



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

KEYLA MAYARA MIAN AROUCHA

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
Qualea paraensis Ducke (Vochysiaceae)

Boa Vista, RR

2015

KEYLA MAYARA MIAN AROUCHA

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
Qualea paraensis Ducke (Vochysiaceae)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Francisco das Chagas do Nascimento.

Boa Vista, RR

2015

KEYLA MAYARA MIAN AROUCHA

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
Qualea paraensis Ducke (Vochysiaceae)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química e avaliada pela seguinte banca examinadora:

Examinadores:

Prof. Dr. Francisco das Chagas do Nascimento
Orientador/Departamento de Química - UFRR

Prof. Dr. André Camargo de Oliveira
Departamento de Química – UERR

Prof^a. Dr^a. Cléria Mendonça de Morais
Departamento de Química – UERR

O único lugar onde sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por todos os obstáculos superados.

Ao Professor Dr. Francisco das Chagas do Nascimento, pelo incentivo, pela valiosa orientação, profissionalismo, suporte técnico, motivação, ensinamentos e amizade, serei eternamente grata por oportunizar esse trabalho.

Aos meus amigos de laboratório: Graciliano Rosa Silva e Shirley Aparecida Carvalho Rabelo pela atenção, colaboração e experiências, pela ajuda na realização de algumas etapas deste trabalho, além da agradabilíssima amizade e convivência.

A minha mãe, por todos esses anos de dedicação, pelo amor e educação, que tanto contribuíram para a formação do meu caráter. Obrigada por ser meu porto-seguro e por confiar em mim, sempre me apoiar em todas as minhas escolhas.

Ao meu noivo Edilson, pela compreensão, carinho, companheirismo e pelo incentivo, por suas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Ao secretário Pedro Rômulo Estevão Ribeiro, pela amizade e pelo incentivo durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Departamento de Química – Universidade Federal de Minas Gerais, em especial a Professora Dr^a. Lucienir Pains Duarte pelos espectros.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial a Professora Dr^a. Jacqueline Aparecida Takahashi, pelos bioensaios.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos no início da pesquisa.

A Universidade Federal de Roraima pela contribuição para a minha formação acadêmica.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico e avaliação biológica do extrato etanólico de *Qualea paraensis* Ducke pertencente a família Vochysiaceae. O material botânico foi coletado no município de Rorainópolis, localizado a 294 Km da capital Boa Vista. O extrato etanólico das cascas, foi particionado com os solventes e rendeu frações em hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. As frações em clorofórmio foram analisadas através de métodos cromatográficos clássicos e determinou-se as atividades antioxidante, antimicrobiana, análise da atividade citotóxica e potencial de inibição da acetilcolinesterase no extrato bruto etanólico. A avaliação da toxicidade foi realizada através do ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* com a DL₅₀. A atividade antioxidante foi determinada pelo sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) em meio metanólico determinando-se o percentual antioxidante e CE₅₀. A atividade antimicrobiana foi testada através da técnica de microdiluição em caldo e a leitura foi realizada em espectrofotômetro, a atividade da acetilcolinesterase também foi determinada com o uso de espectrofotômetro em leitor de Elisa. Os meios de identificação estrutural foram espectros de Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e de ¹³C espectros tipo DEPT 135°, COSY, HSQC e HMBC. O extrato bruto etanólico apresentou baixa atividade antifúngica frente aos fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium proliferatum*. Percebeu-se uma ação moderada da ação antimicrobiana para as bactérias *E. coli* e *S. sanguinis* chegando a 64,59% do percentual de inibição. Não apresentou atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, e baixa toxicidade frente a *Artemia salina*.

Palavras-chave: *Qualea paraensis*. Fitoquímica. Atividade biológica.

ABSTRACT

This paper describes the phytochemical study and biological evaluation of the ethanol extract of *Qualea paraensis* Ducke belonging to Vochysiaceae família. The botanical material was collected in the municipality of Rorainópolis, located 294 km from the capital Boa Vista. The ethanol extract of peel was partitioned with solvents and fractions yielded in hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. The chloroform fractions were analyzed by classical chromatographic methods and determined whether antioxidante activity, antimicrobial, analysis of cytotoxic activity and potential inhibition of acetylcholinesterase. The toxicity evaluation was conducted using the toxicity test facing the microcrustaceans *Artemia salina* with LD₅₀. The antioxidant activity was determined by the kidnapping radical 2, 2-diphenyl-1-picrilhidrazil (DPPH) in methanol means determining the antioxidant and EC₅₀ percentage. The antimicrobial activity was tested using the technique of microdilution broth and were read on a spectrophotometer, acetylcholinesterase activity was also determined using ELISA reader spectrophotometer. The structural identification means are infrared spectra, proton magnetic resonance spectra ¹H and ¹³C 135 type DEPT, COSY, HSQC and HMBC. The crude ethanol extract showed low antifungal activity to fungi *Aspergillus flavus* and *Fusarium proliferatum*. It was noticed a moderate action of antimicrobial action for *E. coli* bacteria and *S. sanguinis* reaching 64.59% of the percentage of inhibition. He showed no inhibitory activity of the enzyme acetylcholinesterase and low toxicity against *Artemia salina*.

Keywords: *Qualea paraensis*. Phytochemical. Biological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa de distribuição da família Vochysiaceae.....	21
Figura 2 -	Substâncias isoladas do gênero <i>Vochysia</i>	23
Figura 3 -	Substâncias isoladas de <i>Vochysia thyrsoidea</i>	25
Figura 4 -	Substâncias Isoladas do gênero <i>Qualea</i>	26
Figura 5 -	Compostos isolados do extrato clorofórmico de <i>Qualea parviflora</i>	27
Figura 6 -	Espécie <i>Qualea paraensis</i> Ducke.....	28
Figura 7 -	Coluna cromatográfica clássica de <i>Qualea paraensis</i>	38
Figura 8 -	Estrutura química de QP-1: ácido 3 β -hidroxilup-20(29) -en-28-óico (ácido betulínico).....	53
Figura 9 -	Espectro de absorção na região do IV de QP-1(KBr).....	54
Figura 10 -	Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de QP-1.....	55
Figura 11 -	Ampliação do Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de QP-1...	56
Figura 12 -	Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) de QP-1.....	57
Figura 13 -	Espectro tipo DEPT 135 ^o (50 MHz, CDCl ₃) de QP-1.....	57
Figura 14 -	Mapa de contorno COSY de QP-1, em CDCl ₃ a 200 MHz.....	58
Figura 15 -	Mapa de contorno HSQC de QP-1 (200 X 50 MHz, CDCl ₃).....	60
Figura 16 -	Mapa de contorno HMBC de QP-1 (200 X 50 MHz, CDCl ₃).....	60
Figura 17 -	Curva analítica de calibração do radical DPPH.....	67
Figura 18 -	Curva de redução de DPPH do extrato etanólico de <i>Qualea paraensis</i> e substâncias referências.....	68
Figura 19 -	Curva de atividade frente à <i>Artemia salina</i>	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Gêneros da família Vochysiaceae.....	22
Tabela 2 -	Classificação botânica de <i>Qualea paraensis</i>	28
Tabela 3 -	Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das cascas de <i>Qualea paraensis</i>	38
Tabela 4 -	Grupos originados do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das cascas de <i>Qualea paraensis</i>	39
Tabela 5 -	Fracionamento cromatográfico do grupo 05.....	40
Tabela 6 -	Grupos originados da cromatografia do grupo 05.....	41
Tabela 7 -	Fracionamento cromatográfico do grupo 03.....	42
Tabela 8 -	Grupos originados da cromatografia do grupo 03.....	43
Tabela 9 -	Fracionamento cromatográfico do grupo 07.....	44
Tabela 10 -	Grupos originados da cromatografia do grupo 07.....	44
Tabela 11 -	Correlações do mapa de contorno COSY.....	58
Tabela 12 -	Correlações observadas no mapa de contorno HMBC de QP-1.....	59
Tabela 13 -	Atribuições dos sinais de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) para QP-1 comparados com dados da literatura.....	61
Tabela 14 -	Atribuições dos sinais de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) para QP-1 comparados com dados da literatura.....	62
Tabela 15 -	Percentual de inibição para bactérias Gram-positivas.....	64
Tabela 16 -	Percentual de inibição para bactérias Gram-negativas.....	65
Tabela 17 -	Percentual de inibição fúngica.....	65

Tabela 18 -	Preparo das soluções para curva do DPPH.....	66
Tabela 19 -	Percentual de redução do DPPH pelo extrato bruto etanólico e substâncias referências em função da concentração.....	67
Tabela 20 -	Número de náuplios mortos.....	69
Tabela 21 -	Dados de atividade frente à <i>Artemia salina</i> para QPEBE.....	70
Tabela 22 -	Análise da atividade inibitória de acetilcolinesterase do extrato Bruto etanólico de <i>Qualea paraensis</i>	71

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 -	Tratamento das cascas de <i>Qualea paraensis</i>	36
Esquema 2 -	Extrato das cascas de <i>Qualea paraensis</i>	37
Esquema 3 -	Fracionamento fitoquímico e substância isolada das cascas de <i>Qualea paraensis</i>	45
Esquema 4 -	Estabilização do radical livre DPPH.....	50

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
AA	Atividade Antioxidante
AACHE	Atividade Anticolinesterásica
AAM	Atividade Antimicrobiana
ACHE	Acetilcolinesterase
β	Beta
BHA	butil-hidroxi-anisol
BHI	Brain Heart Infusion (Infuso de cérebro e coração)
BHT	butil-hidroxi-tolueno
°C	Graus Celsius
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl_3	Clorofórmio Deuterado
CE	Concentração Efetiva
CL_{50}	Concentração Letal 50%
COSY	Correlated Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DL	Dose Letal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EBE	Extrato Bruto Etanólico
EC ₅₀	Concentração Máxima Efetiva
EE	Extrato Etanólico
ER'Os	Espécies Reativas de Oxigênio
g	Gramas
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlattion
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de Potássio
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
µL	Microlitro
mL	Mililitro
µM	Micrômetro
multi.	Multiplicidade
nm	Nanômetro
PA	Para Análise
PG	Propil galato
pH	potencial de Hidrogênio
QP-1	Ácido Betulínico

QPEBE	<i>Qualea paraensis</i> Extrato Bruto Etanólico
QPEE	<i>Qualea paraensis</i> Extrato Etanólico
QUER	Quercetina
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
S	Singleto
TAS	Toxicidade
TBHQ	terc-butil-hidroquinona
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
Vit. C	Ácido Ascórbico
Vit. E	α -tocoferol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA VOCHYSIACEA.....	20
3.2	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO <i>QUALEA</i>	26
3.3	TAXONOMIA VEGETAL.....	28
3.4	DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE <i>QUALEA PARAENSIS</i>	29
3.5	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>QUALEA PARAENSIS</i>	29
3.6	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	29
3.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	30
3.7.1	Radicais livres.....	30
3.7.2	Antioxidantes.....	31
3.8	CITOTOXICIDADE FRENTE À <i>ARTEMIA SALINA</i>	32
3.9	INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	ESPECIFICAÇÕES DE MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS.....	34
4.2	ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>Qualea</i>	

	<i>paraensis</i>	36
4.2.1	Coleta e identificação do material vegetal.....	36
4.2.2	Extratos das cascas de <i>Qualea paraensis</i>	36
4.2.3	Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das cascas de <i>Qualea paraensis</i>	37
4.2.3.1	Grupo 08.....	40
4.2.3.2	Grupo 03.....	41
4.3	ANÁLISE BIOLÓGICA.....	46
4.3.1	Atividade antimicrobiana.....	46
4.3.1.1	Material microbiológico.....	46
4.3.1.2	Determinação da concentração inibitória mínima.....	46
4.3.2	Determinação da Atividade Antioxidante (AA) pela redução do DPPH...	48
4.3.3	Ensaio Toxicológico sobre <i>Artemia salina</i>	50
4.3.3.1	Preparo da solução salina.....	50
4.3.3.2	Preparo das amostras.....	51
4.3.3.3	Avaliação da toxicidade.....	51
4.3.4	Determinação de Inibição da Acetilcolinesterase (I-ACHE).....	52
4.4	DADOS FÍSICO-QUÍMICOS DA SUBSTANCIA ISOLADA.....	53
4.4.1	QP-1.....	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	54
5.1	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA ISOLADA.....	54
5.2	RESULTADOS BIOLÓGICOS.....	63

5.2.1	Atividade Antimicrobiana do Extrato Bruto Etanólico.....	63
5.2.1.1	Interpretação dos resultados.....	63
5.2.2	Determinação da Atividade Antioxidante.....	66
5.2.3	Teste de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	69
5.2.4	Determinação da Inibição da enzima Acetilcolinesterase (I-ACHE).....	71
6	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior floresta tropical do mundo, a floresta Amazônica, que é rica em biodiversidade, permitindo assim o estudo de produtos naturais uma das áreas mais conhecidas da química em nosso país (PUPO e GALLO, 2007). Das 200.000 espécies vegetais existentes no Brasil é provável que pelo menos a metade tenha alguma propriedade terapêutica, e estima-se que nem 1% dessas espécies com potencial foram estudadas adequadamente quanto a suas propriedades medicinais (MARTINS et al., 2003).

A utilização de plantas medicinais no tratamento de doenças recebe influências de diversas culturas como a indígena, africana e a europeia. As plantas são um recurso terapêutico que contribui no fornecimento de substâncias de grande variedade, úteis no tratamento de doenças. Os índios utilizavam a fitoterapia através da observação de animais que procuravam certas plantas quando doentes. Os negros africanos faziam exorcismos com plantas trazidas da África a fim de expulsar espíritos causadores de doenças. A influência europeia teve início no Brasil com a vinda dos primeiros padres com a finalidade de catequizar os índios e assim trouxeram ervas medicinais as quais foram se reproduzindo espontaneamente no solo brasileiro e formando, em alguns casos, variedades distintas (MARTINS et al., 2003).

As estruturas moleculares complexas fornecidas pelas plantas são praticamente impossíveis de serem obtidas sinteticamente, sendo os medicamentos de origem vegetal de grande interesse para indústria farmacêutica (MONTANARI, 2001; PINTO et al., 2002).

Portanto, é muito importante a pesquisa em produtos naturais, visto que muitas pessoas fazem uso de diversas espécies de plantas sem comprovação de sua eficácia e sem o conhecimento dos efeitos colaterais que estas podem causar. O presente estudo refere-se à *Qualea paraensis* Ducke., onde o extrato etanólico foi preparado a partir das cascas do tronco deste vegetal e posteriormente realizou-se o fracionamento e o isolamento do constituinte químico através de várias etapas cromatográficas. Foram realizados testes de citotoxicidade, avaliação antimicrobiana, antioxidante e inibição da enzima acetilcolinesterase no extrato bruto etanólico afim de verificar a presença de atividade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a composição química e avaliar a atividade biológica das cascas do tronco da espécie *Qualea paraensis* Ducke (Vochysiaceae).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar por cromatografia de adsorção as cascas de *Q. paraensis*.
- Isolar e identificar os compostos químicos presente nas cascas por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas.
- Realizar testes biológicos de atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, toxicidade e inibição da enzima acetilcolinesterase com o extrato da espécie em estudo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA VOCHYSIACEAE

Composta por árvores e arbustos tropicais, a família Vochysiaceae possui cerca de 8 gêneros e 200 espécies, sendo que no Brasil ocorrem 6 gêneros e aproximadamente 150 espécies (SOUZA e LORENZI, 2005), é uma família frequente no cerrado e é considerada florística e fitofisionomicamente importante na América do Sul, os gêneros não amazônicos da família possuem em algumas espécies, elementos característicos da vegetação do cerrado brasileiro (BARBOSA; YAMAMOTO; VALIO, 1999) citado por Cândido et. al., (2010).

Os gêneros mais importantes são *Salvertia*, 1 espécie; *Callisthene*, 10 espécies; *Qualea*, 60 espécies; e *Vochysia*, 105 espécies (HEYWOOD, 1993).

Os gêneros da família Vochysiaceae são diferenciados pelas características anatômicas de suas flores, variam entre si no número de pétalas, frutos, sementes e apresentam diferentes formas de carpo (Mayworm et al., 2000). Mesmo sendo uma família com poucas espécies, é considerada um componente típico nas comunidades vegetais de cerrado com ampla distribuição nessa região (Sajo et al., 2002). A distribuição no cerrado é controlada principalmente pelo solo, mais do que por qualquer outro fator ecológico, possui uma heterogeneidade florística e fitofisionômica que está diretamente ligada às características químicas e físicas do solo (AMORIM; BATALHA, 2006) citado por (CÂNDIDO et al., 2010).

No Brasil, o núcleo de distribuição de suas espécies encontra-se na região Guiano-Amazônica e no Planalto Central Brasileiro, de onde se irradiam para as demais regiões (Barroso et al., 1984).

As Vochysiaceae são plantas que acumulam alumínio ocorrendo em solos como os do Brasil, que tem a característica de serem de pH ácido e pobres em minerais (HARIDASAN 1982; JANSEN et al., 2002). A maioria dos solos do cerrado são ácidos, apresentando baixa capacidade de troca de cátions e elevados níveis de saturação de alumínio, metal geralmente tóxico para a maioria das plantas. Muitas espécies se adaptaram para serem capazes de reter esse composto em seus tecidos. Algumas espécies da família

Vochysiaceae não só toleram o alumínio, como são alumínio-dependentes, como é o caso da espécie *Vochysia tunacorum* que é alumínio-dependente e apresenta alta habilidade competitiva, alta frequência e ampla distribuição no Brasil (CÂNDIDO et al., 2010).

A distribuição da família é anfi-atlântica, ou seja, ocorre em ambos os lados do oceano atlântico, seis dos oito gêneros são predominantemente neotropical, sendo apenas *Erismadelphus* e *Korupodendron* exclusivos do oeste e centro da África (KEAY & STAFLEU 1953; LITT & CHEEK 2002; SENTERRE & OBIANG 2005).

Figura 1 – Mapa de distribuição da família Vochysiaceae em amarelo



Fonte: Tropicos, 2015.

As espécies de Vochysiaceae podem ser classificadas como as mais bonitas e mais representativas de cerrado. Neste caso, pode-se destacar as flores de *Qualea* com sua única pétala e um único estame, as inflorescências de *Vochysia*, e os troncos tortuosos de *Qualea grandiflora* Mart. (WARMING & FERRI, 1973).

São lenhosas, geralmente arbóreas, de folhas opostas ou verticiladas, simples, estípulas às vezes glandulares (*Qualea*), com flores piríginas ou epíginas, diclamídeas ou monoclamídeas, frequentemente zigomorfas, isoladas ou em inflorescência do tipo tirso, cálice geralmente calcarado, corola frequentemente com número reduzido de pétalas em um único estame fértil,

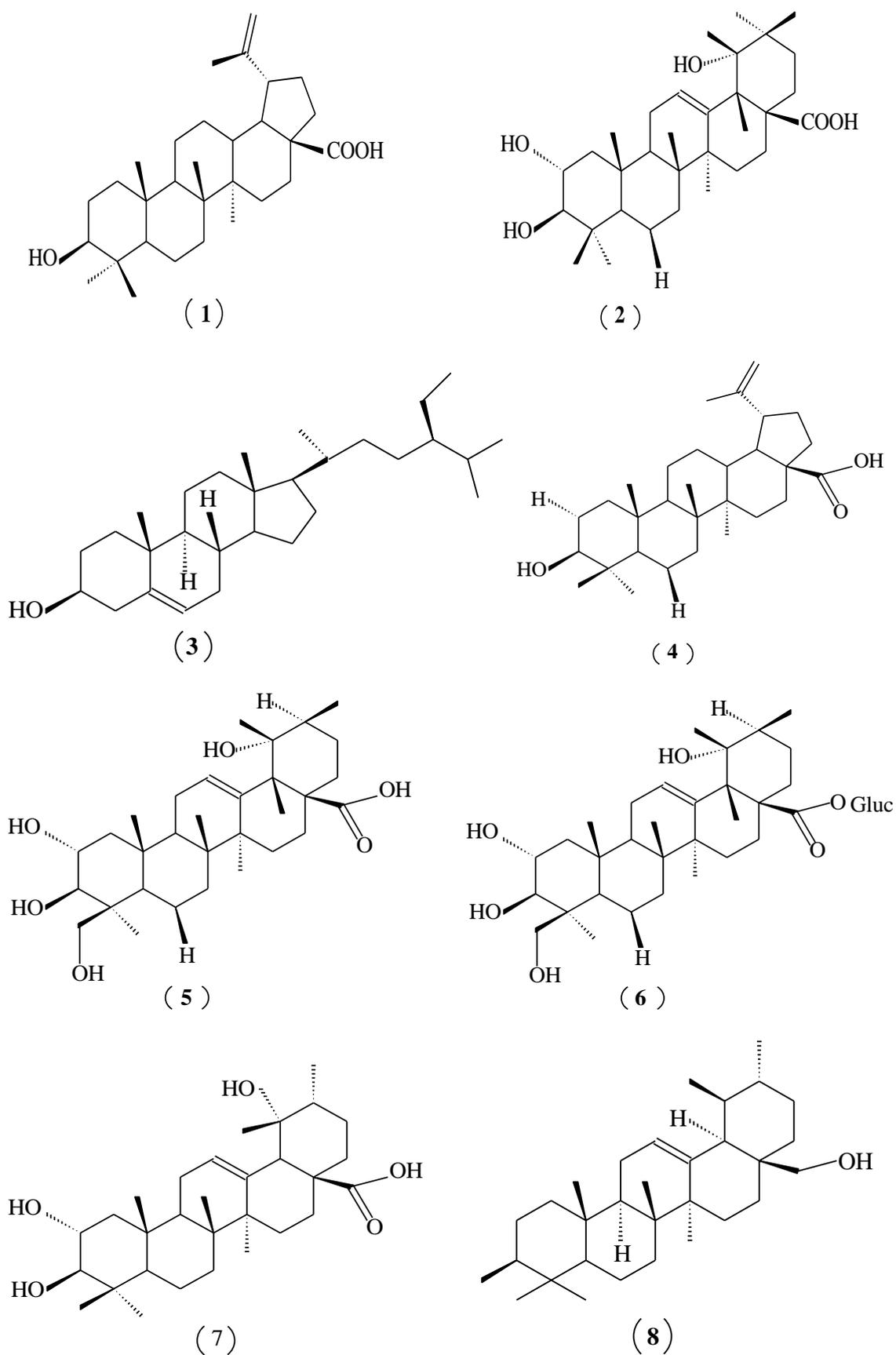
com frutos capsulares ou samaróides e sementes geralmente aladas (BARBOSA 1999; SHIMIZU 2009).

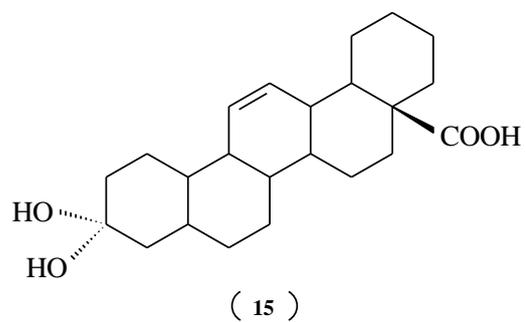
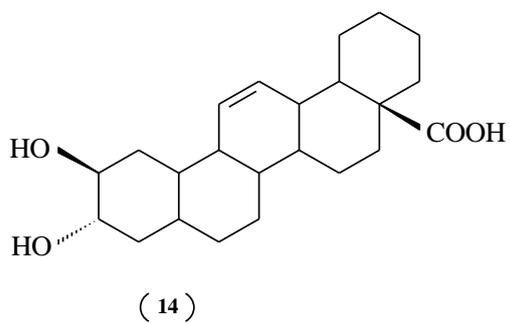
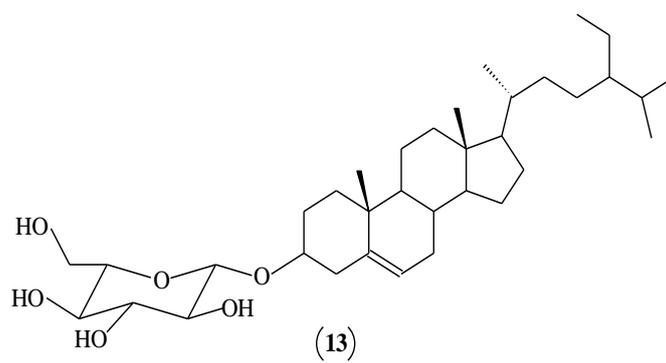
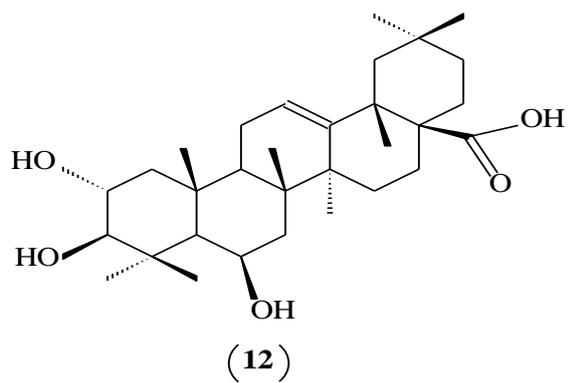
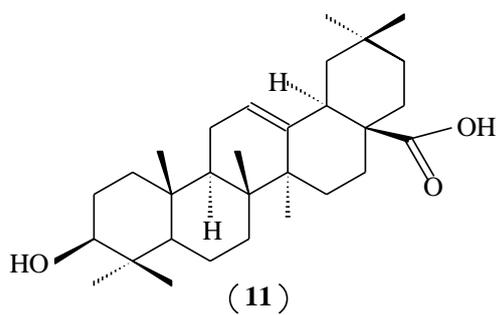
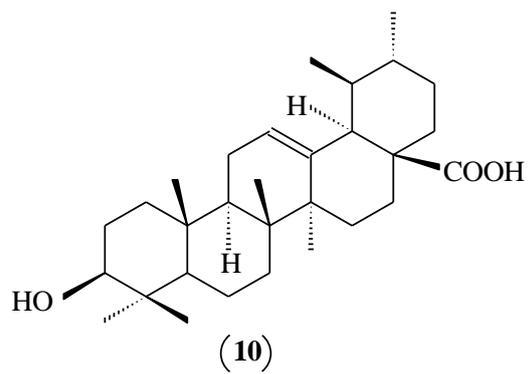
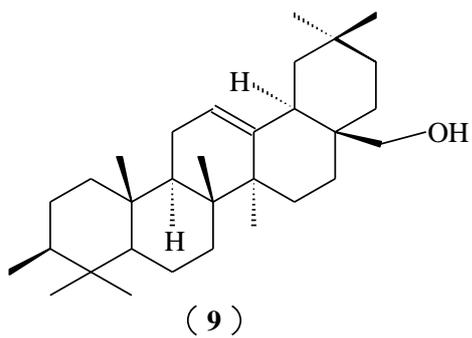
Tabela 1 – Gêneros da família Vochysiaceae

Gêneros
<i>Qualea</i>
<i>Vochysia</i>
<i>Callisthene</i>
<i>Salvertia</i>
<i>Erisma</i>
<i>Ruizterania</i>
<i>Erismadelphus</i>
<i>Korupodendon</i>

Fonte: Shimizu, G. H. (2004).

Estudos fitoquímicos tem sido voltados principalmente para o gênero *Vochysia*. Algumas substâncias como, ácido betulínico(1), ácido sérico(2) e β -sitosterol(3), foram encontrados em *V. divergens* (HESS et al., 1995), ácido divergióico(4), ácido 24-hidroxi-tormentico(5) e o éster glucopiranosil(6) e (HESS e DELLE MONACHE,1999), ácido tormentico(7) (BORTALANZA et al., 2002). Em *Vochysia ferruginea* foi encontrado uvaol(8), eritrodiol(9), ácido ursólico(10), ácido oleanólico(11), ácido 6 β -hidroximaslinico(12), β -sitosterol-glicosilado(13), ácido 2 α , 3 β -dihidroxi-12-en-28-óico(14) e o 3 β -dihidroxiolcano-12-en-28-óico(15) (ZUCARO et al., 2000).

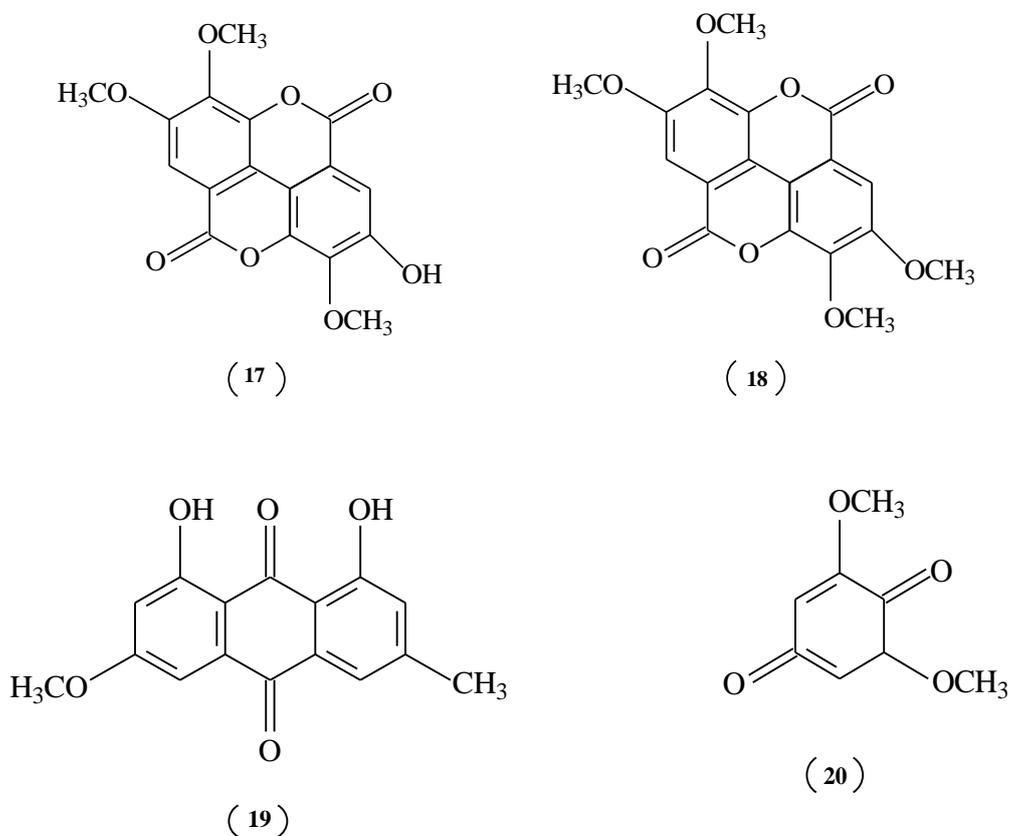
Figura 2 – Substâncias isoladas do gênero *Vochysia*



Vários relatos referente a espécie *Vochysia* descrevem a atividade biológica destas plantas, como exemplo, *V. divergens* é usada contra infecções e asma (POTT e POTT, 1994). Compostos isolados destas espécies têm evidenciado poder antifúngico (HESS et al., 1995), analgésico (BORTALANZA et al., 2002) e antibacteriano (HESS et al., 1997). A atividade antiinflamatória e analgésica foi reportada nos extratos alcoólico de *V. ferruginea* (CALDERON et al., 2001).

A *Vochysia thyrsoidea* Pohl, é uma Vochysiaceae usada na medicina popular como expectorante, é encontrada em abundância no cerrado brasileiro e campos cerrados de altitude. O estudo prévio relacionado à caracterização química dos constituintes desta espécie revela o isolamento de dois ácidos elágicos: ácidos 3,3',4-tri-O-metilelágico(17) e 3,3',4,4' -tetra-O-metilelágico(18) e das duas quinonas 1,8-dihidroxi-6-metoxi-3-metil-antra-quinona(19) e 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona(20) (Sousa, L. R. F. et al., 2014).

Figura 3 - Substâncias isoladas de *Vochysia thyrsoidea*

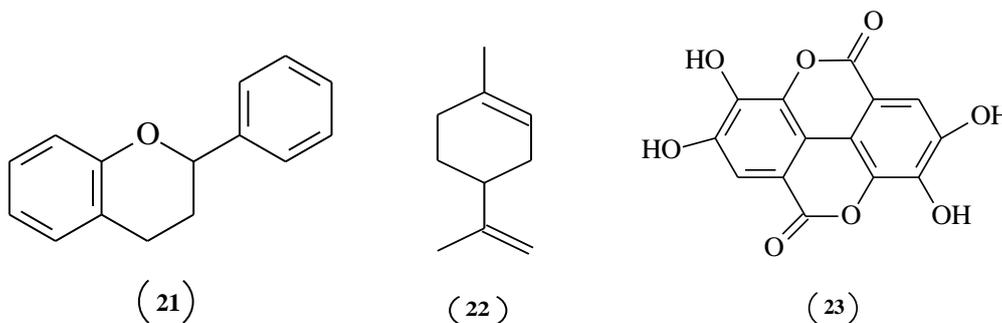


3.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO *QUALEA*

O gênero *Qualea* está presente em toda a América tropical, passando pelo México, Peru e Guianas, indo até o Brasil, principalmente em áreas de cerrado, onde sua presença é marcante. As espécies são conhecidas popularmente como pau-terra, mandioqueira ou quaruba e são utilizadas na medicina tradicional para os mais variados fins (CÔRREA, 1974). Pott e Pott (1994) demonstraram a ocorrência de taninos em *Qualea parviflora*, sendo que a casca em pó ou chá é usada como antisséptico de uso externo, e as folhas são usadas contra acidez estomacal. As cascas, entrecascas e folhas de *Qualea grandiflora* tem ação no sistema nervoso central, se comporta como um agente anticonvulsivante (GASPI, et al., 2006) são usadas como adstringente e antidiarreico, na limpeza de úlceras externas sendo útil também contra inflamações (SEPTÍMO, 1994; ALMEIDA et al., 1998). Estudos recentes mostram que *Q. grandiflora* apresenta atividade antimicrobiana e antiulcerogênica (HIRUMA-LIMA et al., 2006; COSTA et al., 2008). Estudos reportam que o decocto das folhas de *Qualea sp.* é usado para úlceras, gastrites, amebíase, diarreia com sangue e cólicas intestinais (GRANDI et al., 1989).

Estudos fitoquímicos de espécies do gênero *Qualea* resultaram na identificação de ácidos graxos (MAYWORM & SALATINO, 2002), polissacarídeos, taninos pirogálicos e catequínicos (ROCHA et al., 1979), flavonoides(21) (CORRÊA et al., 1981), terpenóides(22) (NASSER et al., 2006) e derivados de ácido elágico(23) (NASSER et al., 2008).

Figura 4 – Substâncias isoladas do Gênero *Qualea*



Estudos a partir do extrato clorofórmico das cascas de *Q. parviflora* resultou no isolamento do β -sitosterol(24), friedelina(25), lupenona(26), lupeol(27), betulina(28) e ácido epibetulínico(29) (Nasser, A. L. M. et al., 2013).

Figura 5 – Compostos isolados do extrato clorofórmico de *Q. parviflora*

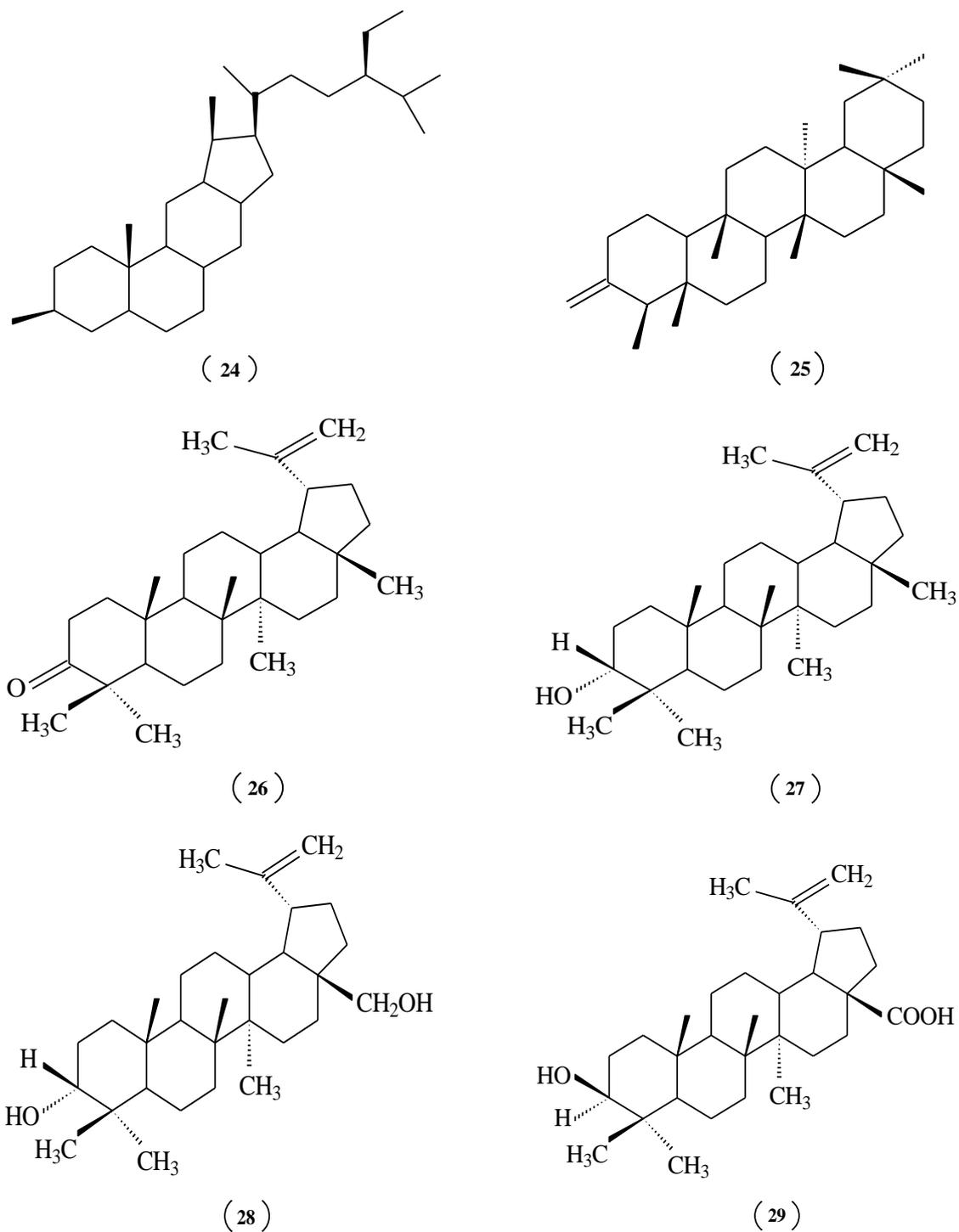


Figura 6 – Espécie de *Qualea paraensis* Ducke



Fonte: Denise Sasaki, 2015.

3.3 TAXONOMIA VEGETAL

Tabela 2 – Classificação botânica de *Qualea paraensis*

Nome Científico	<i>Qualea paraensis</i> Ducke
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Polygalales
Família	Vochysiaceae
Gênero	<i>Qualea</i>

Fonte: Instituto de Ciencias Naturales, 2015.

3.4 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE *QUALEA PARAENSIS*

Nome popular: mandioqueira, mandioqueira vermelha, quaruba, mandioqueira escamosa, lacreiro (LOUREIRO & SILVA, 1968).

Árvore grande, córtex dos ramos jovens esfoliativo; nectários extraflorais axilares, urceolares; pecíolo subcilíndrico, glabro, finamente canaliculado na parte superior; folhas coriáceas, oblongas ou etílico-oblongas, ápice acuminado, base aguda ou obtusa, glabras, lustrosas na face superior, na inferior opacas com alguns pelos junto a nervura mediana; nervuras laterais numerosas (8-15) por cm, salientes nas 2 faces; inflorescência em panículas terminais frequentemente com 2 flores em cincínio; pedicelos delgados, longos, puberulentos; flores aromáticas; cálice seríceo externa e internamente nos lóbulos; lóbulos arredondados, sendo o lateral menor do que o anterior; esporão elipsoide; pétala branca, arredondada, com a base vermelha e o centro amarelo; pétalas rudimentares presentes; estames com filete glabro, antera lanceolada, sub-recurvada, com o dorso piloso, ápice arredondado, emarginado; estaminoides presentes; ovário globoso, densamente piloso com estilete subglabro; estigma semilateral, não captado; fruto cápsula desconhecida (LOUREIRO & SILVA, 1968).

3.5 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *QUALEA PARAENSIS*

No Brasil, tem ampla distribuição na Amazônia brasileira nos Estados do Amazonas, Pará, Acre e Mato Grosso, ocorre ainda na Guiana (LOUREIRO & SILVA, 1968).

Habitat – Comumente encontrada nas margens de terra firme e ocasional na margem de igarapés.

Usos comuns - Compensados, caixas, remos, canoas, esquadrias e construção civil (LOUREIRO & SILVA, 1968).

3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A busca de novos agentes antimicrobianos é muito importante, uma vez que o elevado potencial de recombinação genética das bactérias tem

provocado o aumento de cepas multirresistentes e patógenos que podem surgir de forma mais rápida devido ao uso indiscriminado destes agentes e, conseqüentemente, tornando ineficientes muitos fármacos antimicrobianos disponíveis no mercado (TRIAS, GORDON, 1997; LABARCA, 2002; ALVAREZ, LABARCA, SALLES, 2010).

Existem diversos métodos que podem ser empregados para medir a atividade *in vitro* de microrganismos contra os agentes antimicrobianos (SILVEIRA et al., 2009). Os métodos disponíveis para a detecção da atividade antimicrobiana de produtos naturais, são classificados em três grupos, são eles: Método de difusão em ágar, bioautográfico e diluição. Os métodos de bioautografia e difusão são conhecidos como técnicas qualitativas pois estes métodos apenas demonstram a presença ou ausência de substâncias com atividade antimicrobiana. Por outro lado, os métodos de diluição são considerados ensaios quantitativos, uma vez que determinam a concentração inibitória mínima (VALGAS et al., 2007).

3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.7.1 Radicais livres

Radicaís livres são espécies químicas, geralmente muito reativas, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. São formados nas células como consequência tanto do metabolismo aeróbico normal quanto por fatores externos (ADELMANN, 2005). De uma maneira mais coerente são denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO's), quando em concentrações baixas ou moderadas podem ser benéficos para a célula, e estão envolvidos em vários processos fisiológicos de sinalização e de regulação (FRIDOVICH, 1999). Esses radicaís livres são usualmente removidos ou inativados *in vivo* por enzimas antioxidantes endógenas. Porém, as ERO's tornam-se danosas quando em condições anormais são produzidas em excesso, quando isso ocorre, o organismo lança mão de sistemas de defesa endógenos ou exógenos que os estabilizam ou desativam antes que ataquem os alvos biológicos, mas essa defesa pode ser insuficiente podendo causar dano celular. Por isso, a ingestão de antioxidantes através da dieta tem

uma importante função na prevenção de doenças causadas pelos danos das ERO's (ADELMANN, 2005).

Como fontes endógenas de produção de espécies reativas temos como exemplo a própria mitocôndria onde ocorre o processo de respiração celular, os processos inflamatórios e ações enzimáticas. Como fontes exógenas produtoras de ERO's temos o ozônio, os íons metálicos, as radiações gama e ultravioleta, os medicamentos, alguns alimentos, poluentes ambientais e exercícios físicos (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

3.7.2 Antioxidantes

Antioxidante são compostos que tem a finalidade de reagir diretamente com os agentes oxidantes, assim como, os radicais livres. Esses compostos possuem a capacidade de doar elétrons para um radical livre, inativando-o, tornando-o um composto eletricamente estável (ARBOS, 2004; COSTA; FERREIRA, 2011).

Essas substâncias combatem os radicais livres, diminuindo seu poder de reação química, atuam no organismo como mecanismos de defesa e estão em constante atividade, pois a produção de energia no organismo é uma das principais causas da formação dos radicais livres (RAMALHO; JORGE, 2006).

Doenças causadas por estresse oxidativo em sistemas biológicos podem ser retardadas através de alimentação rica em vitamina C e E que são encontradas em frutas, cereais e diferentes vegetais (SIMÕES et al., 2000). Vários compostos isolados de plantas e vegetais de natureza química diversificada promovem ação antioxidante reconhecida, principalmente aquelas que possuem em sua estrutura um grupamento fenólico, representados por cumarinas, flavonoides, antraquinonas e taninos (ARBOS, 2004; COSTA; FERREIRA, 2011).

A estrutura fenólica desses compostos, permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando assim a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres. Entretanto, estes radicais podem se estabilizar promovendo o encerramento da propagação em cadeia e

formação de novos agentes oxidantes (BUCK 1981 apud RAMALHO; JORGE, 2006).

Entre os antioxidantes mais conhecidos estão as vitaminas, principalmente C e E, e os flavonoides, entre os quais se pode citar a quercetina e rutina (GARRIDO et al., 2002).

A vitamina C, ou ácido L-ascórbico é um composto natural, com uma potente atividade antioxidante, por ser uma substância hidrossolúvel, está envolvida em diversas funções biológicas cuja função principal no organismo é proteger lipoproteínas da oxidação (ARBOS, 2004). A quercetina (3, 5, 7, 3' – 4' – pentahidroxi-flavona) é o principal flavonóide presente na dieta humana e têm sido estudada nos últimos anos, destacando seu potencial antioxidante, anticarcinogênico e seus efeitos protetores aos sistemas cardiovascular e hepático (BEHLING et al., 2004).

Os antioxidantes podem ser de caráter enzimático como, por exemplo, a catalase (CAT) entre outras e não enzimáticos como por exemplo o ácido ascórbico (vit. C), entre outros com diferentes mecanismos de ação (ANDRADE et al., 2007).

Os antioxidantes naturais mais utilizados são os tocoferóis, os ácidos fenólicos e os extratos de plantas e os sintéticos mais comumente utilizados na indústria de alimentos são BHA, BHT, PG e TBHQ (RAMALHO; JORGE, 2006).

Devido ao aumento da perspectiva de vida e ao surgimento de doenças degenerativas próprias ao envelhecimento, tem sido de grande relevância pesquisas de compostos antioxidantes exógenos como adjuvantes do sistema endógeno, principalmente compostos naturais fitoquímicos. Em especial os compostos fenólicos que agem tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo com a formação de intermediários relativamente estáveis devido a ressonância do anel aromático presente em suas estruturas (YAMAGUCHI et al., 1998).

3.8 CITOTOXICIDADE FRENTE À *ARTEMIA SALINA*

A *Artemia salina* (Crustacea, Anostraca) é um microcrustáceo de água salgada de coloração que vai do rosa-pálido a avermelhado, branco ou esverdeado dependendo do seu tipo de alimentação, apresenta dimorfismo

sexual e atinge a fase adulta em 20 dias. É utilizado como alimento para peixes, se movimenta de forma agitada normalmente próximo à superfície da água e é encontrado em lojas de aquaristas. Seu ciclo de vida tem início com a eclosão de cistos dormentes, os quais são embriões encapsulados metabolicamente inativos. Estes cistos podem ficar em estado de dormência por muitos anos, desde que fiquem em lugar seco, já que em contato com água salgada hidratam-se e reassumem seu desenvolvimento (GOMES, 1986 apud BORTOLOTTI, 2007).

Quando entra em contato com alguma substância que a afeta, seus movimentos são imediatamente reduzidos por incapacidade de manter a parte superior da coluna, fazendo-a afundar. A positividade do teste se dá visualmente pela detecção de imobilidade do crustáceo (MEYER et al., 1982).

A utilização deste organismo como bioindicador em testes de toxicidade é devido a fácil manutenção em condições de laboratório, ampla distribuição, praticidade de manuseio e cultivo além de ser um método rápido e de baixo custo (BORTOLOTTI, 2007).

3.9 INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

Presente no sistema nervoso central e periférico, a acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima pertencente a família das colinesterases, sendo responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (Rang, 2001).

A Doença de Alzheimer (DA) foi caracterizada pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer em 1907, como uma doença associada a idade e caracterizada pelo declínio dos neurotransmissores, com perda de memória, alucinações, ilusões e comprometimento psicossocial (ALZHEIMER, 1907 apud GOES, V. F., 2006).

O primeiro aspecto clínico da doença de Alzheimer é a deficiência da memória recente, enquanto as lembranças remotas são preservadas até certo estágio da doença. As dificuldades de atenção e fluência verbal, além de dificuldade de executar atividades cotidianas vão aparecendo à medida que a patologia evolui. O grau de vigília e a lucidez do paciente são afetados em

estágios avançados da doença. Fraqueza motora não é observada, porém, as contraturas musculares são uma característica quase universal nos estágios avançados da patologia, ocorre a diminuição do vocabulário, diminuição do apetite e do peso, assim como descontrole urinário e fecal, e dependência progressiva do cuidador (CANINEU, 2002; STUART, ROBERT, 2006; LINDEBOOM, WEINSTEIN, 2004).

A deficiência do neurotransmissor do sistema nervoso central acetilcolina (ACH) é citada como fator desencadeador da doença, ela está envolvida na aquisição, consolidação e transmissão da memória. A diminuição da ACH pode ser causada pela deficiência da enzima colina acetiltransferase ou por sua degradação pela enzima acetilcolinesterase (ACHE), verifica-se ainda um acúmulo da proteína β -amilóide nas placas senis e da microtubulina *tau* nosovelos neurofibrilares impossibilitando a produção de ACH (LEHNINGER et al., 2007; BRUNTON, 2012).

Não existe tratamento efetivo conclusivo para a deterioração cognitiva da doença de Alzheimer, estratégias psicossociais e intervenção farmacológica limitam-se apenas ao retardo na evolução da doença e melhora temporária de estado funcional do paciente (MARTINEZ, 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESPECIFICAÇÕES DE MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS

Na preparação dos extratos hexânico e etanólico, foi utilizado um frasco de Mariotte, seguido de evaporação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Para a cromatografia líquida em coluna (CL) utilizou-se sílica gel 60 da marca Vetec com tamanho de partículas entre 70-230 mesh.

Para a cromatografia em camada delgada (CCD), foram utilizadas placas de vidro e sílica gel 60G da marca Vetec com espessura de 0,25 mm, previamente ativada entre 100 à 120°C por 30 minutos.

As revelações cromatográficas foram realizadas com revelador de vanilina sulfúrica. A solução reveladora foi preparada pela mistura de uma

solução de 1% (p/v) de vanilina em metanol com uma solução de ácido sulfúrico 5% (p/v) em etanol (ALVES, 2007).

Os solventes utilizados na cromatografia líquida em coluna foram das marcas Synth e Nuclear de grau de pureza analítico (P. A). A água utilizada na análise dos experimentos foi previamente destilada.

Os critérios de pureza adotados foram:

- Observação de uma mancha única por cromatografia em camada delgada (CCD).

- Observação dos sinais de espectros de RMN de ^{13}C e RMN de ^1H comparados com a literatura.

Os espectros de absorção na região do Infravermelho foram registrados em espectrofotômetro FT-IR Shimadzu, modelo Prestige 21, na região de 4000 a 400 cm^{-1} , em pastilhas de KBr.

As técnicas unidimensional e bidimensional de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foram realizadas em espectrômetro Bruker operado a 200 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade δ (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. Tetrametilsilano (TMS) foi empregado como padrão de referência interna, tendo CDCl_3 como solvente.

As multiplicidades no espectro de RMN de ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (singleto), *d* (dubleto), *dd* (duplo dubleto), *t* (tripleto), *q* (quarteto), *m* (multiplete).

O ponto de fusão da amostra foi determinado em aparelho digital para ponto de fusão, marca Microquímica, modelo MQAPF-302 com bloco de alumínio e temperatura que varia de 0-350°C, da Universidade Federal de Roraima. Os valores obtidos foram comparados com os da literatura.

4.2 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Qualea paraensis*

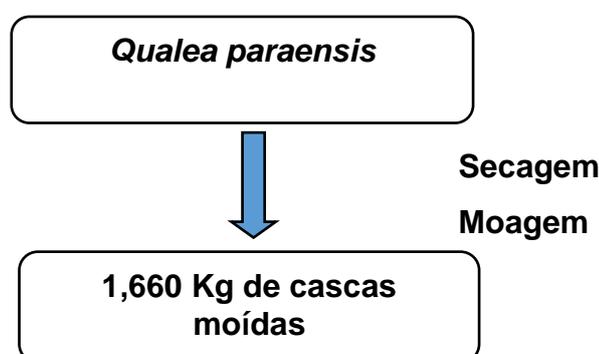
4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal

As cascas de *Qualea paraensis*, foram coletadas em Agosto de 2013, no município de Rorainópolis-RR pelos Professores Dr. André Camargo de Oliveira e Prof. Msc. Tiago Monteiro Condé da Universidade Estadual de Roraima, Campus de Rorainópolis. Uma exsicata encontra-se depositada no laboratório da Embrapa Roraima.

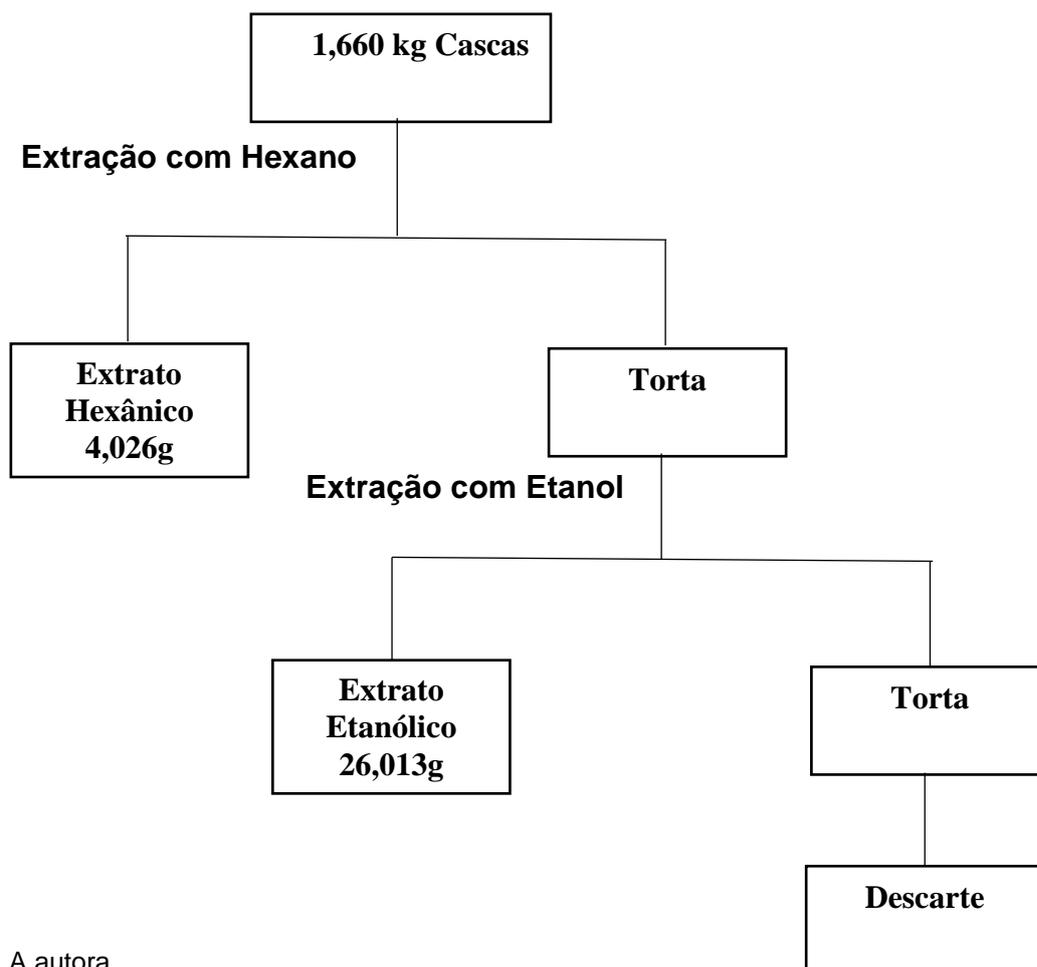
4.2.2 Extratos das cascas de *Qualea paraensis*

As cascas de *Qualea paraensis*, após secagem em temperatura ambiente, foram trituradas e pulverizadas em liquidificador, totalizando 1,600 kg de pó seco o qual foi transferido para o frasco de Mariotte. O processo de extração empregado foi a técnica de maceração exaustiva, os extratores foram utilizados em ordem crescente de polaridade, sendo primeiramente o hexano, seguido por etanol bidestilado levado ao banho-Maria. O processo foi acompanhado por filtração primeiramente em um pano fino e logo após em papel de filtro, e concentrados sob pressão reduzida, em evaporador rotativo, fornecendo 4,026 g de extrato hexânico e 25,513 g de extrato etanólico (Esquema 2). O produto obtido de cada extrator foi denominado como Extrato Bruto Hexânico (EBH) e Extrato Bruto Etanólico (EBE).

Esquema 1 – Tratamento das cascas de *Qualea paraensis*



Fonte: A autora.

Esquema 2 – Extrato das cascas de *Qualea paraensis*

Fonte: A autora.

4.2.3 Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das cascas de *Qualea paraensis*

Parte do extrato etanólico (25,513g) foram submetidos ao procedimento de cromatografia em coluna (CC), utilizando-se sílica gel 60 G (70 -230 mesh) como fase estacionária e diferentes eluentes como fase móvel, hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, intercalados com as respectivas misturas binárias. Foram coletadas 183 frações, conforme os resultados da tabela 3.

Figura 7 – Coluna cromatográfica clássica de *Qualea paraensis*

Fonte: A autora.

Tabela 3 – Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das cascas de *Qualea paraensis*

Eluente	Frações
Hexano/Clorofórmio 30%	1
Hexano/Clorofórmio 50%	2 – 4
Hexano/Clorofórmio 60%	5 – 10
Hexano/Clorofórmio 70%	11 – 41
Hexano/Clorofórmio 80%	42 – 67
Hexano/Clorofórmio 90%	68 – 73
Clorofórmio	74 – 83
Clorofórmio/Acetato de etila 10%	84 – 89
Clorofórmio/Acetato de etila 20%	90 – 96
Clorofórmio/Acetato de etila 30%	97 – 115
Clorofórmio/Acetato de etila 40%	116 – 122
Clorofórmio/Acetato de etila 50%	123 – 127
Clorofórmio/Acetato de etila 60%	128 – 139
Clorofórmio/Acetato de etila 70%	140 – 143
Clorofórmio/Acetato de etila 80%	144 – 166
Clorofórmio/Acetato de etila 90%	167 – 177
Acetato de etila	178 – 182
Metanol	183

Fonte: A autora.

Essas frações foram analisadas em CCD a fim de verificar quais frações eram similares e poderiam ser agrupadas. Feito este procedimento, as frações foram reunidas em 20 grupos, cujas massas estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Grupos originados do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das cascas de *Qualea paraensis*

Grupos	Frações	Massas (g)
01	1 – 2	0,107
02	3 – 4	0,049
03	5 – 7	0,483
04	8 – 11	0,237
05	12 – 13	0,064
06	14 – 18	0,415
07	19 – 21	1,243
08	22 – 81	8,231
09	82 – 86	0,330
10	87 – 90	0,242
11	91 – 92	0,535
12	93 - 104	0,561
13	105 – 117	0,551
14	118 - 125	0,681
15	126 – 130	0,498
16	131 – 143	0,846
17	144 – 156	0,668
18	157 – 169	0,832
19	170 – 182	0,381
20	183	4,028
Total	-	20,982

Fonte: A autora.

4.2.3.1 Grupo 08

O grupo 08, correspondente as frações 22 – 81, de massa 8,231g foi cromatografado em coluna de sílica gel fornecendo 12 grupos. Destes, o grupo 5 (frações 24-39) obtido da cromatografia do grupo 08 também foi cromatografado e forneceu 121 frações. Análise por CCD permitiu reunir essas frações em 10 subgrupos conforme tabela 6.

Tabela 5 – Fracionamento cromatográfico do grupo 05

Eluente	Frações
Hexano/Clorofórmio 50%	01
Hexano/Clorofórmio 60%	02 – 08
Hexano/Clorofórmio 70%	09 – 12
Hexano/Clorofórmio 80%	13 – 53
Hexano/Clorofórmio 90%	54 – 58
Clorofórmio	59 – 63
Clorofórmio/Acetato de etila 10%	64 – 70
Clorofórmio/Acetato de etila 20%	71 – 80
Clorofórmio/Acetato de etila 30%	81 – 85
Clorofórmio/Acetato de etila 40%	86 – 89
Clorofórmio/Acetato de etila 50%	90 – 94
Clorofórmio/Acetato de etila 60%	95 – 97
Clorofórmio/Acetato de etila 70%	98 – 103
Clorofórmio/Acetato de etila 80%	104 – 109
Clorofórmio/Acetato de etila 90%	110 – 115
Acetato de etila	116 – 120
Metanol	121

Fonte: A autora.

Após comparação em CCD foram reunidas frações iguais em 10 grupos, conforme a Tabela 6.

Tabela 6 – Grupos originados da cromatografia do grupo 05

Grupo	Frações	Massa (g)
01	01 – 12	0,030
02	13 – 16	0,362
03	17 – 49	2,279
04	50 – 61	0,209
05	62 – 73	0,032
06	74 – 85	0,023
07	86 – 97	0,013
08	98 – 109	0,017
09	110 – 120	0,012
10	121	0,624

Fonte: A autora.

4.2.3.2 Grupo 03

O grupo 03, (tabela 6) por apresentar maior massa (2,279g) foi cromatografado em coluna de sílica gel, fornecendo 151 frações. Tabela 7.

Tabela 7 – Fracionamento cromatográfico do grupo 03

Eluente	Frações
Hexano/Clorofórmio 40%	01
Hexano/Clorofórmio 50%	02 – 10
Hexano/Clorofórmio 60%	11 – 19
Hexano/Clorofórmio 70%	20 – 103
Hexano/Clorofórmio 80%	104 – 108
Clorofórmio	109 – 116
Clorofórmio/Acetato de etila 20%	117 – 120
Clorofórmio/Acetato de etila 30%	121 – 124
Clorofórmio/Acetato de etila 40%	125 – 129
Clorofórmio/Acetato de etila 50%	130 – 133
Clorofórmio/Acetato de etila 60%	134 – 136
Clorofórmio/Acetato de etila 70%	137 – 139
Clorofórmio/Acetato de etila 80%	140 – 143
Clorofórmio/Acetato de etila 90%	144 – 146
Acetato de etila	147 – 150
Metanol	151

Fonte: A autora.

Após comparação em CCD foram reunidas frações iguais em 12 grupos, conforme a Tabela 8.

Tabela 8 – Grupos originados da cromatografia do grupo 03

Grupo	Frações	Massa (g)
01	1 – 5	0,005
02	6 – 8	0,025
03	9 – 13	0,019
04	14 – 22	0,032
05	23 – 24	0,050
06	25 – 39	0,053
07	40 – 87	1,308
08	88 – 110	0,186
09	111 – 118	0,003
10	119 – 130	0,031
11	131 – 150	0,034
12	151	0,060

Fonte: A autora.

Do grupo 06 (frações 25-39), foi isolado uma substância denominada **QP-1**, a qual foi recristalizada fornecendo um sólido branco com massa 0,050g, Análise por RMN mono e bidimensional permitiu identifica-la como o ácido betulínico.

O grupo 07 (frações 40-87), com 1,308g foi cromatografado em coluna, fornecendo 83 frações. Utilizando eluentes da mesma maneira que as outras colunas em ordem crescente de polaridade, Tabela 09.

Tabela 9 – Fracionamento cromatográfico do grupo 07

Eluentes	Frações
Hexano/Acetato de etila 5%	1 – 2
Hexano/Acetato de etila 10%	3 – 4
Hexano/Acetato de etila 20%	5 – 38
Hexano/Acetato de etila 30%	39 – 52
Hexano/Acetato de etila 40%	53 – 62
Hexano/Acetato de etila 50%	63 – 67
Hexano/Acetato de etila 60%	68 – 71
Hexano/Acetato de etila 70%	72 – 74
Hexano/Acetato de etila 80%	75 – 77
Hexano/Acetato de etila 90%	78 – 79
Acetato de etila	80 – 82
Metanol	83

Fonte: A autora.

Após comparação em CCD foram reunidas frações iguais em 06 grupos, conforme a Tabela 10.

Tabela 10 – Grupos originados da cromatografia do grupo 07

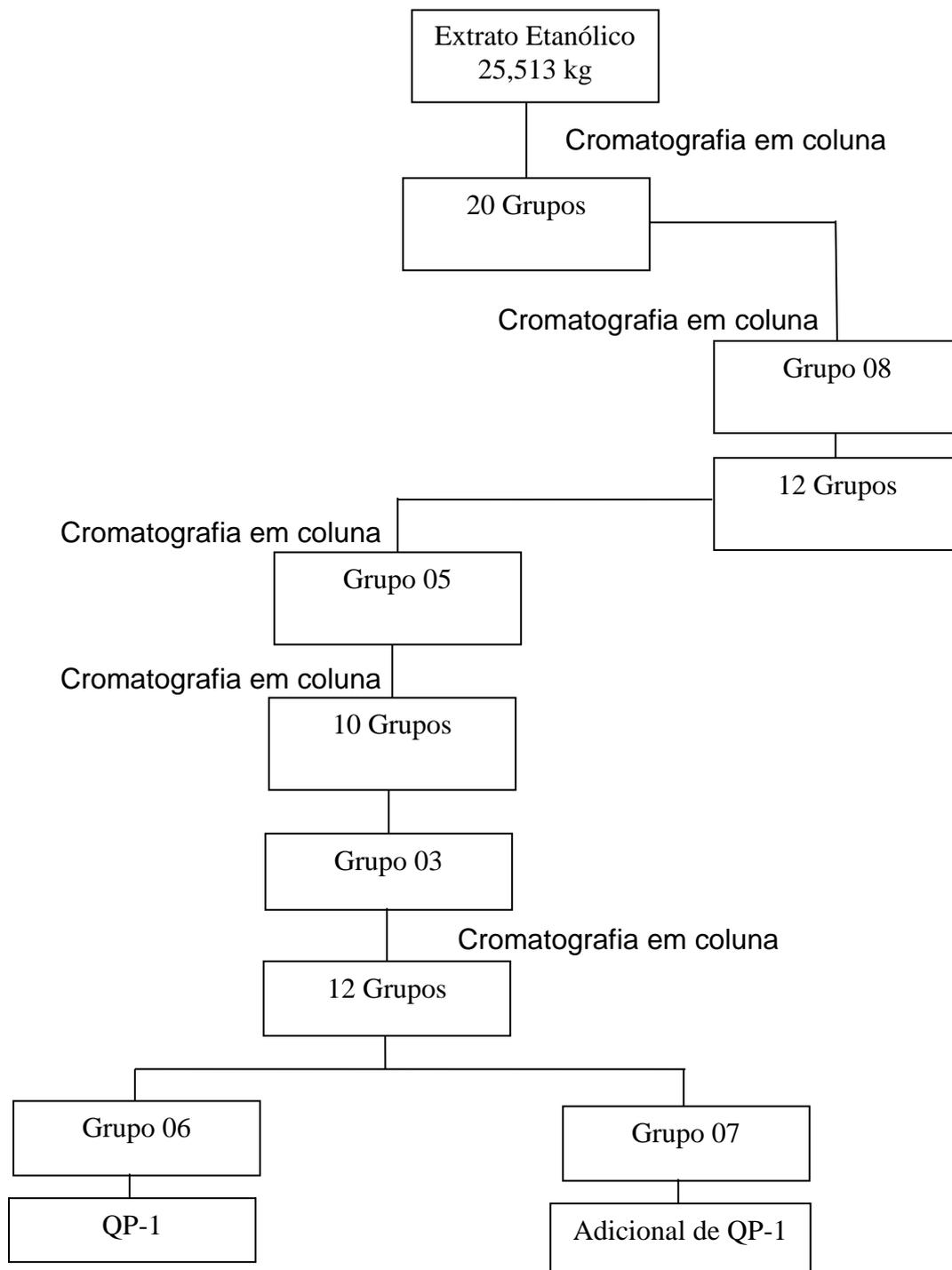
Grupo	Frações	Massa (g)
01	1 – 4	0,001
02	5 – 6	0,020
03	7 – 11	0,052
04	12 – 68	0,405
05	69 – 82	0,001
06	83	0,004

Fonte: A autora.

O grupo 3 (frações 7-11), após análise por CCD, constatou-se ser uma mistura adicional de QP-1.

O esquema 3, sumariza o fracionamento fitoquímico e substância isolada das cascas de *Qualea paraensis*

Esquema 3 - Fracionamento fitoquímico e substância isolada das cascas de *Qualea paraensis*



Fonte: A autora.

4.3 ANÁLISE BIOLÓGICA

4.3.1 Atividade antimicrobiana

A ação antimicrobiana foi investigada no Laboratório de biotecnologia e Bioensaios, no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela equipe e sob a supervisão da Professora Doutora Jaqueline Takahashi. Foi realizado apenas um efeito comparativo com os fármacos.

4.3.1.1 Material microbiológico

Na determinação da atividade antimicrobiana para fungos e bactérias, foram testados os fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium proliferatum*, as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella tiphymurium*, e as gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 49456).

4.3.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima

Os procedimentos abaixo foram descritos pela Prof. Dra. Jaqueline Takahashi:

As amostras foram pesadas e solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em uma solução com concentração de 50 mg/mL (extratos) e 12,5 mg/mL (substâncias puras). Pipetaram-se 40 µL desta solução para um frasco contendo 960 µL de meio de cultura BHI (solução de trabalho). Foi preparado um pré-inócuo no qual os microrganismos estocados em tubos de ensaio foram transferidos com alça de platina e inoculadas em tubos de ensaios contendo 3,0 mL de meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion, Infuso de cérebro e coração). Em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 37 °C por 18 h. Com o auxílio de uma micropipeta, 500 µL do pré-inócuo foram transferidos para os tubos de ensaio contendo 4,5 mL de água destilada estéril. Os tubos foram homogeneizados e a concentração ajustada comparando-se com o tubo

0,5 da escala de McFarland de turbidez padrão (10^8 UFC/mL), obtendo-se assim, os inócuos utilizados no teste.

Os testes foram realizados em placas de 96 micropoços, em duplicata. Em cada poço foram adicionados 100 μ L do meio de cultura BHI. No poço 1 foram adicionados também 100 μ L da solução de trabalho. Homogeneizou-se a solução e 100 μ L foram transferidos para o próximo poço e assim sucessivamente. Desprezaram-se os 100 μ L finais. Foram testadas 8 concentrações de cada amostra. A seguir, 100 μ L do inócuo do micro-organismo a ser testado foram adicionados a cada poço. Foram realizados dois controles, um para controle de crescimento do micro-organismo, no qual não houve adição da solução de trabalho (para verificar a viabilidade celular) e o branco, em que não se adicionou o inócuo (para se eliminar o efeito da coloração da solução de trabalho). Uma placa controle contendo 100 μ L de meio de cultura BHI e 100 μ L de água destilada estéril foi adicionada ao experimento como de controle de esterilidade do meio de cultura BHI.

As microplacas foram submetidas a primeira leitura em leitor de placa de Elisa (492 nm) imediatamente após a execução do experimento (leitura a 0h). Posteriormente, foram incubadas em estufa a 37 °C e após 24 h foi realizada nova leitura das mesmas, encerrando o teste.

Na determinação dos bioensaios para os fungos filamentosos *Aspergillus flavus* e *Fusarium proliferatum*, o meio utilizado para o crescimento dos microrganismo foi o caldo Sabouraud e inoculada as suspensões de esporos na concentração de 5×10^{-5} esporos/ml, as amostras foram pesadas e solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em uma solução com concentração de 250 mg/ml. Em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 37°C por 48h.

Após a incubação, a leitura foi realizada em leitor de placas de microtitulação, utilizando o comprimento de onda de 490 nm. Para o tratamento estatístico dos dados foram utilizados os testes de Outlier, teste de Grubbs com nível de significância de 95%. O cálculo da porcentagem de inibição foi realizado através da formula:

$$\%inibição = 100 - \frac{(EC - CC) \times 100}{CH - CM}$$

Onde:

EC: absorvância do teste

CC: absorvância do controle da amostra

CH: absorvância do controle do fungo

CM: absorvância do controle do meio de cultura

4.3.2 Determinação da Atividade Antioxidante (AA) pela redução do DPPH

A atividade antioxidante foi testada *in vitro* através do teste de DPPH e com utilização do espectrofotômetro UV-visível por comparação adaptada com a metodologia de (RUFINO, 2007). O teste foi realizado no laboratório de Química de produtos naturais da Universidade Federal de Roraima.

Este método é um dos mais empregados pois baseia-se na capacidade do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de reagir com doadores de hidrogênio. É um método simples e possibilita avaliar uma grande quantidade de amostra em curto período de tempo além de possuir boa sensibilidade, pois detecta pequenas concentrações do ativo testado, e permite a avaliação de antioxidantes lipofílicos, já que o solvente utilizado no processo é metanol ou etanol (DI MAMBRO et al., 2005).

Na presença de substâncias antioxidantes o DPPH recebe H⁺ sendo então reduzido. O radical DPPH é estável, de coloração púrpura, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela.

A atividade antioxidante (AA) foi determinada utilizando uma método fotocolorimétrico segundo a metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS (1995) com modificações de acordo com RUFINO e colaboradores (2007). Para esse procedimento, foi preparada uma solução de DPPH a 6×10^{-5} M (2,4 mg de DPPH dissolvido em álcool metílico em um balão volumétrico de 100 mL) e soluções com as substâncias-testes e padrão em cinco concentrações diferentes (250, 200, 150, 100, 50 µg/mL). Uma curva de ácido ascórbico e outra de quercetina nas mesmas concentrações das frações foram utilizadas como padrão (controle positivo), pois essas substâncias são referências

considerando seu alto poder de sequestrar 100% dos radicais. Para o controle negativo foi realizado no sistema contendo 3,9mL da solução de DPPH e 0,1 mL de metanol. As leituras das absorvâncias, foram realizadas em $\lambda=515$ nm, imediatamente após 30 minutos de incubação da reação em temperatura ambiente, protegida de luz. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

As misturas foram preparadas a partir da adição de 0,1 ml da amostra em 3,9 ml de solução de DPPH (60 μ M) na ausência de iluminação e mantidas em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura foi efetuada em espectrofotômetro UV-Vis/Shimadzu – 1800 no comprimento de onda 515 nm tendo como branco metanol. Foi determinada a curva de calibração da solução de DPPH seguidas pela análise dos controles positivos e negativos (tratados da mesma forma que as amostras) e por fim, a análise das amostras.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi determinada a partir dos valores de absorvância de todas as concentrações das amostras testados, conforme a equação.

$$\%inibição = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right]$$

Onde:

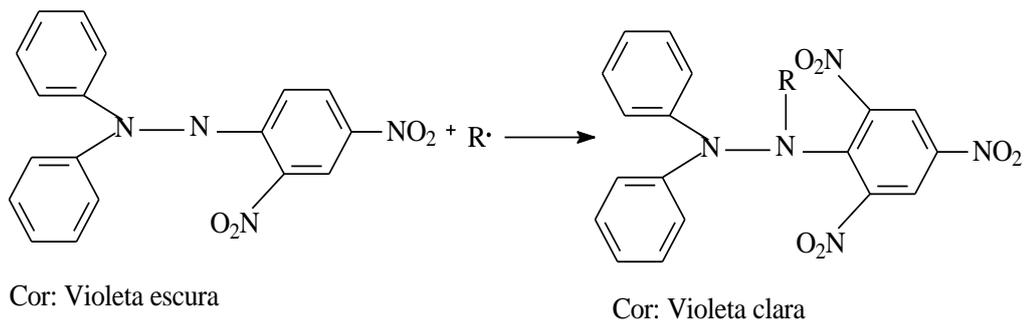
Abs_{amostra} = Absorvância da fração

Abs_{branco} = Absorvância das frações sem adição de DPPH

Abs_{controle} = Absorvância da solução de DPPH em metanol

Extratos vegetais com inibição do radical DPPH superior a 70% são considerados de elevada ação antioxidante, valores de 60 a 70% de inibição é considerado de moderada atividade, enquanto que valores inferiores a 60% são considerados de baixa atividade antioxidante (MELO et. al., 2006).

Esquema 4 – Estabilização do radical livre DPPH



Fonte: Adelman, 2005.

A atividade antioxidante expressa em CE_{50} é a concentração efetiva que elimina 50% dos radicais livres, indica o quanto a amostra é oxidante, ou seja, quanto menor o valor de CE_{50} mais ativa é a amostra (ALPIOVEZZA et al., 2012; LOCATELLI et al., 2009). O valor de CE_{50} foi calculado por regressão linear.

4.3.3 Ensaio Toxicológico sobre *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, é um ensaio biológico rápido, de baixo custo, não requer ambiente asséptico, utiliza um grande número de organismos para validação estatística, não requer equipamentos especiais e a quantidade de amostra é relativamente pequena de 2 a 20 mg (MEYER et al., 1982; DALL’STELLA, 2008).

4.3.3.1 Preparo da solução salina

A água do mar artificial foi preparada adicionando-se 14 g de sal marinho por litro de água destilada.

O pH foi ajustado entre 8,0 e 9,0 com carbonato de sódio a 10% para evitar o risco de morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação.

4.3.3.2 Preparo das amostras

O estudo foi realizado com o extrato bruto etanólico obtido das cascas de *Qualea paraensis*. As amostras foram obtidas suspendendo 100 mg do extrato em solução salina com adição de Tween-80 a 1%. Esta solução foi considerada a solução mãe. As demais soluções de concentração inferior (500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/ml) foram obtidas a partir da solução mãe também em solução salina de Tween-80 1%. O pH foi ajustado entre 8,0 e 9,0 com carbonato de sódio a 10%.

Em um sistema montado a partir de um aquário de vidro com capacidade para 1L, acoplado a uma bomba difusora própria para aquários com a mesma capacidade, foi colocado 400ml de água marinha, em seguida colocou-se os ovos de *Artemia salina* para eclodir por 36 horas. A temperatura foi controlada em torno de 25°C e a eclosão dos ovos foi monitorada a cada 12 horas.

4.3.3.3 Avaliação da toxicidade

Os testes foram realizados em triplicata, após a eclosão dos ovos, foram transferidas dez larvas de *Artemia salina* para cada tubo contendo as amostras e para os tubos controles. Os controles consistiram de tubos com o solvente solubilizador da fração. A contagem das larvas mortas e vivas foi realizada após 24 horas, com auxílio de lupa e iluminação incandescente. De acordo com Meyer et al. (1982), os extratos e as frações são considerados ativos quando os valores de DL₅₀ forem menores que 1000 µg/ml.

A probabilidade de mortalidade foi determinada de acordo com a fórmula:

$$M(\%) = \frac{r \times 100}{n}$$

Onde:

r = número de Artemias mortas

n = número de Artemias totais no tubo de ensaio

4.3.4 Determinação de Inibição da Acetilcolinesterase (I-ACHE)

A avaliação da atividade anticolinesterásica foi realizada no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios, no departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais sob a supervisão da Professora Doutora Jaqueline Takahashi.

Os procedimentos abaixo foram descritos pela Prof. Dra. Jaqueline Takahashi:

Adicionaram-se 25 μ L da solução de trabalho (amostra em DMSO 10 mg/ml) aos poços da placa de Elisa do teste e dos controles negativo e positivo. Nos cinco primeiros poços da coluna do controle positivo, adicionaram-se 25 μ L da solução de eserina (10 mg/mL em tampão Tris/HCl pH 8,0). Adicionou-se, a cada poço, 25 μ L de solução de Iodeto de Acetilcolina (ATC), 125 μ L da solução de DTNB (5', 5-ditio-bis-(2-nitrobenzoato, Sigma) e 50 μ L de Tris/HCl (50 mM) com albumina sérica bovina. A absorbância foi medida a 405 nm a cada 1 minuto por 8 vezes. Adicionou-se 25 μ L da solução de AChE (0,226 U/mL) em Tris/HCl ao poço. Mediu-se a absorbância a 405 nm por 10 vezes (10 minutos no total).

A porcentagem de inibição foi calculada pela comparação das taxas da amostra com o controle eserina. Os extratos foram classificados como inibidores potentes (>50% de inibição), inibidores moderados (30-50% de inibição) e inibidores fracos (<30% de inibição) de acordo com VINUTHA et al., 2007.

4.4 DADOS FÍSICO-QUÍMICOS DA SUBSTÂNCIA ISOLADA

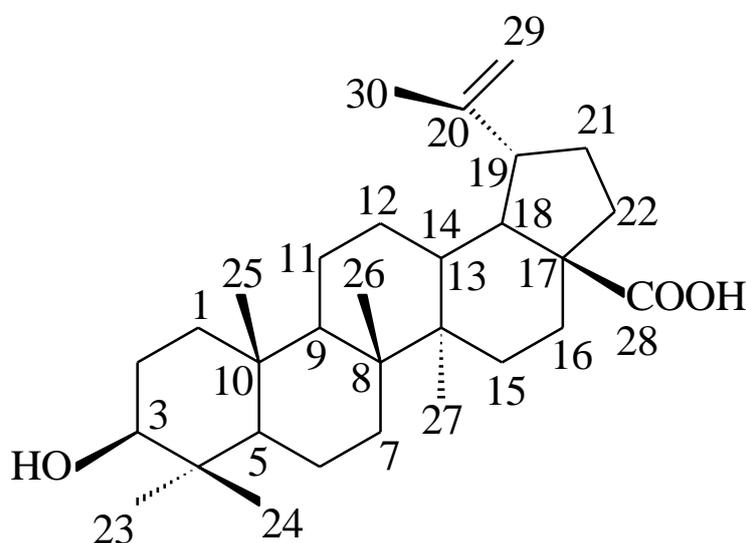
4.4.1 QP-1

Aspecto: Sólido branco

Solubilidade: Clorofórmio

Faixa de fusão: 255-260 °C

Figura 8 – Estrutura química de QP-1: ácido 3 β -hidroxilup-20(29) -en-28-óico (ácido betulínico).



a) IV (KBr, cm^{-1}): 1.381; 1.400; 2.870; 3.448.

b) RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ : 0,75; 0,83; 0,95; 0,96; 1,53; 1,60; 1,69; 3,01; 3,18; 4,60; 4,73.

c) RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 14,3; 15,0; 15,5; 15,7; 18,0; 18,9; 20,6; 25,3; 27,5; 29,4; 30,3; 32,0; 34,1; 38,1; 38,5; 38,6; 40,4; 42,2; 47,7; 49,0; 50,3; 55,2; 56,0; 78,4; 109,1; 150,2; 178,8.

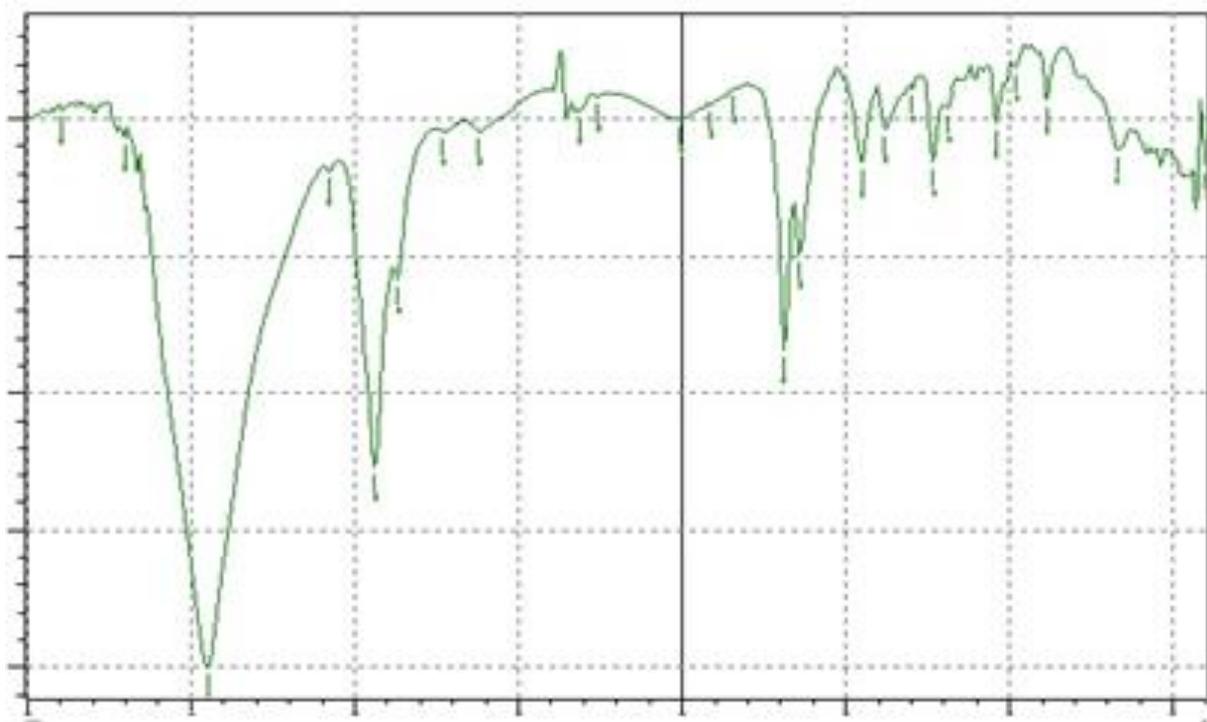
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA ISOLADA

A substância denominada QP-1 foi isolada como um sólido branco, solúvel em clorofórmio, com faixa de fusão 255–260 °C. Forneceu teste positivo para triterpeno pentacíclico, quando tratado com reagente de Liebermann-Burchard.

No espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 9) foram observadas absorções características de grupo hidroxila em 3.448 cm^{-1} , ligação olefínica em 1.400 cm^{-1} , grupos metila em 2.870 cm^{-1} , além de banda atribuída à deformação de ligação C-O em 1.381 cm^{-1} .

Figura 9 - Espectro de absorção na região do IV de QP-1(KBr)



O espectro de RMN de ^1H (Figura 10) de QP-1 mostrou sinais em δ_{H} 4,73 e 4,60 correspondente aos hidrogênios vinílicos H-29 da dupla terminal. O sinal em δ_{H} 3,18 foi atribuído ao hidrogênio carbinólico (H-3), como um tripleto com constantes de acoplamento 4,0 Hz, evidenciando a configuração β para o

grupo hidroxila. Foram observados os sinais de seis hidrogênios metílicos com deslocamentos químicos em δ_H 0,96 (s, H-23), 0,75 (s, H-24), 0,83 (s, H-25), 0,95 (s, H-26), 0,99 (s, H-27) e 1,69 (s, H-30). Figura 11. Os dados de RMN de 1H de QP-1 foram comparados com os dados da literatura para o ácido 3 β -hidroxilup-20(29)-en-28-óico (Tabela 13, pág. 62).

Figura 10 - Espectro de RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$) de QP-1

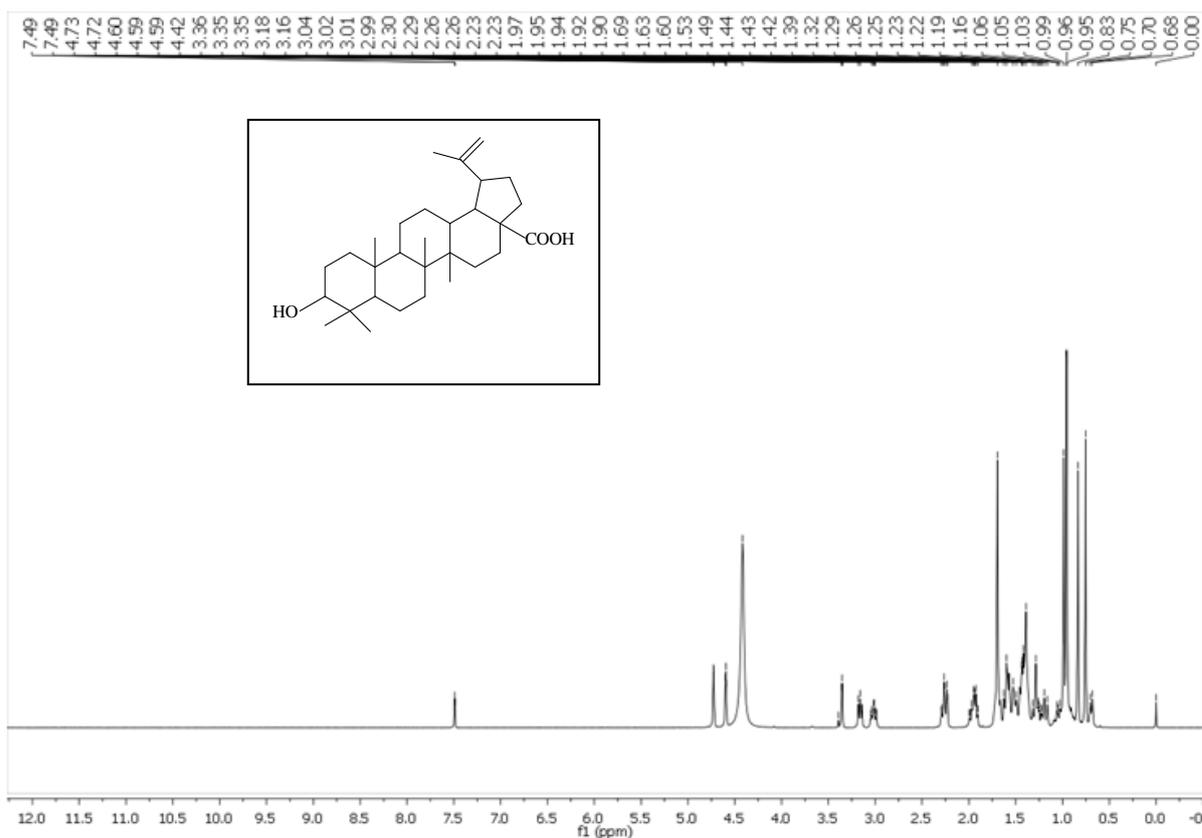
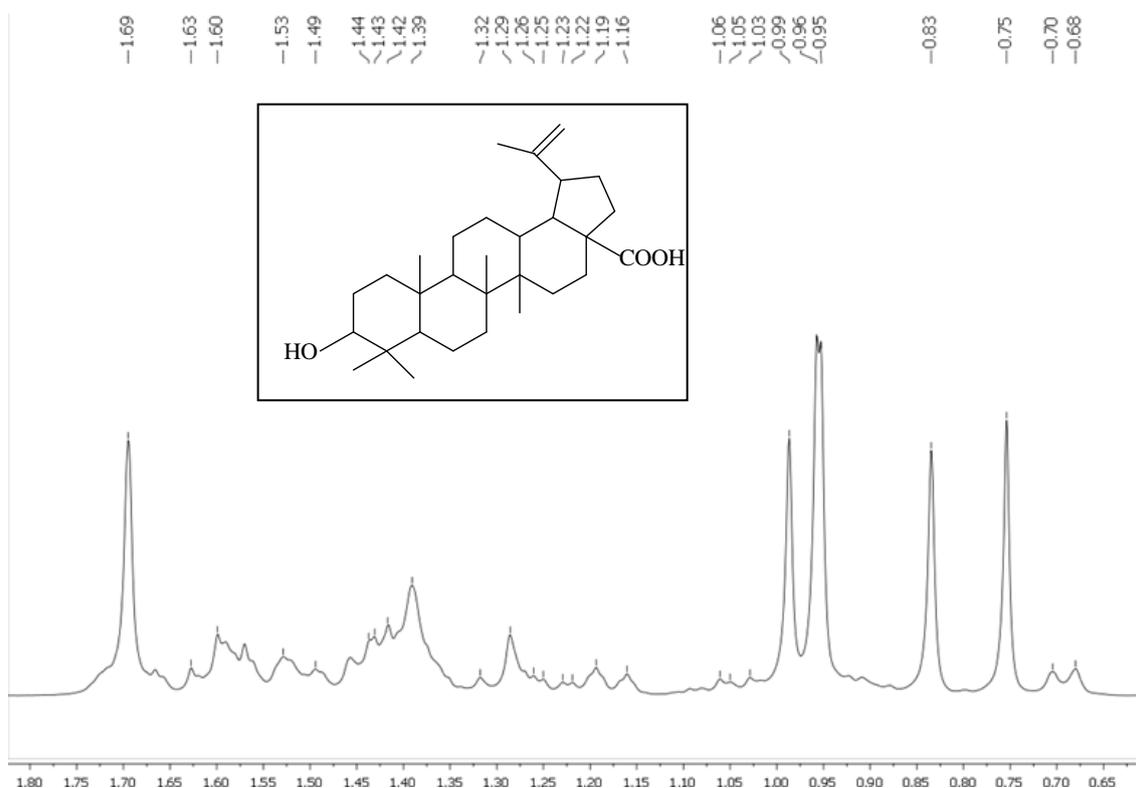
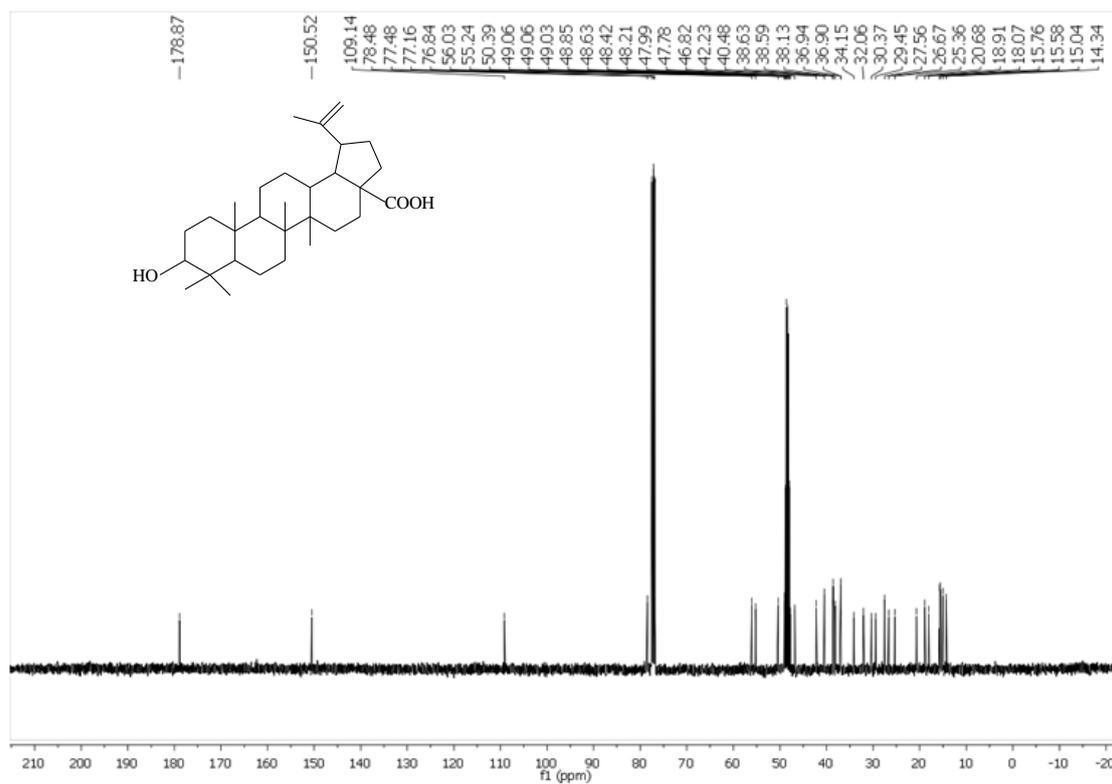
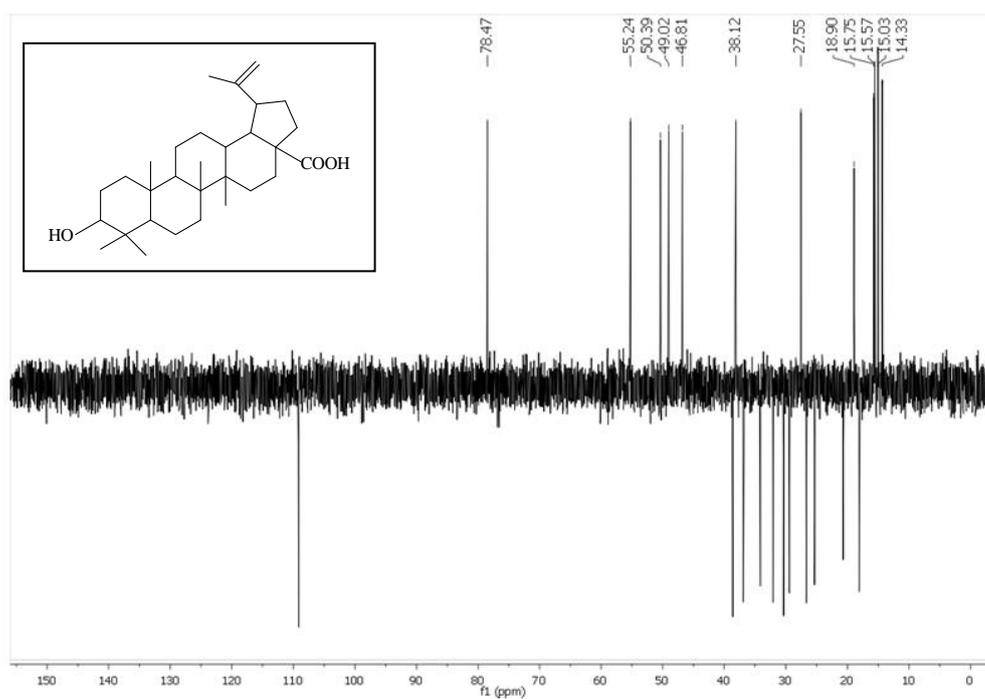


Figura 11 - Espectro de RMN de ^1H , ampliação da região de δ_{H} (0,75 – 1,69) (200 MHz) de QP-1 em CDCl_3



No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 12) foram observados trinta sinais indicando um composto de natureza triterpênica. A comparação com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 13, pág. 58) de QP-1 permitiu reconhecer o padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono, sendo seis carbonos não hidrogenados, seis metílicos, onze metilênicos (um olefínico) e sete carbonos metílicos. Os sinais em δ_{C} 178,8 correspondente ao carbono carbonílico (C-28), em δ_{C} 150,5 correspondente ao carbono vinílico (C-20), em δ_{C} 109,1 atribuído ao carbono metilênico (C-29), em δ_{C} 78,4 referente ao carbono carbinólico (C-3). Os deslocamentos químicos dos carbonos metílicos foram observados entre δ_{C} 14,3 a 27,5. A tabela 14, página 63, mostra a comparação dos dados de RMN de ^{13}C para QP-1 e o ácido betulínico na literatura.

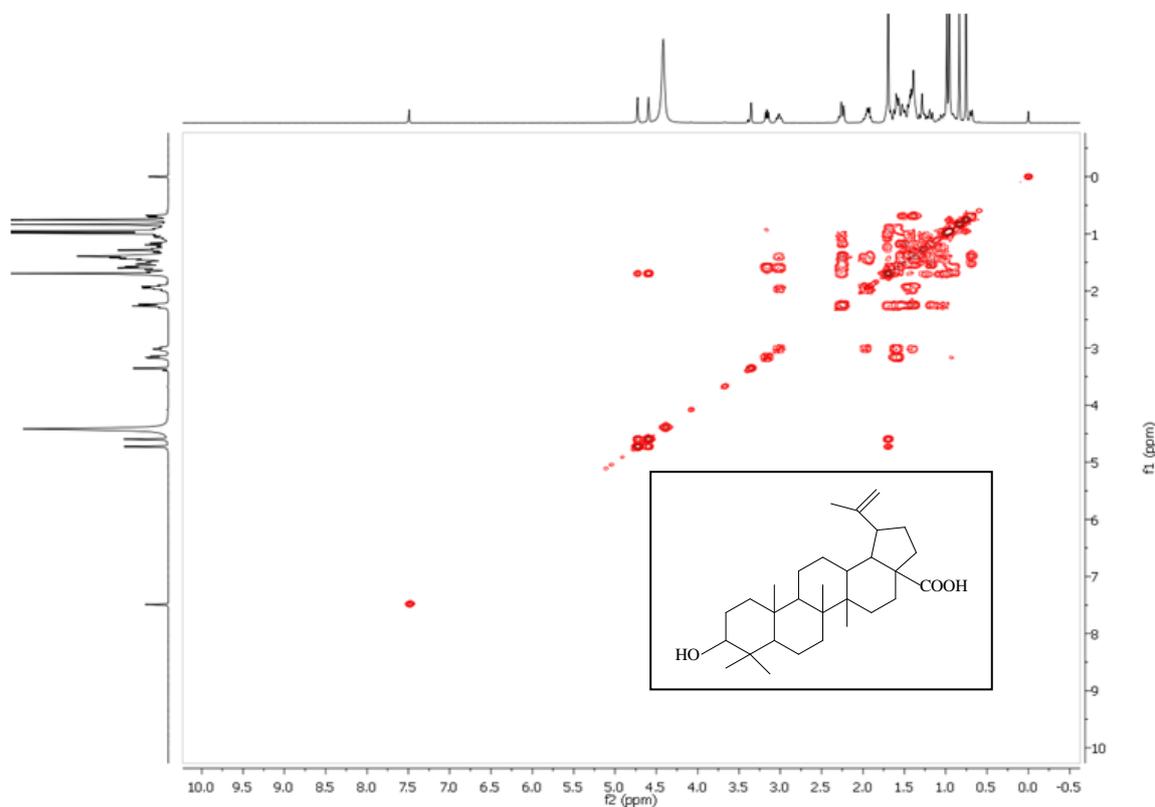
Figura 12 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de QP-1Figura 13 - Espectro tipo DEPT 135 $^\circ$ (50 MHz, CDCl_3) de QP-1

O mapa de contorno COSY (Figura 14) mostrou as correlações entre os hidrogênios H-3 com os hidrogênios metilênicos H-2, os hidrogênios vinílicos H-29 e os hidrogênios metílicos H-3, além de outras. As principais correlações observadas no mapa de contornos COSY para QP-1 encontram-se na tabela 11.

Tabela 11 – Correlações do mapa de contorno COSY

δ_H (multi., J , H)	δ_H (multi., J , H)
3,18 (t, $J= 4,0$ Hz, H-3)	1,53 (m, H-2)
4,73/4,60 (d, $J= 2,0$ Hz, H-29)	1,69 (s, H-30)
1,69 (s, H-30)	4,73/4,60 (d, $J= 2,0$ Hz, H-29)
3,01(m, H-18)	1,60 (m, H-19)

Figura 14 – Mapa de contorno COSY de QP-1, em $CDCl_3$ a 200 MHz



No espectro bidimensional de correlação heteronuclear HSQC, Figura 15, foi possível observar as correlações via 1J C-H entre os hidrogênios e seus respectivos carbonos. Nesse espectro foi observado o acoplamento entre o hidrogênio em δ_H 3,18 (H-3) com o carbono em δ_C 78,4 (C-3), do hidrogênio em δ_H 3,01 (H-18) com o carbono em δ_C 47,7 (C-18), do hidrogênio em δ_H 4,60 e 4,73 (H-29) com o carbono em δ_C 109,1 (C-29), do hidrogênio em δ_H 1,69 (H-30) com o carbono em δ_C 18,9 (C-30).

A partir da análise do mapa de contornos HMBC, Figura 16, que mostra as correlações C-H (2J) e (3J) foi possível confirmar as correlações observadas na tabela 12, além de outras correlações.

Tabela 12 - Correlações observadas no mapa de contornos HMBC de QP-1

	1H	2J	3J
	H-3 δ 3,18	δ 27,5 (C-2)	δ 38,5 (C-1)
	H-18 δ 3,01	δ 150,2 (C-20)	δ 109,1 (C-29) δ 18,9 (C-30)
	H-19 δ 1,60	δ 150,2 (C-20)	δ 150,2 (C-20) δ 178,8 (C-28)

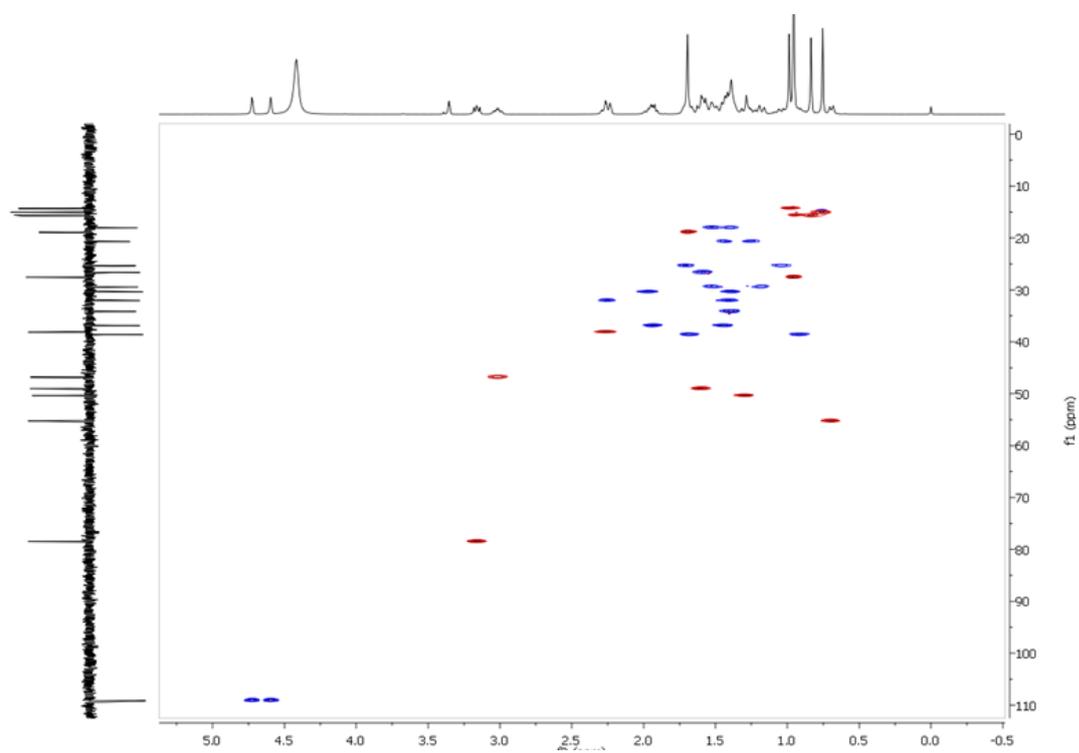
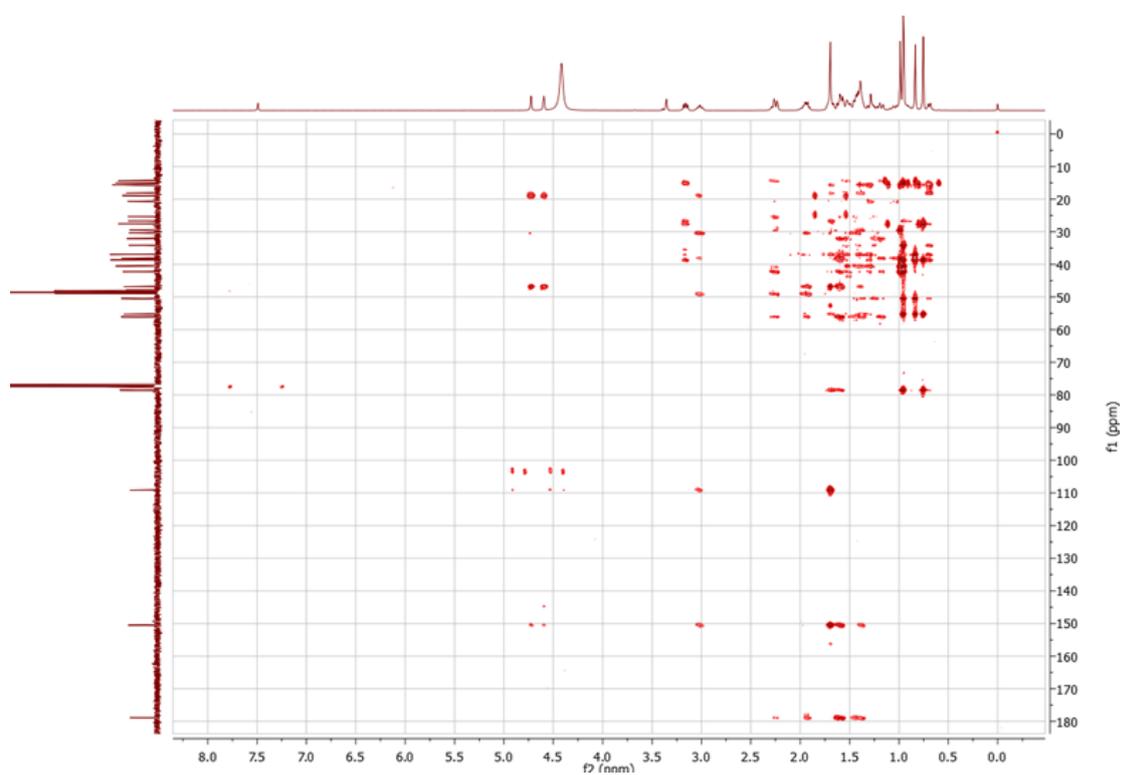
Figura 15 - Mapa de contorno HSQC de QP-1 (200 X 50 MHz, CDCl_3)Figura 16 - Mapa de contorno HMBC de QP-1 (200 X 50 MHz, CDCl_3)

Tabela 13 - Atribuições dos sinais de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para QP-1 comparados com dados da literatura

HIDROGÊNIO	QP-1 (200 MHz, CDCl_3)	Lit: ANDRADE, 1997 Ácido 3β -hidroxilup- 20(29) -en-28-óico ($\text{CDCl}_3 + \text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)
	δ_{H}	δ_{H}
H-2	1,53	1,54
H-3	3,18	3,15
H-18	3,01	3,00
H-19	1,60	1,61
H-23	0,96	0,88
H-24	0,75	0,75
H-25	0,83	0,77
H-27	0,95	0,95
H-29	4,73 e 4,60	4,66
H-30	1,69	1,59

Tabela 14 - Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) para QP-1 comparados com dados da literatura

CARBONO	QP-1 (50 MHz, CDCl_3)	Lit.: ANDRADE,1997 Ácido 3 β -hidroxilup-20(29) -en-28-óico ($\text{CDCl}_3 + \text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)
	δ_c	δ_c
1	38,5	38,7
2	27,5	27,4
3	78,4	78,9
4	38,6	38,8
5	55,2	55,3
6	18,0	18,3
7	34,1	34,3
8	40,4	40,7
9	50,3	50,5
10	38,1	37,2
11	20,6	20,8
12	25,3	25,5
13	38,5	38,4
14	42,2	42,4
15	30,3	30,5
16	32,0	32,1
17	56,0	56,3
18	47,7	47,7
19	49,0	49,7
20	150,2	151,2
21	29,4	29,7
22	38,6	37,0
23	27,5	27,9
24	15,0	15,3
25	15,5	16,0
26	15,7	16,1
27	14,3	14,7
28	178,8	180,5
29	109,1	109,6
30	18,9	19,4

A análise detalhada dos espectros de RMN mono e bidimensional, bem como a comparação com dados da literatura, permitiram concluir que QP-1 trata-se do ácido betulínico.

A literatura revela que o ácido betulínico apresenta uma variedade de atividades biológicas e farmacológicas, dentre elas pode-se citar as atividades antimalárica, antiinflamatória, antihelmíntica, antioxidante, anti-HIV, propriedades imunomodulatórias e antineoplásica em diferentes células cancerígenas humanas (YOGEERSWARI; SRIRAM, 2005).

Vários trabalhos descrevem os efeitos antitumorais do ácido betulínico contra um amplo espectro de células cancerígenas, tais como melanoma, pescoço e cabeça, ovário, mama, pulmão, tireoide, cervical, cólon, lipossarcoma (ZUCO et al., 2002; RZESKI et al., 2006; KESSLER et al., 2007; KOMMERA et al., 2010b; KOMMERA et al., 2010c; KOMMERA et al., 2011).

5.2 RESULTADOS BIOLÓGICOS

5.2.1 Atividade Antimicrobiana do Extrato Bruto Etanólico

Foi possível verificar através do ensaio antimicrobiano a atividade do extrato etanólico bruto obtido das cascas de *Qualea paraensis* frente às cepas dos microrganismos avaliados. O extrato bruto apresentou uma variação de 7,0% a 64,5% para as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. sanguinis*), de 6,3% a 22,7% para as bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *S. tiphymurium*) e de -1,58% a 14,9% para os fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium proliferatum*.

As cepas de *S. sanguinis* e as de *E. coli* demonstraram-se mais sensíveis aos extratos analisados do que as espécies de *S. aureus* e *S. tiphymurium* em comparação com a Ampicilina. Porém, o bioensaio para fungos, apresentou baixa atividade.

5.2.1.1 Interpretação dos resultados

Os bioensaios de efeito comparativo de atividade para as bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fúngica realizado no extrato bruto de *Qualea paraensis* apresentaram os seguintes resultados (Tabelas 15, 16 e 17 respectivamente).

Tabela 15 – Percentual de inibição para bactérias Gram-positivas

S. aureus	% de inibição de crescimento	Ampicilina
01 (500 µg)	33,661	104,626
02 (250 µg)	20,965	106,004
03 (125 µg)	12,598	105,512
04 (62,5 µg)	8,071	104,134
05 (31,25 µg)	15,945	101,969
06 (15,625 µg)	8,661	86,713
07 (9,375 µg)	7,087	34,744
08 (3,90625 µg)	0,000	14,862

S. sanguinis	% de inibição de crescimento	Ampicilina
01 (500 µg)	48,979	102,905
02 (250 µg)	64,594	3,223
03 (125 µg)	49,251	2,678
04 (62,5 µg)	59,691	0,000
05 (31,25 µg)	34,816	0,000
06 (15,625 µg)	31,457	0,000
07 (9,375 µg)	27,372	0,000
08 (3,90625 µg)	23,468	0,000

Fonte: Laboratório de Biotecnologia e bioensaios, Departamento de Química, UFMG.

Tabela 16 – Percentual de inibição para bactérias Gram-negativas

E. coli	% de inibição de crescimento	Ampicilina
01 (500 µg)	45,689	186,938
02 (250 µg)	29,077	140,933
03 (125 µg)	19,130	118,601
04 (62,5 µg)	14,355	104,874
05 (31,25 µg)	18,632	96,270
06 (15,625 µg)	21,766	95,375
07 (9,375 µg)	21,815	94,529
08 (3,90625 µg)	23,258	79,559
S. tiphymurium	% de inibição de crescimento	Ampicilina
01 (500 µg)	-22,997	228,381
02 (250 µg)	-48,984	180,031
03 (125 µg)	-46,396	142,138
04 (62,5 µg)	-38,010	123,295
05 (31,25 µg)	-25,689	102,174
06 (15,625 µg)	-27,346	101,242
07 (9,375 µg)	6,820	108,593
08 (3,90625 µg)	22,764	100,932

Fonte: Laboratório de Biotecnologia e bioensaios, Departamento de Química, UFMG.

Tabela 17 – Percentual de inibição fúngica

Fungo	% de inibição de crescimento
Flavus	14,91
F. proliferatum	-1,58

Fonte: Laboratório de Biotecnologia e bioensaios, Departamento de Química, UFMG.

5.2.2 Determinação da Atividade Antioxidante

A determinação da Atividade Antioxidante foi realizada através de leitura da absorbância das amostras em 515 nm, após o tempo de 30 minutos. Foi utilizado como controle positivo a quercetina e o ácido ascórbico. O extrato bruto etanólico de *Qualea paraensis* foi considerado de baixa atividade antioxidante por ter obtido consumo inferior a 60% entre as concentrações de 250 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

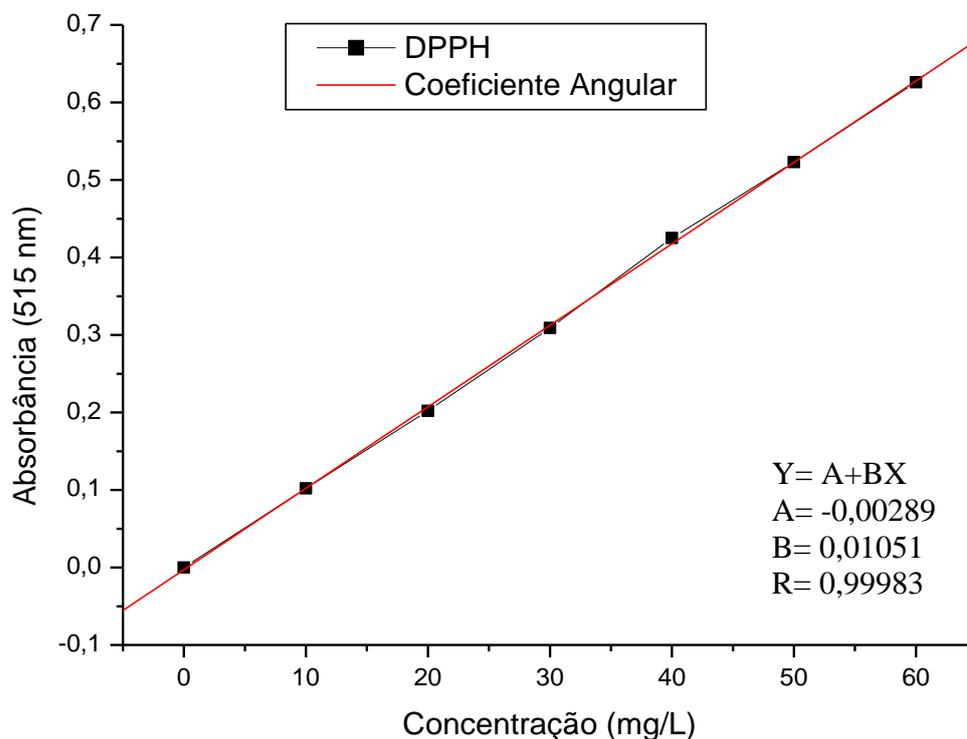
O preparo da curva de calibração do DPPH encontra-se descrito abaixo na tabela 18.

Tabela 18 - Preparo das soluções para curva do DPPH

Solução de DPPH (mL)	Álcool metílico (mL)	Concentração final de DPPH (μM)
0	10	0
1,7	8,3	10
3,3	6,7	20
5,0	5,0	30
6,7	3,3	40
8,3	1,7	50
10	0	60

Fonte: A autora.

Figura 17 – Curva analítica de calibração do radical DPPH



Fonte: A autora

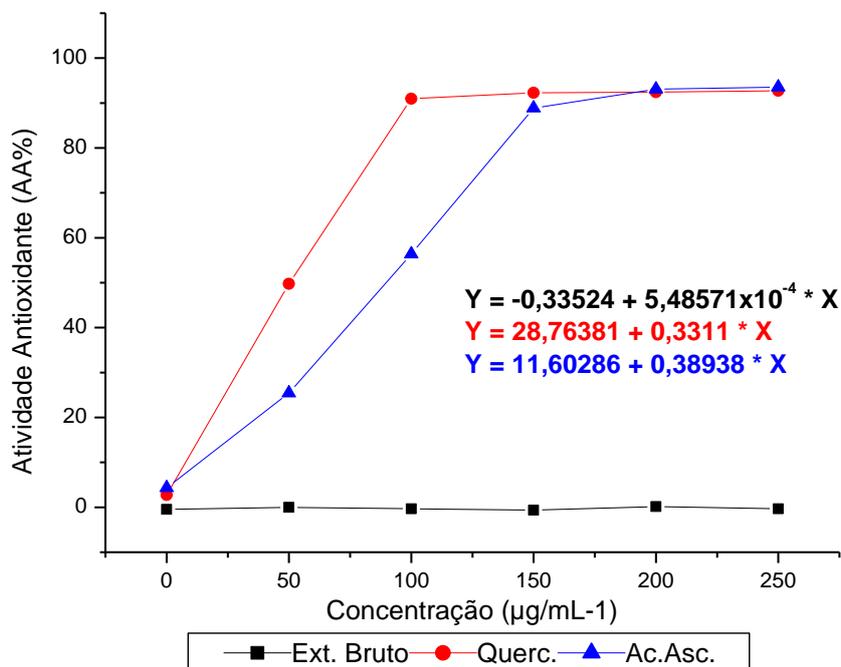
Tabela 19 - Percentual de redução do DPPH pelo extrato bruto etanólico e substâncias referências em função da concentração.

Amostra	Atividade Antioxidante (AA%)					Regressão Linear $Y = A + B * X \pm DP$	CE ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)
	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)						
	50	100	150	200	250		
QPEBE	0	-0,32	-0,64	0,16	-0,32	$Y = -0,33524 + 5,48571 \times 10^{-4} * X$	91757,01
Querc	49,75	90,98	92,27	92,43	92,75	$Y = 28,76381 + 0,3311 * X$	64,13
Vit. C	25,44	56,36	88,88	93,07	93,55	$Y = 11,60286 + 0,38938 * X$	98,35

Querc= Quercetina, Vit. C= Ácido ascórbico, QPEBE= *Qualea paraensis* extrato bruto etanólico.

Fonte: A Autora.

Figura 18 – Curva de redução de DPPH do extrato de *Qualea paraensis* e substâncias referências



Fonte: A autora.

Utilizando o software Origin 6.0, a figura 18 representa a análise de regressão linear entre as concentrações avaliadas de QPEBE e suas respectivas atividade antioxidante, o que possibilitou a determinação da equação da reta $y = -0,33524 + 5,48571 \times 10^{-4}$. Através desta equação, pode-se encontrar a concentração eficiente (CE_{50}), que é a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%.

Foi observado que o extrato de *Qualea paraensis* é inativo pois, apresentou o valor de CE_{50} de $91757,01 \mu\text{g/mL}^{-1}$, muito acima se comparado com os valores de CE_{50} dos padrões Quercetina ($64,13 \mu\text{g/mL}^{-1}$) e Ácido Ascórbico ($98,35 \mu\text{g/mL}^{-1}$). Observou-se, portanto, que a substância testada não possui potencial de atividade antioxidante.

5.2.3 Teste de toxicidade frente à *Artemia salina*

Após exposição por 24 hs, foi feita a contagem de náuplios vivos e mortos (Tabela 20), considerando vivos todos aqueles que apresentarem qualquer tipo de movimento observado próximo a uma fonte luminosa para melhor visualização durante 10 segundos.

Tabela 20 – Número de náuplios mortos

Nº de Náuplios	D1	D2	D3	D4	D5	D6
	M	M	M	M	M	M
A (amostra)	08	03	0	0	0	0
D (duplicata)	05	03	0	0	0	0
T (triplicata)	06	02	0	0	0	0
MÉDIA	6,3	2,6	0	0	0	0

M= Mortos D= Diluição

Fonte: A autora

Após a contagem do número de náuplios vivos, mortos ou imobilizados realizou-se os seguintes cálculos:

$$M(\%) = \frac{\text{Número de organismos mortos}}{\text{Número total de organismos no tubo}} \times 100$$

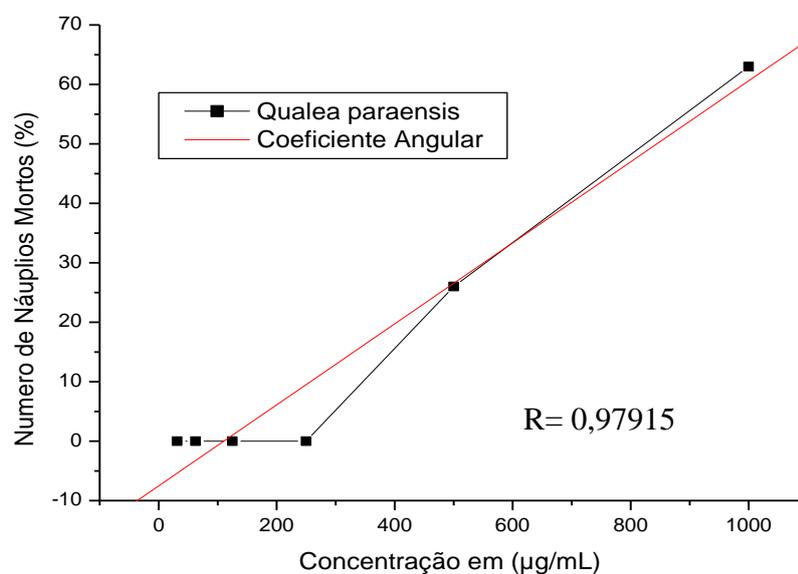
Considerar após os cálculos, baixa toxicidade quando a dose letal 50% DL₅₀ for superior a 500 µg/mL⁻¹, entre 100 a 500 µg/mL⁻¹ moderada e inferior a 100 µg/mL⁻¹ muito tóxica (LUCENA, 2012). Foi obtido os seguintes resultados, Tabela 21.

Tabela 21 – Dados de atividade frente à *Artemia salina* para QPEBE

Concentração $\mu\text{g/ml}^{-1}$	Amostras	Mortalidade (%)
1000	D1	63
500	D2	26
250	D3	0
125	D4	0
62,5	D5	0
31,25	D6	0
Controle	D7	0

Fonte: A autora.

Calculando a média dos valores obtidos do extrato, foi encontrado os valores de 63% de mortalidade na concentração $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 26% na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Figura 19 – Curva de atividade frente à *Artemia salina*

Fonte: A autora.

Através da fórmula de regressão linear $Y = A + BX$, podemos calcular a DL_{50} . Onde: $Y=50$, $A= -7,51741$, $B=0,06812$ encontrando o valor de X igual a $844,35 \mu\text{g/mL}^{-1}$.

De acordo com Lucena, 2012, pode-se verificar que o extrato bruto etanólico de *Qualea paraensis*, não apresentou letalidade frente ao microcrustáceo. Sendo considerada a amostra de baixa toxicidade com base no valor encontrado de DL_{50} superior a $500 \mu\text{g/mL}^{-1}$.

5.2.4 Determinação da Inibição da enzima Acetilcolinesterase (I-ACHE)

A análise de inibição da enzima acetilcolinesterase demonstrou que o extrato bruto de *Qualea paraensis* possui um baixo grau de inibição da enzima acetilcolinesterase, conforme exposto na tabela 22.

Tabela 22 – Análise da atividade inibitória de acetilcolinesterase do extrato Bruto etanólico de *Qualea paraensis*

Amostra	%Inibição	Desv. Pad
QPEBE	23,66	4,25

QPEBE=Extrato bruto etanólico de *Qualea paraensis*.

Fonte: Laboratório de Biotecnologia e bioensaios, Departamento de Química, UFMG.

6 CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico do extrato etanólico realizado das cascas de *Qualea paraensis*, obteve êxito em seu objetivo principal que foi a ampliação do conhecimento do gênero, através de estudo fitoquímico e ensaios biológicos realizado na espécie.

O estudo fitoquímico realizado nas cascas de *Qualea paraensis* Ducke, forneceu como resultado a substância ácido 3 β -hidroxilup-20(29) -en-28-óico (ácido betulínico), que possui atividades antiinflamatória, antihelmíntica, antioxidante, além de propriedades imunomodulatórias e antineoplásica. Suas estruturas foram elucidadas através de técnicas espectroscópicas como RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , DEPH 135 $^\circ$, COSY, HSQC e HMBC.

Os ensaios biológicos mostraram que o extrato etanólico de *Qualea paraensis* não possui atividade antioxidante e possui baixa toxicidade de acordo com o teste realizado frente ao microcrustáceo *Artemia salina*.

Foram submetidos aos ensaios de efeito comparativo os fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium proliferatum* com as amostras do extrato bruto etanólico que apresentou atividade inferior a 50%.

As bactérias testadas nos bioensaios foram *S. aureus*, *S. sanguinis*, *E. coli* e *Salmonella tiphymurium*. A inibição da bactéria *S. sanguinis* foi satisfatória pois apresentou um nível de inibição superior a 50% comparado ao antibiótico ampicilina. As demais cepas testadas apresentaram grau de inibição inferior a 50%.

Este trabalho contribuiu com o estudo fitoquímico de uma das espécies da família Vochysiaceae, fornecendo dados sobre o gênero *Qualea* mediante a divulgação de novos dados sobre a espécie *Qualea paraensis* Ducke.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELMANN, J. **Própolis: Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ALMEIDA S.P.; PROENÇA C.E.B.; SANO S.M.; RIBEIRO J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**, D.F.: EMBRAPA - Planaltina, 1998.

ALPIOVEZZA, A. R.; PINTO, M. S.; GONÇALVES, I. D.; BARBOSA, A. P.; ARAUJO, F. R. C.; MENDONÇA, S.; MARCUCCI, M. C.; MARQUES, L. C. **Avaliação Farmacognóstica da Droga Vegetal Flores de Jasmim**. Revista Fitos. v. 7, n. 4, 2012.

ALVAREZ, C.; LABARCA, J.; SALLES, M. **Estratégias de prevenção de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) na América Latina**. Braz. J. Infect. Disv. v. 14, n. 2, p.108-120, 2010.

ALVES, E. G. et al., **Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras**. Quím. Nova, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ALVES, PRISCILA DRUMOND. **Avaliação cromatográfica e atividade antimicrobiana de produtos preparados com NIM (*Azadirachta indica* A. Juss, Meliaceae)**, 2007. 75p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação, em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

AMORIM, P. K. & BATALHA, M. A. 2006. **Soil characteristic of a hyperseasonal cerrado compared to a seasonal cerrado and a foodplain grassland: implications for plant community structure**. Brazilian Journal of Biology 66: 661-670, 2006.

ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. **Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acácia podalyrifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. **Atividade microbiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes.** Revista brasileira de farmacologia. 16 (4): 517-524, out./dez. 2016.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira. **Farmacopéia Brasileira.** 2004. Disponível em: <<http://www.farmacopeia.org.br>> Acesso em: 08 ago. 2013.

ARBOS, K. A. **Estudo do potencial antioxidante de vegetais da família Cruciferae de diferentes cultivos.** 2004. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Área de Medicamentos, Insumos e Correlatos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

BARBOSA, A. R. **As espécies do gênero *Vochysia Aubl.* (Vochysiaceae) ocorrentes no Estado de São Paulo.** 1999. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1999.

BARBOSA, A. R.; YAMAMOTO, K.; VALIO, I. F. M. **Effect of light and temperature on germination and early growth of *Vochysia tucanorum* Mart., Vochysiaceae, in cerrado and forest soil under different radiation levels.** Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v. 22, s. 2, p. 275 – 280, 1999.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; COSTA, C. G. 1984. **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** UFV, Impr. Univ., Viçosa, v.2. FRANÇA, F. 2012. Vochysiaceae. In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000250>.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. de L. P. **Flavonoide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas.** Alim. Nutr. Araraquara, SP. v. 15, n. 3, 285 p, 2004.

BENASSI, J. C. **O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de percolado de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana.** 2004. 106p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta**. Rev. Nutr., Campinas, v. 12, n. 2, ago. 1999.

BORTALANZA, L. B.; FERREIRA, J.; HESS, S. C.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Anti-allodinic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice**. Eur. J. Pharmacol. 453 (2): 203-208, 2002.

BORTOLOTTO, Tiago. **Avaliação da atividade tóxica e genotóxica de percolados do aterro sanitário de Sombrio-SC, utilizando *Artemia sp.* e *Allium cepa L.*** 2007. 79 f. Trabalho de conclusão de curso (graduação em Ciências Biológicas) Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of free radical method to evaluate antioxidant activity**. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRUNTON, L. L. Goodman & Gilman: **As bases farmacológicas da Terapêutica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

BUCK, D. F.; J. Am. **Oil Chem.** Soc. 1981, 58-275 p.

CALDERON, A. I.; M. ESPOSITO-AVELLA, R. E. B.; TELLO, J. M.; PEZZUTO, C. SANCHEZ & M. P. **Pharm. Biol.** 39: 35-9, 2001.

CÂNDIDO, H. G.; PEREIRA, L.; SPOLON, M. G.; ROGERI K.; POLISEL, R. T. **Distribuição espacial de *Vochysia tunacorum* Mart. Em solos distróficos com diferentes concentrações de Alumínio**. Disponível em: <<http://www.ib.unicamp.br/profs/fsantos/ecocampo/2010/Relatorios/R3a.pdf>.> Acesso em: 22 mai. 2014.

CANINEU, P. R. **Doença de Alzheimer**. In: CAOVIALLA, V. P.; CANINEU, P. R. (Org.). *Você está sozinho*. São Paulo, SP: Abraz, p. 11-17, 2002.

CORRÊA D. B.; GUERRA L. F. B.; GOTTLIEB, O. R.; MAIA, J. G. S. C. **Methyl phenolics from *Qualea species***. *Phytochemistry*. 1981;20(2):305-7.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da agricultura, v.5, 1974.

COSTA, E. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LIMA, E. O.; SUCUPIRA, G. C.; BERTOLIN, A. O.; LOLIS, S. F.; ANDRADE, F. D.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R. **Antimicrobial activity of some medicinal plants of the Cerrado, Brazil.** Phytoter. Rev. v. 22, p. 705-707, 2008.

DALL'STELLA, D.S.G. **Estudo fitoquímico aplicada da fração solúvel do extrato etanólico bruto da *Dorstenia multiformis* Miquel (MORACEAE).** 2008. 113p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

DENISE SASAKI. **Kew Royal Botanic Gardens.** Disponível em: <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Vochysiaceae.htm>>. Acesso em: 01 mar. 2015.

DI MAMBRO, V. M., MARQUELE, F. D., FONSECA, M. J. V. **Avaliação *in vitro* da ação antioxidante em formulações antienvhecimento.** Rev. Cosmetics & Toiletries (edição em português), v. 17, n. 4, p. 74-78, jul./ago. 2005.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O. et al., (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, p.197-220, 1999.

FERREIRA, M. A.; COSTA, M. C. D. **Utilização de antioxidantes no combate aos radicais livres causadores de envelhecimento cutâneo.** Curso Superior de Tecnologia em Estética e Cosmética – UniFil. I Simpósio Nacional de iniciação científica. UniFil – Out. 2011. Disponível em: <<http://www.unifil.br/portal/arquivos/publicações/paginas/>>. Acesso em: 15 de junho de 2014.

FRANÇA, F. **O gênero *Callisthene* Mart. & Zucc. (Vochysiaceae) no Estado da Bahia.** Sientibus 15:41-47, 1996.

FRIDOVICH, I. **Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?** Ann N. Y. Acad Sci; 893:13-8, 1999.

GARRIDO J. M. P. J.; DELERUE-MATOS C.; BORGES M. F. M.; MACEDO, T. R. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. **Oxidative behaviour of apomorphine and its metabolites, *Bioelectrochem*,** v. 55, p. 113-114, 2002.

GASPI, F. O.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; MORENO, R. A. **Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandiflora* Mart.** J. Ethopharmacol, v.107, p. 19-24, 2006.

GOES, V. F. **Avaliação Nutricional e Cognitiva de Pacientes com Diagnóstico Clínico da Doença de Alzheimer.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UNICENTRO Paraná, Guarapuava, 2012.

GRANDI, T. S. M.; TRINDADE, J. A.; PINTO, M. J. F.; FERREIRA, L. L.; CATELLA, A. C. **Plantas Medicinais de Minas Gerais, Brasil,** Acta Bot. Bras, v.3, 1989.

HARIDASAN, M. 1982. **Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil.** Plant Soil. 65(2):265-273, 1982.

HEYWOOD, V. **Flowering Plants of the World.** Oxford University Press, New York, 1993, p.335.

HESS, S. C.; BRUM, R. L.; HONDA, N. K.; CRUZ, A. B.; MORETTO E.; CRUZ, R. B.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; CECHINEL, F. V.; YUNES, R. A. **Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae).** J. Ethnopharm. 47: 97-100, 1997.

HESS, S. C.; BRUM, R. L.; HONDA, N. K.; MORAIS, V. F. M.; GOMES, S. T. A.; LIMA, E. O.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. **Fitoterapia** 66: 549-550, 1995.

HESS, S. C e DELLE MONACHE, F. **Divergoic acid, a triterpene from *Vochysia divergens*.** J. Braz. Chem. Soc. 10: 104-106, 1999.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C.; KUSHIMA, H.; PELLIZZON, C. H.; SILVEIRA, G. G.; VASCONCELOS, P. C.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. ***Qualea grandiflora*, a Brazilian "Cerrado" medicinal plant presents an important antiulcer activity.** J. Ethopharmacol, v.104, p.207-214, 2006.

INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES. ***Qualea paraensis* Ducke – Vochysiaceae.** Disponível em:
<<http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=349364>> Acesso em: 10 mar. 2015.

JANSEN, S.; BROADLEY, M. R.; ROBBRECHT, E.; SMETS, E. 2002. **Aluminium hyperaccumulation in angiosperm: a review of its phylogenetic significance.** The Bot. Rev. 68(2):235-269, 2002.

KEAY, R. W. J. & STAFLEU, F. A. **Erismadelphus.** Acta Bot. Neerl. 1:594-599, 1953.

KESSLER, J. H.; MULLAUER, F. B.; ROO, G. M. de; MEDEMA, J. P. **Broad *in vitro* efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types.** Cancer Letters, v. 251, n. 1, p. 132-145, 2007.

KOMMERA, H.; KALUDEROVIC, G. N.; DITTRICH, S.; KALBITZ, J.; DRÄGER, B.; MUELLER, T.; PASCHKE, R. **Carbamate derivatives of betulinic acid and betulin with selective cytotoxic activity.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 20, p. 3409-3412, 2010b.

KOMMERA, H.; KALUDEROVIC, G. N.; KALBITZ, J.; DRÄGER, B.; PASCHKE, R. **Small structural changes of pentacyclic lupane type triterpenoid derivatives lead to significant differences in their anticancer properties.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 45, p. 3346-3353, 2010c.

KOMMERA, H.; KALUDEROVIC, G. N.; KALBITZ, J.; PASCHKE, R. **Lupane triterpenoids - betulin and betulinic acid derivatives induce apoptosis in tumor cells.** Investigational New Drugs, v. 29, p. 266-272, 2011.

LABARCA J. L. **Nuevos conceptos en farmacodinâmica, debemos repensar cómo administramos antimicrobianos.** Rev. Chilena Infectol, v. 19, supl. 1, p. 33-37, 2002.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica.** Ed. Sarvier, 2007.

LIMA, R. S. **Isolamento, determinação estrutural e atividades anti-tumoral e anti-inflamatória de triterpenos isolados de *Vochysia cinnamomea* (Vochysiaceae).** 2010. 23p. Dissertação (Programa de pós-graduação stricto sensu em ciências moleculares) - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2010.

LINDEBOOM, J.; WEINSTEIN, H. **Neuropsychology of cognitive ageing, minimal cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular**

cognitive impairment. European Journal of Pharmacology, v. 490, n. 1-3, p. 83-86, 2004.

LISBOA, M. L. G. **Estudos taxonômicos sobre o gênero *Qualea* Aubl., subgênero *Amphilochia* (Mart.) Stafl. (Vochysiaceae A. St.-Hil.).** 2000. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

LITT, A. & CHEEK, M. 2002. ***Korupodendron songweanum*, a new genus and species of Vochysiaceae from West-Central Africa.** Brittonia 54:13-17, 2002.

LOCATELLI, M.; GINDRO, R.; TRAVAGLIA, F.; COISSON, J. D.; RINALDI, M; ARLORIO, M. **Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data.** Food Chemistry, Amsterdam, v. 114, n. 3, p. 889-897, 2009.

LOUREIRO, A. A. & SILVA, M. F. **Catálogo das madeiras da Amazônia.** 1968. Belém. Sudam. V. II. p. 347-364.

LUCENA, H. F. S. **Uma nova lignana e outros constituintes químicos de *Hypenia salzmannii* (Benth.) Harley (Lamiaceae).** 2012. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Paraíba/UFPB – João Pessoa, 2012.

MARTINEZ, V. T. P. **Demencial la enfermedad de Alzheimer: um enfoque integral.** Rev. Cubana Med Gen Integr, Havana, [on line], v. 21, n. 3-4, may./ago., 2005.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Medicinais.** Viçosa-MG, Ed. UFV, 5ª ed. p. 15-19, 2003.

MAYWORM M. A. S.; SALATINO A. **Distribution of seed fatty acids and the taxonomy of Vochysiaceae.** Biochem Syst Ecol. 30(10):91-7, 2002.

MAYWORM, M. A. S.; BUCKERIDGE, M. S.; SALATINO, A. **Monomer composition of polysaccharides of seed cell walls and the taxonomy of Vochysiaceae.** Phytochemistry, v. 55, p. 581-587, 2000.

MELO, E. A. et. al., **Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MEYER, B. N. et. al., **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents.** *Planta Medica*, v. 45, n.8, p. 31 – 34, 1982.

MONTANARI, C. A.; **“Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais”.** *Química Nova*, 24. São Paulo, 2001.

NASSER, A. L. M.; CARLI, C. B. A.; RODRIGUES, C. M.; MAIA, D. C. G.; CARLOS, I. Z.; EBERLIN, M. N.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. **Identification of ellagic acid derivatives in methanolic extracts from *Qualea* species.** *Z Naturforsch C*. 2008;63 (11- 12):794-800.

NASSER, A. L. M.; MAZZOLIN, L. P.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. S.; EBERLIN, M. N.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. **Preparative droplet counter-current chromatography for the separation of the new nor-secotriterpene and pentacyclic triterpenoids from *Qualea parviflora*.** *Chromatographia*. 64 (11/12):695-9, 2006.

NASSER, A. L. M.; PAVAN, F. R.; BORALLE, N.; ZOCOLO, G. J.; SANTOS, L. C.; MARCHI, M. R. R.; LEITE, C. Q. F.; VILEGAS, W. **Esteróide e Triterpenos de espécies de *Qualea* – Bioatividade sobre *Mycobacterium tuberculosis*.** *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, Araraquara, São Paulo, 34(4):513-517, 2013.

PINTO, A.C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P. **“Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas”.** *Quím. Nova*, 25. São Paulo, 2002.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal.** Planaltina, Embrapa, p.41, 1994.

PUPO, T.; GALLO, M. B. C. *Biologia Química: “Uma Estratégia Moderna para a Pesquisa em Produtos Naturais”.* *Química Nova*, 30: 1446-1455, 2007.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. **Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos.** *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 4, 2006.

RENNÓ, L. R. **Pequeno dicionário etimológico das famílias botânicas.** Belo Horizonte: UFMG, 1963.

ROCHA A. B.; SILVA J. B.; PANIZZA S. **Substâncias tânicas da casca de *Qualea grandiflora* Martius (Vochysiaceae)**. Rev Bras Cienc Farm. 80;2:109-14, 1979.

RUFINO MSM et. al., **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Comunicado Técnico Embrapa, 127: 1-4, 2007.

RZESKI, W.; STEPULAK, A.; SZYMANSKI, M.; SIFRINGER, M.; KACZOR, J.; WEJKSZA, K.; ZDZISINSKA, B.; KANDEFER-SZERSZEN, M. **Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells**. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, v. 374, n. 1, p. 11-20, 2006.

SAJO, M. G.; RUDALL, P. J. **Leaf and stem anatomy of Vochysiaceae in relation to subfamilial and suprafamilial systematic**. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 138, p. 339-364, 2002.

SENTERRE, B. & OBIANG, D. 2005. **Nouvelles découvertes à propos des Vochysiaceae africaines: *Erismadelphus* Mildbr. et *Korupodendron* Litt & Cheek**. Taxonomania. 17:3-18.

SEPTÍMO, L. R. **Fitoterapia baseada em ervas medicinais do cerrado**. Brasília, DF: SIPE. Ministério da agricultura, 1994.

SHIMIZU, G. H. **Vochysiaceae na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

SILVEIRA, L. M. S. et al., **Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão**. Rev. Bras. Farm., v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000, cap. 18.

SOUSA, L. R. F.; SILVA, J. A.; VIEIRA, P. C.; COSTA, M. B.; SANTOS, M. L.; SBARDELOTTO, A. B.; PESSOA, C. DO Ó.; MORAES, M. O.; MENEZES, A. C. S. **Constituintes químicos das cascas do caule de *Vochysia thyrsoidea* pohl. (vochysiaceae) e avaliação das atividades citotóxica e inibitória**

frente as catepsinas b e k. Quim. Nova, Anápolis – GO, v. 37, n. 2, p. 288-292, 2014.

SOUZA, V. C. e LORENZI H. **Botânica Sistemática.** Editora Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2005, p.639.

STUART C. Y.; ROBERT, E. H. **Neuropsiquiatria e neurociências na prática clínica.** 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 1120 p. 2006.

TRIAS, J.; GORDON, E. M. **Innovative approaches to novel antibacterial drug discovery.** Curr. Opin. Biotechnol, v. 8, p. 757-762, 1997.

TROPICOS. **Vochysiaceae A. St.-Hil. Disponível em:** <<http://www.tropicos.org/Name/42000246?tab=maps>>. Acesso em: 10 de março de 2015.

VALGAS, C. et al., **Screening methods to determine antibacterial activity of natural products.** Braz. J. Microbiol., v. 38, p. 369-380, 2007.

VIANNA, M. C. 2006. **Vochysiaceae na Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim,** Rio de Janeiro, Brasil. Rodriguésia 57(3): p. 659-666, 2006.

VINUTHA, B. et. al., **Screening of selected Indian medicinal plants for cetylcholinesterase inhibitory activity.** Journal of Ethnopharmacology, v. 109, p. 359-63, 2007.

WARMING, E. & FERRI, M. G. 1973. **Lagoa Santa e a vegetação de cerrados brasileiros.** Itatiaia, Belo Horizonte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1973.

YAMAGUCHY, T; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAQ, J. **HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.** Biosci. Biotechnol. Biochem, v. 62, n. 6, p. 1201-12-4, 1998.

YAMAMOTO, K. **Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Vochysiaceae.** Bol. Bot. Univ. São Paulo 27(1):131-136, 2009.

YOGEE SWARI, P.; SRIRAM. D. **Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties.** Curr. Med. Chem, v. 12, n. 6, p. 657-666, 2005.

ZUCARO, Y. L.; COMPAGNONE, R. S.; HESS, S. C e DELLE MONACHE, F. **6 β - Hidroxymaslinic Acid, a Triterpene from *Vochysia ferruginea*.** J. Braz. Chem. Soc. 11 (3): 241-244, 2000.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S. C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E. PASSERINI, C. G.; FORMELLI, F. **Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells.** Cancer Lett, v.175, p. 17-25, 2002.