



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FRANCYNE CARMEM SANTOS CORREIA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS
FOLHAS E GALHOS DE *Cordia insignis* Cham. (BORAGINACEAE).**

CUIABÁ, MT
JUNHO, 2016

FRANCYNE CARMEM SANTOS CORREIA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS
FOLHAS E GALHOS DE *Cordia insignis* Cham. (BORAGINACEAE).**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para obtenção do título de Mestre em Química, Área de Concentração Produtos Naturais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Tereza Auxiliadora Nascimento Ribeiro

**CUIABÁ, MT
JUNHO, 2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

C824e CORREIA, FRANCYNE CARMEM SANTOS.
ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS
E GALHOS DE CORDIA INSIGNIS CHAM. (BORAGINACEAE) /
FRANCYNE CARMEM SANTOS CORREIA. -- 2016
156 f. ; 30 cm.

Orientadora: TEREZA AUXILIADORA NASCIMENTO RIBEIRO.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso,
Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Programa de Pós-Graduação em
Química, Cuiabá, 2016.
Inclui bibliografia.

1. CORDIA INSIGNIS. 2. ATIVIDADE BIOLÓGICA. 3. FITOQUÍMICA. I.
Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

FRANCYNE CARMEM SANTOS CORREIA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS
FOLHAS E GALHOS DE *Cordia insignis* Cham. (BORAGINACEAE).**

Esta dissertação foi analisada e julgada adequada para a obtenção do título Mestre em Química de Produtos Naturais e aprovada em sua forma final pela Orientadora e pela Banca Examinadora designada pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Mato Grosso.

APROVADA: 10/06/2016



Profa. Dra. Cláudia J. Nehme
(Examinadora externa)



Prof. Dr. Lucas C. C. Vieira
(Examinador interno)



Profa. Dra. Tereza A.N. Ribeiro
(Orientadora)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Av. Fernando Corrêa da Costa, 2367, Depto Química Bloco F - Boa Esperança

ATA DE DEFESA PÚBLICA
Mestranda Francyne Carmem Santos Correia

Aos 10 dias do mês de junho do ano de 2016, às 14h00, no Auditório da Química, sob a presidência da professora Doutora Tereza Auxiliadora Nascimento Ribeiro, orientadora, reuniu-se em sessão pública a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado, a discente Francyne Carmem Santos Correia do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA, visando a obtenção de título de MESTRE EM QUÍMICA. A Mestranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre, na Área de Concentração PRODUTOS NATURAIS, e foi aprovada no Exame de Qualificação no dia 06 de maio de 2016, de acordo com os registros constantes na Secretaria do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA. Esta foi a 56ª sessão pública de Defesa de Dissertação do Programa. Os trabalhos foram instalados às 14:50 h pela presidente da Banca Examinadora, constituída pelos professores Doutores Tereza Auxiliadora Nascimento Ribeiro (Presidente da Banca/Orientadora), Cláudia Joseph Nehme (Examinadora Externa) e Lucas Campos Curcino Vieira (Examinador Interno). A pós-graduanda procedeu à apresentação de seu trabalho, cujo título é "Estudo Fitoquímico e Atividades Biológicas das Folhas e Galhos de *Cordia insignis* Cham. (Boraginaceae)" e em seguida foi arguida pelos integrantes da banca. Os trabalhos de arguição foram encerrados às 16:00 h, e após reunião a Banca deliberou por sua aprovação. Proclamando o resultado final pelo Presidente da Banca Examinadora foram concluídos os trabalhos. O título de Mestre será conferido sob condição de apresentação, na Secretaria do Programa, da versão final corrigida na forma e no prazo estabelecido no Regimento Interno do Programa (90 dias) juntamente com o Termo de Aprovação do Orientador. Cumpridas as formalidades, às 16:30 h, o presidente da mesa encerrou a sessão de defesa, e para constar eu, Tereza Auxiliadora Nascimento Ribeiro, docente permanente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA lavrei a presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos integrantes da banca examinadora em 06 vias de igual teor.

Composição da Banca Examinadora:

1. Tereza A.N. Ribeiro Doutora Tereza Auxiliadora Nascimento Ribeiro (Presidente da Banca / Orientadora)
2. Cláudia Joseph Nehme Doutora Cláudia Joseph Nehme (Examinadora Externa)
3. Lucas Campos Curcino Vieira Doutor Lucas Campos Curcino Vieira (Examinador Interno)

Recomendações da Banca:
Incorporar as sugestões da banca conforme versões impressas entregues a mestranda por cada um dos membros da banca.

Ciência da Discente: Francyne Carmem Santos Correia

CUIABÁ, 10/06/2016.

* Este documento tem validade de 24 meses contados a partir da data de sua emissão.

**Dedico este trabalho aos meus pais, José e Aparecida,
que sempre me apoiaram e me incentivaram.**

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por tudo que tenho e que conquistei.

As minhas irmãs, Ana e Francyele, pelos momentos felizes, pelas brincadeiras e pelas risadas que demos juntas.

Á minha avó Maria Frassinete pelo apoio.

Ao meu noivo, Luciano, pela paciência e sobretudo pelo esforço que me deu no decorrer desta caminhada.

Á todos os meus tios, tias, primos, primas que sempre acreditaram em mim.

Á minha querida orientadora Prof^a Dr^a Tereza Ribeiro, pela confiança, pelo apoio e pelos ensinamentos adquiridos.

Á Prof^a Dr^a Virgínia Cláudia, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

Ao Prof^o Dr^o Evandro Dall'Oglio, pela oportunidade que me destes de conhecer a área de Produtos Naturais.

Ao Prof^o Dr^o Paulo Teixeira, meu muito obrigada pelo apoio.

Aos Prof^o Dr^o Ângelo de Fátima (UFMG), Prof^o Dr^o Mário Geraldo de Carvalho (UFRRJ), Prof^o Dr^o Luciano Suzart (UFRRJ) e Prof^o Ms. Leonardo Vasconcelos (UFMT), pelas análises de RMN e pelos espectros de massas obtidos.

Á Prof^a Dr^a Ivana Violante (UNIC), pelos testes antimicrobianos e ao Prof^o Dr^o Edgar Gamero (UNIFESP) pelos testes antilêucêmico.

Aos Prof. Dr. Lucas Curcino e a Profa. Dra. Cláudia Nehme por terem participado da banca e contribuído com o trabalho.

Á Tamires e a Sabrina, minhas IC's queridas, que me ajudaram a desenvolver este trabalho. Sem vocês nada disso seria possível. Meu muito obrigada.

Aos meus amigos do LPQPN e da CA-LPQPN, muito obrigada pelos momentos de descontração, pelas conversas e pela convivência.

Á Thayana, grande amiga, com quem iniciei os trabalhos no PN.

Á minha querida amiga Mariele, que sempre esteve ao meu lado me ajudando nas dificuldades encontradas.

Ao meu querido amigo Washington, que me acompanhou durante toda essa jornada.

Á técnica Vanilde Frageri, pelo apoio e ajuda dentro do laboratório.

Á todos os professores e técnicos do Departamento de Química, que contribuíram na minha formação.

Aos meus colegas do mestrado.

Á todos (a), que de certa forma contribuíram com este trabalho.

Ao INAU, pelo apoio financeiro.

“A verdadeira coragem é ir atrás de seus sonhos mesmo quando todos dizem que ele é impossível.” (Cora Coralina)

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
COSY	Correlated spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
<i>d</i>	duplete
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo duplete
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EM	Espectrometria de massas
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
PA	Pró-Análise
ppm	Partes por milhão
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Simpleto
<i>sl</i>	Simpleto largo
TMS	Tetrametilsilano
<i>t_r</i>	Tempo de retenção
UFC	Unidades formadoras de colônia
UV	Ultra-Violeta
δ	Deslocamento químico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica da família Boraginaceae no mundo.....	29
Figura 2: Distribuição geográfica do gênero <i>Cordia</i> no mundo.....	31
Figura 3: Distribuição geográfica de <i>C. insignis</i>	55
Figura 4: Folhas e galhos de <i>C. insignis</i>	55
Figura 5: Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) das substâncias I e II.....	98
Figura 6: Expansão do espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) das substâncias I e II entre δ_{H} 3,6-5,4 ppm.....	98
Figura 7: Espectro de RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) das substâncias I e II.....	99
Figura 8: Espectro de DEPT 135 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) das substâncias I e II.....	99
Figura 9: Expansão do espectro de DEPT 135 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) das substâncias I e II entre δ_{C} 46,0-79,0 ppm.....	100
Figura 10: Expansão do espectro de DEPT 135 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) das substâncias I e II entre δ_{C} 11,0-42,0 ppm.....	100
Figura 11: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) das substâncias III e IV.....	104
Figura 12: Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) das substâncias III e IV.....	104
Figura 13: Cromatograma a gás das substâncias III, IV e V.....	105
Figura 14: Espectro de massas da substância V.....	105
Figura 15: Espectro de massas da substância IV.....	105
Figura 16: Espectro de massas da substância III.....	105
Figura 17: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da substância VI.	108

Figura 18: Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) da substância VI.....	108
Figura 19: Cromatograma a gás da substância VI.....	109
Figura 20: Espectro de massas da substância VI.....	109
Figura 21: Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) das substâncias VII e VIII.....	113
Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias VII e VIII.....	113
Figura 23: Espectro de DEPT 135 (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias VII e VIII.....	114
Figura 24: Expansão do espectro DEPT 135 (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias VII e VIII entre δ_{C} 38,0-78,0 ppm.....	114
Figura 25: Expansão do espectro DEPT 135 (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias VII e VIII entre δ_{C} 14,0-34,5 ppm.....	115
Figura 26: Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância IX.....	117
Figura 27: Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) da substância IX.....	117
Figura 28: Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) da substância X.....	119
Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) da substância X.....	120
Figura 30: Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância XI.....	122
Figura 31: Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) da substância XI.....	122
Figura 32: Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância XII.....	124
Figura 33: Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância XII entre δ_{H} 6,1-7,6 ppm.....	125

Figura 34: Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) da substância XII	125
Figura 35: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) da substância XII entre δ_{C} 115,0-170,0 ppm.....	126
Figura 36: Correlações observadas no espectro RMN HMBC (CD_3OD , 125 MHz) da substância XIII	128
Figura 37: Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) das substâncias XII e XIII	130
Figura 38: Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) das substâncias XII e XIII entre δ_{H} 6,90-7,60 ppm.....	130
Figura 39: Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) das substâncias XII e XIII entre δ_{H} 6,20-6,84 ppm.....	131
Figura 40: Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias XII e XIII	131
Figura 41: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias XII e XIII entre δ_{C} 126,0-149,0 ppm.....	132
Figura 42: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias XII e XIII entre δ_{C} 112,5-122,5 ppm.....	132
Figura 43: Espectro de RMN COSY (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias XII e XIII	133
Figura 44: Expansão do espectro de RMN COSY (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias XII e XIII entre δ_{H} 6,2 - 7,7 ppm.....	133
Figura 45: Espectro de RMN HMBC (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias XII e XIII	134
Figura 46: Expansão do espectro de RMN HMBC (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias XII e XIII entre δ_{H} 6,20 – 7,60 ppm e δ_{C} 110,0 – 170,0 ppm.....	134
Figura 47: Espectro de RMN HSQC (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias XII e XIII	135

Figura 48: Expansão do espectro de RMN HSQC (CD ₃ OD, 125 MHz) das substâncias XII e XIII entre δ_H 6,20 – 7,05 ppm e δ_C 110,0 – 125,0 ppm.....	135
Figura 49: Efeito dos extratos EBHEG e EBHEF sobre o ciclo celular das linhagens HL 60, K562, Kasumi-1 e Raji.....	140

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Fracionamento cromatográfico do EBHEG	62
Esquema 2: Fracionamento cromatográfico da fração FCG	65
Esquema 3: Fracionamento cromatográfico da fração FAG	69
Esquema 4: Fracionamento cromatográfico do grupo FA6	72
Esquema 5: Fracionamento cromatográfico do grupo FA7	73
Esquema 6: Fracionamento cromatográfico do EBHEF	75
Esquema 7: Fracionamento cromatográfico do grupo FCF3	78
Esquema 8: Fracionamento cromatográfico da fração FAF	79
Esquema 9: Fracionamento cromatográfico do grupo FFC	81
Esquema 10: Fracionamento cromatográfico do grupo FFE	84
Esquema 11: Proposta de fragmentação para a substância VI.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fase móvel utilizada na eluição da coluna da fração FHG	59
Tabela 2. Fase móvel utilizada na eluição da coluna do grupo FH5	60
Tabela 3. Fase móvel utilizada na eluição da coluna do grupo FH5-C	61
Tabela 4. Fase móvel utilizada na eluição da coluna da fração FCG	63
Tabela 5. Fase móvel utilizada na eluição da fração FAG	66
Tabela 6. Fase móvel utilizada na eluição do grupo FA1	67
Tabela 7. Fase móvel utilizada na eluição do grupo FA6	70
Tabela 8. Fase móvel utilizada na eluição do grupo FA6-B	71
Tabela 9. Fase móvel utilizada na eluição do grupo FA7	72
Tabela 10. Fase móvel utilizada na eluição da fração FCF	74
Tabela 11. Fase móvel utilizada na eluição do grupo FCF3	76
Tabela 12. Fase móvel utilizada na eluição da fração FAF	79
Tabela 13. Fase móvel utilizada na eluição do grupo FFC	80
Tabela 14. Fase móvel utilizada na eluição do grupo FFE	82
Tabela 15. Fase móvel utilizada na eluição do grupo FFE5	83
Tabela 16. Dados de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das substâncias I e II em comparação com dados da literatura (SOARES, 2015).....	96
Tabela 17. Dados de RMN DEPT 135 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das substâncias I e II em comparação com dados da literatura (SOARES, 2015).....	97
Tabela 18. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias III , IV e V em comparação com dados da literatura (RUIZ, 1998)*.....	103
Tabela 19. Dados de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância VI em comparação com dados da literatura (VILA-NOVA et al., 2012).....	107

Tabela 20. Dados de RMN DEPT 135 (500 MHz, CD ₃ OD) da mistura das substâncias VII e VIII em comparação com dados da literatura (ZANON,2006).....	112
Tabela 21. Dados de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) e ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) da substância IX em comparação com dados da literatura (PYO et al., 2002).....	116
Tabela 22. Dados de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) e ¹³ C (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)da substância X em comparação com dados da literatura (ANDRADE, 2007).....	119
Tabela 23. Dados de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) e ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) da substância XI em comparação com dados da literatura (CARVALHO et al., 2006).....	121
Tabela 24. Dados de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) e ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) da substância XII em comparação com dados da literatura (BRESCIANI, 2003).....	124
Tabela 25. Dados de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) e ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) da substância XIII em comparação com dados da literatura (AL-MUSAYEIB et al., 2011).....	129
Tabela 26: Avaliação das atividades antifúngica e antibacteriana através da CIM (µg/mL) das frações obtidas da <i>Cordia insignis</i>	138

RESUMO

CORREIA, Francyne Carmem Santos; Ms.; Universidade Federal de Mato Grosso, Junho de 2016. **Estudo fitoquímico atividades biológicas das folhas e galhos de *Cordia insignis* Cham. (Boraginaceae).** Orientadora: Prof^a Dr^a Tereza Auxiliadora Nascimento Ribeiro.

A espécie *Cordia insignis*, conhecida popularmente como “calção-de-velho”, distribui-se nas regiões Nordeste e Centro-Oeste em ambientes de Cerrado. O chá de suas folhas é utilizado no tratamento de dores em geral e reumatismo. Este trabalho descreve, pela primeira vez, a investigação química e biológica da espécie *C. insignis*, na busca para isolamento e caracterização dos seus metabólitos especiais. Os esteroides 3-O- β -D-glicopiranosil sitosterol, 3-O- β -D-glicopiranosil estigmasterol, β -sitosterol, estigmasterol e campesterol, os triterpenos α -amirina e β -amirina, a cumarina escoparona, o ureído alantoína e o derivado fenilpropanoídico cafeoato de metila foram isolados dos galhos. Das folhas foram isoladas duas cumarinas, a escoparona e escopoletina, a alantoína, os derivados fenilpropanoídico ácido cafeico e rosmarinato de metila. A determinação estrutural foi realizada empregando as técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D) e EM. Os extratos e as frações foram submetidos a atividade antimicrobiana. Nenhum extrato ou fração apresentou atividade antibacteriana. Para as cepas fúngicas, o extrato bruto hidroetanólico e a fração clorofórmica obtida dos galhos apresentaram atividade promissora contra *C. albicans*, com CIM de 500 e 125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O extrato bruto hidroetanólico e as frações hexânica, clorofórmica e acetato obtidas das folhas, se mostraram ativas frente as cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*, com CIM que variaram entre 15,62 e 500 $\mu\text{g/mL}$. A fração hexânica e acetato também apresentaram resultados promissores contra a cepa de *C. neoformans*, com valores de CIM de 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Na atividade antileucêmica, somente o extrato bruto hidroetanólico das folhas apresentou resultados satisfatórios frente a linhagem de células promielócitas HL-60.

Essas atividades podem estar relacionadas com a presença de substâncias que apresentam atividade antifúngica e antileucêmica.

Palavras chave: *Cordia insignis*, Fitoquímica, Atividade biológica.

ABSTRACT

CORREIA, Francyne Carmem Santos; Ms.; Federal University of Mato Grosso, June 2016. **Phytochemical studies and biological activities of leaves and branches *Cordia insignis* Cham. (Boraginaceae).** Advisor: Prof^a Dr^a Tereza Auxiliadora Nascimento Ribeiro.

The *Cordia insignis* species, popularly known as "shorts-of-old", is distributed in the Northeast and Midwest in Cerrado environments. The tea leaves is used in the treatment of pain and rheumatism. This work describes for the first time the chemical and biological investigation of *C. insignis* species, in the search for isolation and characterization of its special metabolites. The steroids 3-O- β -D-glucopyranosyl sitosterol, 3-O- β -D-glucopyranosyl stigmasterol, β -sitosterol, stigmasterol and campesterol, the triterpenes α -amyrin and β -amyrin, the coumarin scoparone, the ureido allantoin and phenilpropanoid derived methyl caffeate were isolated from the branches. From the leaves were isolated two coumarins, the scoparone and scopoletin, allantoin, phenilpropanoid derived caffeic acid and methyl rosmarinate. The structure determination was performed using spectroscopic techniques ^1H and ^{13}C NMR (1D and 2D) and MS. The extracts and fractions were subjected to antimicrobial activity. No extract or fraction showed antibacterial activity. For fungal strains, hydroethanol crude extract and chloroform fraction obtained from the branches showed promising activity against *C. albicans* with MIC 500 and 125 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The hydroethanol crude extract and hexane fractions, chloroform and ethyl obtained from the leaves, have proved active against strains of *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei*, with MICs ranging entre 15,62 and 500 $\mu\text{g/mL}$. The hexane and ethyl acetate fraction also showed promising results against strains of *C. neoformans*, with MIC values of 125 and 250 $\mu\text{g/mL}$, respectively. In antileukemic activity, only hydroethanol crude extract of leaves showed satisfactory results across the line of promyelocytes cells HL-60. These

activities may be related to the presence of substances with antifungal and antileukemic activity.

Keywords: *Cordia insignis*, Phytochemistry, Biological activities.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	26
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.1 FAMÍLIA BORAGINACEAE: UMA BREVE DESCRIÇÃO...28	
2.2 O GÊNERO <i>Cordia</i>	30
2.2.1 Caracterização	30
2.2.2 Uso medicinal.....	31
2.2.3 Importância econômica e tradicional	33
2.2.4 Constituintes químicos e atividades biológicas	34
2.2.5 A espécie <i>Cordia insignis</i>	54
3. JUSTIFICATIVA	55
4. OBJETIVOS.....	56
4.1 Objetivos Gerais.....	56
4.2 Objetivos Específicos	56
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	57
5.1 MATERIAIS	57
5.1.1 Materiais de consumo e equipamentos	57
5.1.2 Material botânico	58
5.2 MÉTODOS	58
5.2.1 Secagem e pulverização das folhas e galhos de <i>C. insignis</i>	58
5.2.2 Obtenção dos Extratos	58
5.3 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO HIDROETANÓLICO DOS GALHOS (EBHEG)	59
5.3.1 Partição líquido-líquido	59

5.3.2 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO HEXÂNICA (FHG).....	59
5.3.2.1 Fracionamento do grupo FH5.....	60
5.3.2.1.1 Fracionamento do grupo FH5-C	61
5.3.3 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA (FCG).....	63
5.3.3.1 Fracionamento do grupo FHC4	64
5.3.3.2 Fracionamento do grupo FHC5	64
5.3.4 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO (FAG)	66
5.3.4.1 Fracionamento do grupo FA1	67
5.3.4.1.1 Fracionamento do grupo FA1-C	68
5.3.4.2 Fracionamento do grupo FA6	70
5.3.4.2.1 Fracionamento do grupo FA6-B	71
5.3.4.3 Fracionamento do grupo FA7	72
5.4 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS (EBHEF).....	73
5.4.1 Retirada da clorofila e Partição líquido-líquido	73
5.4.2 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA (FCF).....	74
5.4.2.1 Fracionamento do grupo FCF3	75
5.4.3 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO (FAF)	78
5.4.3.1 Fracionamento do grupo FFC	80
5.4.3.1.1 Fracionamento do grupo FFC3.....	80
5.4.3.1.2 Fracionamento do grupo FFC4.....	81
5.4.3.2 Fracionamento do grupo FFE.....	81

5.4.3.2.1 Fracionamento do grupo FFE5	82
6. ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	84
6.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>in vitro</i>	84
6.1.1 Linhagens microbianas.....	84
6.1.2 Meios de cultura	85
6.1.3 Manutenção dos microrganismos indicadores	85
6.1.4 Preparo do padrão McFarland.....	85
6.1.5 Preparo do inóculo bacteriano e ajuste da suspensão do inóculo para a densidade de 0,5 da escala de McFarland	86
6.1.6 Preparo do inóculo dos fungos leveduriformes	86
6.1.7 Ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	87
6.1.8 Método de diluição em placas utilizando resazurina como revelador.....	89
6.2 ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA <i>in vitro</i>	90
6.2.1 Cultura das células	90
6.2.2 Dupla-coloração por Anexina V-FITC/Iodeto de propídio e Análise Citométrica de Fluxo	90
6.2.3 Análise estatística	90
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
7.1 Substâncias isoladas dos galhos de <i>C. insignis</i>	92
7.2 Substâncias isoladas das folhas de <i>C. insignis</i>	93
7.3 Substâncias I e II (3-O- β -D-glicopiranosil sitosterol e 3-O- β - D-glicopiranosil estigmasterol).....	93
7.4 Substâncias III, IV e V (β -sitosterol, estigmasterol e campesterol).....	101

7.5 Substância VI (escoparona).....	106
7.6 Substâncias VII e VIII (α -amirina e β -amirina)	110
7.7 Substância IX (cafeato de metila)	115
7.8 Substância X (alantoína).....	118
7.9 Substância XI (escopoletina)	120
7.10 Substância XII (ácido cafeico)	123
7.11 Substância XIII (rosmarinato de metila)	126
8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	136
8.1 Ensaio da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos extratos brutos e frações.....	136
8.2 Ensaio da atividade antileucêmica <i>in vitro</i> dos extratos brutos.....	139
9. CONCLUSÃO	142
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143

1. INTRODUÇÃO

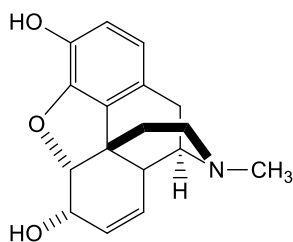
Florestas tropicais são grandes fontes de biodiversidade, e estão localizadas em países em desenvolvimento como o Brasil, que possui 8,5 milhões de km² e abrange várias zonas climáticas que levam a grandes variações ecológicas formando os seis biomas brasileiros: Floresta Amazônica, Pantanal, Cerrado, Caatinga, Campos dos Pampas e Mata Atlântica. Devido a esta variedade de biomas, o Brasil detém aproximadamente um terço da flora mundial, destacando-se as plantas produtoras de frutos alimentares, resinas, óleos, gomas, aromas, e, principalmente, o potencial medicinal, podendo citar muitas espécies com propriedades terapêuticas, sendo sua utilização uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade para tratamento, cura e prevenção de doenças (BRASIL, 2002; KLEIN et al., 2009).

A fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais contribuem para sua utilização pelas populações (VEIGA JR. et al., 2005). Ainda hoje, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem, em muitas ocasiões, seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, este tipo de cultura medicinal chama a atenção de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, Botânica, Química e Farmacologia que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a flora mundial, além de comprovar a eficácia e promover o uso seguro desses recursos naturais (MACIEL et al., 2002).

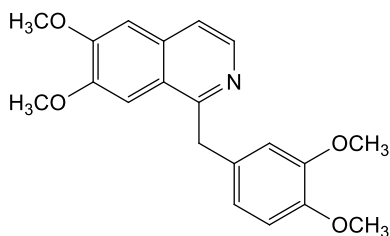
Assim, estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas contribuem para o desenvolvimento da medicina moderna e da indústria farmacêutica, pois estas fontes naturais podem fornecer fármacos extremamente

importantes, que podem, posteriormente, serem obtidos via síntese química. Além disso, fornecem compostos que podem ser modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos, podendo ainda serem utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais (TUROLLA et al., 2006).

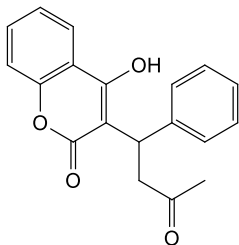
O isolamento da morfina (**1**) da *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae), em 1804 por Seturner, marcou o início do processo de extração de princípios ativos de plantas. Passado mais de um século isolou-se desta mesma planta a papaverina (**2**). Dentre os mais de 30 alcalóides dessa espécie, a morfina apresenta ação analgésica e a papaverina, efeito vasodilatador. A warfarina (**3**) é um dos fármacos mais empregados como anticoagulante. Sua ação pode ser antagonizada ou potencializada pelo emprego de um grande número de ervas, dentre as quais a angélica (*Angelica archangelica*). Dentre os quimioterápicos para o câncer, a vimblastina (**4**) e a vincristina (**5**), extraídas de *Catharantus roseus* são importantes fármacos introduzidos na terapêutica nos últimos 20 anos (VIEGAS Jr et al., 2006).



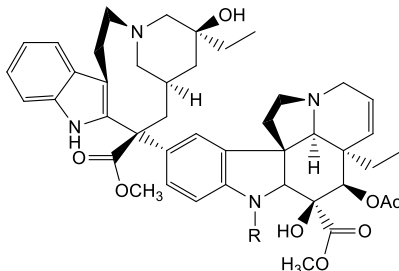
(1)



(2)



(3)



(4) R = CH₃

(5) R = CHO

Devido a tais constatações, os produtos naturais e derivados foram, e continuam sendo, notoriamente, de importância crucial em determinados setores de uma sociedade moderna, mesmo considerando-se o grande número de produtos produzidos por síntese. Fundamentada nesse princípio, a indústria farmacêutica vem aplicando grandes investimentos em pesquisas de bioprospecção (MONTANARI et al., 2001). Porém a participação do Brasil e de outros países em desenvolvimento no mercado farmacêutico ainda é limitada, mesmo que a inovação tecnológica em pesquisa e exploração de produtos naturais é uma das características marcantes nesses países. Para reverter esta situação e promover o desejado desenvolvimento biotecnológico no setor farmacêutico, faz-se necessário a formulação de uma política de saúde pública que fomenta o desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional, e possibilite o acesso equitativo de seus cidadãos a medicamentos apropriados para o tratamento de suas enfermidades (FUNARI e FERRO, 2005).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FAMÍLIA BORAGINACEAE: UMA BREVE DESCRIÇÃO

A família Boraginaceae apresenta grande complexidade morfológica, principalmente no que se refere ao habitat, inflorescências, flores e frutos. É uma família cosmopolita, muito diversificada em número de gêneros e espécies (MELO e SALES, 2005). Pertence à ordem Lamiales e

compreende cerca de 148 gêneros e 2.740 espécies, distribuídas nas zonas temperada e tropical da Europa, Ásia, América e Austrália (NOGUEIRA et al., 2013). Na América do Sul ocorrem cerca de 25 gêneros, dos quais 10 são endêmicos (**Figura 1**).

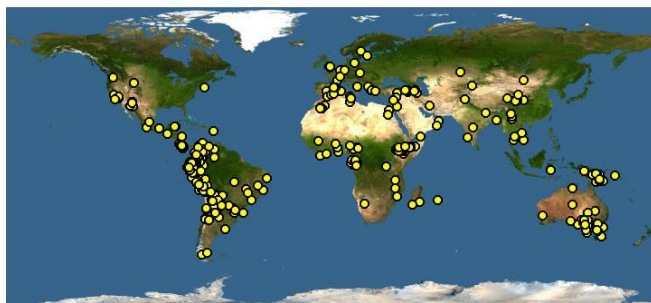


Figura 1 - Distribuição geográfica da família Boraginaceae no mundo.

Fonte: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Boraginaceae>

No Brasil, ocorrem espontaneamente 11 gêneros de Boraginaceae: *Auxemma* Miers, *Cordia* L., *Euploca* Nutt., *Heliotropium* L., *Lepidocordia* Ducke, *Moritzia* DC. ex Meisn., *Myriopus* Small, *Patagonula* L., *Rotula* Lour., *Thaumatocaryon* Baill. e *Tournefortia* L. e aproximadamente 150 espécies distribuídas em todas as regiões, podendo ser encontradas desde ervas, subarbustos, arbustos, lianas até árvores (MELO e ANDRADE, 2007). Porém, algumas espécies de *Cordia* L., *Borago* L., *Pulmonária* L., *Heliotropium* L. e *Symphytum* L., se destacam no território brasileiro por incluírem espécies medicinais (BARROSO e OLIVEIRA, 2009).

Estudos farmacológicos dos extratos de diversas espécies pertencentes à família Boraginaceae apresentam propriedades biológicas como: anti-úlceras, antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante (BARBAKADZE et al., 2013). Diversos constituintes químicos pertencentes a várias classes de metabólitos especiais já foram encontrados na família como: flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, terpenos, triterpenos, alcaloides, quinonas, saponinas, taninos, mucilagens, polissacarídeos, ciclitóis e ácidos graxos de interesse terapêutico e nutricional, como o ácido

gama-linolênico (ARREBOLA et al., 2004). Na medicina popular, algumas espécies são utilizadas no tratamento de cólicas menstruais, reumatismo, dispepsia, febre, dores no fígado, gripe, entre outras patologias (COSTA et al., 2008).

Devido às inúmeras investigações farmacológicas, químicas e biológicas que demonstram a potencialidade de várias espécies de Boraginaceae, faz-se necessário a continuidade de estudos que explorem novas informações a respeito deste gênero, contribuindo assim para o conhecimento da flora brasileira e a descoberta de novas substâncias com potencial atividade farmacológica.

2.2 O GÊNERO *Cordia*

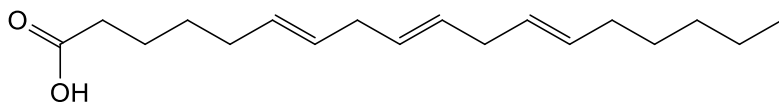
2.2.1 Caracterização

Foi descrito por Linnaeus em 1753 (ARREBOLA et al., 2004). Pertence à subfamília Cordioideae sendo um dos gêneros mais representativo e complexo da família Boraginaceae devido aos seus aspectos químicos, biológicos, farmacológicos e de importância econômica. Possui 320 espécies (NOGUEIRA et al., 2013) distribuídas nos trópicos e subtropicais, com centro de diversidade nas Américas (**Figura 2**). No Brasil, existem cerca de 100 espécies geralmente associadas a ambientes florestais atlânticos e amazônicos, estando ainda relativamente bem representados em caatingas e cerrados (MELO e ANDRADE, 2007).

casca do caule. As folhas e raízes de *C. leucocephala* têm sido usadas na medicina popular contra reumatismo, indigestão e tônico geral. O xarope das flores é indicado contra raquitismo e artrismo (OLIVEIRA et al., 2012). A decocção ou infusão das folhas de *C. globosa* é utilizada no tratamento dos sintomas de reumatismo, menstruação dolorosa e dispepsia. O xarope dos frutos de *C. myxa* L. é utilizado como adstringente, anti-helmíntico, demulcente, diurético, expectorante e no tratamento de infecção urinária sendo que os frutos de *C. sellowiana* apresentam propriedades semelhantes à espécie anteriormente citada (BARROSO e OLIVEIRA, 2009). As cascas de *C. sinensis* são utilizadas para tratar distúrbios estomacais e dores no peito (AL-MUSAYEIB et al., 2011). O banho das folhas de *C. verbenacea* é utilizado no tratamento da dor.

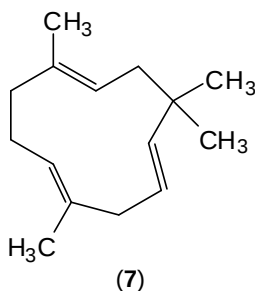
Estudos comprovam que os extratos de algumas espécies apresentam propriedades biológicas. O extrato hidroalcoólico das folhas de *C. verbenacea* apresentou atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (PINHO et al., 2012). O extrato metanólico de galhos e folhas de *C. salicifolia* apresentou atividade citotóxica contra células cancerígenas (SIQUEIRA et al., 2006). O extrato das raízes de *C. corymbosa* apresentou atividade contra as bactérias Gram-positivas e micobactérias (BIEBER et al., 1990).

Estudos das sementes de algumas espécies de *Cordia* são relatados na literatura devido à presença de lipídeos de grande interesse da indústria farmacêutica, o que sugere que estas espécies podem atuar como fonte vegetal desses ácidos graxos. O ácido gama-linolênico (6) tem recebido atenção considerável nos últimos anos devido aos efeitos benéficos que possui, podendo ser encontrado no óleo das sementes de *C. ecalyculata*, *C. myxa* e *C. sellowiana* (ARREBOLA et al., 2004).



(6)

A espécie *C. verbenacea*, nativa da flora brasileira, consta como matéria prima do primeiro anti-inflamatório produzido no país. O Acheflan®, fabricado pelo Laboratório Farmacêutico Aché, tem em sua composição de 2,3-2,9% de α -humuleno (7), um sesquiterpeno obtido exclusivamente do óleo essencial da espécie, responsável pela propriedade terapêutica da planta (GOMES, 2010).



2.2.3 Importância econômica e tradicional

Além do uso medicinal do gênero *Cordia*, algumas espécies apresentam importância econômica, sendo utilizadas no setor madeireiro, para fins ornamentais e por apresentarem grande potencial melífero (GASPARINO, 2005).

As três espécies mais importantes de *Cordia* que produzem madeira comercial na América, são *C. alliodora* (explorada principalmente na América Central e áreas tropicais a noroeste da Amazônia Brasileira), *C. trichotoma* (explorada principalmente na região Sul do Brasil e regiões limítrofes da Argentina e Paraguai) e *C. goeldiana*. Suas madeiras são amplamente empregadas na confecção de móveis, revestimentos decorativos, marcenaria, em construção civil e naval, assoalho, laminação, compensado, entre outros. *Cordia trichotoma* também é utilizada em esculturas e tornearia permitindo obter valiosas peças (SCHEEREN et al., 2002).

Os arbustos se destacam para fins ornamentais. As árvores são utilizadas em arborização urbana, devido ao seu belo aspecto paisagístico

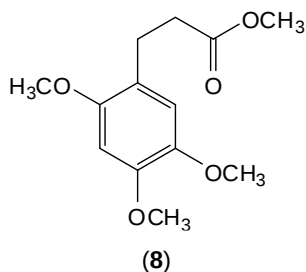
que se forma quando perdem suas folhas no período de floração se cobrindo inteiramente de pequenas e alvas flores de cores exuberantes.

Algumas espécies, como por exemplo, *C. alliodora*, *C. nitida*, *C. collococca*, *C. curassavica*, *C. hirta*, *C. hypoleuca*, *C. leucocephala*, *C. superba*, *C. trichotoma* e *C. verbenacea* apresentam grande potencial melífero. Outras são ainda utilizadas como alimento, como é o caso de *C. myxa*, onde seus frutos são consumidos *in natura* quando maduros e em forma de conservas convenientemente condimentada, quando ainda verdes. Os frutos de *C. sellowiana* também são vendidos maduros *in natura* ou após processo de secagem (BARROSO e OLIVEIRA, 2009).

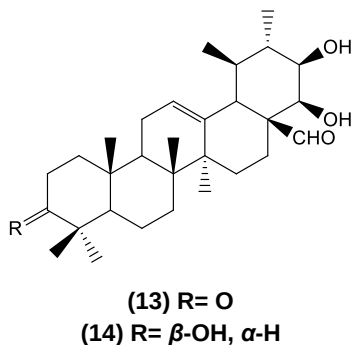
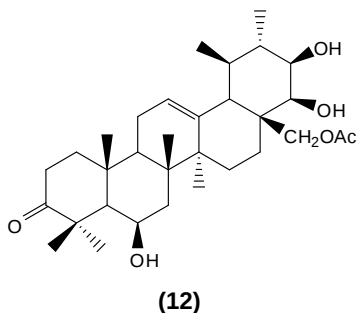
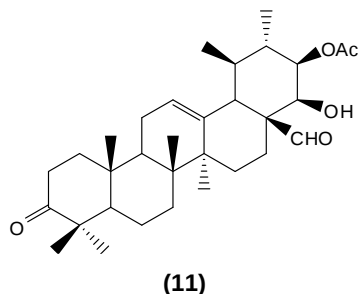
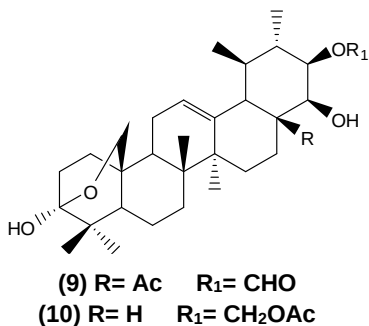
2.2.4 Constituintes químicos e atividades biológicas

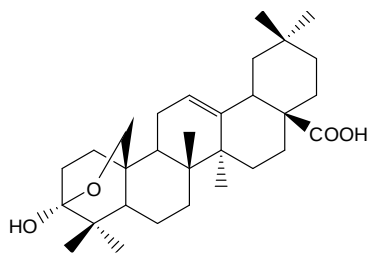
Quimicamente, o gênero *Cordia* apresenta ampla diversidade de classes de metabólitos especiais, que foram identificados em várias espécies, tais como: quinonas, triterpenos, flavonoides, saponinas, taninos, compostos cianogênicos, mucilagens, esteroides, compostos nitrogenados, ácidos graxos (OLIVEIRA et al., 2012), sesquiterpenos, diterpenos, hidroquinonas, álcoois terpênicos, alcaloides (FREITAS et al., 2012), cumarinas, ácidos fenólicos, porfirinas, neolignananas (NOGUEIRA et al., 2013), carboidratos, lipídeos e derivados fenilpropanóide (SILVA et al., 2010). Vários desses constituintes apresentam atividades biológicas descritas na literatura.

O composto 1-(3'-metoxipropanoil)-2,4,5-trimetoxibenzeno (**8**), isolado das cascas da raiz e considerado o princípio ativo de *C. alliodora* e também encontrado em outras espécies do gênero, apresentou atividade larvicida frente às larvas do *Aedes aegypti*, mosquito transmissor da dengue (IOSET et al., 2000).

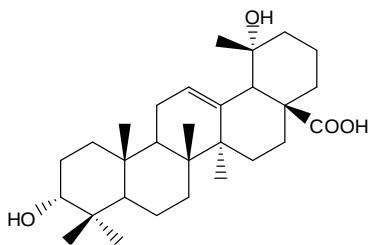


Das folhas de *C. multispicata* foram isolados os triterpenos cordiacetal A **(9)**, cordiacetal B **(10)**, cordianal A **(11)**, cordianona **(12)**, cordianal B **(13)**, cordianal C **(14)**, ácido lantanólico **(15)**, ácido-3-epipomólico **(16)**, ácido lantico **(17)**, icterogenina **(18)**, lantadeno A **(19)**, lantadeno B **(20)**, ácido ursômico **(21)**, ácido pomônico **(22)** e os flavonóis pachipodol **(23)** e retusina **(24)**. Os compostos **(9)**, **(10)**, **(15)**, **(17-20)** apresentaram uma potente atividade anti-androgênica (MASANORI et al., 2001).

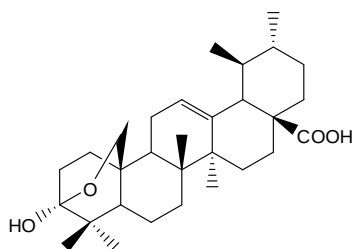




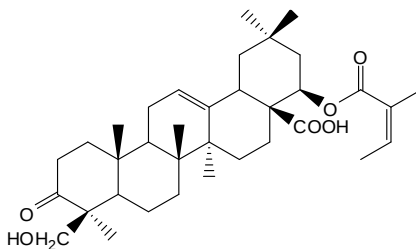
(15)



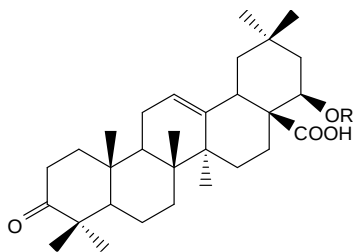
(16)



(17)

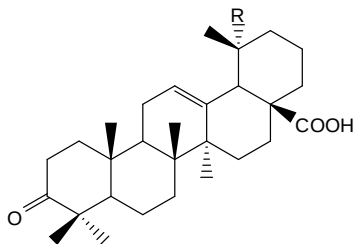


(18)



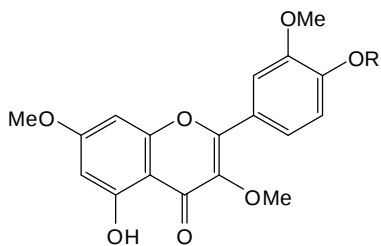
(19) R= 2-metil-2Z-butenoil

(20) R= 3-metilbutenoil



(21) R= H

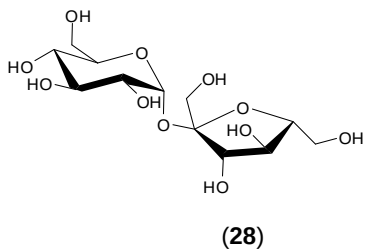
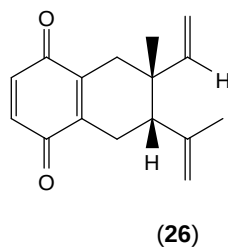
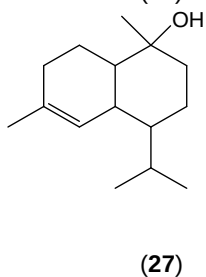
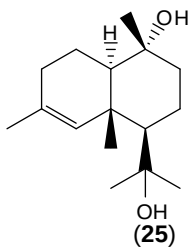
(22) R= OH

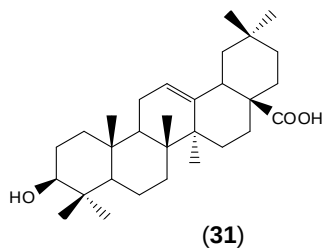
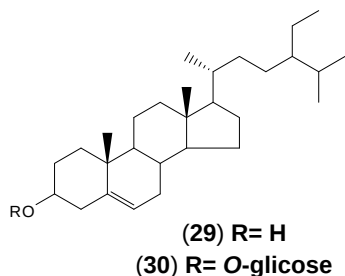


(23) R= H

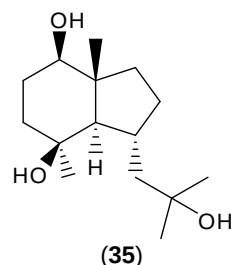
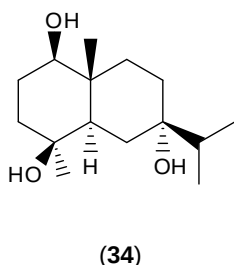
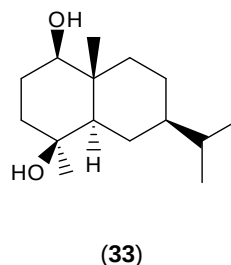
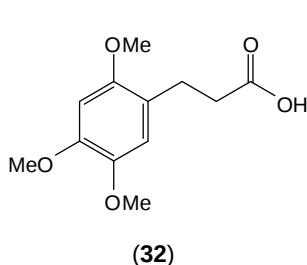
(24) R= Me

Um novo sesquiterpeno, denominado trichotomol (**25**) e compostos conhecidos como cordiacromo C (**26**), α -cadinol (**27**), sacarose (**28**), β -sitosterol (**29**), β -sitosterol glicosilado (**30**), alantoína (**100**) e ácido oleanólico (**31**) foram isolados do cerne de *C. trichotoma* (MENEZES et al., 2001).

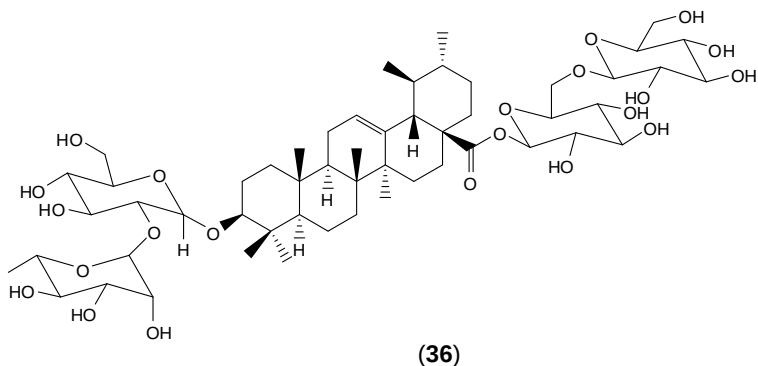




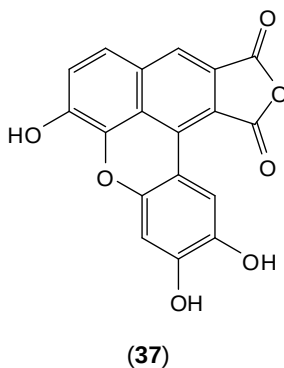
Em estudo posterior, Menezes e colaboradores (2004) isolaram do cerne de *C. trichotoma* mais 2 novos metabólitos especiais, o ácido 3-(2',4',5'-trimetóxiifenil) propanoico (32) e o sesquiterpeno (+)-1 β ,4 β ,6 α -trihidroxieudesmano (33), além de mais 2 sesquiterpenos conhecidos como (+)-1 β ,4 β ,7 α -trihidroxieudesmano (34) e (+)-1 β ,4 β ,11-trihidrioppositano (35).



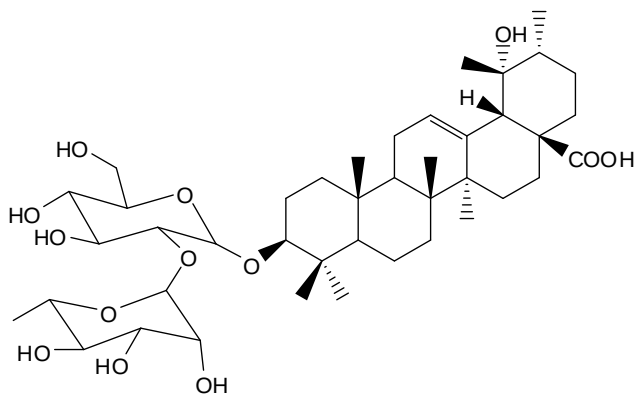
Do caule de *C. piauiensis* foi isolada uma nova saponina bidesmosídica denominada 3 β -O-[α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosil] ácido ursólico-28-O-[β -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glicopiranosil] éster (36) (SANTOS et al., 2003.).



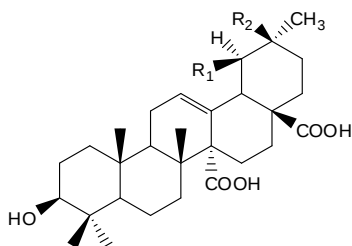
Dos caules e ramos de *C. rufescens* foi isolada uma nova lignana, denominada rufescidride (**37**), do tipo arilnaftaleno, a primeira contendo um radical anidrido incomum (SILVA et al., 2004).



Uma saponina triterpênica monodesmosídica, caracterizada como ácido 3- β -O- α –L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosil pomólico (**38**), foi isolada do caule de *C. piauiensis*. Os triterpenóides ácido quinóico (**39**), ácido cinchólico (**40**), ácido 3- β -O-6-deoxi- β -D-glicopiranosídeo cinchólico (**41**) e 3- β -O- β -D-glicopiranosídeo quinóico (**42**) foram isolados das raízes (SANTOS et al., 2005).

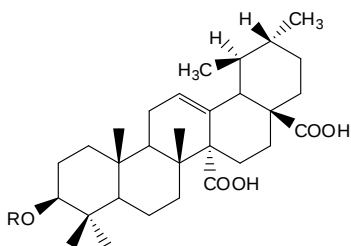


(38)



(39) $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

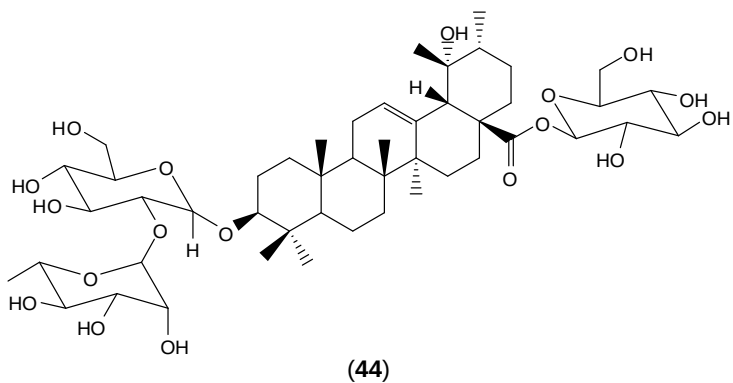
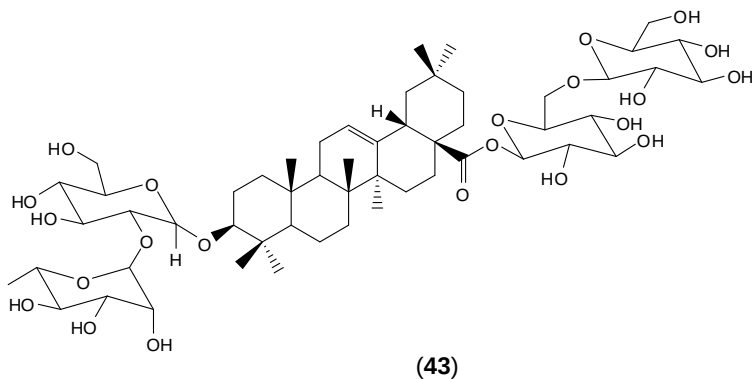
(40) $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$



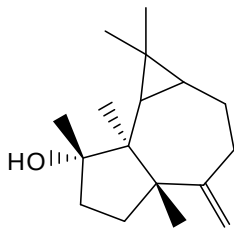
(41) $R = 6\text{-deoxy-}\beta\text{-D-glicosil}$;

(42) $R = \beta\text{-D-glicosil}$;

Em estudo posterior, foram isoladas 2 novas saponinas triterpênica bidesmosídica dos caules de *C. piauhiensis*, que foram denominadas de ácido 3- O - α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glicopiranosil pomólico 28- O - β -D-glicopiranosil éster (43) e ácido 3- O - α -L-ramnopiranosil oleanólico 28- O - β -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glicopiranosil éster (44) (SANTOS et al., 2007).

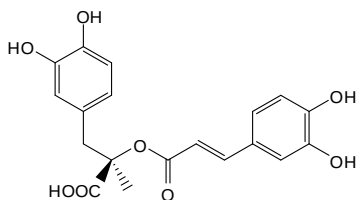


No extrato diclorometano das folhas de *C. salicifolia* foram identificados o β -sitosterol (29) e o (+)-espatulenol (45), sendo o (+)-espatulenol o composto majoritário. Porém, ele exibiu baixa atividade como inibidor do crescimento de *Helicobacter pylori in vitro* (MENGHINI et al., 2008).

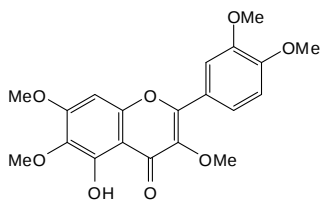


(45)

O extrato metanólico das folhas de *C. verbenacea* inibiu a formação de edema em patas de camundongos, induzido pelo veneno de *Bothrops jararacussue*, sendo o ácido rosmarínico (46), um composto fenólico, o responsável pela atividade anti-inflamatória (TICLI et al 2005). Já o extrato hidroalcoólico e o extrato etanólico das folhas de *C. verbenacea* apresentaram atividade anti-inflamatória e cicatrizante, associada a uma baixa toxicidade e um efeito protetor da mucosa gástrica quando administrados por via oral em roedores, propriedades estas associadas ao flavonóide artemetina (47) (FREITAS, 2010).

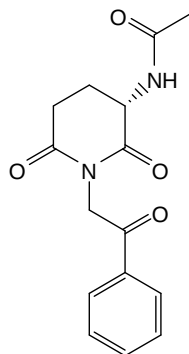


(46)

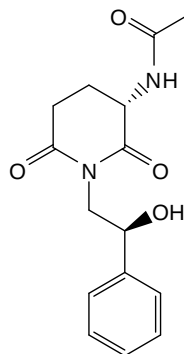


(47)

Cordiarimida A (48) e B (49), alcaloides glutarimidínicos isolados das raízes de *C. globifera*, inibiram a formação do radical ânion superóxido. Cordiarimida B suprimiu a geração de ânion superóxido em células HL-60 de leucemia promielocítica humana diferenciadas quando induzida por 12 - O-tetradecanoilforbol - 13 - acetato (TPA). Essas atividades de eliminação de radicais sugerem que os dois alcaloides apresentam potencial para a quimioprevenção do câncer (PARKS et al., 2010).

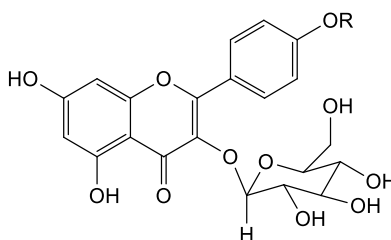


(48)



(49)

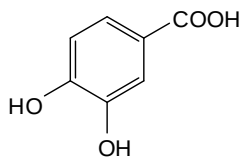
Al-musayeib e colaboradores (2011) avaliaram o potencial anti-inflamatório de dois flavonoides isolados do extrato metanólico da planta inteira de *C. sinensis* pelo teste do edema da pata de rato induzida por carragenina. Foi possível analisar que ambos os compostos denominados de kaempferida-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (**50**) e kaempferol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (**51**) apresentaram potente atividade anti-inflamatória.



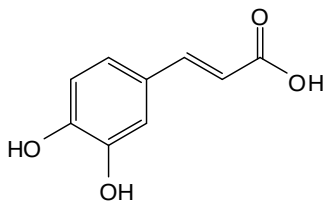
(50) R= Me

(51) R= H

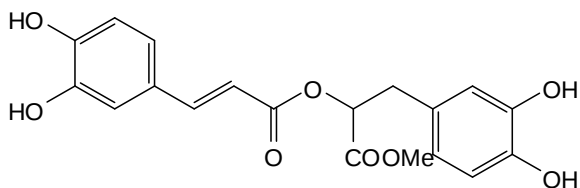
No mesmo estudo é descrito o isolamento de vários outros compostos: ácido protocatecuico (**52**), ácido trans-cafeico (**53**), rosmarinato de metila (**54**) e ácido rosmarínico (**46**) e de mais três flavonoides: quercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (**55**), kaempferida-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glicopiranosídeo (**56**) e kaempferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glicopiranosídeo (**57**).



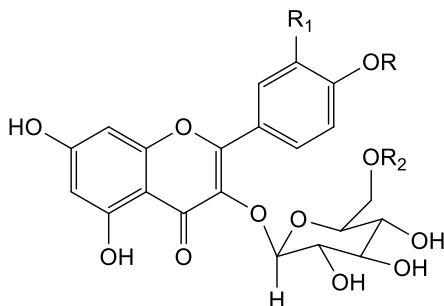
(52)



(53)



(54)

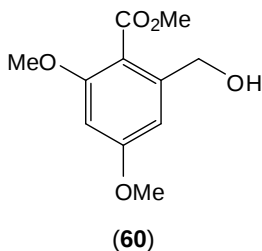
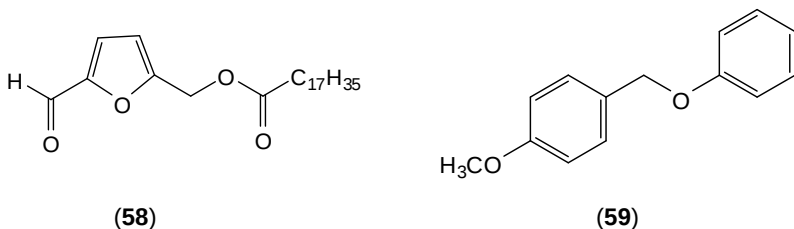


(55) R= H; R₁= OH; R₂= H

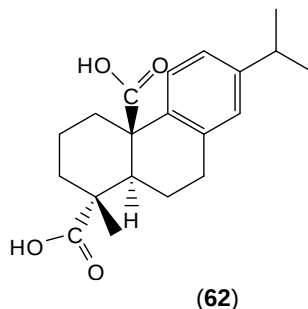
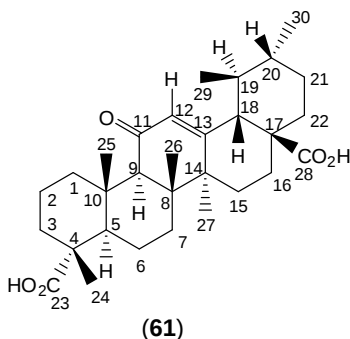
(56) R= Me; R₁= H; R₂= Ramnosil

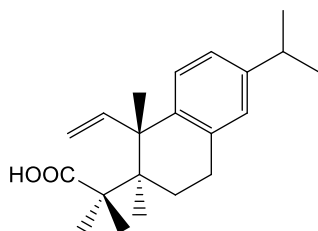
(57) R= H; R₁= H; R₂= Ramnosil

Siddiqui e colaboradores (2010) isolaram dos frutos de *C. latifolia* 2 novos compostos, latifolinal (58) e latifolidina (59), além do composto aromático cordicinol (60).

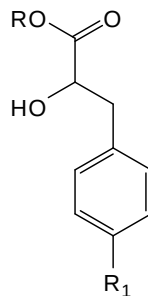


Das cascas do caule de *C. latifolia* foi isolado um triterpenoide raro, pois apresenta um esqueleto amirina, que não têm um átomo de O no C-3, denominado ácido cordinoico (**61**) e 2 diterpenoides, ácido cordioico (**62**) e ácido cordifólico (**63**). Dos frutos foram isolados 4 derivados fenilpropanoides latifolicininas A-D (**64-67**) e o ácido rosmarínico (**46**). Das folhas foram isolados o monoterpene cordinol (**68**), o composto aromático cordicinal (**60**) e o derivado fenilpropanoide cordicilina (**69**). Os compostos **61** e **62** apresentaram atividade nematicida frente à *Meloidogyne incógnita*, causando 100% de mortalidade em concentração 0,50 % após 24 horas (BEGUM et al., 2011).





(63)

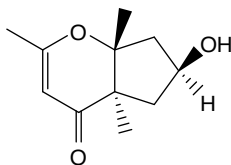


(64) R= Bu; R₁= OH

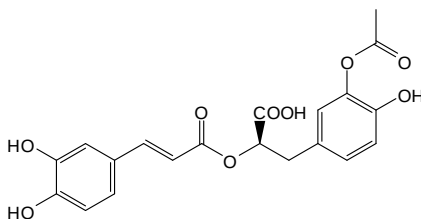
(65) R= Et; R₁= OH

(66) R= Me; R₁= OH

(67) R= H; R₁= MeO

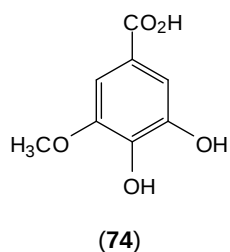
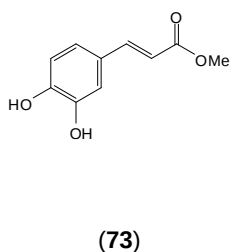
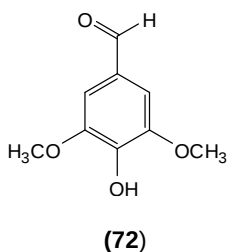
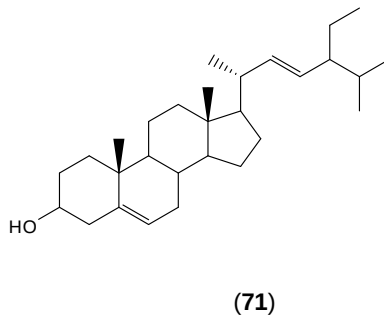
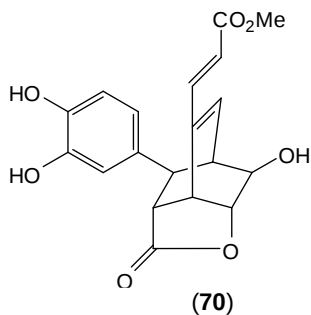


(68)

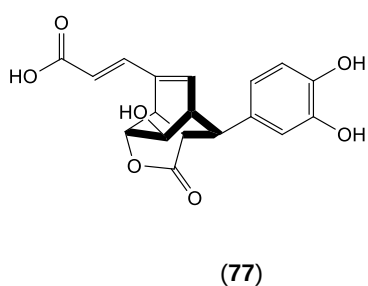
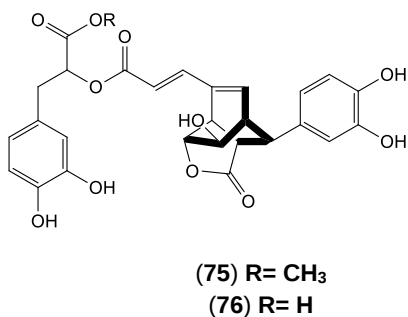


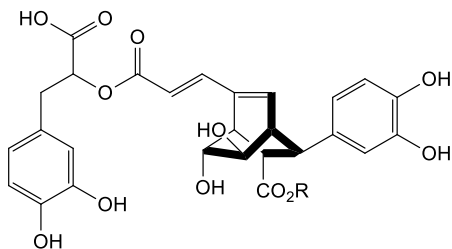
(69)

Dos caules de *C. rufescens* foi isolada uma lignana incomum que possui um esqueleto bicíclico [2.2.2] octano denominada de rufescenolida (70). Também foram isolados o β -sitosterol (29), estigmasterol (71), siringaldeído (72), β -sitosterol glicosilado (30), cafeoato de metila (73), ácido 4-metóxi-protocatecuico (74) e rosmarinato de metila (54) (VALE et al., 2012).



Do extrato etanólico das cascas de *C. americana* foram isoladas 5 neolignanas denominadas de rufescenolida B (**75**), rufescenolida D (**76**), rufescenolida C (**77**), ácido yunaneico I (**78**) e ácido yunaneico J (**79**) que apresentaram boa atividade antioxidante. No entanto, somente a rufescenolida D (**76**) apresentou baixa atividade fungistática contra *Fusarium virguliforme* (FERNÁNDEZ et al., 2013).

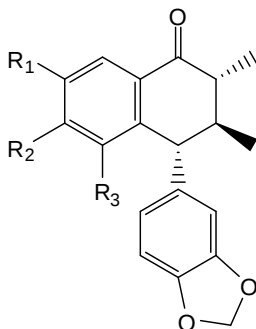




(78) R= H

(79) R= CH₃

Duas neolignanas foram isoladas do extrato metanólico dos frutos de *C. exaltata*, 8,8'-dimetil-3,4,3',4'-dimetilenodioxí-7-oxo-2,7'-ciclolignana (**80**) e 8,8'-dimetil-4,5-dimetóxi-3',4'-metilenodioxí-7-oxo-2,7'-ciclolignana (**81**). Ambas apresentaram atividade antimicrobiana significativa contra bactérias e leveduras (NOGUEIRA et al., 2013).

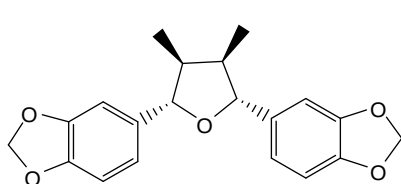


(80) R₁= H; R₂= OCH₃; R₃= OCH₃

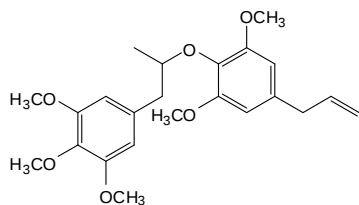
(81) R₁= OCH₃; R₂= OCH₃; R₃= H

No mesmo estudo foram ainda isoladas mais duas neolignanas denominadas de 2,5-bis-(3',4'-metilenodioxifenil)-3,4-dimetiltetrahydrofurano (**82**) e 3,4,5,3',5'-pentametóxi-1'-alil-8.O.4'-neolignana (**83**), quatro porfirinas, feofitina A (**84**), 13-hidroxi feofitina A (**85**), 17-etóxi feoforbida A (**86**) e 13-hidróxi-17-etóxi feoforbida A (**87**), duas cumarinas 1-benzopiran-2-ona (**88**) e 7-hidroxi-1-benzopiran-2-ona (**89**) e cinco flavonoides 3,5,7,3',4'-

pentahidróxiflavanol (**90**), 5,7-diidróxi-4'-metóxiavona (**91**), 5,8-diidróxi-7,4'-dimetóxiavona (**92**), kaempferol 3-*O*- β -D-glicosil-6"- α -L-ramnopiranosídeo (**93**) e kaempferol 3,7-di-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (**94**).

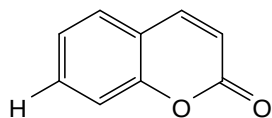
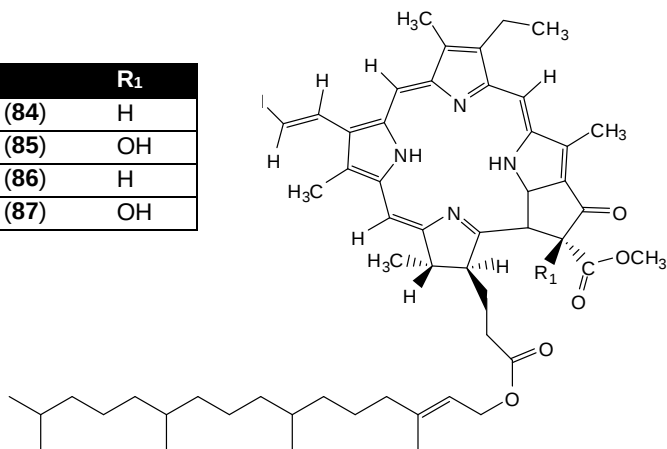


(82)

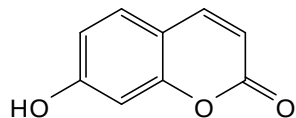


(83)

	R ₁
(84)	H
(85)	OH
(86)	H
(87)	OH

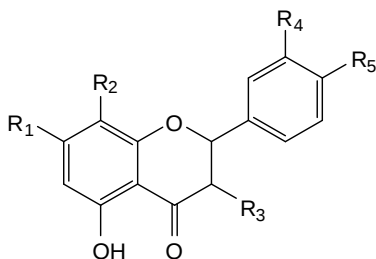


(88)

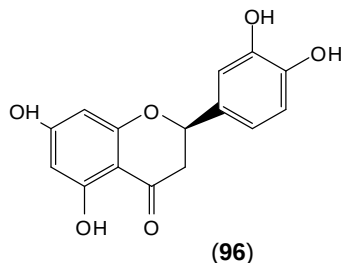
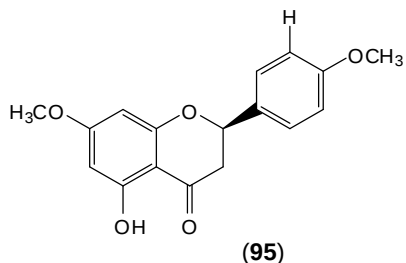


(89)

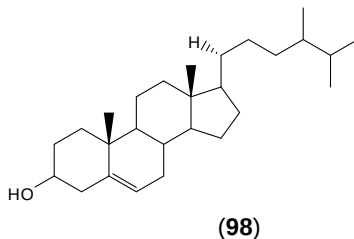
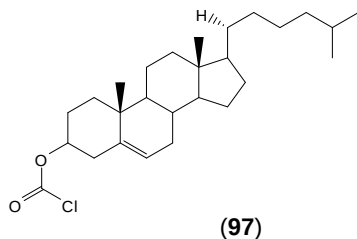
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(90)	OH	H	OH	OH	OH
(91)	OH	H	H	H	OCH ₃
(92)	OCH ₃	OH	H	H	OCH ₃
(93)	OH	H	O-glicose-6"-O ramnose	H	OH
(94)	O-ramnose	H	O-ramnose	H	OH



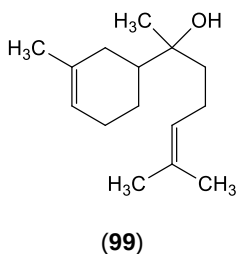
Das partes aéreas de *C. globosa* foram isoladas duas flavanonas denominadas de 7,4'-dimetilnaringenina (**95**) e eriodictiol (**96**) as primeiras agliconas desta classe isoladas no gênero *Cordia* (SILVA et al., 2010).



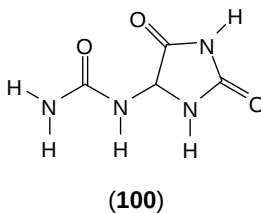
Do extrato éter de petróleo das cascas de *C. macleodii* foram isolados três compostos conhecidos, porém inéditos para a espécie: estigmasterol (**71**), colest-5-en-3-ol(3 β)-carbonil clorado (**97**) e campesterol (**98**) (NARIYA et al., 2014).



Do óleo essencial das folhas de *C. verbenacea* foi isolado um novo sesquiterpeno denominado 6-metil-2-(3-metilciclohex-3-enil)-hept-5-en-2-ol **(99)** (GUIMARAES et al., 2015).



A alantoína **(100)** é uma substância que pertence à classe dos ureídeos e que comumente é encontrada em Boragináceas. Ela já foi isolada a partir do extrato etanólico do cerne de *C. trichotoma* (MENEZES et al., 2001), do extrato aquoso e hidroalcoólico das folhas de *C. coloccoca* (ANDRADE, 2007) e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. ecalyculata*. Trata-se de um pó branco, cristalino, também chamado de 5-ureidohidantoína, glioxildiureído ou cordianina (ASSONUMA, 2009).

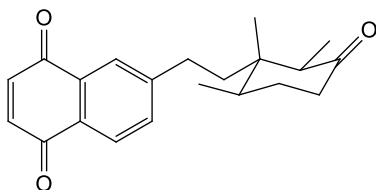


Dentre as várias classes de metabólitos especiais, as quinonas são consideradas marcadores químicos do gênero *Cordia* (SILVA et al.,

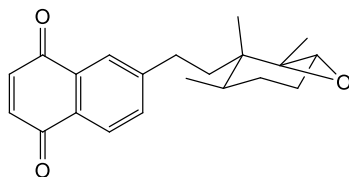
2010). Nos últimos anos intensificou-se o interesse nestas substâncias, não só devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior que apresentam em variados estudos farmacológicos, onde mostram variadas biodinamicidades, destacando-se, dentre muitas, as propriedades microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores, processos nos quais atuam de diferentes formas (SILVA et al., 2003).

As cordiaquinonas B (**101**), E (**102**), G (**103**) e H (**104**), isoladas das raízes de *C. linnaei*, foram testadas frente à *Cladosporium cucumerinum* e *Candida albicans*. Para *C. cucumerinum*, as cordiaquinonas **101**, **102** e **104** apresentaram CIM = 3 µg/mL, enquanto que **103** apresentou CIM = 1,5 µg/mL. Frente a *C. albicans*, as cordiaquinonas **102**, **103** e **104** apresentaram CIM = 6 µg/mL, enquanto que **101** apresentou CIM = 3 µg/mL. Todas exibiram atividades antifúngicas semelhantes às do composto de referência, nistatina, sob as mesmas condições (IOSET et al., 1997). A (+) cordiaquinona J (**105**), obtida das raízes de *C. leucocephala*, apresentou atividade citotóxica frente a linhagens celulares HL-60 (leucemia) e SF-295 (cérebro), mostrando valores de IC₅₀ entre 2,7-6,6 µM em HL-60 e nas células SF-295, respectivamente (MARINHO-FILHO et al., 2010). Já a globiferina (**106**), obtida das raízes de *C. globifera*, apresentou atividade antimicobacteriana significativa contra as cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, com CIM = 6,2 µg/mL (PARKS et al., 2010). As cordiaquinonas B (**101**), N (**107**) e O (**108**), isoladas das raízes de *C. polycephala*, foram avaliadas contra quatro linhagens de células cancerígenas: HCT-8 (colo), HL-60 (leucemia), MDA-MB-435 (melanoma) e SF295 (glioblastoma) mostrando IC₅₀ na faixa de 1,2 a 11,1 µmol.L⁻¹. As cordiaquinonas N (**107**) e O (**108**) foram as mais ativas contra todas as linhagens de câncer, enquanto B (**101**) foi mais seletiva para células leucêmicas com IC₅₀ 2,2 µmol.L⁻¹ (FREITAS et al., 2012). A microfilaquinona (**109**), obtida das raízes de *C. globosa*, também apresentou atividade citotóxica considerável contra várias linhagens de células tumorais (MENEZES et al., 2005).

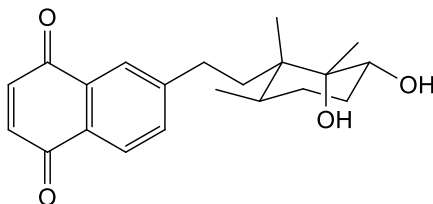
A ocorrência de quinonas em plantas é limitada às raízes e, raramente, são encontradas no tronco (FILHO, 2012; FREITAS et al., 2012).



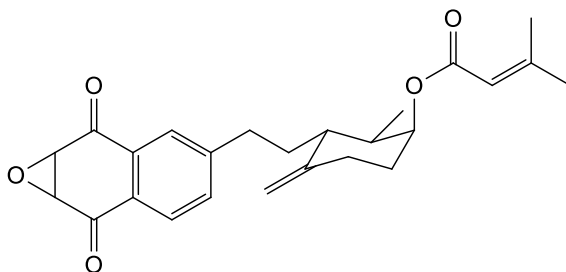
(101)



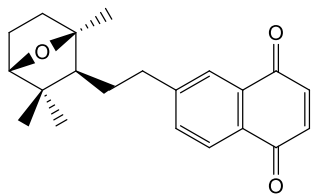
(102)



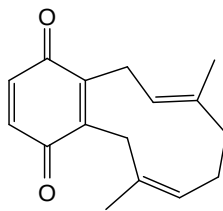
(103)



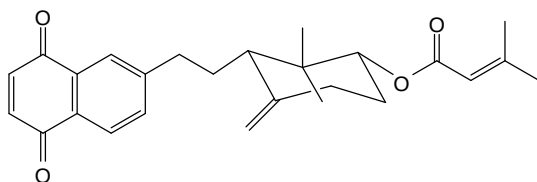
(104)



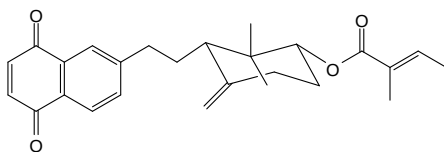
(105)



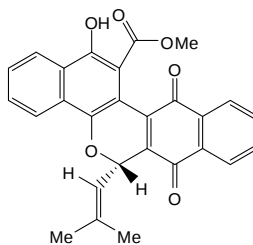
(106)



(107)



(108)



(109)

2.2.5 A espécie *Cordia insignis*

Espécie restrita ao Brasil, distribui-se nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (**Figura 3, pág. 55**) em ambientes de Cerrado e é conhecida popularmente como "calção-de-velho" (MELO e SALES, 2005).



Figura 3 - Distribuição geográfica de *C. insignis*.

Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublica>.

É um arbusto perene, ereto que atinge até 3 m de altura (**Figura 4**). Floresce entre os meses de abril e julho sendo que sua flor, ao abrir, possui cor amarelada, em seguida branqueia, escurecendo na frutificação. O fruto amadurece em poucas semanas, na estação seca (POTT & POTT, 1994).



Figura 4 – Folhas e galhos de *C. insignis*.

Na medicina popular suas folhas são usadas na forma de chá ou garrafada no tratamento de dores em geral e reumatismo (MOREIRA e GUARIM-NETO, 2009).

3. JUSTIFICATIVA

Em levantamento bibliográfico realizado verificou-se que não há relatos de estudos químicos referentes a espécie *C. insignis*. Por isso, considerou-se de interesse a escolha desta espécie para estudo, e, desta forma, contribuir para o conhecimento da flora brasileira e conhecer as

propriedades biológicas da mesma. Seu estudo é promissor tendo em vista que outras espécies do mesmo gênero apresentam diversas atividades biológicas descritas na literatura, sendo produtoras de metabólitos especiais muito importantes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho visa realizar estudos relacionados aos aspectos químicos e atividades biológicas de extratos e frações dos galhos e das folhas de *Cordia insignis* contribuindo para o conhecimento da biodiversidade mato-grossense sobretudo na busca de potenciais moléculas bioativas.

4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Efetuar a coleta e identificação da espécie *C. insignis*;
- ✓ Realizar secagem e trituração dos galhos e das folhas de *C. insignis*;
- ✓ Preparar extrato bruto hidroetanólico dos galhos e das folhas de *C. insignis*;
- ✓ Realizar testes antimicrobianos e antileucêmicos com os extratos e as frações.
- ✓ Executar o fracionamento cromatográfico dos extratos e frações dos galhos e das folhas de *C. insignis*, utilizando partição líquido-líquido com solventes em polaridade crescente que posteriormente serão submetidos a outras técnicas de CCDA, CCDP e cromatografia em coluna com fase estacionária Sephadex e sílica gel;
- ✓ Isolar e efetuar elucidação estrutural dos metabólitos especiais por meio de técnicas espectrométricas e espectroscópicas convencionais como EM, RMN ^1H e de ^{13}C uni e bidimensional.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 MATERIAIS

5.1.1 Materiais de consumo e equipamentos

Os solventes utilizados na preparação dos extratos e fracionamentos cromatográficos foram de grau PA das marcas Vetec, Dinâmica e Chemis.

A sílica utilizada na cromatografia em coluna foi do tipo 70-230 e 230-400 mesh, ambas da marca Silicycle e Macherey-Nagel.

As análises em CCDA foram realizadas em cromatofolhas de alumínio 20x20 cm com gel de sílica 60 F254 da Macherel-Nagel e Merck.

Foi utilizado Sephadex™ LH-20, marca GE Healthcare.

As análises em CCDP foram realizadas em placas cromatográficas 20x20 cm, preparadas a partir da mistura de 9 g de sílica gel 60 para cromatografia em camada fina da Vetec e 6 g de sílica gel 60 para cromatografia em camada fina com UV 254 da Macherey Nagel.

Utilizou-se para trituração das folhas e galhos moinho de facas da marca MARCONI, modelo MA 580/E.

As amostras foram secas na estufa a vácuo TECNAL, modelo TE-395/1 e na estufa da marca FANEM, modelo 315 SE.

Utilizou-se rotavapor, marca BUCHI vacuum controller V-850. Para pesagem das amostras foram utilizadas as balanças da marca SHIMADZU, modelo Libror AEG com capacidade para 220 g e TOLEDO com capacidade de 100 Kg.

As placas cromatográficas foram visualizadas por irradiação com luz no UV ($\lambda = 254$ e 365 nm) em equipamento Spectroline Model CC-80 e/ou reveladas em cuba com vapores de iodo.

A análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi realizada em um aparelho da marca Shimadzu QP5050A, acoplado a um cromatógrafo gasoso, no modo

ionização por impacto de elétrons a 70 eV. A varredura foi efetuada na faixa de massa de 40 a 500 u. Foi utilizada uma coluna DB-5 J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), no modo *split*. A temperatura inicial do forno cromatográfico foi de 100 °C por 1 min, com taxa de aquecimento de 10 °C/min até 290 °C, permanecendo nesta temperatura por 40 min. Os fragmentos foram descritos como razão de massa por carga (*m/z*).

Os espectros de RMN de hidrogênio (¹H) e carbono-13 (¹³C), de uma e duas dimensões, foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance II-500. Os solventes utilizados foram CDCl₃, CD₃OD, C₅D₅N e DMSO-*d*₆ e como referência interna o TMS. Os deslocamentos químicos (δ) foram indicados em ppm e as constantes de acoplamentos (*J*) em Hertz (Hz).

5.1.2 Material botânico

As folhas e galhos de *C. insignis* foram coletadas no dia 28/03/2014 na Rodovia MT 251 km 27, coordenada geográfica S 15°21.964' W 055°57.372'. A amostra testemunho está depositada no Herbário Central da Universidade Federal de Mato Grosso sob o número de exsicata 41.212.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Secagem e pulverização das folhas e galhos de *C. insignis*

As folhas e galhos de *C. insignis* foram separadas e secas em temperatura ambiente e posteriormente pulverizadas em moinho de faca, obtendo-se 1,26 kg do pó das folhas e 2,12 kg do pó dos galhos.

5.2.2 Obtenção dos Extratos

O pó das folhas (1,26 kg) e dos galhos (2,12 Kg) foram extraídos com solução hidroetanólica a 80% v/v. Os extratos foram filtrados e concentrados sob pressão reduzida a 40° C em evaporador rotatório obtendo-se o extrato bruto hidroetanólico dos galhos **EBHEG** (185,21 g; 8,74%) e das

folhas **EBHEF** (166,72 g; 13,23%). Ambos os extratos foram acondicionados em cápsula de porcelana e levados à estufa (30°C) para secagem total.

5.3 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO HIDROETANÓLICO DOS GALHOS (EBHEG)

5.3.1 Partição líquido-líquido

O **EBHEG** (140,0 g) foi submetido a partição líquido-líquido em 250 mL de MeOH:H₂O (8:2), sendo a seguir submetido a extração com Hex (3X500 mL), CHCl₃ (3X500 mL) e AcOEt (3X500 mL). Após eliminação dos solventes e secagem dos resíduos em estufa (30° C), obtiveram-se as frações hexânica (**FHG**) (7,73 g; 5,52%), clorofórmica (**FCG**) (8,38 g; 6%) e acetato (**FAG**) (38,60 g; 27,6%), além do resíduo hidrometanólico (**FRHMG**) (84,25 g; 60,2 %) (**Esquema 1, pág. 62**).

5.3.2 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO HEXÂNICA (FHG)

A fração **FHG** (5,5 g) foi submetida à cromatografia em sílica gel (70-230 mesh). A coluna utilizada tinha altura de 60 cm e diâmetro de 6 cm e a altura da fase estacionária foi de 22 cm. Os solventes usados na eluição foram Hex/AcOEt e AcOEt/MeOH, em ordem crescente de polaridade (**Tabela 1**). Foram obtidas 59 frações de 50 mL, que foram concentradas em rotavapor. Na fração 55 (**FH9**, 10 mg) houve precipitação de um pó branco, a qual não foi agrupada. Após análises de RMN ¹H e ¹³C, esse pó foi identificado como sendo uma mistura dos esteroides glicosilados β -sitosterol (**Substância I**) e estigmasterol (**Substância II**). As demais frações foram agrupadas (**Esquema 1, pág. 62**).

Tabela 1: Fase móvel utilizada na eluição da coluna da fração **FHG**.

Fase móvel	Volume (mL)
Hex	400
Hex/AcOEt (9,5:0,5)	400
Hex/AcOEt (9:1)	1200
Hex/AcOEt (8:2)	1300
Hex/AcOEt (7:3)	800

Cont. da Tabela 1.

Hex/AcOEt (6:4)	700
Hex/AcOEt (1:1)	500
AcOEt/Hex (6:4)	400
AcOEt/Hex (7:3)	600
AcOEt	300
AcOEt/MeOH (9:1)	400
AcOEt/MeOH (8:2)	200
AcOEt/MeOH (7:3)	200
AcOEt/MeOH (1:1)	100
MeOH	350

5.3.2.1 Fracionamento do grupo FH5

O grupo **FH5** (965,2 mg) foi submetido à cromatografia em sílica gel (70-230 mesh). A coluna utilizada tinha altura de 50 cm e diâmetro de 2,5 cm e a altura da fase estacionária foi de 31 cm. Os solventes usados na eluição foram Hex/AcOEt e AcOEt/MeOH, em ordem crescente de polaridade (**Tabela 2**). Foram obtidas 57 frações de 50 mL, que foram concentradas em rotavapor e agrupadas, após análise por CCDA em 8 grupos (**Esquema 1**, **pág. 62**).

Tabela 2: Fase móvel utilizada na eluição da coluna do grupo **FH5**.

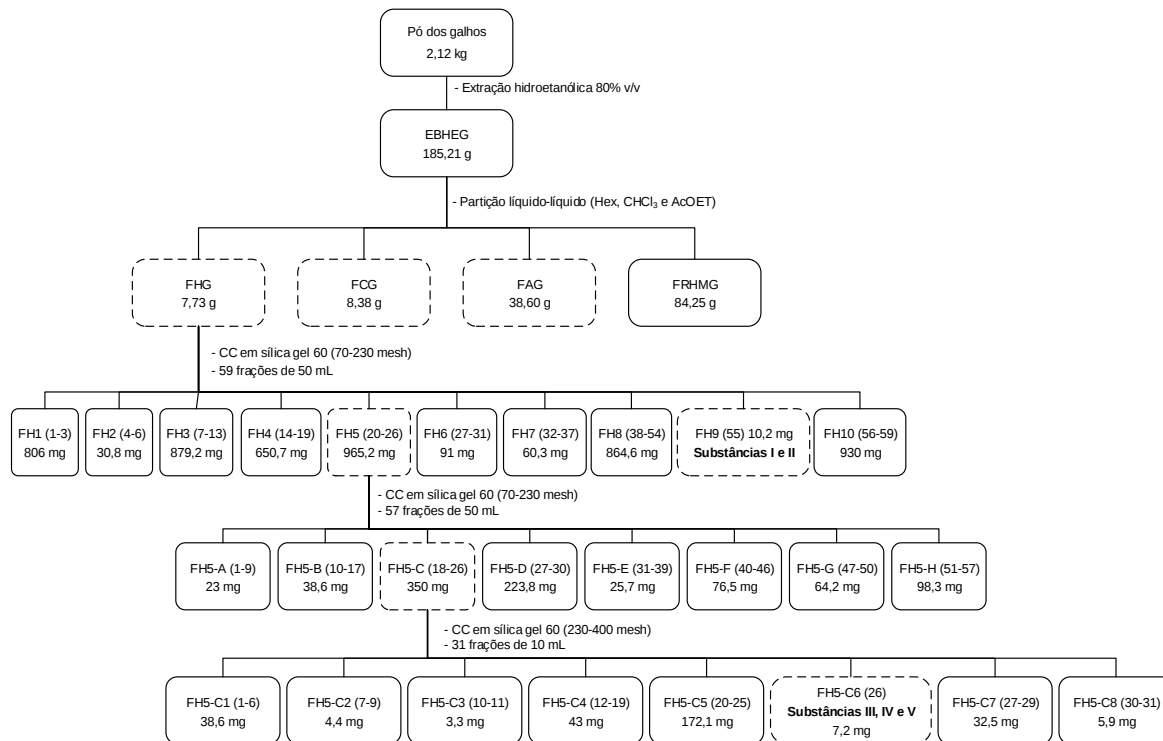
Fase móvel	Volume (mL)
Hex	60
Hex/AcOEt (9,5:0,5)	200
Hex/AcOEt (9,25:0,75)	300
Hex/AcOEt (9:1)	300
Hex/AcOEt (8,5:1,5)	100
Hex/AcOEt (8:2)	200
Hex/AcOEt (7:3)	50
Hex/AcOEt (6:4)	50
Hex/AcOEt (1:1)	50
AcOEt/Hex (7:3)	50
AcOEt	30
AcOEt/MeOH (1:1)	30
MeOH	120

5.3.2.1.1 Fracionamento do grupo FH5-C

O grupo **FH5-C** (350 mg) foi submetido à cromatografia em sílica gel (230-400 mesh). A coluna utilizada tinha altura de 42 cm e diâmetro de 2 cm e a altura da fase estacionária foi de 32,5 cm. Os solventes usados na eluição foram Hex/AcOEt e AcOEt/MeOH, em ordem crescente de polaridade (**Tabela 3**). Foram obtidas 31 frações de 10 mL. A fração 26 (**FH5-C6**, 4,2 mg) se apresentou na forma de um sólido cristalino, a qual não foi agrupada. Após análises de RMN ^1H e ^{13}C , esse sólido foi identificado como sendo uma mistura dos esteroides estigmasterol (**Substância III**), β -sitosterol (**Substância IV**) e campesterol (**Substância V**). As demais frações foram agrupadas (**Esquema 1, pág. 62**).

Tabela 3: Fase móvel utilizada na eluição da coluna do grupo **FH5-C**.

Fase móvel	Volume (mL)
Hex	30
Hex/AcOEt (9,5:0,5)	100
Hex/AcOEt (9:1)	140
Hex/AcOEt (8:2)	60
AcOEt	40
MeOH	10



Esquema 1: Fracionamento cromatográfico da fração FHG.

5.3.3 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA (FCG)

A fração **FCG** (6,45 g) foi submetida à cromatografia em sílica gel (70-230 mesh). A coluna utilizada tinha altura de 58 cm e diâmetro de 3,5 cm e a altura da fase estacionária foi de 36 cm. Os solventes usados na eluição foram $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ e AcOEt/MeOH , em ordem crescente de polaridade (**Tabela 4**). Foram obtidas 85 frações de 100 mL, que foram concentradas em rotavapor e agrupadas em 12 grupos após análise por CCDA (**Esquema 2**, **pág. 65**).

Tabela 4: Fase móvel utilizada na eluição da coluna da fração **FCG**.

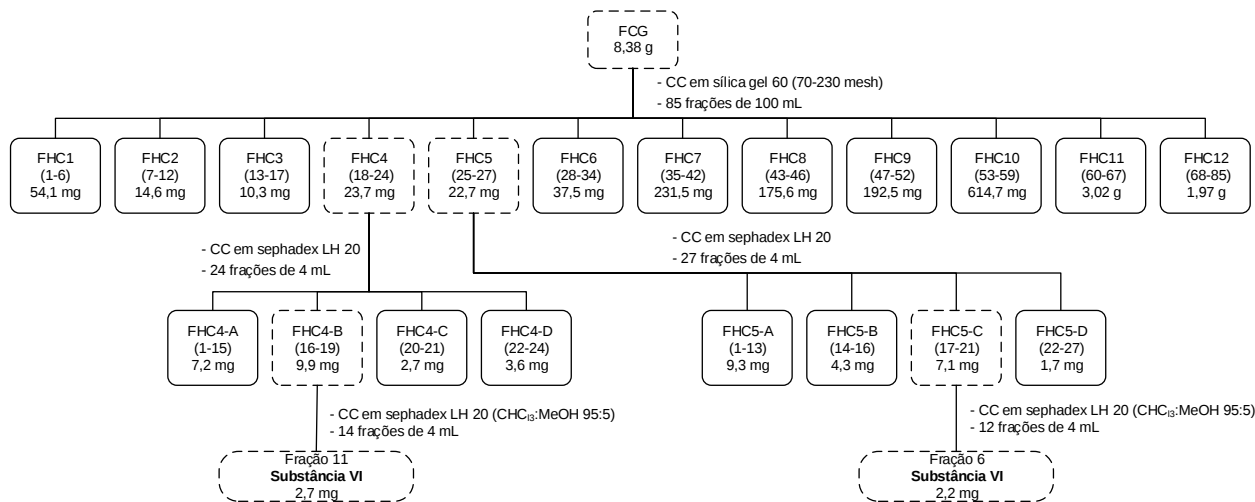
Fase móvel	Volume (mL)
Hex	200
Hex/ CHCl_3 (9:1)	400
Hex/ CHCl_3 (8:2)	300
Hex/ CHCl_3 (7:3)	300
Hex/ CHCl_3 (1:1)	300
CHCl_3 /Hex (8:2)	500
CHCl_3 /Hex (9:1)	300
CHCl_3	300
CHCl_3 /AcOEt (9:1)	700
CHCl_3 /AcOEt (8:2)	400
CHCl_3 /AcOEt (7:3)	600
CHCl_3 /AcOEt (6:4)	650
CHCl_3 /AcOEt (1:1)	400
AcOEt/ CHCl_3 (7:3)	300
AcOEt/ CHCl_3 (9:1)	200
AcOEt	600
AcOEt/MeOH (9:1)	300
AcOEt/MeOH (8:2)	300
AcOEt/MeOH (6:4)	400
AcOEt/MeOH (4:6)	300
AcOEt/MeOH (2:8)	200
MeOH	400

5.3.3.1 Fracionamento do grupo FHC4

O grupo **FHC4** (23,7 mg) foi submetido em CC com sephadex LH-20 utilizando como solvente eluente MeOH (**Esquema 2, pág. 65**). A coluna utilizada tinha altura de 41 cm e diâmetro de 1,8 cm e a altura da fase estacionária foi de 29 cm. Foram obtidas 24 frações de 4 mL, que foram agrupadas em 4 grupos após análise por CCDA. O grupo **FHC4-B** (9,9 mg) foi submetido em CC com sephadex utilizando como solvente eluente o sistema isocrático CHCl_3 :MeOH (95:5). Foram obtidas 14 frações de 4 mL. A fração 11 (2,7 mg) apresentou-se como um sólido branco que após a análise por RMN ^1H e ^{13}C foi identificada como a cumarina escoparona (**Substância VI**).

5.3.3.2 Fracionamento do grupo FHC5

O grupo **FHC5** (22,7 mg) foi submetido em CC com sephadex LH-20 utilizando como solvente eluente MeOH (**Esquema 2, pág. 65**). A coluna utilizada tinha altura de 41 cm e diâmetro de 1,8 cm e a altura da fase estacionária foi de 29 cm. Foram obtidas 27 frações de 4 mL que foram agrupadas em 4 grupos após análise por CCDA. O grupo **FHC5-C** (7,1 mg) foi submetido em CC com sephadex utilizando como solvente eluente o sistema isocrático CHCl_3 :MeOH (95:5). Foram obtidas 12 frações de 4 mL. A **fração 6** (2,2 mg) apresentou-se como um sólido esbranquiçado que após a análise de RMN ^1H e ^{13}C foi identificada como a cumarina escoparona (**Substância VI**).



Esquema 2: Fracionamento cromatográfico da fração **FCG**.

5.3.4 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO (FAG)

A fração **FAG** (30,2 g) foi submetida à cromatografia em sílica gel (70-230 mesh). A coluna utilizada tinha altura de 58 cm e diâmetro de 5,5 cm e a altura da fase estacionária foi de 35 cm. Os solventes usados na eluição foram $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ e AcOEt/MeOH , em ordem crescente de polaridade (**Tabela 5**). Foram obtidas 145 frações de 100 mL, que foram concentradas em rotavapor e agrupadas em 8 grupos após análise por CCDA (**Esquema 3, pág. 69**).

Tabela 5: Fase móvel utilizada na eluição da fração **FAG**.

Fase móvel	Volume (mL)
Hex	200
Hex/ CHCl_3 (9:1)	300
Hex/ CHCl_3 (7:3)	300
Hex/ CHCl_3 (1:1)	500
CHCl_3 /Hex (7:3)	500
CHCl_3 /Hex (9:1)	200
CHCl_3	600
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (9:1)	600
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (8:2)	1700
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (7:3)	600
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (6:4)	1300
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1)	1500
$\text{AcOEt}/\text{CHCl}_3$ (6:4)	1000
$\text{AcOEt}/\text{CHCl}_3$ (7:3)	1300
$\text{AcOEt}/\text{CHCl}_3$ (8:2)	1500
$\text{AcOEt}/\text{CHCl}_3$ (9:1)	1000
AcOEt	800
AcOEt/MeOH (9:1)	1500
AcOEt/MeOH (8:2)	1100
AcOEt/MeOH (7:3)	2100

Cont. da Tabela 5.

AcOEt/MeOH (6:4)	800
AcOEt/MeOH (1:1)	600
MeOH/ AcOEt (6:4)	400
MeOH/ AcOEt (8:2)	400
MeOH	600

5.3.4.1 Fracionamento do grupo FA1

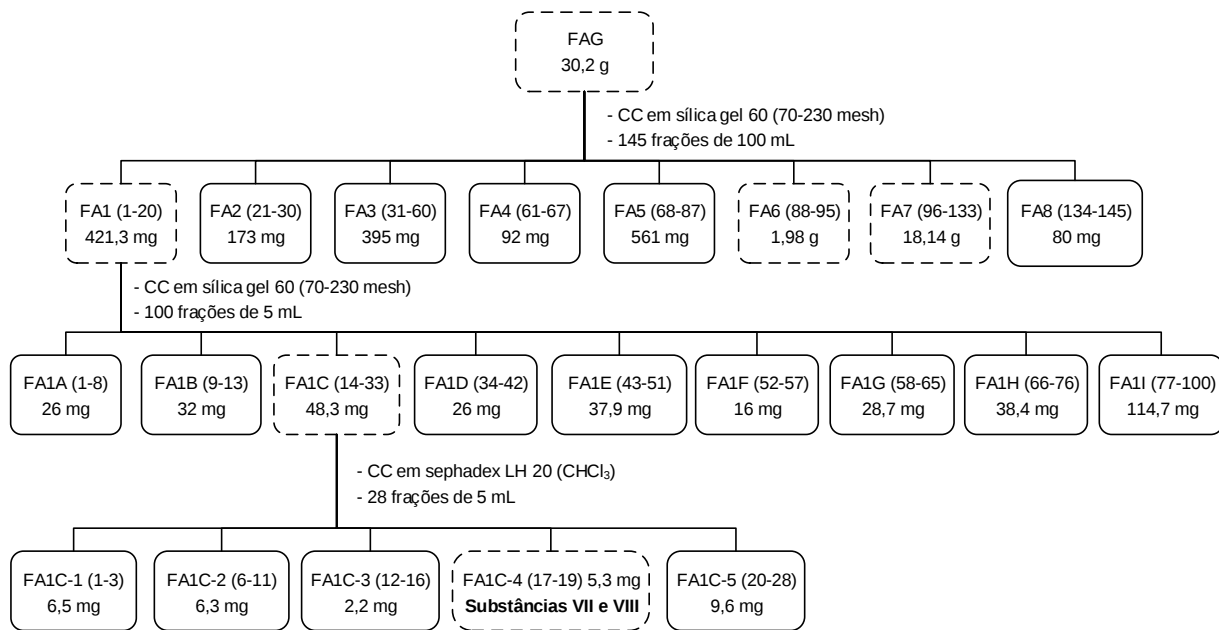
O grupo **FA1** (421,3 mg) foi submetido à cromatografia em sílica gel (70-230 mesh). A coluna utilizada tinha altura de 54 cm e diâmetro de 3 cm e a altura da fase estacionária foi de 36 cm. Os solventes usados na eluição foram $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ e AcOEt/MeOH , em ordem crescente de polaridade (**Tabela 6**). Foram obtidas 100 frações de 5 mL, que foram concentradas em rotavapor e agrupadas em 9 grupos após análise por CCDA (**Esquema 3, pág. 69**).

Tabela 6: Fase móvel utilizada na eluição do grupo **FA1**.

Fase móvel	Volume (mL)
CHCl_3	180
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (9:1)	150
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (8:2)	250
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (7:3)	200
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (6:4)	200
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1)	200
$\text{AcOEt}/\text{CHCl}_3$ (7:3)	100
AcOEt	150
AcOEt/MeOH (9:1)	200
AcOEt/MeOH (8:2)	200
AcOEt/MeOH (7:3)	200
AcOEt/MeOH (6:4)	100
MeOH	100

5.3.4.1.1 Fracionamento do grupo FA1-C

O grupo **FA1C** (48,3 mg) foi submetido em CC com sephadex LH-20 utilizando como solvente eluente CHCl_3 (**Esquema 3, pág. 69**). A coluna utilizada tinha altura de 55 cm e diâmetro de 3 cm e a altura da fase estacionária foi de 40 cm. Foram obtidas 28 frações de 4 mL, que foram agrupadas em 6 grupos após análise por CCDA. O grupo **FAC1-4** (5,3 mg) apresentou-se como um sólido branco que após análises de RMN ^1H e ^{13}C , foi identificado como sendo uma mistura dos triterpenos α -amirina e β -amirina (**Substâncias VII e VIII**).



Esquema 3: Fracionamento cromatográfico da fração **FAG**.

5.3.4.2 Fracionamento do grupo FA6

O grupo **FA6** (1,98 g) foi submetido à cromatografia em sílica gel (70-230 mesh). A coluna utilizada tinha altura de 42 cm e diâmetro de 3,8 cm e a altura da fase estacionária foi de 28 cm. Os solventes usados na eluição foram Hex/AcOEt e AcOEt/MeOH, em ordem crescente de polaridade (**Tabela 7**). Foram obtidas 72 frações de 50 mL, que foram concentradas em rotavapor e agrupadas em 8 grupos após análise por CCDA (**Esquema 4**, **pág. 72**).

Tabela 7: Fase móvel utilizada na eluição do grupo **FA6**.

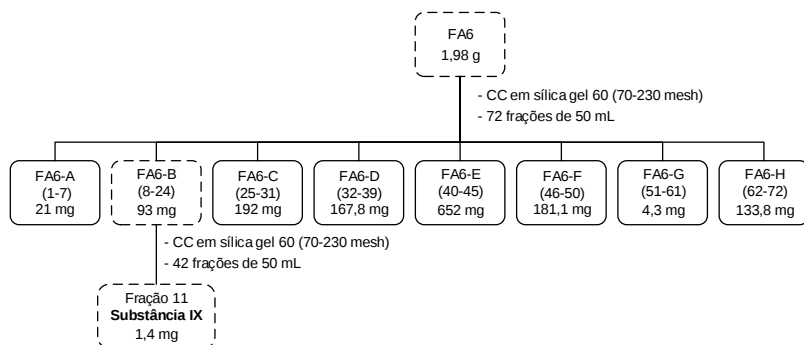
Fase móvel	Volume (mL)
Hex	200
Hex/ AcOEt (9:1)	300
Hex/ AcOEt (8:2)	300
Hex/ AcOEt (7:3)	500
Hex / AcOEt (6:4)	500
Hex / AcOEt (1:1)	400
AcOEt/Hex (6:4)	400
AcOEt/Hex (7:3)	200
AcOEt/Hex (9:1)	200
AcOEt	400
AcOEt/MeOH (9:1)	400
AcOEt/MeOH (8:2)	600
AcOEt/MeOH (7:3)	300
AcOEt/MeOH (6:4)	400
AcOEt/MeOH (1:1)	200
MeOH/ AcOEt (6:4)	200
MeOH/ AcOEt (7:3)	100
MeOH	600

5.3.4.2.1 Fracionamento do grupo FA6-B

O grupo **FA6-B** (93 mg) foi submetido à cromatografia em sílica gel (70-230 mesh) (**Esquema 4, pág. 72**). A coluna utilizada tinha altura de 42 cm e diâmetro de 2 cm e a altura da fase estacionária foi de 14,5 cm. Os solventes usados na eluição foram $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ e AcOEt/MeOH , em ordem crescente de polaridade (**Tabela 8**). Foram obtidas 42 frações de 5 mL. A **fração 11** (1,4 mg) apresentou-se como um sólido amarelado que após a análise de RMN ^1H e ^{13}C foi identificado como sendo o derivado fenilpropanoídico cafeoato de metila (**Substância IX**).

Tabela 8: Fase móvel utilizada na eluição do grupo **FA6-B**.

Fase móvel	Volume (mL)
CHCl_3	100
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (9:1)	100
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (8:2)	100
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (7:3)	100
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (6:4)	50
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1)	100
$\text{AcOEt}/\text{CHCl}_3$ (6:4)	50
$\text{AcOEt}/\text{CHCl}_3$ (7:3)	50
AcOEt	100
AcOEt/MeOH (9:1)	100
AcOEt/MeOH (8:2)	100
AcOEt/MeOH (7:3)	50
AcOEt/MeOH (1:1)	50
MeOH	50



Esquema 4: Fracionamento cromatográfico do grupo **FA6**.

5.3.4.3 Fracionamento do grupo FA7

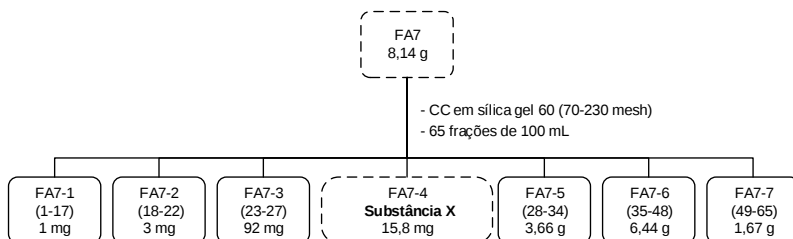
O grupo **FA7** (18,14 g) foi submetido à cromatografia em sílica gel (70-230 mesh) (**Esquema 5, pág. 73**). A coluna utilizada tinha altura de 58 cm e diâmetro de 5 cm e a altura da fase estacionária foi de 28 cm. Os solventes usados na eluição foram $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ e AcOEt/MeOH , em ordem crescente de polaridade (**Tabela 9**). Foram obtidas 65 frações de 100 mL. A **fração 29** (FA7-4; 15,8 mg) apresentou-se como um sólido branco que após a análise de RMN ^1H e ^{13}C foi identificada como sendo o ureído alantoína (**Substância X**).

Tabela 9: Fase móvel utilizada na eluição do grupo **FA7**.

Fase móvel	Volume (mL)
CHCl_3	300
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (9:1)	300
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (8:2)	300
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (7:3)	500
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (6:4)	400
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1)	400
$\text{AcOEt}/\text{CHCl}_3$ (6:4)	300
$\text{AcOEt}/\text{CHCl}_3$ (7:3)	700

Cont. da Tabela 9.

AcOEt/ CHCl ₃ (8:2)	400
AcOEt/ CHCl ₃ (9:1)	400
AcOEt	700
AcOEt/MeOH (9:1)	1200
AcOEt/MeOH (8:2)	1400
AcOEt/MeOH (7:3)	600
AcOEt/MeOH (6:4)	1100
AcOEt/MeOH (1:1)	500
MeOH/ AcOEt (6:4)	400
MeOH/ AcOEt (7:3)	300
MeOH/ AcOEt (8:2)	200
MeOH	800



Esquema 5: Fracionamento cromatográfico do grupo FA7.

5.4 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS (EBHEF)

5.4.1 Retirada da clorofila e Partição líquido-líquido

O **EBHEF** (156,0 g) foi solubilizado em 500 mL de metanol e 500 mL de água destilada e deixou repousar na geladeira por 48h. Posteriormente, filtrou-se a solução para a retirada da clorofila. A solução hidrometanólica obtida foi submetida à partição líquido-líquido, onde foi

extraída com Hex (3x500 mL), CHCl₃ (3x500 mL) e AcOEt (3x500 mL). Após eliminação dos solventes e secagem dos resíduos em estufa (30° C), obtiveram-se as frações hexânica **FHF** (0,25 g; 0,18%), clorofórmica **FCF** (3,95 g; 2,90%), acetato **FAF** (14,23 g; 10,42%) e o resíduo hidrometanólico **FRHMF** (98,3 g; 72%) (**Esquema 6, pág. 76**).

5.4.2 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMICA (FCF)

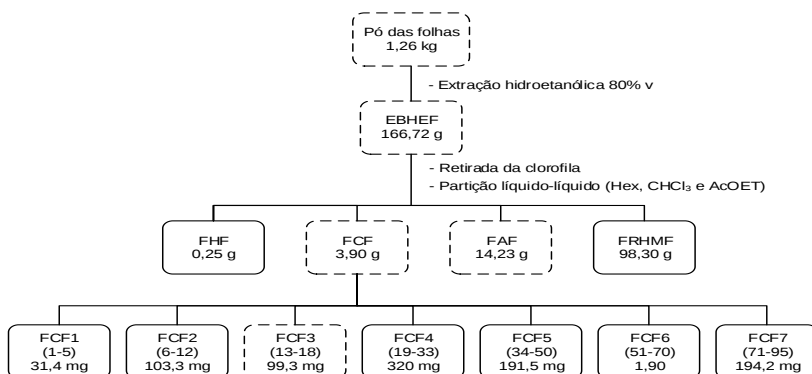
A fração **FCF** (3,0 g) foi submetida à cromatografia em sílica gel (70-230 mesh). A coluna utilizada tinha altura de 39 cm e diâmetro de 3,5 cm e a altura da fase estacionária foi de 15 cm. Os solventes usados na eluição foram Hex/DCM, DCM/AcOEt e AcOEt/MeOH em ordem crescente de polaridade (**Tabela 10**). Foram obtidas 95 frações de 50 mL que foram agrupadas em 7 grupos após análise por CCDA (**Esquema 6, pág. 75**).

Tabela 10: Fase móvel utilizada na eluição da fração **FCF**.

Fase móvel	Volume (mL)
Hex	100
Hex/DCM (9:1)	100
Hex/DCM (8:2)	300
Hex/DCM (7:3)	100
Hex/DCM (6:4)	100
Hex/DCM (1:1)	100
DCM/Hex (6:4)	100
DCM/Hex (7:3)	100
DCM/Hex (8:2)	100
DCM/Hex (9:1)	100
DCM	200
DCM/AcOEt (9:1)	200
DCM/AcOEt (8:2)	300
DCM/AcOEt (7:3)	200
DCM/AcOEt (6:4)	300

Cont. da Tabela 10.

DCM/AcOEt (1:1)	300
AcOEt/DCM (6:4)	200
AcOEt/DCM (7:3)	300
AcOEt/DCM (8:2)	300
AcOEt	200
AcOEt/MeOH (9:1)	200
AcOEt/MeOH (7:3)	200
AcOEt/MeOH (1:1)	200
MeOH/AcOEt (7:3)	200
MeOH	200

**Esquema 6:** Fracionamento cromatográfico do **EBHEF**.**5.4.2.1 Fracionamento do grupo FCF3**

O grupo **FCF3** (99,3 mg) foi submetido à cromatografia em sílica gel (230-400 mesh). A coluna utilizada tinha altura de 40 cm e diâmetro de 2 cm e a altura da fase estacionária foi de 21 cm. Os solventes usados na eluição foram Hex/DCM, DCM/AcOEt e AcOEt/MeOH, em ordem crescente de polaridade (**Tabela 11, pág. 76**). Foram obtidas 70 frações de 50 mL que após análise por CCDA foram agrupadas em 9 grupos (**Esquema 7, pág. 78**).

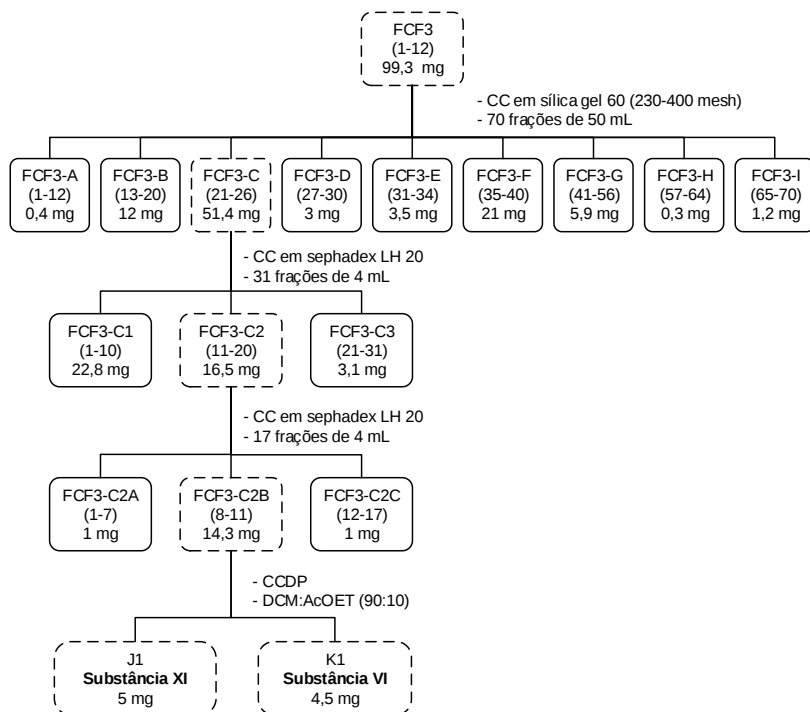
O grupo **FCF3-C** (51,4 mg) foi submetido em CC com sephadex LH-20 utilizando como solvente eluente MeOH. Foram obtidas 31 frações de 4 mL, que após análise por CCDA foram agrupadas em 3 grupos. O grupo **FCF3-C2** (16,5 mg) foi novamente fracionado em CC com sephadex LH-20 utilizando como eluente MeOH. Foram obtidas 17 frações de 4 mL, que após análise por CCDA foram agrupadas em 3 grupos. O grupo **FCF3-C2B** (14,3 mg) foi submetido em CCDP utilizando como solvente eluente DCM:AcOEt (90:10). Foram obtidas 2 manchas denominadas J1 e K1. A mancha **J1** (5 mg) apresentou-se como um sólido esverdeado que após análises de RMN ^1H e ^{13}C foi identificada como a cumarina escopoletina (**Substância XI**). A mancha **K1** (4,5 mg) apresentou-se como um sólido esbranquiçado que foi identificada como a cumarina escoparona (**Substância VI**).

Tabela 11: Fase móvel utilizada na eluição do grupo **FCF3**.

Fase móvel	Volume (mL)
Hex	50
Hex/DCM (9:1)	70
Hex/DCM (8:2)	50
Hex/DCM (7:3)	50
Hex/DCM (6:4)	70
Hex/DCM (1:1)	100
DCM/Hex (6:4)	120
DCM/Hex (7:3)	50
DCM/Hex (8:2)	70
DCM/Hex (9:1)	50
DCM	100
DCM/AcOEt (9:1)	250
DCM/AcOEt (8:2)	100
DCM/AcOEt (7:3)	100
DCM/AcOEt (6:4)	50
DCM/AcOEt (1:1)	50
AcOEt/DCM (6:4)	50

Cont. da Tabela 11.

AcOEt/DCM (7:3)	50
AcOEt/DCM (8:2)	50
AcOEt/DCM (9:1)	50
AcOEt	100
AcOEt/MeOH (9:1)	70
AcOEt/MeOH (8:2)	100
AcOEt/MeOH (7:3)	50
AcOEt/MeOH (6:4)	50
AcOEt/MeOH (1:1)	60
MeOH/AcOEt (6:4)	50
MeOH/AcOEt (7:3)	50
MeOH/AcOEt (8:2)	50
MeOH/AcOEt (9:1)	50
MeOH	150



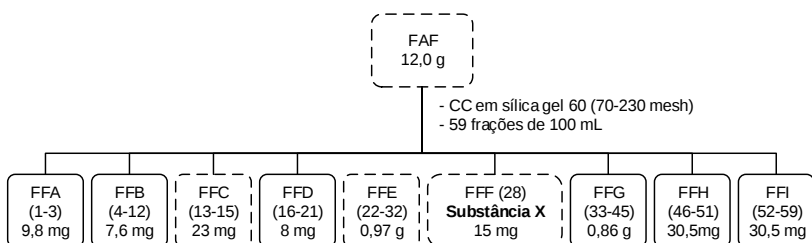
Esquema 7: Fracionamento cromatográfico do grupo **FCF3**.

5.4.3 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO (FAF)

A fração **FAF** (12,0 g) foi submetida à cromatografia em sílica gel (70-230 mesh). A coluna utilizada tinha altura de 71 cm e diâmetro de 6 cm e a altura da fase estacionária foi de 29 cm. Os solventes usados na eluição foram Hex/AcOEt e AcOEt/MeOH, em ordem crescente de polaridade (**Tabela 12, pág. 79**). Foram obtidas 59 frações de 100 mL. A fração 28 (**FFF**; 15 mg) se apresentou como um sólido branco que após a análise de RMN ^1H e ^{13}C foi identificada como sendo o ureido alantoína (**Substância X**). As demais frações foram agrupadas em 8 grupos (**Esquema 8, pág. 79**).

Tabela 12: Fase móvel utilizada na eluição da fração **FAF**.

Fase móvel	Volume (mL)
Hex	200
Hex/AcOEt (9:1)	500
Hex/AcOEt (8:2)	200
Hex/AcOEt (6:4)	200
AcOEt/Hex (6:4)	600
AcOEt/Hex (7:3)	600
AcOEt/Hex (8:2)	500
AcOEt	800
AcOEt/MeOH (9:1)	500
AcOEt/MeOH (8:2)	200
AcOEt/MeOH (7:3)	400
AcOEt/MeOH (6:4)	900
AcOEt/MeOH (1:1)	700
MeOH/AcOEt (6:4)	700
MeOH/AcOEt (7:3)	500
MeOH	1000



Esquema 8: Fracionamento cromatográfico da fração **FAF**.

5.4.3.1 Fracionamento do grupo FFC

O grupo **FFC** (123,0 mg) foi submetido à cromatografia em sílica gel (230-400 mesh). A coluna utilizada tinha altura de 30 cm e diâmetro de 2 cm e a altura da fase estacionária foi de 21,5 cm. Os solventes usados na eluição foram $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ e AcOEt/MeOH , em ordem crescente de polaridade (**Tabela 13**). Foram obtidas 25 frações de 5 mL, que foram agrupadas em 5 grupos após análise por CCDA (**Esquema 9, pág. 81**).

Tabela 13: Fase móvel utilizada na eluição do grupo **FFC**.

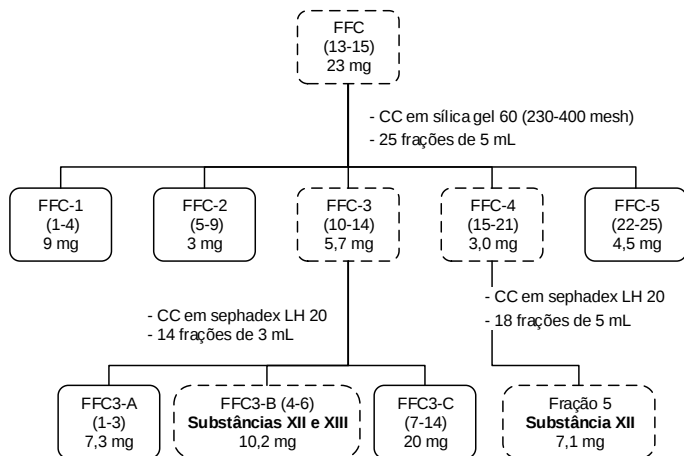
Fase móvel	Volume (mL)
CHCl_3	90
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (9:1)	80
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (8:2)	60
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (7:3)	50
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1)	100
AcOEt	100
AcOEt/MeOH (1:1)	50
MeOH	70

5.4.3.1.1 Fracionamento do grupo **FFC3**

O grupo **FFC3** (45,7 mg) foi submetido em CC com sephadex LH-20 utilizando como solvente eluente MeOH (**Esquema 9, pág. 81**). Foram obtidas 14 frações de 3 mL que foram agrupadas em 3 grupos após análise por CCDA. O grupo **FFC3-B** (10,2 mg) apresentou-se como um sólido amarelo que após as análises de RMN ^1H e ^{13}C foi identificada como sendo uma mistura dos derivados fenilpropanoídico ácido cafeico (**Substância XII**) e rosmarinato de metila (**Substância XIII**).

5.4.3.1.2 Fracionamento do grupo FFC4

O grupo **FFC4** (63 mg) foi submetido em CC com sephadex LH-20 utilizando como solvente eluente MeOH (**Esquema 9**). Foram obtidas 18 frações de 5 mL. A **fração 5** (7,1 mg) apresentou-se como um sólido amarelo que após a análise de RMN ^1H e ^{13}C foi identificada como sendo o derivado fenilpropanoídico ácido cafeico (**Substância XII**).



Esquema 9: Fracionamento cromatográfico do grupo FFC.

5.4.3.2 Fracionamento do grupo FFE

O grupo **FFE** (6,97 g) foi submetido à cromatografia em sílica gel (70-230 mesh). A coluna utilizada tinha altura de 69 cm e diâmetro de 5,5 cm e a altura da fase estacionária foi de 22 cm. Os solventes usados na eluição foram Hex/AcOEt e AcOEt/MeOH, em ordem crescente de polaridade (**Tabela 14, pág. 82**). Foram obtidas 61 frações de 50 mL, que foram agrupadas em 5 grupos após análise por CCDA (**Esquema 10, pág. 84**).

Tabela 14: Fase móvel utilizada na eluição do grupo **FFE**.

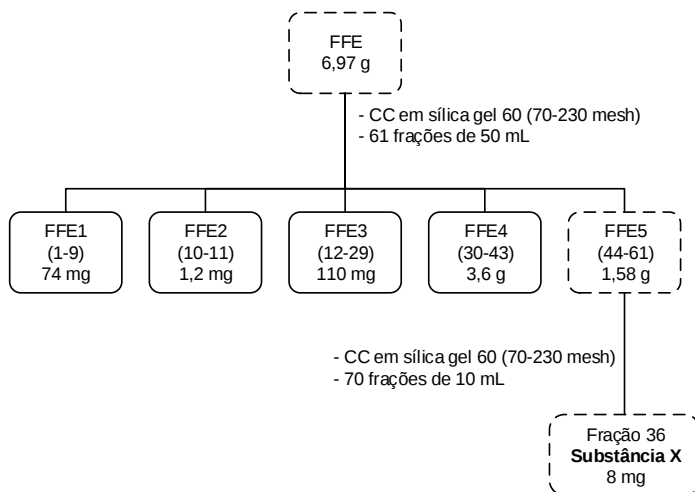
Fase móvel	Volume (mL)
Hex	400
Hex/AcOEt (8:2)	400
Hex/AcOEt (6:4)	200
AcOEt/Hex (6:4)	200
AcOEt/Hex (7:3)	400
AcOEt/Hex (9:1)	400
AcOEt	300
AcOEt/MeOH (9:1)	400
AcOEt/MeOH (8:2)	400
AcOEt/MeOH (7:3)	500
AcOEt/MeOH (6:4)	300
AcOEt/MeOH (1:1)	200
MeOH/AcOEt (8:2)	300
MeOH	300

5.4.3.2.1 Fracionamento do grupo **FFE5**

O grupo **FFE5** (1,58 g) foi submetido à cromatografia em sílica gel (70-230 mesh) (**Esquema 10, pág. 84**). A coluna utilizada tinha altura de 42 cm e diâmetro de 4 cm e a altura da fase estacionária foi de 19,5 cm. Os solventes usados na eluição foram DCM/AcOEt e AcOEt/MeOH, em ordem crescente de polaridade (**Tabela 15, pág. 83**). Foram obtidas 70 frações de 10 mL. A **fração 36** (10,0 mg) apresentou-se como um sólido cristalino que após as análises de RMN ^1H e ^{13}C foi identificada como sendo o ureído alantoína (**Substância X**).

Tabela 15: Fase móvel utilizada na eluição do grupo **FFE5**.

Fase móvel	Volume (mL)
DCM	100
DCM/AcOEt (9:1)	200
DCM/AcOEt (8:2)	400
DCM/AcOEt (7:3)	300
DCM/AcOEt (6:4)	400
DCM/AcOEt (1:1)	200
AcOEt/DCM (6:4)	300
AcOEt/DCM (7:3)	300
AcOEt/DCM (8:2)	300
AcOEt/DCM (9:1)	200
AcOEt	300
AcOEt/MeOH (9:1)	400
AcOEt/MeOH (8:2)	400
AcOEt/MeOH (7:3)	300
AcOEt/MeOH (6:4)	200
AcOEt/MeOH (1:1)	100
MeOH/AcOEt (6:4)	200
MeOH/AcOEt (7:3)	200
MeOH/AcOEt (8:2)	200
MeOH/AcOEt (9:1)	200
MeOH	500



Esquema 10: Fracionamento cromatográfico do grupo FFE.

6. ATIVIDADE BIOLÓGICA

6.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro*

6.1.1 Linhagens microbianas

Para os bioensaios da atividade antimicrobiana foram selecionadas cepas padronizadas originárias da *American Type Culture Collection* (ATCC), disponíveis no Núcleo de pesquisa da Faculdade de Farmácia-Bioquímica, da Universidade de Cuiabá.

No teste da atividade antibacteriana foram utilizadas cinco cepas Gram positivas *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) e *Bacillus subtilis* (6051), e cinco cepas de bactérias Gram negativas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas*

aeruginosa (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Shigella flexneri* (ATCC 12022),

Para os ensaios da atividade antifúngica foram usadas seis cepas de leveduras de *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 9030) *Candida krusei* (ATCC 6258) *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) *Candida tropicalis* (ATCC 760) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32045).

6.1.2 Meios de cultura

No ensaio da atividade antibacteriana foi empregado o meio caldo e ágar Müller-Hinton (MH - Difco®) preparado de acordo com as instruções do fabricante. O pH utilizado foi de 7,2 a 7,4, à temperatura ambiente (25°C). No teste da atividade antifúngica foram utilizados os meios de Sabouraud (Difco®) e RPMI-1640 líquido (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador de vermelho de fenol) (Cultilab®), tamponado com uma solução tampão de MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] numa concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0.

6.1.3 Manutenção dos microrganismos indicadores

Os microrganismos foram mantidos congelados a -20°C em meio BHI (*Brain Heart Infusion* – MERCK®), contendo glicerol, com exceção de *C. neoformans* que foi armazenado a -4°C.

6.1.4 Preparo do padrão McFarland

Foram adicionados 0,5 mL de 0,048 M de BaCl₂ (1,17% peso/volume de BaCl₂.2H₂O) em 99,5 mL de 0,18 M de H₂SO₄ (1% v/v) em um bquer sob forte agitação. O padrão foi distribuído em tubos de ensaio com tampa do mesmo tamanho e do mesmo material usado para o crescimento bacteriano. Os tubos foram firmemente vedados para evitar

evaporação e guardados em ambiente seco e à temperatura ambiente. Antes de ser utilizado, o padrão foi vigorosamente agitado em vórtex.

6.1.5 Preparo do inóculo bacteriano e ajuste da suspensão do inóculo para a densidade de 0,5 da escala de McFarland

Cada cepa bacteriana foi transferida do meio de manutenção para um tubo contendo caldo BHI (*Brain Heart Infusion* – Merck®) e mantida a 35°C por 18 horas, para ativação. Para o isolamento de colônias jovens, alíquotas foram transferidas para uma placa de Petri com Agar Müller Hinton (Difco®) e incubadas a 35°C, por aproximadamente 24 horas.

Após o período de incubação, foram selecionadas de 4 a 5 colônias e transferidas para um tubo contendo 5 mL de solução salina estéril (0,85%), seguido de homogeneização em agitador de tubos por 15 segundos. A turvação da suspensão celular foi ajustada de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão McFarland de 0,5, resultando em uma suspensão contendo aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ células/mL.

Esta solução foi então diluída (1:10) para obter o inóculo com concentração de 10^7 células/mL. Em cada poço da microplaca que recebeu o inóculo, a concentração final ficou entre 5×10^5 e $7,5 \times 10^5$ células/mL (NCCLS, 2003).

6.1.6 Preparo do inóculo dos fungos leveduriformes

Os fungos leveduriformes foram repicados em Agar Sabourad dextrosado (Difco®) e em seguida, incubados a 37°C por 24 horas para as espécies de leveduras do gênero *Candida* e por 48 horas para *C. neoformans*.

Para o preparo do inóculo foram selecionadas entre 4 a 5 colônias de levedura, de aproximadamente 1 mm de diâmetro. As colônias foram suspensas em 5 mL de solução salina a 0,85%, seguido de agitação vigorosa.

Após este período, foi realizada uma diluição de 1:50 e depois de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI 1640, para se obter uma concentração de células de $1 \text{ a } 5 \times 10^3$ UFC/mL. O inóculo foi então diluído a 1:1 quando os poços foram inoculados, chegando-se à concentração final desejada de inóculo ($0,5 \text{ a } 2,5 \times 10^3$ UFC/mL) (NCCLS, 2002).

6.1.7 Ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O método de microdiluição em caldo foi utilizado para a determinação da CIM (NCCLS, 2003), com algumas modificações (MITSCHER et al., 1972; FERESIN et al., 2001; STOPPA et al., 2009).

O método consistiu em preparar diluições sucessivas da amostra a ser testada, em meio de cultura líquido, semear a bactéria e o fungo em estudo e, após incubação, fazer a leitura para se determinar a menor concentração da amostra que inibiu visualmente o crescimento do microrganismo (CIM) (VIOLANTE, 2008).

Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar e com vidrarias, ponteiros e meios de cultura previamente esterilizados.

Os valores da CIM foram determinados pela diluição dos extratos e frações da espécie vegetal em estudo, que foram inicialmente dissolvidas em DMSO 5%, 20 mg extrato e fração/1000µL de DMSO, seguida de uma segunda diluição para que obtivesse concentrações de 2 mg/mL, para o extrato bruto e frações.

As amostras (extrato bruto e frações) foram colocadas em microplacas de 96 poços e diluídas para obtenção das concentrações finais no interior dos poços de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 e 7,8125 µg/mL.

Em seguida foram adicionados 100 µL da suspensão do inóculo, com exceção do poço de número 1, onde foram adicionados apenas a amostra e o meio em questão, para observação de uma possível turbidez ou precipitação provocada pela amostra.

No poço 10 foi realizado o controle padrão com os antimicrobianos pré-determinados, contendo cloranfenicol e anfotericina B (Sigma Chemical Co.®), para os ensaios da atividade antibacteriana e antifúngica, respectivamente. As Concentrações Inibitórias Mínimas dos agentes antimicrobianos utilizados como padrões foram determinadas individualmente para cada cepa fúngica e bacteriana, nas mesmas condições padronizadas para os extratos vegetais, a fim de controlar a sensibilidade dos microrganismos em questão.

No poço 11 fez-se o controle positivo, para observação do crescimento dos microrganismos. No poço 12 o controle de esterilidade (sem microrganismos).

Para verificar se o diluente (DMSO) não apresentava atividade contra as cepas fúngicas e bacterianas os testes foram realizados em uma concentração que não ultrapassou a 5% em relação ao volume total de cada experimento, não sendo observada nenhuma atividade do DMSO sobre os microrganismos.

As placas foram incubadas à temperatura de 35°C, sendo que o tempo estabelecido dependeu da cepa testada, variando de 24 para as cepas bacterianas, 48 horas para cepas fúngicas do gênero *Candida* e 72 horas para cepas fúngicas do gênero *Cryptococcus*. Após o período de incubação, fez-se a leitura visual para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). A CIM é definida como a menor concentração da amostra que inibe o crescimento do microrganismo. O crescimento dos microrganismos foi indicado pela presença de turbidez e comparado o crescimento em cada poço com o crescimento observado no poço 11 (controle positivo). Os testes (diluições) foram realizados em duplicata na mesma placa e repetidos duas vezes.

De acordo com o projeto de pesquisa X.7 do CYTED (Ciencia y Tecnologia para el Desarrollo) "Proyecto Iberoamericano de Búsqueda y Desarrollo de Antifúngicos Naturales y Análogos" (CYTED, 2003), a técnica microbiológica usada na busca de novos compostos antifúngicos a partir de

plantas da flora latinoamericana, baseada principalmente no seu uso etnofarmacológico, será pela determinação da diluição em caldo. Os testes são realizados em concentrações até 1000 µg/mL para extratos brutos e a partir de 250 µg/mL para compostos puros, tendo como fármacos de referência, anfotericina B, cetoconazol e terbinafina.

Segundo Violante (2012) não existe um consenso sobre o padrão de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros qualificam com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibições superiores. Aligiannis *et al.* (2001) *apud* Duarte e colaboradores (2004), sugeriram uma classificação para produtos vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como: forte inibição: CIM até 500 µg/mL; inibição moderada: CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição: CIM acima de 1600 µg/mL.

Outros estudos consideraram ativos os extratos vegetais com valores de CIM inferiores a 1000 µg/mL (FERESIN *et al.*, 2001; ESCALANTE *et al.*, 2002; MUSCHIETTI *et al.*, 2005; KUETE e EFFERTH, 2010).

6.1.8 Método de diluição em placas utilizando resazurina como revelador

Após a leitura foram colocados 30 µL de resazurina (0,0001g/mL) (Vetec®) em solução aquosa esterilizada, em cada compartimento (ALVES *et al.*, 2008; CABRAL *et al.*, 2009). A microplaca foi, então, novamente colocada na estufa a 35°C. Após 2 horas, foi realizada a análise da mudança de cor. Nos poços em que não houve mudança na cor do corante, ou seja, permaneceu roxo, foi considerado como ausência de bactérias viáveis. Qualquer evidência na mudança da coloração se considerou crescimento bacteriano.

A mudança de cor pode ser explicada levando-se em conta que a resazurina é um corante azul (fenoxazin-3-ona) não fluorescente que se torna rosa e fluorescente quando é reduzido à resofurina através de uma reação

de óxido-redução por células microbianas vivas e tem sido muito utilizada para avaliar a viabilidade e contaminação bacteriana e para testar a atividade antimicrobiana (MONTEJANO et al., 2005; VIOLANTE, 2012).

6.2 ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA *in vitro*

6.2.1 Cultura das células

As células Kasumi-1, HL-60, K562 e RAJI foram obtidas no Banco Celular do Rio de Janeiro (BCRJ). Após descongelamento, as células cultivadas foram mantidas como suspensões em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), pH 7,4, suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco®), 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em frascos de cultura á 37 °C em 5% de atmosfera de CO₂ (Sanyo MCO-20AIC).

6.2.2 Dupla-coloração por Anexina V-FITC/Iodeto de propídio e Análise Citométrica de Fluxo

As linhagens celulares foram semeadas (1×10^5 /mL) em placas de 96 poços e incubadas com os extratos de *C. insignis* ou estaurosporina (Sigma-Aldrich) na concentração de 100 µg/mL, durante 24 h.

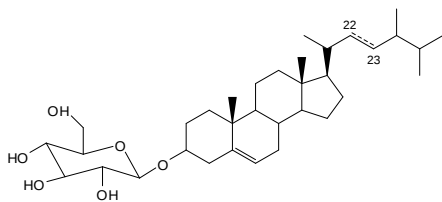
As células foram coletadas e ressuspensas em 200 µL do tampão anexina V [(10 mM HEPES pH 7,4), 140 mM NaCl e 2,5 mM CaCl₂], e, em seguida, incubadas à temperatura ambiente com 1 µL de anexina V-FITC (Becton Dickinson) e 5 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich), durante 30 min a 37 °C. A análise das amostras foi realizada utilizando um Citômetro de Fluxo BD Accuri C6 (Becton Dickinson), com aquisição de 5.000 eventos.

6.2.3 Análise estatística

Os resultados dos testes paramétricos foram expressos em média $\pm$ SEM. Para a análise de variância simples (ANOVA) foi utilizada para comparação de mais de dois meios seguido de comparação múltipla de Dunnett um teste *post-hoc*, com valores de $p < 0,05$ sendo considerados significativos. Software GraphPad Prism 5 versão 5.01 foi usado para análise de dados.

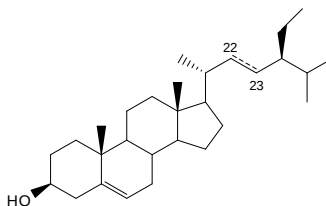
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Substâncias isoladas dos galhos de *C. insignis*

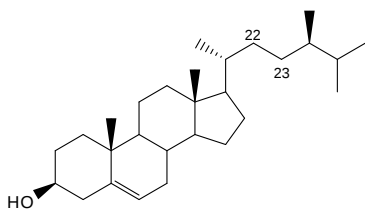


(I) 3-*O*- β -*D*-glicopiranosil sitosterol
[22,23 diidro]

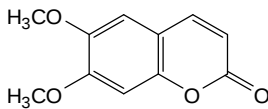
(II) 3-*O*- β -*D*-glicopiranosil estigmasterol
[$\Delta^{22,23}$]



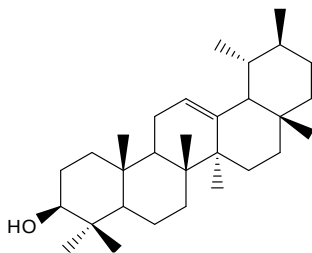
(III) β -sitosterol [22,23 diidro]
(IV) estigmasterol [$\Delta^{22,23}$]



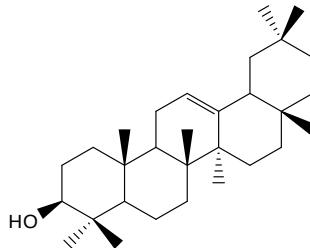
(V) campesterol



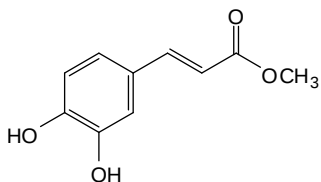
(VI) escoparona



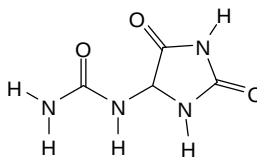
(VII) α -amirina



(VIII) β -amirina

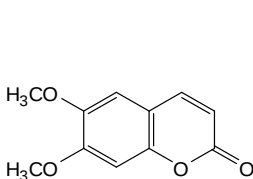


(IX) cafeoato de metila

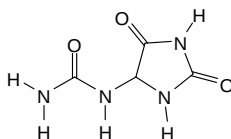


(X) alantoína

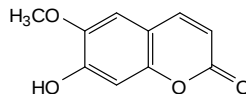
7.2 Substâncias isoladas das folhas de *C. insignis*



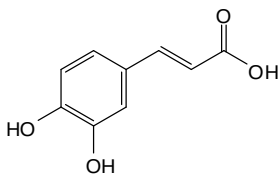
(VI) escoparona



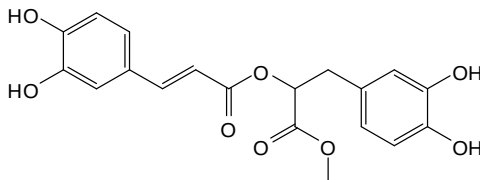
(X) alantoína



(XI) escopoletina



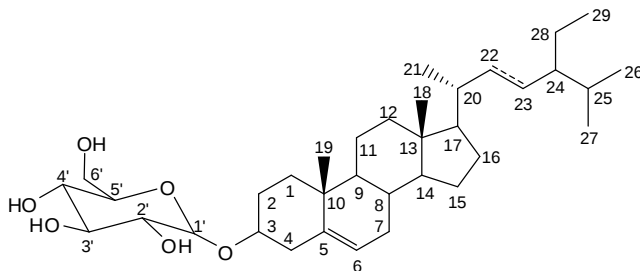
(XII) ácido cafeico



(XIII) rosmarinato de metila

7.3 Substâncias I e II (3-O- β -D-glicopiranosil sitosterol e 3-O- β -D-glicopiranosil estigmasterol)

As substâncias I e II foram isoladas em mistura e apresentaram-se como um sólido branco, solúvel em piridina, que foram identificadas através das análises dos dados de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135 comparados com valores descritos na literatura (SOARES, 2015), como sendo os esteroides 3-O- β -D-glicopiranosil sitosterol (I) e 3-O- β -D-glicopiranosil estigmasterol (II).



3-*O*- β -*D*-glicopiranosil sitosterol [22,23 diidro] (I)

3-*O*- β -*D*-glicopiranosil estigmasterol [$\Delta^{22,23}$] (II)

No espectro de RMN ^1H (**Figuras 5-6, pág. 98**) da mistura das substâncias I e II foi possível observar na região de δ 0,6-2,8 ppm, vários sinais característicos de hidrogênios de esteroides de difícil atribuição devido a sobreposição dos mesmos. Observa-se um singlete largo em δ 5,35, relativo ao hidrogênio ligado ao carbono olefínico C-6 dos esteroides. Nota-se um multipeto em δ 3,82-3,91 (H-3), o qual foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico C-3. O espectro também apresentou dois duplos dupletos em δ 5,20 (H-22) e δ 5,05 (H-23), ambos com $J= 15,1$ e $8,7$ Hz, característicos de hidrogênios ligados a carbonos olefínicos da dupla ligação presente na cadeia lateral do estigmasterol. Além dos deslocamentos anteriormente citados, relativos às estruturas do estigmasterol e do sitosterol, são observados, ainda, sinais que caracterizam a presença de uma unidade de carboidrato. O duplete largo em δ 4,87 ($J= 7,7$ Hz) refere-se ao hidrogênio do carbono anomérico C-1' e o valor de J indica que o açúcar possui configuração β . Observa-se também um duplo duplete em δ 4,17 ($J= 11,7$ e $5,4$), atribuídos aos H-6'a/H-6'b e dois multipletos sobrepostos em δ 3,98-4,05 (H-2' e H-3') e outro em δ 4,32-4,38 (H-4' e H-5').

O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 7, pág. 99**) demonstrou sinais em δ 140,7 e 121,7 que caracterizam os carbonos olefínicos C-5 e C-6 dos esteróides. Na análise do DEPT 135 (**Figuras 8-10, págs. 99-100**) foi possível observar os sinais em δ 138,6 e δ 129,2, referentes aos carbonos

olefínicos C-22 e C-23 do estigmasterol. Como o β -sitosterol glicosilado não possui ligação dupla na cadeia lateral, os C-22 e C-23 apresentaram sinais em δ 33,9 e δ 26,1 respectivamente. O sinal em δ 78,2 foi atribuído ao carbono carbinólico C-3 e o em δ 102,3 ao carbono anomérico C-1'. Esse açúcar foi identificado como sendo a glicose devido aos deslocamentos químicos dos carbonos metínicos em δ 75,0 (C-2'), δ 77,9 (C-3'), δ 71,4 (C-4'), δ 78,3 (C-5') e do carbono metilênico em δ 62,5 (C-6').

O 3-*O*- β -D-glicopiranosil sitosterol (**I**) e o 3-*O*- β -D-glicopiranosil estigmasterol (**II**) já foram isolados na espécie *C. exaltata* (NOGUEIRA et al., 2013). Também há relatos do isolamento do 3-*O*- β -D-glicopiranosil sitosterol (**I**) nas espécies *C. trichotoma* (MENEZES et al., 2001) e *C. rufescens* (VALE et al., 2012). Os dados de RMN ^1H e DEPT 135 de (**I**) e (**II**), juntamente com dados descritos na literatura (SOARES, 2015), estão demonstrados nas **Tabelas 16 e 17 (págs. 96-97)**, respectivamente.

Tabela 16. Dados de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das substâncias I e II em comparação com dados da literatura (SOARES, 2015).

H	β -sitosterol glicosilado δH (ppm) ^a	I δH (ppm) ^a	estigmasterol glicosilado δH (ppm) ^a	II δH (ppm) ^a
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	3,82-3,91 (<i>m</i>)	-	3,82-3,91 (<i>m</i>)
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	5,30 (<i>s</i>)	5,35 (<i>s</i>)	5,30 (<i>s</i>)	5,35 (<i>s</i>)
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	5,01-5,22 (<i>m</i>)	5,20 (<i>dd</i>)
23	-	-	5,01-5,22 (<i>m</i>)	5,05 (<i>dd</i>)
24	-	-	-	-
25	-	-	-	-
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
1'	4,58-3,60 (<i>m</i>)	4,87 (<i>d</i>)	4,58-3,60 (<i>m</i>)	4,58-3,60 (<i>m</i>)
2'	4,58-3,60 (<i>m</i>)	3,98-4,05 (<i>m</i>)	4,58-3,60 (<i>m</i>)	4,58-3,60 (<i>m</i>)
3'	4,58-3,60 (<i>m</i>)	3,98-4,05 (<i>m</i>)	4,58-3,60 (<i>m</i>)	4,58-3,60 (<i>m</i>)
4'	4,58-3,60 (<i>m</i>)	4,32-4,38 (<i>m</i>)	4,58-3,60 (<i>m</i>)	4,58-3,60 (<i>m</i>)
5'	4,58-3,60 (<i>m</i>)	4,32-4,38 (<i>m</i>)	4,58-3,60 (<i>m</i>)	4,58-3,60 (<i>m</i>)
6'	4,58-3,60 (<i>m</i>)	4,17 (<i>dd</i>)	4,58-3,60 (<i>m</i>)	4,58-3,60 (<i>m</i>)

^aRMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

Tabela 17. Dados de RMN DEPT 135 (125 MHz, C₅D₅N) da mistura das substâncias I e II em comparação com dados da literatura (SOARES, 2015).

C	β -sitosterol glicosilado δC (ppm) ^a	I δC (ppm)	estigmasterol glicosilado δC (ppm) ^a	II δC (ppm)
1	37,23	37,27	37,23	37,27
2	29,80	30,03	28,24	30,03
3	78,15	78,21	78,15	78,21
4	38,86	42,27 [*]	38,86	42,27 [*]
5	140,52	140,72 [*]	140,52	140,72 [*]
6	121,65	121,71	121,65	121,71
7	31,83	31,96	31,83	31,96
8	31,83	31,84	31,83	31,84
9	50,11	50,13	51,20	50,13
10	36,65	36,71 [*]	36,65	36,71 [*]
11	19,80	21,07	21,01	21,07
12	39,73	39,11	39,73	39,11
13	42,26	42,13 [*]	42,26	42,13 [*]
14	56,66	56,62	56,66	56,62
15	23,10	24,29	24,27	24,29
16	26,12	28,33	29,80	28,33
17	56,01	56,03	55,92	56,03
18	11,81	11,77	11,81	11,77
19	19,04	19,00	19,24	19,00
20	36,10	36,17	36,15	36,17
21	18,68	18,80	18,79	18,80
22	33,94	33,99	138,40	138,61
23	24,26	26,16	129,22	129,26
24	45,81	45,82	43,88	45,82
25	28,24	29,25	26,11	29,25
26	18,79	19,77	19,80	19,77
27	19,24	19,21	19,04	19,21
28	21,01	23,17	29,80	25,48
29	11,97	11,95	11,98	11,95
1'	102,01	102,32	102,90	102,32
2'	74,38	75,09	75,09	75,09
3'	77,59	77,96	78,15	77,96
4'	71,40	71,46	71,39	71,46
5'	77,28	78,34	78,15	78,34
6'	62,63	62,57	62,63	62,57

^{*}Esses sinais não apareceram no espectro DEPT 135, porém, apareceram no RMN ¹³C.

^aRMN ¹H (400 MHz, CDCl₃+C₅D₅N) e RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃+C₅D₅N)

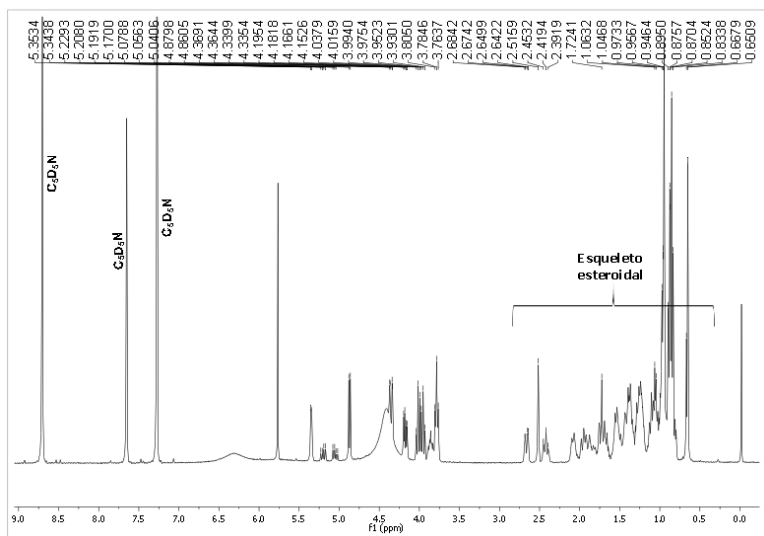


Figura 5: Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) das substâncias I e II.

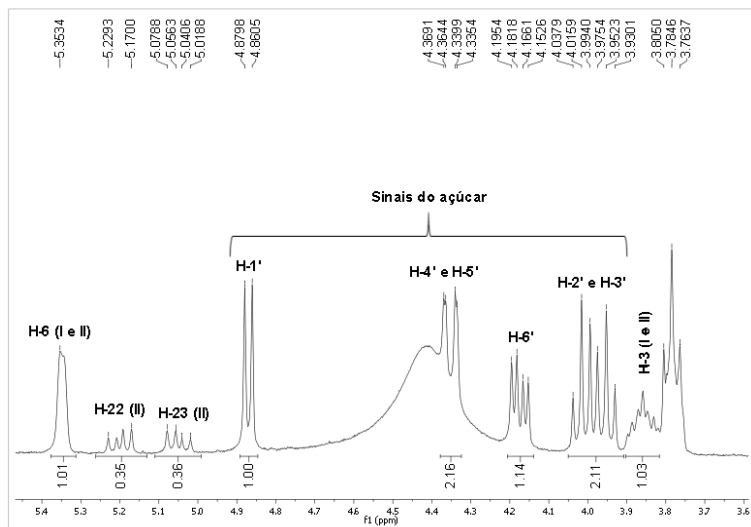


Figura 6: Expansão do espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) das substâncias I e II entre δ_{H} 3,6-5,4 ppm

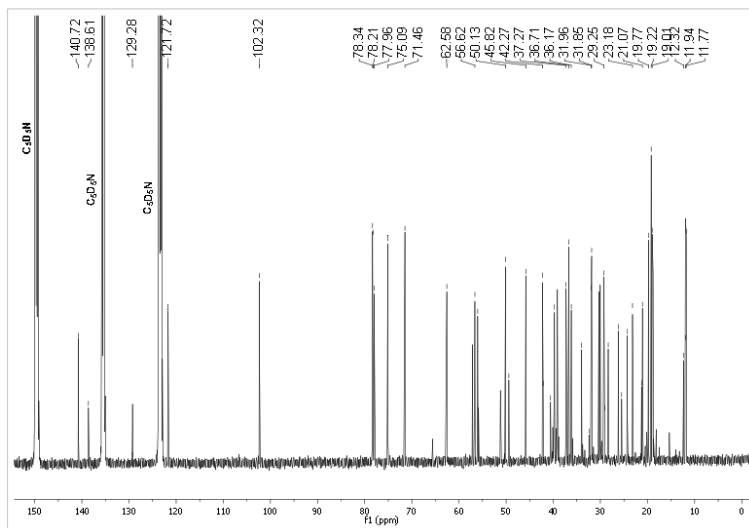


Figura 7: Espectro de RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) das substâncias I e II.

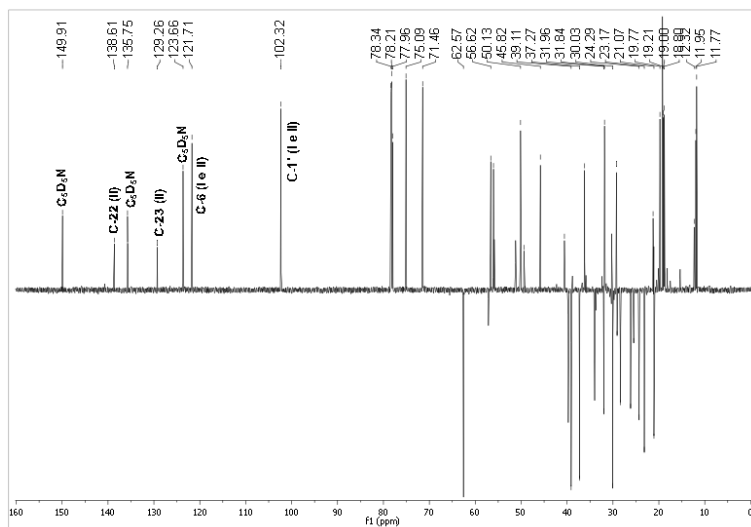


Figura 8: Espectro de DEPT 135 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) das substâncias I e II.

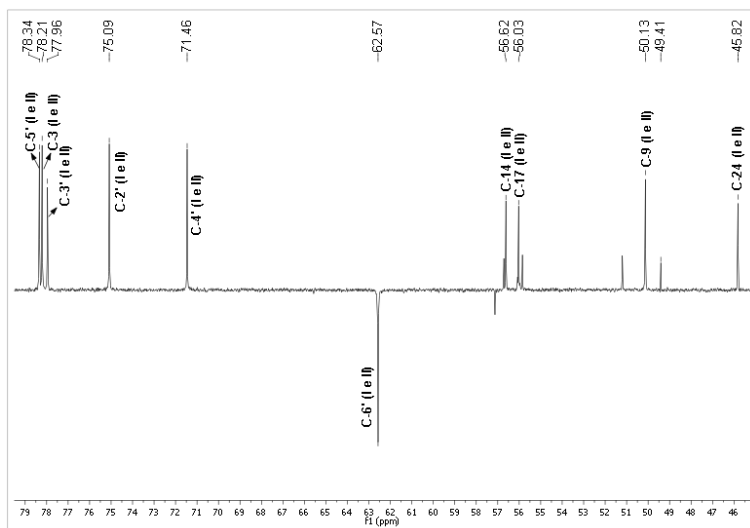


Figura 9: Expansão do espectro de DEPT 135 (C_5D_5N , 125 MHz) das substâncias I e II entre δ_C 46,0-79,0 ppm.

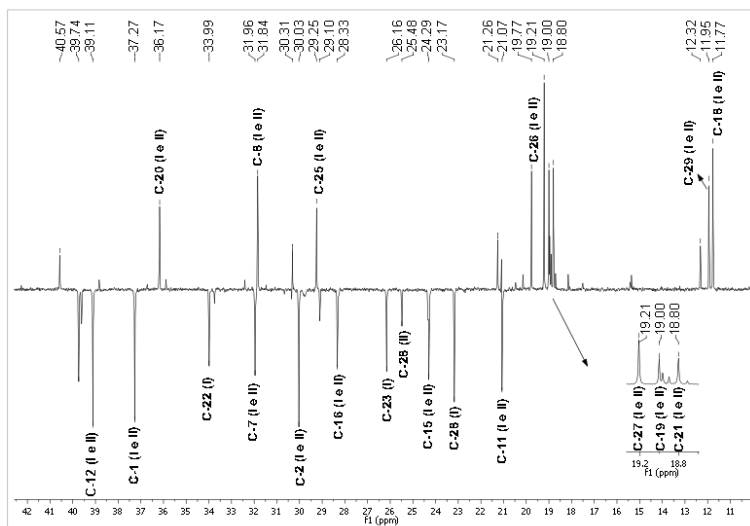
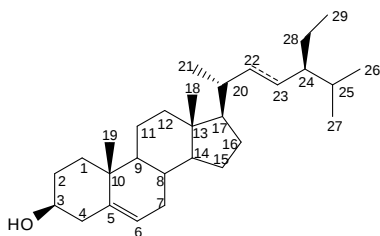


Figura 10: Expansão do espectro de DEPT 135 (C_5D_5N , 125 MHz) das substâncias I e II entre δ_C 11,0-42,0 ppm.

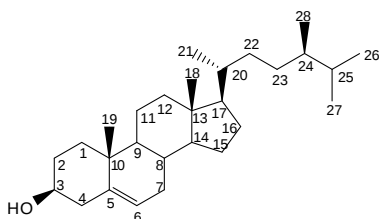
7.4 Substâncias III, IV e V (β -sitosterol, estigmasterol e campesterol)

As substâncias **III**, **IV** e **V** foram isoladas como uma mistura de três esteroides que se apresentaram como um sólido cristalino, solúvel em clorofórmio, que foram identificadas através das análises dos dados de RMN ^1H e CG-MS, comparados com valores descritos na literatura (RUIZ, 1998), como sendo os esteroides β -sitosterol (**III**), estigmasterol (**IV**) e campesterol (**V**).



(**III**) β -sitosterol [22,23 diidro]

(**IV**) estigmasterol [$\Delta^{22,23}$]



(**V**) campesterol

A mistura das substâncias **III** e **IV** foi identificada após a análise do espectro de RMN ^1H e ^{13}C (**Figuras 11-12, pág. 104**), que apresentou sinais com valores muito próximos das substâncias **I** e **II** (**Subitem 7.3, pág. 93**), discutidas anteriormente. No espectro de RMN ^1H (**Figura 11, pág. 104**) da mistura das substâncias **III** e **IV** foi possível observar na região de δ 0,6-2,8 ppm, vários sinais característicos de hidrogênios de esteroides de difícil atribuição devido a sobreposição dos mesmos. Observa-se um singlete largo em δ 5,36 (H-3) relativo ao hidrogênio ligado ao carbono olefínico C-6 dos esteroides. Nota-se um multiplete em δ 3,51-3,57 (H-3), o qual foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico C-3. O espectro também apresentou dois duplos dupletos em δ 5,18 (H-22) e δ 5,05 (H-23), ambos com $J = 15,2$ e $8,6$ Hz, característicos de hidrogênios ligados a carbonos olefínicos da dupla ligação presente na cadeia lateral do estigmasterol. No

entanto, é possível observar no espectro, a ausência dos sinais da unidade do açúcar, o que condiz com o fato de não serem glicosiladas.

Os dados de RMN ^1H para a mistura dos esteroides indicaram a presença dos esteroides β -sitosterol (**III**) e estigmasterol (**IV**). No entanto, a análise da mesma fração por CG-MS indicou a presença do esteroide campesterol (**V**).

O cromatograma a gás da mistura de **III**, **IV** e **V** (**Figura 13, pág. 105**) revelou a presença de três bandas majoritárias. O espectro de massas de cada banda demonstrou valores de m/z 414 (t_r 34,0 min.), m/z 412 (t_r 33,5 min) e m/z 400 (t_r 33,0 min), os quais foram associados aos esteroides β -sitosterol (**Figura 16, pág. 105**), estigmasterol (**Figura 15, pág. 105**) e campesterol (**Figura 14, pág. 105**), respectivamente.

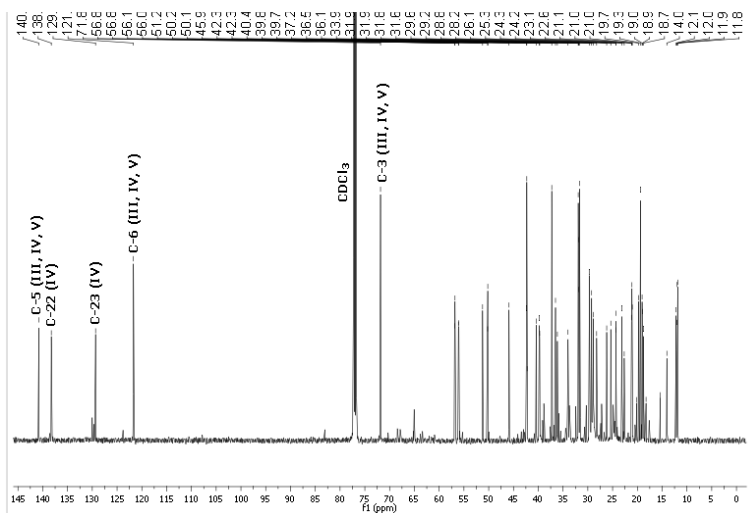
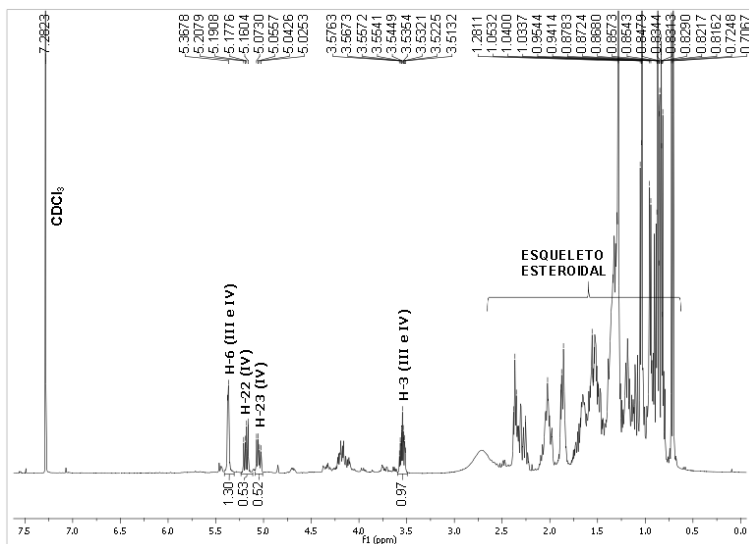
Esses esteroides possuem propriedades físico-química muito semelhantes, dificultando assim sua separação. O β -sitosterol (**III**) já foi isolado nas espécies *C. trichotoma* (MENEZES et al., 2001), *C. salicifolia* (MENGHINI et al., 2008) e *C. rufescens* (VALE et al., 2012). O estigmasterol (**IV**) e o campesterol (**V**) já foram isolados na espécie *C. macleodii* (NARIYA et al., 2014). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C das substâncias **III**, **IV** e **V**, em comparação com os dados da literatura (RUIZ, 1998), estão demonstrados na **Tabela 18 (pág. 103)**.

Tabela 18. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias III, IV e V em comparação com dados da literatura (RUIZ, 1998)*.

H/C	β -sitosterol, estigmasterol e campesterol δH (ppm)	III, IV e V δH (ppm)	β -sitosterol, estigmasterol e campesterol δC (ppm)	III, IV e V δC (ppm)
1	-	-	37,2	37,2
2	-	-	31,8	31,6
3	3,43-3,50 (<i>m</i>)	3,51-3,57 (<i>m</i>)	71,5	71,8
4	-	-	42,2	42,3
5	-	-	140,7	140,7
6	5,35 (<i>d</i>)	5,36 (<i>s</i>)	121,6	121,6
7	-	-	33,6	31,6
8	-	-	33,6	31,6
9	-	-	50,1	50,2
10	-	-	36,4	36,1
11	-	-	21,1	21,1
12	-	-	39,7	39,7
13	-	-	42,2	42,3
14	-	-	56,7	56,8
15	-	-	24,2	24,2
16	-	-	28,3	28,2
17	-	-	56,0	56,0
18	-	-	12,1	12,1
19	-	-	19,2	19,3
20	-	-	40,3	40,4
21	-	-	18,7/20,5/21,1	18,7/20,1/21,0
22	5,35 (<i>dd</i> , $J=15,3$ e 8,4 Hz) est. [#]	5,18 (<i>dd</i> , $J=15,2$ e 8,6 Hz) est. [#]	33,9/137,9/38,1	33,9/138,2/39,8
23	5,02 (<i>dd</i> , $J=15,3$ e 8,4 Hz) est. [#]	5,05 (<i>dd</i> , $J=15,2$ e 8,6 Hz) est. [#]	26,0/129,8/29,2	26,1/129,3/29,2
24	-	-	45,8/51,2/51,1	45,9/50,1/51,2
25	-	-	29,1/31,9/31,8	29,6/31,9/31,8
26	-	-	19,8/21,2/21,0	19,7/22,6/21,0
27	-	-	19,0/19,8/19,0	19,0/19,7/19,0
28	-	-	23,0/25,4/25,3	23,1/25,3/25,3
29	-	-	11,9/11,8	11,9/11,8

#est. – sinais dos hidrogênios olefínicos do stigmasterol

*RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)



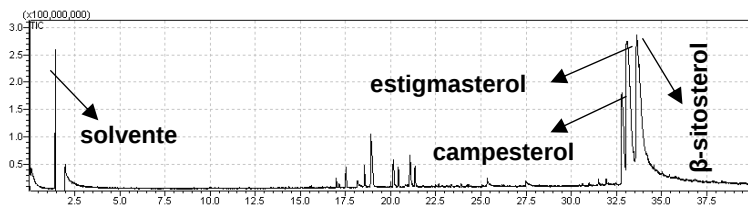


Figura 13: Cromatograma a gás das substâncias III, IV e V.

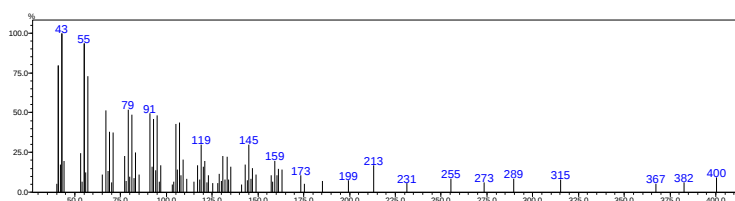


Figura 14: Espectro de massas da substância V.

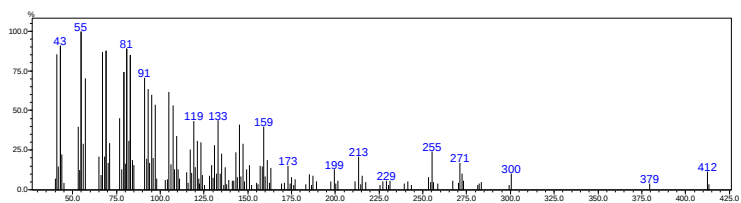


Figura 15: Espectro de massas da substância IV.

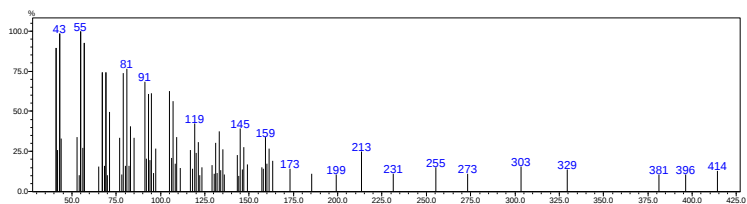
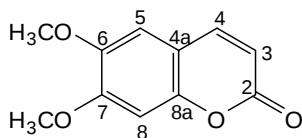


Figura 16: Espectro de massas da substância III.

7.5 Substância VI (escoparona)

A substância **VI**, isolada na forma de um sólido branco, solúvel em clorofórmio, foi identificada através das análises dos dados de RMN ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas comparados com valores descritos na literatura (VILA-NOVA et al., 2012), como sendo a 6,7-dimetóxi-cumarina, conhecida como escoparona.



(VI)

O espectro de RMN ^1H (**Figura 17, pág. 108**) demonstrou dois dupletos em δ 7,65 (H-4) e δ 6,32 (H-3), ambos com $J = 9,45$ Hz, característicos da ligação dupla α,β -insaturada. Dois simpletos em δ 6,83 e 7,82 foram atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-8, respectivamente, do anel aromático tetrassubstituído. Nota-se, ainda, dois simpletos em δ 3,95 e 3,98, com integral de 3 H cada, os quais foram atribuídos as metoxilas do anel aromático.

O espectro de RMN DEPT 135 (**Figura 18, pág. 108**) confirmou o esqueleto básico C_6C_3 de uma cumarina, com sinais correspondentes a um carbono carbonílico em δ 161,4, e a outros carbonos sp^2 , em δ 113,5 (C-3) e δ 143,3 (C-4), os quais foram atribuídos à lactona α,β -insaturada. Os sinais em δ 107,9 (C-5) e δ 100,0 (C-8) foram atribuídos aos carbonos metínicos do anel aromático e os sinais em δ 111,4 (C-4a), δ 146,3 (C-6), δ 152,8 (C-7) e δ 150,0 (C-8a) foram atribuídos aos carbonos quaternários. O sinal intenso em δ 56,3 foi associado as duas metoxilas presentes na escoparona.

O cromatograma a gás de **VI** (**Figura 19, pág. 109**) revelou a presença de uma banda com t_r em 12,15 minutos. O espectro de massas (**Figura 20, pág. 109**), revelou um íon molecular com m/z 206, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_4$. As fragmentações com m/z 191, de perda

de metila, com m/z 163 e m/z 135, ambas com perda de CO, reforçam a proposta estrutural de **VI** como sendo a escoparona. As demais fragmentações podem ser observadas no **Esquema 11 (pág. 109)**.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C da escoparona (**VI**), juntamente com dados descritos na literatura (VILA-NOVA et al., 2012), estão representados na **Tabela 19**.

Tabela 19: Dados de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) da substância **VI** em comparação com dados da literatura (VILA-NOVA et al., 2012).

Substância VI ^a			Vila-nova ^a		
C/H	δH (Hz)	δC (ppm)	C/H	δH (Hz)	δC (ppm)
2	-	161,4	2	-	161,4
3	6,32 (<i>d</i> ; 9,45)	113,5	3	6,23 (<i>d</i> , 9,5)	113,4
4	7,65 (<i>d</i> ; 9,45)	143,3	4	7,59 (<i>d</i> , 9,5)	143,3
4a	-	111,4	4a	-	111,4
5	6,83 (<i>s</i>)	107,9	5	6,83 (<i>s</i>)	108,0
6	-	146,3	6	-	146,3
7	-	152,8	7	-	152,8
8	7,82 (<i>s</i>)	100,0	8	6,78 (<i>s</i>)	100,0
8a	-	150,0	8a	-	150,0
OCH₃	3,95 (<i>s</i>)	56,3	OCH₃	3,90 (<i>s</i>)	56,4
OCH₃	3,98 (<i>s</i>)	56,3	OCH₃	3,88 (<i>s</i>)	56,4

^aRMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3)

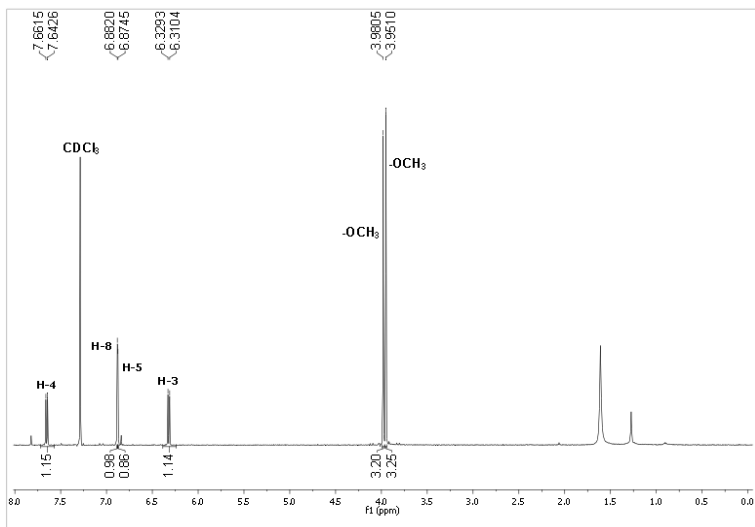


Figura 17: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da substância VI.

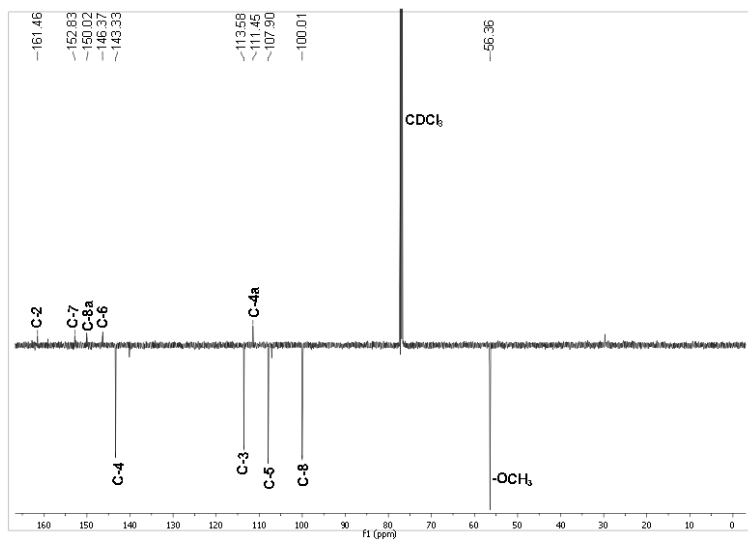


Figura 18: Espectro de RMN DEPT 135 (CDCl_3 , 125 MHz) da substância VI.

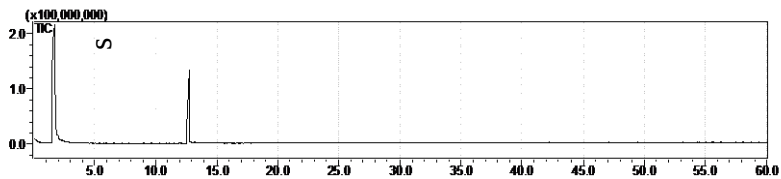


Figura 19: Cromatograma a gás da substância VI.

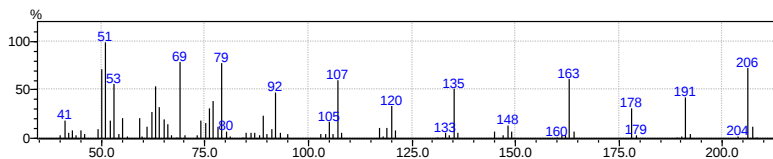
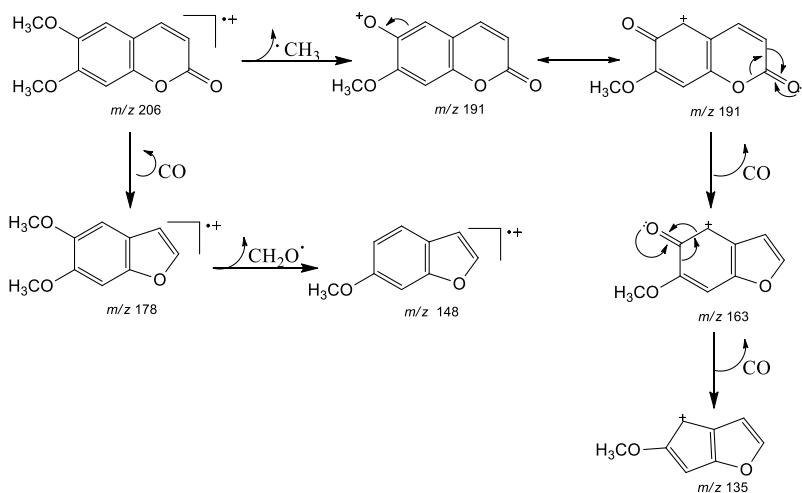


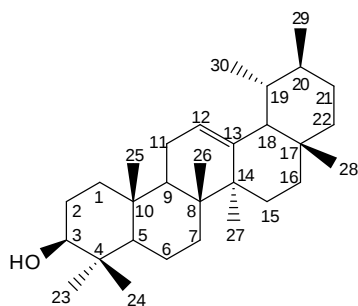
Figura 20: Espectro de massas da substância VI.



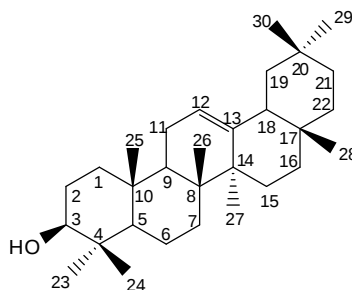
Esquema 11: Proposta de fragmentação para a substância VI.

7.6 Substâncias VII e VIII (α -amirina e β -amirina)

As substâncias **VII** e **VIII** foram isoladas como um sólido branco, solúvel em metanol, que foram identificados através das análises dos dados de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135 comparados com valores descritos na literatura (ZANON, 2006), como sendo os triterpenos α -amirina e β -amirina, respectivamente.



(VII)



(VIII)

O espectro de RMN ^1H (Figura 21, pág. 113) da mistura das substâncias **VII** e **VIII**, apresentou um padrão característico de triterpenóides, confirmado pela presença de vários sinais na região de δ 0,7 – 1,4 ppm referentes aos hidrogênios metílicos e metilênicos. Nota-se dois tripletos em δ 5,26 (J = 3,5 Hz) e δ 5,40 (J = 3,8 Hz) referentes ao H-12 da α -amirina e β -amirina, respectivamente. Além disso, apresentou um duplo duplete sobreposto em δ 3,19 (J = 11,4 e 4,7 Hz) referente ao H-3.

O espectro de RMN DEPT 135 (Figuras 23-25, págs. 114-115) apresentou sinais em δ 78,31 e 78,25, atribuídos aos carbonos carbinólicos C-3. No espectro de RMN ^{13}C (Figura 22, pág. 113), na região das olefinas, foram observados quatro sinais bem desblindados na região de carbono sp^2 , em δ 125,77 (C-12) e δ 138,54 (C-13) para a dupla ligação da α -amirina e em δ 122,23 (C-12) e δ 143,83 (C-13) para a dupla ligação da β -amirina. Sinais nessa região, quando presentes, são altamente característicos de cada

esqueleto, pelo menos no caso de triterpenos oxigenados no C-3. Estes sinais são, portanto, muito importantes na elucidação estrutural de misturas de triterpenos (ZANON, 2006). No espectro em questão, a mistura apresentou estruturas pertencentes as séries ursano (VII) e oleanano (VIII).

Os dados de RMN DEPT 135 da α -amirina (VII) e β -amirina (VIII), juntamente com dados descritos na literatura (ZANON, 2006), estão representados na **Tabela 20 (pág 112)**

Tabela 20: Dados de RMN DEPT 135 (500 MHz, CD₃OD) da mistura das substâncias **VII** e **VIII** em comparação com dados da literatura (ZANON, 2006).

C	α -amirina ^a	VII δC (ppm)	C	β -amirina ^a	VIII δC (ppm)
1	38,78	38,43	1	38,78	38,43
2	27,25	28,35	2	26,64	27,44
3	79,05	78,31	3	79,05	78,25
4	38,62	38,99	4	38,82	38,99
5	55,21	55,36	5	55,21	55,36
6	17,46	18,10	6	18,37	18,00
7	32,96	32,43	7	31,26	32,43
8	39,82	39,15 [*]	8	40,04	39,15 [*]
9	47,66	48,44 [*]	9	47,74	48,44 [*]
10	36,92	36,76 [*]	10	36,97	36,65 [*]
11	23,37	23,11	11	23,54	23,11
12	124,40	125,77	12	121,75	122,23
13	139,60	138,54 [*]	13	145,18	143,83 [*]
14	41,74	41,48 [*]	14	42,10	41,48 [*]
15	28,13	26,58	15	28,11	26,10
16	26,44	26,46	16	26,17	26,10
17	33,75	33,50	17	32,68	32,61
18	59,10	55,52	18	47,26	46,26 [*]
19	39,62	41,34	19	46,86	45,86
20	39,68	41,34	20	31,07	31,67 [*]
21	32,49	30,98	21	34,75	34,54
22	41,54	41,84 [*]	22	37,16	38,76
23	28,74	27,33	23	28,39	27,33
24	15,57	15,21	24	15,49	14,91
25	15,61	15,06	25	15,49	14,48
26	16,82	16,33	26	15,66	16,33
27	23,69	22,57	27	25,98	24,98
28	29,68	27,39	28	27,29	27,39
29	16,88	17,19	29	33,32	34,28
30	21,37	20,86	30	23,27	22,57

^aRMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) e RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz)

^{*}Esses sinais não apareceram no DEPT 135, porém, apareceram no RMN ¹³C.

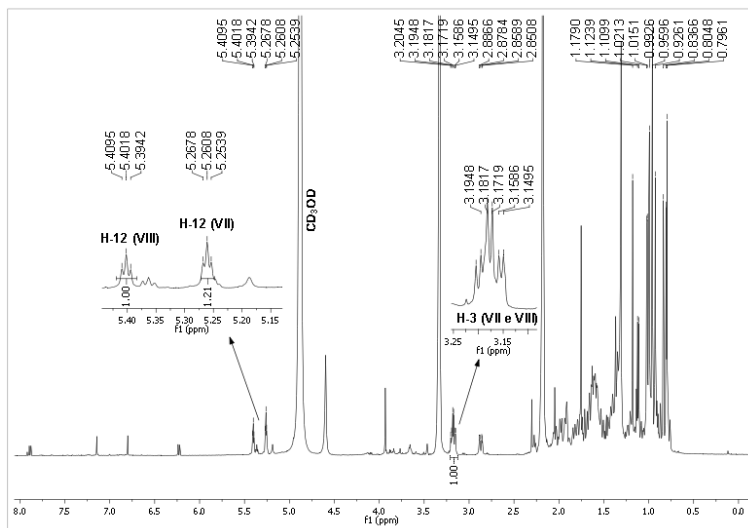


Figura 21: Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) das substâncias VII e VIII.

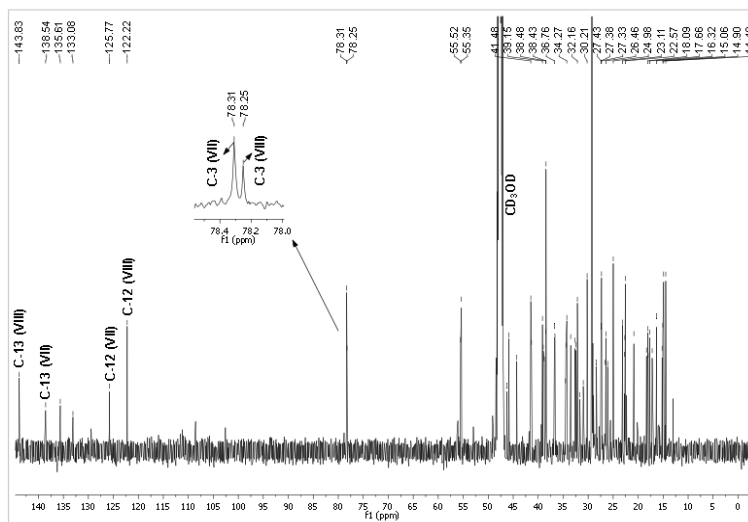


Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias VII e VIII.

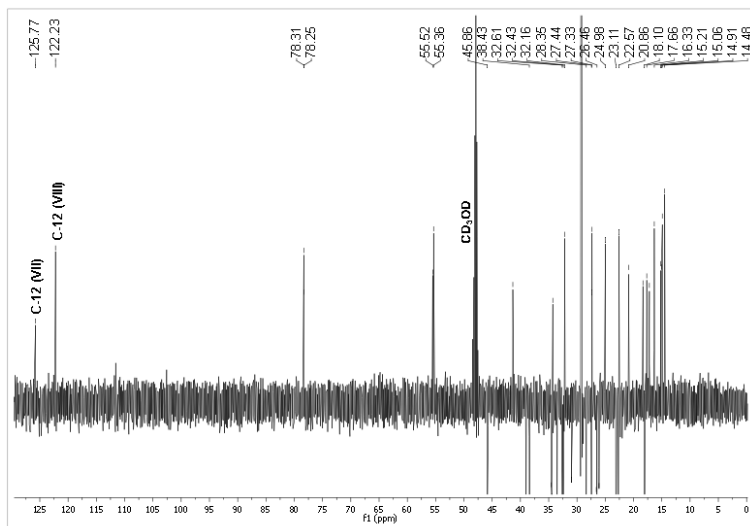


Figura 23: Espectro DEPT 135 (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias VII e VIII.

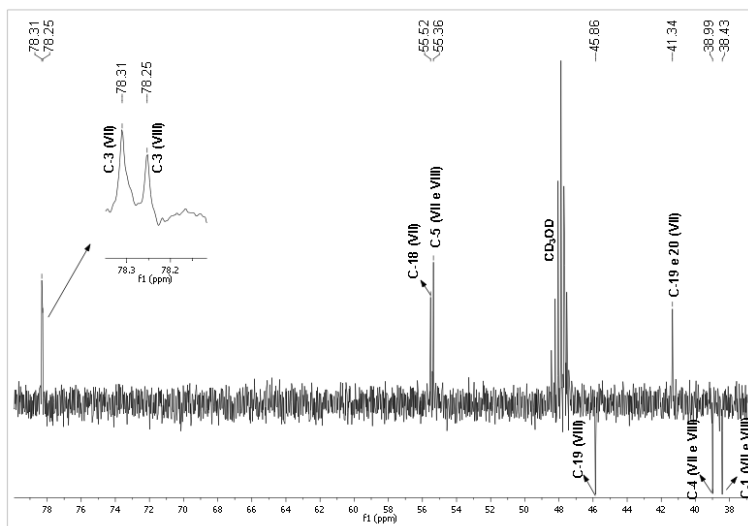


Figura 24: Expansão do espectro DEPT 135 (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias VII e VIII entre δ_c 38,0-78,0 ppm.

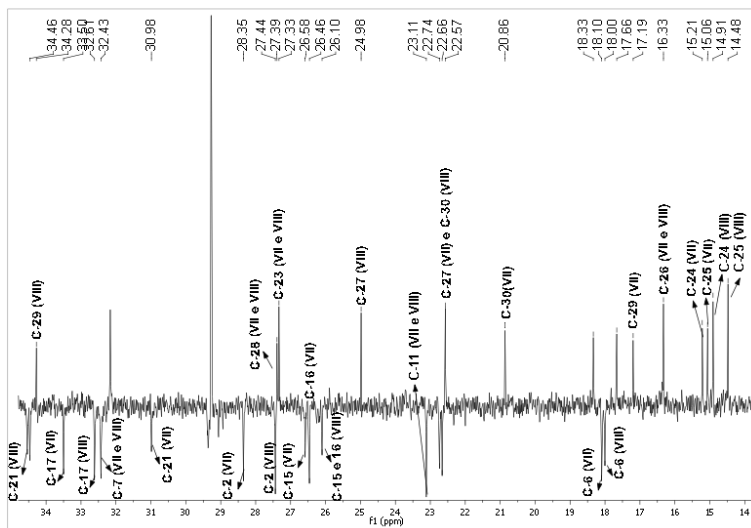
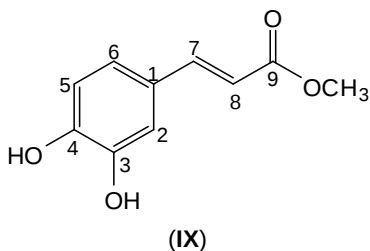


Figura 25: Expansão do espectro DEPT 135 (CD₃OD, 500 MHz) das substâncias **VII** e **VIII** entre δ_c 14,0 - 34,5 ppm.

7.7 Substância IX (cafeato de metila)

A substância **IX** foi isolada na forma de um sólido branco, solúvel em metanol, que foi identificada através das análises dos dados de RMN ¹H e ¹³C, comparados com valores descritos na literatura (PYO et al., 2002), como sendo o cafeato de metila, um derivado fenilpropanoídico.



O espectro de RMN ¹H (**Figura 26**, **pág. 117**) apresentou dois dupletos em δ 7,56 (H-7) e δ 6,28 (H-8), ambos com $J= 15,9$ Hz, que confirmam a presença do sistema *trans*-alceno. Os sinais em δ 7,05 (*d*, $J= 2,0$

Hz), δ 6,96 (*dd*, $J=2,0$ e $8,2$ Hz) e δ 6,79 (*d*, $J=8,2$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-2, H-6 e H-5, respectivamente, e os valores das constantes de acoplamento sugerem a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído. O sinal em δ 3,78 (s) com integral igual à três, foi atribuído a metoxila.

O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 27, pág. 117**) apresentou um sinal correspondente ao carbono carbonílico C-9 (δ 168,5), sinais para dois carbonos olefínicos C-7 (δ 145,3) e C-8 (δ 113,7), sinais para os três carbonos metínicos do anel aromático em C-2 (δ 115,1) C-5 (δ 113,4) e C-6 (δ 121,6) e sinais para três carbonos de anel aromático trissubstituído C-1 (δ 126,2), C-3 (δ 145,6), e C-4 (δ 148,1). Ao grupo metoxila foi atribuído o sinal em δ 56,9.

Essa substância já foi isolada na espécie *C. rufescens* (VALE et al., 2012). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C do cafeoato de metila (**IX**), juntamente com dados descritos na literatura (PYO et al., 2002), estão representados na

Tabela 21.

Tabela 21: Dados de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) e ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da substância **IX** em comparação com dados da literatura (PYO et al., 2002).

Substância IX			PYO*		
C/H	δH (Hz)	δC (ppm)	C/H	δH (Hz)	δC (ppm)
1	-	126,2	1	-	127,1
2	7,05 (<i>d</i> , 2,0)	115,1	2	7,15 (<i>d</i> , 2,1)	116,2
3	-	145,6	3	-	146,3
4	-	148,1	4	-	148,9
5	6,79 (<i>d</i> , 8,2)	113,4	5	6,86 (<i>d</i> , 8,1)	114,8
6	6,96 (<i>dd</i> , 2,0 e 8,2)	121,6	6	7,03 (<i>dd</i> , 2,1 e 8,1)	122,4
7	7,56 (<i>d</i> , 15,9)	145,3	7	7,52 (<i>d</i> , 15,6)	145,9
8	6,28 (<i>d</i> , 15,9)	113,7	8	6,27 (<i>d</i> , 15,6)	114,8
9	-	168,5	9	-	168,2
OCH_3	3,78 (s)	56,9	OCH_3	3,70 (s)	51,6

*RMN ^1H (300 MHz, D_3CCOCD_3) e RMN ^{13}C (75 MHz, D_3CCOCD_3);

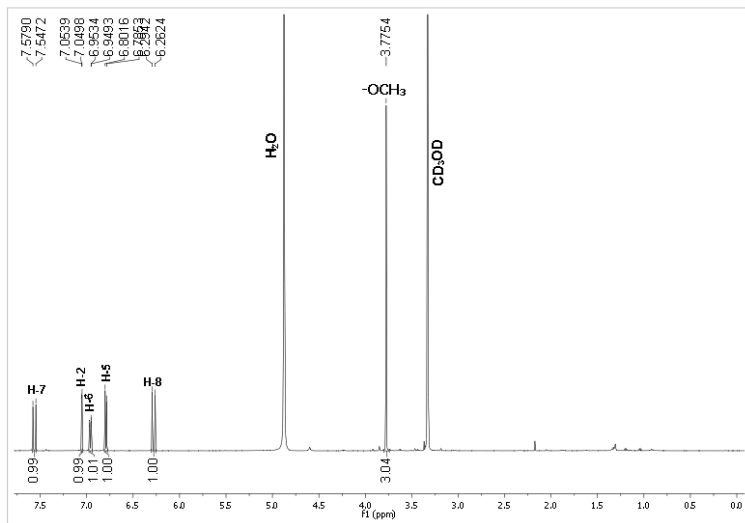


Figura 26: Espectro de RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz) da substância IX.

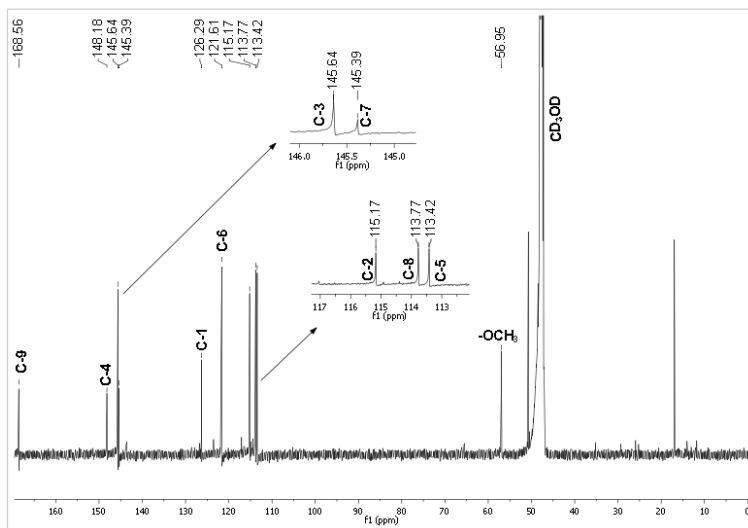
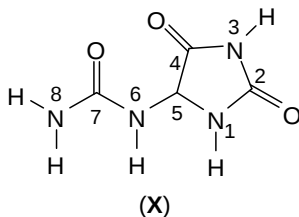


Figura 27: Espectro de RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz) da substância IX.

7.8 Substância X (alantoína)

A substância **X**, foi isolada na forma de um sólido branco, solúvel em DMSO, que foi identificada através das análises dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , comparados com valores descritos na literatura (ANDRADE, 2007), como sendo o ureído alantoína.



O espectro de RMN ^1H (**Figura 28, pág. 119**) revelou a presença de três simpletos largos em δ 8,04, δ 10,53 e δ 5,77 correspondentes aos hidrogênios HN-1, HN-3 e H₂N-8, respectivamente. Observou-se, também, a presença de dois dupletos em δ 6,89 (HN-6) e δ 5,25 (H-5), ambos com $J=8,1$ Hz, o que indica um acoplamento em orto.

O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 29, pág. 120**) apresentou três sinais correspondentes aos átomos dos carbonos carbonílicos C-2 (δ 157,4), C-4 (δ 174,1) e C-7 (δ 156,8) e um de carbono metínico em δ 62,9 atribuído ao C-5.

Essa substância é comumente encontrada em espécies de Boragináceas, tendo sido identificada nas espécies *C. trichotoma* (MENEZES et al., 2001) e *C. ecalyculata* (ASSONUMA, 2009). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C da alantoína (**X**), juntamente com dados descritos na literatura (ANDRADE, 2007), estão representados na **Tabela 22 (pág. 119)**.

Tabela 22: Dados de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) e ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da substância **X** em comparação com dados da literatura (ANDRADE, 2007).

Substância X			ANDRADE*		
C/H	δH (ppm)	δC (ppm)	C/H	δH (ppm)	δC (ppm)
HN-1	8,04 (s)	-	HN-1	8,06	-
C-2	-	156,8	C-2	-	157,3
HN-3	10,53 (s)	-	HN-3	10,56 (s)	-
C-4	-	157,4	C-4	-	157,9
C-5	5,25 (d, 8,1 Hz)	62,9	C-5	5,23 (d, 8,0 Hz)	62,9
HN-6	6,89 (d, 8,1 Hz)	-	HN-6	6,90 (d, 8,0 Hz)	-
C-7	-	174,1	C-7	-	174,1
H ₂ N-8	5,77 (s)	-	H ₂ N-8	5,79 (s)	-

* RMN ^1H (400 MHz, D_2O) e ^{13}C (101 MHz, D_2O);

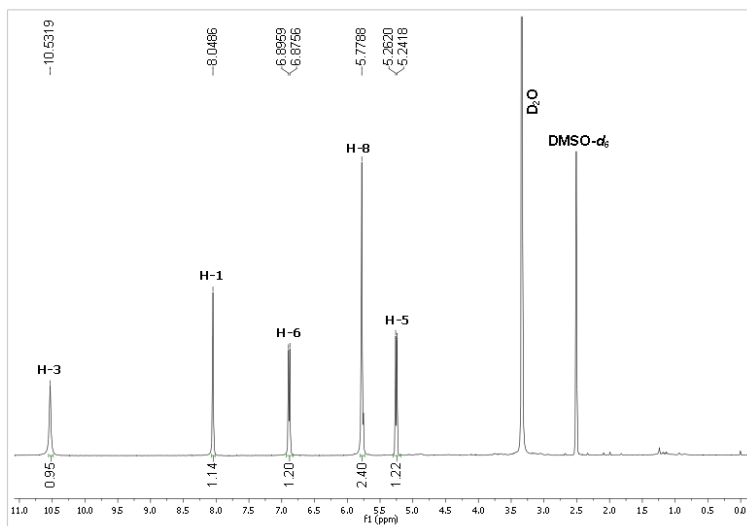


Figura 28: Espectro de RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) da substância **X**.

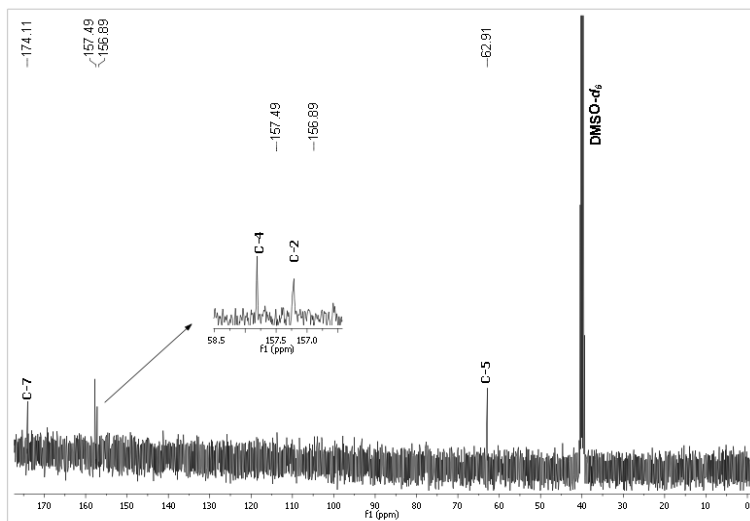
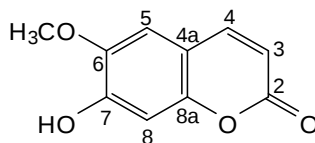


Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz) da substância **X**.

7.9 Substância XI (escopoletina)

A substância **XI** foi isolada na forma de um sólido esverdeado, solúvel em metanol, que foi identificada através das análises dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , comparados com valores descritos na literatura (CARVALHO et al., 2006), como sendo a cumarina escopoletina.



(**XI**)

Os dados de RMN ^1H (**Figura 30, pág. 122**) confirmaram a presença da dupla α,β -insaturada devido a presença de dois dupletos em δ 7,84 (H-4) e δ 6,26 (H-3), ambos com $J = 9,4$ Hz. Dois singletos em δ 6,99 e 6,98 foram atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-5 do anel aromático tetrassubstituído. Estes dados permitiram caracterizar o esqueleto de uma cumarina contendo

dois substituintes no anel aromático, um OH (*s/l*, δ 8,5) e uma metoxila (*s*, δ 3,87) nas posições 6 e 7, respectivamente.

O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 31**, **pág. 122**) confirmou o esqueleto básico C_6C_3 de uma cumarina, com sinais correspondentes a um carbono carbonílico em δ 168,8 (C-2) e a outros carbonos sp^2 , em δ 112,1 (C-3) e δ 143,9 (C-4), os quais foram atribuídos à lactona α,β -insaturada do anel B cumarínico. Os sinais em δ 104,2 (C-5) e δ 99,2 (C-8) foram atribuídos aos carbonos metínicos e os em δ 144,4 (C-6) e δ 152,7 (C-7) aos carbonos quaternários do anel aromático. Ao grupo metoxila foi associado o sinal em δ 55,4.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C da escopoletina (**XI**), juntamente com dados descritos por Carvalho e colaboradores (2006), estão representados na **Tabela 23**.

Tabela 23: Dados de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) e ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da substância **XI** em comparação com dados da literatura (CARVALHO et al., 2006).

Composto XI			Carvalho*		
C/H	δH (ppm)	δC (ppm)	C/H	δH (ppm)	δC (ppm)
2	-	168,8	2	-	161,5
3	6,26 (<i>d</i> ; 9,4 Hz)	112,1	3	6,20 (<i>d</i> , 9,5 Hz)	113,3
4	7,84 (<i>d</i> ; 9,4 Hz)	143,9	4	7,80 (<i>d</i> , 9,5 Hz)	143,8
4a	-	111,5	4a	-	111,0
5	6,98 (<i>s</i>)	104,2	5	6,75 (<i>s</i>)	107,4
6	-	144,4	6	-	144,0
7-OH	8,5 (<i>s/l</i>)	152,7	7-OH	8,5 (<i>s/l</i>)	150,0
8	6,99 (<i>s</i>)	99,2	8	7,09 (<i>s</i>)	103,2
8a	-	148,9	8a	-	149,7
OCH ₃	3,97 (<i>s</i>)	55,4	OCH ₃	3,89 (<i>s</i>)	56,4

*RMN de ^1H e ^{13}C (200 MHz, CD_3OD)

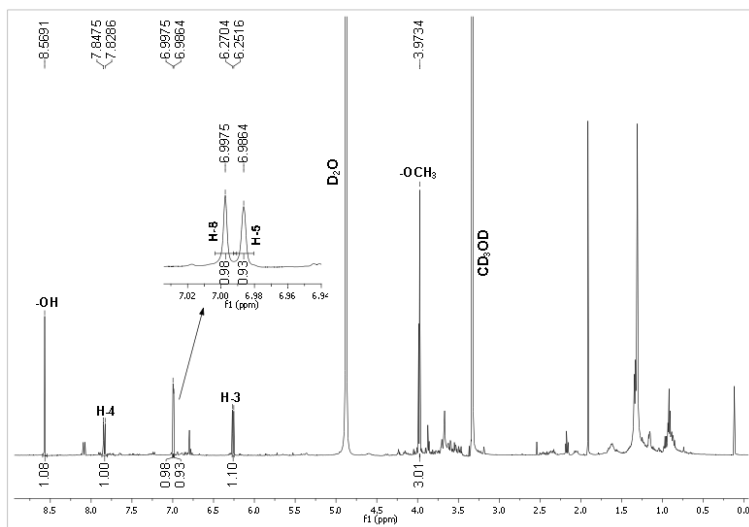


Figura 30: Espectro de RMN ^1H (CD₃OD, 500 MHz) da substância XI.

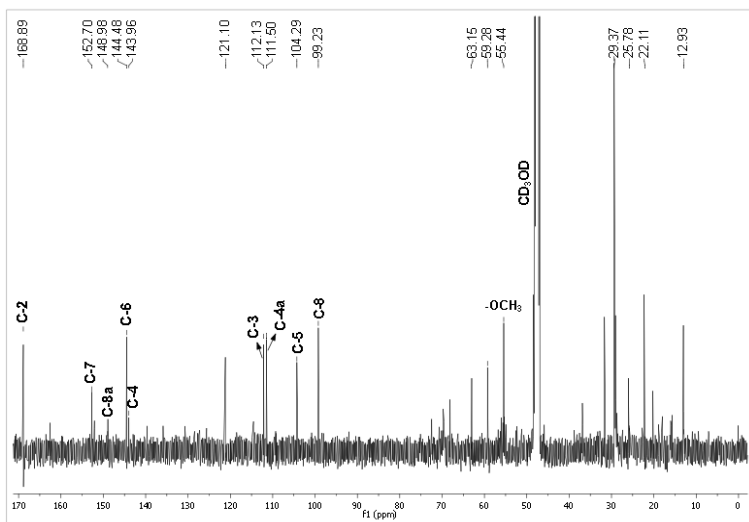
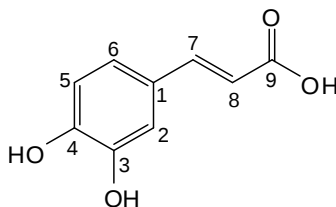


Figura 31: Espectro de RMN ^{13}C (CD₃OD, 125 MHz) da substância XI.

7.10 Substância XII (ácido cafeico)

A substância **XII** foi isolada na forma de um sólido amarelo, solúvel em metanol, que foi identificada através das análises dos dados de RMN ^1H e ^{13}C , comparados com valores descritos na literatura (BRESCIANI, 2003), como sendo o ácido *trans*-cafeico, um derivado fenilpropanoídico.



(XII)

A análise do espectro de RMN ^1H (Figuras 32-33, pág. 124-125) permitiu caracterizar a substância **XII** como um derivado do ácido cinâmico pela presença de dois dupletos em δ 7,53 (H-7) e δ 6,24 (H-8), ambos com $J = 15,9$ Hz, com integral de um hidrogênio cada um, típicos do sistema *trans*-alceno. Os sinais em δ 7,05 (*d*, $J = 2,0$ Hz), δ 6,94 (*dd*, $J = 8,2$ e $2,0$ Hz) e δ 6,79 (*d*, $J = 8,2$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-2, H-6 e H-5, respectivamente, o que sugere tratar-se de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído.

O espectro de RMN ^{13}C (Figuras 34-35, pág. 125-126) apresentou um sinal correspondente ao carbono carbonílico C-9 (δ 170,0), sinais para dois carbonos olefínicos C-7 (δ 147,9) e C-8 (δ 116,3), sinais para os três carbonos metínicos do anel aromático em C-2 (δ 113,6) C-5 (δ 115,0) e C-6 (δ 121,3) e sinais para os três carbonos quaternários do anel aromático trissubstituído C-1 (δ 126,5), C-3 (δ 145,1), e C-4 (δ 145,3).

Essa substância já foi isolada na espécie *C. sinensis* (AL-MUSAYEIB et al., 2011). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C do ácido cafeico (**XII**), juntamente com dados descritos na literatura (BRESCIANI, 2003), estão representados na Tabela 24 (pág. 124).

Tabela 24: Dados de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) e ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da substância **XII** em comparação com dados da literatura (BRESCIANI, 2003).

Substância XII			BRESCIANI*		
C/H	δH (ppm)	δC (ppm)	C/H	δH (ppm)	δC (ppm)
1	-	126,5	1	-	129,1
2	7,05 (<i>d</i> , 2,0 Hz)	113,6	2	7,14 (<i>d</i> , 1,8 Hz)	112,3
3	-	145,1	3	-	145,1
4	-	145,3	4	-	146,9
5	6,79 (<i>d</i> , 8,2 Hz)	115,0	5	6,87 (<i>d</i> , 8,1 Hz)	116,7
6	6,94 (<i>dd</i> , 8,2 e 2,0 Hz)	121,3	6	7,14 (<i>dd</i> , 1,8 e 8,1 Hz)	118,8
7	7,53 (<i>d</i> , 15,9 Hz)	147,9	7	6,84 (<i>d</i> , 15,9 Hz)	148,0
8	6,24 (<i>d</i> , 15,9 Hz)	116,3	8	5,77 (<i>d</i> , 15,9 Hz)	117,5
9	-	170,0	9	-	172,9

*RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (50 MHz, CDCl_3);

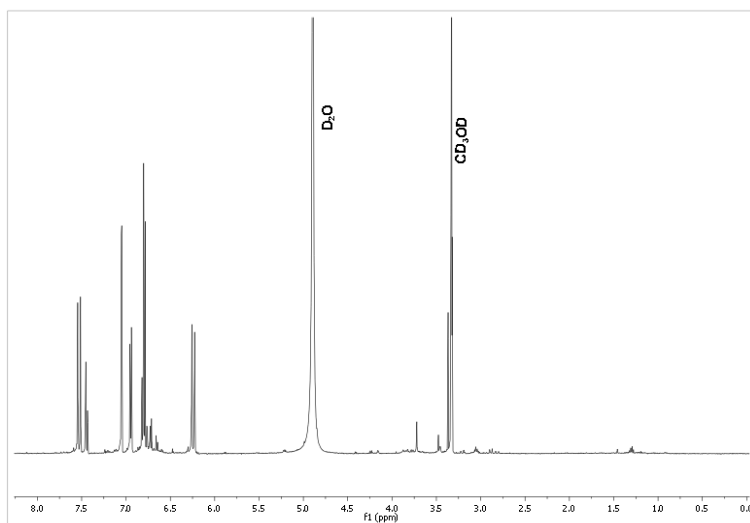


Figura 32: Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da substância **XII**.

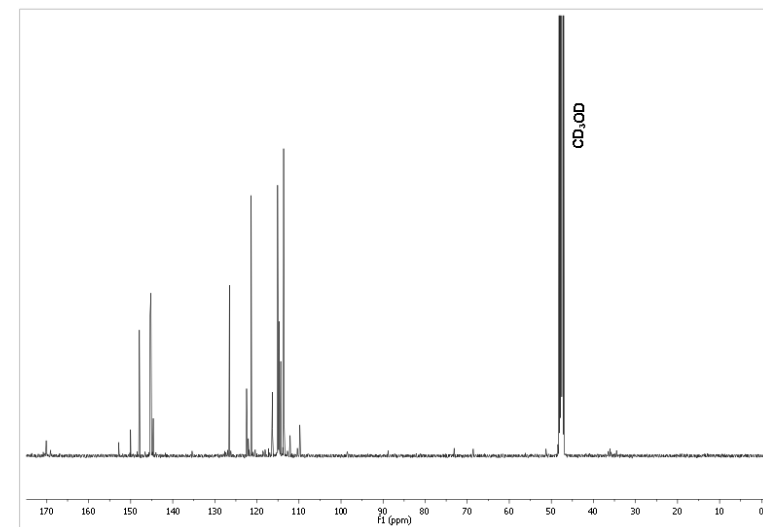
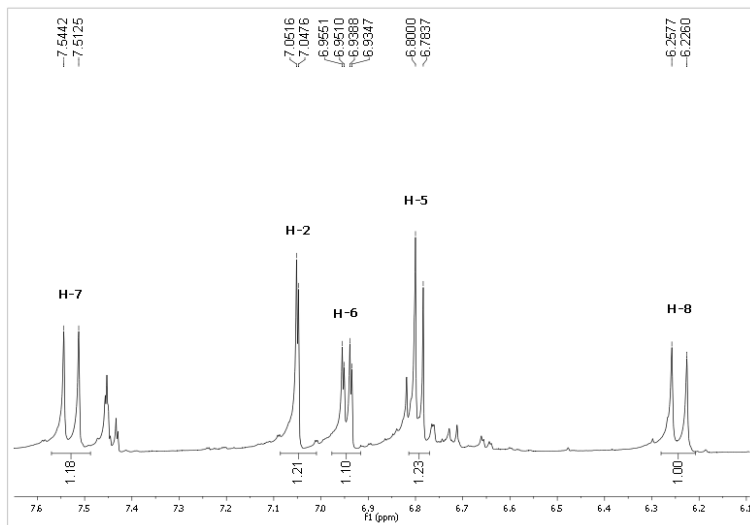


Figura 34: Espectro de RMN ^{13}C (CD₃OD, 125 MHz) da substância XII.

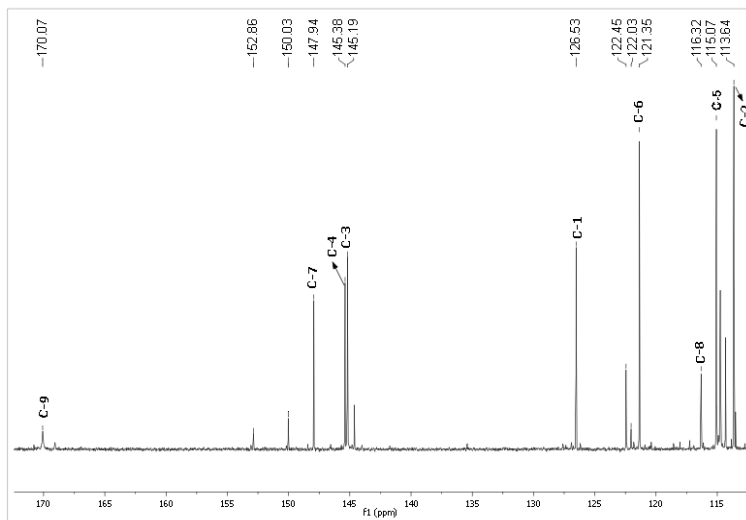
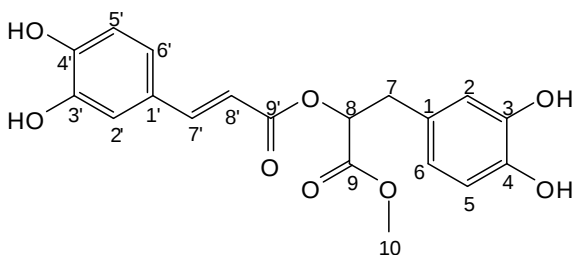


Figura 35: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) da substância **XII** entre δ_{C} 115,0-170,0 ppm.

7.11 Substância XIII (rosmarinato de metila)

A mistura das substâncias **XII** (ácido cafeico) e **XIII** (rosmarinato de metila) foram isoladas na forma de um sólido amarelo, solúvel em metanol. A substância **XIII** foi identificada através das análises de RMN 1D e 2D comparados com valores descritos na literatura (AL-MUSAYEIB et al., 2011), como sendo o rosmarinato de metila, um derivado fenilpropanoídico.



(XIII)

No espectro de RMN ^1H da mistura (**Figuras 37-39, págs. 130-131**), foram observados sinais de uma unidade cafeoila pertencente ao rosmarinato de metila (**XIII**), com os dupletos em δ 6,28 (H-8') e δ 7,57 (H-7'), ambos com $J = 15,9$ Hz característicos de hidrogênios *trans*, além de sinais correspondentes a anel aromático 1,3,4-trissubstituído em δ 6,98 (*dd*, $J = 8,3$ e $2,0$ Hz, 1H), δ 6,79 (*d*, $J = 8,1$ Hz, 1H) e δ 7,07 (*d*, $J = 2,1$ Hz, 1H), referentes aos hidrogênios H-6', H-5' e H-2', respectivamente. Foram observados também sinais em δ 5,21 (*dd*, $J = 7,6$ e $5,5$ Hz, 1H) referente ao H-8, dois duplos dupletos em δ 3,03 ($J = 14,4$ e $7,7$ Hz) e δ 3,08 ($J = 14,8$ e $5,8$ Hz), referente aos hidrogênios H-7a e H-7b e em δ 3,72 (*s*, 3H) o qual foi atribuído a metoxila. O anel trissubstituído ligado ao C-7 foi caracterizado pela presença de um duplo duplete em δ 6,59 ($J = 8,1$ e $2,1$ Hz, 1H) referente ao H-6, e de dois dupletos em δ 6,72 ($J = 8,1$ Hz, 1H) e δ 6,73 ($J = 2,1$ Hz, 1H) referentes aos hidrogênios H-5 e H-2, respectivamente. Os outros sinais foram atribuídos ao ácido cafeico (**XII**), que já foi discutido anteriormente (**Subitem 7.10, pág. 123**).

No espectro de RMN ^{13}C (**Figuras 40-42, págs. 131-132**) pode-se verificar os sinais dos grupos carbonila em δ 166,94 (C-9') e δ 170,79 (C-9). Para a unidade cafeoila, os carbonos aromáticos C-2', C-5' e C-6', apresentaram deslocamentos químico em δ 113,84, δ 115,12 e δ 121,82. Os carbonos quaternários C-1', C-3' e C-4', apresentaram deslocamentos químico em δ 126,19, δ 146,57 e δ 145,44. Os sinais em δ 112,72 e δ 148,43 foram atribuídos aos carbonos olefinicos C-8' e C-7', respectivamente. O sinal em δ 51,28 foi atribuído ao carbono da metoxila (C-10). O anel aromático trissubstituído ligado ao C-7, apresentou deslocamentos químicos em δ 127,36, δ 143,99 e δ 144,82 referentes aos carbonos quaternários C-1, C-3 e C-4, e em δ 116,14, δ 115,08 e δ 120,40 referentes aos carbonos metínicos C-2, C-5 e C-6, respectivamente.

O carbono metínico C-8, apresentou deslocamento químico em δ 73,28 e o carbono metilênico C-7 em δ 36,50. O espectro de RMN COSY (**Figura 43, pág. 133**) mostrou esse acoplamento vicinal. Pelo espectro

HMBC (**Figura 45, pág. 134**), foi possível identificar a presença do anel aromático trissubstituído ligado ao C-7, já que os hidrogênios metilênicos H-7a e H-7b apresentaram correlação com o carbono aromático C-6 ($^3J_{CH}$). Estes hidrogênios também se correlacionaram com o carbono metínico C-8 ($^2J_{CH}$) e com o carbono carbonílico C-9 ($^3J_{CH}$). O hidrogênio H-8 apresentou correlação com os carbonos carbonílicos C-9' ($^3J_{CH}$) e C-10 ($^2J_{CH}$) e com o carbono aromático C-1 ($^3J_{CH}$). Os hidrogênios da metoxila apresentaram correlação com o carbono carbonílico C-9 ($^3J_{CH}$).

Também foi possível observar no espectro HMBC (**Figura 46, pág. 134**) a correlação do hidrogênio aromático H-6 com os carbonos aromáticos C-4 ($^3J_{CH}$) e C-2 ($^3J_{CH}$). O hidrogênio aromático H-5 apresentou correlação com os carbonos aromáticos C-4 ($^2J_{CH}$) e C-1 ($^3J_{CH}$). Os hidrogênios olefínicos H-8' e H-7', apresentaram correlação com o carbono carbonílico C-9, $^3J_{CH}$ e $^2J_{CH}$, respectivamente. O H-7' também apresentou correlação com o carbono aromático C-6' ($^3J_{CH}$) enquanto que o H-8' apresentou correlação com o carbono quaternário C-1' ($^3J_{CH}$).

O anel aromático trissubstituído ligado ao C-7, apresentou deslocamentos químicos em δ 127,36, δ 143,99 e δ 144,82 referentes aos carbonos quaternários C-1, C-3 e C-4, e em δ 116,14, δ 115,08 e δ 120,40 referentes aos carbonos metínicos C-2, C-5 e C-6, respectivamente (**Figuras 41-42, pág. 131**).

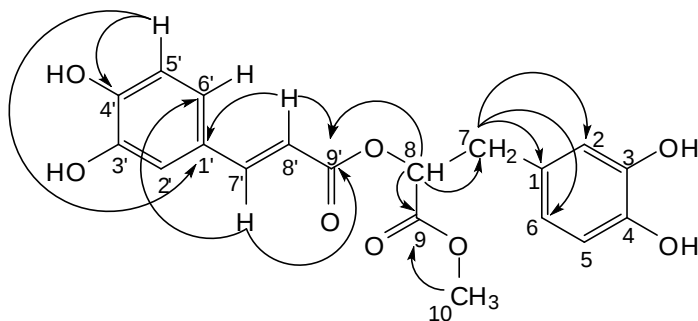


Figura 36: Correlações observadas no espectro RMN HMBC (CD_3OD , 125 MHz) da substância **XIII**.

Essa substância já foi isolada nas espécies *C. sinensis* e *C. rufescens*. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C do rosmarinato de metila (**XIII**), juntamente com dados descritos na literatura (AL-MUSAYEIB et al., 2011), estão representados na **Tabela 25**.

Tabela 25: Dados de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) e ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da substância **XIII** em comparação com dados da literatura (AL-MUSAYEIB et al., 2011).

Substância XIII			AL-MUSAYEIB	
C/H	δH (ppm)	δC (ppm)	δH (ppm)	δC (ppm)
1'	-	126,19	-	127,67
2'	7,07 (<i>d</i> ; 2,1Hz)	113,84	7,04 (<i>d</i> ; 2,0 Hz)	115,34
3'	-	146,57	-	147,03
4'	-	145,44	-	150,10
5'	6,79 (<i>d</i> ; 8,1 Hz)	115,12	6,78 (<i>d</i> ; 8,5 Hz)	116,66
6'	6,98 (<i>dd</i> ; 8,3 e 2,0 Hz)	121,82	6,95 (<i>dd</i> ; 8,5 e 2,0 Hz)	123,38
7'	7,57 (<i>d</i> ; 15,9 Hz)	148,43	7,55 (<i>d</i> ; 15,5 Hz)	148,14
8'	6,28 (<i>d</i> ; 15,9 Hz)	112,75	6,26 (<i>d</i> ; 15,5 Hz)	114,23
9'	-	166,94	-	168,50
9	-	170,79	-	172,34
8	5,21 (<i>dd</i> ; 7,6 e 5,5 Hz)	73,28	5,19 (<i>dd</i> ; 7,5 e 5,0 Hz)	74,82
7a	3,03 (<i>dd</i> ; 14,4 e 7,7 Hz)	36,50	3,06 (<i>dd</i> ; 14,5 e 5,5 Hz)	38,05
7b	3,08 (<i>dd</i> ; 14,8 e 5,8 Hz)	36,50	3,00 (<i>dd</i> ; 14,5 e 5,5 Hz)	38,05
6	6,59 (<i>dd</i> ; 8,1 e 2,1 Hz)	120,40	6,57 (<i>dd</i> ; 8,0 e 2,0 Hz)	121,92
5	6,72 (<i>d</i> ; 8,1 Hz)	115,08	6,69 (<i>d</i> ; 8,0 Hz)	116,45
4	-	144,82	-	145,55
3	-	143,99	-	146,37
2	6,73 (<i>d</i> ; 2,1 Hz)	116,14	6,70 (<i>d</i> ; 2,0 Hz)	117,67
1	-	127,36	-	128,89
OCH_3	3,72 (s)	51,28	3,70 (s)	52,82

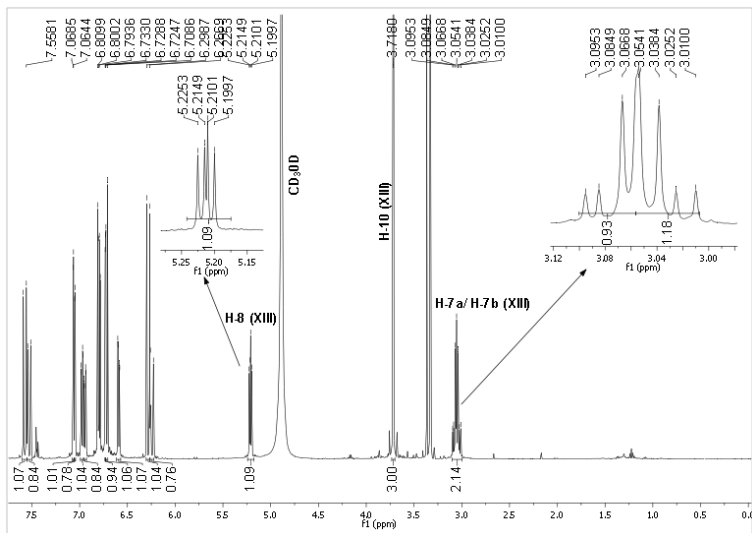


Figura 37: Espectro de RMN ^1H (CD $_3$ OD, 500 MHz) das substâncias XII e XIII.

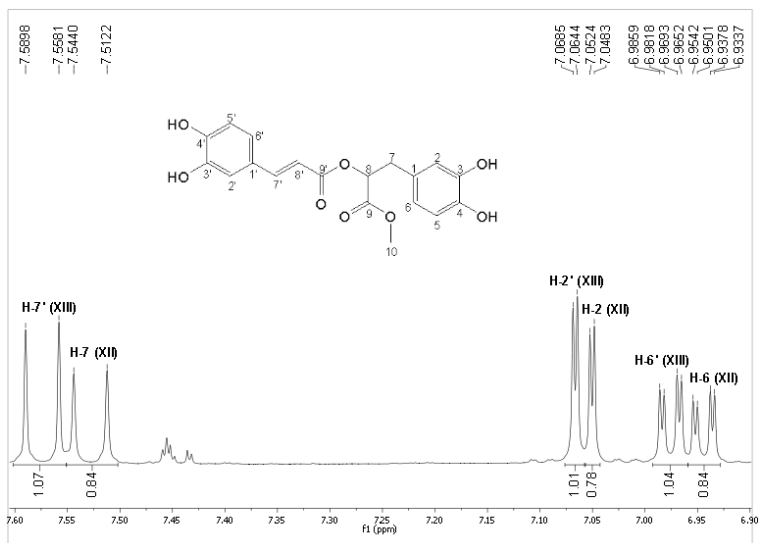


Figura 38: Expansão do espectro de RMN ^1H (CD $_3$ OD, 500 MHz) das substâncias XII e XIII entre δ_{H} 6,90-7,60 ppm.

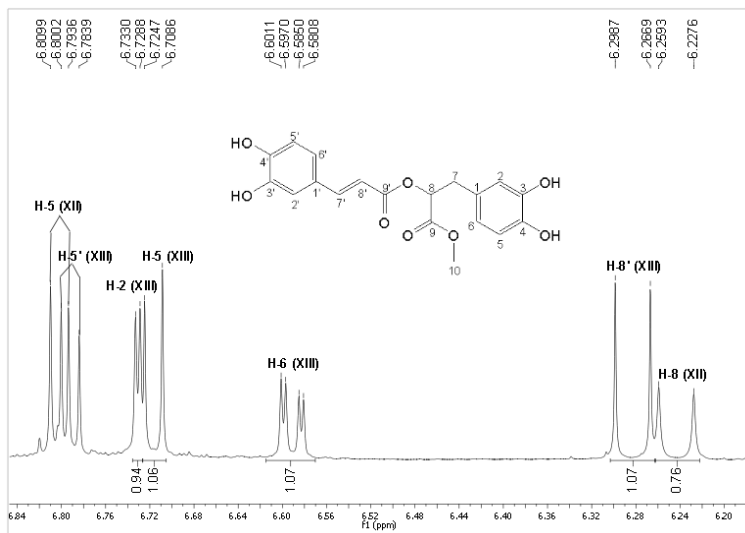


Figura 39: Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) das substâncias XII e XIII entre δ_{H} 6,20-6,84 ppm.

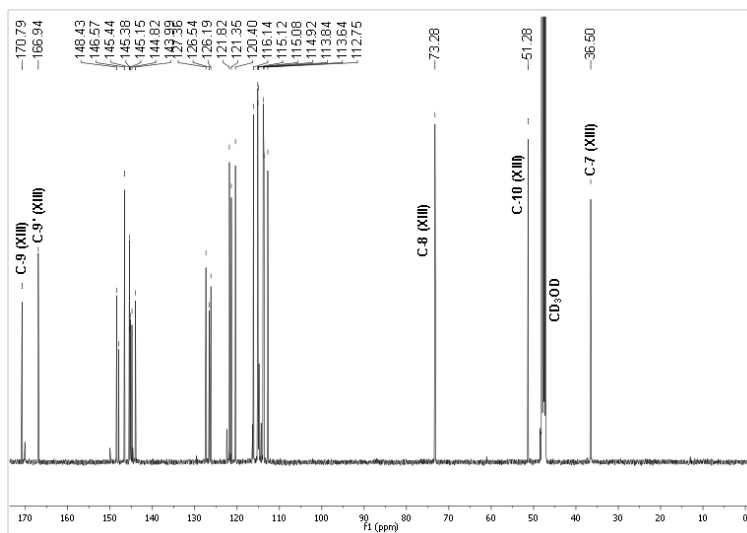


Figura 40: Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias XII e XIII.

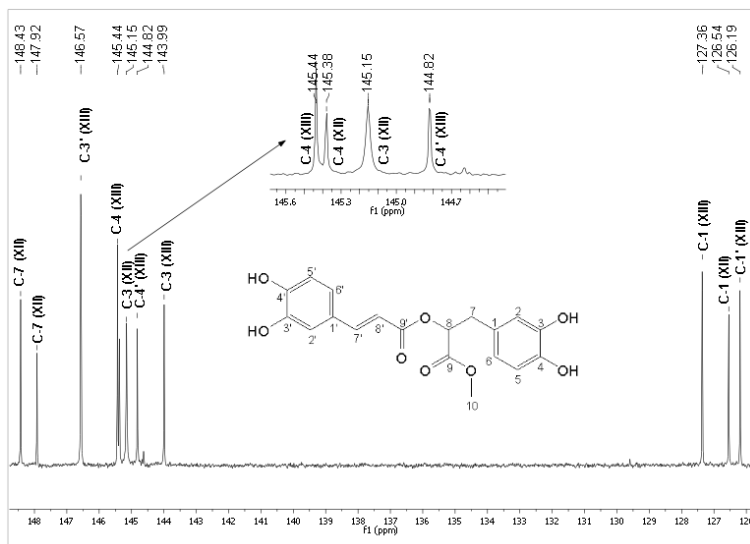


Figura 41: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias XII e XIII entre δ_{C} 126,0-149,0 ppm.

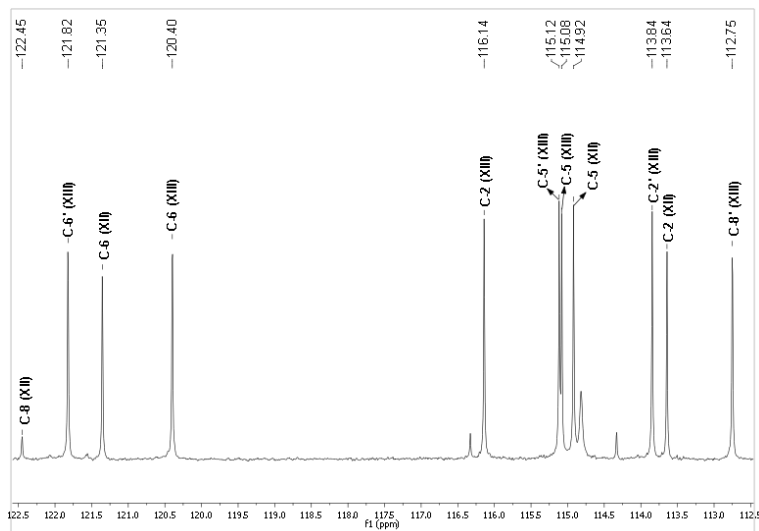


Figura 42: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias XII e XIII entre δ_{C} 112,5-122,5 ppm.

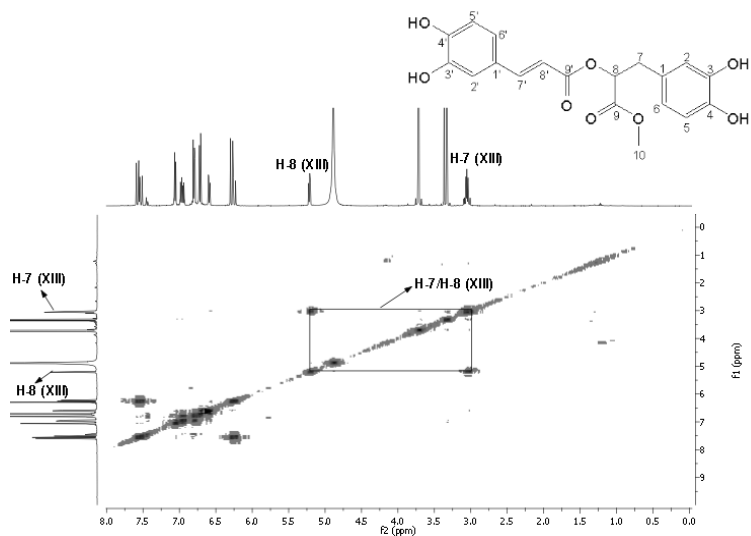


Figura 43: Espectro de RMN COSY (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias XII e XIII.

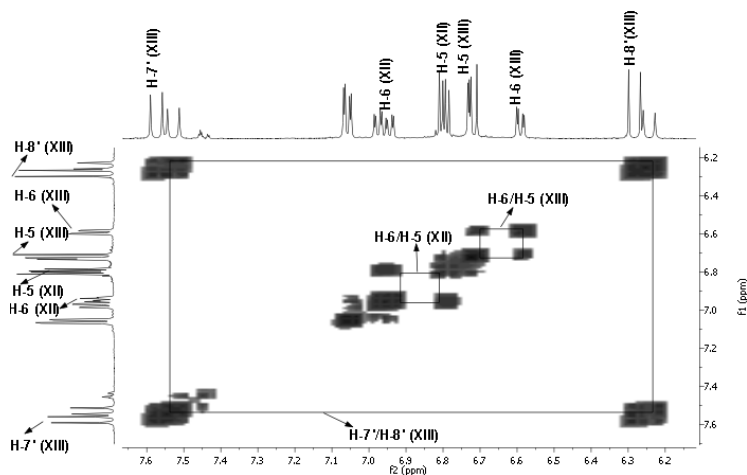


Figura 44: Expansão do espectro de RMN COSY (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias XII e XIII entre δ_{H} 6.20 - 7.60 ppm.

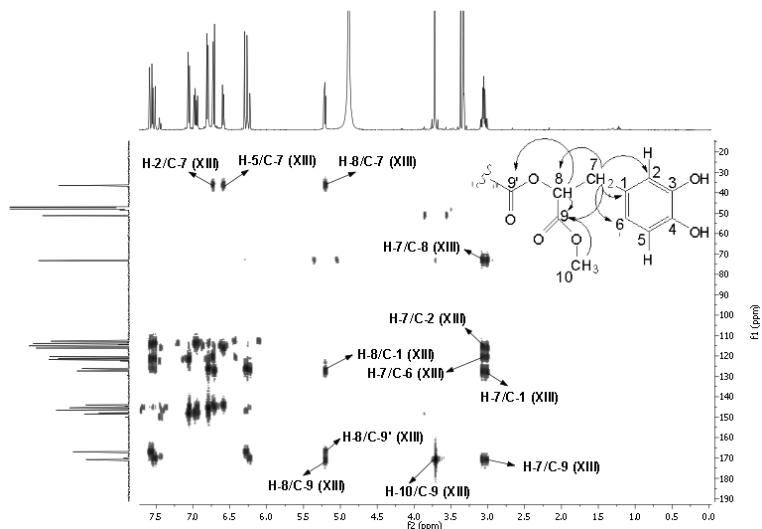


Figura 45: Espectro de RMN HMBC (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias XII e XIII.

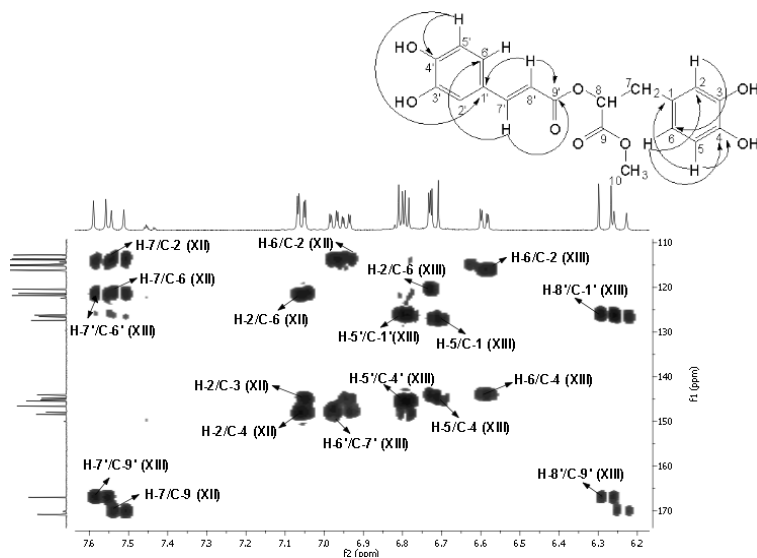


Figura 46: Expansão do espectro de RMN HMBC (CD_3OD , 123 MHz) das substâncias XII e XIII entre δ_{H} 6,20 – 7,60 ppm e δ_{C} 110,0 – 170,0 ppm.

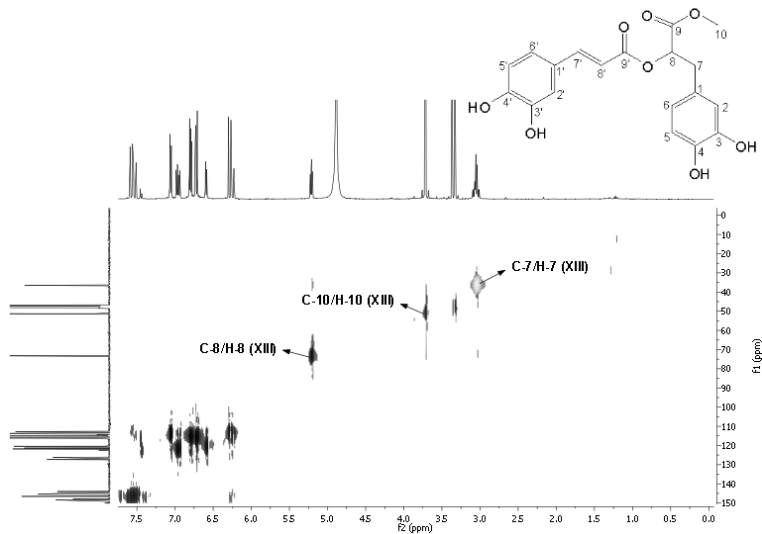


Figura 47: Espectro de RMN HSQC (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias XII e XIII.

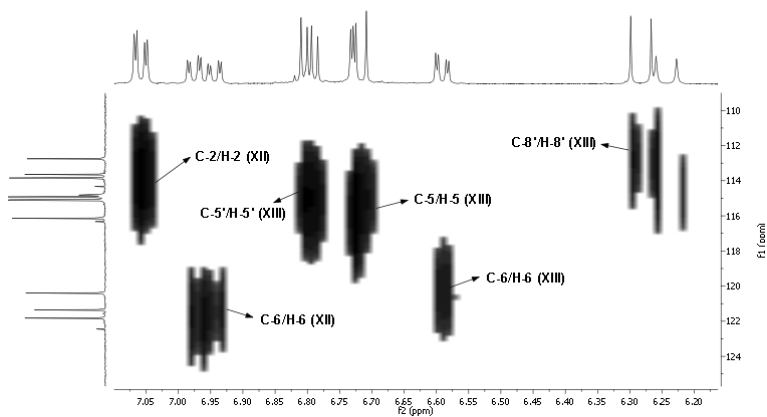


Figura 48: Expansão do espectro de RMN HSQC (CD_3OD , 125 MHz) das substâncias XII e XIII entre δ_{H} 6,20 – 7,05 ppm e δ_{C} 110,0 – 125,0 ppm.

8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

8.1 Ensaio da atividade antimicrobiana in vitro dos extratos brutos e frações

Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países, tais como o Brasil, que possui uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico (DUARTE, 2006). Como o uso popular não é suficiente para avaliar a eficácia no tratamento das enfermidades, foi delineado como um dos objetivos deste trabalho a avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações de *C. insignis*. Assim, foi realizada o teste da possível atividade antimicrobiana dos extratos e frações utilizando-se o método da microdiluição em caldo, frente às bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos.

O extrato bruto hidroalcoólico e as frações hexânica, clorofórmica, acetato e o resíduo hidrometanólico, obtidas das folhas e dos galhos de *C. insignis* foram submetidas ao teste da atividade antibacteriana e antifúngica, e os resultados estão resumidos na **Tabela 26 (pág. 138)**.

Pode-se observar que nenhum extrato ou fração apresentou atividade promissora contra as cepas Gram positivas e Gram negativas. Para as cepas fúngicas, o extrato **EBHEF** e as frações **FHF**, **FCF** e **FAF**, obtidas das folhas de *C. insignis*, se mostraram ativos frente as cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*, com CIM que variaram entre 15,62 e 250 µg/mL. As frações **FHF**, **FCF** e **FAF** também apresentaram resultados satisfatórios contra a cepa de *C. neoformans*, com CIM que variaram entre 125 e 500 µg/mL. Das frações obtidas dos galhos, somente o extrato **EBHEG** e a fração **FCG** apresentaram resultados promissores contra a cepa de *C. albicans*, com CIM= 500 e 125 µg/mL, respectivamente. A **FCG** também foi ativa contra as cepas de *C. glabrata* com CIM= 500 µg/mL.

A atividade apresentada pelos extratos e frações de *C. insignis*, pode estar relacionada com a presença de substâncias que tenham atividade

antifúngica entre elas, a escopoletina que apresentou atividade antifúngica contra as cepas de *C. albicans* (KHAN et al., 2011). No entanto, não apresentou resultados satisfatórios quando testada contra as cepas de *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (OJALA et al., 2000). A alantoína e o ácido cafeico apresentaram atividade antifúngica contra as cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* (OZÇELIK et al., 2011). O cafeoato de metila foi testado contra as cepas de *C. albicans* e apresentou atividade antifúngica (BALACHANDRAN et al., 2012). A mistura dos triterpenos α -amirina e β -amirina apresentou atividade antimicrobiana moderada contra as cepas de *S. aureus* e *C. albicans* e se mostrou inativa contra as cepas de *S. coli* (VILLASENOR et al., 2004). O β -sitosterol glicosilado foi inativo contra as cepas de *S. epidermis*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans* (GIACOMELI, 2005). A escoparona foi testada contra as cepas das bactérias *E. coli* e *S. aureus* e não apresentou resultados significativos (JOHANN et al., 2007).

Tabela 26 – Avaliação das atividades antifúngica e antibacteriana através da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do extrato bruto e das frações obtidas de *Cordia insignis*.

Microrganismos	EBHEG	FHG	FCG	FAC	FRHMG	EBHEF	FHF	FCF	FAG	FRHMF	ANF B	CLO
<i>E. faecalis</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	-	0,25
<i>S. aureus</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	-	0,25
<i>S. epidermidis</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	-	0,125
<i>S. pyogenes</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	-	0,50
<i>B. subtilis</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	-	0,50
<i>E. coli</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	-	0,25
<i>P. aeruginosa</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	-	0,25
<i>K. pneumoniae</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	-	0,50
<i>S. typhimurium</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	-	0,25
<i>S. flexneri</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	-	0,50
<i>C. albicans</i>	500	1000	125	1000	1000	250	15,62	125	62,5	>1000	0,50	-
<i>C. glabrata</i>	1000	>1000	500	>1000	>1000	500	250	500	125	>1000	0,25	-
<i>C. krusei</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	250	125	500	250	>1000	0,50	-
<i>C. parapsilosis</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	0,25	-
<i>C. tropicalis</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	0,25	-
<i>C. neoformans</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	125	500	250	>1000	0,25	-

EBHEG – extrato bruto hidroalcoólico dos galhos; FHG – fração hexânica dos galhos; FCG – fração clorofórmica dos galhos; FAG – fração acetato dos galhos; FRHMG – resíduo hidrometanólico dos galhos; EBHEF – extrato bruto hidroalcoólico das folhas; FHF – fração hexânica das folhas; FCF – fração clorofórmica das folhas; FAF – fração acetato das folhas; FRHMF – resíduo hidrometanólico das folhas; ANF B - anfotericina B; CLO – cloranfenicol.

8.2 Ensaio da atividade antileucêmica *in vitro* dos extratos brutos.

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (INCA, 2016). Dentre os cânceres mais comuns estão as leucemias, que comprometem uma grande variedade de doenças hematológicas malignas.

A quimioterapia é o método mais utilizado no tratamento das leucemias, no entanto, apresenta evidentes limitações de sua efetividade, pois o desenvolvimento de resistência ao tratamento é um fator recorrente. Outra limitação a ser ressaltada é a alta toxicidade dos quimioterápicos, a qual aumenta a morbidade dos pacientes levando-os, muitas vezes, a óbito antes do término do tratamento (BOMFIM, 2013).

Por isso, estudos buscam novas alternativas no tratamento das leucemias.

Os extratos **EBHEF** e **EBHEG** foram incubados com células promielócitas HL-60, K562 e Kasumi-1 na concentração de 100 µg/mL por 24 h, enquanto que para a célula RAJI a incubação durou 48 h. A estaurosporina foi utilizada como controle positivo. Os resultados obtidos estão representados na **Figura 49 (pág. 140)**.

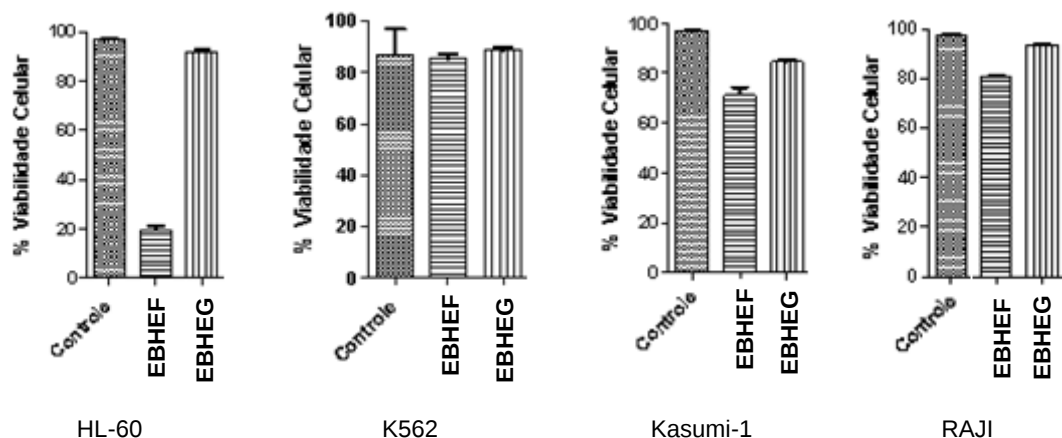


Figura 49: Efeito do extrato bruto hidroalcoólico dos galhos (EBHEG) e das folhas (EBHEF) sobre o ciclo celular das linhagens HL 60, K562, Kasumi-1 e RAJI. As células HL-60, K562 e Kasumi-1 (1×10^5 células/poço) foram incubadas por 24h na presença da estaurosporina (controle) e dos extratos **EBHEG** e **EBHEF**. A célula RAJI foi incubada por 48 h na mesma concentração que as demais. As análises foram realizadas em um Citômetro de Fluxo BD Accuri C6 (Becton Dickinson), com aquisição de 5.000 eventos e avaliadas pelo Software GraphPad Prism 5 versão 5.01.

O **EBHEG** não apresentou resultados satisfatórios para nenhuma das linhagens celulares testadas. O **EBHEF** foi inativo frente as células K562, porém provocou redução significativa na viabilidade das células Kasumi-1 e RAJI. No entanto, para a linhagem HL-60 se mostrou altamente ativo.

Sendo assim, o **EBHEF** de *C. insignis* pode ser considerado promissor no estudo de novos fármacos antileucêmicos, já que o resultado satisfatório apresentado pode estar relacionado com a presença de substâncias no extrato que apresentam atividade antileucêmica entre elas a escopoletina. Entre os estudos descritos na literatura de citotoxicidade para a escopoletina, resultados satisfatórios foram observados na apoptose em células promielócitas HL-60 (NAVARRO, 2005). Já a escoparona inibiu a proliferação de células T de leucemia linfóide. O ácido cafeico apresentou citotoxicidade elevada quando avaliado frente as linhagens celulares de leucemia JURKAT, HL-60, RAJI e U937 (WATANABE et al., 2011).

9. CONCLUSÃO

O estudo químico dos galhos e das folhas de *C. insignis* levou ao isolamento de diferentes metabólitos especiais. Dos galhos foram isolados os esteroides 3-*O*- β -*D*-glicopiranosil sitosterol (I), 3-*O*- β -*D*-glicopiranosil estigmasterol (II), sitosterol (III), estigmasterol (IV) e campesterol (V), a cumarina escoparona (VI), os triterpenos α -amirina (VII) e β -amirina (VIII), o derivado fenilpropanoídico cafeoato de metila (IX) e o ureído alantoína (X). Das folhas também foram isoladas (VI) e (X), além de outra cumarina conhecida como escopoletina (XI) e os derivados fenilpropanoídico ácido cafeico (XII) e rosmarinato de metila (XIII). Como este é o primeiro relato de estudo químico da espécie, todos esses metabólitos estão sendo descritos pela primeira vez na espécie, e estão de acordo com o perfil químico da família.

Os extratos e frações foram submetidos a atividade antimicrobiana, utilizando cepas Gram positivas, Gram negativas e fungos. Nenhum extrato ou fração apresentou atividade antibacteriana. Para as cepas fúngicas, todos os extratos e frações, obtidas das folhas, apresentaram atividade promissora contra as cepas de *Cândida*. As frações hexânicas (FHF), clorofórmica (FCF) e a acetato (FAF) também se mostraram ativas contra as cepas de *Cryptococcus neoformans*.

Na avaliação da atividade antileucêmica, o extrato bruto hidroetanólico dos galhos (EBHEG) não apresentou resultados satisfatórios frente a nenhuma das linhagens testadas, enquanto que o extrato bruto hidroetanólico das folhas (EBHEF) foi altamente ativo frente a linhagem de célula promielócitas HL 60.

As atividades apresentadas pelos extratos e frações podem estar relacionadas com a presença de substâncias que tenham atividade antifúngica e antileucêmica.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B.; Composition and antimicrobial activity of the essential oils two *Origanum* species. *J. Agric. Food. Chem.* v. 49, p. 4168-4170, **2001**.
- AL-MUSAYEIB, N.; PERVEEN, S.; FATIMA, I.; NASIR, M.; HUSSAIN, A.; Antioxidant, anti-glycation and anti-inflammatory activities of phenolic constituents from *Cordia sinensis*. *Molecules*, v. 16, p. 10214-10226, **2011**.
- ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.C.; FURTADO, N.A.J.C. ANDRADE E SILVA, M.L.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova*, v. 31, p. 1224-1229, **2008**.
- ANDRADE, N.S.P.; Química y farmacología de *Cordia collococca* (Boraginaceae). 2007, 90 f., Trabalho de conclusão de curso - Universidad del Zulia – Facultad Experimental de Ciencias, Maracaibo, **2007**.
- ARREBOLA, M.R.B.; PETERLIN, M.F.; BASTOS, D. H. M.; RODRIGUES, R. F. de O.; CARVALHO, P. de O.; Estudo dos componentes lipídicos das sementes de três espécies do gênero *Cordia* L. (Boraginaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 14, nº 1, **2004**.
- ASSONUMA, M.M.; Determinação de alantoína e avaliação farmacológica de *Cordia ecalyculata* VELL. (chá de bugre). 2009, 84 f., Dissertação - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita, Instituto de Química, Araraquara, **2009**.
- BALACHANDRAN, C.; DURAIPANDIYAN, V.; AL-DHABI, N.A.; BALAKRISHNA, K.; KALIA, N.P.; RAJPUT, V.S.; KHAN, I.A.; IGNACIMUTHU, S.; Antimicrobial and antimycobacterial activities of methyl caffeate isolated from *Solanum torvum* Swartz. *Fruit. Indian J. Microbiol.*, v. 52, p. 676-681, **2012**.

BARBAKADZE, V.; GOGILASHVILI, L.; AMIRANASHVILI, L.; MERLANI, M.; MULKIJANYAN, K.; SALGADO, A.; CHANKVETADZE, B. Novel biologically active dihydroxycinnamate-derived polyether from different species of family Boraginaceae. *The georgian national academy of sciences*, v. 7, nº.2, **2013**.

BARROSO, I.C.E.; OLIVEIRA, F. de; Caracterização farmacognóstica dos frutos de *Cordia sellowiana* Cham. e de *Cordia myxa* L. (Boraginaceae Jussieu). *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.19, nº 2A, p. 458-470, **2009**.

BEGUM, S.; PERWAIZ, S.; SIDDIQUI, B.S.; KHAN, S.; FAYYAZ, S.; RAMZAN, M.; Chemical constituents of *Cordia latifolia* and their nematocidal activity. *Chemistry & Biodiversity*, v. 8, **2011**.

BIEBER, L.W.; MESSANA, I.; LINS, S.C.N.; FILHO, A.A. da S.; CHIAPPETA, A.A.; MELLO, J.F. de; Meroterpenoid naphthoquinones from *Cordia corymbosa*. *Phytochemistry*, v. 29, nº 26, p. 1955-1959, **1990**.

BOMFIM, C.C.B.; Avaliação do potencial antileucêmico de adutos aromáticos de Morita-Baylis-Hillman. 2013, 88 f., Monografia – Universidade Federal da Paraíba - Departamento de Ciências Farmacêuticas, João Pessoa, **2013**.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília, **2002**.

BRESCIANI, L.F.V.; Análise qualitativa e quantitativa da metabólitos secundários e propriedades farmacológicas de quatro espécies de plantas medicinais da flora catarinense. 2003, 169 f., Tese, Universidade Federal de Santa Catarina - Cursode Pós-graduação em Química, Florianópolis, **2003**.

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quimica Nova*, v. 32, p. 1523-1527, **2009**.

CARLI, C.B.de A.; Atividade anti-inflamatória e antitumoral da fração terpenoídica e de β -sitosterol obtidos de *Qualea multiflora*. 2009. 96 f., Dissertação – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita. Programa em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, Araraquara, **2009**.

CARVALHO, M.G. de; ALVES, C.C.F.; WERLE, A.A.; BRAZ-FILHO, R.; Metabólitos especiais isolados de *Laseguea erecta* (Apocynaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 16, nº 4, p. 497-500, **2006**.

CYTED SUBPROGRAMA X. *Pryecto X.7*: Búsqueda y desarrollo de antifúngicos naturales y análogos. Rosário: CYTED-PIBEAFUN. **2003**. 181 p.

COSTA, J.F.O.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; GIULIETTI, A.M.; QUEIROZ, L.P.; SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.; Immunomodulatory activity of extracts from *Cordia superba* Cham. and *Cordia rufescens* A. DC. (Boraginaceae), plant species native from Brazilian Semi-arid. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 18, nº 1, p. 11-15, **2008**.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P.M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolícos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 14, p. 6-8, **2004**.

DUARTE, M.C.T.; Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *MultiCiência*, **2006**.

ESCALANTE, A.M.; SANTECCHIA, C.B.; LÓPEZ, S.N.; GATTUSO, M.A.; RAVELO, A.G.; MONACHE, F.D.; SIERRA, M.G.; ZACCHINO, S.A. Isolation of antifungal saponins from *Phytolacca tetramera*, an Argentinean species in critic risk. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 82, p. 29-34, **2002**.

FERESIN, G.E.; TAPIA, A.; LÓPEZ, S.N.; ZACCHINO, S.A. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan Province, Argentine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 78, p. 103–107, **2001**.

FERNÁNDEZ, L.R.; CIRIGLIANO, A.; FABANI, M.P.; LIMA, B.; ALBERTI, S.; KRAMER, F.; TAPIA, A.A.; CABRERA, G.; PALERMO, J.A.; SÁNCHEZ, M.;

Antioxidant neolignans from *Cordia americana*. *Planta Med*, 79, p. 1724-1729, **2013**.

FILHO, J.D.B.M.; Participação das vias ATM/ATR e C-MYC/GSH nos efeitos antitumorais da cordiaquinonas J induzidos pelo estresse oxidativo. 2012, 173 f., Tese, Universidade Federal do Ceará - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, **2012**.

FREITAS, H.P.S. de; Estudo químico e farmacológico de *Cordia polycephala* (Lam.) I. M. Johnston (Boraginaceae). 2010, 193 f., Dissertação, Universidade Federal do Ceará - Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, **2010**.

FREITAS, H.P.S.; MAIA, A.I.V.; SILVEIRA, E.R.; FILHO, J.D.B.M.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; LOTUFO, L.V.C.; PESSOA, O.D.L.; Cytotoxic cordiaquinones from the roots of *Cordia polycephala*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 23, nº 8, p. 1558-1562, **2012**.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O.; Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 15, nº 2, p. 178-182, **2005**.

GASPARINO, E.C.; Estudo polínico das espécies do gênero *Cordia* L. (Boraginaceae) ocorrentes no Estado de São Paulo. 2005, 105 f., Dissertação, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, **2005**.

GIACOMELLI, S.R.; Estudo fitoquímico de três espécies pertencentes à família Rhamnaceae: *Discaria americana*, *Colletia paradoxa* e *Gouania ulmifolia*. 2005, 333 f., Tese, Universidade Federal de Santa Maria - Programa de Pós-graduação em Química, Santa Maria, **2005**.

GOMES, P.A.; Óleo essencial da erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.) de áreas nativas. 2010, 69 f., Dissertação, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes, **2010**.

GUIMARÃES, L.G. de L.; CARDOSO, M. das G.; LUCAS, E.M.F.; FREITAS, M.P. de; FRANCISCO, W.; NELSON, D.L.; Structural elucidation of a new sesquiterpene alcohol by comparative NMR studies. *Rec. Nat. Prod.*, v. 9, nº 2, p. 201-207, **2015**.

IOSET, J.R.; MARSTON, A.; GUPTA, M.P.; HOSTETTMANN, K.; Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots bark of *Cordia curassavica*. *Phytochemistry*, v. 53, p. 613-617, **2000**.

IOSET, J.R.; MARSTON, A.; GUPTA, M.P.; HOSTETTMANN, K.; Antifungal and larvicidal meroterpenoid naphthoquinones and a naphthoxirene from the roots of *Cordia linnaei*. *Phytochemistry*, v. 47, p. 729-734, **1997**.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **INCA**. Disponível em http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. Acesso em: 24 fev. **2016**.

JOHANN, S.; OLIVEIRA, V.L.de; PIZZOLATTI, M.G.; SCHRIPEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; BRANCO, R.; Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus spp.* peels. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 102(6), p. 681-685, **2007**.

KIM, J-K.; KIM, J-Y.; KIM, H-J.; PARK, K-G.; HARRIS, R-A.; CHO, W-J.; LEE, J-T.; LEE, I-K.; Scoparone exerts anti-tumor activity against DU145 prostate cancer cells via inhibition of STAT3 activity. *PLOS ONE*, v. 8, 2013.

KUETE, V.; EFFERTH, T. Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products. *Frontiers in pharmacology*, v. 1, **2010**.

KHAN, Z.U.H.; ALI, F.; KHAN, S.U.; ALI, I.; Phytochemical study on the constituents from *Cirsium arvense*. *Mediterranean Journal of Chemistry*, v. 2, p. 64-69, **2011**.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P.; Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 30, nº 3, p. 241-248, **2009**.

MACIEL, M.A.M.; VEIGA Jr, V.F.; PINTO, A.C.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A.; Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, nº 3, p. 429-438, **2002**.

MARINHO-FILHO, J. D. B.; BEZERRA, D. P.; ARAÚJO, A. J.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C.; DINIZ, J. C.; VIANA, F. A.; PESSOA, O. D.L.; SILVEIRA, E. R.; MORAES, M. O. de; COSTA-LOTUFO, L. V. Oxidative stress induction by (+)-cordiaquinone J triggers both mitochondria-dependent apoptosis and necrosis in leukemia cells. *Chemico-Biological Interactions* 183 (**2010**), p. 369-379.

MASANORI, K.; SEKI, T.; HAYASHI, T.; NAGASHIMA, Y.; KAWAHARA, N.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; Anti-androgenic triterpenoids from the Brazilian medicinal plant, *Cordia multispicata*. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 49, nº 8, p. 954-957, **2001**.

MELO, J.I.M. de.; SALES, M.F. de. Boraginaceae A. Juss. Na região de Xingó: Alagoas e Sergipe. *Hoehnea*, p.369-380, **2005**.

MELO, J.I.M. de; ANDRADE, W.M. de. Boraginaceae s.l. A. Juss. em uma área de Caatinga da ESEC Raso da Catarina, BA, Brasil. *Acta bot. bras.*, v. 21, nº 2, p. 369-378. **2007**.

MENEZES, J.E.S.A.; LEMOS, T.L.G.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O.D.L.; Trichotomol, a new cadinenediol from *Cordia trichotoma*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.12, nº 6, p. 787-790, **2001**.

MENEZES, J.E.S.A.; MACHADO, F.E.A.; LEMOS, T.L.G.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O.D.L.; Sesquiterpenes and a phenylpropanoid from *Cordia trichotoma*. *Z. Naturforsch.*, v. 59 c, p. 19-22, **2004**.

MENEZES, J.E.S.A. de; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; BRAZ-FILHO, R.; MONTENEGRO, R.C.; WILKE, D.V.; LOTUFO, L.V.C.; PESSOA, C.; MORAES, M.O. de; SILVEIRA, E.R.; A cytotoxic meroterpenoid benzoquinone from roots of *Cordia globosa*. *Planta Med.*, 71, p. 54-58, **2005**.

MENGHINI, L.; EPIFANO, F.; LEPORINI, L.; PAGIOTTI, R.; TIRILLINI, B. Phytochemical investigation on leaf extract of *Cordia salicifolia* Cham. *Journal of medicinal food*, v. 11, nº 1, p. 193–194, **2008**.

MITSCHER, L.A.; BEAL, J.L.; BATHALA, M.S. Antimicrobial agents from higher plants. Introduction, rationale, and methodology. *Lloydia*, v. 35, p. 157-161, **1972**.

MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTTI, S. G. The excited-states quenching of resazurin and resorufin and resorufin by *p*-benzoquinones in polar solvents. *Dyes and Pigments*, n. 64, p. 117-124, **2005**.

MOREIRA, D.L.; GUARIM-NETO, G.; Usos múltiplos de plantas do Cerrado: um estudo etnobotânico na comunidade sítio Pindura, Rosário Oeste, Mato Grosso, Brasil. *Polibotânica*, nº 27, p. 159-190, **2009**.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V. da S.; Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. *Química Nova*, v. 24, Nº 1, p. 105-111, **2001**.

MUSCHIETTI, L.; DERITA, M.; SÜLSEN, V.; MUÑOZ, J.D.; FERRARO, G.; ZACCHINO, S.A.; MARTINO, V. *In vitro* antifungal assay of traditional Argentine medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 102, p. 233–238, **2005**.

NARIYA, P.B.; SHUKLA, V.J.; ACHARYA, R.N.; NARIYA, M.B.; BHATT, P.V.; PANDIT, C.M.; TADA, R.; Isolation and characterization of phytosterols from *Cordia macleodii* (Hook F. and Thomson) bark by chromatographic and spectroscopic method. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 7, p. 86-88, **2014**.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras: Norma Aprovada. 2ed. Norma M27-A2. **2002**. Disponível em: <www.anvisa.gov> Acesso em: 26 nov 2012.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. Método de referência para testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbio: Norma Aprovada. 6 ed. Norma M7-A6. **2003**. Disponível em: <www.anvisa.gov> Acesso em: 26 nov de 2014.

NAVARRO, D. de F.; Estudo químico, biológico e farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* Pohl para a obtenção de frações e moléculas bioativas de potencial terapêutico. 2005. 293 f., Tese – Universidade Federal de Santa Catarina. Curso de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2005.

NOGUEIRA, T.B. de S. de S.; NOGUEIRA, R.B. de S. de S.; SILVA, D. A. e; TAVARES, J.F.; LIMA, E. de O.; PEREIRA, F. de O.; FERNANDES, M.M.M. de S.; MEDEIROS, F.A. de; SARQUIS, R. do S.F.R.; BRAZ-FILHO, R.; MACIEL, J.K. da S.; SOUZA, M. de F.V. de. First chemical constituents from *Cordia exaltata* Lam and antimicrobial activity of two neolignans. *Molecules*, p. 11086-11099, **2013**.

OJALA, T.; REMES, S.; HAANSUU, P.; VUORELA, H.; HILTUNEM, R.; HAAHTELA, K.; VUORELA, P.; Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, p. 299-305, **2000**.

OLIVEIRA, F.M.; JUNIOR, H.M.S.; VIANA, F.A.; DINIZ, J.C.; ROCHA, S.A.S.; Quantificação por CLAE de naftoquinonas do extrato das raízes de *Cordia leucocephala* Moric. *Holos*, **2012**.

OZÇELIK, B.; KARTAL, M.; ORHAN, I.; Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology*, v. 4, p. 396-402, **2011**.

PARKS, J.; GYELTSHEN, T.; PRACHYAWARAKORN, V.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTA KOOP, P.; Glutarimide alkaloids and a terpenoid benzoquinone from *Cordia globifera*. *J. Nat. Prod.*, 73, p. 992-994, **2010**.

PINHO, L. de; SOUZA, P.N.S.; SOBRINHO, E.M.; ALMEIDA, A.C. de; MARTINS, E.R.; Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das

folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Ciência Rural*, v. 42, nº 2, p. 326-331, **2012**.

POTT, A.; POTT, V.J.; Plantas do Pantanal. Embrapa, 1ª edição. Editora da Embrapa, **1994**.

PYO, M.K.; LEE, Y.Y.; YUN-CHOI, H.S.; Anti-platelet effect of the constituents isolated from the barks and fruits of *Magnolia obovata*. *Arch. Pharm. Res.*, v. 25, nº 3, p. 325-328, **2002**.

RUIZ, A.L.T.G.; Estudo fitoquímico de *Poecilanthe parviflora* Benth. E *Lonchocarpus atropurpureus* Benth. (Leguminosae) isolamento, determinação estrutural e atividade biológica. 1998, 166 f., Dissertação, Universidade Estadual de Campinas - Programa de Pós-Graduação em Química, Campinas, **1998**.

SANTOS, R.P.; VIANA, F.A.; LEMOS, T.L.G.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O.D.L.; Structure elucidation and total assignment of ^1H and ^{13}C NMR data for a new bisdesmoside saponin from *Cordia piauiensis*. *Magn. Reson. Chem.*, v. 41, p. 735-738, **2003**.

SANTOS, R.P. dos; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; BRAZ-FILHO, R.; RODRIGUES-FILHO, E.; VIANA, F.A.; SILVEIRA, E.R.; Chemical constituents of *Cordia piauiensis*- Boraginaceae. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 16, nº 3B, p. 662-665, **2005**.

SANTOS, R.P.; SILVEIRA, E.R.; UCHÔA, D.E. de A.; PESSOA, O.D.L.; VIANA, F.A.; BRAZ-FILHO, R. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of new saponins from *Cordia piauiensis*. *Magn. Reson. Chem.*, v. 45, p. 692-694, **2007**.

SIDDIQUI, B.S.; PERWAIZ, S.; BEGUM, S.; ALI, T.; Three new constituents, latifolinal, latifolidin and cordicinol, from the fruits and leaves of *Cordia latifolia*. *Natural Product Research*, v. 24, nº 2, p. 160-166, **2010**.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V.; Um panorama atual da Química e da Farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -Lapachona e derivados. *Química Nova*, v. 26, nº 3, p. 407-416, **2003**.

SILVA, S.A.S. da; SOUTO, A.L.; AGRA, M. de F.; CUNHA, E.V.L. da; BARBOSA-FILHO, J.M.; SILVA, M.S. da; BRAZ-FILHO, R.; A new aryl-naphthalene type lignan from *Cordia rufescens* A.DC. (Boraginaceae). *Arkivoc*, nº 6, p. 54-58, **2004**.

SILVA, S.A.S.da; AGRA, M. de F.; TAVARES, J.F.; CUNHA, E.V.L. da; FILHO, J.M.B.; SILVA, M.S. da; Flavanones from aerial parts of *Cordia globosa* (Jacq.) Kunth, Boraginaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, nº 5, p. 682-685, **2010**.

SIQUEIRA, V.L.D.; CORTEZ, D.A.G.; OLIVEIRA, C.E. de; NAKAMURA, C.V.; BAZOTTE, R.B.; Pharmacological studies of *Cordia salicifolia* Cham in normal and diabetic rats. *Brazilian Archives of Biology And Technology An International Journal*, v. 49, nº 2, p. 215-216, **2006**.

SOARES, D.B. da S.; Estudo fitoquímico das folhas de *Psychotria viridis* (Rubiaceae) e avaliação da atividade biológica de extratos e constituintes. 2015, 170 f., Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais - Programa de Pós-graduação em Química, Belo Horizonte, **2015**.

SCHEEREN, L.W.; SCHNEIDER, P.S.P.; SCHNEIDER, P.R.; FINGER, C.A.G.; Crescimento do Louro-Pardo, *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. ex. Steud., na depressão central do estado do Rio Grande do Sul. *Ciência Florestal*, v. 12, nº 2, p. 169-176, **2002**.

STOPPA, M.A.; CASEMIRO, L.A.; VINHOLIS, A.H.C.; CUNHA, W.R.; ANDRADE E SILVA, M.L.; MARTINS, H.G.; FURTADO, N.A.J. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. *Química Nova*, v. 32, p. 498-502, **2009**.

TICLI, F.K.; HAGE, L.I.S.; CAMBRAIA, R.S.; PEREIRA, P.S.; MAGRO, A.J.; FONTES, M.R.M.; STÁBELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon*, v. 46 p. 318-327, **2005**.

TUROLLA, M.S. dos R.; NASCIMENTO, E.de S.; Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, nº 2, **2006**.

VALE, A.E. do; DAVID, J.M.; SANTOS, E.O. dos; DAVID, J.P.; SILVA, L.C.R.C.; BAHIA, M.V.; BRANDÃO, H.N.; An unusual caffeic acid derived bicyclic [2.2.2.] octane lignan and other constituents from *Cordia rufescens*. *Phytochemistry*, v. 76, p. 158-161, **2012**.

VEIGA Jr, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M.; Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v. 28, nº 3, p. 519-528, **2005**.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E.J.; Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Química Nova*, v. 29, nº 2, p. 326-337, **2006**.

VILLASENOR, I.M.; CANLAS, A.P.; FAUSTINO, K.M.; PLANA, K.G.; Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam leaves. *Journal of ethnopharmacology*, v.92, p. 53-56, **2004**.

VIOLANTE, I.M.P. Avaliação das Atividades Biológicas e Estudo Químico de *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. 2012, 201 f. Tese, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Faculdade de Medicina, Campo Grande, **2012**.

VIOLANTE, I.M.P. Avaliação do potencial antimicrobiano e citotóxico de espécies vegetais do Cerrado da Região Centro-Oeste. 2008. 89 f. Dissertação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, **2008**.

VILA-NOVA, N.S.; MORAIS, S.M.; FALCÃO, M.J.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; RONDON, F.C.M.; WILSON, M.E.; VIEIRA, I.G.P.; ANDRADE, H. F. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and *Platymiscium floribundum*, native plants from Caatinga biome. *Pes. Vet. Bras.*, v. 32 (11), p. 1164-1168, **2012**.

ZANON, R.B.; Metabólitos secundários em *Vernonia Tweedieana* Baker. 2006, 180 f., Dissertação, Universidade Federal de Santa Maria - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Santa Maria, **2006**.

WATANABE, M.A.E.; AMARANTE, M.K.; CONTI, B.J.; SFORCIN, J.M.; Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 63, p. 1378-1386, **2011**