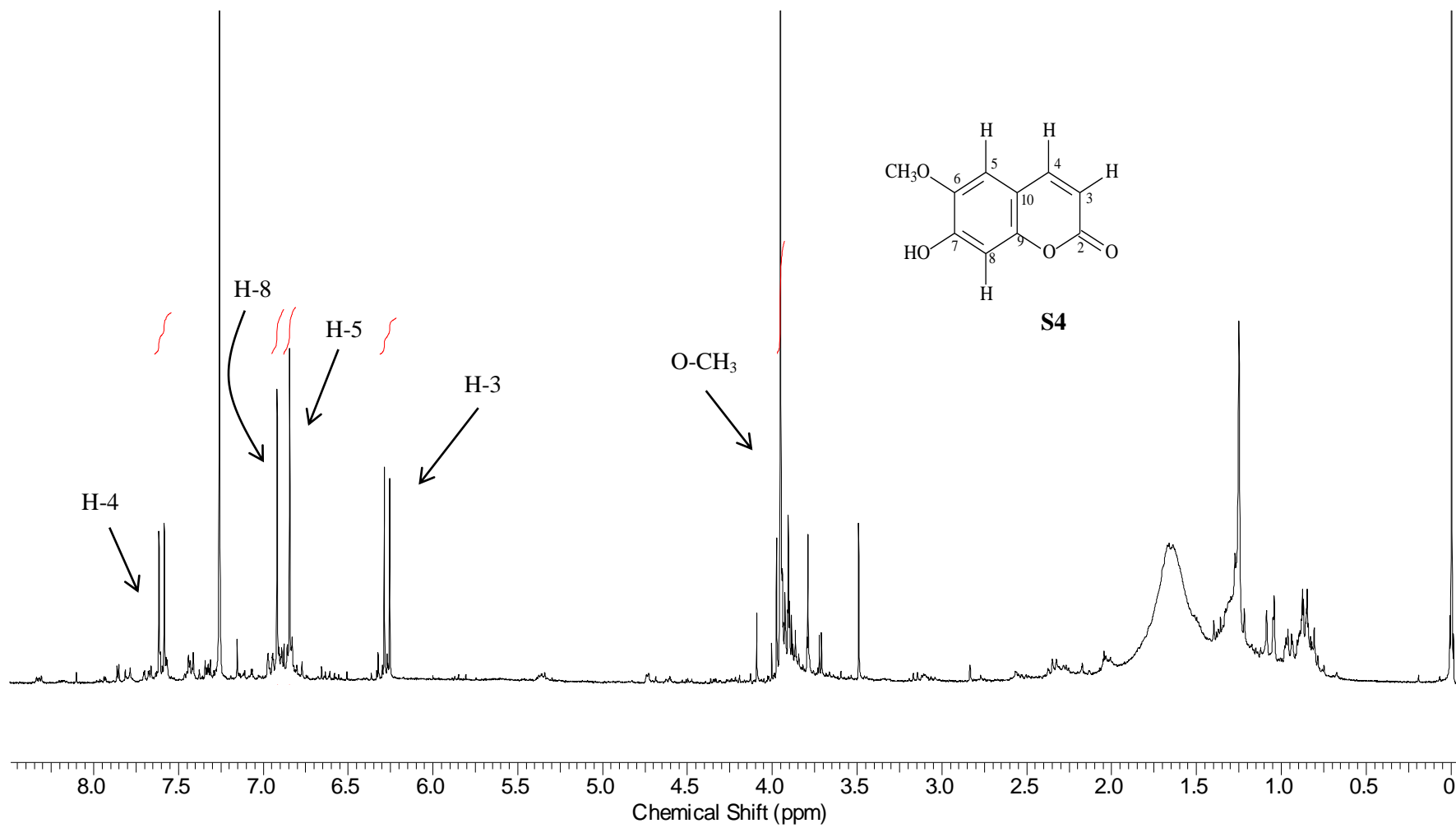


S4

O composto **S4** (2,1 mg) foi isolado da fração clorofórmica com aspecto de um sólido amarelo solúvel em clorofórmio. Ao analisar-se a placa de CCD desta substância em luz UV com comprimento de onda de 366 nm, percebeu-se a fluorescência azul indicativa de sistemas conjugados.

No espectro de RMN de ^1H de **S4** (**Figura 14**) os dupletos em δ_{H} 6,29 e 7,62 foram atribuídos a dois hidrogênios típicos de sistema carbonílico α,β -insaturado, sendo que as constantes de acoplamento de 9,3 Hz sugerem que estes hidrogênios estão em *cis*; estes sinais denotaram a presença de uma aglicona lactônica presentes em compostos da classe das cumarinas; os hidrogênios em questão tratam-se do H-3 e H-4. Além disso, dois singletos em δ_{H} 6,85 e 6,92 sugeriram a presença de um anel benzênico na estrutura, sendo que tais valores condizem com os hidrogênios H-8 e H-5; ademais, o singlete em δ_{H} 3,96 indica a presença de um grupo metoxila na estrutura.

Figura 14: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,06MHz) da substância **S4**.



Os sinais averiguados no espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 15**) juntamente com as correlações verificadas no mapa de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) HSQC (**Figura 16**) auxiliaram na caracterização da amostra; observaram-se sinais próprios de carbonos não ligados a hidrogênio desistemas aromáticos em δ_{C} 111,7; 143,6 e 149,9 sinais esses que foram atribuídos aos carbonos C-10, C-6, C-7 e C-9. Além disso, sinais em δ_{C} 107,7 e 103,4 são indicativos de carbonos ligados a hidrogênio (C-5 e C-8) desse sistema. O carbono do grupamento metoxila teve seu sinal observado em δ_{C} 56,3 e o sistema carbonílico $\alpha\beta$ -insaturado foi confirmado pelos sinais de dois carbonos em δ_{C} 113,6 (C-3) e 143,3 (C-4).

No mapa de contornos HMBC (**Figuras 17 e 18**) foi observada a correlação a longa distância (3J) entre o hidrogênio H-4 (δ_{H} 7,62) com o carbono δ_{C} 161,8 (C-2), indicando a presença do carbono carbonílico na estrutura, e com os carbonos C-5 (δ_{C} 107,7) e C-9 (δ_{C} 149,9). Os hidrogênios metoxílicos em δ_{H} 3,96 correlacionaram com o carbono C-6 (δ_{C} 143,6), sugerindo que o grupo metoxila encontra-se na posição C-6. Correlações entre o hidrogênio H-8 (δ_{H} 6,92) com os carbonos C-6 (δ_{C} 143,6) e C-10 (δ_{C} 111,7), de H-5 (δ_{H} 6,85) com os carbonos C-7 e C-9 (δ_{C} 149,9) e do hidrogênio H-3 (δ_{H} 6,29) com o carbono C-10 (δ_{C} 111,7) também foram verificadas (**Tabela 14**) (**Figura 19**).

Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 75,45MHz) da substância S4.

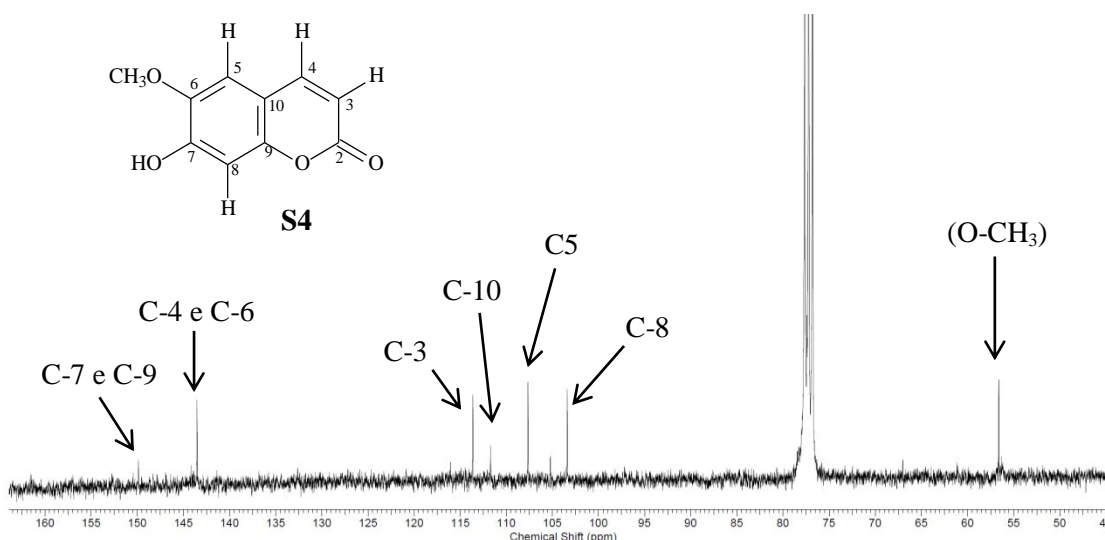


Figura 16: Mapa de correlação heteronuclear HSQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) da substância **S4**.

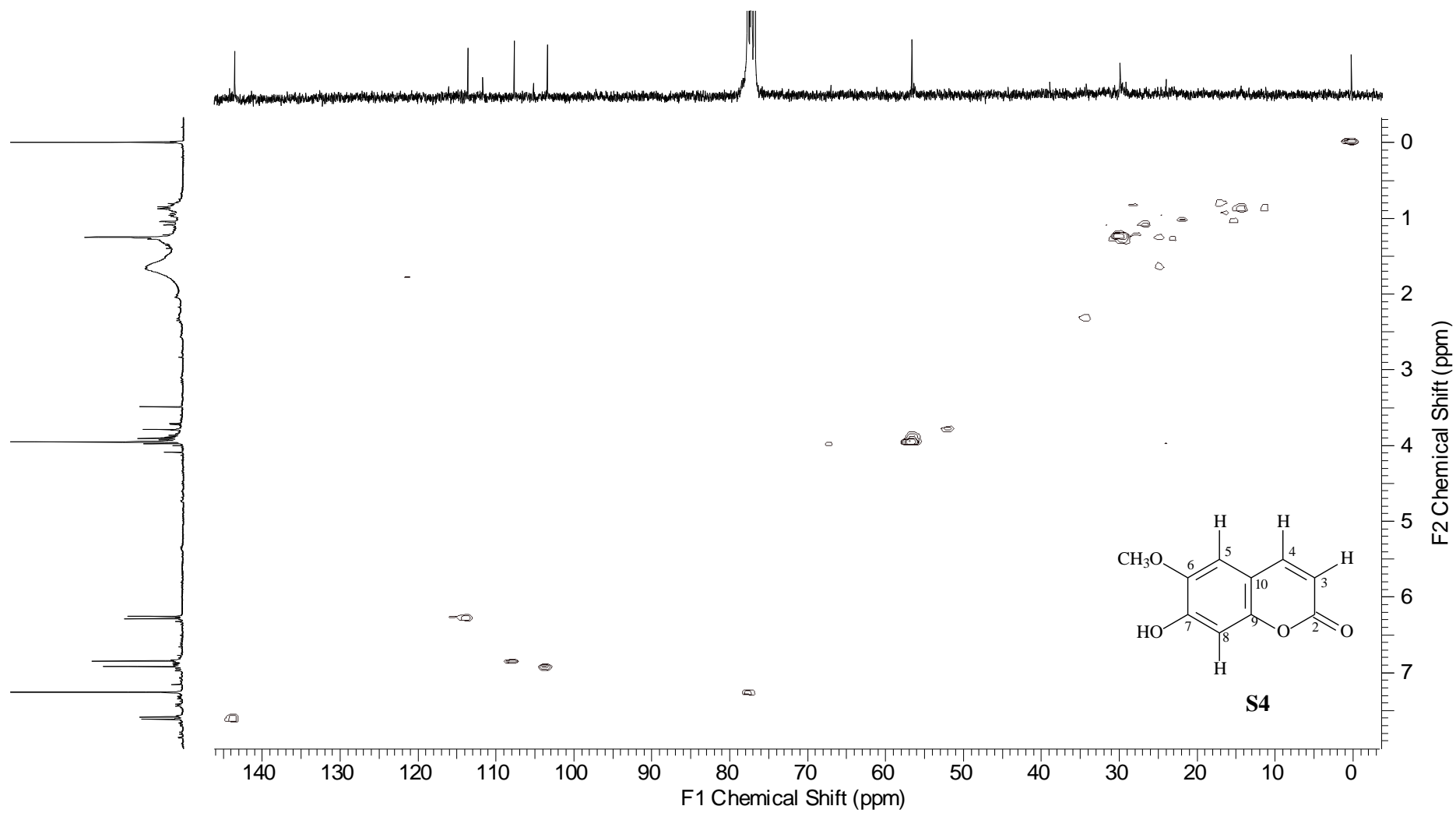


Figura 17: Mapa de correlação heteronuclear HMBC ($^1\text{H}\times^{13}\text{C}$) da substância S4.

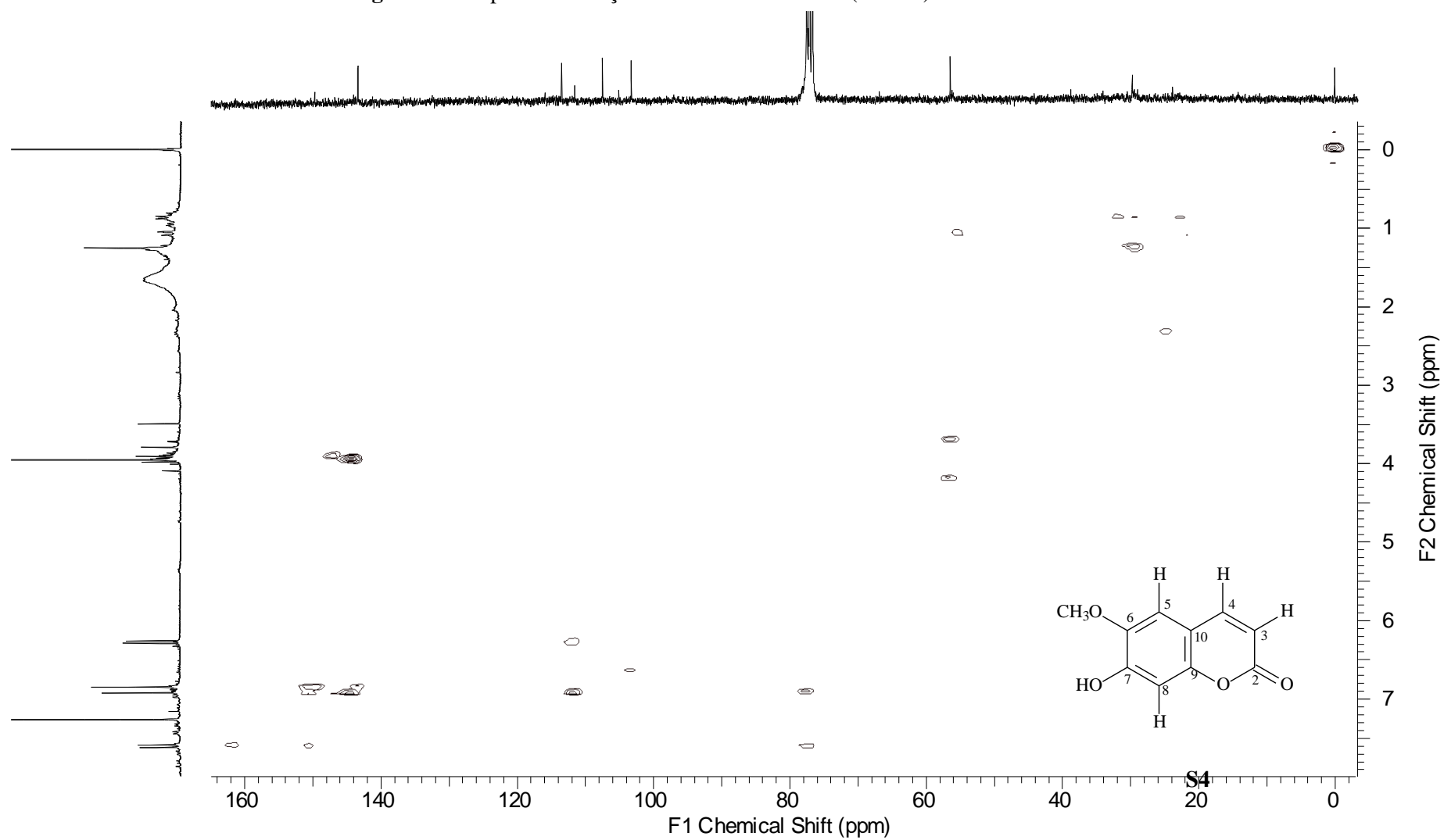


Figura 18: Expansões do mapa de correlação heteronuclear HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) da substância **S4**.

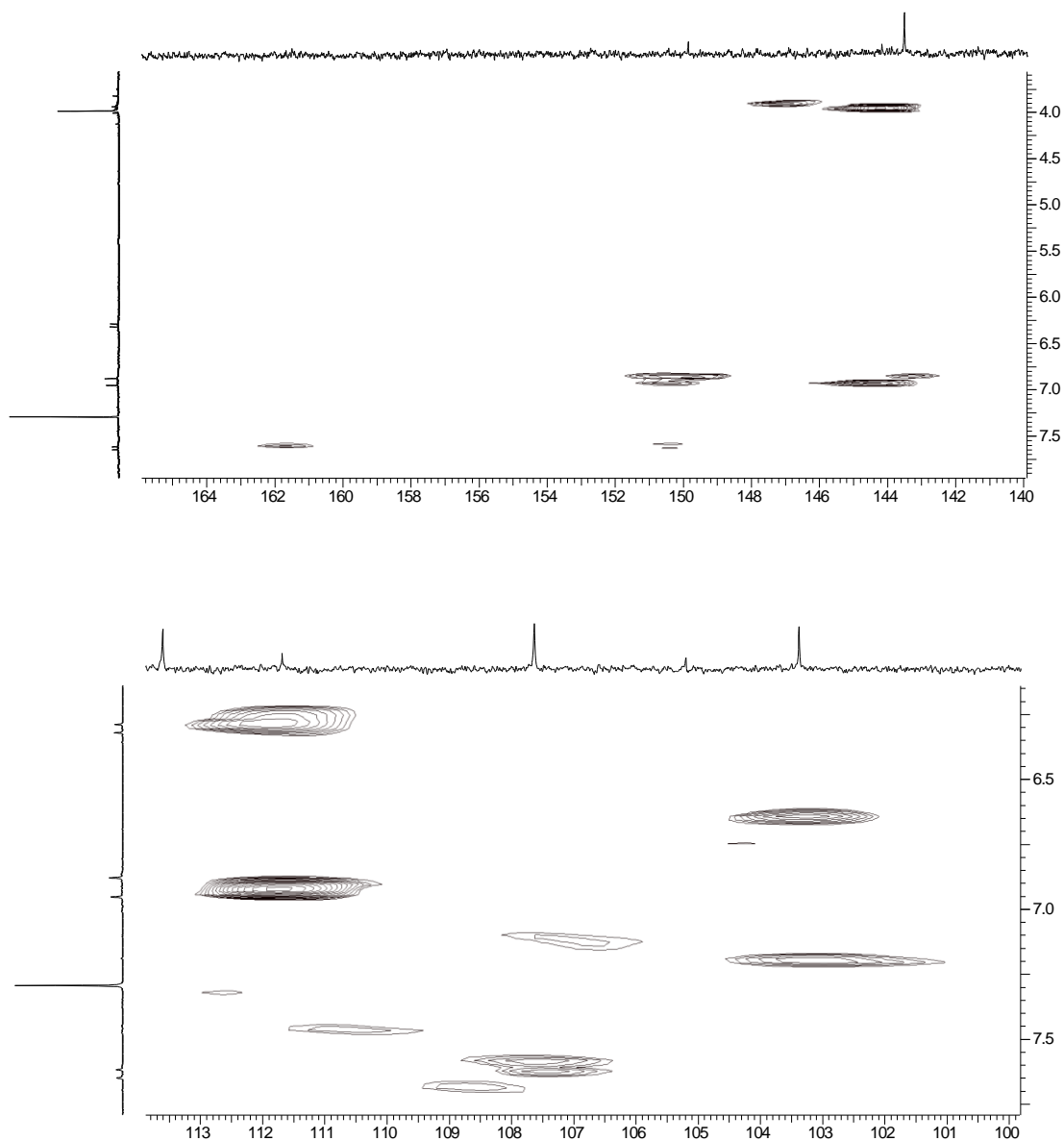


Tabela 14: Correlações observadas no mapa de contornos HMBC para S4.

δ_{H} (H)	δ_{C} (C)
6,29 (3)	111,7 (10)
7,62 (4)	161,8 (2); 107,7 (5); 149,9 (9)
6,85 (5)	149,9 (7 e 9)
6,92 (8)	143,6 (6); 111,7 (10)
3,96 (OCH ₃)	143,6 (6)

A análise das correlações $^1\text{H}^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos COSY (Figura 19) confirmou o acoplamento entre o hidrogênio H-3 em δ_{H} 6,29 e H-4 em δ_{H} 7,62 (Figura 20).

Figura 19: Mapa de correlação homonuclear COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) da substância S4.

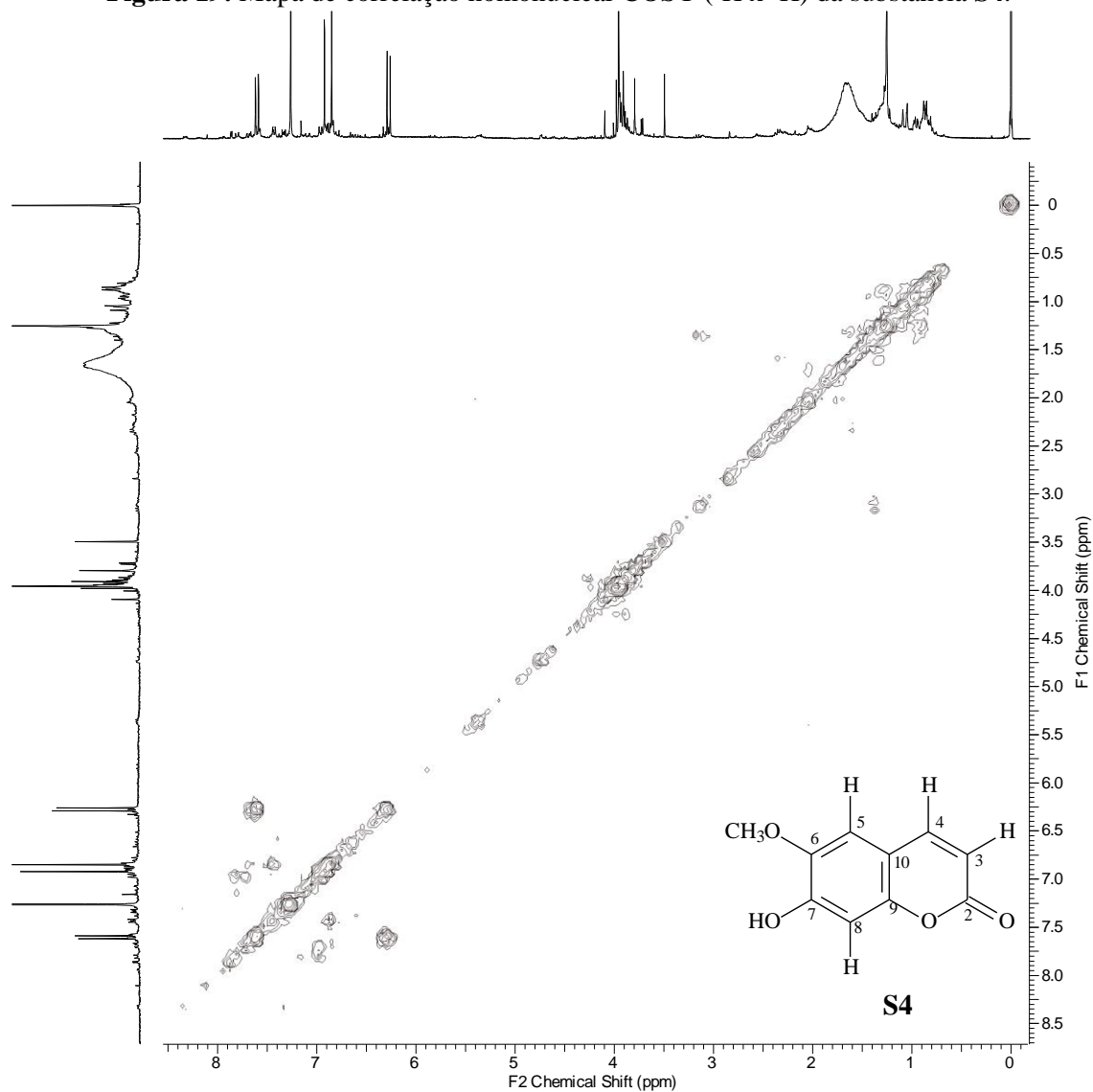
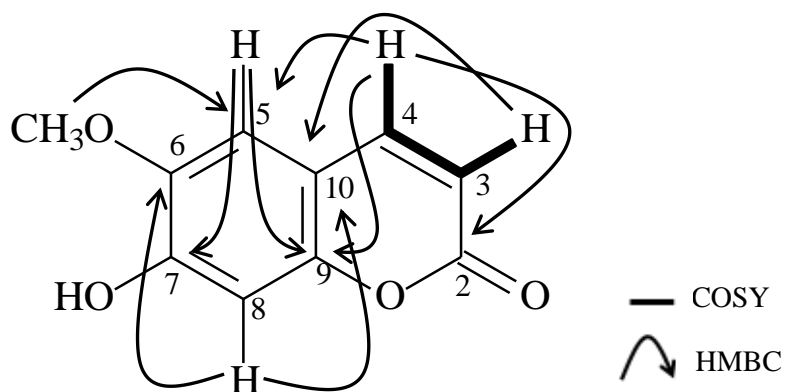


Figura 20: Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC e COSY para S4.



A posição do grupo metoxila em C-6 foi confirmada pela técnica de diferença de NOE (**Figura 21**) que apresentou um ganho de intensidade no sinal em δ_H 6,85 (H-5) quando irradiado os hidrogênios do grupamento metoxila (δ_H 3,96). A posição do H-5 (δ_H 6,85), por sua vez, foi confirmada por essa mesma técnica (**Figura 22**) ao se irradiar o H-4 (δ_H 7,62).

Figura 21: Espectro de diferença de NOE da substância **S4** com irradiação em δ_H 3,96.

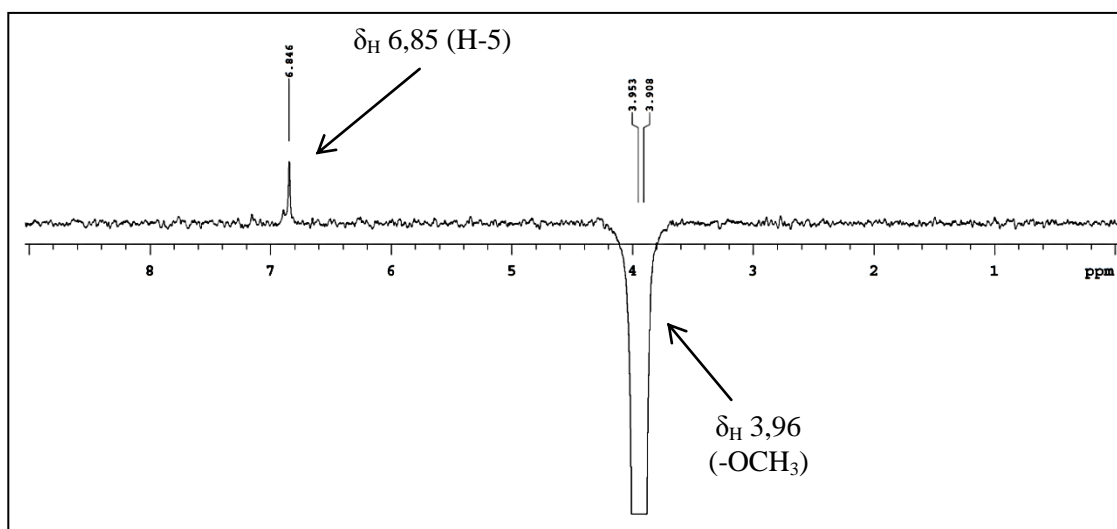
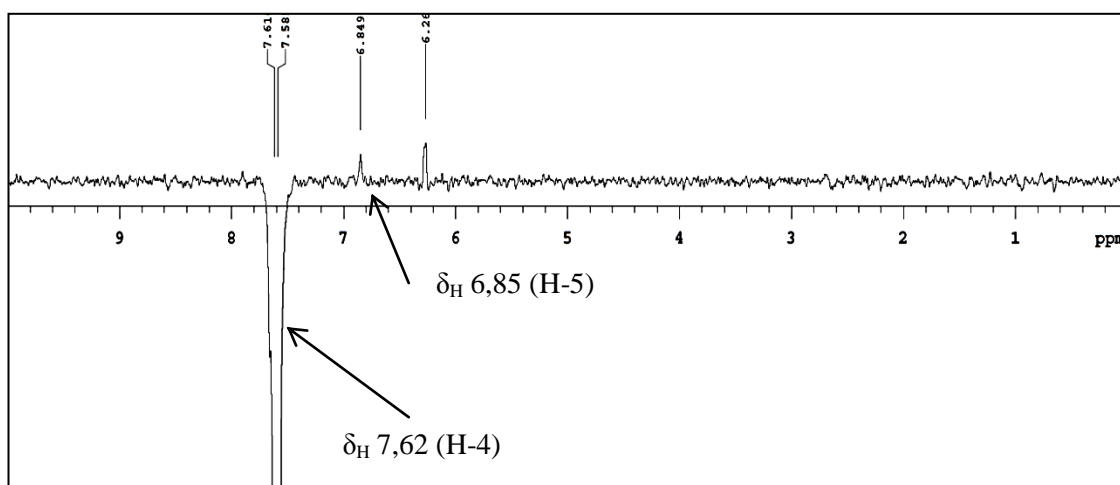


Figura 22: Espectro de diferença de NOE da substância **S4** com irradiação em δ_H 7,62.



Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância **S4** foram comparados com os dados constantes na literatura (**Tabela 15**) e se mostraram concordantes para a escopoletina(**33**) (BAYOUMI, 2010).

Tabela 15: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para S4 e para a Escopoletina.

S4			Escopoletina*	
C	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}
2	-	161,8	-	164,3
3	6,29 (d, 9,3)	113,6	6,19 (d, 9,6)	112,6
4	7,62 (d, 9,3)	143,6	7,84 (d, 9,6)	146,1
5	6,85 (s)	107,7	7,09 (s)	109,9
6	-	143,6	-	141,1
7	-	149,9	-	153,0
8	6,92 (s)	103,4	6,75 (s)	104,0
9	-	149,9	-	151,4
10	-	111,7	-	112,6
OCH ₃	3,96 (s)	56,3	3,90 (s)	56,8

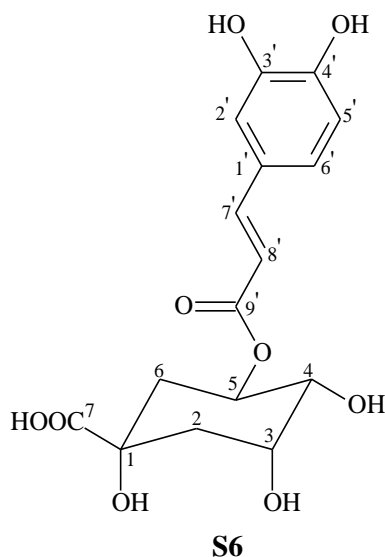
(δ -ppm; 300,06 e 75 ,5 MHz; CDCl₃); *(δ -ppm; 400,0 e 100,0; MHz CD₃OD)

Este é o primeiro relato de isolamento de um composto da classe das cumarinas no gênero *Sabicea*, porém, na literatura há referência do isolamento da escopoletina na subfamília Ixoroideae, mais precisamente de *Augusta longifolia* (CHOSE, 2010).

A escopoletina(**33**), juntamente com a isoescopoletina, foi considerada o principio ativo do extrato acetato de etila das folhas de *Artemisia argyi*, sendo que tal extrato apresentou inibição substancial da atividade proliferativa de células de leucemia humana CCRF-CEM (ADAMS, 2006).

Para essa substância destaca-se, ainda, seu potencial anti-inflamatório (KIM, 2004), sendo que a mesma, nas doses de 5mg/kg e 25mg/kg apresentou efeito protetores na fase aguda e preventiva do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico) em ratos, reduzindo a incidência de diarreia, aderência e obstrução intestinal (CHAGAS, 2010); além disso, a escopoletina é um inibidor específico da produção de citocinas (mediadores inflamatórios gerados pelos leucócitos durante o processo inflamatório) em células HMC-1 (Célula Mastocitoma Humana) e esta inibição pode explicar o seu efeito benéfico no tratamento de doenças inflamatórias crônicas (MOON, 2007).

5.2 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE S6



O composto **S6** foi isolado da fração acetato de etila (3,2 mg) e da fração butanólica (3,6 mg) sob a forma de um óleo amarelo solúvel em metanol.

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 23e 24**) foram observados, na região de hidrogênios de sistema aromático, dupletos em δ_{H} 7,03 ($J = 1,8$ Hz) e em δ_{H} 6,78 ($J = 8,1$ Hz) e um duplo duplete em δ_{H} 6,93 ($J = 8,1$ e 1,8 Hz), os quais indicavam a presença de um anel benzênico 1,3 e 4 substituído; esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6', respectivamente. Além disso, foram verificados dupletos em δ_{H} 6,28 e δ_{H} 7,58 característicos de hidrogênios de sistemas carbonílicos $\alpha\beta$ -insaturados, onde a constante de acoplamento de 15,9 Hz indica uma configuração *trans* para esses hidrogênios que foram caracterizados como H-8' e 7'; a associação de todos esses sinais remete à presença de unidade cafeoila na estrutura.

Além desses sinais, o espectro de RMN de ^1H mostrou a presença de sinais característicos de hidrogênios oximetínicos em δ_{H} 3,70, 5,36 e 4,16 e também de hidrogênios metilênicos compreendidos na faixa de δ_{H} 1,98 a 2,24, sendo estes atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-6; a comparação desses valores com os presentes na literatura (NAKATANI, 2000 e SATAKE, 2007) infere a presença do grupo quínico na estrutura. O sinal em δ_{H} 3,70 se apresentou como um duplo duplete com uma constante de acoplamento de 10,0 e 3,0 Hz relacionado ao hidrogênio na posição axial vizinho de um hidrogênio axial e outro equatorial; essas multiplicidades aliadas às constantes de acoplamento permitiram a atribuição desse sinal à H-4. O sinal em δ_{H} 5,36 (ddd) têm duas constantes de acoplamento de 10,0 Hz, correspondendo a um hidrogênio na

posição axial que possui dois hidrogênios vizinhos também na axial; foi notada também uma constante de acoplamento de 4,2 Hz, indicativa do acoplamento axial-equatorial do hidrogênio em questão com um outro hidrogênio vizinho que ocupa a posição equatorial; por essas considerações é possível afirmar que este hidrogênio é o H-5. O outro sinal trata-se de um duplete largo em δ_H 4,16 onde é verificada uma constante de acoplamento de 3,0 Hz, denotando o acoplamento entre este hidrogênio, que ocupa posição equatorial, e o hidrogênio axial vizinho; desta forma, o hidrogênio H-3 foi abrangido. Analisando-se os deslocamentos químicos de H-3 (δ_H 4,16) e H-5 (δ_H 5,36) vê-se que o desblindamento deste último infere que tal posição encontra-se substituída por um grupo retirador de densidade eletrônica, no caso, o grupo cafeoil. Desta forma, pode-se considerar que o composto **S6** trata-se de um dos isômeros do ácido cafeoil quínico, sendo que a comparação dos valores de deslocamento químico de H-3, H-4 e H-5 (**Tabela 19**) em comparação com os dados da literatura (NAKATANI, 2000 e SATAKE, 2007) apontam para a substituição na posição 5 do grupo quínico.

O espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (**Figura 25**) apresentou, na região de carbonos aromáticos, sinais de carbonos metínicos em δ_C 114,9, 116,2 e 122,8, sendo atribuídos aos carbonos C-2', C-5' e C-6' do anel. Também podem ser destacados os sinais em δ_C 146,4 e 149,1, cuja desproteção desses carbonos sugerem a substituição por grupos retiradores de densidade eletrônica, de forma que esses sinais foram atribuídos aos carbonos C-3' e C-4'. A presença do sinal em δ_C 127,5 implica a existência de um carbono não ligado a hidrogênio na posição 1 do anel aromático, sendo que as considerações efetuadas confirmam a substituição do anel nas posições 1, 3 e 4.

O espectro apresentou, ainda, um sinal em δ_C 168,8 (C-9') característico de carbonila de éster $\alpha\beta$ -insaturado, sendo que os sinais em δ_C 115,1 e 146,8 foram atribuídos aos C-8' e C-7', isto é, ao C- α e C- β desse sistema. Confirma-se, então, a presença de uma unidade cafeoil na estrutura. Fora isso, foram observados sinais de carbonos metilênicos em δ_C 39,8 (C-2) e 38,3 (C-6) e de carbonos oximetínicos em δ_C 72,3 (C-3), 74,3 (C-4) e 72,0 (C-5). O sinal típico de carbono carbonílico de ácido carboxílico C-7 e o sinal do carbono carbinólico C-1 não foram observados e mesmo assim, devido à presença dos outros sinais citados, esta unidade foi confirmada como sendo o grupo quínico.

No mapa de contornos HSQC (**Figuras 26 e 27**) foram observadas as correlações entre os deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio que auxiliaram nas atribuições e na confirmação da estrutura para esse composto.

Figura 23: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06MHz) da substância **S6**.

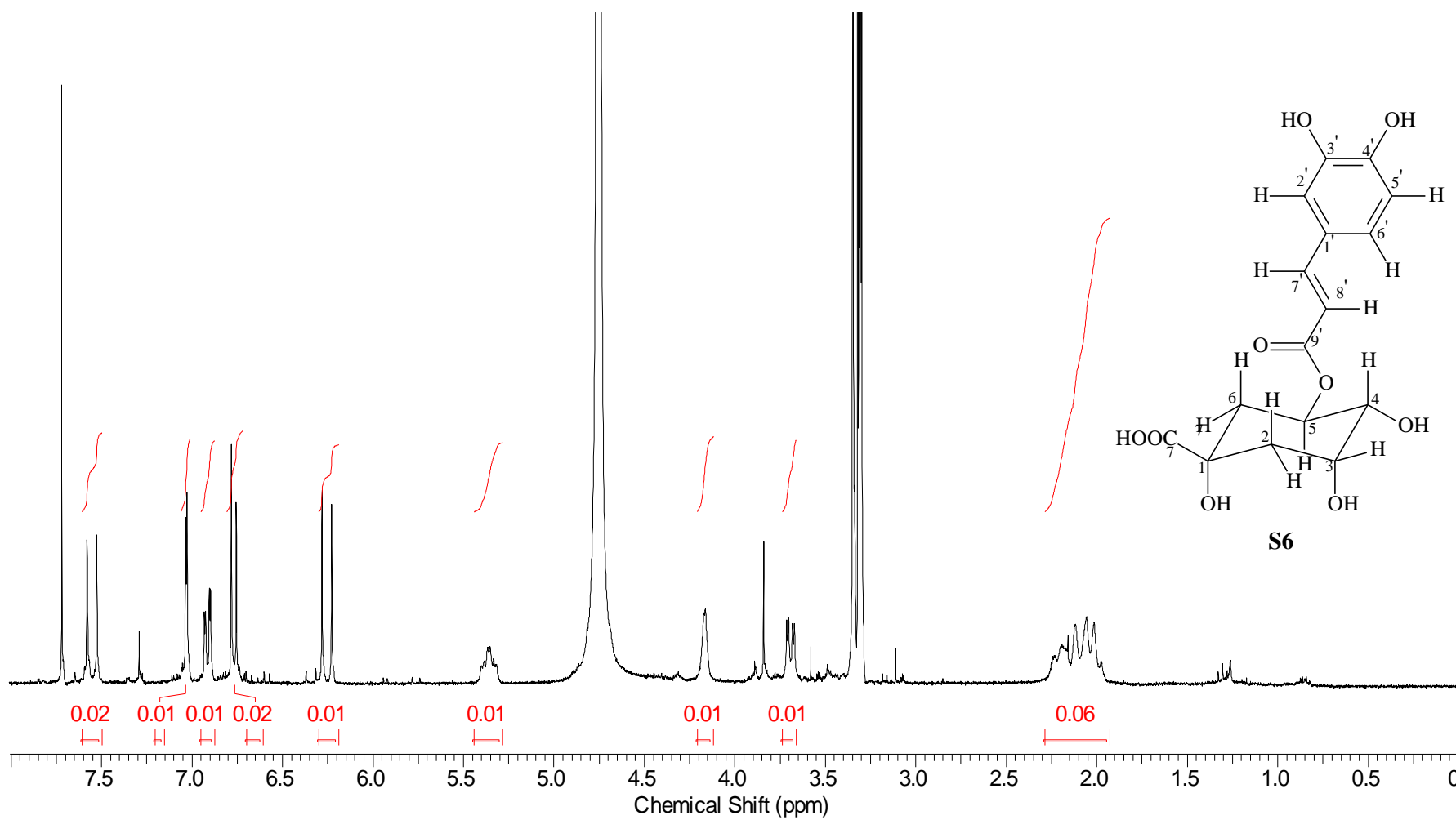


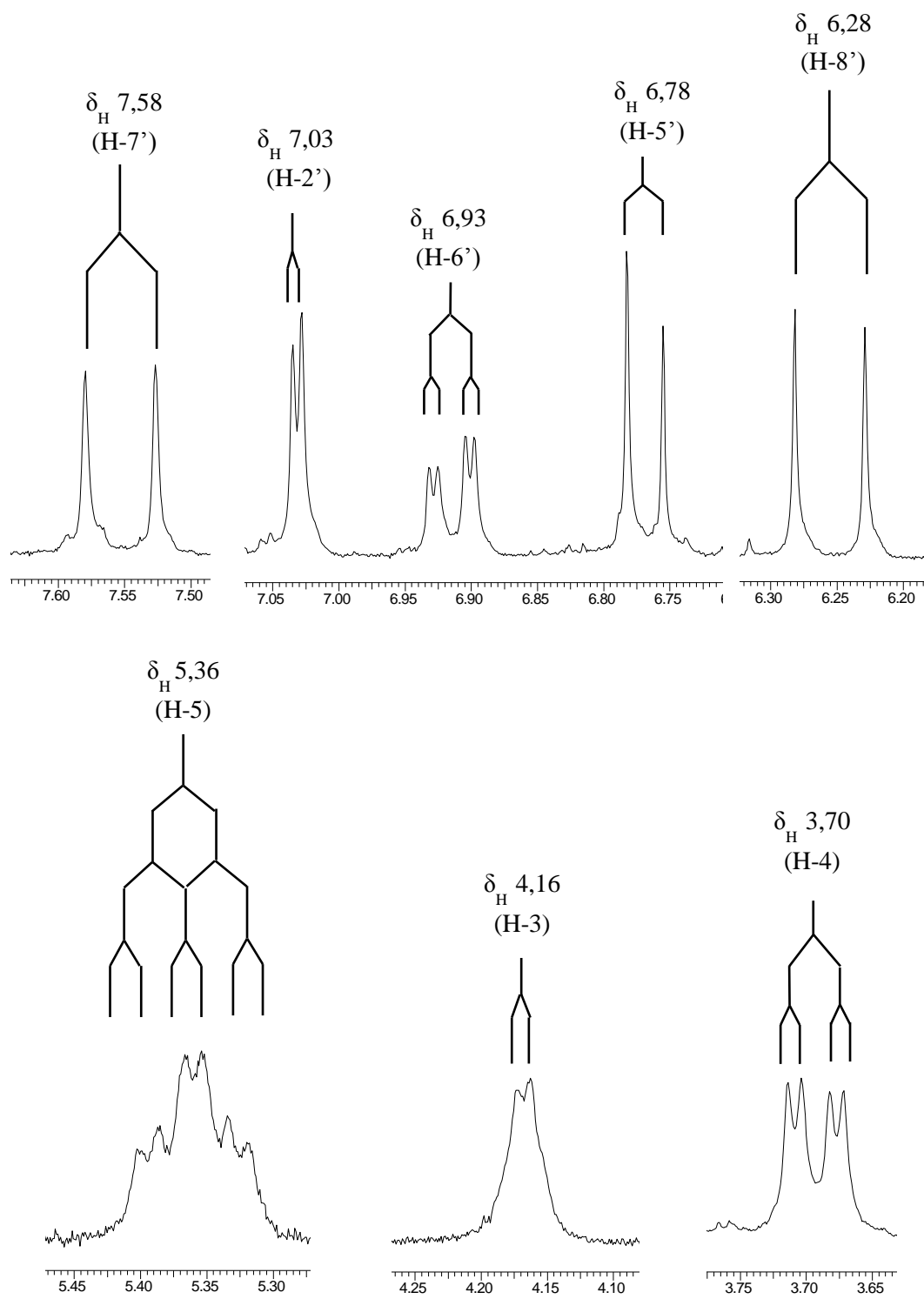
Figura 24: Expansão dos sinais do espectro de ^1H (CD_3OD ; 300,06MHz) da substância **S6**.

Figura 26: Mapa de correlação heteronuclear HSQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) da substância **S6**.

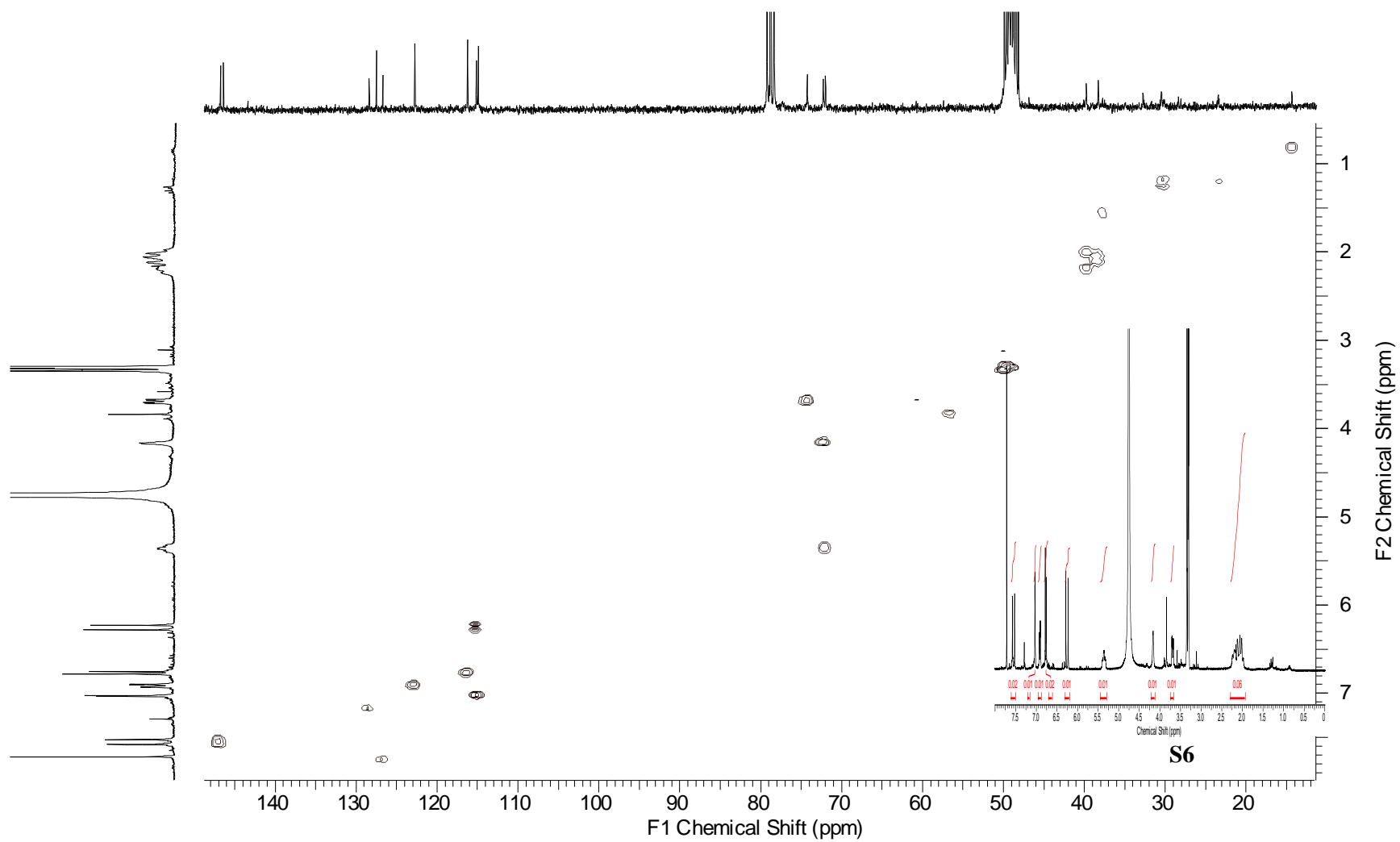
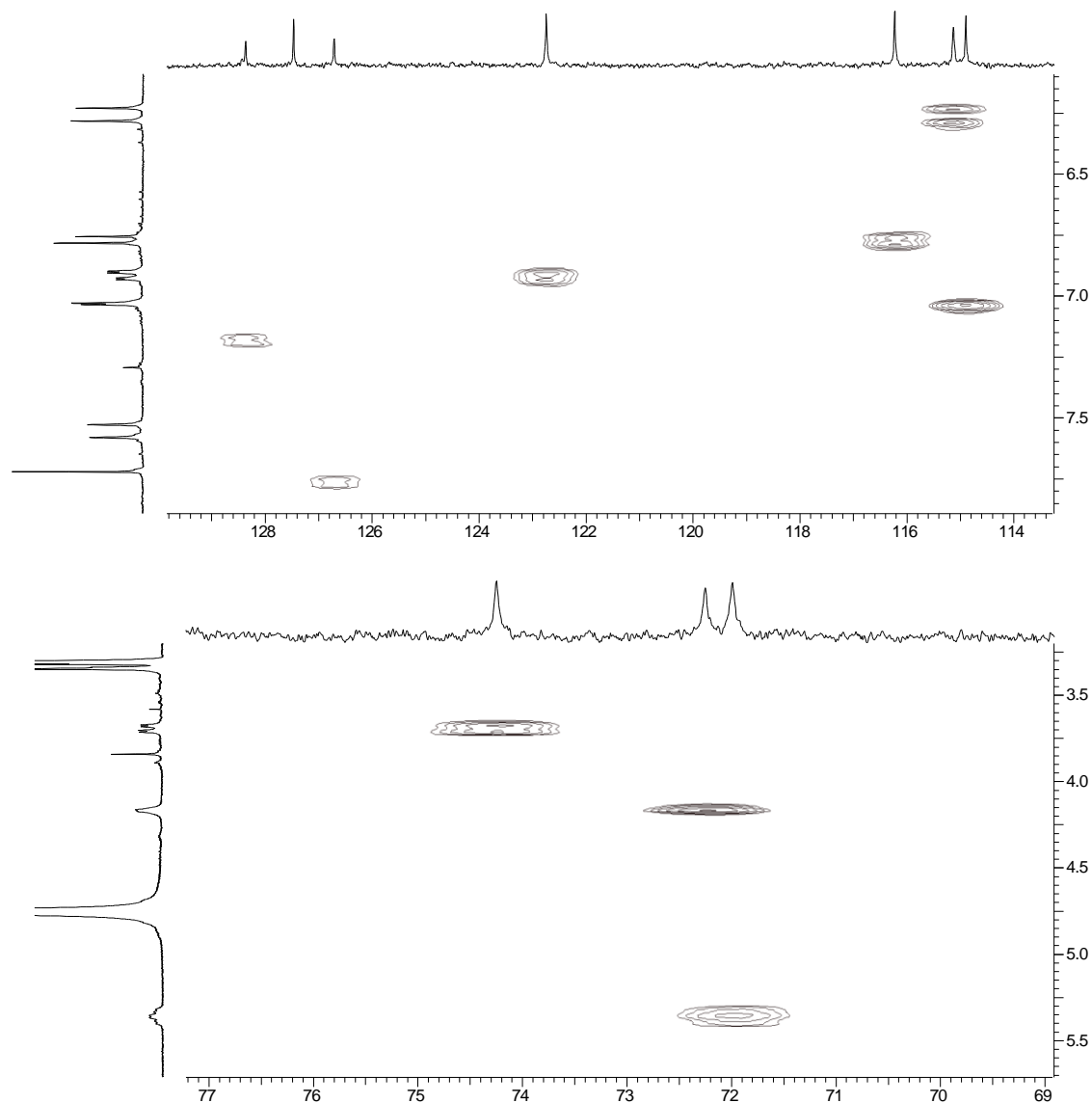


Figura 27: Expansões do mapa de correlação heteronuclear HSQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) da substância **S6**.



No mapa de contornos ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) COSY (**Figura 28**) foram observadas correlações entre os hidrogênios vinílicos em $\delta_{\text{H}}6,28$ (H-8') e $\delta_{\text{H}}7,58$ (H-7') do sistema α,β -insaturado e correlações entre os hidrogênios em $\delta_{\text{H}}6,78$ (H-5') e $\delta_{\text{H}}6,93$ (H-6') do anel aromático. Desta forma, verificam-se as correlações para o grupo cafeoila. Ademais, o hidrogênio H-3 ($\delta_{\text{H}} 4,16$) apresentou correlação com o H-2 ($\delta_{\text{H}} 1,98-2,26$) e com o H-4 ($\delta_{\text{H}} 3,70$) e este, por sua vez, correlacionou com o H-5 ($\delta_{\text{H}} 5,36$); o H-5 ($\delta_{\text{H}} 5,36$) correlacionou com o H-6 ($\delta_{\text{H}} 1,98-2,26$) (**Tabela 16, Figura 33**); todas estas correlações auxiliaram na confirmação da presença do grupo quínico na estrutura.

Figura 28: Mapa de correlação homonuclear COSY ($^1\text{H}\times^1\text{H}$) (a) e expansão (b) para a substância S6.

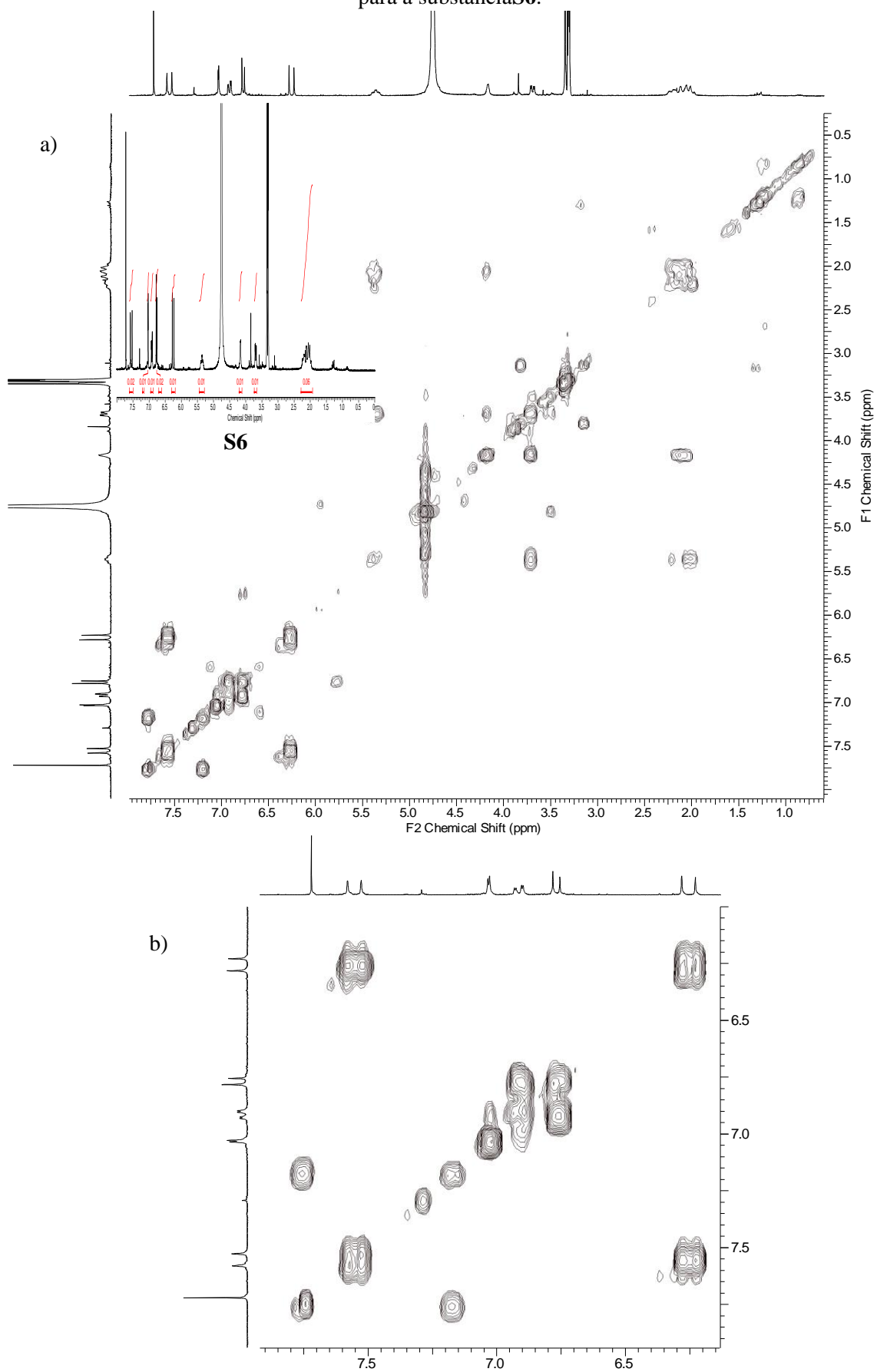


Tabela 16: Correlações observadas no mapa de contornos ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) COSY para S6

$\delta_{\text{H}}(\text{H})$	$\delta_{\text{H}}(\text{H})$
1,98-2,26 (2)	4,16 (3)
4,16 (3)	3,70 (4);
3,70 (4)	5,36 (5)
5,36 (5)	1,98-2,26 (6)
6,78 (5')	6,93 (6')
7,58 (7')	6,28 (8')

No mapa de contornos HMBC (**Figuras 29e30**) foram observadas as correlações à longa distância entre o carbono carbonílico em δ_{C} 168,8 (C-9') e o hidrogênio H-7' em δ_{H} 7,58, confirmando a presença do grupo α,β -insaturado na molécula. A correlação entre o H-8' (δ_{H} 6,28) e o C-1' (δ_{C} 127,5) e entre o H-2' (δ_{H} 7,03) com o carbono C-7' (δ_{C} 146,8) confirmam a substituição do grupo α,β -insaturado na posição 1 do anel aromático. No grupo quínico foi verificada a correlação entre o H-4 (δ_{H} 3,70) e o carbono C-5 (δ_{C} 72,0 – 2J)(**Figura 33**). Estas e demais correlações estão na **Tabela 17**.

Figura 29: Mapa de correlação heteronuclear HMBC ($^1\text{H}\times^{13}\text{C}$) da substância **S6**.

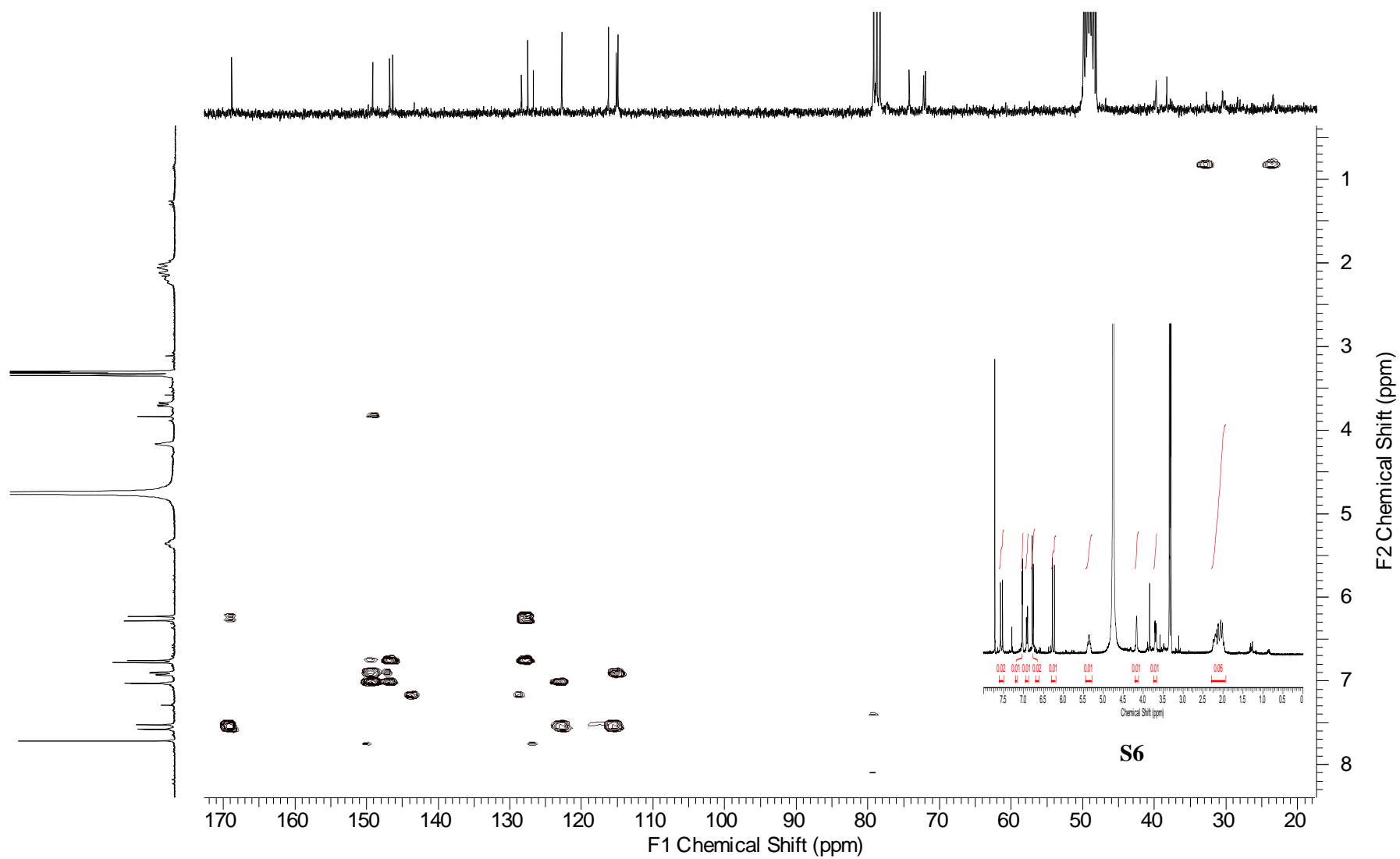


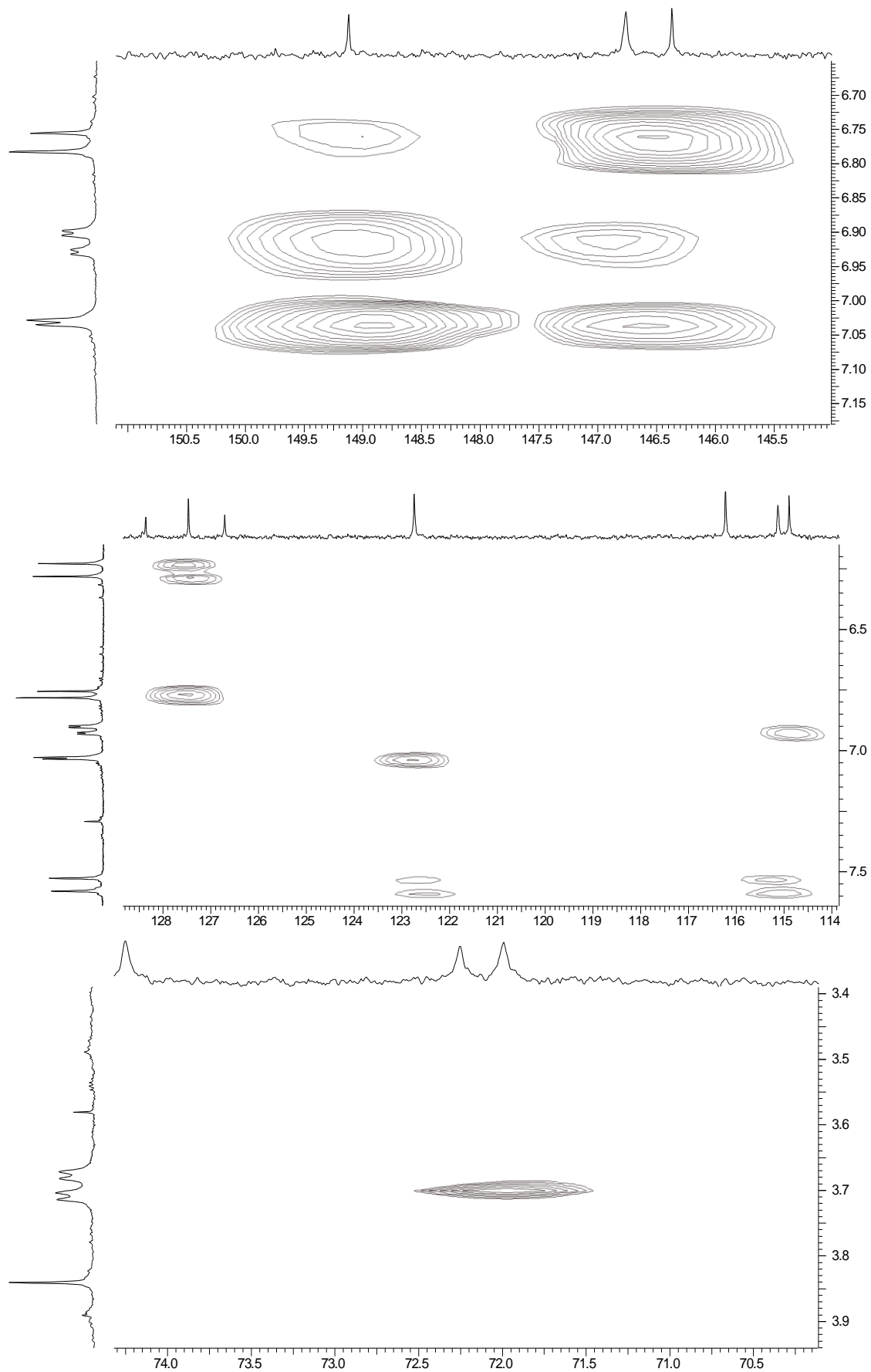
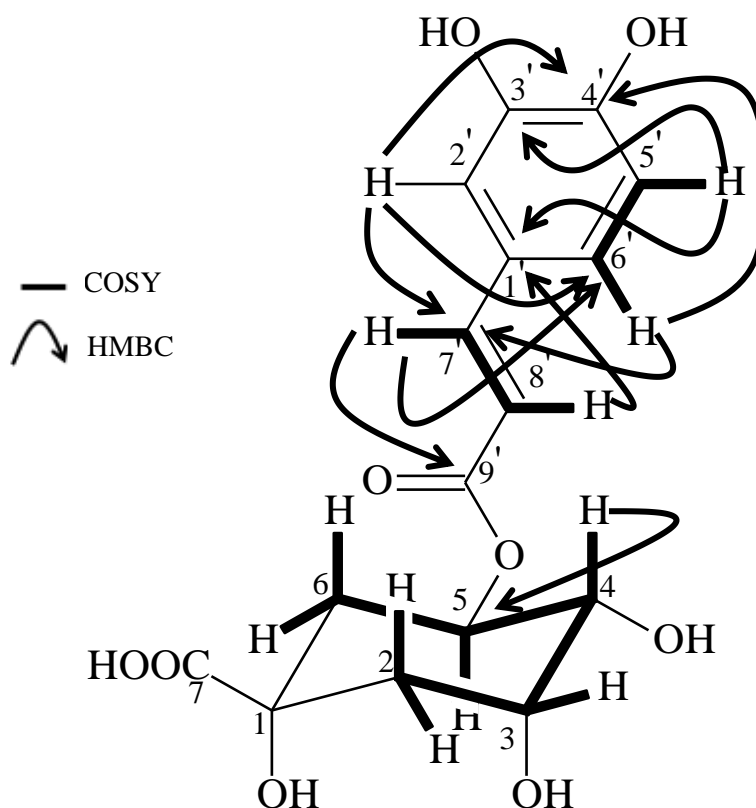
Figura 30: Expansões do mapa de correlação heteronuclear HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) da substância **S6**.

Tabela 17: Correlações observadas no mapa de contornos HMBC para S6

δ_H (H)	δ_C (C)
3,70 (4)	72,0 ($5^{-2}J$)
7,03 (2')	149,1 (4'); 122,8 (6'); 146,8 (7')
6,78 (5')	127,5 (1'); 146,4 (3'); 149,1 ($4'^{-2}J$)
6,93 (6')	114,9 (2'); 149,1 (4'); 146,8 (7') 168,8 ($9'^{-2}J$)
7,58 (7')	122,8 (6'); 168,8 (9'); 115,1 ($8'^{-2}J$)
6,28 (8')	127,5 (1'); 168,8 ($9'^{-2}J$)

Figura 31: Principais correlações observadas no mapa correlação heteronuclear HMBC ($^1H \times ^{13}C$) e homonuclear COSY ($^1H \times ^1H$) de S6.

A análise do espectro de NOESY (Figura 32) forneceu as correlações entre o hidrogênio H-7' em δ_H 7,58 e os hidrogênios H-2' e H-6' em δ_H 7,03 e 6,93, respectivamente. O hidrogênio H-6' (δ_H 6,93), por sua vez, correlacionou com o H-5' em δ_H 6,78 e com o H-8' em δ_H 6,28. Para o grupo quínico, o hidrogênio H-3 (δ_H 4,16) apresentou correlação com o H-4 (δ_H 3,70) demonstrando que estes hidrogênios estão na mesma face do anel, ao passo que a falta de correlação entre o H-4 (δ_H 3,70) e o H-5 (δ_H 5,36) demonstra que eles estão em faces opostas do anel (Figura 33). Estas e outras correlações constam na Tabela 18.

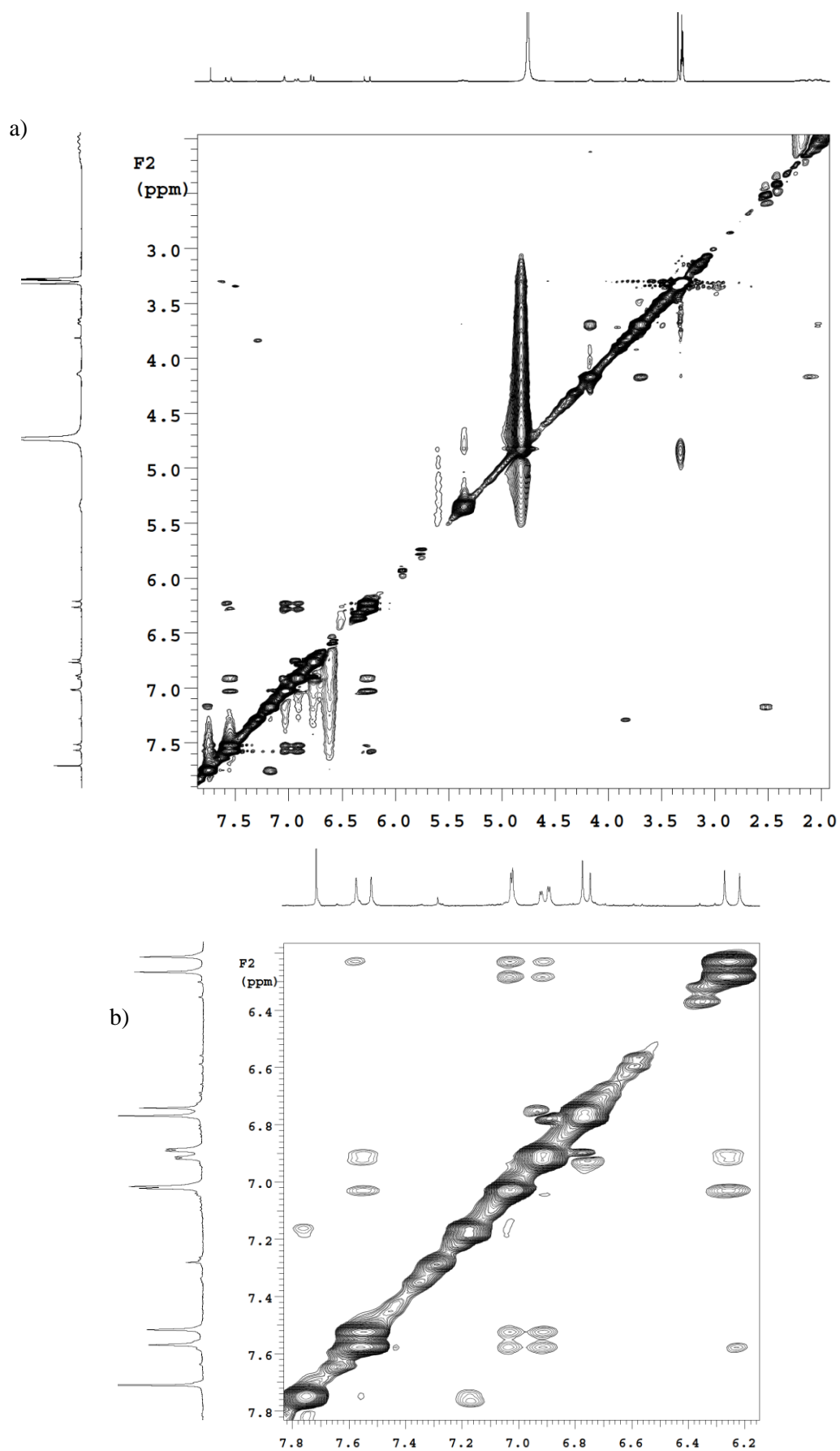
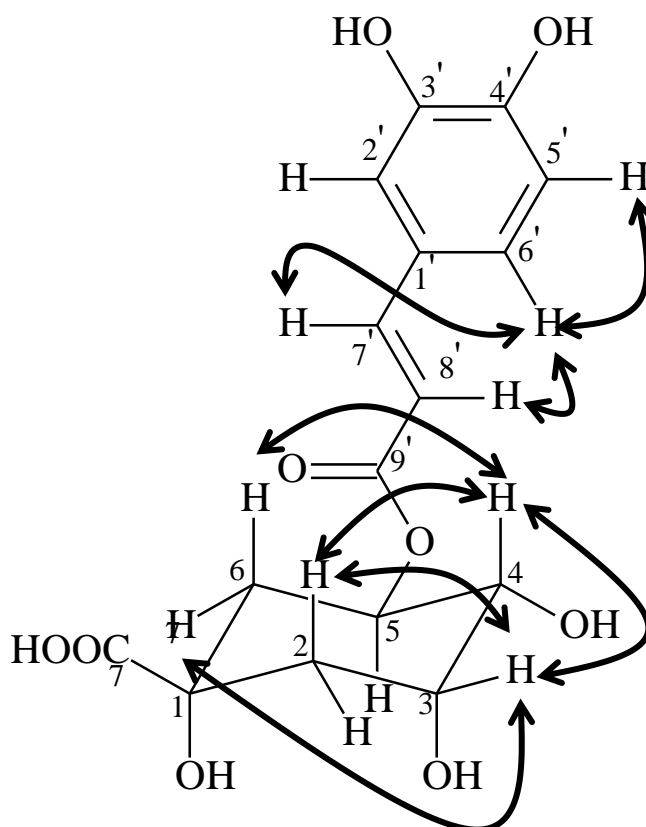
Figura 32: Mapa de correlação espacial NOESY ($^1\text{H}\times^1\text{H}$) (a) e expansão (b) da substância S6.

Tabela 18: Correlações observadas no mapa de contornos NOESY para S6

δ_H (H)	δ_C (H)
7,58 (H-7')	7,03 (H-2'); 6,93 (H-6')
6,93 (H-6')	6,78 (H-5'); 6,28 (H-8')
3,70 (H-4)	4,16 (H-3); 1,98-2,26 (H-2 e H-6)
4,16 (H-3)	1,98-2,26 (H-2 e H-6)

Figura 33: Principais correlações observadas no mapa de contornos NOESY para S6.

Todos esses sinais levaram a caracterização do composto como sendo o ácido 5-*O*-cafeoil-quinico(22) (NAKATANI, 2000; SATAKE, 2007), sendo que os dados de RMN encontram-se nas Tabelas 19 e 20.

Tabela 19: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S6 e para os isômeros dos ácidos 3-*O*-cafeoil-quínico, 4-*O*-cafeoil-quínico e 5-*O*-cafeoil-quínico (Região do Grupo Quínico).

C	3^{b1}		4^{b1}		5^{c2}		S6^{a}	
	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult.; <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult.; <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult.; <i>J</i> em Hz)
1	75,4	-	76,6	-	77,7	-	-	-
2	36,7	2,20 (dd, 4,0; 15,0; H-2ax) 2,13 (m, H-2eq)	38,4	2,17 (dd, 4,0; 14,0; H-2ax) 2,06 (ddd, 3,0; 4,0; 14,0; H-2eq)	39,2	1,95 (ddd, 14,5; 2,9; 2,8, H-2eq) 2,17 (dd, 14,5; 3,1, H-2ax)	39,8	1,98-2,26 (m)
3	73,0	5,34 (ddd, 3,0; 3,0; 4,0)	69,6	4,28 (ddd, 3,0; 3,0; 4,0)	73,1	4,13 (ddd, 3,2; 3,1; 2,9)	72,3	4,16 (dl, 3,0 Hz)
4	74,8	3,63 (dd, 3,0; 9,0)	79,3	4,79 (dd, 3,0; 9,0)	75,2	3,69 (dd, 10,0; 3,2)	74,3	3,70 (dd, 10,0; 3,0)
5	68,3	4,14 (ddd, 3,0; 9,0; 9,0)	65,5	4,27 (ddd, 4,0; 9,0; 11,0)	72,5	5,39 (ddd, 11,4; 10,0; 5,1)	72,0	5,36 (ddd, 10,0; 10,0; 4,2)
6	41,5	1,95 (dd, 9,0; 14,0; H-6ax) 2,13 (m, H-6eq)	42,7	2,00 (dd, 11,0; 13,0; H-6ax) 2,20 (ddd, 3,0; 5,0; 13,0; H-6eq)	40,7	2,10 (ddd, 12,8; 5,1; 2,8; H-6eq) 2,02 (dd, 12,8; 11,4; H-6ax)	38,3	1,98-2,26 (m)
7	178,3	-	177,3	-	181,1	-	-	-

Tabela 20: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para S6 e para os isômeros dos ácidos 3-*O*-cafeoil-quínico, 4-*O*-cafeoil-quínico e 5-*O*-cafeoil-quínico (Região do grupo cafeico).

	3^{b1}		4^{b1}		5^{c2}		S6^a	
C	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)
1'	127,9	-	127,8	-	127,7	-	127,5	-
2'	115,1	7,04 (d, 2,0)	115,1	7,06 (d, 2,0)	115,2	7,06 (d, 2,1)	114,9	7,03 (d, 1,8)
3'	146,8	-	146,8	-	146,8	-	146,4	-
4'	149,4	-	149,6	-	149,7	-	149,1	-
5'	116,4	6,76 (d, 8,0),	116,5	6,77 (d, 8,0)	116,6	6,79 (d, 8,2)	116,2	6,78 (d, 8,1)
6'	122,9	6,93 (dd, 2,0; 8,0)	123,0	6,96 (dd, 2,0; 8,0)	122,9	6,93 (dd, 2,1; 8,2)	122,8	6,93 (dd, 1,8, 8,1)
7'	146,8	7,58 (d, 16,0)	147,1	7,65 (d, 16,0)	146,9	7,57 (d, 15,9)	146,8	7,58 (d, 15,9)
8'	115,8	6,30 (d, 16,0),	115,4	6,37 (d, 16,0)	115,5	6,29 (d, 15,9)	115,1	6,28 (d, 15,9)
9'	169,0	-	169,0	-	169,3	-	168,8	-

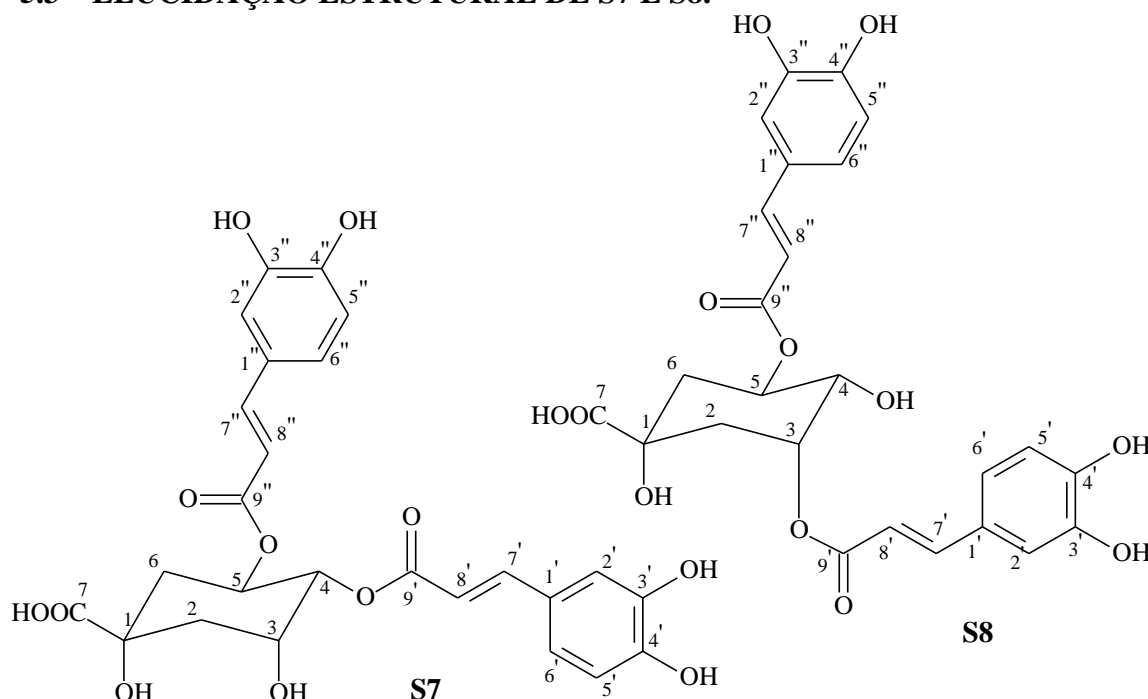
^a(δ -ppm; 300,06 e 75,5 MHz; CD₃OD); ^b(δ -ppm : 500,0 e 125 MHz; CD₃OD); ^c(δ -ppm: 400,0 e 100,0 MHz; CD₃OD)

¹(NAKATANI, 2000); ² (SATAKE, 2007)

Apesar de ter sido anteriormente isolado de *Coffea arabica*(CLIFFORD, 2006), espécie pertencente à subfamília Ixoroideae, pode-se dizer que isolamento do o ácido 5-*O*-cafeoilquinico é inédito em espécies do gênero *Sabicea*.

Este composto apresentou propriedades anti-inflamatórias devido a sua capacidade de inibição do processo inflamatório mediado por citocinas (TATEFUJI,1996).Este ácido, em sistemas lipofílicos, possui atividade antioxidante equiparada a potentes antioxidantes como o BHT (butil-hidroxi-tolueno) e BHA (butil-hidroxi-anisol) (KAYANO, 2002).

5.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE S7 E S8.



As substâncias **S7**e **S8** foram obtidas em mistura sob a forma de um sólido amarelo solúvel em metanol. Essas substâncias estavam bastante presentes na fração acetato de etila (A7.8 - 3,3 mg; A8.6 - 5,0 mg e A'32 - 20,8mg) totalizando 29,1 mg. Considerando a massa superior da amostra A'32 (20,8mg) em relação às demais, a mesma foi submetida às análises posteriores de RMN uni e bidimensionais.Pelo valor das integrais observadas no espectro de RMN de ^1H desta amostra, percebe-se que a substância **S7** (70%) esta em maior proporção em relação à **S8** (30%).

O espectro de RMN de ^1H (**Figuras 34e 35**)para essas substâncias mostrou sinais parecidos com os observados para **S6**.

Para a substância **S7**, sinais de dois grupos de hidrogênios vinílicos foram observados em δ_{H} 7,51 e 6,28 (H-7' e H-8') e δ_{H} 7,59 e 6,18 (H-7'' e H-8''), se apresentando como dupletos e a constante de acoplamento ($J=15,9$ Hz) demonstrou a configuração *trans* desses hidrogênios. Também foram notados, na região de hidrogênios de sistema aromático, sinais que indicavam a presença de mais de um anel benzênico. Para o primeiro anel, o duplo duplete em δ_{H} 6,90 ($J = 8,1$ e $2,1$ Hz), além dos dupletos em δ_{H} 6,73 ($J = 8,1$ Hz) e δ_{H} 7,00 ($J = 2,1$ Hz) sugeriram a presença de um anel benzênico 1,3 e 4 substituído, sendo que os sinais foram atribuídos aos H-6', H-5' e H-2', nessa ordem. O segundo anel também demonstrou ser substituído nas posições 1,3 e 4, visto que apresentou dupletos em δ_{H} 7,02 ($J = 2,1$ Hz) e em δ_{H} 6,74 ($J = 8,1$ Hz) e um duplo duplete em δ_{H} 6,91 ($J = 8,1$ e $2,1$ Hz), com respectiva atribuição para H-2'', H-5'' e H-6'. Por essas considerações, a presença de dois grupamentos cafeoíla na estrutura é sugerida. Além desses sinais, o espectro de RMN de ^1H mostrou a presença de três hidrogênios oximetínicos na região de δ_{H} 4,36 a 5,61 e o multiplete compreendidos na faixa de δ_{H} 2,05 a 2,35 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos H-2 e H-6, sendo que de acordo com a literatura (TATEFUJI, 1996 e CHEMINAT, 1988), estes sinais são típicos de grupo quínico. As multiplicidades e as constantes de acoplamento observadas permitiram a atribuição do sinal em δ_{H} 5,61 (*ddd*; $J=9,1; 9,1; 5,3$ Hz) para H-5, δ_{H} 5,11 (*dd*; $J=9,1$ e $3,0$ Hz) para H-4 e em δ_{H} 4,36 (*ddd*, $J=4,4; 3,0$ e $3,0$ Hz) para H-3.

Desta forma, pode-se afirmar que o composto **S7** trata-se de um dos isômeros do ácido dicafeoilquínico e, de acordo com CHEMINAT (1988) os deslocamentos químicos dos hidrogênios oximetínicos H-5 (δ_{H} 5,61), H-4 (δ_{H} 5,11) e H-3 (δ_{H} 4,36) apontam para a substituição nas posições 4 e 5 do grupo quínico.

Para a substância **S7**, o espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (**Figura 36 e 37**) mostrou sinais em δ_{C} 168,9 e 168,5 correspondentes aos carbonos carbonílicos C-9' e C-9'', respectivamente. Além disso, sinais típicos de carbonos vinílicos C-7' e C-8' foram observados em δ_{C} 147,7 e 115,1, enquanto que os sinais em δ_{C} 147,7 e 114,6 foram atribuídos aos C-7'' e C-8''. Desta forma-se, confirma-se a presença de dois sistemas $\alpha\beta$ -insaturados na molécula. Os sinais que foram notados na região de carbonos de sistema aromático, como em δ_{C} 127,7, 149,6 e 147,3 pertencem aos carbonos não ligados a hidrogênio C-1', C-3' e C-4', sendo observado um efeito de desproteção nos dois últimos carbonos devido à substituição nessas posições por grupos retiradores de densidade eletrônica. Ademais, o sinal do carbono C-1'' foi visto em δ_{C} 127,8 e o C-3''

e C-4'' apareceram em 149,5 e 147,1, tendo o mesmo efeito discutido acima. Os demais carbonos pertencentes aos anéis aromáticos foram identificados através dos sinais em δ_C 115,1 (C-2' e C-2''), 116,5 (C-5' e C-5'') e 123,2 (C-6' e C-6''). Percebe-se, então, a existência de dois anéis aromáticos 1,3,4 substituído e esses sinais, aliados aos primeiros, demonstram a presença de dois grupos cafeóila na estrutura.

Figura 34: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) das substâncias **S7** e **S8**.

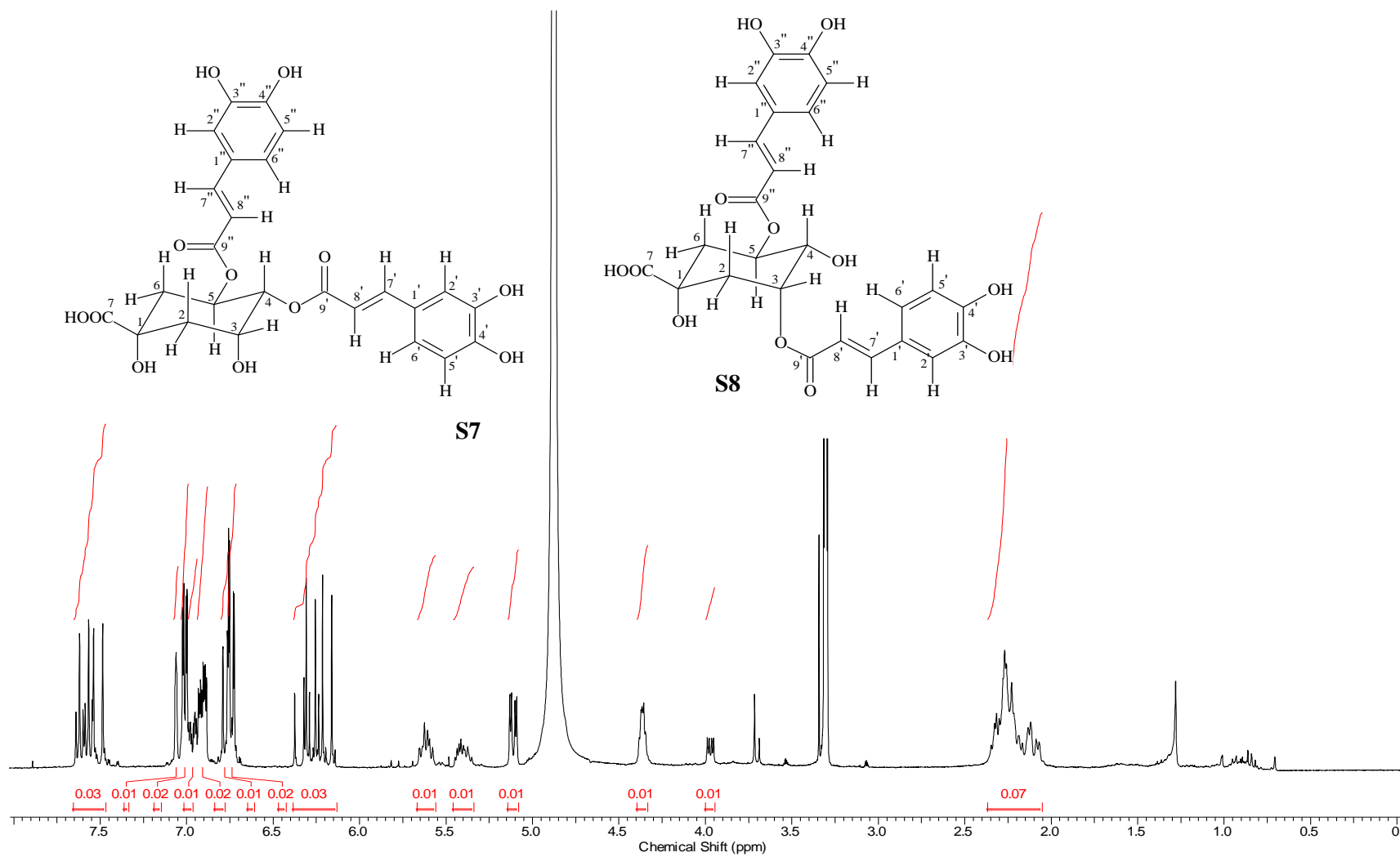


Figura 35: Expansão dos sinais do espectro de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) da substância **S7**.

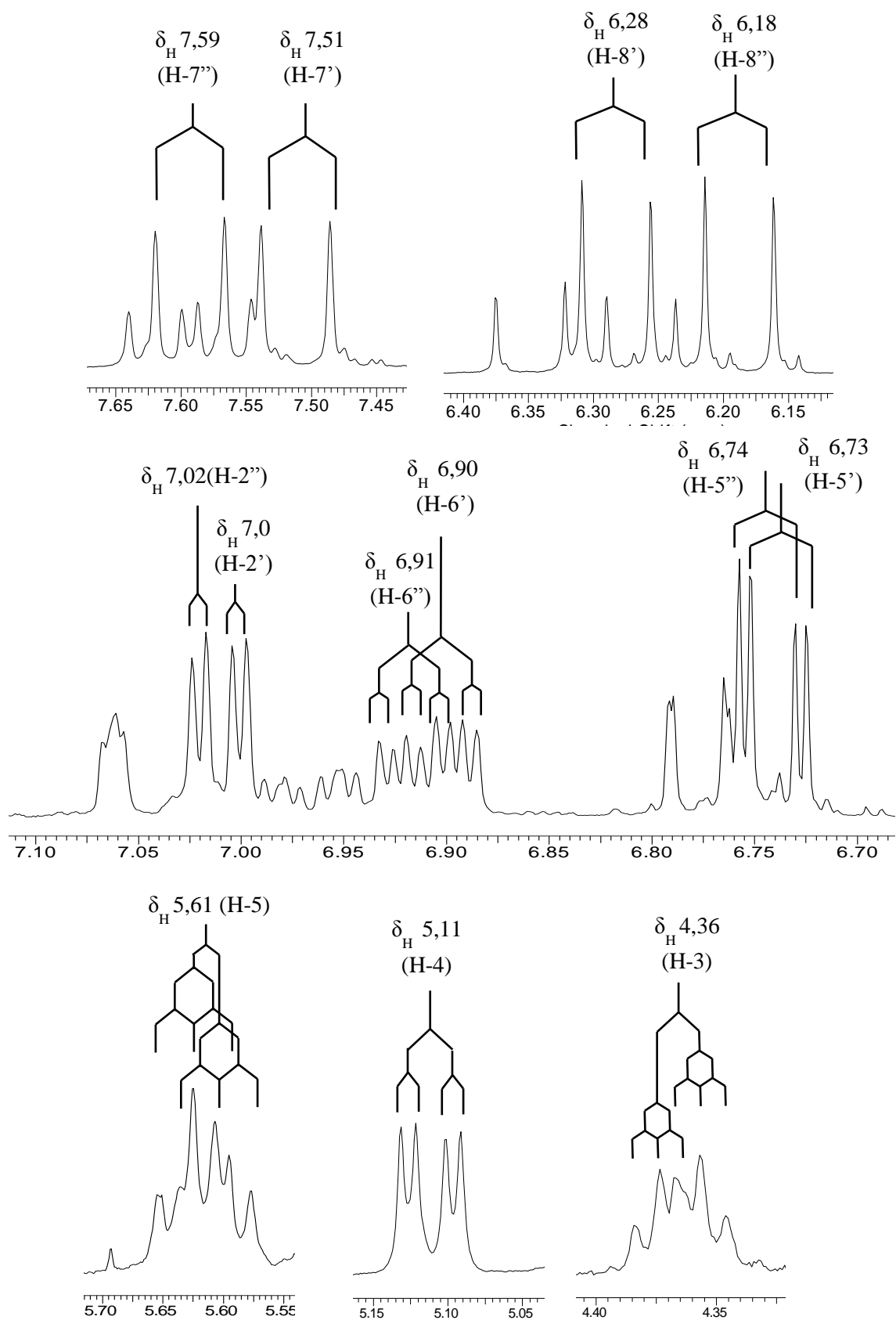


Figura 36: Espectro de RMN de ^{13}C (a), DEPT 135° (b) e DEPT 90° (c) (CD_3OD ; 75,45MHz) das substâncias **S7** e **S8**.

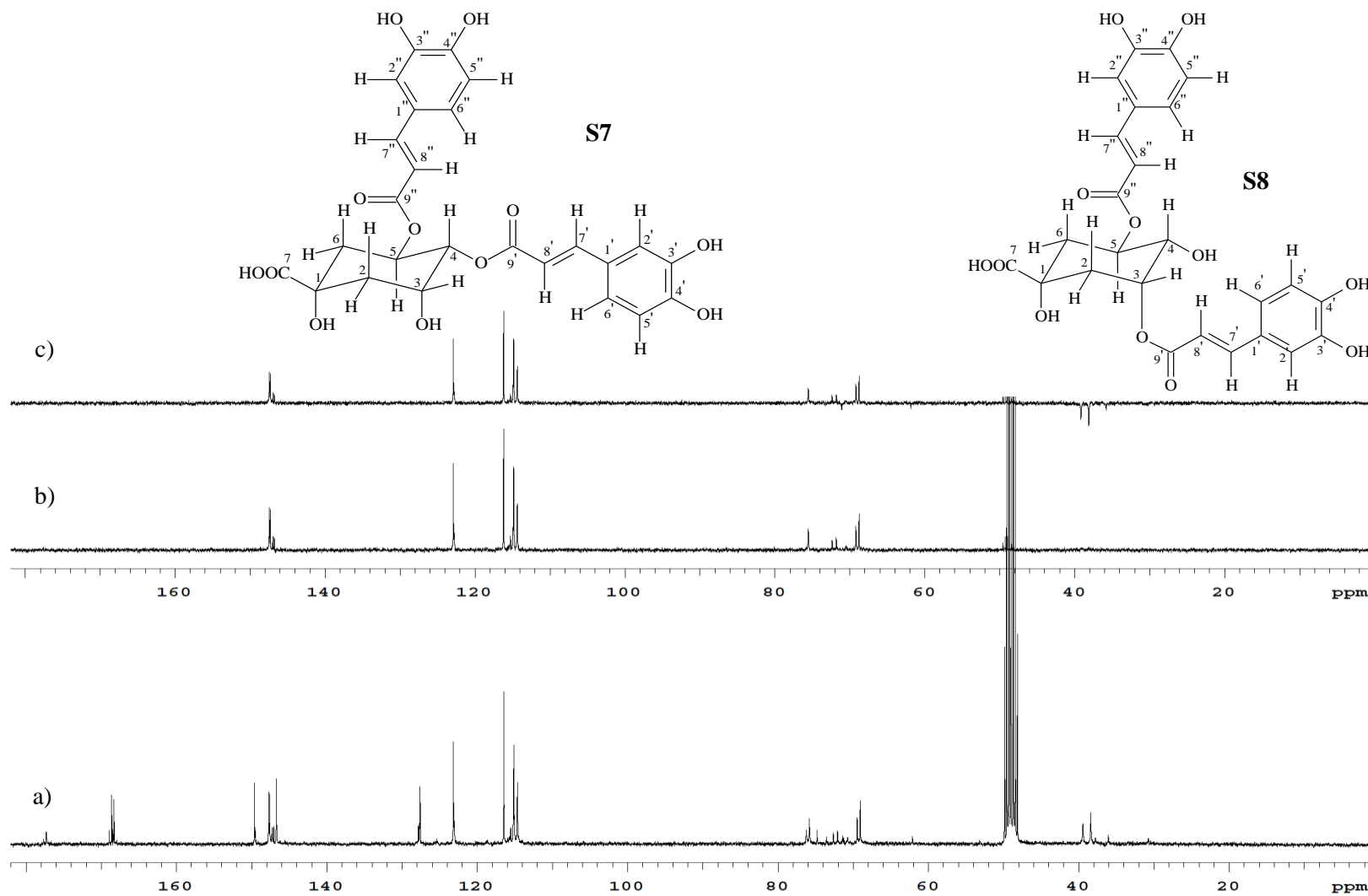
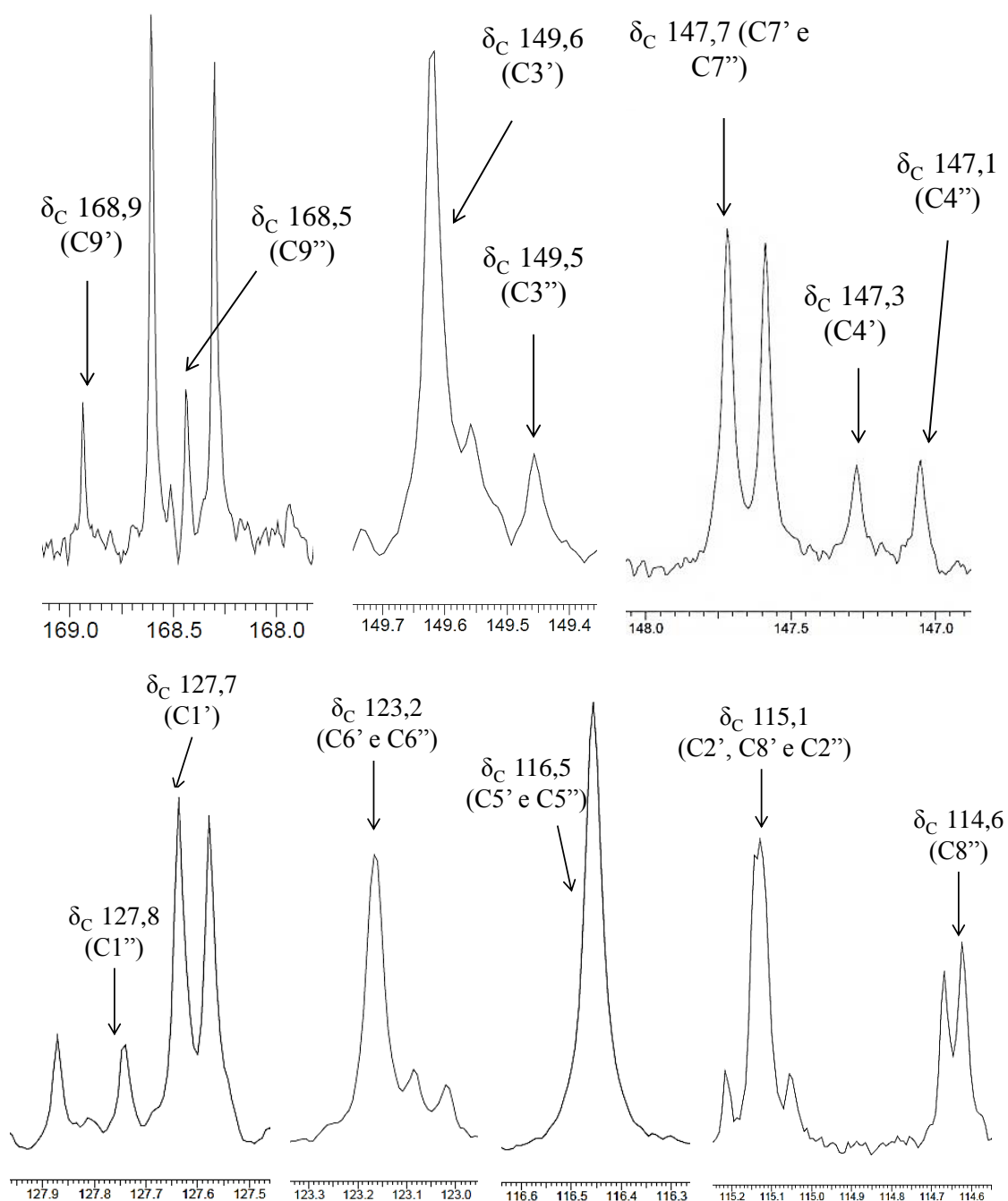
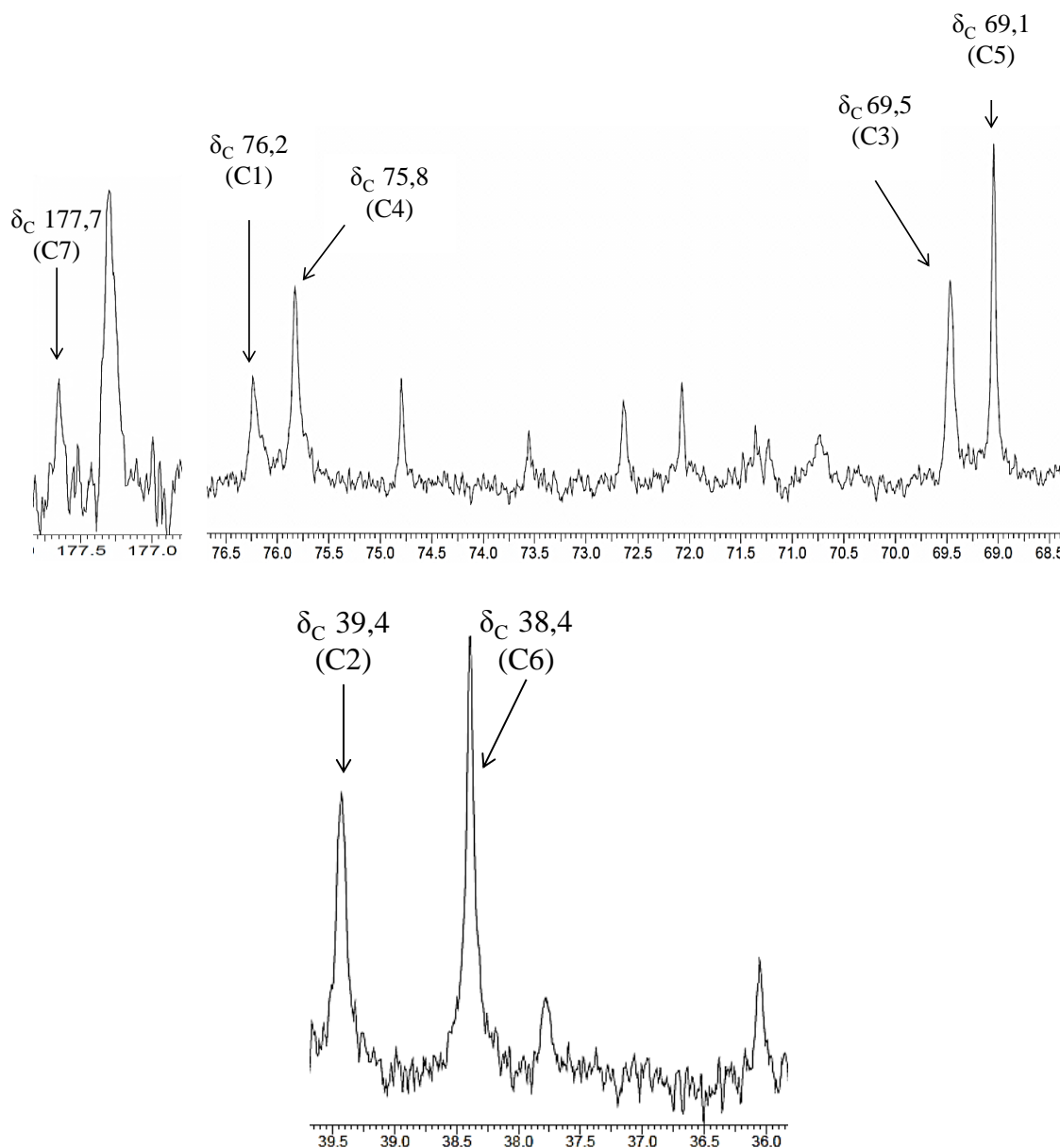


Figura 37: Expansão do espectro de ^{13}C (CD_3OD ; 75,45MHz) na região do grupo cafeoil de **S7**.



O sinal típico de carbono carbonílico de ácido carboxílico foi notado em δ_C 177,7; fora isso, foram observados sinais de carbonos metilênicos em δ_C 39,4 (C-2) e 38,4 (C-6) e de carbonos oximetínicos em δ_C 69,5 (C-3), 75,8 (C-4) e 69,1 (C-5), além do sinal do carbono carbinólico C-1 em δ_C 76,2 corroborando a presença do grupo quínico na molécula (**Figura 38**).

Figura 38: Expansão do espectro de ^{13}C (CD_3OD ; 75,45MHz) na região do grupo quínico da substância **S7**.



No mapa de contornos HSQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) (**Figuras 39a 41**) foram observadas as correlações entre os deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio que ampararam nas atribuições e na confirmação da estrutura para **S7**.

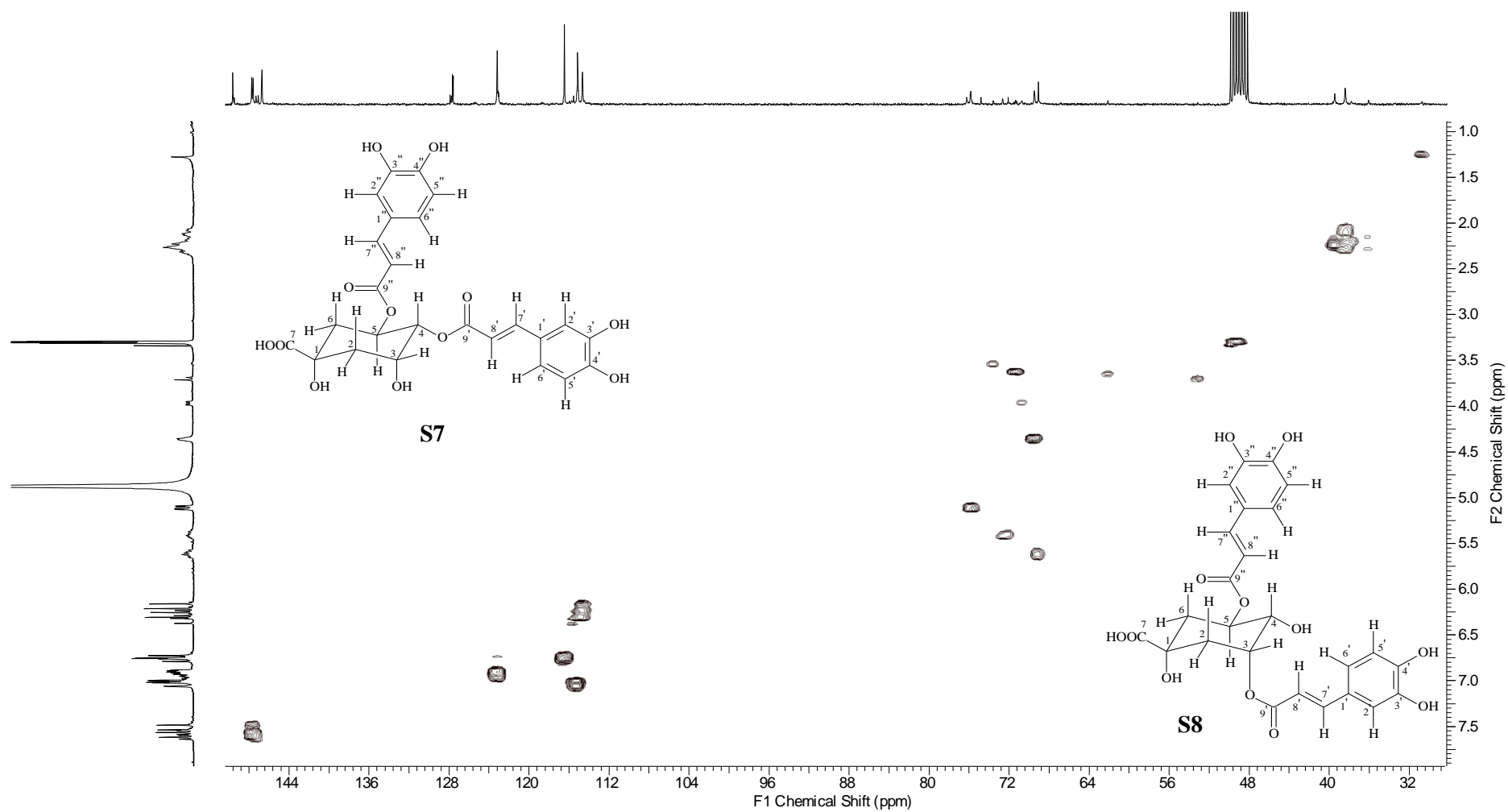
Figura 39: Mapa de correlação heteronuclear HSQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) das substâncias **S7** e **S8**.

Figura 40: Expansões do mapa de correlação heteronuclear HSQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) das substâncias **S7** e **S8**.

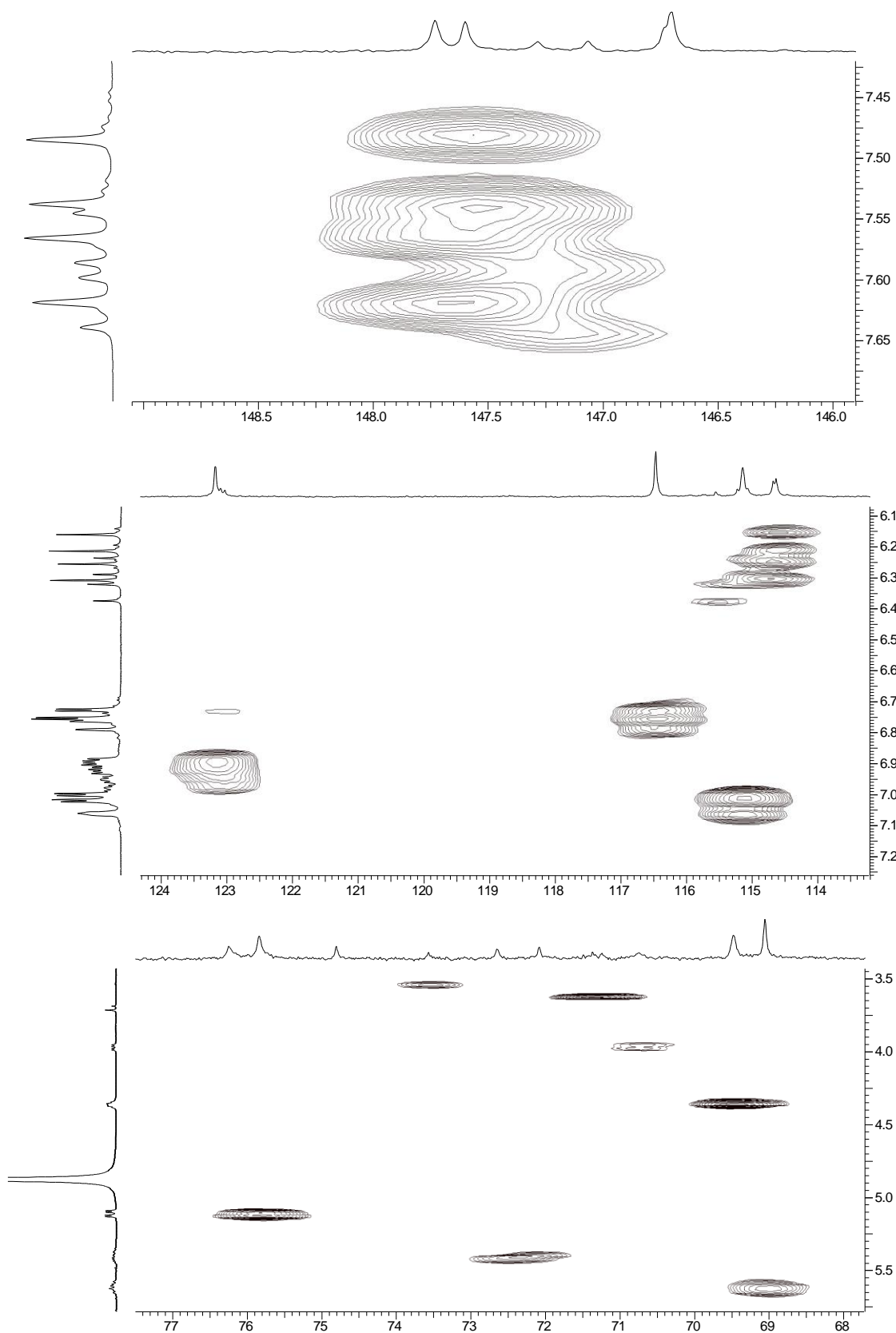
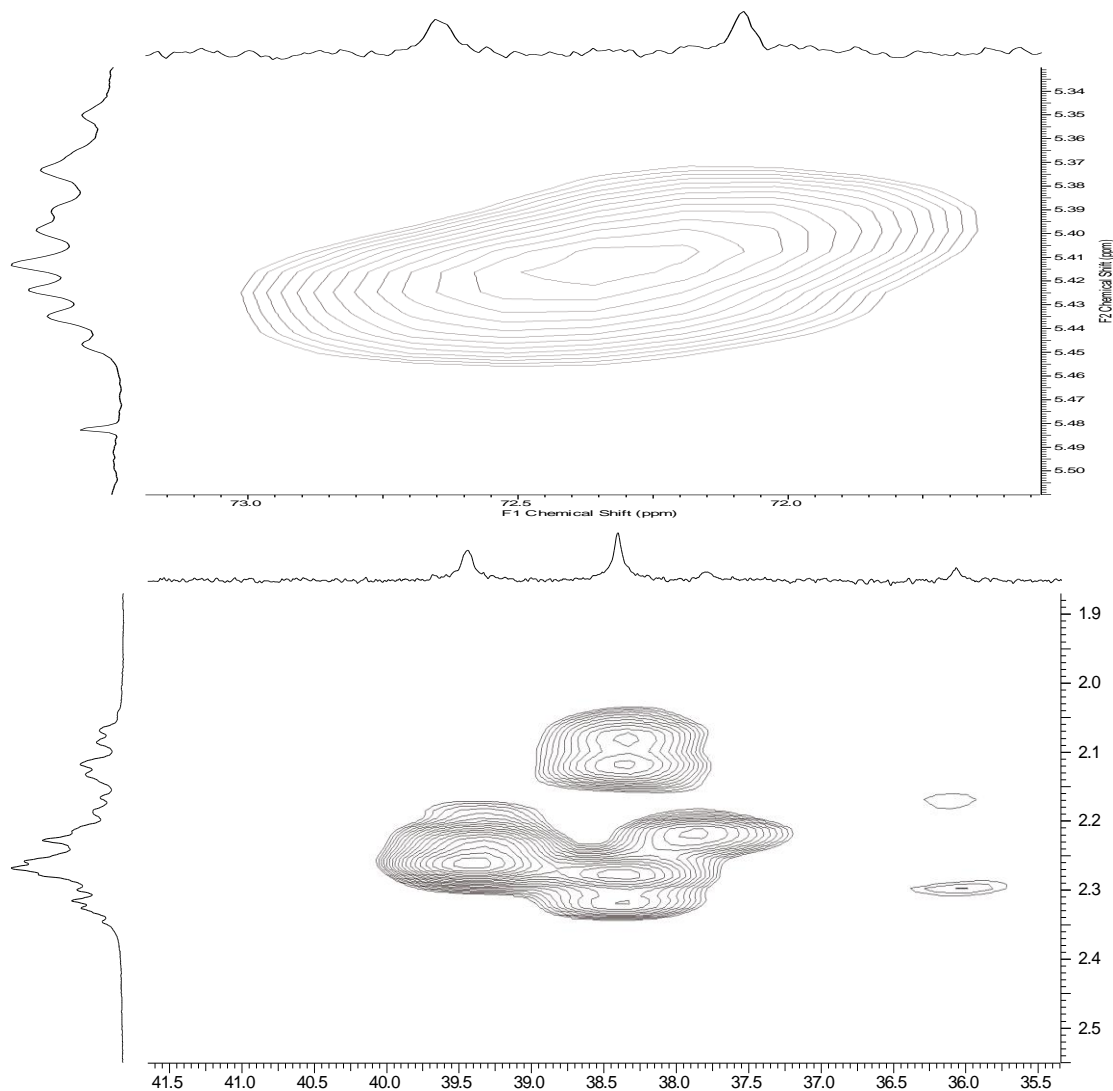


Figura 41: Expansões do mapa de correlação heteronuclear HSQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) das substâncias **S7** e **S8**.



No mapa de contornos HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) (**Figuras 42 a 45**) foram observadas as correlações a longa distância (3J) entre os carbonos carbonílicos C-9' (δ_{C} 168,6) e C-9'' (δ_{C} 168,5) com os hidrogênios H-4 (δ_{H} 5,11) e H-5 (δ_{H} 5,61) do grupo quínico, nessa ordem, confirmando o posicionamento dos substituintes cafeoíla nas posições 4 e 5 do grupo quínico. Destacam-se ainda correlações entre o carbono C-9' (δ_{C} 168,6) e o H-7' (δ_{H} 7,51) e entre o carbono C-9'' (δ_{C} 168,5) e o H-7'' (δ_{H} 7,59) dos dois grupos cafeoíla; essas correlações foram importantes na determinação das posições em que os grupos cafeoíla estão ligados no grupo quínico (**Figura 51**). Outras correlações também foram observadas e estão descritas na **Tabela 21**.

Figura 42: Mapa de correlação heteronuclear HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) das substâncias **S7** e **S8**.

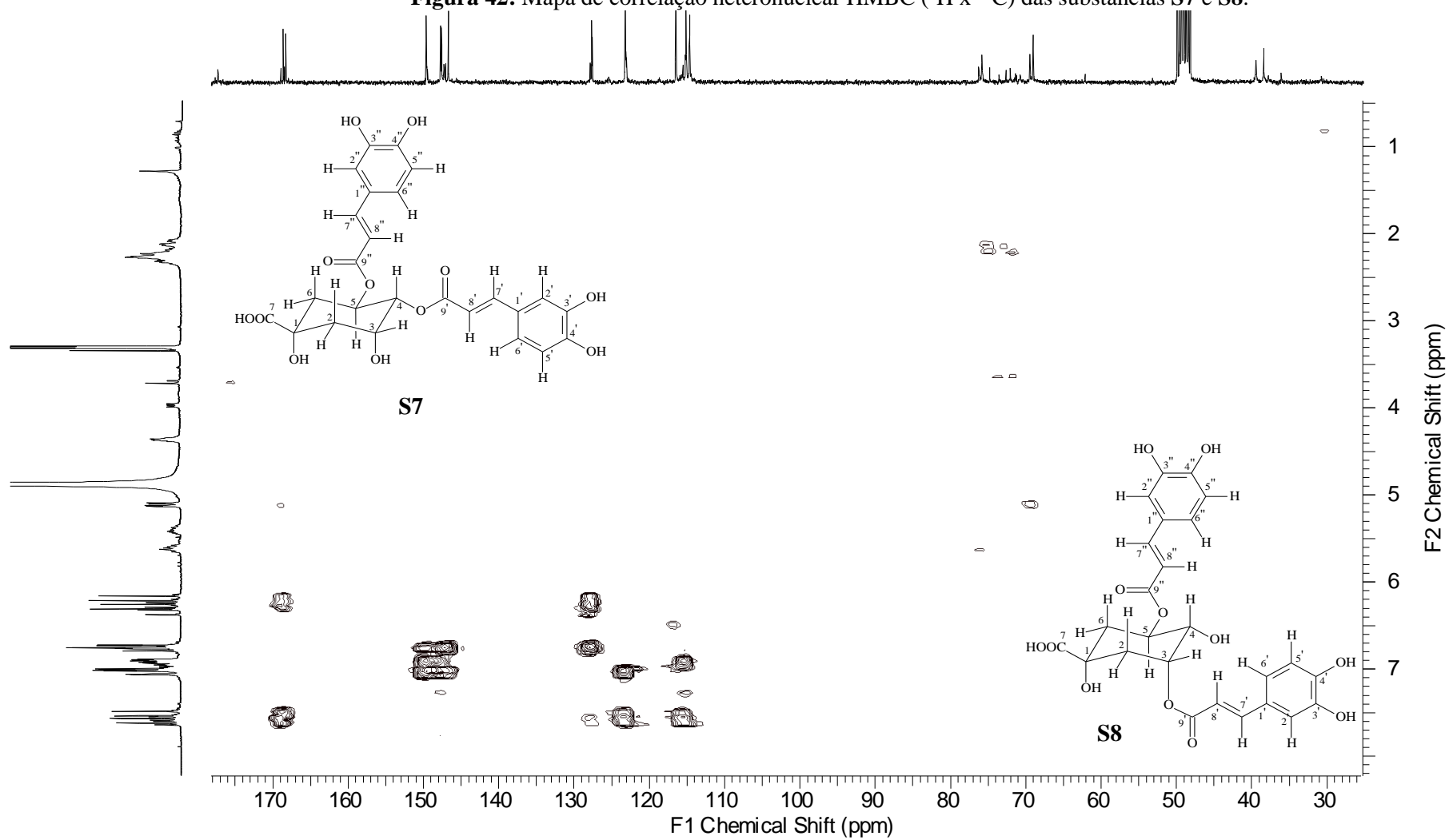


Figura 43: Expansões do mapa de correlação heteronuclear HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) das substâncias **S7** e **S8**.

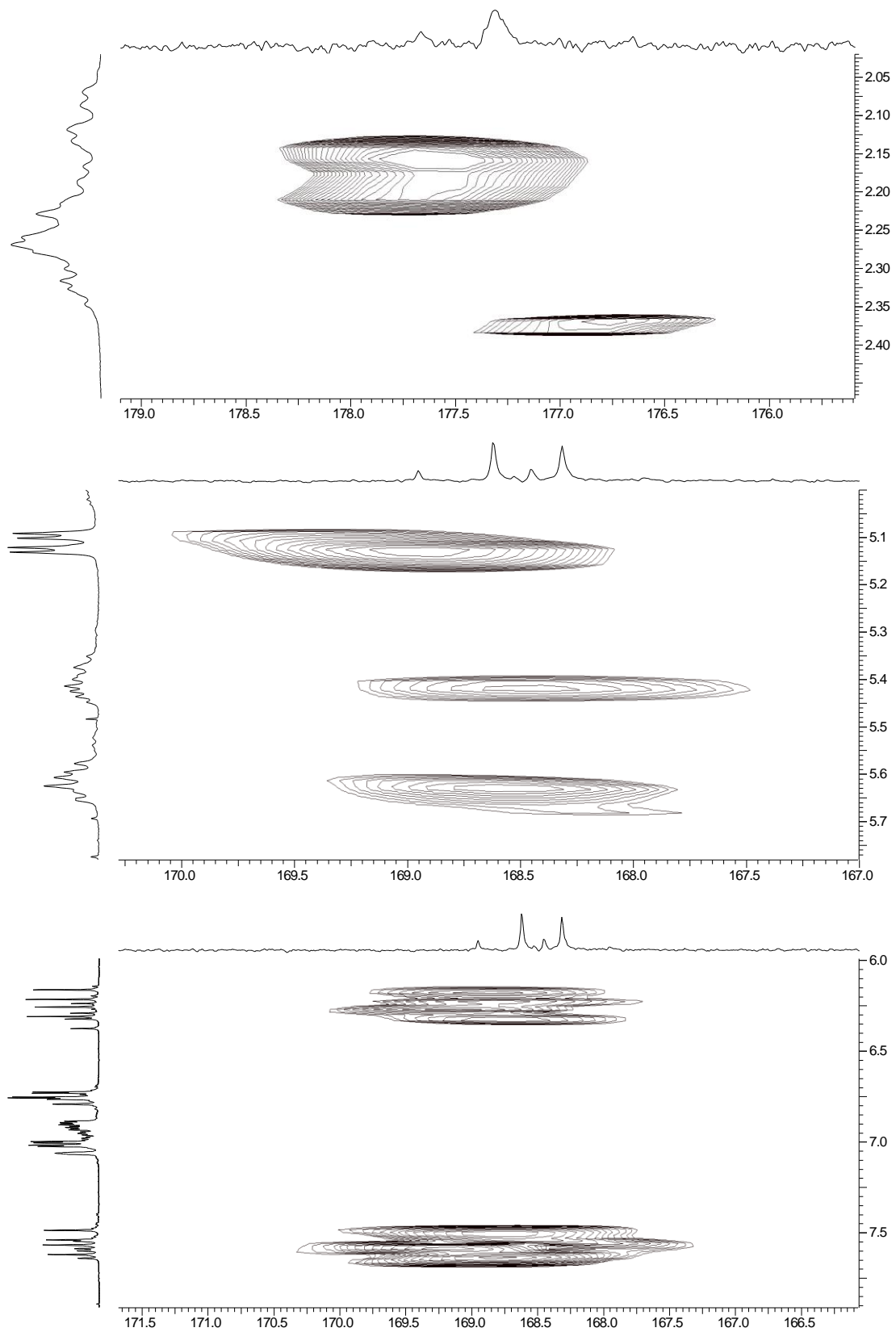


Figura 44: Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) das substâncias **S7** e **S8**.

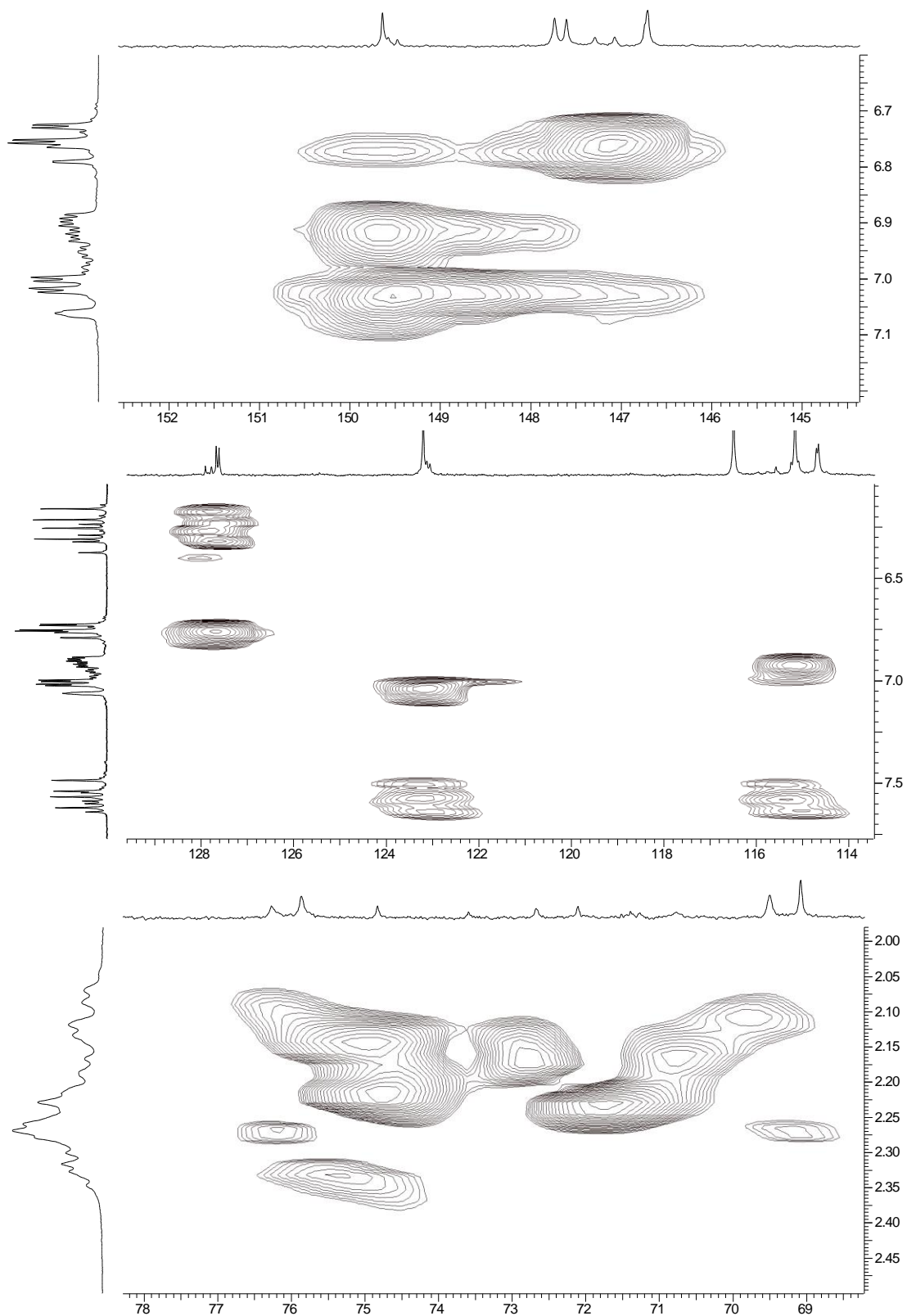


Figura 45: Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) das substâncias **S7** e **S8**.

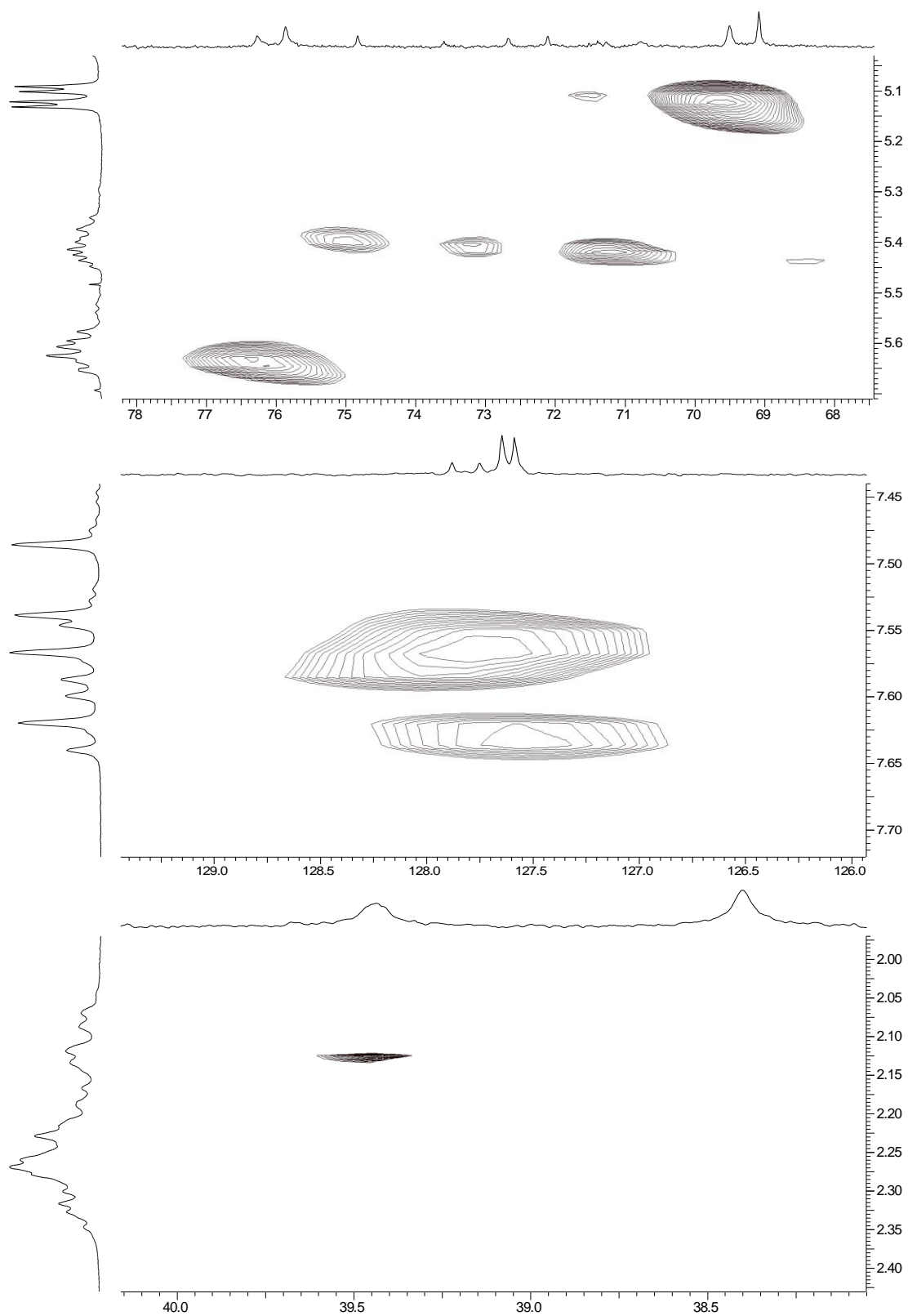


Tabela 21: Correlações observadas no mapa de contornos HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) para S7.

$\delta_{\text{H}} (\text{H})$	$\delta_{\text{C}} (\text{C})$	$\delta_{\text{H}} (\text{H})$	$\delta_{\text{C}} (\text{C})$
2,05-2,35 (2 e 6)	177,7 (7)	7,51 (7')	123,2 (6'); 168,6 (9'); 115,6 (8 ⁻² J)
		6,28 (8')	127,7 (1')
5,11 (4)	168,9 (9')	7,02 (2'')	123,2 (6''); 149,5 (3''- ² J)
5,61 (5)	75,8 (4); 168,5 (9'')	6,74 (5'')	149,5 (3''); 147,1 (4''- ² J)
2,05-2,35 (6)	39,4 (2)	6,91 (6'')	115,1 (2'')
7,00 (2')	147,7 (7')	7,59 (7'')	127,8 (1''); 115,1 (2''); 123,2 (6''); 168,5 (9'')
6,73 (5')	149,6 (C3')	6,18 (8'')	127,8 (1'')
6,90 (6')	115,1 (2')		

A análise das correlações observadas no mapa de contornos ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) COSY (**Figuras 46 e 47**) mostrou os acoplamentos entre o H-3 (δ_{H} 4,36) e H-4 (δ_{H} 5,11) e H-2 (δ_{H} 2,05-2,35); também foi percebida a correlação entre H5 (δ_{H} 5,61) com o H-6 (δ_{H} 2,05-2,35) confirmando a existência do grupo quínico. As correlações entre os hidrogênios H-5' (δ_{H} 6,73) e H-6' (δ_{H} 6,90), entre H-5'' (δ_{H} 6,74) e H-6'' (δ_{H} 6,90), assim como as correlações entre os hidrogênios H-7' (δ_{H} 7,51) e H-8' (δ_{H} 6,28) e entre os H-7'' (δ_{H} 7,59) e H-8'' (δ_{H} 6,18) auxiliaram na confirmação da presença de dois grupos $\alpha\beta$ -insaturados e de dois anéis aromáticos na estrutura de **S7** (**Tabela 22, Figura 51**).

Figura 46: Mapa de correlação homonuclear COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) das substâncias **S7** e **S8**.

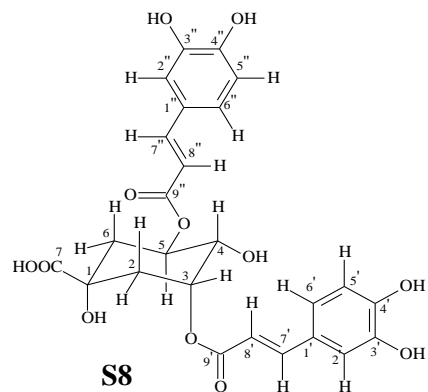
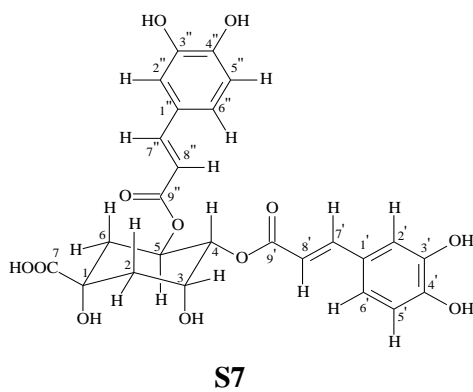
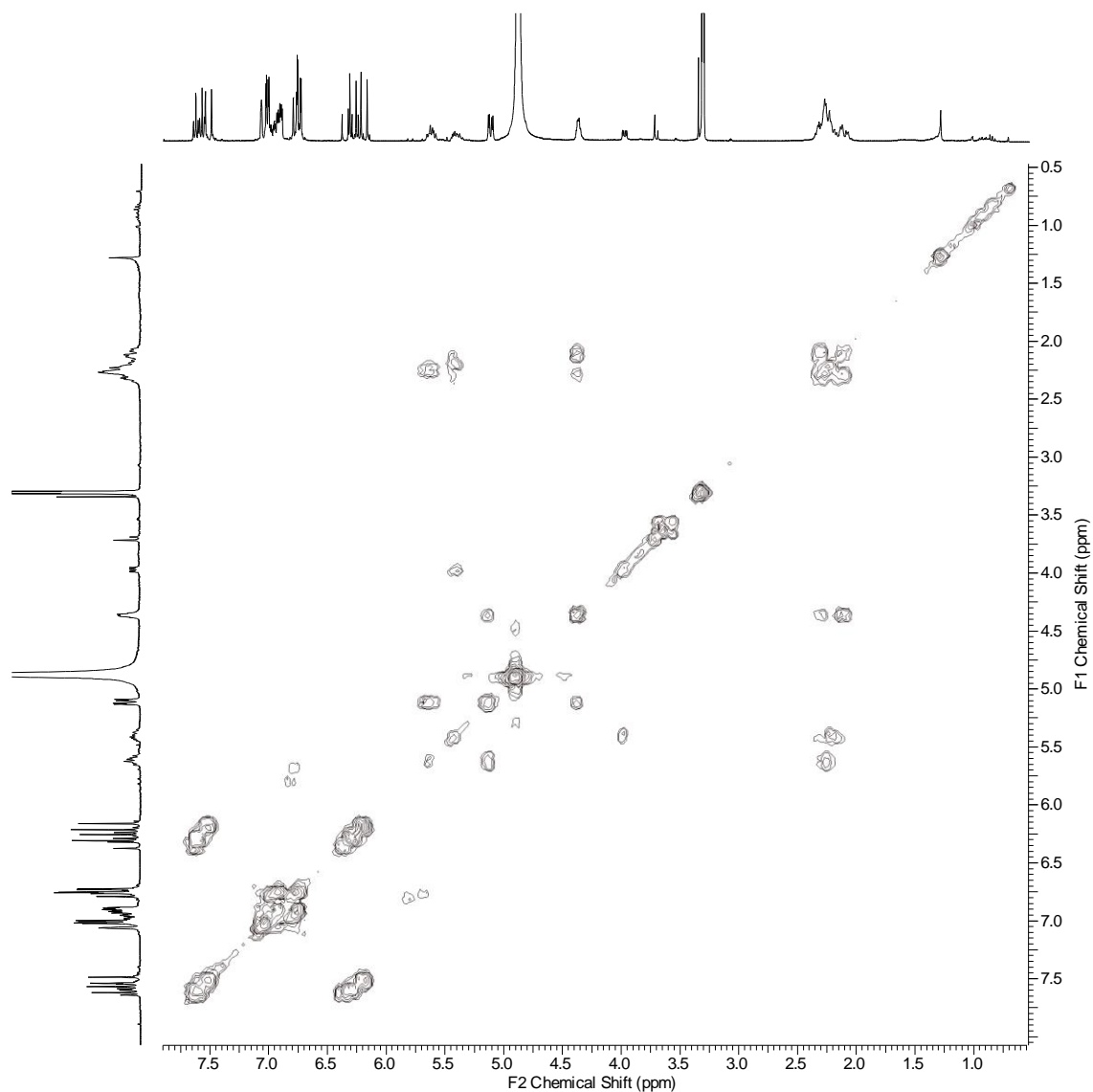


Figura 47: Expansão do mapa de correlação homonuclear COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) das substâncias S7 e S8.

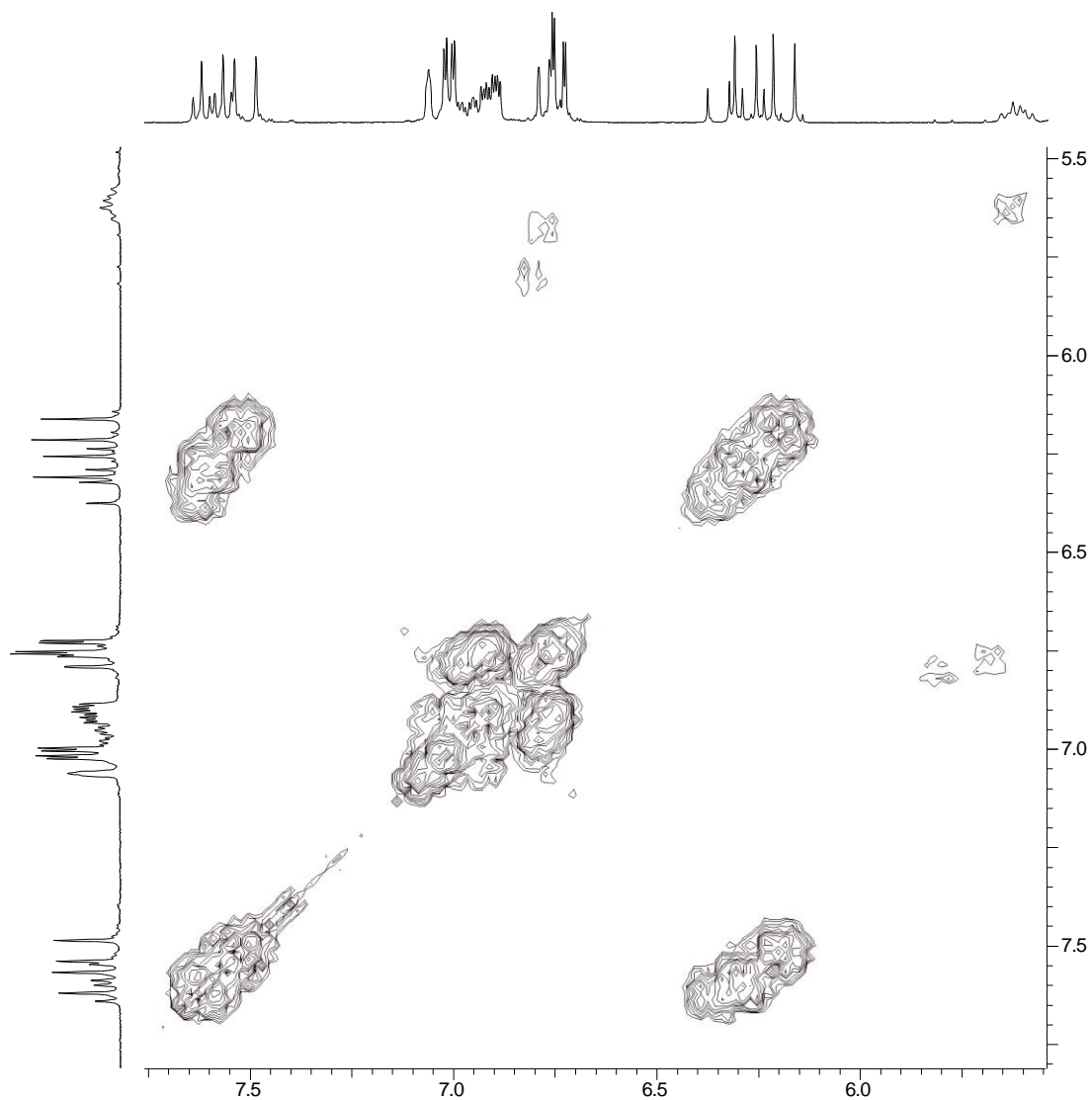
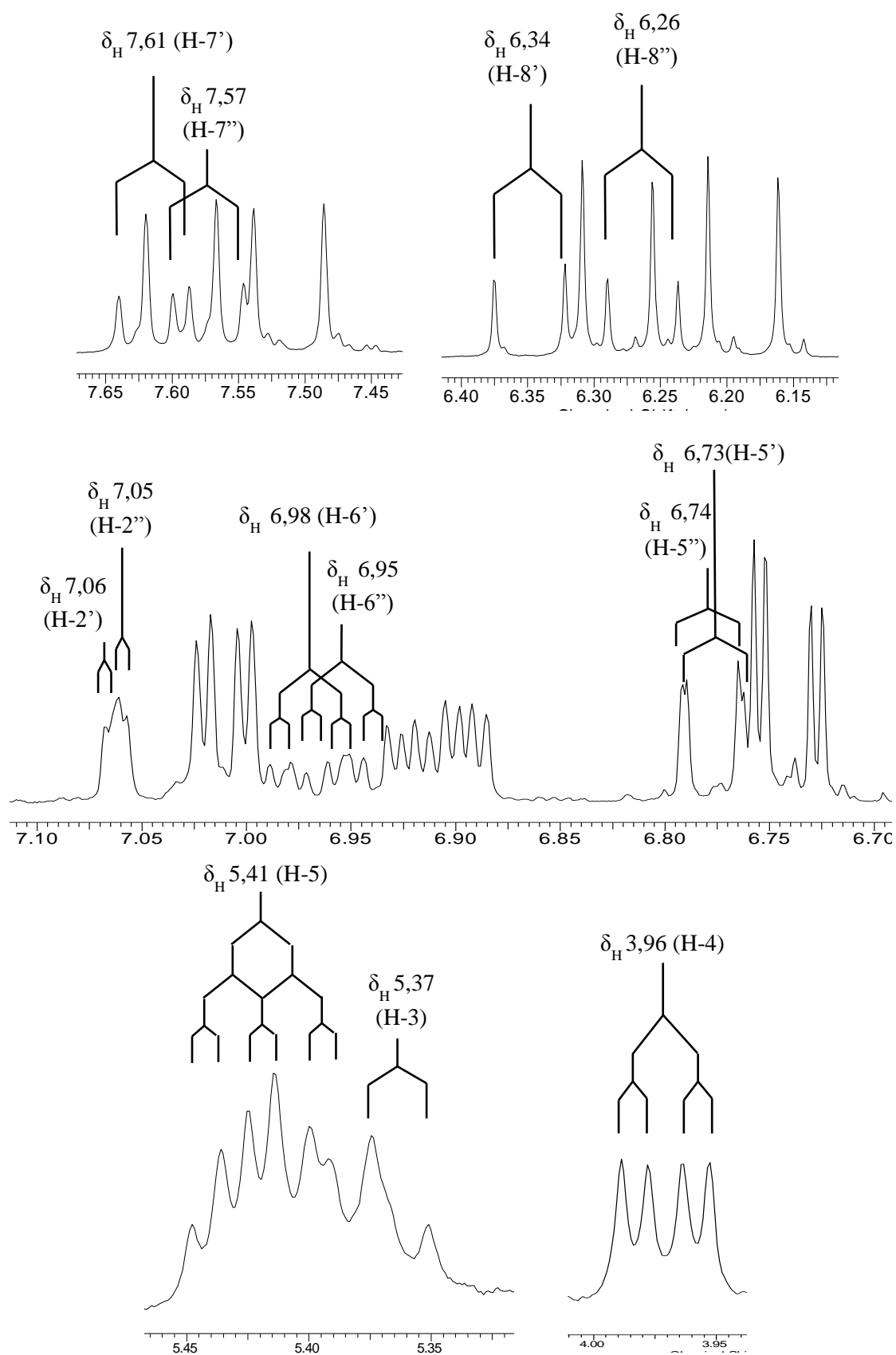


Tabela 22: Correlações observadas no mapa de contornos ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) COSY para S7.

$\delta_{\text{H}}(\text{H})$	$\delta_{\text{H}}(\text{H})$
2,05-2,35 (2)	4,36 (3)
4,36 (3)	5,11 (4)
5,11 (4)	5,61 (5)
5,61 (5)	2,05-2,35 (6)
6,73 (5')	6,90 (6')
7,51 (7')	6,28 (8')
6,74 (5'')	6,91 (6'')
7,59 (7'')	6,18 (8'')

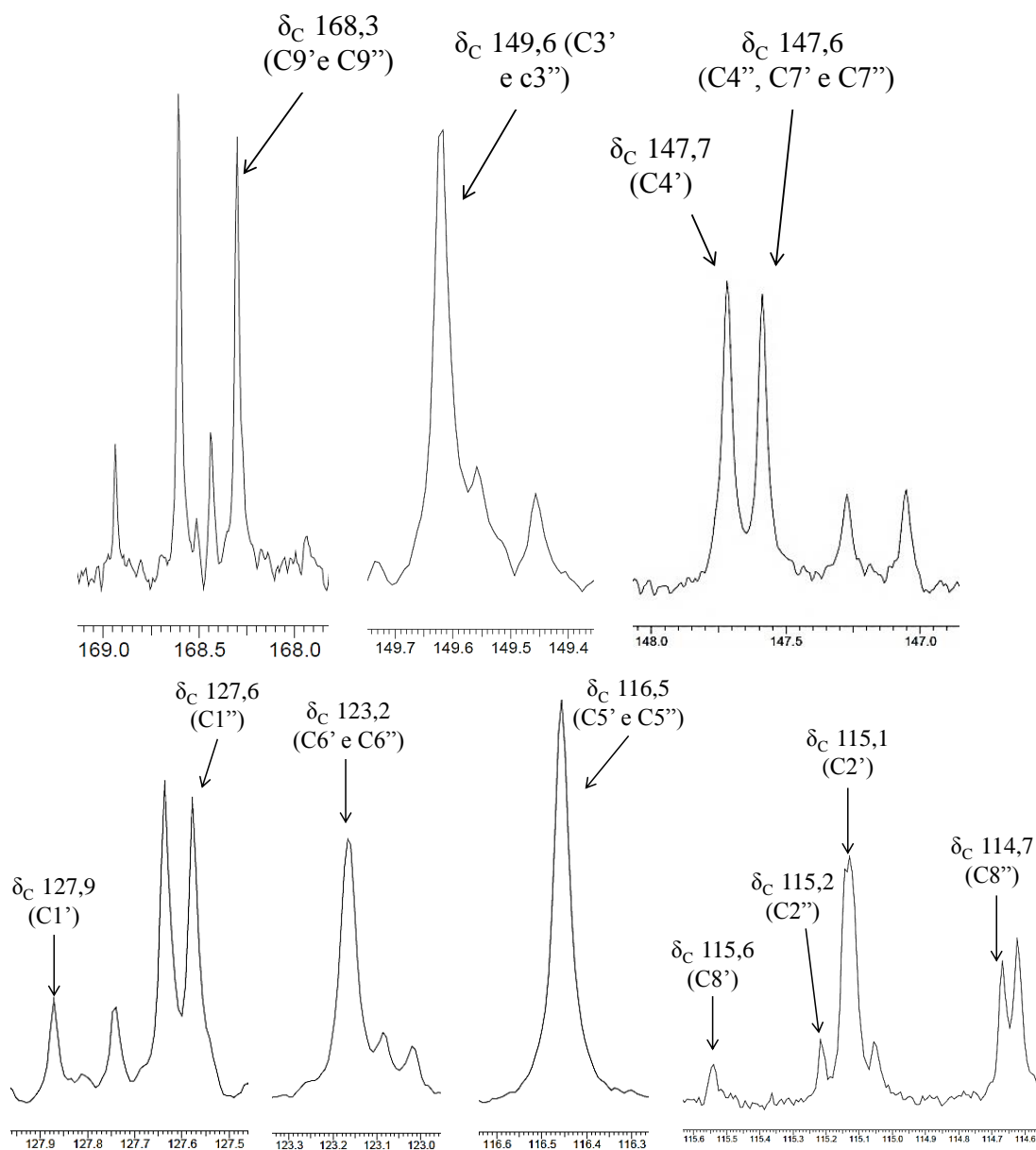
O espectro de RMN de ^1H da substância **S8** (Figuras 34 e 48) também mostrou a presença de duas unidades cafeoíla devido aos sinais de dois grupos de hidrogênios vinílicos *trans* em δ_{H} 7,61 e 6,34 (d, $J = 15,7$ Hz, H-7' e H-8') e δ_{H} 7,57 e 6,26 (d, $J = 15,9$ Hz, H-7'' e H-8''). A presença de dois anéis aromáticos pode ser observada através de dois duplos dupletos em δ_{H} 6,98 e 6,95 (dd, $J = 2,1$ e $8,1$ Hz, H-6' e H-6''), de dupletos em δ_{H} 6,78 e 6,79 ($J = 8,1$ Hz, H-5' e H-5'') e em δ_{H} 7,06 e 7,05 (d, $J = 1,47$ Hz, H-2' e H-2''). Além desses sinais, o espectro mostrou a presença de três hidrogênios oximetínicos na região de δ_{H} 3,96 a 5,41 e de hidrogênios metilênicos compreendidos entre δ_{H} 2,05 e 2,35 (m, H-2 e H-6) característicos do grupamento quínico (CHEMINAT, 1996; TATEFUJI, 1988). As multiplicidades e as constantes de acoplamento observadas permitiram a atribuição dos sinais em δ_{H} 3,96 (dd, $J = 3,3$ e $7,1$ Hz) para H-4, em δ_{H} 5,37 (dl, $J = 7,0$ Hz) para H-3 e em δ_{H} 5,41 (ddd, $J = 7,1$; $7,0$; $3,3$ Hz) para H-5. Por essas considerações, pode-se afirmar que a substância **S8** é um dos outros isômeros possíveis do ácido dicafeoil quínico e os deslocamentos químicos dos hidrogênios oximetínicos H-5 (δ_{H} 5,41), H-4 (δ_{H} 3,96) e H-3 (δ_{H} 5,37) explicitaram a substituição nas posições 3 e 5 do grupo quínico.

Figura 48: Expansão dos sinais do espectro de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) da substância **S8**.



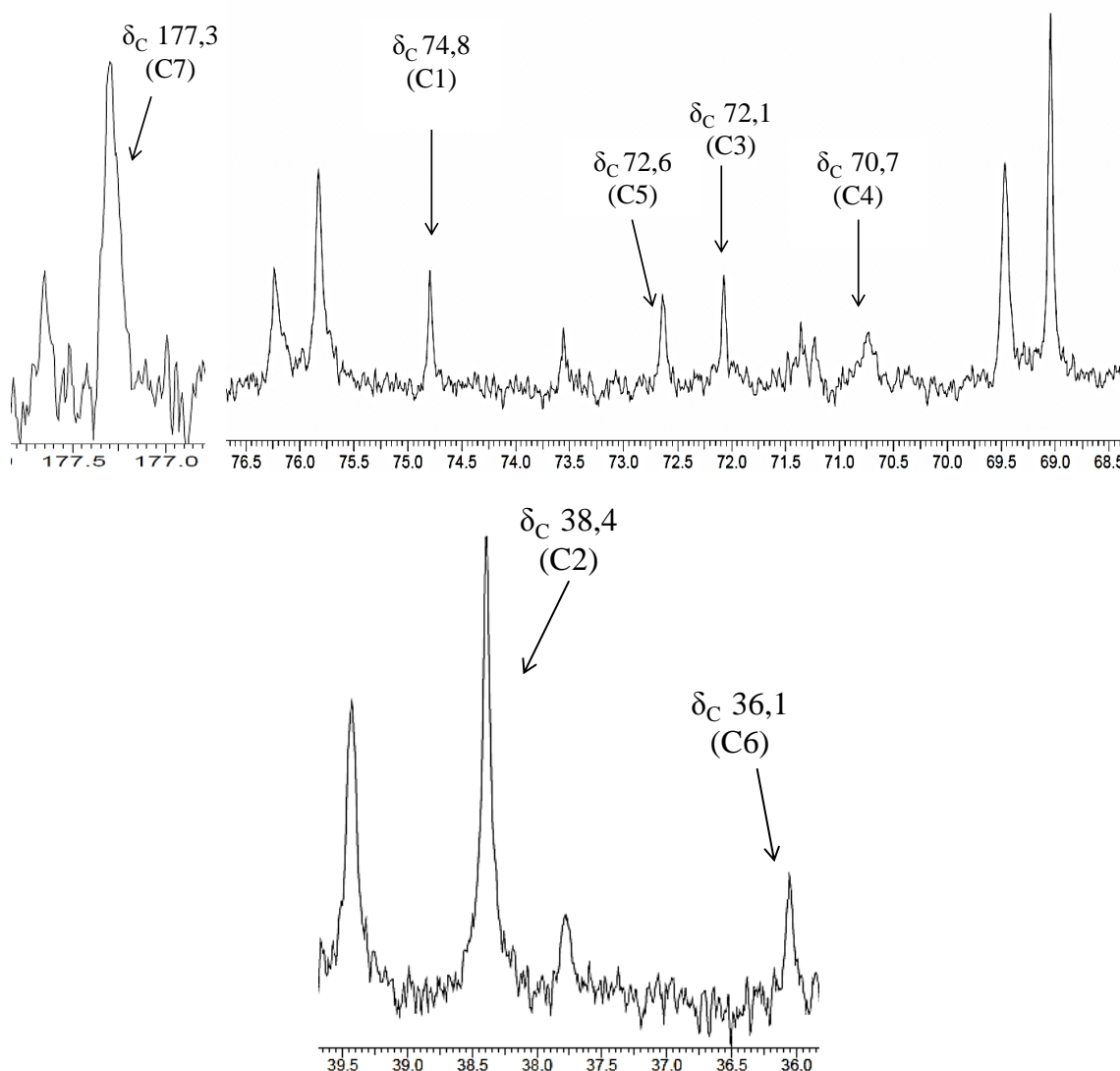
O espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (**Figuras 36e 49**) da substância **S8** mostrou sinais de carbonos carbonílicos em δ_{C} 168,3 apropriados aos C-9' e C-9''. Os sinais dos carbonos vinílicos C-7' e C-8' foram notados em δ_{C} 147,6 e 115,6, ao passo que os sinais em δ_{C} 147,6 e 114,7 foram atribuídos aos C-7'' e C-8''. Os carbonos não ligados a hidrogênio C-1', C-3' e C-4' foram identificados em δ_{C} 127,9, 149,6 e 147,7, enquanto que os sinais dos carbonos C-1'', C-3'' e C-4'' apareceram em δ_{C} 127,6, 149,6 e 147,6. Os outros carbonos dos anéis aromáticos foram identificados por meio dos sinais em δ_{C} 115,1 (C-2' e C-2''), 116,5 (C-5' e C-5'') e 123,2 (C-6' e C-6'').

Figura 49: Expansão do espectro de ^{13}C (CD_3OD ; 75,45MHz) na região do grupo cafeoil da substância **S8**.



O grupo quínico foi evidenciado pela presença de um carbono em δ_C 177,3 (C-7) típico de carbonila de ácido carboxílico, além dos sinais de carbonos metilênicos em δ_C 38,4 (C-2) e 36,1 (C-6); de carbonos oximetínicos em δ_C 72,1 (C-3), 70,7 (C-4) e 72,6 (C-5) e do sinal do carbono carbinólico C-1 em δ_C 74,8 (**Figuras 36e 50**).

Figura 50: Expansões dos sinais do espectro de ^{13}C (CD_3OD ; 75,45MHz) na região do grupo quínico da substância **S8**.



No mapa de contornos HSQC (**Figuras 39a41**) foram notadas as correlações entre os deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio que ajudaram nas atribuições e na ratificação da estrutura para **S8**.

No mapa de contornos HMBC (**Figuras 42a45**) foram observados as correlações a longa distância entre os carbonos carbonílicos C-9' e C-9'' (δ_C 168,3) com os hidrogênios H-3 (δ_H 5,37) e H-5 (δ_H 5,41) do grupo quínico, respectivamente,

demonstrando o posicionamento dos substituintes cafeoila nas posições 3 e 5 do grupo quínico. Puderam ser observadas ainda correlações entre o carbono C-9' (δ_C 168,3) e o H-7' (δ_H 7,61) e entre o carbono C-9'' (δ_C 168,3) e o H-7'' (δ_H 7,57) dos dois grupos cafeoila; estas correlações auxiliaram a construção estrutural da substância S8, mostrando as posições em que os grupos cafeoila estão ligados no grupo quínico (**Figura 45**); as demais correlações notadas estão dispostas na **Tabela 23**.

Tabela 23: Correlações observadas no mapa de contornos HMBC para S8.

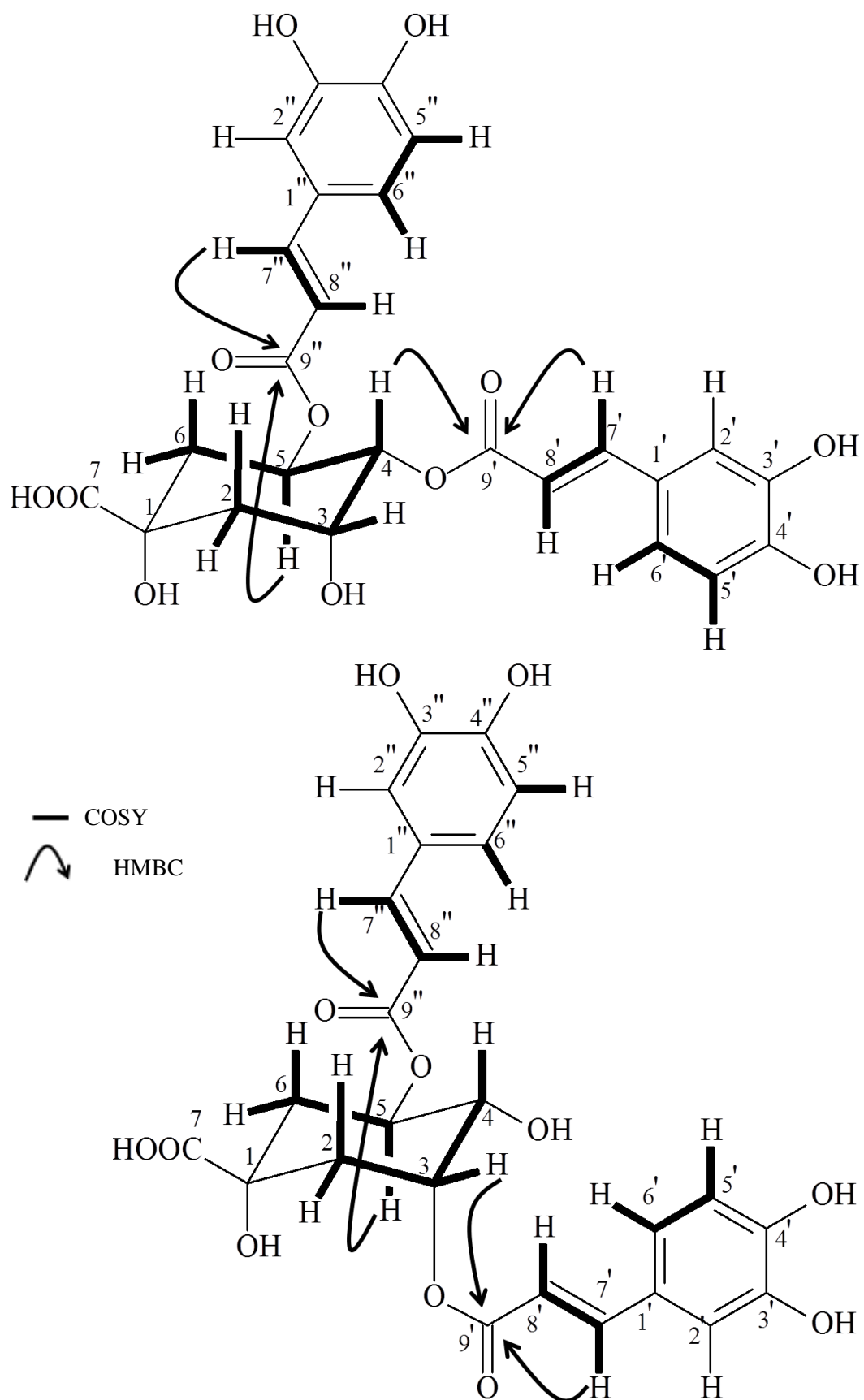
δ_H (H)	δ_C (C)
2,05-2,35 (2 e 6)	74,8 ($1^{-2}J$); 72,6 ($5^{-2}J$)
5,37 (3)	168,3 ($9''$); 70,7 ($4^{-2}J$)
5,41 (5)	168,3 ($9'$); 70,7 ($4^{-2}J$)
7,61 (7')	168,3 ($9'$)
6,34 (8')	127,9 ($1'$)

A análise das correlações observadas no mapa de contornos ($^1H \times ^1H$) COSY (**Figuras 46e 47**) mostraram os acoplamentos entre o H-3 (δ_H 5,37) com H-4 (δ_H 3,96) e com H-2 (δ_H 2,05-2,35) e de H-5 (δ_H 5,41) com o H-6 (δ_H 2,05-2,35) confirmando a existência do grupo quínico. As correlações entre os hidrogênios H-5' (δ_H 6,78) e H-6' (δ_H 6,98), entre H-5'' (δ_H 6,79) e H-6'' (δ_H 6,95), assim como as correlações entre os hidrogênios H-7' (δ_H 7,61) e H-8' (δ_H 6,34) e entre os H-7'' (δ_H 7,57) e H-8'' (δ_H 6,26) auxiliaram na confirmação da presença de dois grupos $\alpha\beta$ -insaturados e de dois anéis aromáticos na estrutura de S8 (**Figura 51**) (**Tabela 24**).

Tabela 24: Correlações observadas no mapa de contornos ($^1H \times ^1H$) COSY para S8.

δ_H (H)	δ_H (H)
2,05-2,35 (2)	5,37 (3)
5,37 (3)	3,96 (4)
5,41 (5)	2,05-2,35 (6)
6,78 (5')	6,98 (6')
7,61 (7')	6,34 (8')
6,79 (5'')	6,95 (6'')
7,57 (7'')	6,26 (8'')

Figura 51: Principais correlações espaciais observadas nos mapas de correlação heteronuclear HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) e homonuclear COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) das substâncias **S7eS8**.



Os dados das substâncias isoladas foram compatíveis com os da literatura (CHEMINAT, 1988; MEIRA, 2008; OLIVEIRA, 2008), como descrito nas **Tabelas 25e 26e** confirmam a estrutura do ácido 3,5-*O*-dicafeoilquinico(**42**) para **S7e** do ácido 4,5-*O*-dicafeoilquinico para **S8**.

Tabela 25: Dados de RMN de ¹H para a mistura das substâncias S7e S8 e para os isômeros do ácido *O*-cafeoilquinico.

	3,4 ^{b1}	3,5 ^{c2}	S8 ^a	4,5 ^{c2}	S7 ^a
H	δ_H (mult., J em Hz)	δ_H (mult., J em Hz)	δ_H (mult., J em Hz)	δ_H (mult., J em Hz)	δ_H (mult., J em Hz)
2	2,00-2,40	2,26 (m, 6,7)	2,05-2,35 (m)	1,90-2,20	2,05-2,35 (m)
3	5,63	5,50 (dd, 3,3; 6,7)	5,37 (dl, 7,0)	4,39 (ddd, 3,0; 3,1, 4,1;)	4,36 (ddd, 3,0; 3,0; 4,4)
4	5,12	4,00 (dd, 3,3; 7,5)	3,96 (dd, 3,3; 7,1)	5,14 (dd, 3,0; 9,2)	5,11 (dd, 3,0; 9,1)
5	4,37	5,41 (ddd, 3,6; 7,0; 7,5)	5,41 (ddd, 3,3; 7,0; 7,1)	5,66 (m)	5,61 (ddd, 5,3; 9,1; 9,1)
6ax	2,00-2,40	2,19 (dd, 7,0; 13,7)	2,05-2,35 (m)	1,90-2,20	2,05-2,35 (m)
6eq	2,00-2,40	2,35 (dd, 3,6; 13,7)	2,05-2,35 (m)	1,90-2,20	2,05-2,35 (m)
2'	7,02	7,10 (d, 2,0)	7,06 (d, 1,5) †	7,02 (d, 2,0)	7,00 (d, 2,1) †
5'	6,75	6,82 (d, 8,2)	6,78 (d, 8,1) †	6,77 (d, 8,2)	6,73 (d, 8,1) †
6'	6,92	7,01 (dd, 2,0; 8,2)	6,98 (dd, 2,1; 8,1) †	6,93 (dd, 2,0; 8,2)	6,90 (dd, 2,1; 8,1) †
7'	7,60	7,65 (d, 15,7)	7,61 (d, 15,9) †	7,62 (d, 15,9)	7,51 (d, 15,9) †
8'	6,29	6,39 (d, 15,7)	6,34 (d, 15,9) †	6,31 (d, 15,9)	6,28 (d, 15,9) †
2''	7,01	7,09 (d, 2,0)	7,05 (d, 1,5) †	7,05 (d, 2,0)	7,02 (d, 2,1) †
5''	6,74	6,81 (d, 8,2)	6,79 (d, 8,1) †	6,78 (d, 8,2)	6,74 (d, 8,1) †
6''	6,91	7,00 (dd, 2,0; 8,2)	6,95 (dd, 2,1; 8,1) †	6,95 (dd, 2,0; 8,2)	6,91 (dd, 2,1; 8,1) †
7''	7,52	7,61 (d, 15,7)	7,57 (d, 15,9) †	7,54 (d, 15,9)	7,59 (d, 15,9) †
8''	6,19	6,30 (d, 15,7)	6,26 (d, 15,9) †	6,22 (d, 15,9)	6,18 (d, 15,9) †

^a(δ -ppm; 300,06 MHz; CD₃OD); ^b(δ -ppm; 500,2 MHz; CD₃OD); ^c(δ -ppm; 400,0 MHz; CD₃OD).

¹(TATEFUJI, 1996); ²(CHEMINAT, 1988)

†Esses valores podem estar invertidos.

Tabela 26: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ de S7e S8e para os isômeros do ácido *O*-dicafeoilquínico.

	3,4 ^{b1}	3,5 ^{b2}	S8 ^a	4,5 ^{b2}	S7 ^a
C	δ_{C} (DEPT)	δ_{C} (DEPT)	δ_{C} (DEPT)	δ_{C} (DEPT)	δ_{C} (DEPT)
1	76,1 (C)	74,8 (C)	74,8 (C)	76,6 (C)	76,2 (C)
2	39,4 (CH ₂)	37,7 (CH ₂)	38,4 (CH ₂)	42,0 (CH ₂)	39,4 (CH ₂)
3	69,4 (CH)	72,2 (CH)	72,1 (CH)	70,2 (CH)	69,5 (CH)
4	75,8 (CH)	72,6 (CH)	70,7 (CH)	75,3 (CH)	75,8 (CH)
5	69,0 (CH)	70,8 (CH)	72,6 (CH)	65,9 (CH)	69,1 (CH)
6	38,4 (CH ₂)	36,1 (CH ₂)	36,1 (CH ₂)	37,1 (CH ₂)	38,4 (CH ₂)
7	176,8 (C)	177,4 (C)	177,3 (C)	178,0 (C)	177,7 (C)
1'	127,8 (C)	128,0 (C)	127,9 (C) †	127,9 (C)	127,7 (C) †
2'	115,3 (CH)	115,3 (CH)	115,1 (CH) †	115,3 (CH)	115,1 (CH) †
3'	149,7 (C)	149,6 (C)	149,6 (C) †	149,7 (C)	149,6 (C) †
4'	147,6 (C)	147,3 (C)	147,7 (C) †	147,4 (C)	147,3 (C) †
5'	116,5 (CH)	116,6 (CH)	116,5 (CH) †	116,6 (CH)	116,5 (CH) †
6'	123,2 (CH)	123,1 (CH)	123,2 (CH) †	123,3 (CH)	123,2 (CH) †
7'	146,8 (CH)	146,8 (CH)	147,6 (CH) †	146,8 (CH)	147,7 (CH) †
8'	114,8 (CH)	115,7 (CH)	115,6 (CH) †	115,1 (CH)	115,1 (CH) †
9'	168,6 (C)	168,9 (C)	168,3 (C) †	168,7 (C)	168,9 (C) †
1''	127,7 (C)	127,9 (C)	127,6 (C) †	127,8 (C)	127,8 (C) †
2''	115,2 (CH)	115,2 (CH)	115,2 (CH) †	115,2 (CH)	115,1 (CH) †
3''	149,7 (C)	149,5 (C)	149,6 (C) †	149,7 (C)	149,5 (C) †
4''	147,8 (C)	147,1 (C)	147,6 (C) †	147,3 (C)	147,1 (C) †
5''	116,5 (CH)	116,6 (CH)	116,5 (CH) †	116,5 (CH)	116,5 (CH) †
6''	123,2 (CH)	123,0 (CH)	123,2 (CH) †	123,1 (CH)	123,2 (CH) †
7''	146,8 (CH)	146,8 (CH)	147,6 (CH) †	146,9 (CH)	147,7 (CH) †
8''	114,7 (CH)	115,4 (CH)	114,7 (CH) †	115,0 (CH)	114,6 (CH) †
9''	168,3 (C)	168,4 (C)	168,3 (C) †	168,6 (C)	168,5 (C) †

^a(δ -ppm; 75,5 MHz; CD₃OD); ^b(δ -ppm; 125,8 MHz; CD₃OD).

¹(TATEFUJI, 1996); ²(CHEMINAT, 1988)

†Esses valores podem estar invertidos.

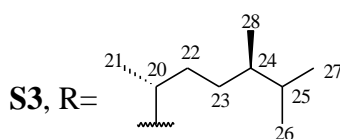
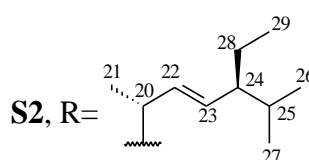
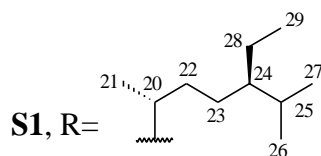
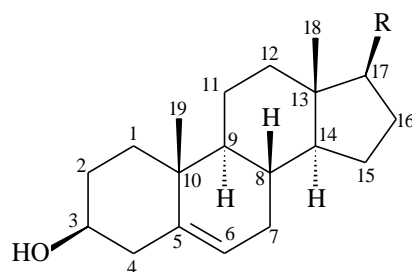
Da mesma forma que para o ácido 5-*O*-cafeoilquínico, este é o primeiro relato do isolamento destes dois compostos em espécies do gênero *Sabicea*, apesar dos mesmos já terem sido isolados de *Coffea arabica*(CLIFFORD, 2006).

Trabalhos descritos na literatura têm demonstrado que os ácidos 3,5 e 4,5-*O*-dicafeoilquínico apresentam significativas capacidades sequestradoras de radicais livres (HUNG, 2006). Além disso, o extrato metanólico das partes aéreas de *Centella asiática* teve atividade coagulante, sendo esta atribuída ao ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico

(SATAKE, 2007); estudos mostram que, por este composto ter ação antioxidante, ele possui atividade neuroprotetora, protegendo as células nervosas. Dessa forma, além de um potente antioxidante, esse ácido pode ser estudado como um método alternativo para um melhor tratamento do mal de Parkinson, entre outras doenças neurodegenerativas (SOH, 2003).

Segundo SANTOS (2010), o ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico mostrou atividade analgésica no teste de dor induzida por ácido acético em ratos, além de possuir atividade anti-inflamatória inibindo a Prostaglandina E₂ (PGE₂), uma das substâncias liberadas no local da lesão responsáveis pelos sinais e sintomas da inflamação.

5.4 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE S1, S2 E S3.



A mistura dos compostos **S1**, **S2** e **S3** foi isolada das frações hexânica (3,1 mg) e clorofórmica (6,3 mg) na forma de um sólido branco cristalino solúvel em clorofórmio e o ponto de fusão obtido para este sólido está compreendido entre 172,3 a 177,0 °C.

No espectro de RMN de ¹H da mistura (**Figura 52**) foram verificados sinais que caracterizam tratar-se de moléculas com esqueleto esteroidal, como os sinais característicos de hidrogênios vinílicos em δ_H 5,29 (*d*, $J=5,1$ Hz), δ_H 4,99 e 5,12 (*dd*, $J=15,0$ e $8,4$ Hz). Observando-se as integrações e considerando que o sinal em δ_H 4,99 corresponde à presença de um hidrogênio vinílico na posição 22, percebe-se que o sinal em δ_H 5,29 apresenta integração três vezes maior, logo esse sinal corresponde à três

hidrogênios vinílicos na posição 6; da mesma forma, infere-se a existência de 3 hidrogênios anoméricos em δ_H 3,45, característico do H-3. Desta forma, percebe-se a existência de 3 compostos com esqueleto esteroidal na mistura. Além disso, sinais entre δ_H 0,55 a 1,03 são característicos de grupos metila.

No espectro RMN de $^{13}C/DEPT$ (**Figuras 53e 54**) pode ser destacado o sinal em δ_C 71,8 referente aos carbonos carbinólicos C-3, assim como sinais atribuídos aos carbonos olefínicos C-5 e C-6 em δ_C 140,7 e 121,7 e C-22 e C-23 em δ_C 138,3 e 129,2, todos intrínsecos do esqueleto citado acima.

Figura 52: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,06 MHz) das substâncias **S1**, **S2** e **S3**.

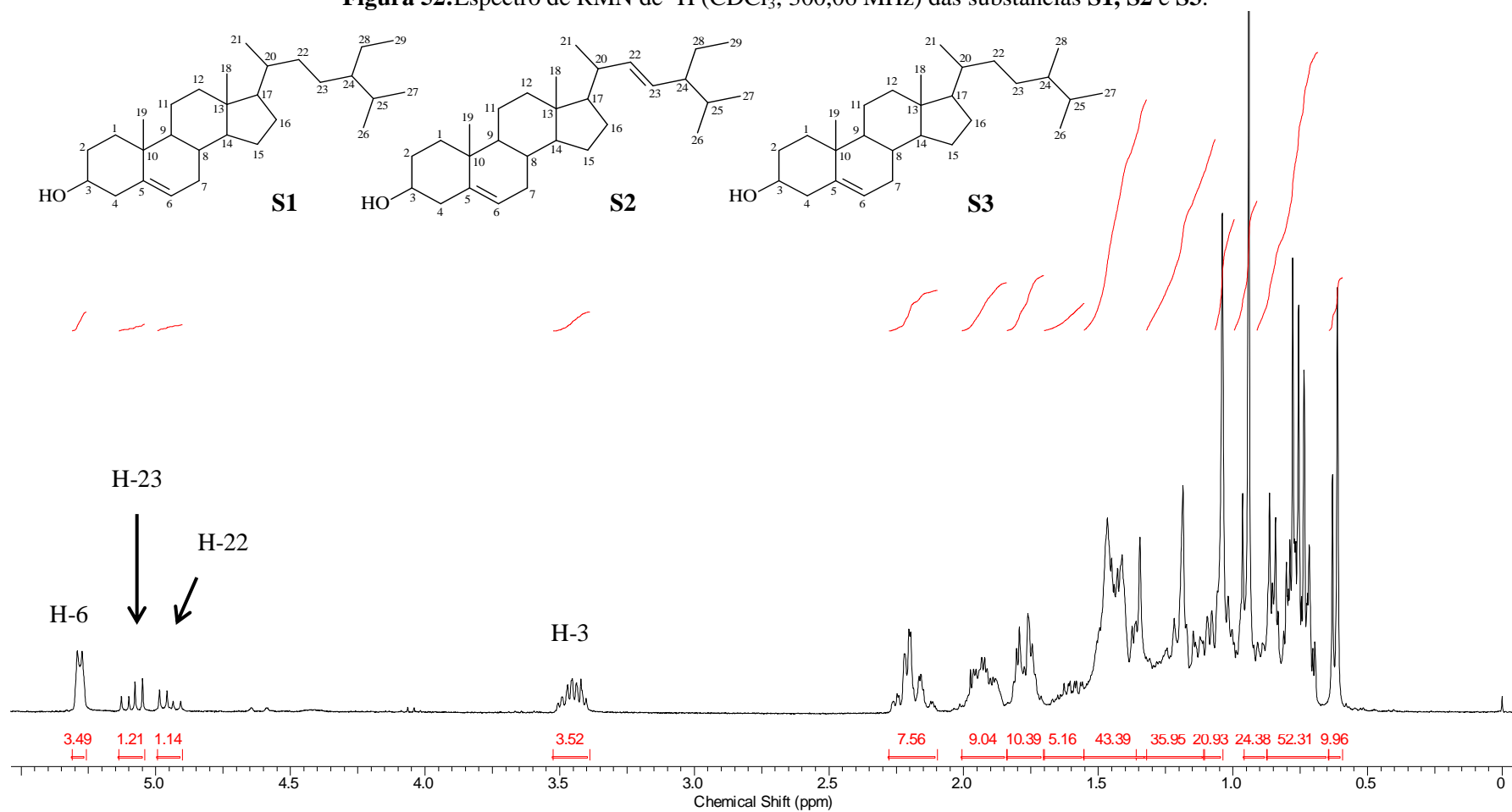


Figura 53: Espectro de RMN de ^{13}C (a), DEPT 135° (b) e DEPT 90° (c) (CDCl_3 ; 75,45MHz) das substâncias **S1**, **S2** e **S3**.

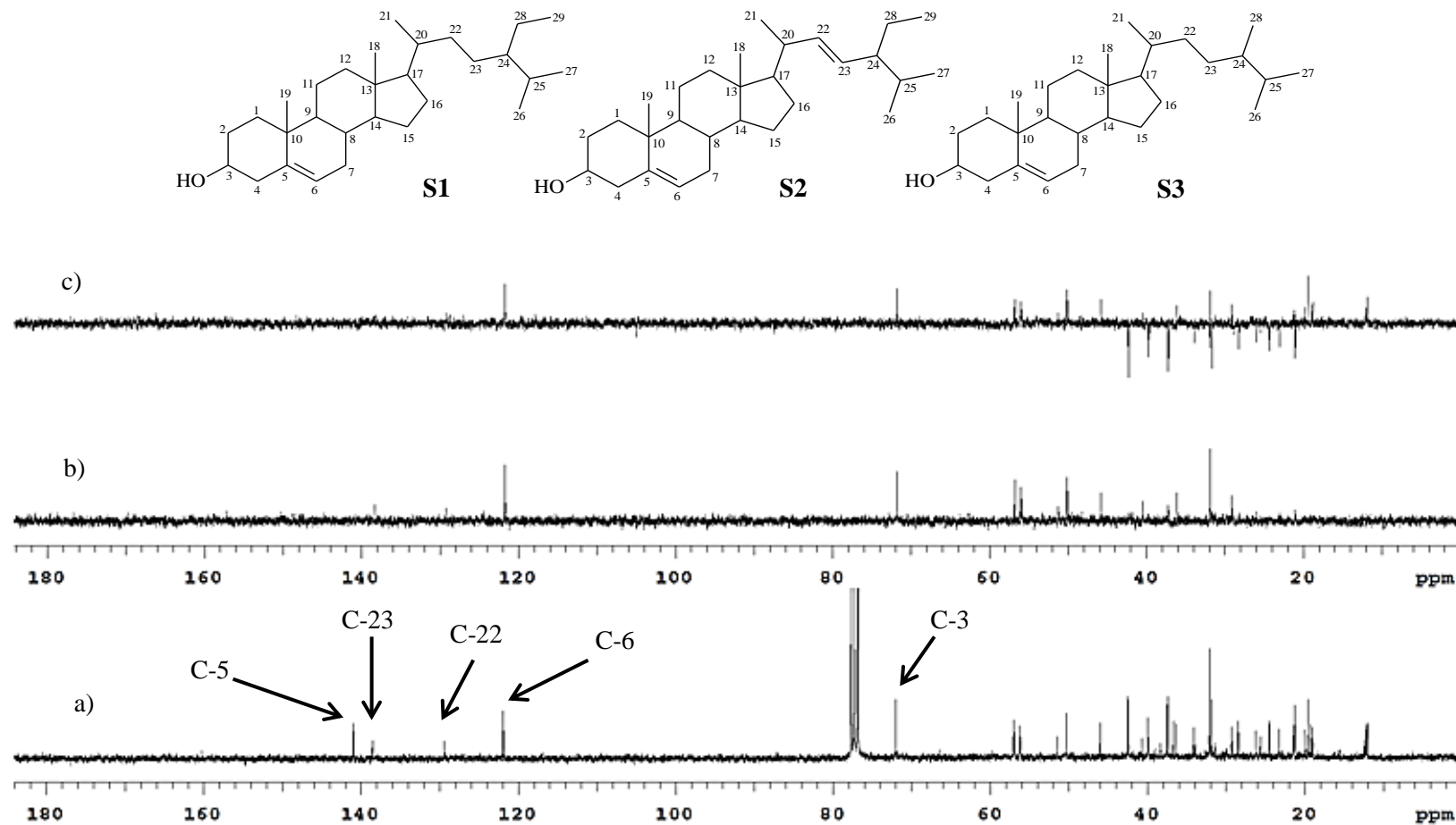
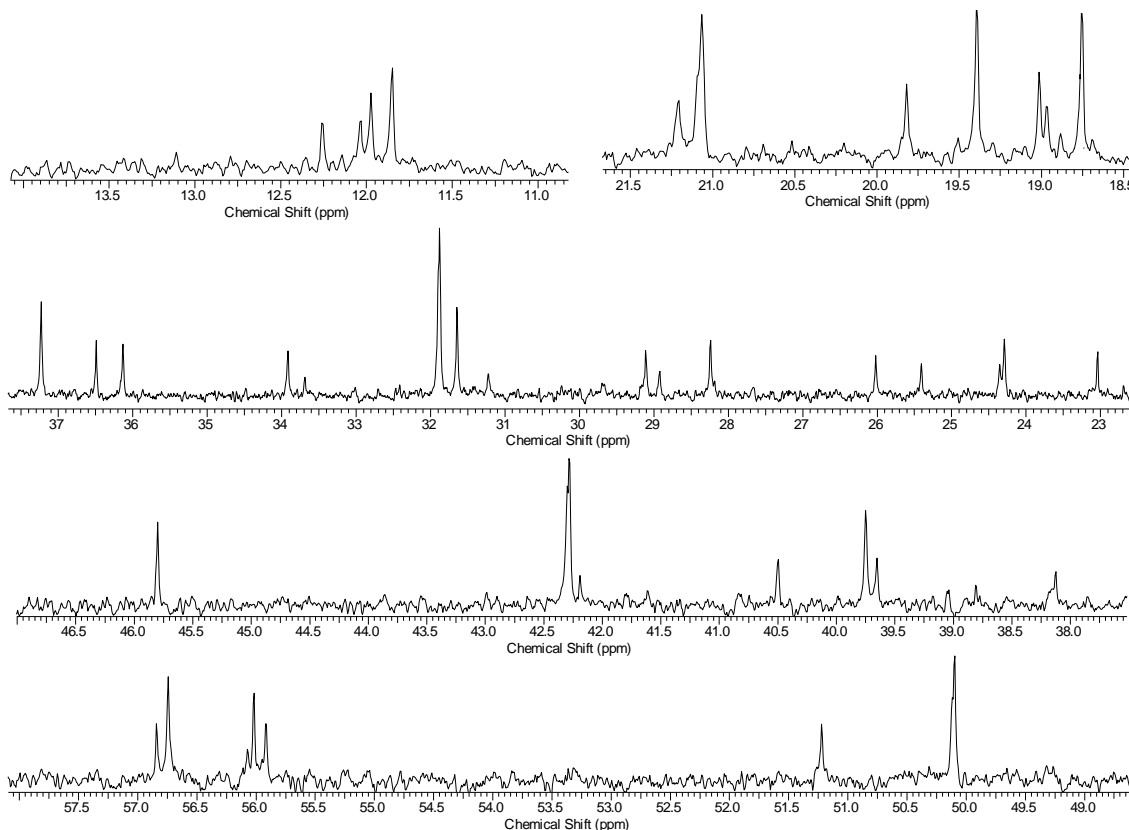


Figura 54: Expansão dos sinais do espectro de ^{13}C das substâncias **S1**, **S2** e **S3**.



O cromatograma, adquirido por CG/EM de baixa resolução (**Figura 55**) para a mistura revelou três picos com tempos de retenção (t_r) próximos (23,33; 22,43 e 21,88 min.) que remetem à presença de três substâncias na proporção de 1:4:2, **S1**, **S2** e **S3**, respectivamente.

O espectro de massas de baixa resolução da substância **S1** ($t_r = 23,33$ min.) apresentou sinal do íon molecular M^+ em m/z 414 que remete à fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$; o pico base foi notado em m/z 107 (**Figura 56**), além de sinais típicos de fragmentações do esqueleto esteroidal, sendo que uma proposta de fragmentação segundo SIMOTE, 2006 para **S1** esta demonstrada na **Figura 57** e as principais fragmentações, segundo GARG (1994) encontram-se na **Tabela 27**. Desta forma, o sinal em m/z 273 foi atribuído ao íon resultante da perda da cadeia lateral e a subsequente perda de uma molécula de água explica o pico em m/z 255. Quando, a partir deste íon, quebra-se o anel de 5 membros com a perda de C_3H_8 , forma-se um íon com pico em m/z 213. Outras perdas interessantes são a de um grupamento metila, $M-(\text{CH}_3)$, de uma molécula de água, $M-(\text{H}_2\text{O})$, e desses dois grupos simultaneamente, $M-$

($\text{H}_2\text{O}+\text{CH}_3$), gerando íons cujos picos são percebidos em m/z 399, 396 e 381, respectivamente. Nesse tipo de esqueleto esteroidal, quando a cadeia lateral se fragmenta pela quebra da ligação $\text{C}_{23}-\text{C}_{24}$ há formação do íon com pico em m/z 329, sendo tal fragmentação típica de cadeia lateral do tipo $\text{C}_{10}\text{H}_{21}$.

Figura 55: Cromatograma obtido por CG-EM para a mistura de substâncias S1, S2 e S3.

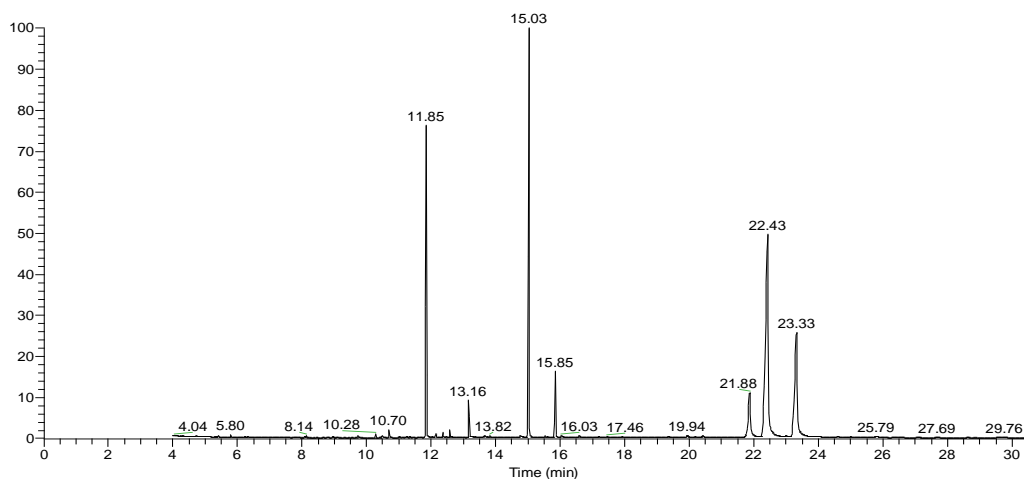


Figura 56: Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) da substância S1.

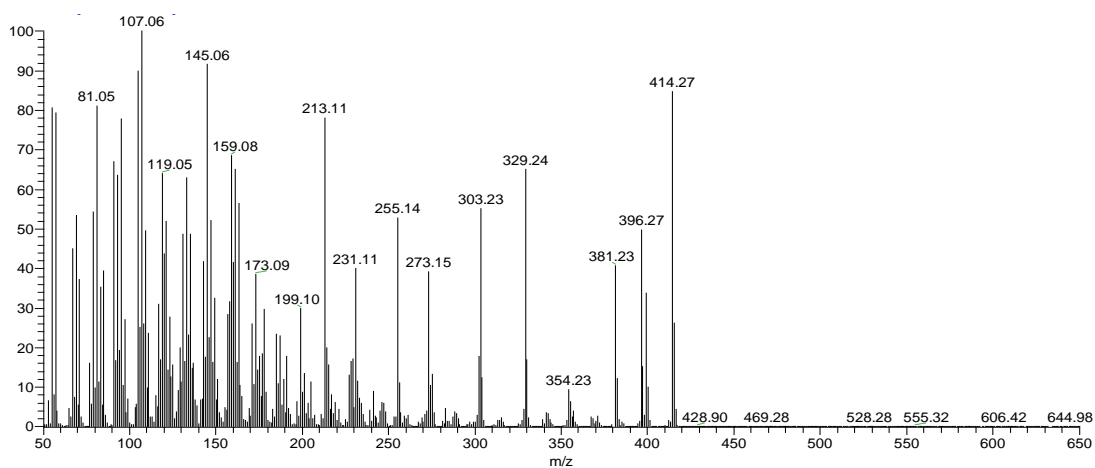
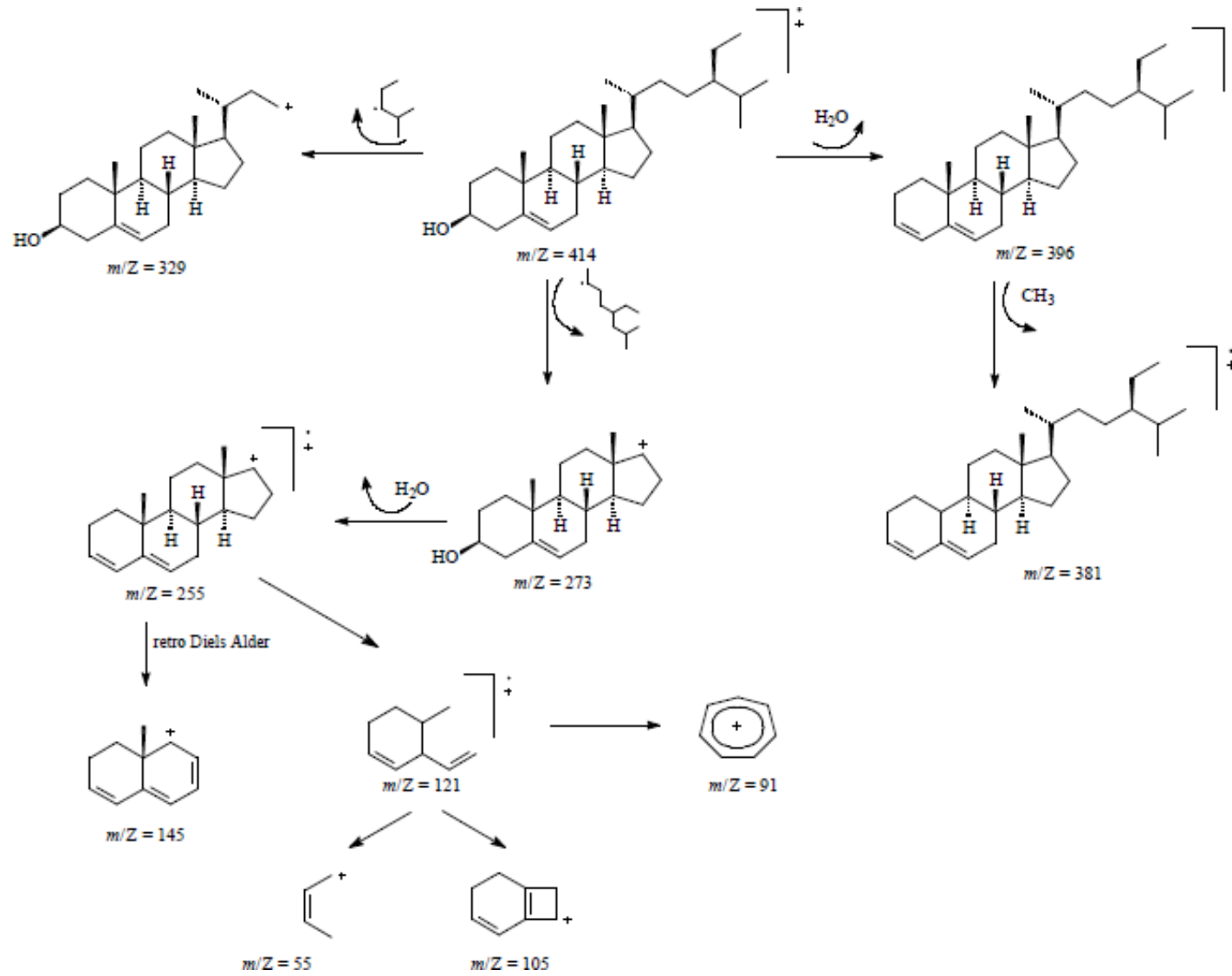


Figura 57: Esquema de fragmentação da substância S1



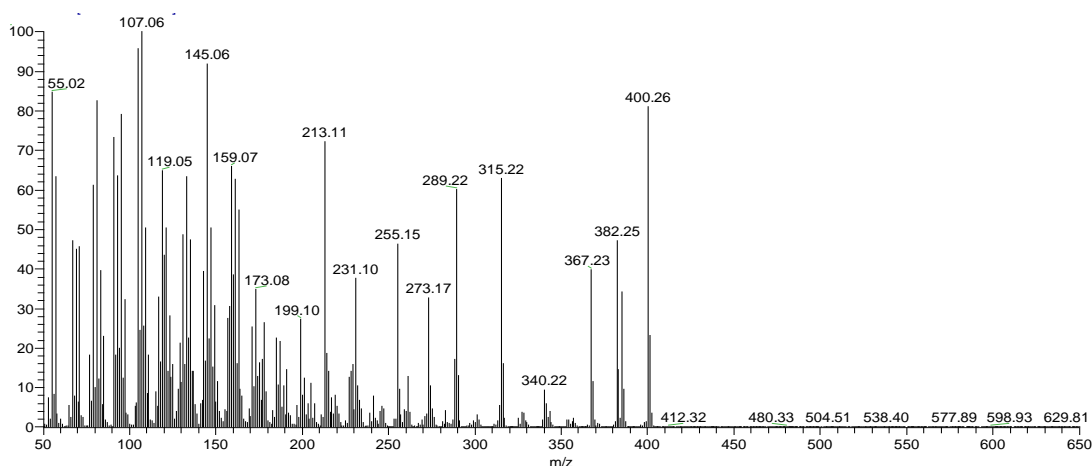
Fonte: SIMOTE, 2006

Tabela 27: Principais fragmentações observadas nos espectros de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) para as substâncias S1, S2 e S3

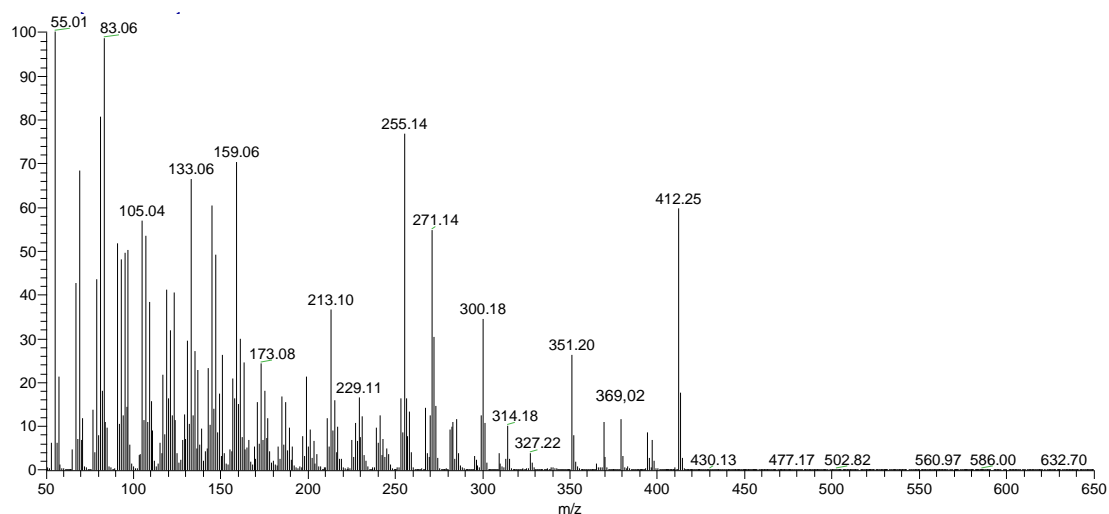
Íon	S1	S2	S3
M+	414	412	400
M-(CH ₃)	399	397	385
M-(H ₂ O)	396	394	382
M-(H ₂ O+CH ₃)	381	379	367
		369	
M-(C ₃ H ₇ da cadeia lateral)	-	(quebra da ligação C ₂₄ -C ₂₅)	-
M-(C ₃ H ₇ da cadeia lateral + H ₂ O)	-	351	-
	329		315
M-(C ₆ H ₁₃ da cadeia lateral)	(quebra da ligação C ₂₃ -C ₂₄)	-	(quebra da ligação C ₂₂ -C ₂₃)
		300	
M-(C ₈ H ₁₆ da cadeia lateral)	-	(quebra da ligação C ₂₀ -C ₂₂)	-
M-(C ₇ H ₁₁ O)	303	-	289
M-(cadeia lateral)	273	-	273
M-(cadeia lateral + 2H)	-	271	-
M-(cadeia lateral + H ₂ O)	255	255	255
M-(cadeia lateral + C ₃ H ₆)	-	231	231
M-(cadeia lateral + C ₃ H ₈)	229	-	-
M-(cadeia lateral + C ₃ H ₈ + H ₂ O)	213	213	213

Para a substância **S3** ($t_r = 21,88$ min.) foi observado o sinal do íon molecular M^+ em m/z 400 ($C_{28}H_{48}O$), com pico base em m/z 107 (**Figura 58**). Este composto apresentou o mesmo tipo de fragmentação ressaltado em **S1**, com aparecimento de picos em m/z 273, 255, 231 e 213. As perdas do grupamento metila, de uma molécula de água e desses dois grupos simultaneamente geraram os íons cujos picos são compreendidos respectivamente em m/z 385, 382 e 367. Para este composto vale ressaltar a fragmentação na cadeia lateral que origina o íon com m/z 315 resultante da quebra da ligação $C_{22}-C_{23}$, visto que essa fragmentação só ocorre na cadeia lateral do tipo C_9H_{19} (**Tabela 27**) (GARG, 1994).

Figura 58: Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) da substância **S3**.



O composto **S2** apresentou sinal do íon molecular em m/z 412 conferindo com a fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$ e o pico base em m/z 55 (**Figura 59**). Os sinais em m/z 255, 231 e 213 também se repetiram neste cromatograma, indicando que os três compostos passam pelo mesmo tipo de fragmentação, confirmando a semelhança estrutural entre eles. Nesta substância, porém, percebe-se uma fragmentação da cadeia lateral que não ocorre para **S1** e **S3**. Essa quebra se deve à presença da dupla ligação na cadeia lateral, sendo que a fragmentação das ligações $C_{20}-C_{22}$ e $C_{24}-C_{25}$, geram os íons com picos em m/z 300 e 369 que ocorrem em esteroides com cadeia lateral insaturada do tipo $C_{10}H_{19}$ (**Tabela 27**) (GARG, 1994).

Figura 53: Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) da substância **S2**.

Os dados espectrais da mistura foram comparados com os dados já existentes na literatura para esteroides (GOULART, 1993), sendo que a partir da análise dos dados obtidos (**Tabela 28**) foi possível concluir que a mistura isolada continha os esteroides 24 α -etil-colest-5-enol (**S1**), 24 α -etil-colest-5,22-dienol (**S2**) e 24 α -metil-colest-5-enol (**S3**), conhecidos como sitosterol (**109**), estigmasterol e campesterol, respectivamente. O ponto de fusão observado para a mistura (172,3-177,0 °C) mostrou-se parecido com o valor verificado na literatura (181-184 °C) (COSTA, 2012).

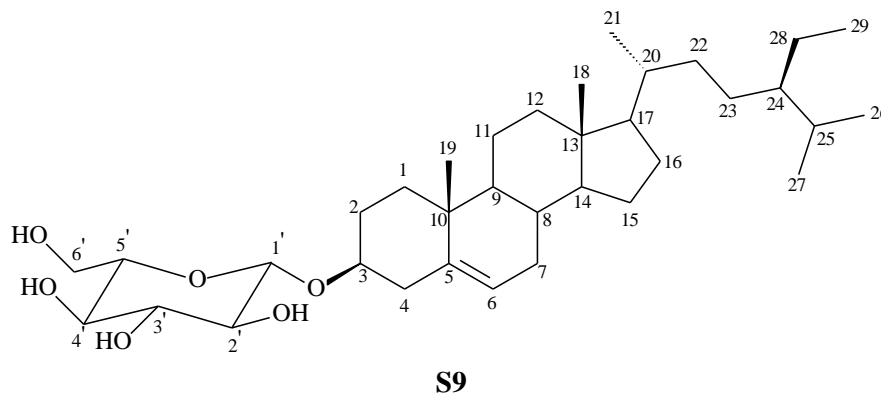
Os compostos sitosterol e estigmasterol têm atividade anti-inflamatória bastante conhecida na literatura (FILHO, 2000), além da ação destes compostos na neutralização de veneno de cobra (GOMES, 2007) e, segundo Toma e colaboradores (2003) o sitosterol, estigmasterol e campesterol podem ter contribuído para a atividade analgésica apresentada pelo extrato hexânico de *Quassia amara*, além de possuírem atividades anti-inflamatórias (FILHO, 2000) e para o estigmasterol pode-se considerar seus efeitos antinociceptivo, hipocolesterolêmico e preventivo de câncer mamário e de próstata (OLIVEIRA, 2007).

Tabela 28: Dados de RMN de ^{13}C / DEPT para a mistura de substâncias S1, S2 e S3 e para os esteroides sitosterol, estigmasterol e campesterol.

	Sitosterol ^a	S1 ^b	Estigmasterol ^a	S2 ^b	Campesterol ^a	S3
C	δc (DEPT)	δc (DEPT)	δc (DEPT)	δc (DEPT)	δc (DEPT)	δc (DEPT)
1	37,2 (CH ₂)	37,2 (CH ₂)	37,2 (CH ₂)	37,2 (CH ₂)	37,2 (CH ₂)	37,2 (CH ₂)
2	31,6 (CH ₂)	31,9 (CH ₂)	31,6 (CH ₂)	31,9 (CH ₂)	31,6 (CH ₂)	31,9 (CH ₂)
3	71,9 (CH)	71,8 (CH)	71,9 (CH)	71,8 (CH)	71,8 (CH)	71,8 (CH)
4	42,3 (CH ₂)	42,3 (CH ₂)	42,3 (CH ₂)	42,3 (CH ₂)	42,3 (CH ₂)	42,3 (CH ₂)
5	140,7 (C)	140,7 (C)	140,7 (C)	140,7 (C)	140,7 (C)	140,7 (C)
6	121,7 (CH)	121,7 (CH)	121,7 (CH)	121,7 (CH)	121,7 (CH)	121,7 (CH)
7	31,8 (CH ₂)	31,6 (CH ₂)	31,8 (CH ₂)	31,6 (CH ₂)	31,9 (CH ₂)	31,6 (CH ₂)
8	31,8 (CH)	31,9 (CH)	31,8 (CH)	31,9 (CH)	31,8 (CH)	31,9 (CH)
9	50,1 (CH)	50,1 (CH)	50,1 (CH)	50,1 (CH)	50,1 (CH)	50,1 (CH)
10	36,4 (C)	36,4 (C)	36,4 (C)	36,4 (C)	36,5 (C)	36,4 (C)
11	21,1 (CH ₂)	21,1 (CH ₂)	21,1 (CH ₂)	21,1 (CH ₂)	21,1 (CH ₂)	21,1 (CH ₂)
12	39,7 (CH ₂)	39,8 (CH ₂)	39,6 (CH ₂)	39,7 (CH ₂)	39,8 (CH ₂)	39,8 (CH ₂)
13	42,3 (C)	42,1 (C)	42,3 (C)	42,3 (C)	42,3 (C)	42,3 (C)
14	56,7 (CH)	56,8 (CH)	56,8 (CH)	56,8 (CH)	56,7 (CH)	56,7 (CH)
15	24,3 (CH ₂)	24,3 (CH ₂)	24,3 (CH ₂)	24,3 (CH ₂)	24,3 (CH ₂)	24,3 (CH ₂)
16	28,2 (CH ₂)	28,3 (CH ₂)	28,2 (CH ₂)	28,3 (CH ₂)	28,2 (CH ₂)	28,3 (CH ₂)
17	56,0 (CH)	56,0 (CH)	55,9 (CH)	55,9 (CH)	56,0 (CH)	56,0 (CH)
18	11,8 (CH ₃)	11,8 (CH ₃)	11,8 (CH ₃)	11,8 (CH ₃)	11,8 (CH ₃)	11,9 (CH ₃)
19	19,3 (CH ₃)	19,8 (CH ₃)	19,3 (CH ₃)	19,4 (CH ₃)	19,3 (CH ₃)	19,8 (CH ₃)
20	36,1 (CH)	36,1 (CH)	40,5 (CH)	40,5 (CH)	36,1 (CH)	36,1 (CH)
21	19,03 (CH ₃)	19,4 (CH ₃)	21,2 (CH ₃)	21,2 (CH ₃)	18,9 (CH ₃)	18,9 (CH ₃)
22	33,9 (CH ₂)	33,7 (CH ₂)	138,4 (CH)	138,3 (CH)	33,6 (CH ₂)	33,9 (CH ₂)
23	39,1 (CH ₂)	38,1 (CH ₂)	129,3 (CH)	129,2 (CH)	28,9(CH ₂)	28,9 (CH ₂)
24	45,8 (CH)	45,8 (CH)	51,2 (CH)	51,2 (CH)	56,1 (CH)	56,0 (CH)
25	26,0 (CH)	26,0 (CH)	31,9 (CH)	31,9 (CH)	29,7 (CH)	29,1 (CH)
26	18,7 (CH ₃)	18,8 (CH ₃)	19,0 (CH ₃)	19,0 (CH ₃)	18,7 (CH ₃)	18,8 (CH ₃)
27	19,8 (CH ₃)	19,4 (CH ₃)	19,0 (CH ₃)	19,0 (CH ₃)	19,8 (CH ₃)	20,0 (CH ₃)
28	23,0 (CH ₃)	23,0 (CH ₃)	25,4 (CH ₃)	25,4 (CH ₃)	18,2 (CH ₃)	18,8 (CH ₃)
29	11,9 (CH ₃)	12,0 (CH ₃)	12,2 (CH ₃)	12,3 (CH ₃)	-	-

^a(δ -ppm; 50,3MHz; CDCl₃); ^b(δ -ppm; 75,5 MHz; CDCl₃)

5.5 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE S9



A substância **S9** (5,1mg) foi isolada da fração acetato de etila sob a forma de um sólido branco solúvel em metanol, sendo que a faixa de fusão para a amostra foi observada entre 265,1 e 267,4 °C.

O espectro de RMN de ^1H (**Figuras 60 e 61**) evidenciou para **S9**, assim como para os compostos **S1**, **S2** e **S3**, a presença de sinais indicativos de esqueleto esteroidal, como o duplete em δ_{H} 5,33 (5,4 Hz) referente ao hidrogênio vinílico H-6, assim como os sinais característicos de hidrogênios metílicos (H-18, 19, 21, 26, 27 e 29) na região entre δ_{H} 0,63 e 1,0. Diferentemente dos compostos citados, percebe-se que o sinal do H-3, agora em δ_{H} 3,55 (m), é um pouco mais desblindado que em **S1**, **S2** e **S3** (δ_{H} 3,45), denotando uma possível substituição na posição 3 da estrutura; essa substituição é confirmada pela inserção de sinais na região característica de açúcares entre δ_{H} 3,17 e 3,82, com destaque para os duplos dupletos em δ_{H} 3,69 (12,1; 4,7 Hz) e δ_{H} 3,80 (12,1; 2,9 Hz) referentes ao hidrogênio oximetilênico H-6'; o duplete em δ_{H} 4,35 (7,8 Hz) foi atribuído ao hidrogênio anomérico da unidade glicosídica (H-1') onde a constante de acoplamento evidenciou a configuração β ; esses sinais levam a crer que a unidade glicosídica em questão é a glicose. Dessa forma, acredita-se que **S9** é um esteroide glicosilado.

Figura 60: Espectro de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 300,06MHz) da substância **S9**.

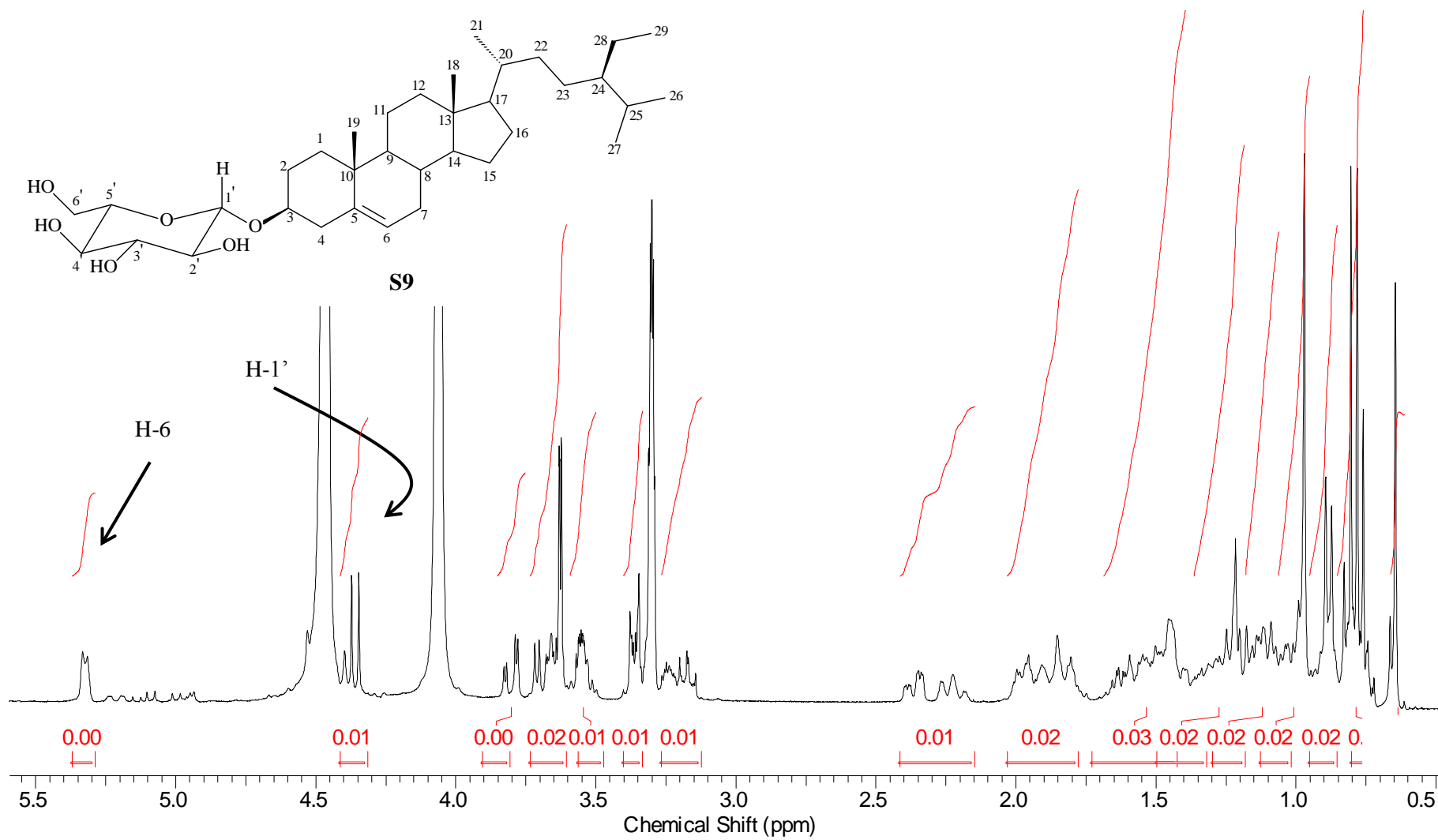
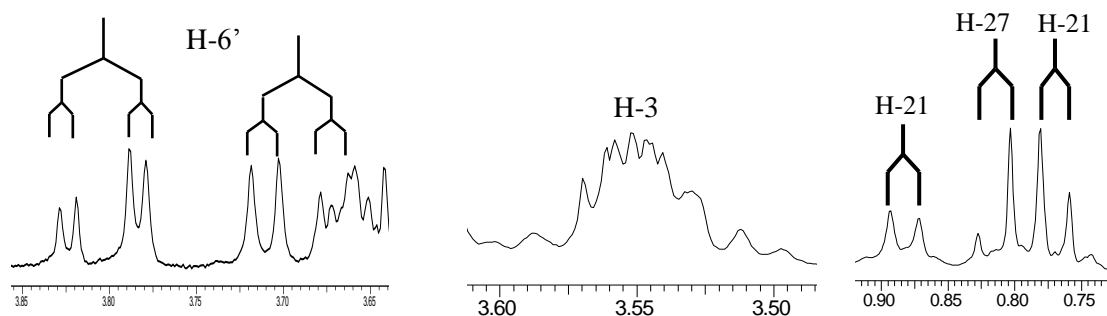


Figura 61: Expansão dos sinais do espectro de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 300,06MHz) da substância **S9**.



O espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (**Figura 62**) também apresentou sinais semelhantes a **S1**, **S2** e **S3**. Os sinais em δ_{C} 122,5 e 140,8 ratificam a presença de uma dupla ligação que abrange carbonos vinílicos C-6 e C-5; os sinais de carbonos metílicos em δ_{C} 12,1 (C-18), 19,6 (C-19), 19,1 (C-21), 19,3 (C-26), 20,1 (C-27) e 12,2 (C-29). Além desses, o carbono carbinólico C-3 de **S9** apresentou um valor de deslocamento químico mais alto (δ_{C} 79,5) do que em **S1**, **S2** e **S3** (δ_{C} 72,0), confirmando a substituição na posição 3 por uma unidade glicosídica; esta, por sua vez, teve seu sinal característico de carbono anomérico (C-1') observado em δ_{C} 101,6 e sinais dos demais carbonos em δ_{C} 74,0 (C-2'), 76,5 (C-3'), 70,6 (C-4'), 77,0 (C-5') e 62,1 (C-6'), indicando que havia a presença de uma glicose na estrutura.

Por todas essas análises, o composto **S9** foi caracterizado como sendo o daucosterol (**55**), sendo que os dados espectrais do mesmo foram concordantes com os da literatura para este esteroide glicosilado (LENDL 2005) (**Tabela 29**). A faixa de fusão para a amostra observada experimentalmente (265,1 - 267,4 °C) foi condizente com a da literatura (287 - 289 °C) (ZHI-MING, 2004) para esse composto.

Figura 62: Espectro de RMN de ^{13}C (a), DEPT 135° (b) e DEPT 90° (c) ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 75,45MHz) de **S9**.

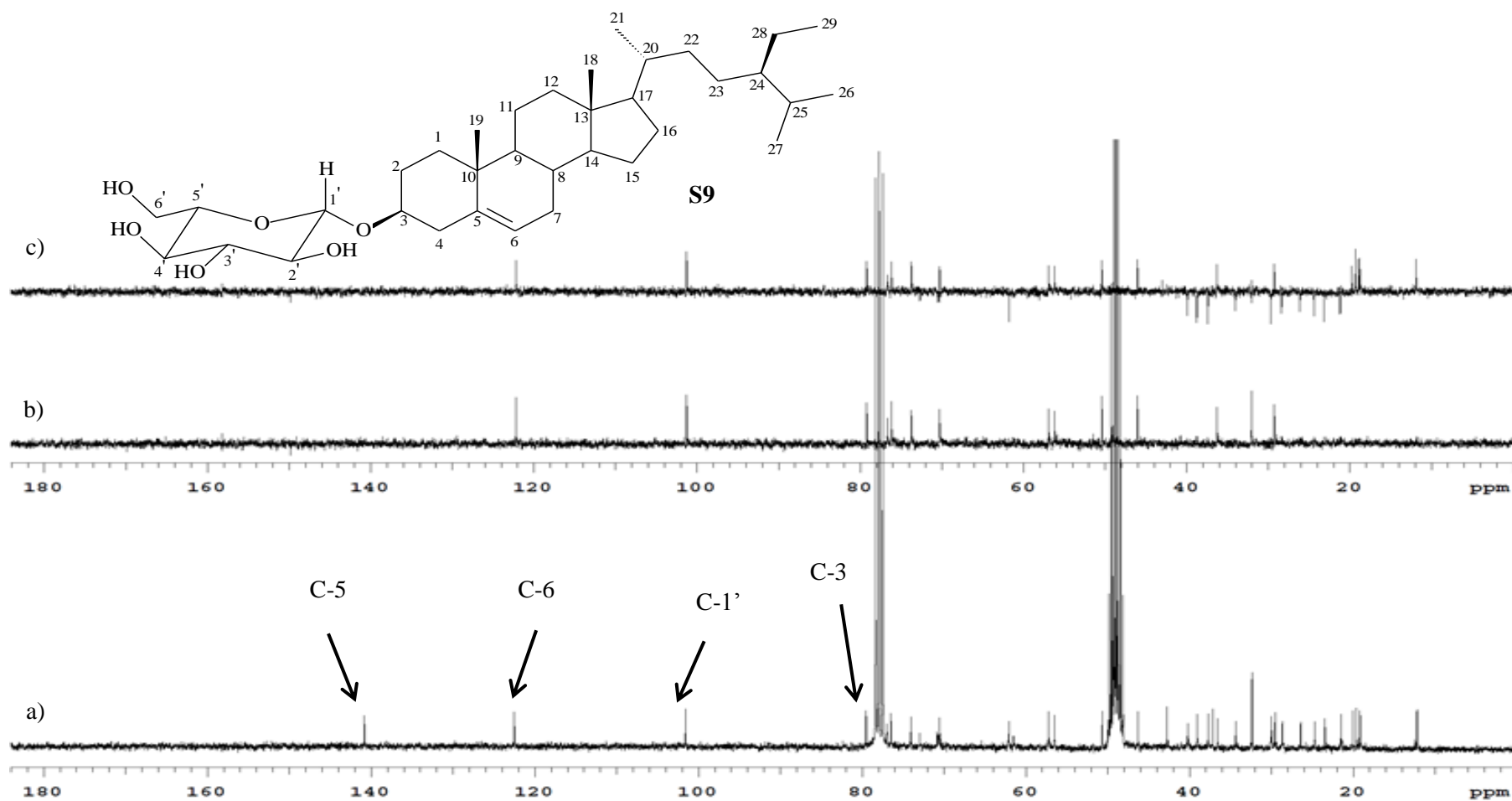


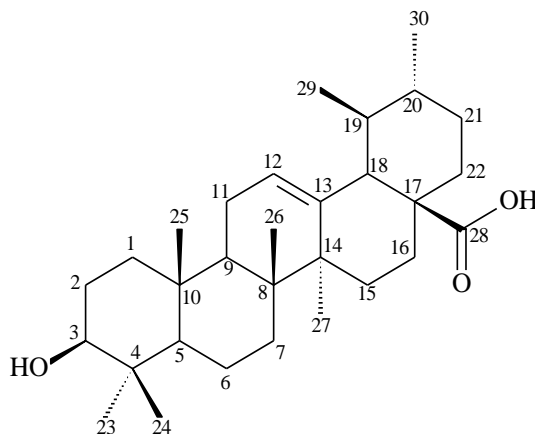
Tabela 29. Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para S9e para o daucosterol.

S9*		Daucosterol**		
C	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C} (DEPT)	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C} (DEPT)
1	1,06 (m)	37,2 (CH ₃)	1,09 (t, 13,0)	36,8 (CH ₃)
	1,84 (m)		1,88 (d, 13,0)	
2	1,51-1,63 (m)	30,0 (CH ₂)	1,57-1,66 (m)	29,0 (CH ₂)
	1,86-1,90 (m)		1,90-1,97 (m)	
3	3,51-3,57 (m)	79,5 (CH)	3,57-3,65 (m)	78,4 (CH)
4	2,17-2,28 (m)	39,0 (CH ₂)	2,24-2,32 (m)	38,1 (CH ₂)
	2,32-2,40 (m)		2,39-2,45 (m)	
5	-	140,8 (C)	-	139,5 (C)
6	5,33 (d; 5,4)	122,5 (CH)	5,36-5,39 (m)	121,4 (CH)
7	1,51-1,56 (m)	32,4 (CH ₂)	1,53-1,59 (m)	31,4 (CH ₂)
	1,92-1,97 (m)		1,95-2,03 (m)	
8	1,37 (m)	32,4 (CH)	1,43-1,50 (m)	31,4 (CH)
9	0,88 (m)	50,7 (CH)	0,90-0,99 (m)	49,7 (CH)
10	-	37,7 (C)	-	36,2 (C)
11	1,41 (m)	21,5 (CH ₂)	1,45-1,55 (m)	20,5 (CH ₂)
12	1,15 (m)	40,2 (CH ₂)	1,19 (t; 11,5)	39,3 (CH ₂)
	1,97-2,00 (m)		2,00-2,06 (m)	
13	-	42,8 (C)	-	41,8 (C)
14	0,96 (m)	57,2 (CH)	0,97-1,07 (m)	56,3 (CH)
15	1,01-1,09 (m)	24,7 (CH)	1,04-1,13 (m)	23,7 (CH)
	1,51-1,62 (m)		1,83-1,90 (m)	
16	1,27-1,35 (m)	28,6 (CH)	1,24-1,32 (m)	27,7 (CH)
	1,80 (m)		1,83-1,90 (m)	
17	1,05 (m)	56,5 (CH)	1,09-1,17 (m)	55,5 (CH)
18	0,67 (s)	12,1 (CH ₃)	0,70 (s)	11,1 (CH ₃)
19	0,97 (s)	19,6 (CH ₃)	1,03 (s)	18,5 (CH ₃)
20	1,35-1,41 (m)	36,6 (CH)	1,34-1,42 (m)	35,6 (CH)
21	0,88 (d, 6,5)	19,1 (CH ₃)	0,94 (d, 6,4)	18,0 (CH ₃)
22	1,08 (m)	34,4 (CH ₂)	1,00-1,07 (m)	33,4 (CH ₂)
	1,33 (m)		1,32-1,39 (m)	
23	1,15-1,17 (m)	26,4 (CH ₂)	1,15-1,22 (m)	25,4 (CH ₂)
24	0,96 (m)	46,3 (CH)	0,91-0,98 (m)	45,4 (CH)
25	1,61-1,67 (m)	29,6 (CH)	1,64-1,72 (m)	28,6 (CH)
26	0,77 (d, 6,7)	19,3 (CH ₃)	0,83 (d, 6,5)	18,1 (CH ₃)
27	0,82 (d, 6,9)	20,1 (CH ₃)	0,85 (d, 6,5)	18,9 (CH ₃)
28	1,29 (m)	23,5 (CH ₂)	1,21-1,32 (m)	22,5 (CH ₂)
29	0,88 (m)	12,2 (CH ₃)	0,86 (t, 8,3)	11,1 (CH ₃)
1'	4,35 (d, 7,8)	101,6 (CH)	4,41 (d, 7,8)	100,6 (CH)
2'	3,17 (m)	74,0 (CH)	3,22 (t, 8,3)	73,1 (CH)
3'	3,35 (m)	76,5 (CH)	3,38-3,44 (m)	76,1 (CH)
4'	3,33 (m)	70,6 (CH)	3,35-3,42 (m)	69,7 (CH)
5'	3,25 (m)	77,0 (CH)	3,27-3,31 (m)	75,6 (CH)
6'	3,69 (dd, 4,7; 12,0)	62,1 (CH ₂)	3,73 (dd, 5,1; 12,0)	61,1 (CH ₂)
	3,80 (dd, 2,9; 12,0)		3,86 (dd, 2,6; 12,0)	

*(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CDCl₃/CD₃OD); **(δ -ppm; 400 e 100 MHz; CDCl₃/CD₃OD)

Segundo GALLOTA (2005), o daucosterol é significativamente citotóxico frente à *Artemia salina*, também apresentando atividade imunomoduladora, protegendo contra a disseminação da candidíase em camundongos (LEE, 2007).

5.6 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE S5



S5

A substância **S5** foi isolada duas vezes em mistura da fração acetato de etila (A4 - 7,2 mg e A6.1 - 2,5 mg) como um sólido branco solúvel em clorofórmio, cujo ponto de fusão teve sua faixa entre 253,2 e 256,3 °C.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 63e 64**) evidenciou a presença de sinais indicativos de mistura de triterpenos devido a presença de um aglomerado de sinais entre δ_{H} 5,28 e δ_{H} 5,34 referentes aos hidrogênios vinílicos H-12 das substâncias, sendo que foram observadas várias constantes de acoplamento de 3,6 Hz típico destes hidrogênios (GUVENALP, 2006); além disso foram vistos sinais típicos de hidrogênios metílicos na região entre δ_{H} 0,65 a 1,30 ppm, podendo ser destacados os dupletos em δ_{H} 1,05 ($J=6,4\text{Hz}$) e δ_{H} 0,76 ($J=5,9\text{Hz}$) atribuídos aos hidrogênios H-29 e H-30 de **S5**, indicando que um dos componentes da mistura pertence à classe dos ursanos.

Figura 63:Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300,06MHz) da substância **S5**.

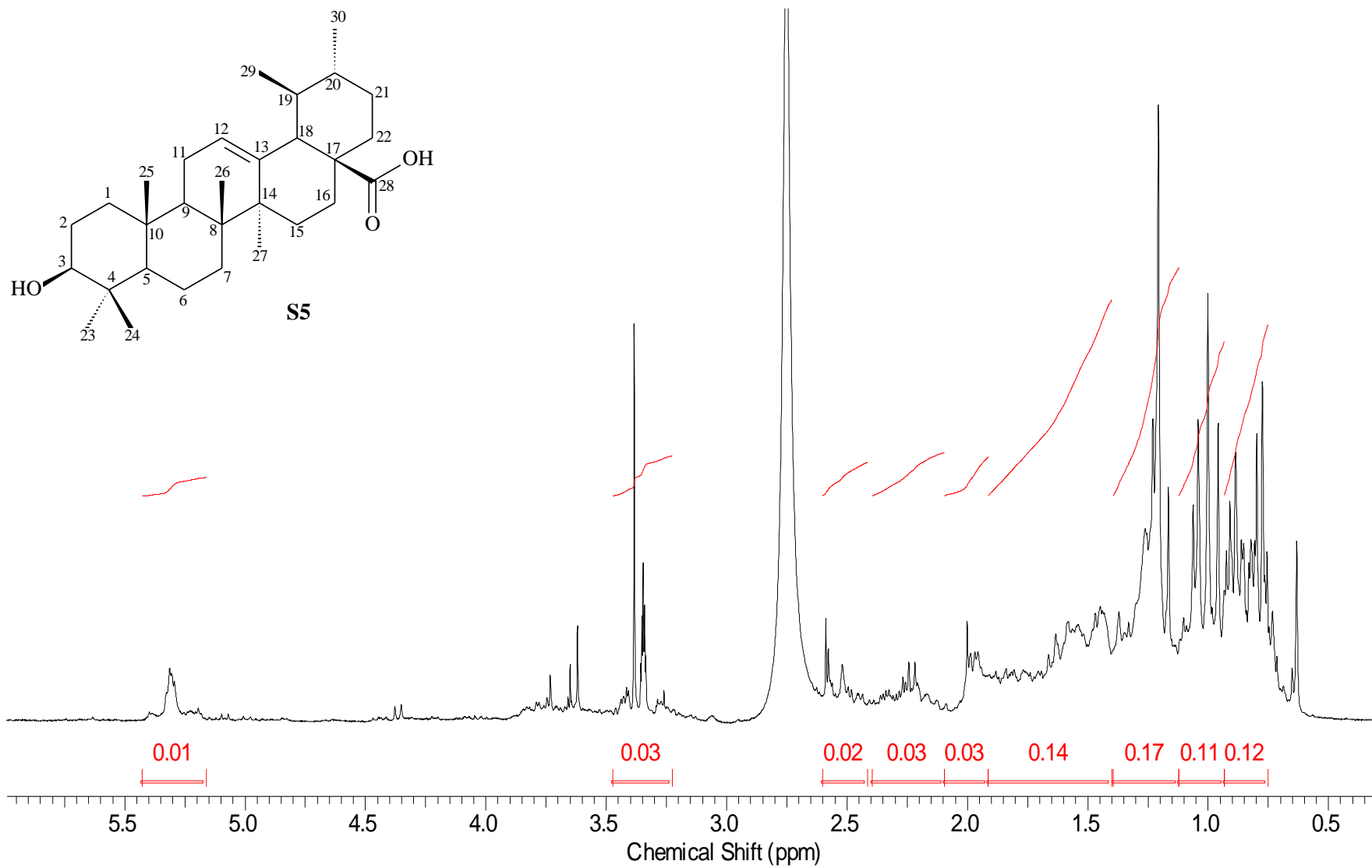
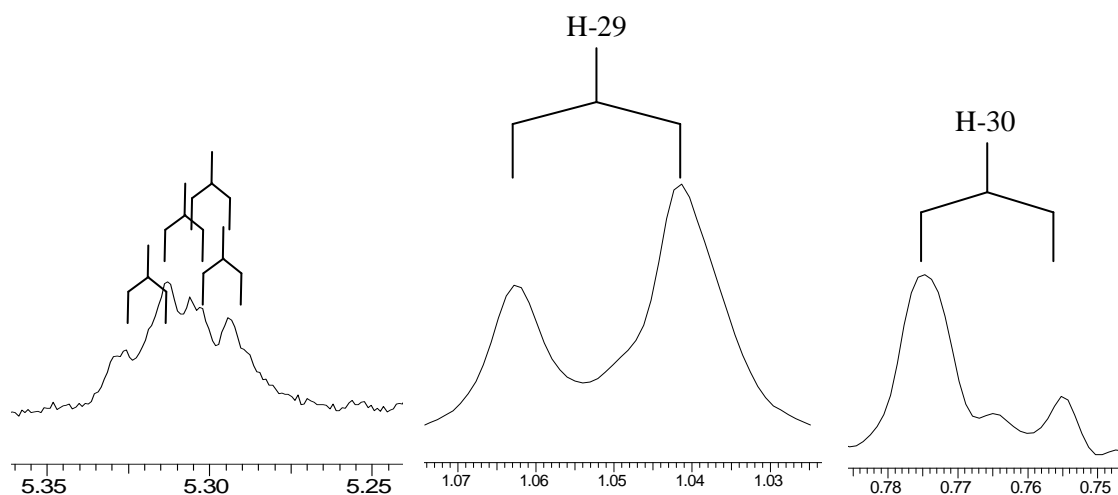


Figura 64: Expansão dos sinais do espectro de ^1H (CDCl_3 ; 300,06MHz) da substância **S5**.



Para a substância **S5**, no espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (**Figura 65 e 66**) foram observados sinais de carbonos de dupla ligação em $\delta_{\text{C}}121,8$ (C-12) e $138,4$ (C-13) e de um carbono carboxílico em $\delta_{\text{C}}181,0$ (C-28); estes sinais, associados aos dados de RMN de ^1H , confirmam que um dos componentes da mistura pertence à classe dos ursanos.

Figura 65: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 75,45MHz) da substância **S5**.

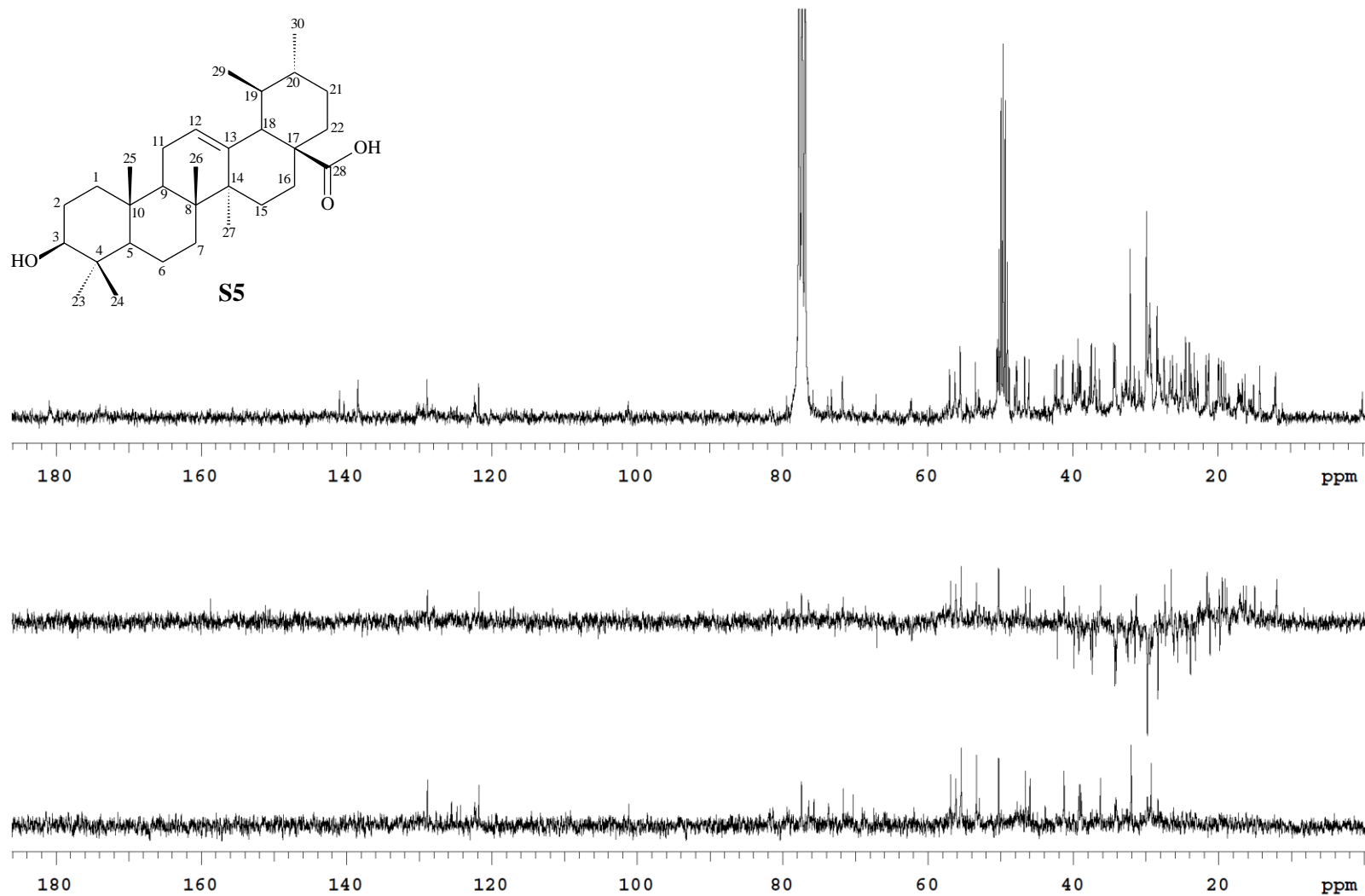
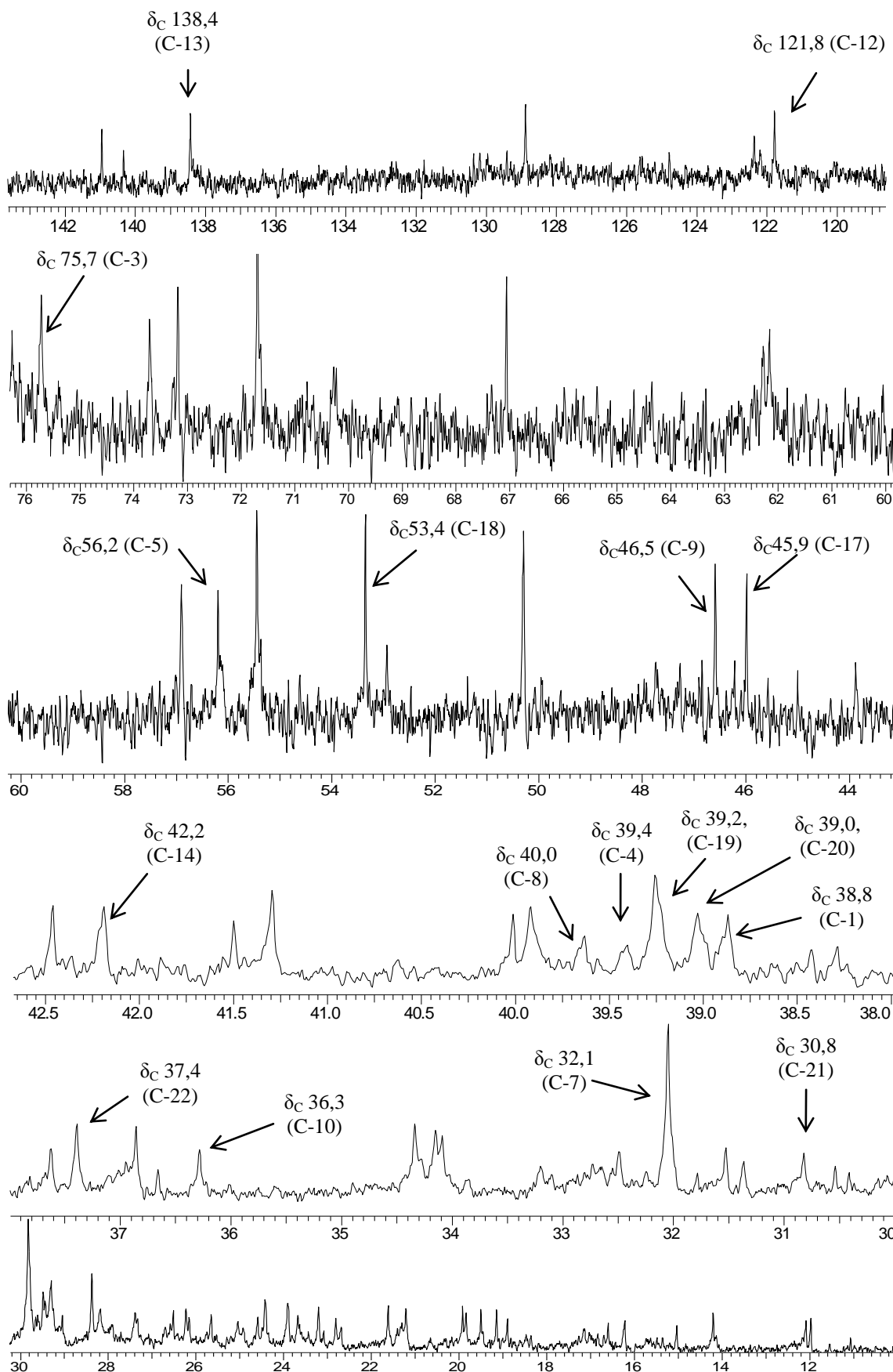


Figura 66: Expansões dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 75,45MHz) da substância **S5**.



A partir desses dados e por comparação dos valores com os encontrados na literatura para triterpenos (SEEBACHER, 2003) concluiu-se que **S5** é o ácido ursólico, conforme a **Tabela 30**. A faixa de ponto de fusão obtida experimentalmente (252,3 a 256,3 °C) foi condizente com o valor observado na literatura (269,1 °C) (SILVA, 2010).

Tabela 30: Dados de RMN de ^{13}C para a substância S5 e para o ácido ursólico.

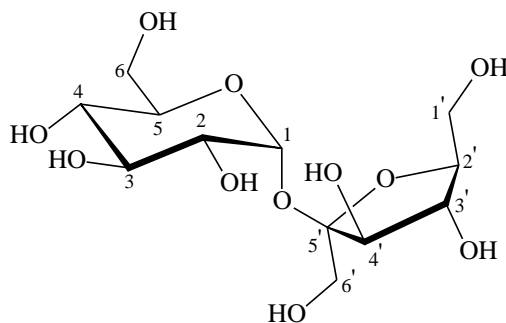
Ácido ursólico**		S5*	Ácido ursólico**		S5*
C	δ_c (DEPT)	δ_c (DEPT)	C	δ_c (DEPT)	δ_c (DEPT)
1	39,2 (CH ₂)	38,8 (CH ₂)	16	24,3 (CH ₂)	23,9 [†] (CH ₂)
2	28,2 (CH ₂)	29,8 (CH ₂)	17	48,1 (C)	45,9 [†] (C)
3	78,2 (CH)	75,7 (CH)	18	52,8 (CH)	53,4 (CH)
4	39,6 (C)	39,4 (C)	19	39,5 (CH)	39,2 (CH)
5	55,9 (CH)	56,2 (CH)	20	39,4 (CH)	39,0 (CH)
6	18,8 (CH ₂)	19,8 (CH ₂)	21	31,1 (CH ₂)	30,8 (CH ₂)
7	33,7 (CH ₂)	32,1 (CH ₂)	22	37,4 (CH ₂)	37,4 (CH ₂)
8	40,1 (C)	39,6 (C)	23	28,8 (CH ₃)	28,3 (CH ₃)
9	48,1 (CH)	46,5 [†] (CH)	24	16,5 (CH ₃)	16,2 (CH ₃)
10	37,5 (C)	36,2 (C)	25	15,7 (CH ₃)	15,0 (CH ₃)
11	23,7 (CH ₂)	23,2 (CH ₂)	26	17,5 (CH ₃)	16,8 (CH ₃)
12	125,7(CH)	121,8(CH)	27	24,0 (CH ₃)	24,4 (CH ₃)
13	139,3 (C)	138,4 (C)	28	179,7 (C)	181,0 (C)
14	42,6 (C)	42,2 [†] (C)	29	17,5 (CH ₃)	15,0 (CH ₃)
15	28,2 (CH ₂)	28,3 (CH ₂)	30	21,4 (CH ₃)	21,2 (CH ₃)

*(δ -ppm; 75,5MHz, CDCl₃); **(δ -ppm; 150,0MHz, Piridina-d₆)

Este é o primeiro relato do isolamento de ácido ursólico em espécies do gênero *Sabicea*, sendo que o mesmo foi isolado anteriormente de *Duroia macrophylla*, que pertence à subfamília Ixoroideae (MARTINS, 2013).

Para o ácido ursólico, inúmeros relatos de atividade antitumoral in vitro têm aparecido na literatura (NOVOTNY, 2001) e estudos buscam desvendar possíveis mecanismos de ação para a inibição do tumor (NETO, 2007); além disso, apresenta também atividades antiedematogênica e anti-inflamatória (OVESNA, 2004 e BANNO, 2004).

5.7 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE S10.



S10

A substância **S10**(313,2 mg) se apresentou sob a forma de um sólido amarelo solúvel em metanol.

Na análise do espectro de RMN de ^1H (**Figura 67**), verificaram-se sinais na região de açúcar entre δ_{H} 3,2 e 4,0, assim como o duplete atribuído ao hidrogênio anomérico H-1 em δ_{H} 5,14 com $J=3,9$ Hz, característico de sacarose.

No espectro de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (**Figuras 68 e 69**) foram ressaltados 12 sinais de carbono, sendo que o sinal do carbono anomérico C-1 da unidade α -D-glicose foi observado em δ_{C} 93,7, assim como sinais dos carbonos oximetínicos em δ_{C} 72,8 (C-2), δ_{C} 74,7 (C-3), δ_{C} 71,0 (C-4) e δ_{C} 71,6 (C-5) e do carbono oximetilênico em δ_{C} 62,5 (C-6) típicos desta unidade. O sinal do carbono anomérico da unidade β -D-frutose foi observado em δ_{C} 83,0 (C-5'); os carbonos oximetínicos apareceram em δ_{C} 103,0 (C-2'), δ_{C} 76,5 (C-3'), δ_{C} 69,2 (C-4') e os carbonos oximetilênicos em δ_{C} 62,4 (C-1') e δ_{C} 62,6 (C-6') característicos desta unidade.

Os dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C foram comparados com os registrados na literatura (**Tabela 31**) para o dissacarídeo α -D-glicopiranosil- β -D-frutofuranosídeo, conhecido como sacarose e se mostraram concordantes (MOLCELINI, 2009).

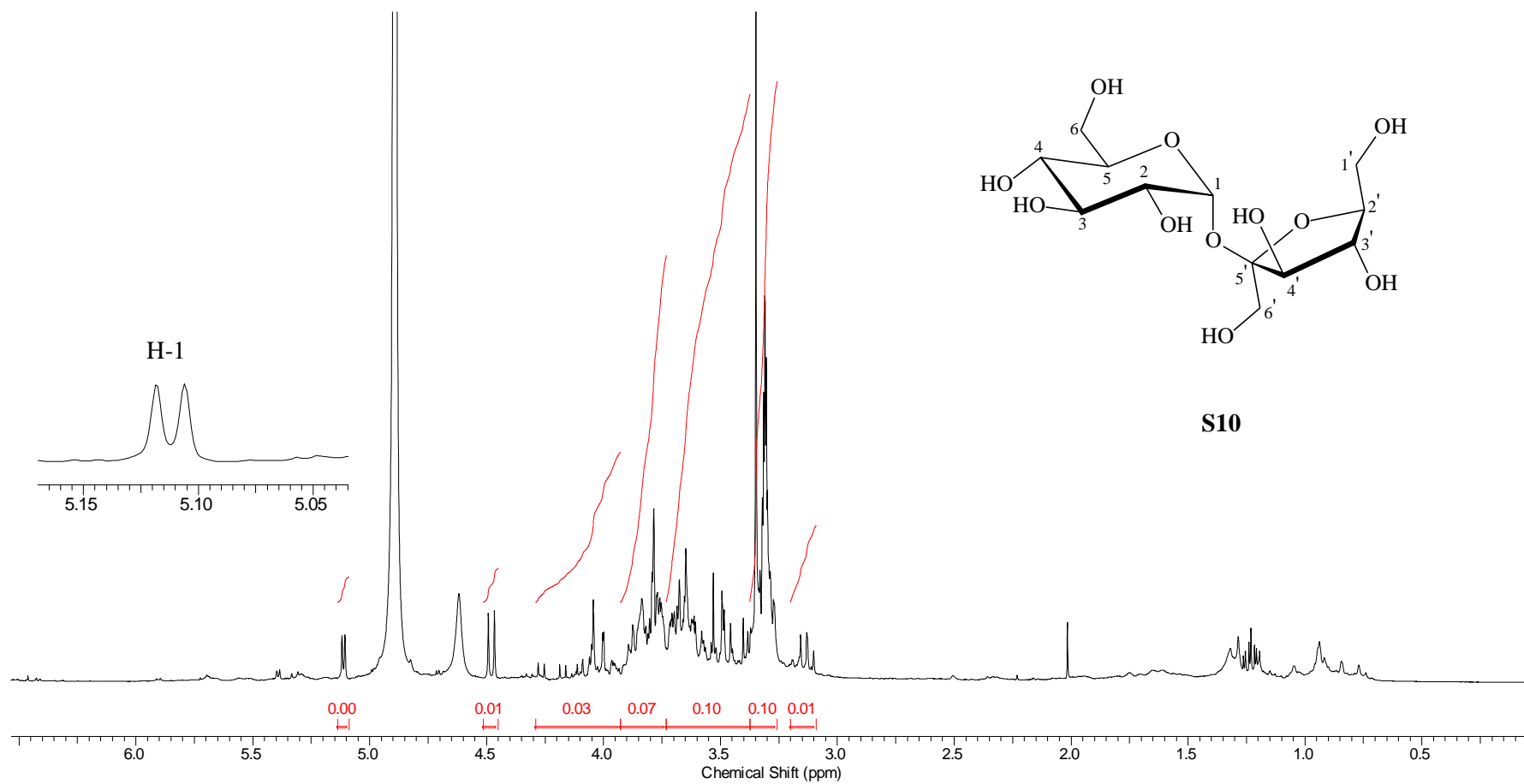
Figura 67: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) da substância **S10**

Figura 68: Espectro de RMN de ^{13}C (a), DEPT 135° (b) e DEPT 90° (c) (CD_3OD ; 75,45 MHz) da substância **S10**.

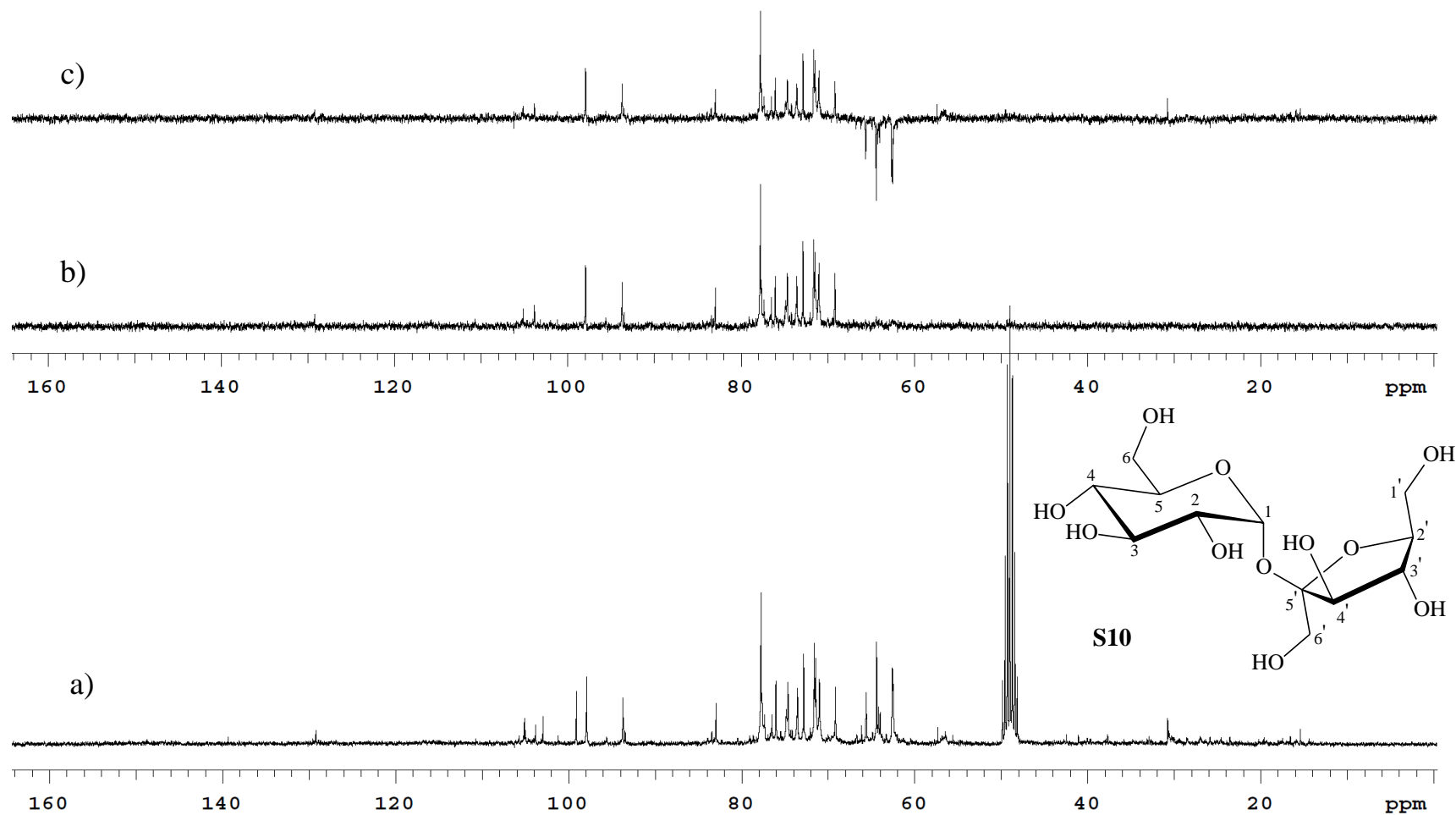


Figura 69: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (a), DEPT 135° (b) e DEPT 90° (c) (CD_3OD ; 75,45 MHz) da substância **S10**.

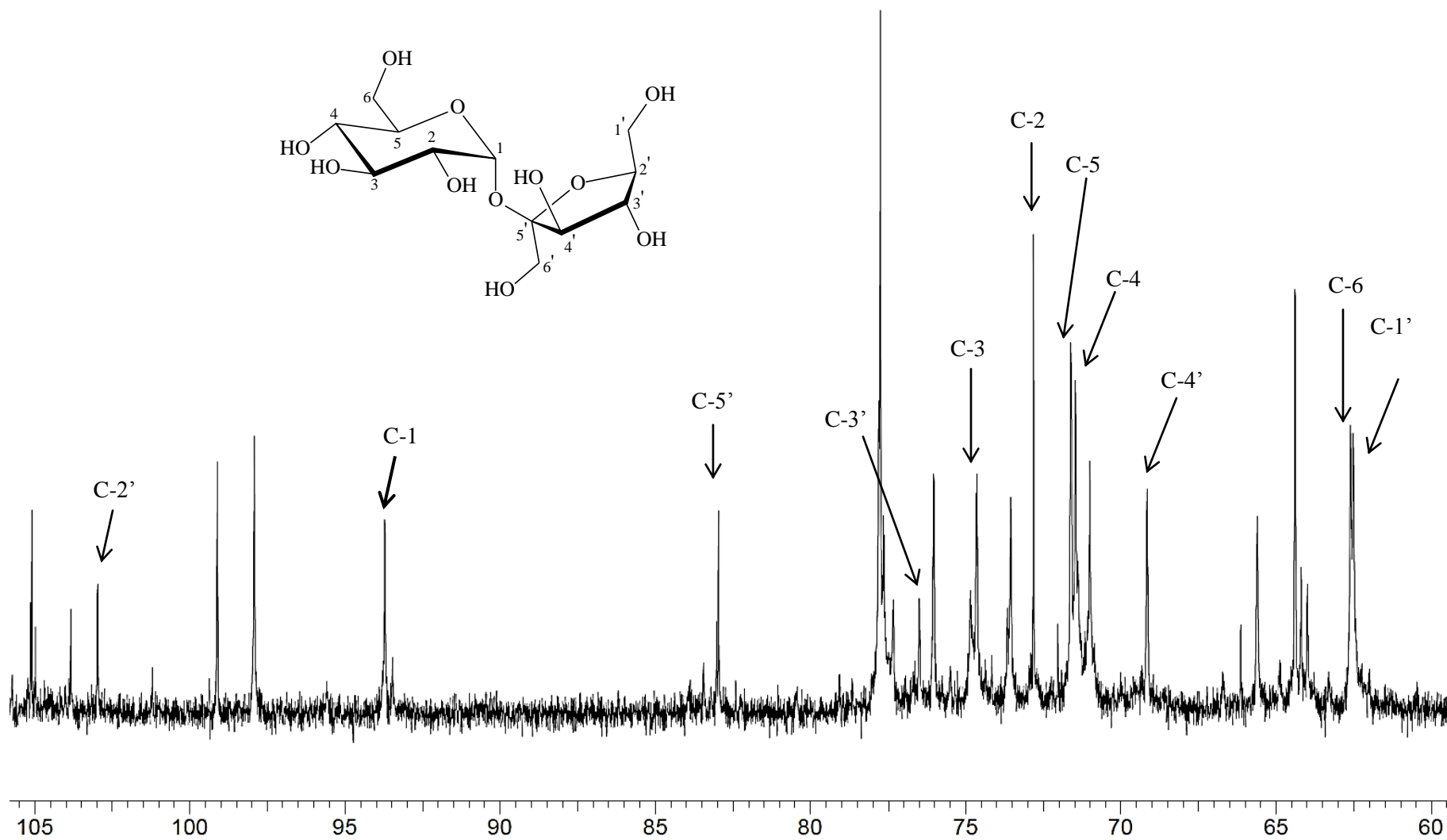


Tabela 31: Dados de RMN de ^{13}C /DEPT de S10e da Sacarose.

	Sacarose*	S10**
C	δ_{C} (DEPT)	δ_{C}
D-glicose		
1	92,2 (CH)	93,7 (CH)
2	72,5 (CH)	72,8 (CH)
3	74,1 (CH)	74,7 (CH)
4	71,2 (CH)	71,0 (CH)
5	72,7 (CH)	71,6 (CH)
6	61,5 (CH ₂)	62,5 (CH ₂)
D-frutose		
1'	60,3 (CH ₂)	62,4 (CH ₂)
2'	103,7 (CH)	103,0 (CH)
3'	76,5 (CH)	76,5 (CH)
4'	69,4 (CH)	69,2 (CH)
5'	81,5 (C)	83,0 (CH)
6'	62,6 (CH ₂)	62,6 (CH ₂)

*(δ -ppm; 75 ,45 MHz; D₃O); **(δ -ppm; 75 ,45 MHz; CD₃OD)

A coluna SBB', de onde foi isolada a substância **S10**, apresentou uma baixa recuperação da amostra após o procedimento (37,3 %), pois, sendo a fração butanólica uma fração bastante polar, o contato da mesma com a sílica resultou em uma adsorção irreversível da amostra na fase estacionária, sendo que os solventes utilizados não foram polares o suficiente para eluir os compostos.

Durante o estudo da fração butanólica, a presença de sacarose nas amostras era recorrente, estando este açúcar presente em grande porcentagem, o que impossibilitou o isolamento de demais constituintes químicos nesta fração.

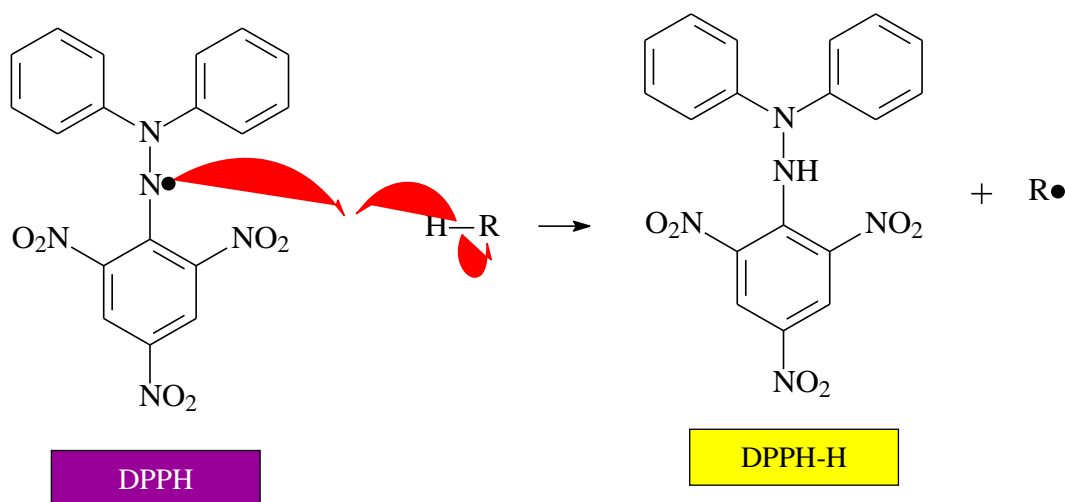
Sobre a sacarose, esta foi identificada como uma das substâncias com atividade nematicida presente no bulbo da cebola (*Allium cepa*), sendo ativa contra *Meloidogyne exigua*, um dos fitonematóides mais disseminados pelos cafezais brasileiros e que traz grandes prejuízos (OLIVEIRA, 2007).

5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para a avaliação da atividade sequestradora de radicais livres foi utilizado o radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Como pode ser observado na

reação apresentada na **Figura 70**, ao ser colocado em contato com uma amostra ou substância antioxidante, representada por H-R, o DPPH, que possui coloração violeta, retira um átomo de hidrogênio desta substância via reação radicalar, tornando-se 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH-H) que, por sua vez, tem coloração amarela (GRESSLER, 2010). Um maior descoramento da solução indica um maior potencial da substância estudada em perder seu átomo de hidrogênio sendo, portanto, mais propensa a ter potencial antioxidante.

Figura 70: Estabilização do radical livre DPPH.



O descoramento do DPPH é monitorado por um espectrofotômetro UV-Visível a 515,5 nm. A partir dos valores de absorvância, foi possível calcular a porcentagem de inibição do radical livre estável (DPPH). As porcentagens de inibição versus a concentração de 10, 30, 50, 100, 150, 300 e 400 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato bruto e frações foram plotados para a obtenção de valores de concentração necessária para um decréscimo de 50% da concentração inicial de radicais livres e também para a obtenção dos limites de confiança, como mostram as **Figuras 71e72**.

Figura 71: Atividade antioxidante do extrato bruto de *Sabicea brasiliensis*.

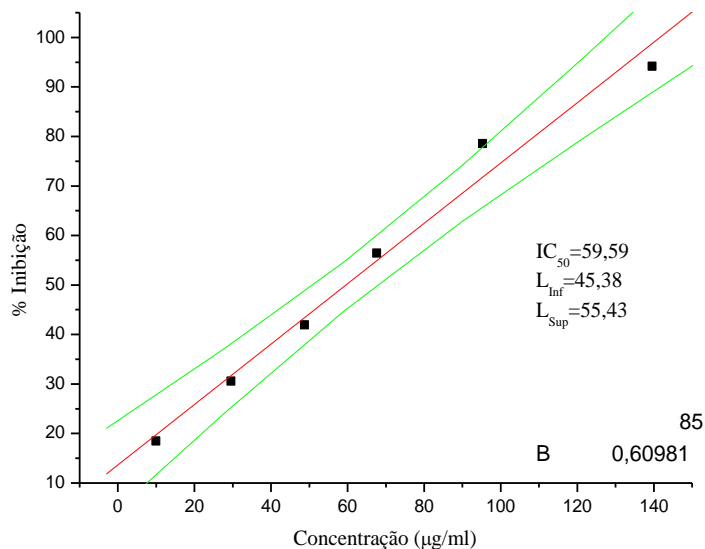
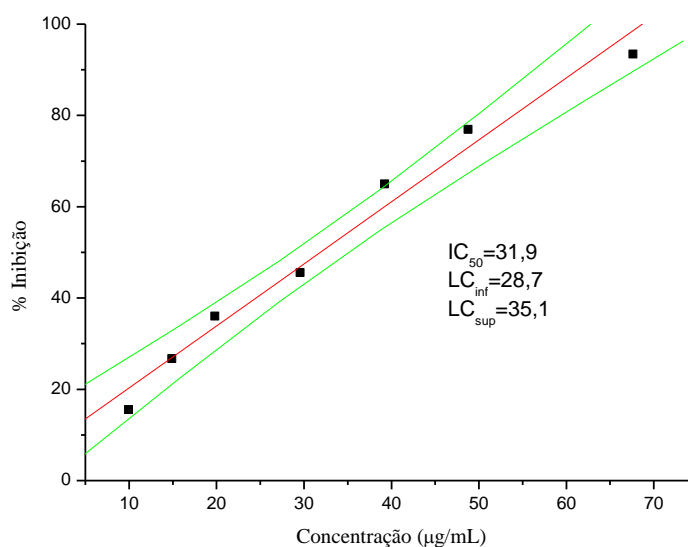


Figura 72: Atividade antioxidante da fração Acetato de Etilade *Sabicea brasiliensis*.



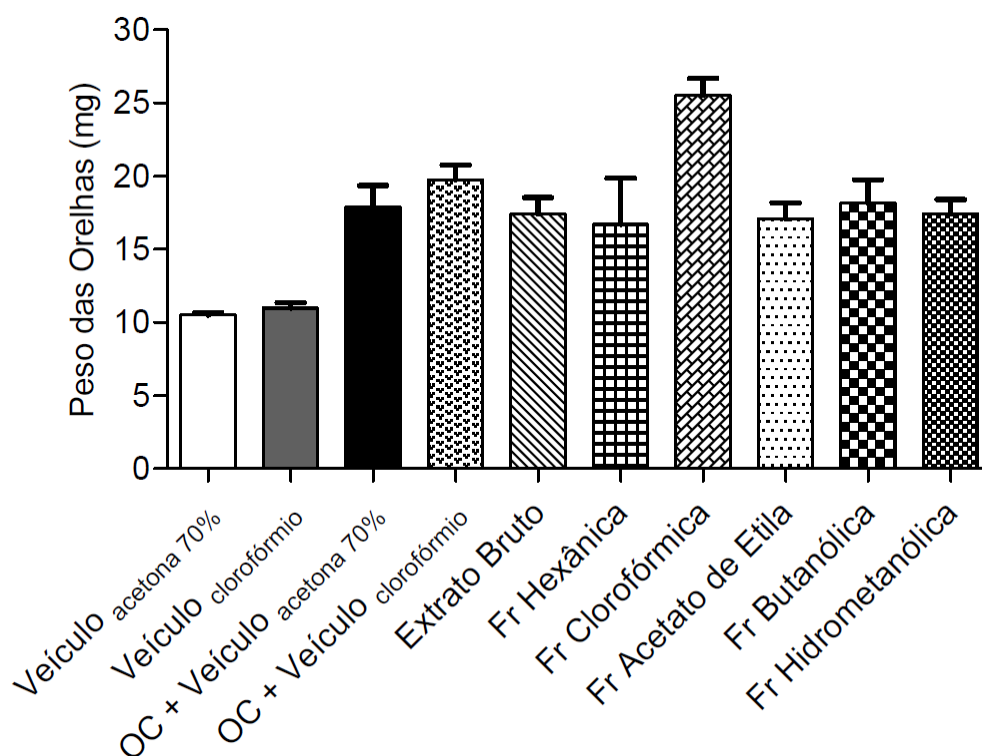
Comparando-se os valores de IC_{50} do extrato bruto (59,6 $\mu\text{g/mL}$) e da fração acetato de etila (31,9 $\mu\text{g/mL}$) com o do padrão BHT (16,9 $\mu\text{g/mL}$), percebe-se que o efeito antioxidante é efetivo nas duas amostras, sendo mais pronunciado na fração acetato de etila, provavelmente devido à presença nessa fração dos ácidos 5-*O*-cafeoilquinico e 3,5, que apresentam esse tipo de potencial (KAYANO, 2002;

SATAKE, 2007). As demais frações apresentaram IC_{50} superior a 100 $\mu\text{g/mL}$, mostrando-se inativas em comparação com o BHT (OLIVEIRA, 2008).

5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

5.9.1 TESTE ANTIEDEMATOGÊNICO

Figura 73: Edema de orelha induzido pelo Óleo de Cróton (OC) (200mg) em camundongos Swiss, machos (30-40 g). A acetona 70%, o clorofórmio, o extrato bruto, as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, butanólica e hidrometanólica (5 mg/orelha) foram aplicadas topicamente, após a aplicação do Óleo de Cróton (20 ml/orelha). A acetona 70% e o clorofórmio foram utilizados como veículo (20ml/orelha). Cada barra representa o peso médio das orelhas \pm E.P.M., 6 h após aplicação do Óleo de Cróton. (ANOVA, seguido do teste de Tukey).



A aplicação de óleo de cróton (OC) na orelha esquerda de camundongos induziu uma resposta inflamatória bastante evidente na sexta hora. Como observado na **Figura 73**, o peso da orelha praticamente dobrou quando comparada à orelha direita (veículo, sem aplicação do óleo de cróton). Considerando que o extrato bruto (EB) e as frações hexânica (SBH) e clorofórmica (SBC) foram solubilizadas em clorofórmio e que nas demais frações (SBA, SBB e SBHM) foi utilizada acetona, pode-se observar que O EB e as frações SBH, SBA, SBB e SBHM (5,0 mg/orelha) não interferiram no desenvolvimento da resposta. Sobre a fração clorofórmica, pode-se dizer que a mesma

aumentou a inflamação quando comparada com o grupo de animais que recebeu somente o OC.

5.9.2 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

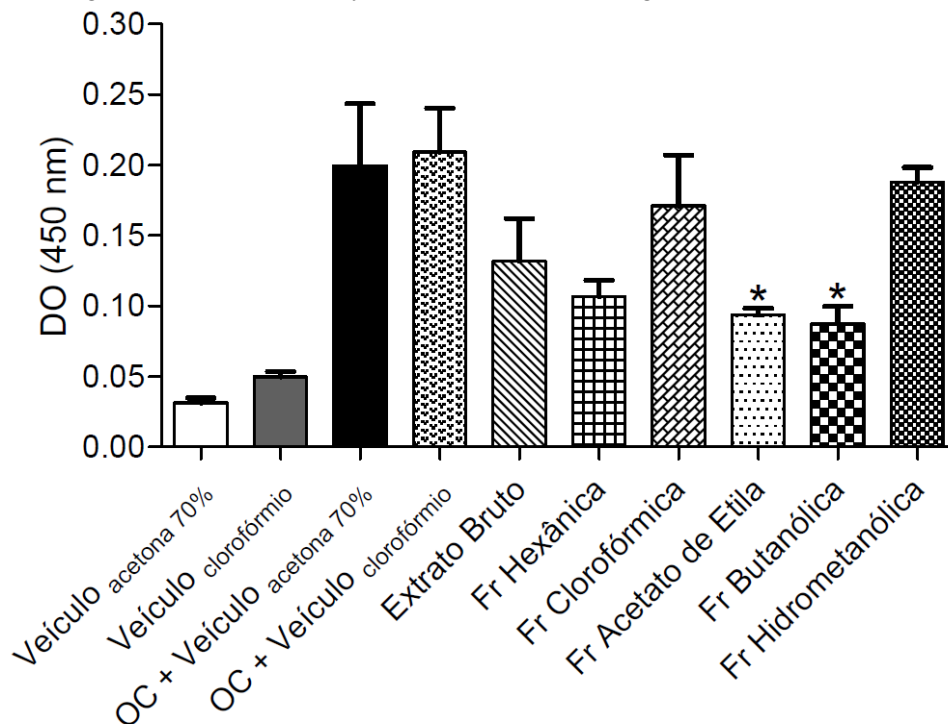
A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima derivada de leucócitos que catalisa a formação de numerosas espécies reativas oxidantes (ROMAN, 2008). Esta enzima é considerada uma macromolécula-chave na resposta imunológica inespecífica a muitos agentes invasores, especialmente bactérias. A MPO é responsável pela conversão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânions cloreto em água e ácido hipocloroso (HOCl) que, por sua vez, atua como um forte agente antimicrobiano (REGASINI, 2008); dessa forma, uma maior atividade observada na enzima mieloperoxidase indica a migração de células polimorfonucleares para o local inflamado (IGNOATO, 2012)

Contudo, o excesso da atividade de MPO e produção exagerada de HOCl culmina em um intenso estresse oxidativo para os leucócitos, causando danos ao DNA, proteínas e lipídios (FERREIRA, 2007). A literatura correlaciona essa injúria oxidativa promovida por MPO e HOCl com inúmeros processos inflamatórios, tais como artrite reumatóide, fibrose cística, doença inflamatória intestinal (IBD), injúria pulmonar neonatal, etc. Dessa forma, a busca por inibidores de MPO a partir de fontes naturais torna-se de essencial na descoberta de novos agentes anti-inflamatórios (REGASINI, 2008)

Sendo assim o extrato bruto metanólico e as frações hexânica (SBH), clorofórmica (SBC), acetato de etila (SBA), butanólica (SBB) e hidrometanólica (SBHM) foram avaliados quanto à sua capacidade de inibição sobre mieloperoxidase.

A aplicação do óleo de cróton induziu um aumento na ordem de 20 vezes na atividade da MPO na 6ª hora após a aplicação do estímulo (**Figura 74**). A aplicação do extrato bruto e das frações SBH, SBC e SBHM não interferiram na atividade da mieloperoxidase. Porém, um aumento na atividade da MPO foi observado no grupo OC, mas não no grupo tratado com as frações SBH, SBA e SBB, sugerindo o efeito inibitório destas frações sobre o recrutamento de neutrófilos. Desta forma pode-se considerar que as frações hexânica, acetato de etila e butanólica das raízes de *Sabicea brasiliensis* apresentaram uma atividade anti-inflamatória significativa no modelo de migração celular.

Figura 74: Atividade da MPO no tecido das orelhas de camundongos Swiss, machos (30-40 g). Os animais foram tratados por via tópica com os veículos (acetona/água e clorofórmio), o extrato bruto, as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, butanólica e hidrometanólica (5mg/orelha), imediatamente após a aplicação do óleo de cróton (OC). Outro grupo recebeu apenas a aplicação dos veículos (acetona/água e clorofórmio). Cada coluna representa a atividade média da MPO \pm E.P.M. * $P < 0.05$ comparado ao grupo OC+Veículo acetona/água (ANOVA, seguida do teste de Tukey, com 5% de nível de significância).



Em se tratando da fração acetato de etila, os compostos isolados podem justificar o efeito observado, visto que as propriedades anti-inflamatórias são descritas na literatura para ácido ursólico (OVESNA, 2004 e BANNO, 2004), ácido 5-*O*-cafeoilquínico (TATEFUJI, 1996) e ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico (SANTOS, 2010), ao passo que a fração butanólica permitiu o isolamento do ácido 5-*O*-cafeoilquínico, com tal atividade.

6 CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico das raízes da espécie vegetal *Sabicea brasiliensis* resultou no isolamento de 10 substâncias. Da fração hexânica foram isolados os esteroides sitosterol, estigmasterol e campesterol. Analisando-se a fração clorofórmica, percebeu-se a presença dos mesmos esteroides, além da cumarina escopoletina. O triterpeno ácido ursólico, o esteroide glicosilado daucosterol, o ácidos 5-*O*-dicafeoilquínico, 3,5 e 4,5-*O*-dicafeoilquínico foram isolados da fração acetato de etila. Com farta presença na fração

butanólica, o dissacarídeo sacarose foi isolado da mesma, além do ácido 5-*O*-dicafeoilquínico. Todos esses compostos são inéditos no gênero *Sabicea* na tribo Sabiceae, com exceção do sitosterol, que já foi isolado das folhas de *Sabicea brasiliensis*. Na subfamília Ixoroideae há relatos do isolamento da escopoletina de *Augusta longifolia*, do ácido 5-*O*-cafeoilquínico e ácidos 3,5- e 4,5-*O*-dicafeoilquínico de *Coffea arabica*, além do triterpeno ácido ursólico de *Duroiamacrophylla*.

No teste do potencial antioxidante, o extrato bruto e a fração acetato de etila exibiram bom efeito, sendo mais efetivo na fração acetato de etila, provavelmente devido à presença dos ácidos 5-*O*-cafeoilquínico, 3,5- e 4,5-*O*-dicafeoilquínicos, que apresentassem tipo de potencial descrito na literatura.

Ao serem avaliadas quanto a sua atividade anti-dematogênica, nem o extrato bruto nem as frações mostraram potencial neste ensaio, porém ao serem submetidos à avaliação da capacidade de inibição sobre mieloperoxidase, pode-se dizer que as frações acetato de etila e butanólica apresentaram atividade anti-inflamatória significativa no modelo de migração celular. A atividade anti-inflamatória dos ácidos 5-*O*-cafeoilquínico e 4,5-*O*-dicafeoilquínico e do ácido ursólico são descritos na literatura e a presença destes nas raízes de *S. brasiliensis* contribuiu para a atividade observada nas frações acetato de etila e butanólica no modelo de migração celular. O isolamento destes compostos nesta espécie pode embasar o uso popular da mesma no tratamento de infecções nos órgãos genitais de mulheres.

7 REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.; EFFERTH, T.; BAUER, R. Activity-Guided Isolation of Scopoletin and Isoscapoletin, the Inhibitory Active Principles Towards Ccrf-Cem Leukaemia Cells and Multi-Drug Resistant Cem/Adr5000 Cells, From *Artenisia Argyi*. *Planta Medica*, 72, 862-869, 2006.
- ALMEIDA, M. G.; RIGONATO, V. D.; “Cultura, conhecimento popular e uso das espécies nativas pelos pequenos agricultores do Cerrado”. Programa Centro Oeste de Pesquisa e Pós-Graduação – POCPG/CNPq; Relatório de pesquisa, 2001-2003.
- ALVES, V. G.; Estudo Químico e Avaliação das Atividades Anti-inflamatória, Antimicrobiana e Moluscicida das Raízes da Espécie *Palicourea rigida* (Rubiaceae). Dissertação de Mestrado, UEM, 2011.
- ARAÚJO, F. C. V.; MARQUES, F. G.; SILVA, C. C.; SANTIN, S. M. Terpenos Isolados de *Coussarea platyphylla* Müll. Arg. (RUBIACEAE) *Quim. Nova*, 32(7), 1760-1763, 2009.
- AWAD, R.; AHMED, F.; BOURBONNAIS-SPEAR, N.; MULLALLY, M.; TA, C. A.; TANG, A.; MERALI, Z.; MAQUIN, P.; CAAL, F.; CAL, V. Ethnopharmacology of Q’eqchi’ Maya antiepileptic and anxiolytic plants: Effects on the GABAergic system. *J. Ethnopharmacol*, 125, 257–264, 2009.
- BAYOUMI, S. A.L.; ROWAN, M. G.; BEECHING J. R.; BLAGBROUGH, I. S. Constituents and secondary metabolite natural products in fresh and deteriorated cassava roots. *Phytochemistry*, 71, 598-604, 2010.
- BANNO, N.; AKIHISA, T.; TOKUDA, H.; YASUKAWA, K.; HIGASHIHARA, H.; UKIYA, M.; WATANABE, K.; KIMURA, Y.; HASEGAWA, J.; NISHINO, H.; Triterpene Acids from Leaves of *Perilla frutescens* and Their Anti-inflammatory and Antitumor-promoting Effects. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 68 (1), 85-90, 2004
- BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASOC. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L.; LIM, H. C. *Rubiaceae: sistemática de dicotiledôneas*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Vol. 3, 1986.
- BOLZANI, V. DA S.; IZUMISAWA, C. M.; YOUNG, M. C. M ; TREVISAN, L. M. V; KINGSTON, D. G. I.; GUNATILAKA, A. L. Iridoids from *Tocoyena formosa*. *Phytochemistry*, 46(2), 305-308, 1997.
- BRADLEY PP, PRIEBAT DA, CHRISTENSEN RD, ROTHSTEIN G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*, 78(3) 206-209, 1982.
- BRAZ-FILHO, R. Química de Produtos Naturais: Importância, Interdisciplinaridade, Dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um Pacatubano. *Química Nova*, 17(5), 405-445, 1994.

CAVÉCHIA, L. A.; PROENÇA, C. E. B.; Resgate Cultural de usos de Plantas Nativas do Cerrado pela População Tradicional da Região do Atual Distrito Federal. *Heringeriana*, 1(2), 11, 2007.

CECHINEL, V.; YUNES, V. A. Estratégias para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a partir de Plantas Medicinais. Conceitos Sobre Modificação Estrutural para Otimização da Atividade. *Química Nova*, 21(1), 99-105, 1997.

CHAGAS, A. S. Atividade Anti-inflamatória Intestinal da Escopoletina e Fraxetina nas Fases Aguda e Crônica do Processo Inflamatório Induzido por TNBS em Ratos. Monografia, 2010.

CHAO, C.; MONG, M.; CHAN, K.; YIN, M. Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice. *Mol. Nutr. Food Res*, 54, 388-395, 2010.

CHEMINAT, A.; ZAWATSKY, R.; BECHER, H.; BROUILLARD, R. Caffeoyl conjugates from *Echinacea* species: Structures and biological activity. *Phytochemistry* 27 (9), 2787-2794, 1988.

CHOZE, R.; DELPRETE, P. G.; LIÃO, L. M. Chemotaxonomic significance of flavonoids, coumarins and triterpenes of *Augusta longifolia* (Spreng.) Rehder, Rubiaceae-Ixoroideae, with new insights about its systematic position within the Family. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(3), 295-299, 2010.

CLIFFORD, M. N.; ZHENG, W.; KUHNERT, N. Profiling the chlorogenic acids of Aster by HPLC-MS. *Phytochem. Anal.* 17, 384-393, 2006.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R.; The Potential of Alkaloids in Drug Discovery. *Phytotherapy Research*, 15, 183-205, 2001.

COSTA, T. O. G.; ALMEIDA, R. A.; KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A.; PINTO, A. C. Constituintes químicos do caule de *Protium hebetatum* (Burseraceae). *Acta Amazônica*, 42(4), 557 – 560, 2012.

CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSSET, C. Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship. *Biosc. Biotech. Biochem.* 56(2), 324-325, 1992.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. *Visão Acadêmica*, Curitiba, 5(1), 33-40, 2004.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. Chichester: John Wiley e Sons, 2ed, 2002.

DELPRETE, P. G.; SMITH, L. B.; KLEIN, R. M. Rubiáceas. v. I – Gêneros de A-G: 1. Alseis até 19. Galium. In: REITS, R.; REIS, A. (Ed.). **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, SC: Herbário Barbosa Rodrigues. 2004a. p. 20-23.

DELPRETE, P.G., SMITH, L.B. & KLEIN, R.M. *Flora ilustrada Catarinense: Rubiaceas*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2005. Vol. 2.

EL-MASSRY, K.F., EL-GHORAB, A.H., FAROUK, A., Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L. *Food Chemistry*, 79, 331–336, 2002.

FANG, J.M.; WANG, K.C.; CHENG, Y.S. Steroids and Triterpenoids from *Rosa Laevigata*, *Phytochemistry*, 30, 3383, 1991.

FARIAS, F. M. *Psychotria myriantha* Arg. (Rubiaceae): Caracterização dos Alcaloides e Avaliação das Atividades Antiquimiotóxica e Sobre o Sistema Nervoso Central. Tese de Doutorado, UFRS, 2006.

FILHO, V.C. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. *Química Nova*, 23 (5), 680- 685, 2000.

FRUTOS ATRATIVOS DO CERRADO; Disponível em < frutosatrativosdocerrado.bio.br > Acesso em: 18 de Julho de 2013.

GALLOTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açaí (*Euterpe precatoria*, Mart., Arecaceae). *Química Nova*, 28, 610-613, 2005.

GOMES, A.; SAHA, A.; CHATTERJEE, I.; CHAKRAVARTY, A.K. Viper and snake venom neutralization by β -sitosterol and stigmasterol isolated from the root extract of *Pluchea indica* Less. (Asteraceae). *Phytomedicine*, 14 (9), 637-643, 2007.

GOMES, W. F. Estudo Químico de Raízes Naturais Renováveis do Estado de Sergipe: *Hancornia speciosa* Gomes. Dissertação de Mestrado, UFS, 2010.

GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G.; LIMA, R. A.; CALVACANTE, S. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elleptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrolanos A e B. *Química Nova*, 16 (2), 95-100, 1993.

GRESSLER, V.; MOURA, S.; FLORES, A. F. C.; FLORES, D.C.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Antioxidant and Antimicrobial Properties of 2-(4,5-Dihydro-1H-pyrazol-1-yl)- pyrimidine and 1-Carboxamidino-1H-pyrazole Derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.*, 21 (8), 1477-1483, 2010.

GUARIM, G.; MORAIS, R. G. Recursos Medicinais de Espécies do Cerrado de Mato Grosso: Um Estudo Bibliográfico. *Acta Bot. Bras.* 17(4), 561-584, 2003.

GUEOGJIAN, K. Funcionalização de cumarinas via reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura de sais de organotrifluoroboratos de potássio. Dissertação de Mestrado, USP, 2011

GUIA DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS – ANVISA. Brasília: Athalaia Gráfica, 2004, 49p.

- GUVENALP, Z.; KILIC, N.; KAZA, C.; KAYA, Y.; DEMIREZER, O. Chemical Constituents of *Galium tortumense*. *Turk J Chem*, 30, 515- 523, 2006.
- HAMERSKI, L.; FURLAN, M.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J.; EBERLIN, M. N.; TOMAZELA, D. M.; BOLZANI, V. DA S. Iridoid glucosides from *Randia spinosa* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, 63, 397–400, 2003.
- HAMERSKI, L.; CARBONEZI, C. L.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. DA S.; YOUNG, M. C. M. Saponinas Triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* MART. (RUBIACEAE). *Quim. Nova*, 28(4), 601-604, 2005.
- HIRSCHMANN, G. S., ARIAS A. R. A Survey of Medicinal Plants of Minas Gerais. Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 29, 159- 172,1990.
- HUNG, T. M.; NA, M.; THUONG, P. T.; DUY SU, N.; SOK, D.; SONG, K. S.; SEONG, Y. H.; BAE, K. Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 188-192, 2006.
- IDOWU, T. O.; OGUNDAINI, A. O.; SALAU, A. O.; OBUOTOR, E. M.; BEZABIH, M.; ABEGAZ, B. M. Doubly linked, A-type proanthocyanidin trimer and other constituents of *Ixora coccinea* leaves and their antioxidant and antibacterial properties. *Phytochemistry*, 71 (17), 2092-2098, 2010.
- INOUE, H.; TAKEDA, Y.; NISHIMURA, H.; KANOMI, A.; OKUDA, T.; PUFF, C. Chemotaxonomic Studies of Rubiaceae Plants Containing Iridoid Glycosides. *Phytochemistry*, 27, 8, 2591-2598, 1988.
- IGNOATO, M. C; FABRÃO, R. M.; SCHUQUEL, I. T. A.; BOTELHO, M. F. P.; SANTIN, S. M.; ARRUDA, L. L. M.; BERSANI-AMADO, C. A.; SOUZA, M. C. Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória de *Aeschynomene fluminensis* Vell. (Fabaceae). *Quim. Nova*, 35(11), 2241-2244, 2012.
- JOLY, L.G., GUERRA, S., SEPTIMO, R., SOLIS, P.N., CORREA, M.D. A., GUPTA, M.P., LEVY, S., SANDBERGD, F. and P. Ethnobotanical Inventory of Medicinal Plants Used by the Guaymi Indians in Western Panama. Part II. *Journal of Ethnopharmacology*, 28, 191-206, 1990.
- KAYANO, S.; KIKUZAKI, H.; FUKUTSUKA, N.; MITANI, T.; NAKATANI, N.; Antioxidant Activity of Prune (*Prunus domestica* L.) Constituents and a New Synergist J. *Agric. Food Chem.* 50, 3708, 2002.
- KIM, H. J.; JANG, S.; KIM, Y. J, CHUNG, H. T.; YUN, Y. G.; KANG, T. H, JEONG, O. S.; KIM, Y. C. Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE2 from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells. *Fitoterapia*, 75, 261–266, 2004.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1 (1), 147-155, 2005.
- KONTOGIANNI, V. G.; EXARCHOU, V.; TROGANIS, A.; GEROTHANASSIS, I. P. Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in

complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy-Comparison with HPLC methods. *Analytica Chimica Acta*, 635, 188-195, 2009.

LEE, C. L.; LIAO, Y. C.; HWANG, T. L.; WU, C. C.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Ixorapeptide I and ixorapeptide II, bioactive peptides isolated from *Ixora coccinea*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20 (24), 7354-7357, 2010.

LEE, J. H.; LEE J. Y.; PARK J. H.; JUNG H. S.; KIM J. S.; KANG S. S.; KIM, Y. S.; HAN, Y. Immunoregulatory activity by daucosterol, a beta-sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated Candidiasis in mice. *Vaccine*, 25(19), 3834-3840, 2007.

LENDL, A.; WERNER, I.; GLASL, S.; KLETTER, C.; MUCAJI, P.; PRESSER, A.; REZNICEK, G.; JURENITSCH, J.; TAYLOR, D. Phenolic and terpenoid compounds from *Chione venosa* (SW.) URBAN var. *venosa* (Bois Bandé). *Phytochemistry*, 66 (19), 2381-2387, 2005.

MARTINS, D.; CARRION, L. L.; RAMOS, D. F.; SALOMÉ, K. S.; SILVA, P. E. A.; BARISON, A.; NUNEZ, C. V. Triterpenes and the Antimycobacterial Activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). *BioMed Research International*, 2013.

MABBERLY, D. J. The plant book: a portable dictionary of the vascular plants. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

MEDINA, R. P.; Estudo Químico e Avaliação da Atividade Anti-inflamatória e Antiproliferativa dos Galhos de *Ixora brevifolia* Benth. (Rubiaceae). Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, 2011.

MEIRA, M.; DAVID, J. M. DAVID, J. P.; ARAÚJO, S. V.; REGIS, T. L.; GIULIETTI, A. M.; QUEIRÓZ, L. P.; Constituintes Químicos de *Ipomoea Subincana* MEISN. (Convolvulaceae). *Quim. Nova*, 31 (4), 751-754, 2008.

MESSIAS, K. L. S. Os Antioxidantes. *Food Ingredients Brasil*, nº6, 2009.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE; Disponível em <www.mma.gov.br/biomas/cerrado> Acesso em: 14 de Julho de 2013.

MOCCELINI, S. K.; SILVA, V. C.; NDIAYE, E. A.; SOUSA JR, P. T. e VIEIRA, P.C. Estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. ex Willd (Rutaceae); *Quim. Nova*, 32(1), 131-133, 2009.

MOON, P. D. Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines through inhibition of the I κ B/NF- κ B signal cascade in the human mast cell line HMC-1. *European Journal of Pharmacology*. 555, 218-225, 2007.

MONTAGNER, C. Atividades Antifúngica, Citotóxica (Células Tumorais Humanas) e Hemolítica de Cumarinas Naturais e Semi-Sintéticas. Dissertação de Mestrado, UFSC, 2007.

- MOREIRA, H. A.; OLIVEIRA, C. M.; SILVA, C. C.; KATO, L. Estudo fitoquímico e avaliação biológica das folhas de *Sabicea brasiliensis* (Rubiaceae). Resumo PIBIC, UFG, 2006.
- MOURA, V. M.; SANTOS, D. P.; SANTIN, S. M. O. CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A. Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (Rubiaceae). *Química Nova*, 29(3), 452-455, 2006.
- NAKATANI, N.; KAYANO, S.; KIKUZAKI, H.; SUMINO, K.; KATAGIRI, K.; MITANI, T.; Identification, Quantitative Determination, and Antioxidative Activities of Chlorogenic Acid Isomers in Prune (*Prunus domestica* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5512-5516, 2000.
- NETO, C. Cranberry and Its Phytochemicals: A Review of In Vitro Anticancer Studies. *The Journal of Nutrition*, 137 (1), 186-193, 2007.
- NOVOTNY L, VACHALKOVA A, BIGGS D. Ursolic acid: an anti-tumorigenic and chemopreventive activity. *Neoplasma*.48 (6), 241-246, 2001.
- OJALA, T. Biological Screening of Plant Coumarins. Dissertação de Mestrado, University of Helsinki, 2001.
- OLIVEIRA, A. M. DE; CONSERVA, L. M.; FERRO, J. N. DE S.; BRITO, F. M.; LEMOS, R. P. L.; BARRETO, E. Antinociceptive and anti-Inflammatory effects of octacosanol from the leaves of *Sabicea grisea* var. *grisea* in Mice. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 1598-1611, 2012.
- OLIVEIRA, D. F.; CARVALHO, H. W.P.; NUNES, A. S.; SILVA, G H.; CAVALHEIRO A. J.; CAMPOS V. P. Atividade de carboidrato purificado a partir da cebola (*Allium cepa* L.) e de carboidratos comerciais sobre juvenis de *Meloidogyne exigua* Goeldi. *Nematologia Brasileira*, 31(3), 202-209, 2007.
- OLIVEIRA, P. L. Contribuição ao Estudo de Espécies da Família Rubiaceae: Fitoquímica da Espécie *Amaioua guianiensis* Aubl. Dissertação de Mestrado, UFG, 2009.
- OLIVEIRA, P. R. N.; TESTA, G.; COSTA, W. F.; SARRAGIOTTO, M. H.; SANTIN, S. M. O. Saponinas triterpênicas das raízes de *Guettarda pohliana* Mull. Arg. (Rubiaceae). *Química Nova*, 31(4): 755-758, 2008.
- OLIVEIRA, V. C.; SAJO, M. G. Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. *Revista Brasileira de Botânica*, 22(3): 365-374, 1999.
- OVESNA, Z.; VACHALKOVA, A.; HORVATHOVA, K.; TOTHOVA, D.; Pentacyclic Triterpenic Acids: New Chemoprotective Compounds. *Neoplasma*, 51, 327, 2004.
- PALE, E.; KOUDA-BONAFOS, M.; NACRO, M.; VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRÉ, R. Two triacylated and tetraglucosylated anthocyanins from *Ipomoea asarifolia* flowers. *Phytochemistry*, 64, 1395-1399, 2003.

PAULI, G. F.; POETSCH, F.; NAHRSTEDT, A. Structure Assignment of Natural Quinic Acid Derivatives using Proton Nuclear Magnetic Resonance Techniques. *Phytochemical Analysis*, 9, 177-185, 1998.

POMILIO, A. B.; VITALE A. A.; CIPRIAN-OLLIVIER, J.; CETKOVICH-BAKMAS, M.; GÓMEZ, R.; VÁZQUEZ, G. Ayahoasca: an experimental psychosis that mirrors the transmethylation hypothesis of schizophrenia. *Journal of Ethnopharmacology*, 65, 29-51, 1999.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim. Nova*, 29 (4), 755-760, 2006.

REGASINI, L. O.; FERNANDES, D. C.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. DA S. Constituintes Químicos das Flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). *Quim. Nova*, 31(4), 802-806, 2008.

RIBEIRO, C. V. C.; KAPLAN, M. A. C. Tendências Evolutivas de Famílias Produtoras de Cumarinas em Angiospermae. *Quimica Nova*, 25 (4), 533-538, 2002.

ROBBERS, J. E., SPEEDIE, M. K.: TYLER, V. E. Farmacognosia-Biotecnologia. Editorial Premier, São Paulo, 205, 1997.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais no Domínio do Cerrado na Região do Alto Rio Grande-Minas Gerais. Dissertação de Mestrado, UFLA, 2001.

ROMAN, R. M.; WENDLAND, A. E.; POLANCZYK, C. A. Mieloperoxidase e Doença Arterial Coronariana: da Pesquisa à Prática Clínica. *Arq. Bras. Cardiol*, 91(1), e12-e19, 2008.

ROSA, E. A.; Contribuição ao Estudo Químico das Espécies Vegetais *Palicourea rigida* e *Palicourea coriacea* e Avaliação das Atividades Antioxidante, Anti-inflamatória e Moluscicida de *Palicourea rigida*. Tese de Doutorado, UEM, 2009.

ROSA, E. A., SILVA B. C., SILVA F. M., TANAKA C. M. A., PERALTA R. M., OLIVEIRA C. M. A., KATO L., FERREIRA H. D., SILVA C. C. Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20, 484-488, 2010.

ROUMY, V.; GARCIA-PIZANGO, G.; GUTIERREZ-CHOQUEVILCA, A.L.; RUIZ, L.; JULLIAN, V.; WINTERTON, P.; FABRE, N.; MOULIS, C.; VALENTIN, A. Amazonian plants from Peru used by Quechua and Mestizo to treat malaria with evaluation of their activity. *J. Ethnopharmacol*, 112, 482-489, 2007.

SANO, E. E. ; ROSA, R.; BRITO, J. L. S.; FERREIRA, L. G. Mapeamento de Cobertura vegetal do Bioma Cerrado: estratégias e resultados. Planaltina: Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados, 2007.

SANTOS Jr., H. M. ; ALVES, D. S. ; OLIVEIRA, D. F. ; CARVALHO, G. A. ; CAVALHEIRO, A. J. . Estudo fitoquímico de *Sabicea brasiliensis* e avaliação da

atividade sobre *Leucoptera coffeella*. In: 31 REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Águas de Lindóia, 2008.

SANTOS Jr., H. M.; OLIVEIRA, D. F.; CAVALHEIRO, A. J. ; CHAGAS, R. C. R. . Estudo fitoquímico das folhas de *Sabicea brasiliensis* Wernh (Rubiaceae). In: 30 REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Águas de Lindóia, 2007.

SANTOS, M. D.; CHEN, G.; ALMEIDA, M. C.; SOARES, D. M.; SOUZA, G. E. P.; LOPESA, N. P.; LANTZ, C. Effects of Caffeoylquinic Acid Derivatives and C-Flavonoid from *Lychnophora ericoides* on in vitro Inflammatory Mediator Production. *Nat. Prod. Commun.* 5(5), 733-740, 2010.

SATAKE, T.; KAMIYA, K.; AN, Y.; OISHI, T. YAMAMOTO, J. The Anti-thrombotic Active Constituents from *Centella asiatica*. *Biol. Pharm. Bull.*, 30(5), 935-940, 2007.

SCAZZOCCHIO, F., D'AURIA, F.D., ALESSANDRINI D.; PANTANELLA F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research*, 161, 327-333, 2006.

SCHULTES, R. E. De Plantis Toxicariis e Mundo Novo Tropicale Commentationes XXXIV: Biodynamic Rubiaceous Plants of the Northwest Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 14, 105-124, 1985.

SEEBACHER, W.; SIMIC, N.; WEIS, R.; SAF R.; KUNERT , O. Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR resonances of oleanolic acid, 18 α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxoderivatives. *Magn. Reson. Chem*, 41, 636-638, 2003.

SILVA, F. DE O; OLIVEIRA, I. R. DE; SILVA, M. G. DE; BRAZ-FILHO, R.; Constituintes Químicos das Folhas de *Senna Spectabilis* (Dc) Irwin & Barneby Var. *Excelsa* (Schrad.) Irwin & Barneby. *Quim. Nova*, 33 (9), 1874-1876, 2010.

SILVA, R. A. Constituintes químicos e avaliação da atividade antifúngica de *Ixora brevifolia* Benth. (Rubiaceae). *Revista de Biologia Neotropical*. 4(2), 165-166, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHEENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. e PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003.

SOH, Y.; KIM, J.; SOHN, N. W.; LEE, K. R.; KIM, S. Y. Protective Effects of Quinic Acid Derivatives on Tetrahydropapaveroline-Induced Cell Death in C6 Glioma Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 26(6) 803-807, 2003.

TATEFUJI, T.; IZUMI, N.; OHTA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Isolation and Identification of Compounds from Brazilian Propolis which Enhance Macrophage Spreading and Mobility. *Biol. Pharm. Bull.* 19(7), 966-970, 1996.

TESTA, G.; OLIVEIRA, P. R. N; SILVA, C. C DA; SCHUQUEL, I. T. A; SANTIN, S. M. A. Constituintes Químicos das Folhas e Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória

de Extratos das Raízes e Folhas de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Quimica Nova*, 35 (3), 527-529, 2012.

TOMA, W.; GRACIOSO, J. S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. Evaluation of the analgesic and antiedematogenic activities of *Quassia amara* bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 85, 19-23, 2003.

VALADEAU, C.; CASTILLO, J.A.; SAUVAIN, M.; LORES, A.F.; BOURDY, G. The rainbow hurts my skin: medicinal concepts and plants uses among the Yanasha (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group. *J. Ethnopharmacol*, 127, 175-192, 2010.

VAN ARMAN G. C. Anti-inflammatory Drugs. *Clin Pharmacol Ther*, 16 (4), 900, 1974.

VIEIRA, T. F.; OLIVEIRA, C. M. A. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Amaioua guianensis* (Rubiaceae). Sociedade Brasileira para o Progresso da Química, 2010.

WANG, T.; LIU Y.; WANG, X.; YANG, N.; ZHU, H.; ZUO, P. Protective effects of octacosanol on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats via regulation of ProNGF and NGF signaling. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31, 765-774, 2010.

ZHI-MING, B.; ZHENG-TAO, W.; LUO-SHAN, X.; Chemical Constituents of *Dendrobium moniliform*. *Acta Botanica Sinica*, 46 (1): 124-126, 2004.