



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

LEANDRO DA SILVA NASCIMENTO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ENSAIOS BIOLÓGICOS DE
Davilla kunthii A. St.-Hil. (Dilleniaceae)**

Boa Vista
2014

LEANDRO DA SILVA NASCIMENTO

ESTUDO FITOQUÍMICO E ENSAIOS BIOLÓGICOS DE
Davilla kunthii A. St.-Hil. (Dilleniaceae)

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
2014

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

N244e Nascimento, Leandro da Silva .
Estudo fitoquímico e ensaios biológicos de *Davilla Kunthii* A. St.
Hil (Dilleniaceae) / Leandro da Silva Nascimento. – Boa Vista, 2014.
101f. : il.

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

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima,
Programa de Pós-Graduação em Química.

1 – Fitoquímica. 2 - Dilleniaceae. 3 – Cromatografia. I – Título. II
– Nascimento, Francisco das Chagas.

CDU – 581.192

LEANDRO DA SILVA NASCIMENTO

ESTUDO FITOQUÍMICO E ENSAIOS BIOLÓGICOS DE
Davilla kunthii A. St.-Hil. (Dilleniaceae)

Dissertação apresentada como Pré-requisito para a conclusão do Curso de mestrado em Química da Universidade Federal de Roraima – UFRR, defendida em 03 de abril de 2014 e avaliada pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Francisco das Chagas do Nascimento
Orientador/Departamento de Química da Universidade Federal de Roraima –
UFRR

Prof. Dr. Habel Nasser Rocha da Costa
Departamento de Química da Universidade Federal de Roraima – UFRR

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

À minha mãe **Sandra Regina da Silva** (in memoriam) e minha avó **Iracema da Silva** (in memoriam), que me ensinaram os primeiros passos de que respeito e educação possam andar lado a lado, buscando uma harmonia entre uns aos outros. E por mais que elas não estejam entre nós, com toda a certeza, estão torcendo pelo meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Por ter fé e saber que só estou aqui graças a Ele, agradeço a DEUS em primeiro lugar.

A minha família: Debora, Valdinei, Ariadne, Arthur, Loana, Vanderlei e Ian, pelo incentivo e apoio. “Pois a família é o alicerce de qualquer ser.”

A Caroline Gomes Coelho Nascimento, minha companheira de todas as horas.

As professoras Silvana, Fabiola, Vania e Gersa e ao professor Mibielli, pelo incentivo e apoio.

A Roselene, Ramon, Elizandra e Benicio, pelo incentivo e apoio.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Francisco das Chagas do Nascimento pelas suas orientações conduzidas com competências e clareza e também pela sua amizade que é de grande importância.

Ao Coordenador Prof. Dr. Antônio Alves de Melo Filho e ao secretário Pedro Rômulo Estevão Ribeiro, por acreditar em minha capacidade e pelo incentivo durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Carlos Ramon Franco, pelo apoio e incentivo.

A Prof^a. MSc. Maria Lucia Taveira, pelo apoio e incentivo.

A Prof^a. Dr^a. Andréia Flores, pesquisadora da FEMACT e do Museu Integrado de Roraima – MIRR, pela identificação Botânica da Planta.

Aos amigos de Laboratório Ricardo Carvalho dos Santos, Shirley Aparecida Carvalho Rabelo, Graciliano Rosa Silva e Wilson Botelho do Nascimento Filho, na realização dos trabalhos e companheirismo.

Aos amigos mestrados: Mauro, Jomara, Janes e Oliveira pela alegria que contagiava todos no Laboratório.

A amiga Eliane, pelo incentivo e apoio na pesquisa.

Aos bibliotecários, pela amizade e ajuda na busca pelas referências.

Aos amigos em geral, pelo incentivo e apoio.

Ao Departamento de Química – Universidade Federal de Minas Gerais, em especial as Professoras: Dr^a Lucienir Pains Duarte e Dr^a Lúcia Pinheiro Santos Pimenta pela ajuda na interpretação dos espectros.

A Dr^a Vany Ferraz do laboratório de Cromatografia, pela análise cromatográfica e identificação dos Ésteres metilados.

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

Aos profissionais de serviços gerais do Núcleo de Pesquisa e Pós – Graduação em Ciências e Tecnologia, pela contribuição.

A equipe do Colégio de Aplicação – Cap/UFRR, pelo companheirismo e compreensão.

A Universidade Federal de Roraima e aos professores do Departamento de Química por terem contribuído para minha formação acadêmica.

Enfim, a todos que de uma forma direta ou indiretamente participaram deste meu sucesso, meu muito obrigado.

“[...] só quando a última árvore for derrubada, o último peixe for morto e o último rio for poluído é que o homem perceberá que não pode comer dinheiro”.
(Provérbio Indígena)

RESUMO

O uso de plantas ou extratos de plantas para propósitos medicinais tem sido realizado a milhares de anos. O estudo químico e biológico de plantas constitui numa estratégia alternativa na procura de novos agentes terapêuticos para a identificação de compostos bioativos. A espécie *Davilla kunthii* A. St. –Hil, pertencente à família Dilleniaceae, é conhecida popularmente como cipó-de-fogo e podem ser encontradas em regiões de savana. Este trabalho teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico e ensaios biológicos da espécie *Davilla kunthii* A. St. –Hil, tendo em vista que até o presente não foram encontrados registros químicos e biológicos a respeito desta espécie.

A espécie foi coletada no Campus Cauamé do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Roraima (CCA/UFRR). Para a preparação dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *D. kunthii* A. St. –Hil os materiais vegetais foram acondicionados em mariotes de vidro para extração a frio em *n*-hexano e, depois, etanol. O extrato etanólico das folhas, que após particionados, renderam as frações em hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. As frações do extrato clorofórmico foram purificadas e analisadas através de métodos cromatográficos. Os compostos foram identificados através de técnicas espectroscópicas e comparados com dados da literatura.

O estudo fitoquímico das folhas levou ao isolamento e identificação de uma mistura de ácidos graxos na forma de seus ésteres metílicos (determinados por CG), uma mistura de β -Sitosterol e Stigmasterol e do álcool Triacontan-1-ol (Álcool Melíssilico). Nos ensaios biológicos o extrato das folhas apresentaram uma variação MIC (Mínima Concentração Inibitória) de 6,2 a 53,7% para as bactérias *S. aureus* e *S. sanguinis*. Já para as bactérias *E. coli* e *S. tiphymurium* o MIC variou de 9,23 a 38,2% e para a levedura *C. albicans* o MIC foi de 92,5 a 95,3%.

Conclui-se que o extrato etanólico das folhas de *D. kunthii* A. St. –Hil apresentou uma baixa toxicidade frente à *Artemia salina*, uma excelente atividade contra a levedura *C. albicans* além de revelar uma grande capacidade antioxidante da espécie pelo método de redução do radical DPPH. No entanto, como ainda não foram encontrado relato sobre a referida espécie espera-se que estes resultados possam contribuir para o estudo fitoquímico desta planta.

Palavras-chave: Fitoquímica; Dilleniaceae; Cromatografia.

ABSTRACT

The use of plants or plant extracts for medicinal purposes has been done for thousands of years. The chemical and biological study of plants is an alternative strategy in the search for new therapeutic agents for the identification of bioactive compounds. The *Davilla kunthii* A. St.-Hil species belonging to Dilleniaceae family, is popularly known as vine-of-fire and can be found in savanna regions. This work aimed to make the phytochemical study and biological assays of the species *Davilla kunthii* A. St.-Hil, considering that to date regarding chemical and biological records of this species were not found.

The species was collected in the Campus Center Cauamé Agricultural Sciences, Federal University of Roraima (CCA / UFRR). For the preparation of hexane and ethanol extracts of the leaves of *D. kunthii* A. St.-Hil plant materials were placed in glass marjotes for cold extraction in n-hexane and then ethanol. The ethanol extract of the leaves, which after partitioned, yielded fractions in hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. The fractions of the chloroform extract were purified and analyzed by chromatographic methods. The compounds were identified by spectroscopic techniques and compared with literature data.

The phytochemical study of leaves led to the isolation and identification of a mixture of fatty acids as their methyl esters (determined by GC), a mixture of β -sitosterol and stigmasterol and alcohol Triacontan-1-ol (Alcohol Melissilico). In biological assays leaves extract showed a MIC (Minimum Inhibitory Concentration) variation from 6.2 to 53.7% for *S. aureus* and *S. sanguinis* bacteria. As for the *E. coli* bacteria and *S. tiphymurium* the MIC ranged from 9.23 to 38.2% and the yeast *C. albicans* MIC was 92.5 to 95.3%.

It is concluded that the ethanol extract of the leaves of *D. kunthii* A. St.-Hil showed low toxicity on *Artemia salina*, an excellent activity against the yeast *C. albicans* as well as revealing a great antioxidant capacity of the species by the method of reduction the DPPH radical. However, they were not reported on the species is expected that these results will contribute to the phytochemical study of this plant family.

Keywords: Phytochemistry; Dilleniaceae; Chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa de distribuição da família Dilleniaceae.....	29
Figura 2 -	Metabólitos isolados do gênero <i>Curatella americana</i>	30
Figura 3 -	Metabólitos isolados do gênero <i>Dillenia</i>	31
Figura 4 -	Metabolitos isolados do gênero <i>Davilla</i>	32
Figura 5 -	Folhas e Fruto de <i>Davilla kunthii</i>	34
Figura 6 -	Caule de <i>Davilla kunthii</i>	35
Figura 7 -	Exsicata de <i>Davilla kunthii</i> A. St. –Hil.....	35
Figura 8 -	Mapa de distribuição da espécie <i>Davilla kunthii</i>	36
Figura 9 -	Biossíntese do esqualeno.....	38
Figura 10 -	Formação de esteróides e triterpenos a partir do esqualeno.....	39
Figura 11 -	Biossíntese do β – Sitosterol.....	40
Figura 12 -	Coluna filtrante do Extrato Etanólico de <i>Davilla kunthii</i>	44
Figura 13 -	Coluna Cromatográfica clássica de <i>Davilla kunthii</i>	45
Figura 14 -	Molécula de Álcool Melíssico.....	57
Figura 15 -	Mistura de (1) β – Sitosterol e (2) Estigmasterol de <i>Davilla kunthii</i> A. St. –Hil.....	58
Figura 16 -	Cromatograma dos ésteres metílicos de <i>Davilla kunthii</i>	59
Figura 17 -	Estrutura de ácidos graxos saturados e insaturados.....	61
Figura 18 -	Espectro de absorção na região do IV de DKF–3 (KBr).....	63
Figura 19 -	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de DKF–3 em CDCl_3 + DMSO-d_6 e Piridina- d_5	64

Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H , ampliação da região de δH (1,0 – 3,5) (400 MHz) de DKF-3 em CDCl_3 + DMSO-d_6 e Piridina- d_5	64
Figura 21 - Espectro de RMN de ^{13}C , (100 MHz) de DKF-3 em CDCl_3 + DMSO-d_6 e Piridina- d_5	65
Figura 22 - Espectro de RMN de ^{13}C , (100 MHz) de DKF-3 em CDCl_3 + DMSO-d_6 e Piridina- d_5	66
Figura 23 - Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de DKF-3 em CDCl_3 + DMSO-d_6 e Piridina- d_5	66
Figura 24 - Espectro de absorção na região do IV de DKF-4 (KBr).....	68
Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H , ampliação da região de δH (3,48 – 5,35) (400 MHz) de DKF-4 em CDCl_3	69
Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H , ampliação da região de δH (1,15 – 2,30) (400 MHz) de DKF-4 em CDCl_3	70
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H , ampliação da região de δH (0,60 – 1,08) (400 MHz) de DKF-4 em CDCl_3	70
Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C , (100 MHz) de DKF-4 em CDCl_3	72
Figura 29 - Subespectro DEPT135 (100 MHz) de DKF-4 em CDCl_3	72
Figura 30 - (1) β – Sitosterol e (2) Estigmasterol.....	74
Figura 31 - Curva de atividade frente á <i>Artemia salina</i>	78
Figura 32 - Estrutura Química do Difenilpicrilhidrazila - Radical Livre (1), e Difenilpicrilhodrazine – Radical Reduzido (2).....	80
Figura 33 - Curva do DPPH.....	81

Figura 34 - Curva da Quercetina.....	83
Figura 35 - Curva do Extrato Etanólico de <i>Davilla kunthii</i> A. St. – Hil.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Lista das plantas Medicinais amazônicas.....	23
Tabela 2 -	Classificação botânica de <i>Davilla kunthii</i> A. St. –Hil.....	33
Tabela 3 -	Coluna filtrante do extrato etanólico de <i>Davilla kunthii</i>	44
Tabela 4 -	Fracionamento cromatográfico do eluato clorofórmico de <i>Davilla kunthii</i>	46
Tabela 5 -	Grupos originados do fracionamento cromatográfico do eluato clorofórmio das folhas de <i>Davilla kunthii</i>	47
Tabela 6 -	Fracionamento cromatográfico dos grupos 07 e 08.....	49
Tabela 7 -	Subgrupos originados da cromatografia dos grupos 7 e 8.....	50
Tabela 8 -	Fracionamento cromatográfico do Grupo 13.....	51
Tabela 9 -	Subgrupos originados da cromatografia do Grupo 13.....	52
Tabela 10 -	Fracionamento cromatográfico das frações 27-34, proveniente do Grupo 13.....	53
Tabela 11 -	Subgrupos originados da cromatografia das frações 27-34.....	53
Tabela 12 -	Fracionamento cromatográfico das frações 21-32.....	54
Tabela 13 -	Subgrupos originados da cromatografia das frações 27-34.....	55
Tabela 14 -	Tempos de retenção por CG de ésteres metílicos.....	60
Tabela 15 -	Normalização da Área.....	60
Tabela 16 -	Atribuições dos sinais de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de DKF – 4 comparadas com a literatura.....	71
Tabela 17 -	Comparações entre sinais de RMN de ¹³ C de DKF–4 e sinais de Estigmasterol e β-Sitosterol.....	73
Tabela 18 -	Número de naudiolos mortos.....	76
Tabela 19 -	Dados de atividade frente a <i>Artemia salina</i> para DKExE.....	77
Tabela 20 -	Preparo das soluções para a curva do DPPH.....	81
Tabela 21 -	Preparo das soluções para a curva de Quercetina.....	82
Tabela 22 -	Preparo das soluções para a curva de <i>Davilla kunthii</i>	84

Tabela 23 - Bioensaio de MIC do extrato etanólico de *Davilla kunthii*..... 89

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 -	Vias do metabolismo secundário.....	37
Esquema 2 -	Tratamento das folhas de <i>Davilla kunthii</i> A. St.-Hil.....	43
Esquema 3 -	Preparação de extratos das folhas de <i>Davilla kunthii</i> A. St.- Hil.....	43
Esquema 4 -	Fracionamento e substâncias isoladas do extrato etanólico de <i>Davilla kunthii</i> A. St. –Hil.....	56

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

δ	Deslocamento químico.
μL	Microlitro.
DKEC	<i>Davilla kunthii</i> Eluato Clorofórmico
DKExE	<i>Davilla kunthii</i> Extrato Etanólico.
CCD	Cromatografia em Camada Delgada.
CDCl_3	Clorofórmio deuterado.
d	Dupleto.
eV	Elétron-volts.
Hz	Hertz.
IV	Infravermelho.
J	Constante de Acoplamento.
MHz	Megahertz.
m/z	Razão entre massa e carga.
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13.
s	Singleto e Segundo
DMSO	Dimetilsulfóxido
BHI	Brain Heart Infusion (Infuso de cérebro e coração)
E.E.	Extrato Etanólico
mg	Miligramas
CG	Cromatografia Gasosa

ω	Ômega
β	Beta
γ	Gama
Δ, δ	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
g	Gramma
DL	Dose Letal
CE	Concentração Efetiva
MIC	Mínima Concentração Inibitória
nm	Nanômetro
UFC	Unidade de Formação de Colônias
Conc.	Concentração
Sol.	Solução
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DKF	<i>Davilla kunthii</i> Fração
C	Carbono
H	Hidrogênio
O	Oxigênio
cm	Centímetro
KBr	Brometo de Potássio
NaCl	Cloreto de Sódio

ppm	Parte por Milhão
MPE-RR	Ministério Público do Estado de Roraima
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
MMA	Ministério do Meio Ambiente
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA DILLENiaceae.....	28
3.1.1 Metabólitos secundários encontrados na família <i>Dilleniaceae</i>	30
3.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO <i>Davilla</i>	32
3.3 TAXONOMIA VEGETAL.....	33
3.4 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE <i>Davilla kunthii</i> A. St. –Hil.....	34
3.5 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE <i>Davilla kunthii</i>	36
3.6 BREVE RELATO SOBRE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	36
3.6.1 Biossíntese de Esteróides e Triterpenos.....	38
4 PARTE EXPERIMENTAL	41
4.1 ESPECIFICAÇÃO DE MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS.....	41
4.2 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>Davilla kunthii</i> A. St. –Hil.....	42
4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	42
4.2.2 Preparação dos Extratos das folhas de <i>Davilla kunthii</i> A. St. –Hil.....	43
4.2.3 Coluna filtrante do extrato etanólico das folhas de <i>Davilla kunthii</i>	43
4.2.4 Fracionamento cromatográfico do eluato clorofórmico das folhas de	

<i>Davilla kunthii</i> A. St. –Hil.....	44
4.2.4.1 Grupos 01 e 02.....	47
4.2.4.2 Grupo 05.....	48
4.2.4.3 Grupo 07/08.....	49
4.2.4.4 Grupo 13.....	51
4.2.5 Resumo do estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de <i>Davilla kunthii</i> A. St. –Hil.....	56
4.3 DADOS FÍSICO-QUÍMICOS DE SUBSTÂNCIAS E MISTURAS ISOLADAS.....	57
4.3.1 DKF – 2 (Mistura de Ésteres).....	57
4.3.2 DKF – 3 Triacontan-1-ol (Álcool Melissílico).....	57
4.3.3 DKF – 4 (Mistura de β – Sitosterol e Estigmasterol).....	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
5.1 DETERMINAÇÕES ESTRUTURAIS DE SUBSTÂNCIA E MISTURAS ISOLADAS.....	59
5.1.1 Misturas de ésteres (DKF - 2).....	59
5.1.1.1 Ácidos Graxos.....	61
5.1.2 DKF-3 (Álcool Triacontan-1-ol (Álcool Melissílico)).....	63
5.1.3 DKF-4 (Mistura de β – Sitosterol e Estigmasterol).....	68
6 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	75
6.1 Teste de toxicidade geral frente à <i>Artemia salina</i>	75
6.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do DPPH.....	78
6.2.1 Preparo das soluções.....	80

6.2.2 Preparo das Diluições.....	80
6.3 Bioensaio Microbiológico.....	85
6.3.1 Procedimento para MIC Gram – Negativa (<i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella tiphymurium</i>), Gram – Positivas (<i>S. aureus</i> e <i>S. sanguinis</i>) e Levedura (<i>Candida albicans</i>).....	85
6.3.2 Procedimento de MIC para Fungos Filamentosos (<i>Aspergillus flavus</i> e <i>Fusarium proliferatum</i>).....	86
6.4 Bioensaio MIC para <i>Davilla kunthii</i>	87
7 CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
APÊNDICES.....	100

1 INTRODUÇÃO

Desde o início da civilização, o uso de plantas medicinais (na forma de chás e extratos) vem se expandindo, e sendo utilizadas pelo homem como fonte de alimento, no uso em rituais religiosos e medicamento (REBOUÇAS, 2009). Precisando ser preservadas, pois a perda de diversidade biológica é um problema global que aumenta a um ritmo alarmante, devido à destruição contínua dos habitats naturais e da consequente extinção das espécies que aparecem (SILVA, 2012).

Sendo seu uso, tão remoto quanto o início da humanidade, elas têm sido uma rica fonte para obtenção de moléculas para serem exploradas terapêuticamente (FOGLIO et al., 2006). No último século, o homem buscou viver muito o macrocosmo, deixando o microcosmo um pouco abandonado, portanto notando-se uma correção de rumo e uma busca pelo conhecimento e pelo domínio do microcosmo, ou seja, o seu interior (PINTO; LAMEIRA; SILVA, 2006).

Países como China e Índia têm encontrado meios de legalizar e reconhecer o uso tradicional das plantas, e a cultura chinesa utiliza o conhecimento popular das ervas há cinco séculos, com mais de 5 mil espécies utilizadas (FOGLIO et al., 2006).

Nesse contexto, valorizando-se o uso de plantas medicinais (fitoterápicos), alimentos de boa qualidade e isentos de agrotóxicos, vêm reconquistando cada vez mais o seu espaço na medicina moderna (PINTO; LAMEIRA; SILVA, 2006). A partir do avanço da revolução industrial, que se deu o desenvolvimento da química orgânica (RATES, 2001) e de grandes indústrias farmacêuticas que buscavam e buscam na natureza novas moléculas para posteriormente sintetizá-las para o desenvolvimento de novos medicamentos (YOUNG, 1999).

Apresentando cerca de 56 mil espécies de plantas (excluindo fungos), o Brasil possui uma das floras mais ricas do mundo, ou seja, representando um sexto de todas as espécies do planeta (GIULIETTI, 2005; MYERS et al., 2000). Mesmo diante de tamanha biodiversidade, o país se encontra hoje como um verdadeiro comprador dessas tecnologias importadas ou pagador de *royalties* para laboratórios farmacêuticos estrangeiros (SILVA, 2012).

Com grande potencial para exploração e cultivo de plantas medicinais a região amazônica, apresenta uma grande diversidade e raras espécies, muito delas, além de serem utilizadas na farmacopeia, são empregadas pelos países importadores, como Estados Unidos, Alemanha, França, Canadá e Japão, como cosméticos ou suplemento nutricional (PINTO; LAMEIRA; SILVA, 2006), fazendo com que o país (Brasil) pague por esses *royalties*.

A Tabela 1 mostra as plantas mais negociadas no exterior:

Tabela 1 - Lista das plantas Medicinais amazônicas (PINTO; LAMEIRA; SILVA, 2006).

Nome popular	Nome científico
Abuta	<i>Cissampelos parreira</i>
Acerola	<i>Malpighia glabra</i>
Andiroba	<i>Carapa guianensis</i>
Cedro-amargo	<i>Cedrella odorata</i>
Cipó-cabeludo	<i>Mikania hirsutíssima</i>
Copaíba	<i>Copaífera officinalis</i>
Cumaru	<i>Dipteryx odorata</i>
Damiana	<i>Turnera afrodisíaca</i>
Imbaúba	<i>Cecropia sp.</i>
Guaraná	<i>Paullinia cupana</i>
Ipecacuanha	<i>Psychotria ipecacuanha</i>
Jatobá	<i>Hymenaea courbaril</i>
Jucá	<i>Caesalpinia férrea</i>
Jurubeba	<i>Solanum paniculatum</i>
Manjerioba	<i>Cassia occidentalis</i>
Mastruço	<i>Chenopodium ambrosiodes</i>
Melão-de-São-Caetano	<i>Momordica charantia</i>
Muirapuama	<i>Ptychopetalumolacoides</i>
Pata-de-vaca	<i>Bauhinia forficata</i>
Pau-d' arco	<i>Tabebuia impetiginosa</i>
Pedra ume caá	<i>Myrcia salicifolia</i>
Quina	<i>Quassia amara</i>
Sacaca	<i>Croton cajucara</i>
Sangue-de-Dragão	<i>Croton lachleri</i>

Segundo Silva (2012), estima-se que populações indígenas brasileiras dominem a aplicação medicinal de 1300 espécies brasileiras.

Essa é uma das opções de se conduzir pesquisas a partir da indicação de plantas utilizadas por comunidades, podendo encurtar o percurso do desenvolvimento de uma nova droga, já que os pesquisadores dispõem, antes mesmo de iniciarem os estudos científicos, um indício de qual atividade biológica esta droga poderia apresentar (SILVEIRA, 2003). Mas, muitas espécies estão desaparecendo em um ritmo acelerado, não dando tempo para a avaliação do potencial terapêutico destas, devido à poluição das águas, do solo e a devastação de áreas para a pecuária e agricultura (CORREA, 2005).

Com isso, o governo federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, a qual se constitui em parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social como um dos elementos fundamentais de transversalidade na implementação de ações capazes de promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira (SILVA, 2012), principalmente, no tratamento das mais variadas doenças nos diferentes grupos sociais (NOLDIN, 2005).

Além da utilização de plantas medicinais na medicina popular brasileira, vários institutos de pesquisa avaliam o potencial de diversas plantas visando à obtenção de novos fitoterápicos ou de novos fármacos (SILVEIRA, 2003).

E segundo Gregório (2008), a biodiversidade brasileira constitui um dos maiores tesouros da nação, pois além de poder gerar divisa com manejo sustentado e o ecoturismo, constitui uma grande fonte para a pesquisa, o desenvolvimento e a produção de novas drogas para o tratamento das mais variadas patologias (GREGÓRIO, 2008).

Um país privilegiado como o nosso, com uma exuberante fauna e flora, riqueza e biodiversidade elevada, quando comparada com outras regiões do mundo, a população tem que estar ciente da sua responsabilidade em cuidar de toda essa riqueza, sendo por isso que dispõe de uma legislação específica a fim de proteger seu patrimônio natural inseridas no Sistema Nacional de Unidades de Conservação, Código Florestal de 1965, Lei dos Crimes Ambientais, IBAMA e CONAMA (MPE-RR, 2004).

O Estado de Roraima é uma das grandes áreas de preservação e conservação ambiental.

Da extensão do seu território de 225mil km², 80% estão destinados como área de proteção ambiental (BRASIL, 2007), e as savanas que ocupam uma área de aproximadamente 39 mil Km² de extensão, possui um número pequeno de espécies quando comparada aos cerrados do Brasil Central, possuindo em sua fisionomia vegetal espécies arbóreas, típicas da Floresta Amazônica, espécies arbustivas e herbáceas, características de savanas (BARBOSA; OLIVEIRA; LÔ, 2003). E cerca de 70 espécies compõem o universo da flora do nosso estado, sendo que aproximadamente 60% destas podem ser consideradas raras (MIRANDA; ABSY; REBÊLO, 2003).

Entre elas, destaca-se a espécie arbustiva *Davilla kunthii* A. St. -Hil, objeto deste trabalho.

Trabalho este, tem por objetivo isolar os fitoconstituintes e realizar os ensaios biológicos do extrato etanólico das folhas da *Davilla kunthii* A. St. -Hil, e elucidar suas estruturas através da utilização de técnicas cromatográficas em coluna e em CCD, técnicas espectroscópicas, recristalizações e comparação com dados da literatura, contribuindo para o conhecimento fitoquímico de plantas da Região Norte e pelo pioneirismo que representa para o Estado de Roraima.

A dissertação está estruturada em quatro partes:

Sendo a Parte I constituída da Introdução;

A Parte II diz respeito aos Procedimentos experimentais, onde estão descritos os processos que levaram ao isolamento, purificação das substâncias isoladas e dos derivados;

A Parte III relata a determinação estrutural dos constituintes químicos isolados e derivados, através de métodos espectroscópicos, e comparação com dados da literatura;

Enfim, a Parte IV relata os Ensaio Biológicos e à descrição dos procedimentos realizados com a espécie *Davilla kunthii* A. St. -Hil.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar o estudo fitoquímico e ensaios biológicos da espécie *Davilla kunthii* A. St. -Hil.

2.2 Objetivos específicos

Realizar o estudo fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Davilla kunthii* A. St. -Hil;

Realizar o isolamento e a caracterização de compostos a partir do eluato clorofórmico;

Determinar a elucidação das substâncias isoladas por análise espectrométrica de Infravermelho, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C ;

Realizar ensaios biológicos com o extrato etanólico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Podemos considerar como planta medicinal aquela planta administrada sob qualquer forma e por alguma via ao homem, exercendo algum tipo de ação farmacológica (SILVA; CARVALHO, 2004).

Segundo Calixto (2000), as plantas podem ser classificadas de acordo com sua ordem de importância, iniciando-se pelas plantas empregadas diretamente como terapêutica, seguidas daquelas que constituem matéria-prima para manipulação e, por último, as empregadas na indústria para obtenção de princípios ativos ou como precursores em semissíntese, e elas também têm sido utilizadas, tradicionalmente, para o tratamento de várias enfermidades com uma vasta aplicação, abrangendo desde o combate ao câncer até os microrganismos patogênicos (CALIXTO, 2000).

Em termos históricos, a pesquisa de plantas medicinais tomou impulso após o isolamento da morfina no século 19 (BALUNAS; KINGHORN, 2005). Como as plantas e seus derivados são as maiores fontes de drogas, elas movimentam cerca de 30% do mercado farmacêutico (KIRKPATRICK, 2002). Segundo Gurib-Fakim (2006), entre os anos de 1981 e 2002, foram introduzidas cerca de 877 novas moléculas no mercado, e em torno de 49% eram substâncias isoladas de produtos naturais, semissintéticos derivados de produtos naturais ou então moléculas sintetizadas, tomando como modelo estruturas de origem natural (GURIB-FAKIM, 2006).

Com a possibilidade de se encontrar novas moléculas a partir de produtos naturais é imensurável (GURBUZ et al., 2002), e segundo Kushima (2006), o estudo de novos compostos a partir de espécies vegetais, tem-se despesas e gastos. Pois para que uma nova droga seja lançada ao mercado, gasta-se em torno de 100 a 360 milhões de dólares e no mínimo 10 anos de trabalho. Estimando-se que a probabilidade de sucesso para a obtenção de novos compostos seja de 1 molécula ativa para cada 10.000 moléculas estudadas (KUSHIMA, 2006). Esses dados são referentes ao panorama de países desenvolvidos que selecionam plantas de maneira randômica aumentando os custos e o tempo gasto para se conseguir novas drogas, mas o estudo de plantas medicinais não se restringe apenas a procura de novas moléculas, pois essas plantas podem ser empregadas em diferentes

formulações, como em infusões, tinturas, extratos, frações ou no desenvolvimento de fitoterápicos (RATES, 2001).

E para se realizar pesquisas com plantas medicinais, deve-se ter critérios adequados na seleção das espécies vegetais para obter sucesso na investigação farmacológica (KUSHIMA, 2006). Segundo Holetz (2002), a escolha com base no conhecimento popular (etnofarmacologia) seria óbvia, devido ao acúmulo milenar das informações, aumentando a possibilidade de se descobrir novos compostos (HOLETZ et al., 2002).

Porém, a seleção com base nos constituintes químicos (potencialmente ativos) encontrados em um dado gênero ou família torna-se interessante, principalmente, pela possibilidade de se encontrar quantidades elevadas de compostos ativos (HOLETZ et al., 2002).

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA DILLENIACEAE

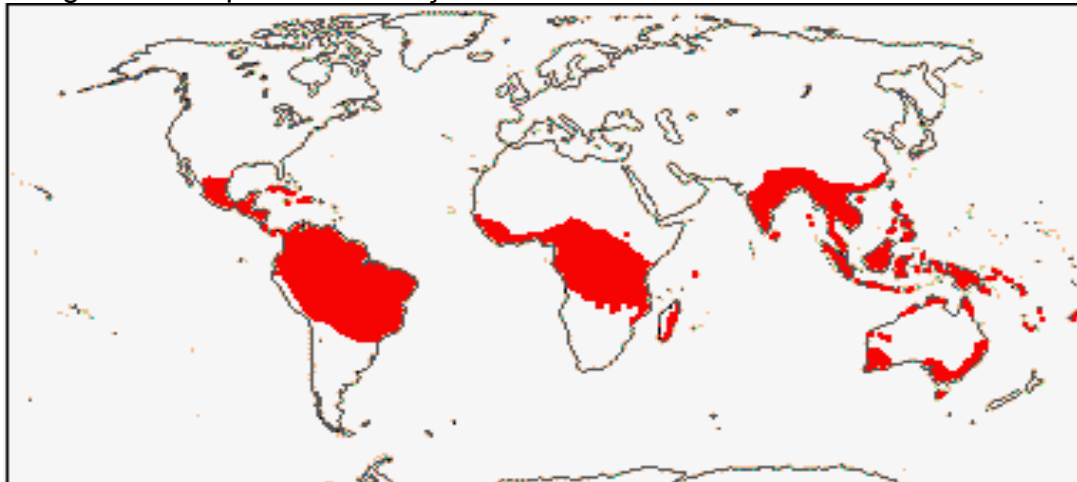
Através de levantamentos bibliográficos, constatou-se que a família Dilleniaceae é composta pelos gêneros *Acrotrema*, *Curatella*, *Davilla*, *Didesmandra*, *Dillenia*, *Doliocarpus*, *Hibbertia*, *Pachynema*, *Pinzona*, *Schumacheria* e *Tetracera* com cerca de 310 espécies (AYMARD, 1998; BARBOSA, 2011). Os indivíduos pertencentes a esses gêneros são classificados como árvores, arbustos, subarbustos eretos ou escandentes, lianas lenhosas, raramente ervas, apresentando folhas alternas inteiras, penínervas, sem estípulas e, geralmente, com células epidérmicas impregnadas de sílica o que lhes conferem certa aspereza ao tato (AYMARD, 1998; BARBOSA, 2011; SOARES et al., 2005).

Na América Central, a família Dilleniaceae, pertence a duas subfamílias distintas, Delimoideae sendo constituída apenas por *Tetracera* L. que pertence a uma linhagem basal e representando o grupo irmão de todas as demais subfamílias (FRAGA; STEHMANN, 2010). Os demais gêneros Neotropicais (*Curatella* L., *Davilla* Vand., *Doliocarpus* Rol., *Neodillenia* Aymard e *Pinzona* Mart. e Zucc.) pertencem à subfamília Doliocarpoideae e formam um grupo monofilético irmão das subfamílias Paleotropicais, Dillenioideae e Hibbertioideae (HORN, 2009).

Mas, de ocorrência Pantropical, as espécies desta família estão distribuídas em três centros de diversidade, América Tropical, África e

Australásia (KUBITZKI; SMITH, 2004), onde são encontradas em locais úmidos ou estacionais, frequentemente, em florestas sempre-verdes, florestas semidecidual e nas savanas, Figura 1 (RIBEIRO et al., 1999).

Figura 1 - Mapa de distribuição da família Dilleniaceae.



Fonte: www.mobot.org/mobot/reserch/apweb/orders/dillenialesweb.html (2013).

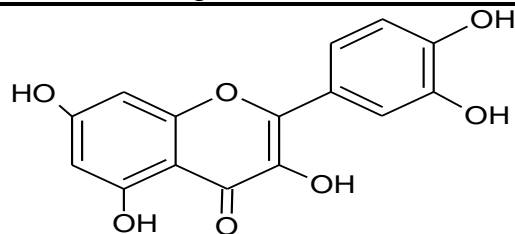
No Brasil, o grupo está representado por cinco gêneros e cerca de 40 espécies distribuídas nos cerrados e em todo o Nordeste (BARBOSA, 2011; SCHULTZ, 1984).

O gênero *Curatella* Linn, com apenas um representante, *Curatella americana* L., “Lixeira”, característico das savanas Neotropicais, ocorre do sul do México até a Bolívia e São Paulo (KUBITZKI; SMITH, 2004). *Davilla* Vendl, um dos gêneros mais diversificados desta família, com cerca de trinta espécies Neotropicais de lianas, arbustos eretos ou escandentes, distribuídas desde o leste do México, até Bolívia e Paraguai, com centro de diversidade no nordeste brasileiro (AYMARD, 2002). *Doliocarpus* Roland, possui ampla dispersão Neotropical, com cerca de quarenta e cinco espécies de lianas lenhosas, distribuídas desde o leste do México até Paraguai e Brasil, principalmente na região Amazônica (RIBEIRO, et al. 1999; AYMARD; MILLER, 1994), *Pinzona* Mart. e Zucc., compreende apenas uma espécie, *Pinzona coriacea* Mart. e Zucc., uma liana lenhosa (trepadeira) das florestas amazônicas e América Central (AYMARD, 1998) e a *Tetracera* Linn., apresenta grande número de lianas lenhosas de ocorrência Pantropical (KUBITZKI; SMITH, 2004), compreendendo algumas espécies na Amazônia (“cipó-d’água”, “orelha-de-onça”) (RIBEIRO et al., 1999).

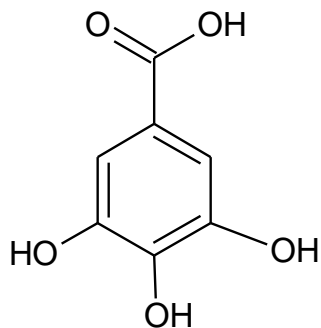
3.1.1 Metabólitos secundários encontrados na família *Dilleniaceae*.

Uma revisão bibliográfica da família *Dilleniaceae* revelou o isolamento de vários metabólitos secundários, Figuras 2, 3 e 4.

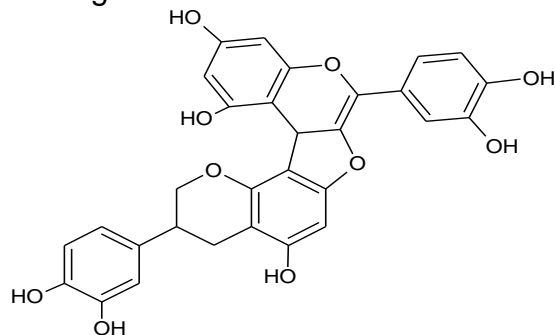
Figura 2 - Metabólitos isolados do gênero *Curatella americana*.



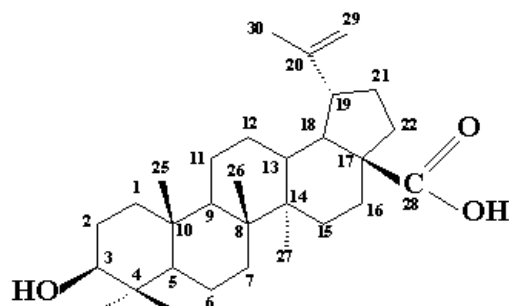
Flavonoide isolado de *Curatella americana* L.



Acido gálico isolado de *C. americana* L.

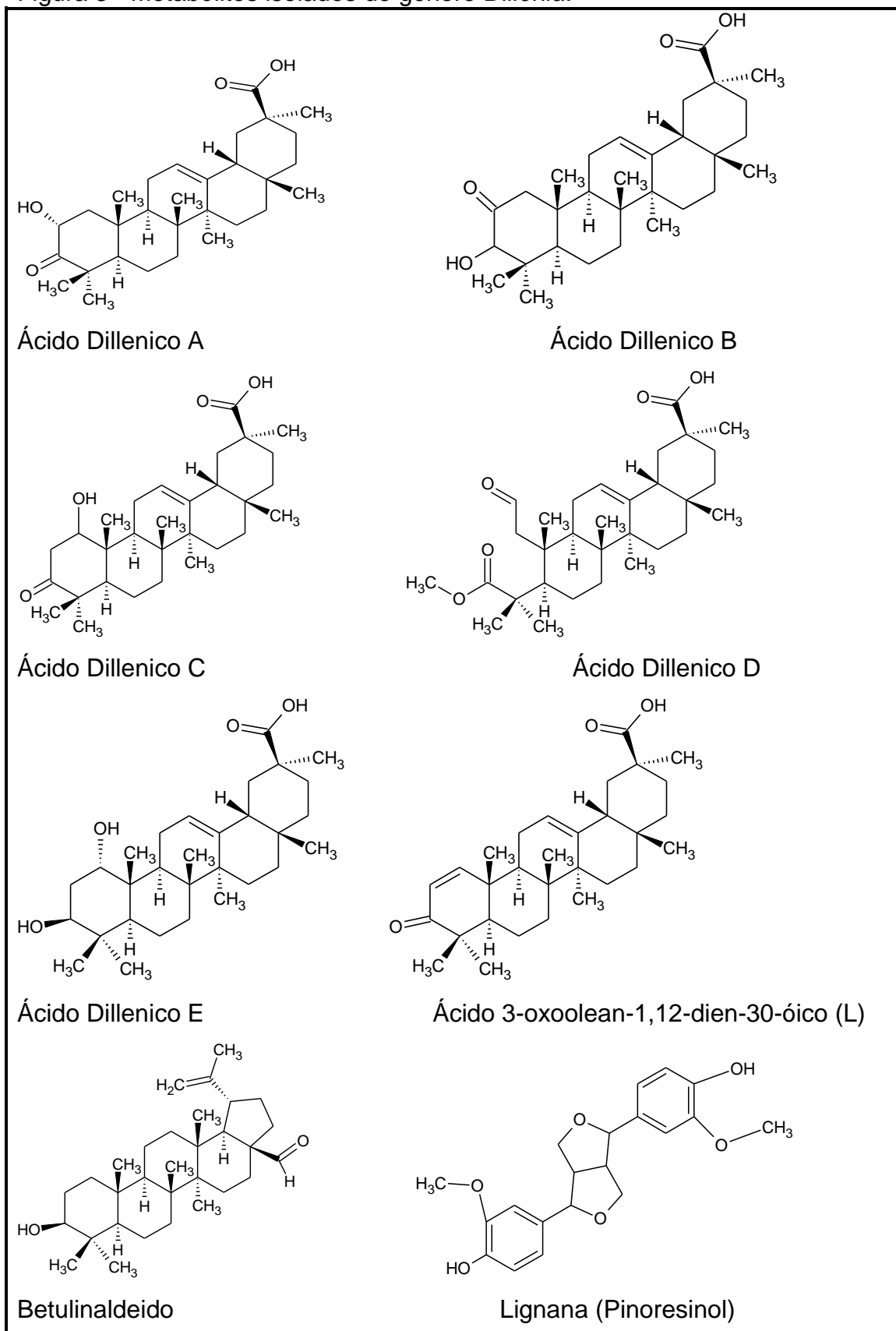


Procianidina isolada de *C. americana* L.

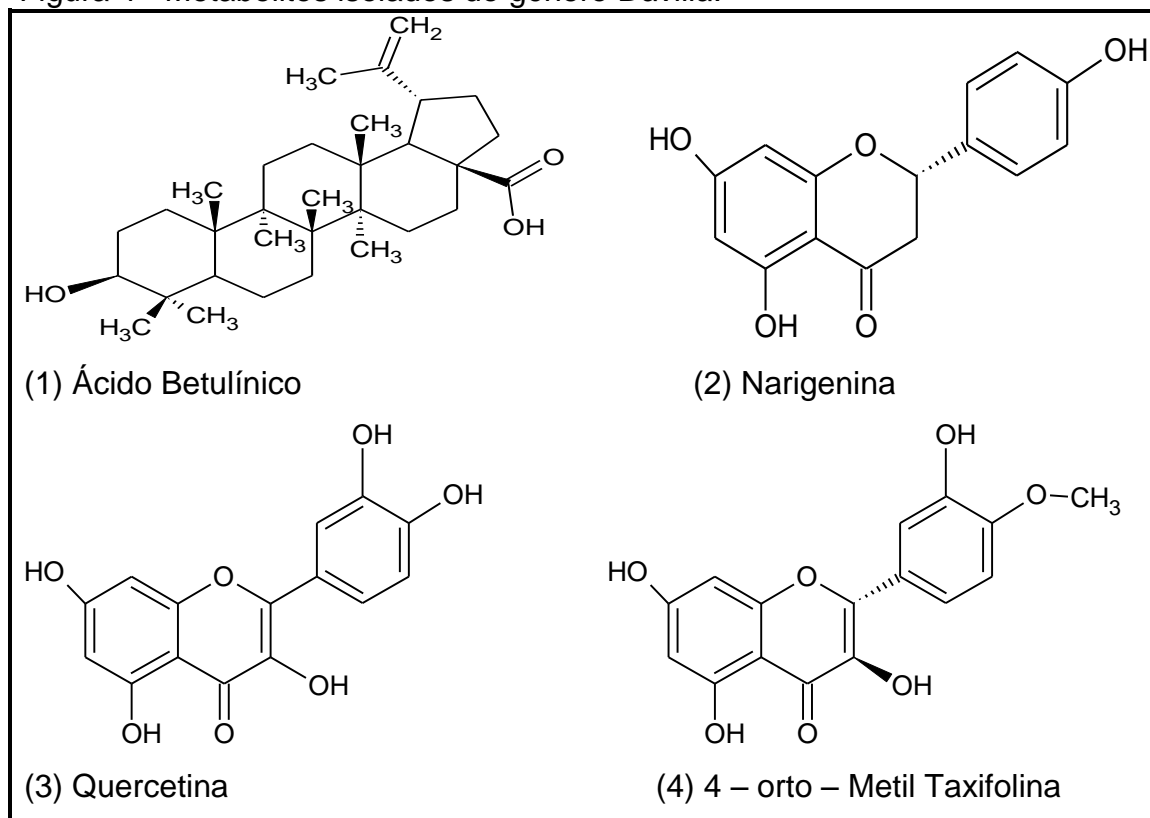


Acido 3β-hidroxilup-20(29)-en-28-oico isolado de *C. americana* L.

Fonte: EL-AZIZI et al., 1980; GURNI; KONIG; KUBITZKI, 1981; SOUZA et al., 1970; MOREIRA, 1997 apud FONSECA, 2008 e BARBOSA, 2011.

Figura 3 - Metabólitos isolados do gênero *Dillenia*.

Fonte: ESPINDOLA, 2000.

Figura 4 - Metabolitos isolados do gênero *Davilla*.

Fonte: DAVID, J. M. et al., 2005.

3.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO *Davilla*

Segundo Fraga (2010), é encontrado no Brasil cerca de trinta espécies do gênero, indicação feita pelo autor a partir de um levantamento realizado em diversos herbários no país para a confecção de uma Lista de Espécies da Flora do Brasil e da revisão taxonômica e filogenia de *Davilla*, sendo possível avaliar o número total de espécies de Dilleniaceae ocorrentes no país, descrevendo na mesma época uma nova espécie de *Davilla* para Rondônia, ampliando assim, a distribuição geográfica conhecida de *Neodillenia* para o território brasileiro (FRAGA, 2010).

A espécie *Davilla kunthii* A. St. -Hil, de origem brasileira, é conhecida popularmente como cipó-de-fogo, com ciclo de vida perene, hábito de crescimento liana, reprodução através de sementes, não tóxica, mas com caule cortante (injúria) (MELO; BARBOSA, 2007; MASCARENHAS, 1999), e até o presente não existem trabalhos envolvendo esta espécie quanto as suas propriedades farmacológicas e composição fitoquímica.

A espécie *Davilla elliptica* St. Hill., é uma planta arbustiva, frequentemente, encontrada no Cerrado, e conhecida, popularmente, como sambaibinha, lixeirinha, lixeira e lixinha (SILVA et al., 2001). Esta espécie apresenta uma elevada quantidade de Silício, indicação medicinal, sendo utilizada em banho para tratar de hematomas, as raízes para tratamento de hemorroidas, e ainda, possuindo efeito adstringente, tônico e laxativo sob forma de infusão, e o infuso das folhas é utilizado no combate a diarreia e úlcera gástricas (CARVALHO; RODRIGUES, 2004; SILVA et al., 2001).

Davilla nitida (Vahl) Kubitzki, conhecida popularmente como sambaibinha e lixeirinha de rama, é um arbusto trepador encontrado no Cerrado e pode atingir quatro metros de altura, indicação medicinal como gastroprotetor para úlceras (KUSHIMA, 2006).

Davilla rugosa Poir. et St. Hill (cipó – caboclo), espécie de origem brasileira, demonstrou que o extrato hidroalcoólico desta espécie apresenta atividade de proteção para o desenvolvimento de úlceras gástricas, inchaço dos membros, diurético e afrodisíaco (GUARALDO et al., 2000; KUSHIMA, 2006). Já existem trabalhos de isolamento e identificação de vários metabólitos secundários, flavonóides e terpenos dos extratos orgânicos do caule de *D. rugosa*, sendo isolado: ácido betulínico (1), narigenina (2) e de frações mais polares quercetina (3) e 4 – orto – metil taxifolina (4), Figura 4 (DAVID, J. M. et al., 2005).

3.3 TAXONOMIA VEGETAL

A taxonomia de *Davilla kunthii* A. St. -Hil obedece ao sistema de classificação proposto por FRAGA, C. N.; STEHMANN (2010), Tabela 2.

Tabela 2 – Classificação botânica de *Davilla kunthii* A. St. -Hil

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Dilleniidae
Ordem	Dilleniales
Subordem	Dillenianae
Família	Dilleniaceae
Subfamília	Tetraceroideae
Tribo	Dilleniaceae
Gênero	<i>Davilla</i>
Serie	<i>kunthii</i>
Espécie	<i>Davilla kunthii</i> St. Hill.

3.4 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE *Davilla kunthii* A. St. -Hil

Segundo Melo e Barbosa (2007), a espécie *Davilla kunthii* A. St. –Hil, Figuras 5, 6 e 7, é um arbusto com folhas simples, alternas e coriáceas. Inflorescência branco-esverdeada, fruto amarelo-alaranjado quando maduro, com sementes envoltas por uma película branca (arilo) adocicada, muito parecida com a do caimbé. Sua dispersão é zoocórica podendo, entretanto, possuir uma parcela de autocoria, e ambientes em que geralmente se encontra esta espécie são os de savana. O lançamento de novas gemas laterais e apicais forma extensões abrasivas do caule, podendo causar queimaduras e cortes na pele quando em contato, daí o nome de cipó-de-fogo, e embora não seja um cipó verdadeiro, adota uma estratégia muito semelhante ao se aproveitar da escora, Figura 6, de indivíduos de espécies maiores (MELO; BARBOSA, 2007).

Figura 5 - Folhas e Fruto de *Davilla kunthii*.



Fonte: o Autor.

Figura 6 - Caule de *Davilla kunthii*.



Fonte: o Autor.

Figura 7 - Exsicata de *Davilla kunthii* A. St. -Hil.



Fonte: o Autor.

3.5 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE *Davilla kunthii*.

Sendo encontrada na América Central entre México e Guatemala. Na América do Sul, pode ser encontrada em Mato Grosso, Bahia e Roraima, Figura 9, (INTERBIOTA, 2013).

Figura 8 - Mapa de distribuição da espécie *Davilla kunthii*

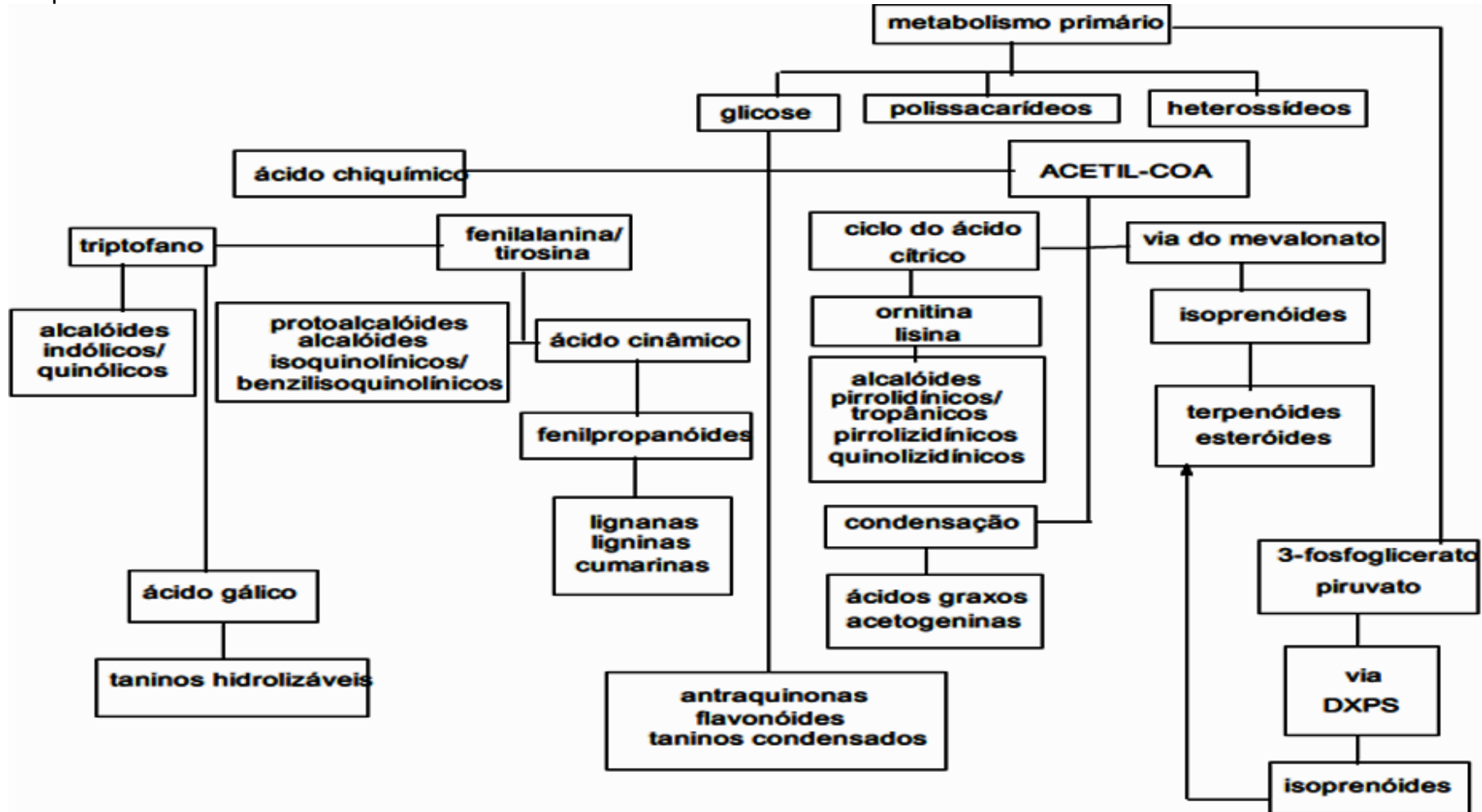


Fonte: [http://interbiota.org/portal/taxa/googlemap.php/taxon=Davilla kunthii](http://interbiota.org/portal/taxa/googlemap.php/taxon=Davilla%20kunthii) (2013).

3.6 BREVE RELATO SOBRE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas medicinais proporcionam uma grande diversidade em constituintes químicos secundários, segundo Soares et al. (2005), apresentam uma grande diversidade de substâncias como: Flavonóides, Saponinas, Esteróides, Taninos, Cumarinas e Triterpenóides, Esquema 1, (ROCHA, 2006).

Esquema 1 - Vias do metabolismo secundário.



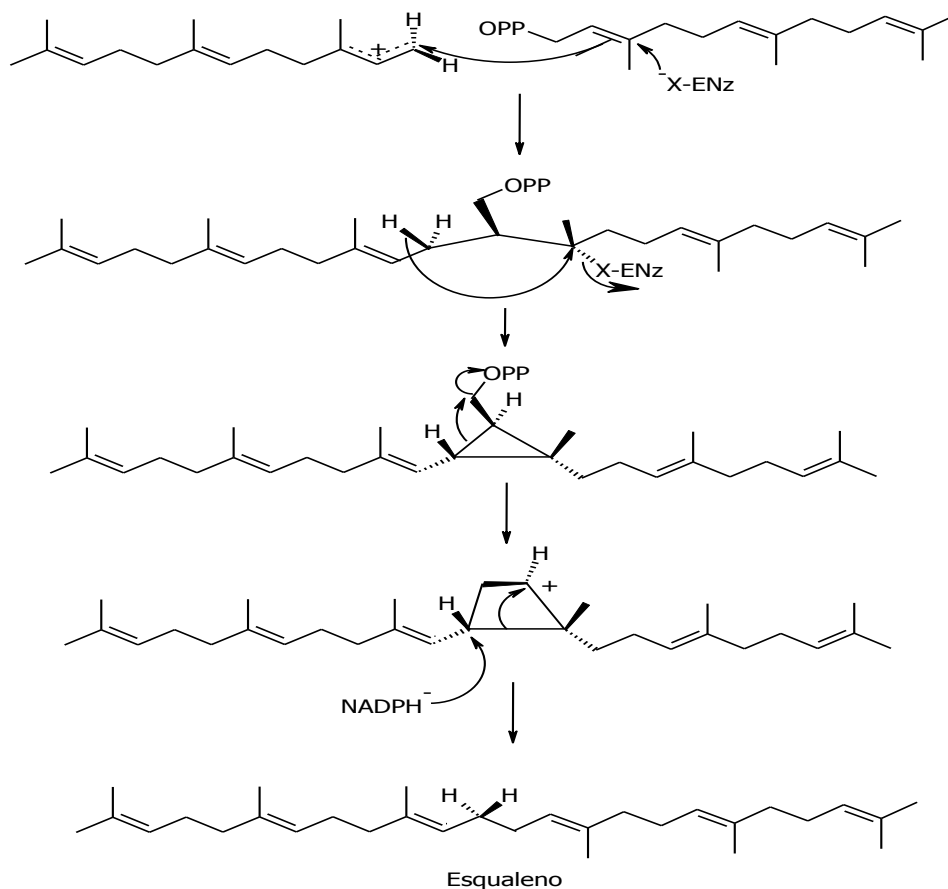
Fonte: ROCHA, 2006.

3.6.1 Biossíntese de Esteróides e Triterpenos

Monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides e sesterpenóides são formados por condensação de um pirofosfato de dimetilalilo ou geranilo ou farnesilo, com o pirofosfato de isopentenilo numa condensação cabeça-cauda e por mecanismo muito idêntico entre si, a biossíntese dos esteróides e triterpenos, no entanto, segue uma via diferente (NIERO; MALHEIROS, 2007).

A biossíntese destes compostos começa com a condensação cauda-cauda de duas unidades de farnesilo para dar origem a outro composto o esqualeno, o nome deste novo composto resulta do fato de ter sido encontrado no óleo de fígado de tubarão, onde é muito abundante. A formação do esqualeno não segue um mecanismo simples, Figura 10, mas sim através de um mecanismo complexo com vários intermediários cíclicos e migrações de ligações ou de grupos alquilo (ARAÚJO, 2012; ROCHA, 2006).

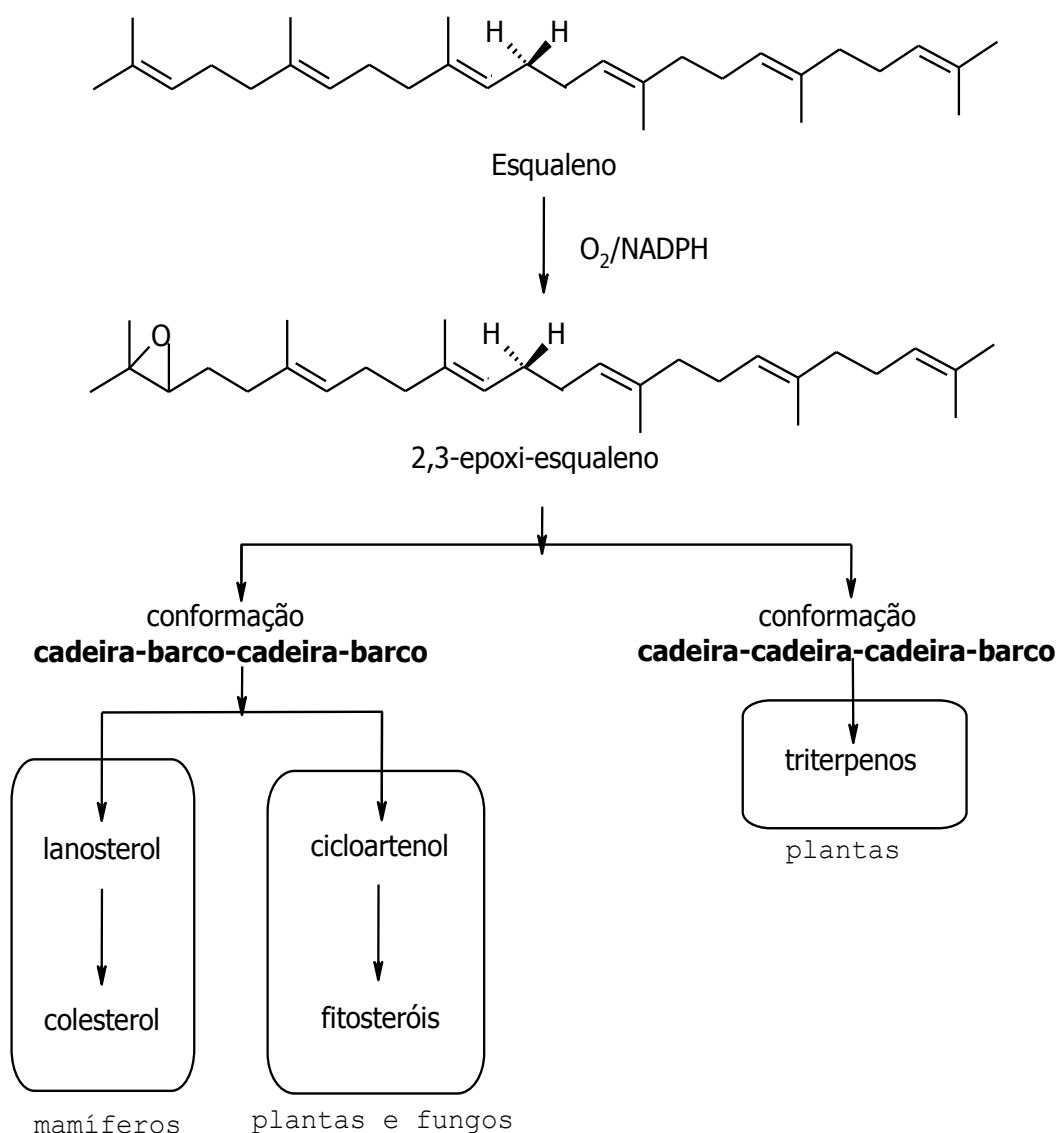
Figura 9 - Biossíntese do esqualeno.



Fonte: ARAÚJO, 2012.

A biossíntese dos esteróides e triterpenos utiliza como precursor não o esqualeno, mas um seu derivado que resulta da epoxidação nas posições 2 e 3. Este composto, o 2,3 óxido de esqualeno (2,3 epoxi-esqualeno) pode tomar várias conformações. Se tomar uma disposição tal que sugira uma conformação “cadeira-barco-cadeira-barco” vai ser o substrato de enzimas específicos, ciclases, que o transformam no lanosterol, no caso dos animais ou no cicloartenol, no caso das plantas, Figura 11, (AKIHISA et al., 2007; ROCHA, 2006).

Figura 10 - Formação de esteróides e triterpenos a partir do esqualeno



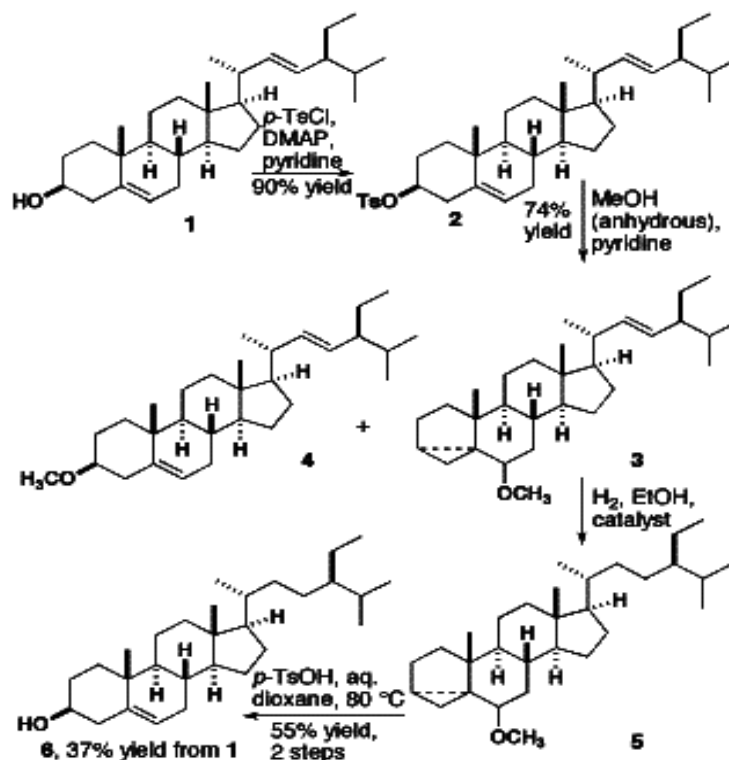
Fonte: ARAÚJO, 2012.

As enzimas ciclases que estão envolvidas na biossíntese dos triterpenos utilizam, igualmente, o 2, 3 óxido de esqualeno como substrato. Mas, neste caso é preciso que este metabolito tome uma disposição que se assemelhe a uma conformação cadeira-cadeira-cadeira-barco (Figura 12) (ARAÚJO, 2012).

Os Triterpenos são uma classe de metabólitos secundários produzidos apenas pelas plantas, são igualmente provenientes do óxido de esqualeno, mas ao contrário dos esteróis não há degradação da cadeia carbonada e, portanto apresentam um esqueleto com 30 átomos de carbono (NIERO; MALHEIROS, 2007; CARREIRA, 2007).

Na biossíntese destes compostos o óxido de esqualeno toma uma conformação diferente, tipo cadeira-cadeira-cadeira-barco, na Figura 12 está representada esquematicamente a biossíntese da β – Sitosterol, um dos Esteróides mais comuns (AKIHISA et al., 2007).

Figura 11 - Biossíntese do β – Sitosterol.



Fonte: ROCHA, 2006.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 ESPECIFICAÇÃO DE MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS

Para a preparação dos extratos Hexânico e Etanólico, foi utilizado um frasco Mariotte, seguido de evaporação do solvente sob pressão reduzida em rotaevaporador.

As separações por cromatografia líquida em coluna clássica (CL) foram efetuadas usando-se sílica gel 60 da Vetec (70 – 230 mesh), como fase estacionária.

Para as cromatografias em camada delgada fase normal (CCD) foram utilizadas sílica gel 60 G da Vetec, em suporte de vidro, ativadas entre 100 a 120 °C por 30 minutos.

As revelações cromatográficas foram feitas com revelador de vanilina, solução de vanilina ativada entre 100 à 120° C, luz ultravioleta em comprimento de onda de $\lambda = 254$ nm e 365 nm. Sendo que a solução reveladora vanilina sulfúrica foi preparada pela mistura de uma solução 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: Cinética, Vetec, Nuclear e Reagente Analítico, apresentando grau de pureza analítico e foram destilados e redestilados.

Os critérios de pureza adotados foram:

- observação de uma mancha única por cromatografia em camada delgada (CCD), variando-se o sistema de eluentes;
- observações 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 (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C) foram realizadas em espectrômetro Bruker operado a 400 MHz para ^1H e 100 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 , $\text{DMSO } d_6$ e Piridina d_5 como solventes.

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

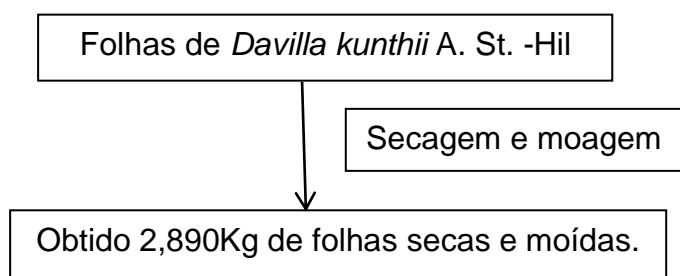
Os pontos de fusão das amostras foram determinados em aparelho digital para ponto de fusão, marca Microquímica, modelo MQAPF – 302 com bloco de alumínio com temperatura que varia de 0 – 350°C, da Universidade Federal de Roraima. Os valores obtidos foram comparados aos da literatura.

4.2 ISOLAMENTO DOS CONSTITUENTES QUÍMICOS DE *Davilla kunthii* A. St. -Hil

4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal.

O material botânico de *Davilla kunthii* A. St. -Hil, selecionado para o estudo fitoquímico foi coletado no campus Cauamé, pertencente, ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Roraima (CCA/UFRR), localizado no município de Boa Vista, Roraima em Maio de 2012. A identificação botânica foi feita pela Prof.^a Dr.^a Andréia Silva Flores, pesquisadora da Fundação Estadual do Meio Ambiente, Ciência e Tecnologia (FEMACT), com exsicata depositada no Herbário do Museu Integrado de Roraima (MIRR) sob o nº 10273 e registro para coleta de material botânico no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) nº 41621-1, Apêndice A.

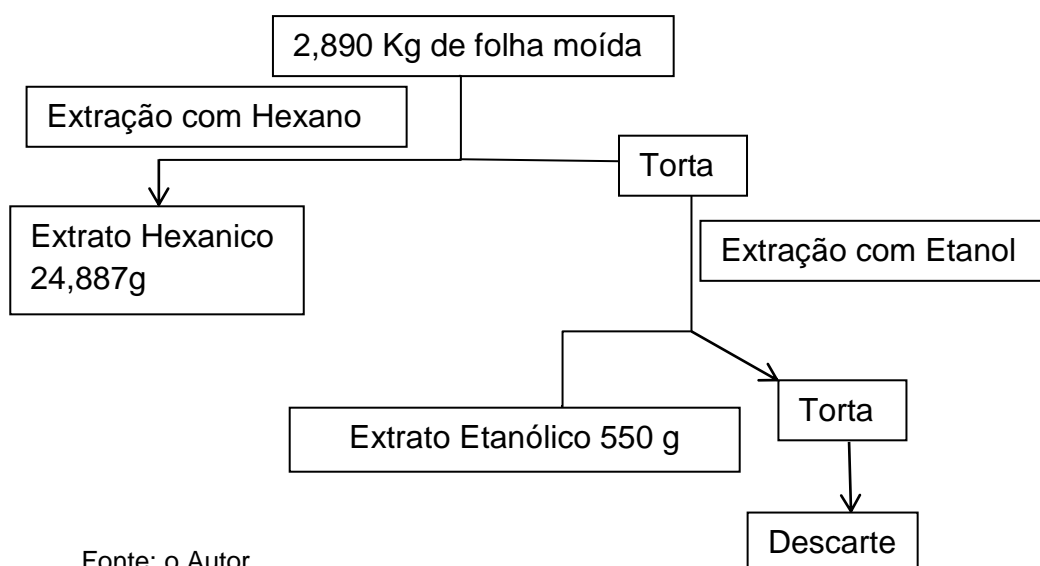
A parte coletada (folhas) foi seca a temperatura ambiente e pulverizada em liquidificador doméstico nas dependências do Núcleo de Pesquisa e Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia (NPPGCT), Laboratório de Produtos Naturais, Esquema 2.

Esquema 2 - Tratamento das folhas de *Davilla kunthii* A. St.-Hil

Fonte: o Autor.

4.2.2 Preparação dos Extratos das folhas de *Davilla kunthii* A. St. -Hil

As folhas de *Davilla kunthii* (2,890 kg), após secagem a temperatura ambiente foram moídas e extraídas, exaustivamente, com hexano a frio e com etanol, sob as mesmas condições a 25°C, com auxílio de um frasco Mariotte. Posteriormente, os extratos obtidos foram filtrados, e a pressão reduzida em rotaevaporador foram concentrados, fornecendo 24,887 g de extrato Hexânico e 550 g de extrato etanólico, Esquema 3.

Esquema 3 - Preparação de extratos das folhas de *Davilla kunthii* A. St.-Hil.

Fonte: o Autor.

4.2.3 Coluna filtrante do extrato etanólico das folhas de *Davilla kunthii*

Parte do extrato etanólico (306 g) foi adsorvido a 286 g de sílica gel, sendo pulverizado em gral de porcelana. Mistura foi acondicionada em funil cilíndrico de separação de 2000 mL, Figura 13, sobre uma camada de 400 g de sílica gel. A eluição com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol puro forneceram os resultados detalhados na Tabela 3.

Figura 12 – Coluna filtrante do Extrato Etanólico de *Davilla kunthii*

Fonte: o Autor.

Tabela 3 - Coluna filtrante do extrato etanólico de *Davilla kunthii*

Eluente	Massa	Porcentagem
Hexano 100%	0,252 g	0,157 %
Clorofórmio 100%	24,858 g	15,542 %
Acetato de Etila 100%	39,176 g	24,494 %
Metanol 100%	95,650 g	59,804 %
Total	159,936 g	99,999 %

Fonte: o Autor.

4.2.4 Fracionamento cromatográfico do eluato clorofórmico das folhas de *Davilla kunthii* A. St. –Hil

O eluato clorofórmico (24,858 g) foi submetido ao fracionamento cromatográfico (Figura 14, pág. 43) em coluna de sílica gel 60 G (70 – 230 mesh). Eluição com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, intercalados com as respectivas misturas binárias de modo a serem obtidas polaridades crescentes, fornecendo os resultados relatados na Tabela 4.

Foram coletadas 321 frações, as quais, após comparação em cromatografia em camada delgada, CCD foram reunidas em 29 grupos conforme Tabela 5. Desses, foram estudados os grupos 2, 5, 7, 8 e 13 por apresentarem maiores quantidades de massas e menor grau de complexidade.

Os demais grupos, quando analisados por CCD revelaram-se como misturas bastante complexas e, ou pouca massa, não foram estudados.

A Figura 14 apresenta uma foto de uma coluna cromatográfica clássica com eluato clorofórmico de *Davilla kunthii* A. St. –Hil.

Figura 13 – Coluna Cromatográfica clássica de *Davilla kunthii*



Fonte: o Autor.

Tabela 4 - Fracionamento cromatográfico do eluato clorofórmico de *Davilla kunthii*.

Eluente	Frações
Hexano 100%	-----
Hexano + Clorofórmio 10%	1
Hexano + Clorofórmio 20%	2 – 5
Hexano + Clorofórmio 30%	6 – 8
Hexano + Clorofórmio 40%	9 – 15
Hexano + Clorofórmio 50%	16 – 37
Hexano + Clorofórmio 60%	38 – 44
Hexano + Clorofórmio 70%	45 – 54
Hexano + Clorofórmio 80%	55 – 58
Hexano + Clorofórmio 90%	59 – 63
Clorofórmio 100%	64 – 104
Clorofórmio + Ac. Etila 10%	105 – 142
Clorofórmio + Ac. Etila 20%	143 – 172
Clorofórmio + Ac. Etila 30%	173 – 191
Clorofórmio + Ac. Etila 40%	192 – 213
Clorofórmio + Ac. Etila 50%	214 – 229
Clorofórmio + Ac. Etila 60%	230 – 261
Clorofórmio + Ac. Etila 70%	262 – 277
Clorofórmio + Ac. Etila 80%	278 – 295
Clorofórmio + Ac. Etila 90%	296 – 305
Ac. Etila 100%	306 – 312
Metanol 100%	313 – 321

Fonte: o Autor.

Tabela 5 - Grupos originados do fracionamento cromatográfico do eluato clorofórmio das folhas de *Davilla kunthii*.

Grupos	Frações	Massa (g)
01	1	0,2984g
02	8 e 9	0,6941g
03	10 – 15	0,3171g
04	16 – 24	0,2468g
05	25 – 26	0,0919g
06	27	0,1950g
07	28 – 37	0,3877g
08	38 – 49	0,7904g
09	50 – 71	0,7888g
10	72 – 82	0,4234g
11	83 – 93	0,2214g
12	94 – 105	0,0860g
13	106 – 119	1,2700g
14	120 – 143	0,5628g
15	144 – 146	0,3912g
16	147 – 156	0,8974g
17	157 – 169	0,6460g
18	170 – 182	1,0018g
19	183 – 195	1,1342g
20	196 – 209	0,6560g
21	210 – 223	0,8315g
22	224 – 231	0,3365g
23	232 – 237	0,3456g
24	238 – 251	0,6342g
25	252 – 265	0,5627g
26	266 – 279	0,7710g
27	280 – 293	1,0119g
28	294 – 309	0,6280g
29	310 – 321	1,2045g
		Total: 17,4263g

Fonte: o Autor.

4.2.4.1 Grupos 01 e 02

Os grupos 01 e 02 com aspecto de graxa esbranquiçada foram submetidos à esterificação e saponificação, conforme técnica descrita a seguir:

Dissolveu-se, em tubo criogênico de capacidade de 2 mL, ~10 mg do óleo em 100 µL de uma solução de etanol (95%)/ hidróxido de potássio 1 mol/L (5%). Após agitação em vórtex por 10 s, o óleo foi hidrolisado em um forno de microondas doméstico (Panasonic Piccolo), à potência de 80 W (Potencia 2), durante 5 min. Após resfriamento, adicionou-se 400 µL de ácido clorídrico a 20%, uma ponta de espátula de NaCl (~20 mg) e 600 µL de Acetato de Etila.

Após agitação em vórtex por 10 s e repouso por 5 min, uma alíquota de 300 μL da camada orgânica foi retirada, colocada em tubos de microcentrífuga e seco por evaporação, obtendo-se assim os ácidos graxos livres. (adaptado de W. W. Christie, *Gas Chromatography and Lipids*, 1989, Pergamon Press) (FERRAZ, 2012).

Os ácidos graxos livres foram metilados com 100 μL BF_3 /metanol (14%) e aquecidas durante 10 min em banho de água a 60 °C. Foram em seguida, diluídos com 400 μL de metanol e analisados por Cromatografia Gasosa.

A mistura (DKF-2) foi isolada como graxa esbranquiçada devido à presença de impurezas. Este grupo foi submetido à saponificação e esterificação, fornecendo os ésteres metílicos, os quais foram analisados por Cromatografia Gasosa. Utilizou-se uma coluna INNOWAX (HP) 15 m x 0,25 mm x 0,20 μm com gradiente de temperatura: 100 °C, 0 min, 7°C/min até 220 °C, injetor (Split de 1/30) a 250 °C e detector a 260 °C. Hidrogênio como gás de arraste (2 mL/min) e volume de injeção de 1 μL (FERRAZ, 2012).

4.2.4.2 Grupo 05

Do grupo 05 foi isolada uma substância denominada **DKF – 3**, o qual foi recristalizada fornecendo um sólido branco com massa de 0,0398 g, que por análise de RMN ^1H e RMN ^{13}C constatou-se ser o Triacontan-1-ol (Álcool Melissílico).

4.2.4.3 Grupo 07/08

Após análise em CCD, os grupos 07 e 08 foram reunidos obtendo uma massa 1,1781 g, com aparência de um sólido amarelo escuro. Foram recromatografados em coluna de sílica gel 60G, fornecendo 74 frações. Utilizaram-se como eluentes os solventes Hexano, acetato de etila, clorofórmio e metanol puros ou em misturas com polaridades crescentes Tabela 6.

Tabela 6 - Fracionamento cromatográfico dos grupos 07 e 08

Eluente	Frações
Hexano 100%	-----
Hexano + Clorofórmio 10%	1 – 2
Hexano + Clorofórmio 20%	3 – 26
Hexano + Clorofórmio 30%	27 – 36
Hexano + Clorofórmio 40%	37 – 38
Hexano + Clorofórmio 50%	39 – 40
Hexano + Clorofórmio 60%	41 – 46
Hexano + Clorofórmio 70%	47 – 49
Hexano + Clorofórmio 80%	50 – 53
Hexano + Clorofórmio 90%	54 – 56
Clorofórmio 100%	58 – 60
Clorofórmio + Ac. Etila 10%	61 – 63
Clorofórmio + Ac. Etila 20%	64 – 65
Clorofórmio + Ac. Etila 30%	66
Clorofórmio + Ac. Etila 40%	67
Clorofórmio + Ac. Etila 50%	68
Clorofórmio + Ac. Etila 60%	69
Clorofórmio + Ac. Etila 70%	70
Clorofórmio + Ac. Etila 80%	71
Clorofórmio + Ac. Etila 90%	72
Ac. Etila 100%	73
Metanol 100%	74

Fonte: o Autor.

Após análise por CCD as frações foram reunidas em 16 subgrupos, Tabela 7.

Tabela 7 - Subgrupos originados da cromatografia dos grupos 7 e 8

Subgrupos	Frações	Massa (g)
01	1 – 5	0,0165
02	6	0,0396
03	7 – 9	0,0121
04	10 – 14	0,2506
05	15 – 17	0,0496
06	18 – 21	0,2396
07	22	0,0217
08	28 – 33	0,0091
09	34 – 36	0,0155
10	37 – 38	0,0111
11	39 – 40	0,0066
12	41 – 50	0,0135
13	51 – 58	0,0507
14	59	0,1646
15	60 – 67	0,1179
16	68 – 74	0,0883
		Total = 1,107 g

Fonte: o Autor.

Após analisadas as amostras por CCD, a fração 22 apresentou um sólido branco puro. Análises dos espectros permitiram concluir tratar-se de uma mistura de β – Sitosterol e Estigmasterol denominada **DKF-4**. Os demais Subgrupos não foram estudados.

4.2.4.4 Grupo 13

O grupo 13 de massa 1,2700 g com aparência de um sólido esverdeado escuro foi recromatografado em coluna de sílica gel 60G, e foram obtidas 55 frações, Tabela 8. Utilizaram-se como eluentes os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade.

Tabela 8 - Fracionamento cromatográfico do Grupo 13.

Eluente	Frações
Hexano + Clorofórmio 80%	1
Hexano + Clorofórmio 90%	2 – 4
Clorofórmio 100%	5 – 8
Clorofórmio + Ac. Etila 5%	9 – 36
Clorofórmio + Ac. Etila 10%	37 – 39
Clorofórmio + Ac. Etila 20%	40 – 42
Clorofórmio + Ac. Etila 30%	43 – 45
Clorofórmio + Ac. Etila 40%	46 – 48
Clorofórmio + Ac. Etila 50%	49
Clorofórmio + Ac. Etila 60%	50
Clorofórmio + Ac. Etila 70%	51
Clorofórmio + Ac. Etila 80%	52
Clorofórmio + Ac. Etila 90%	53
Ac. Etila 100%	54
Metanol 100%	55

Fonte: o Autor.

Após comparação em CCD foram reunidas frações iguais em 14 subgrupos, conforme a Tabela 9.

Tabela 9 – Subgrupos originados da cromatografia do Grupo 13.

Subgrupos	Frações	Massa (g)
01	1 – 2	0,0103
02	3 – 4	0,0031
03	5 – 6	0,0096
04	7 – 8	0,0063
05	9 – 12	0,0294
06	13 – 19	0,0852
07	20 – 25	0,0416
08	26	0,0714
09	27 – 34	0,4590
10	35 – 36	0,0228
11	37 – 39	0,0920
12	40 – 46	0,2015
13	47 – 51	0,0439
14	52 – 55	0,0392
		Total = 1,1153 g

Fonte: o Autor.

Após analisados por CCD as frações 27–34 foram recromatografadas, conforme a Tabela 10. As demais, não foi possível purificá-las por serem muito impuras.

a) Frações 27–34

As frações 27–34 de massa 0,459 g, com aparência de um sólido branco amarelado foi recromatografado em coluna de sílica gel 60G, fornecendo 85 frações tabela 10.

Tabela 10 – Fracionamento cromatográfico das frações 27-34, proveniente do Grupo 13.

Eluente	Frações
Hexano + Clorofórmio 90%	1
Hexano + Clorofórmio 95%	2 – 12
Clorofórmio 100%	13 – 44
Clorofórmio + Ac. Etila 5%	45 – 46
Clorofórmio + Ac. Etila 10%	47 – 49
Clorofórmio + Ac. Etila 20%	50 – 60
Clorofórmio + Ac. Etila 30%	61 – 64
Clorofórmio + Ac. Etila 40%	65 – 69
Clorofórmio + Ac. Etila 50%	70 – 72
Clorofórmio + Ac. Etila 60%	73 – 75
Clorofórmio + Ac. Etila 70%	76 – 77
Clorofórmio + Ac. Etila 80%	78 – 80
Clorofórmio + Ac. Etila 90%	81 – 82
Acetato de Etila 100%	83
Metanol 100%	84 – 85

Fonte: o Autor.

Após comparação em CCD foram reunidas frações iguais em 9 subgrupos, conforme Tabela 11.

Tabela 11 – Subgrupos originados da cromatografia das frações 27-34

Subgrupos	Frações	Massa (g)
01	1 – 9	0,0145
02	10 – 13	0,0116
03	14 – 20	0,1572
04	21 – 32	0,2567
05	33 – 44	0,0209
06	45 – 48	0,0298
07	49 – 60	0,0279
08	61 – 79	0,0457
09	80 – 85	0,0120

Total = 0,5763 g

Fonte: o Autor.

b) Frações 21-32

As frações 21-32 de massa 0,2567 g com aparência de um sólido branco gelo foi recromatografado em coluna de sílica gel 60 G, fornecendo 36 frações, conforme Tabela 12.

Tabela 12 – Fracionamento cromatográfico das frações 21-32.

Eluente	Frações
Hexano + Clorofórmio 70%	1 – 13
Hexano + Clorofórmio 80%	14 – 16
Hexano + Clorofórmio 90%	17 – 19
Clorofórmio 100%	20 – 22
Clorofórmio + Ac. Etila 10%	23 – 24
Clorofórmio + Ac. Etila 20%	25
Clorofórmio + Ac. Etila 30%	26
Clorofórmio + Ac. Etila 40%	27 – 28
Clorofórmio + Ac. Etila 50%	29
Clorofórmio + Ac. Etila 60%	30
Clorofórmio + Ac. Etila 70%	31
Clorofórmio + Ac. Etila 80%	32
Clorofórmio + Ac. Etila 90%	33
Acetato de Etila 100%	34
Metanol 100%	35 – 36

Fonte: o Autor.

Após comparação em CCD foram reunidas frações iguais em 7 subgrupos conforme, Tabela 13.

Tabela 13 – Subgrupos originados da cromatografia das frações 27-34.

Subgrupos	Frações	Massa (g)
01	1 – 3	0,0075
02	4	0,1040
03	5 – 12	0,0009
04	13 – 14	0,0057
05	15 – 25	0,0178
06	26 – 34	0,0096
07	35 – 36	0,0110
		Total = 0,1565 g

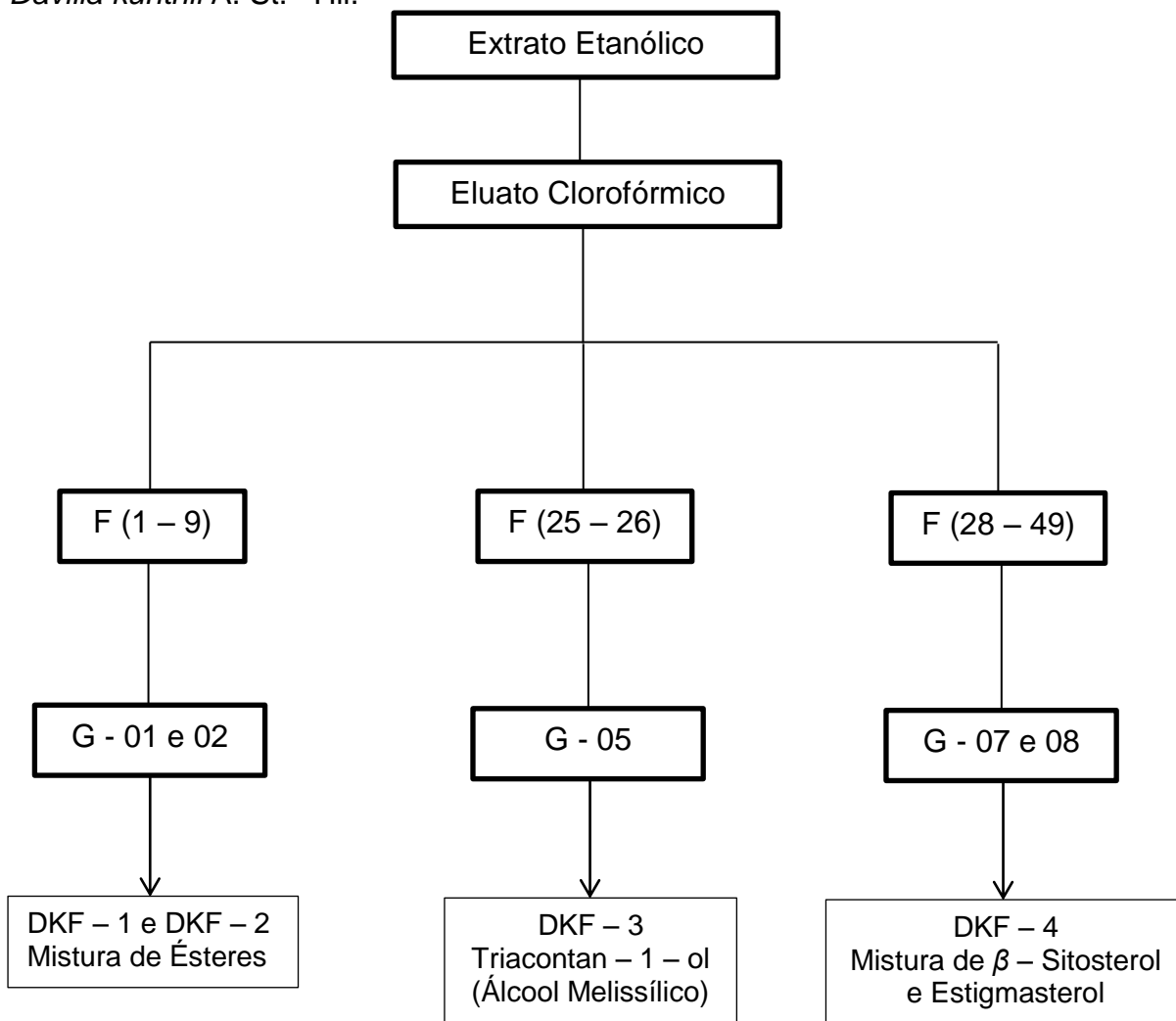
Fonte: o Autor.

Os subgrupos 02 e 03 da Tabela 13, com aparência de um sólido branco amorfo foram enviados para análise espectroscópica, mas ainda não foi possível identifica-los. Os demais subgrupos não tiveram seu estudo continuado por apresentarem-se complexos.

4.2.5 Resumo do estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Davilla kunthii* A. St. –Hil.

O Esquema 4, sumariza a elaboração fitoquímica e os fitoconstituintes isolados do extrato etanólico das folhas de *Davilla kunthii* A. St. –Hil.

Esquema 4 - Fracionamento e substâncias isoladas do eluato clorofórmico de *Davilla kunthii* A. St. –Hil.



Fonte: o Autor.

4.3 DADOS FÍSICO-QUÍMICOS DE SUBSTÂNCIAS E MISTURAS ISOLADAS

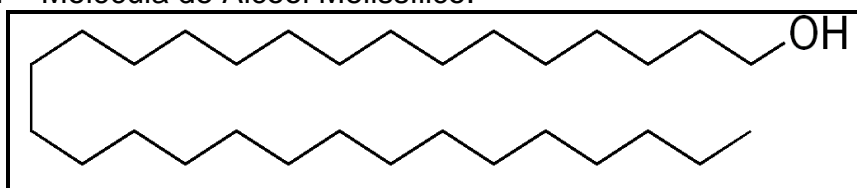
4.3.1 DKF-2 (Mistura de Ésteres)

Aspecto: Graxa esbranquiçada.

4.3.2 DKF – 3 Triacontan-1-ol (Álcool Melissílico)

A Figura 15 apresenta o Triacontan-1-ol.

Figura 14 – Molécula de Álcool Melissílico.



Formula molecular: $C_{30}H_{62}O$;

Aparência: sólido branco amorfo;

Solubilidade: Clorofórmio;

Massa molar: 438,81;

Faixa de fusão = 81,3 – 82,9 °C.

Faixa de fusão = 86,0 – 87,0 °C (ALDRICH, 2014).

IV (KBr, cm^{-1}): 3302; 2916; 2850; 1474; 1464; 1124; 1062; 730; 720.

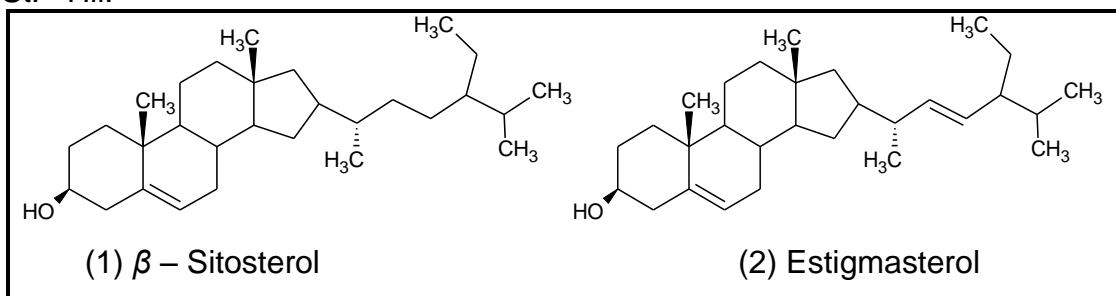
RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0,86; 0,87; 0,89; 1,25; 1,50; 1,52; 1,54; 2,57; 3,52; 3,54; 3,56; 7,30; 7,63; 7,69; 8,59.

RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 13,4; 21,9; 25,2; 28,5; 28,8; 28,9; 31,1; 32,2; 38,8; 39,0; 39,2; 39,4; 39,6; 39,8; 40,0; 61,3; 76,9; 77,2; 77,5; 122,3; 122,6; 122,8; 134,6; 134,8; 135,1; 148,3; 148,6; 148,9.

4.3.3 DKF – 4 (Mistura de β – Sitosterol e Estigmasterol)

A mistura de (1) β – Sitosterol e (2) Estigmasterol de *Davilla kunthii* A. St. –Hil, esta apresentada na Figura 16.

Figura 15 – Mistura de (1) β – Sitosterol e (2) Estigmasterol de *Davilla kunthii* A. St. –Hil.



Aparência: sólido branco em forma de cristais finos;

Solubilidade: Clorofórmio;

Massa molar: 414,71;

Faixa de fusão da Mistura = 128,5 – 130,3 °C;

Faixa de fusão da Mistura = 130,0 – 132,0 °C (PAULA et al., 1998).

a) β – Sitosterol

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 37,2 (C – 1); 31,6 (C – 2); 71,8 (C – 3); 42,2 (C – 4); 140,7 (C – 5); 121,7 (C – 6); 31,9 (C – 7); 31,8 (C – 8); 50,1 (C – 9); 36,5 (C – 10); 21,1 (C – 11); 39,8 (C – 12); 42,3 (C – 13); 56,7 (C – 14); 24,3 (C – 15); 28,2 (C – 16); 56,0 (C – 17); 11,9 (C – 18); 19,4 (C – 19); 36,1 (C – 20); 18,7 (C – 21); 33,9 (C – 22); 26,1 (C – 23); 45,8 (C – 24); 29,1 (C – 25); 19,8 (C – 26); 19,0 (C – 27); 23,0 (C – 28); 11,8 (C – 29).

b) Estigmasterol

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 37,2 (C – 1); 31,9 (C – 2); 71,8 (C – 3); 42,3 (C – 4); 140,7 (C – 5); 121,7 (C – 6); 33,9 (C – 7); 33,9 (C – 8); 50,1 (C – 9); 36,5 (C – 10); 21,1 (C – 11); 39,8 (C – 12); 42,3 (C – 13); 56,7 (C – 14); 24,3 (C – 15); 28,2 (C – 16); 56,0 (C – 17); 12,0 (C – 18); 19,4 (C – 19); 39,8 (C – 20); 19,8 (C – 21); 138,3 (C – 22); 129,3 (C – 23); 50,1 (C – 24); 31,9 (C – 25); 21,1 (C – 26); 19,8 (C – 27); 26,1 (C – 28); 11,9 (C – 29).

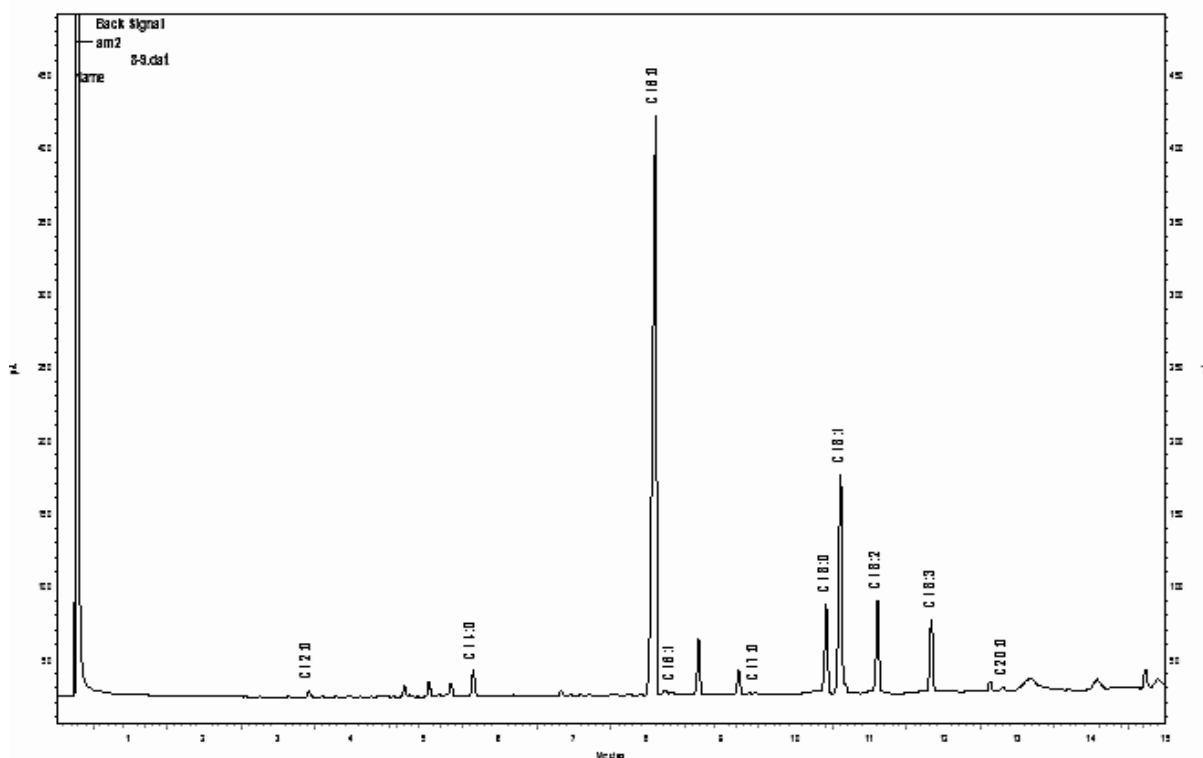
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 DETERMINAÇÕES ESTRUTURAIS DE SUBSTÂNCIA E MISTURAS ISOLADAS

5.1.1 Misturas de ésteres (DKF - 2)

As comparações dos tempos de retenção de padrões ésteres metílicos, Figura 17, indicaram ser uma mistura constituída, principalmente, de ésteres citados nas Tabelas 14 e 15, conforme laudo de análise da Dr^a. Vany Ferraz, do Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG.

Figura 16-Cromatograma dos ésteres metílicos de *Davilla kunthii*



Fonte: o Autor.

Neste trabalho foi realizada a quantificação dos ácidos graxos por Cromatografia Gasosa dos ésteres metílicos de *Davilla kunthii*, como mostrado acima, foi obtido o perfil dos ácidos graxos saturados e insaturados presentes na espécie.

Tabela 14 - Tempos de retenção por CG de ésteres metílicos

C	Nome	Fórmula	RT (min)	DKF-2 (Área)
C8:0	Ác.Caprílato	C ₈ H ₁₆ O ₂	0.85	
C10:0	Ác.Caprato	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1.76	
C12:0	Ác.Araquídico	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	3.42	73515
C14:0	Ác.Mirístico	C ₁₄ H ₂₇ O ₂	5.63	380411
C16:0	Ác.Palmítico	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	8.10	10846862
C16:1	Ác.Palmitoléico	C ₁₆ H ₂₉ O ₂	8.32	72605
C17:0	Ác.Margárico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	9.38	359861
C18:0	Ác.Esteárico	C ₁₈ H ₃₅ O ₂	10.49	1468141
C18:1	Ác.Oleico(CΩ9)	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	10.73	3578619
C18:2	Ác.Linoléico(CΩ6)	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	11.16	1485466
C18:3	Ác.Linolênico(CΩ3)	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	11.84	1139989
C20:0	Ác.Eicosanoico	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	12.81	162400
Áreas				
Identificadas				19567869
Área total				22597727

Fonte: o Autor.

Tabela 15 - Normalização da Área

C	Normalização de Área (%)		
	Nome	RT (min)	DKF - 2
C8:0	Ác.Caprílato	0.85	
C10:0	Ác.Caprato	1.76	
C12:0	Ác.Araquídico	3.42	
C14:0	Ác.Mirístico	5.63	1.68
C16:0	Ác.Palmítico	8.10	48.00
C16:1	Ác.Palmitoléico	8.32	0.32
C17:0	Ác.Margárico	9.38	1.59
C18:0	Ác.Esteárico	10.49	6.50
C18:1	Ác.Oleico(CΩ9)	10.73	15.84
C18:2	Ác.Linoléico(CΩ6)	11.16	6.57
C18:3	Ác.Linolênico(CΩ3)	11.84	5.04
C20:0	Ác.Eicosanoico	12.81	0.72
%Identificadas			86.59
% Total			100.00

Fonte: o Autor.

Conforme análise da Tabela 15 mostrou-se uma composição em média de 58,49% para ácidos graxos saturados e 27,77% para os insaturados, portanto, os ácidos graxos saturados encontram-se em maior quantidade.

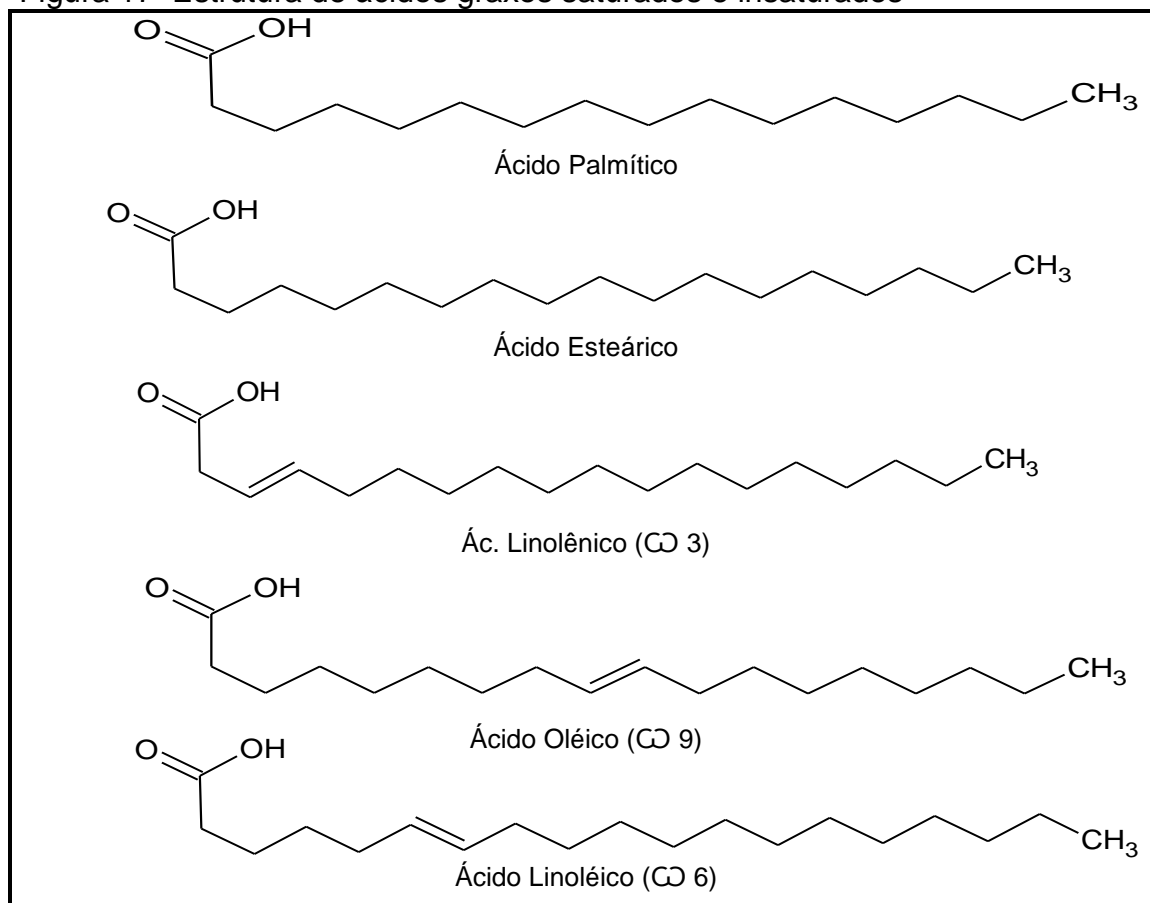
5.1.1.1 Ácidos Graxos

São ácidos monocarboxílicos, geralmente, com uma cadeia carbônica longa, com número par de átomos de carbono e sem ramificações, podendo ser saturada ou conter uma insaturação (ácidos graxos monoinsaturados) ou duas ou mais insaturações (ácidos graxos poliinsaturados). O grupo carboxila constitui a região polar (hidrofílica), e a cadeia carbônica, a parte apolar (hidrofóbica) (SANTOS, 2008).

Embora, os ácidos graxos ocorram em quantidades muito grandes como os blocos construtivos componentes dos lipídios saponificáveis, eles ocorrem apenas em traços na forma livre (não esterificada) nas células e tecidos, todos possuem uma longa cadeia hidrocarbonada e um grupo carboxílico terminal (SILVA, 2011).

Assim, os insaturados possuem ligação dupla e os saturados ligações simples o que os determinam, como mostra a Figura 18.

Figura 17–Estrutura de ácidos graxos saturados e insaturados



Fonte: SILVA, 2011; FARIAS, 2013.

A cadeia hidrocarbonada pode ser saturada, como no ácido palmítico, ou pode possuir uma ou mais duplas ligações, como no ácido Oléico e que em alguns ácidos graxos contêm tripla ligação (LEHNINGER, 1976). Os ácidos graxos diferem um do outro, primariamente, no comprimento da cadeia e no número e posição de suas ligações insaturadas. Eles são geralmente simbolizados por uma notação taquigráfica que designa o comprimento da cadeia carbonada e o número, posição e configuração das duplas ligações. Assim, o ácido palmítico (dezesesseis carbonos, saturados) é simbolizado 16:0 e o ácido Oléico [dezoito carbonos e uma dupla ligação (cis) nos carbonos 9 e 10] é simbolizado por 18:1^{Δ9}, Figura 17, e fica subentendido que as duplas ligações são cis (LEHNINGER, 1976).

Algumas generalizações podem ser feitas sobre os diferentes ácidos graxos de animais ou de plantas superiores, os mais abundantes têm um número par de átomos com cadeias entre 14 e 22 átomos de comprimento, mas aqueles com 16 ou 18 carbonos predominam. Os mais comuns entre os ácidos graxos saturados são os ácidos Palmítico (C₁₆) e Esteárico (C₁₈) e, entre os ácidos graxos insaturados, o ácido Oléico (C₁₈) (MARZZOCO; TORRES, 2007).

Os ácidos graxos necessários na dieta dos mamíferos são chamados de ácidos graxos essenciais. Sendo que, os mais abundantes nos mamíferos é o ácido Linoléico que constitui de 10 a 20% dos ácidos graxos totais de seus triacilgliceróis e fosfoglicerídeos (SILVA, 2011). Os ácidos Linoléicos e γ – Linolênico não podem ser sintetizados pelos mamíferos, mas precisam ser obtidos de fontes vegetais, nas quais eles são muito abundantes (OLIVEIRA, 2008). O ácido Linoléico é um precursor necessário aos mamíferos para a biossíntese do ácido araquidônico, que é encontrado em plantas (MARZZOCO; TORRES, 2007).

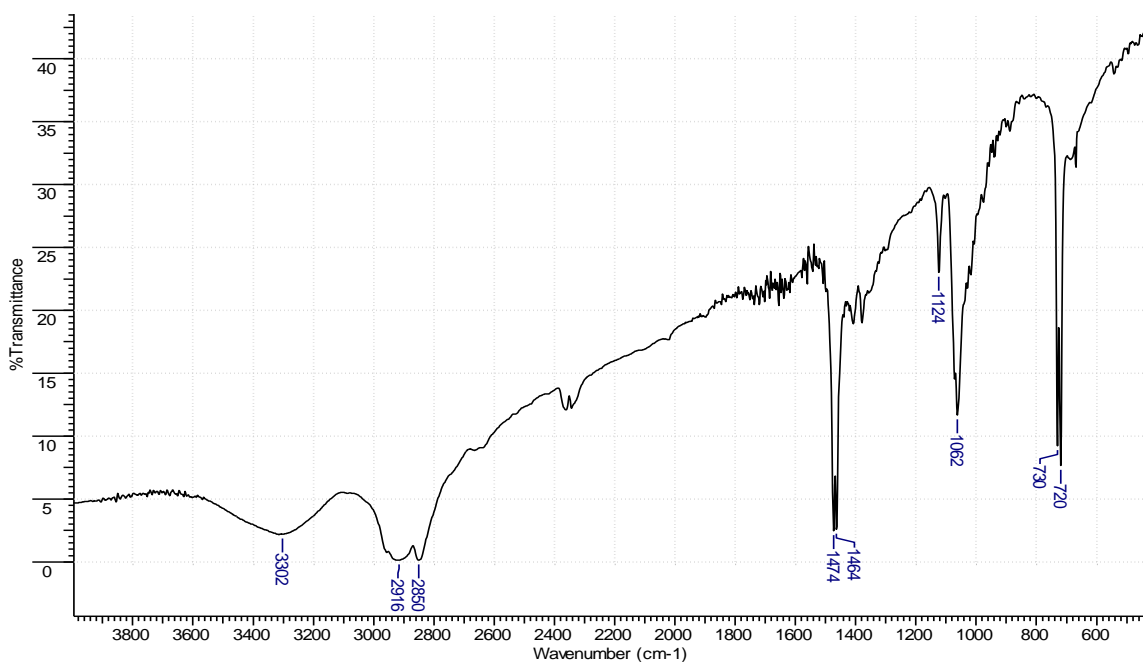
Embora, as funções especiais dos ácidos graxos essenciais em mamíferos tenham sido um mistério durante muitos anos, uma função já foi descoberta (OLIVEIRA, 2008), ácidos graxos essenciais são precursores necessários na biossíntese de um grupo de derivados de ácidos graxos denominados prostaglandinas, compostos parecidos aos hormônios que, em quantidades mínimas, possuem efeitos profundos sobre certo número de importantes atividades fisiológicas (FARIAS, 2013).

5.1.2 DKF-3 (Álcool Triacontan-1-ol (Álcool Melissílico))

A substância denominada DKF-3, foi isolada a partir do eluato clorofórmico. Obtendo um sólido branco amorfo de faixa de fusão 81,3–82,9 °C.

O espectro na região do IV de DKF-3, Figura 19, apresentou bandas de absorção em 3302 cm^{-1} característica de estiramento da ligação O-H de hidroxila, 2916 cm^{-1} característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 de compostos alifáticos, 2850 cm^{-1} característica de estiramento simétrico da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 de compostos alifáticos, em 720 e 730 cm^{-1} características de deformação angular tipo balanço de grupos $[\text{CH}_2]_n$ quando $n \geq 4$.

Figura 18 - Espectro de absorção na região do IV de DKF-3 (KBr).



O espectro de RMN de ^1H (Figura 20 e 21, pág. 64) apresentou um tripleto em δ_{H} 0,87 ($J= 6,7$ Hz) referente a três hidrogênios, esse sinal foi atribuído aos hidrogênios do grupo metila terminal. Observou-se outro tripleto em δ_{H} 3,54 ($J= 6,7$ Hz), referente aos dois hidrogênios em posição alfa em relação à hidroxila. O espectro apresentou um multiplete em δ_{H} 1,52 ($J= 6,7$ Hz) atribuído aos hidrogênios metilênicos em posição beta à hidroxila e um singlete longo em δ_{H} 1,25 atribuído aos hidrogênios dos outros grupos metilênicos. A integração desse sinal sugeriu a presença de 54 hidrogênios.

Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de DKF-3 em CDCl_3 + DMSO-d_6 e Piridina- d_5 .

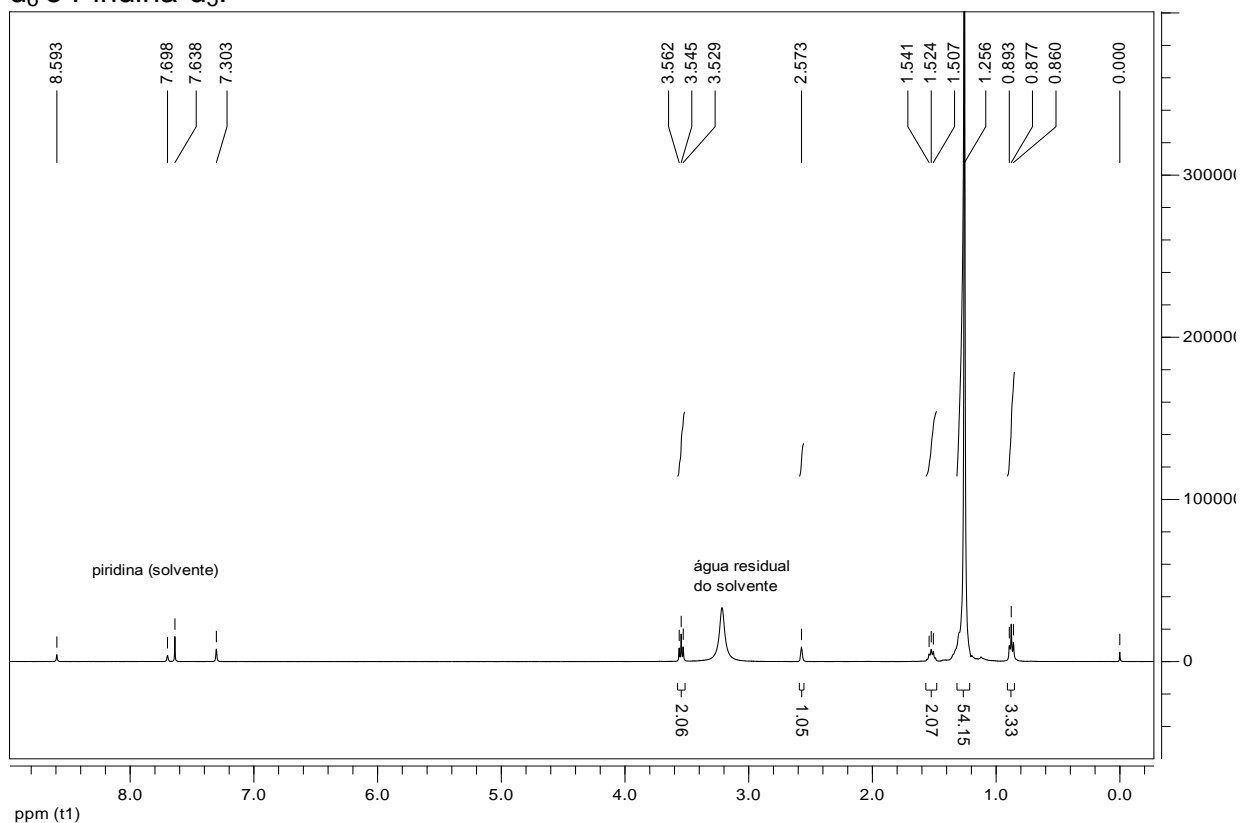
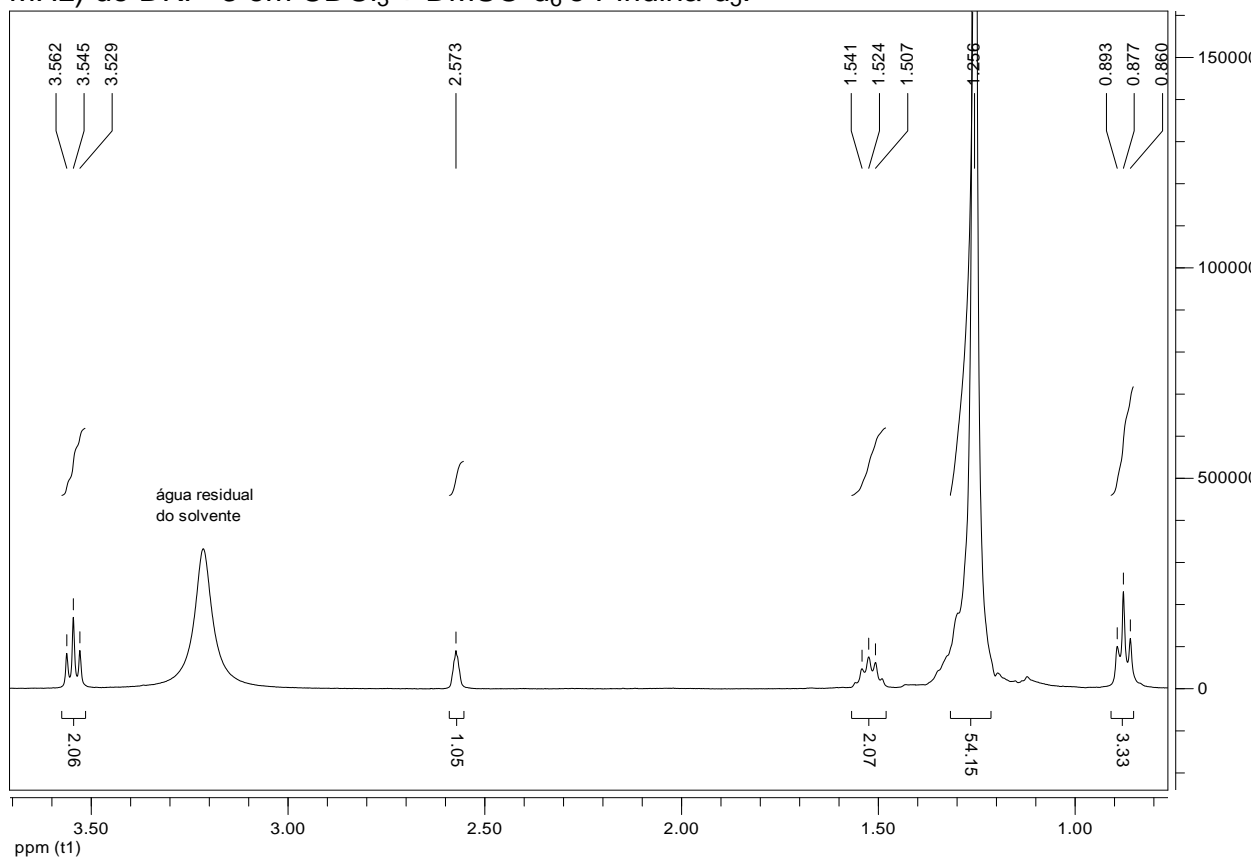


Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H , ampliação da região de δH (1,0 – 3,5) (400 MHz) de DKF-3 em CDCl_3 + DMSO-d_6 e Piridina- d_5 .



O espectro de RMN de ^{13}C de DKF-3, Figuras 22 e 24, apresentaram um sinal em δ_{C} 61,37, referente a um carbono metilênico hidroxilado. No subespectro DEPT-135 (Figura 24, pág. 66) foi observado um sinal de carbono metílico em δ_{C} 13,47. Observou-se, ainda, sinais de carbonos metilênicos em δ_{C} 21,93; δ_{C} 25,23; 28,58; 28,80, sinais sobrepostos em δ_{C} 28,92 e os sinais em δ_{C} 31,15 e δ_{C} 32,24. A integração dos sinais no espectro de RMN de ^{13}C possibilitou concluir que o sinal em δ_{C} 28,92 era referente a 22 átomos de carbono sobrepostos, totalizando 29 carbonos metilênicos na molécula. Considerando a presença de um carbono metílico, foi possível verificar 30 átomos de carbono na estrutura de DKF-3.

Figura 21 - Espectro de RMN de ^{13}C , (100 MHz) de DKF-3 em CDCl_3 + DMSO-d_6 e Piridina- d_5 .

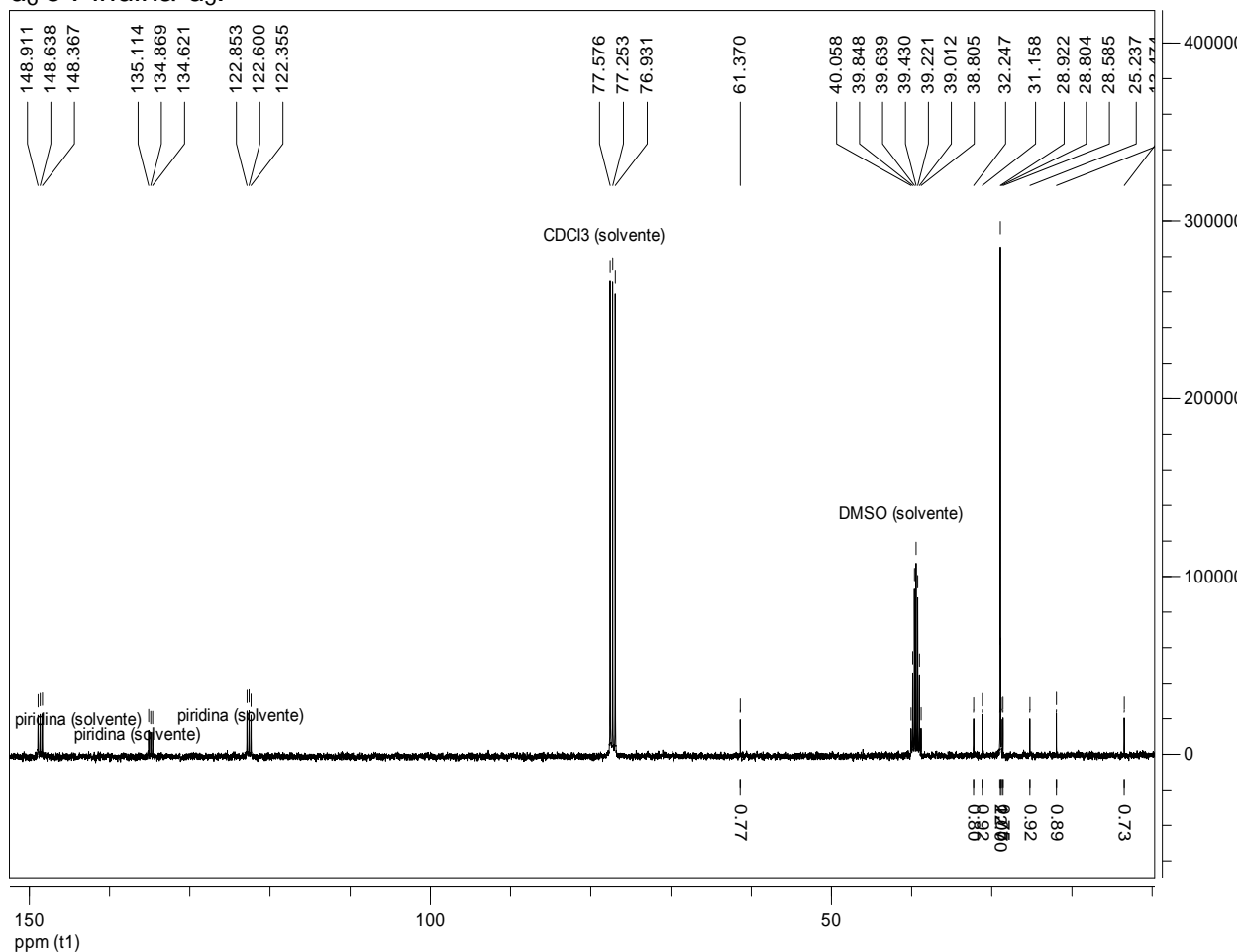


Figura 22 - Espectro de RMN de ^{13}C , (100 MHz) de DKF-3 em CDCl_3 + DMSO-d_6 e Piridina- d_5 .

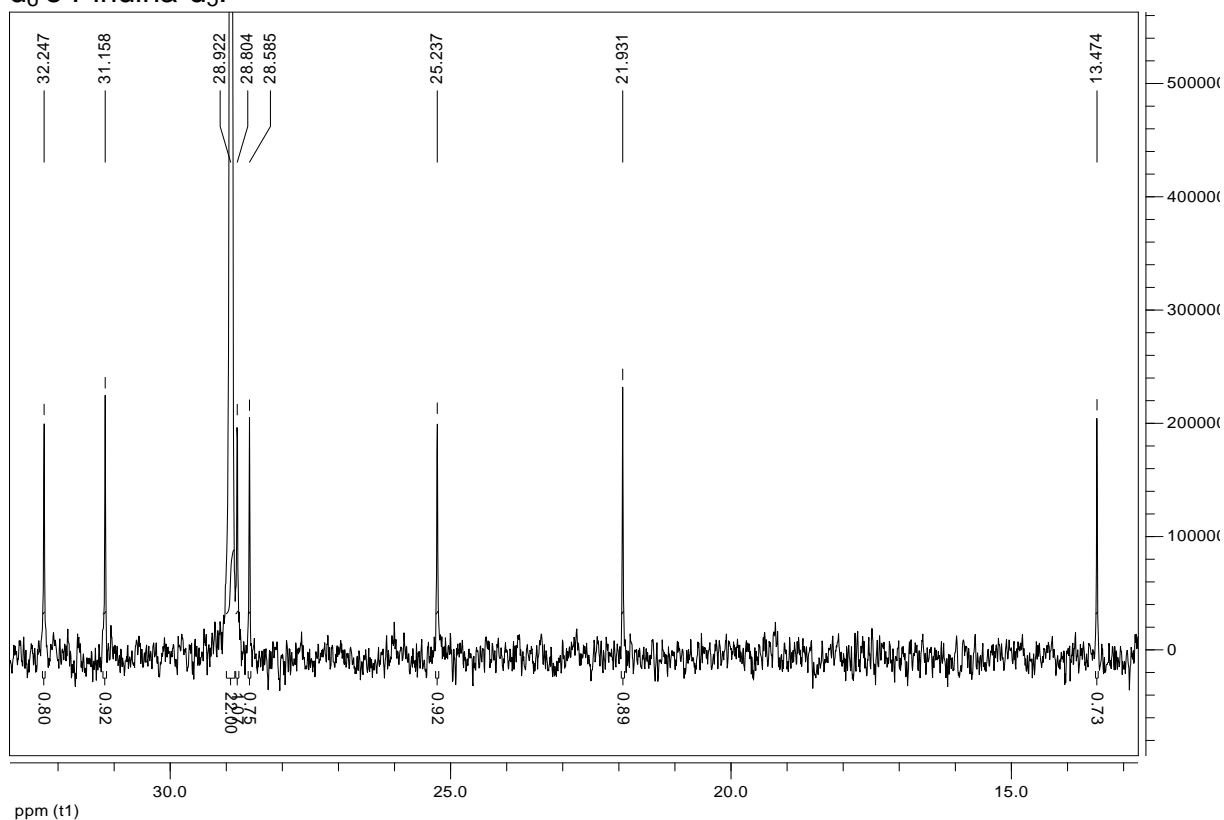
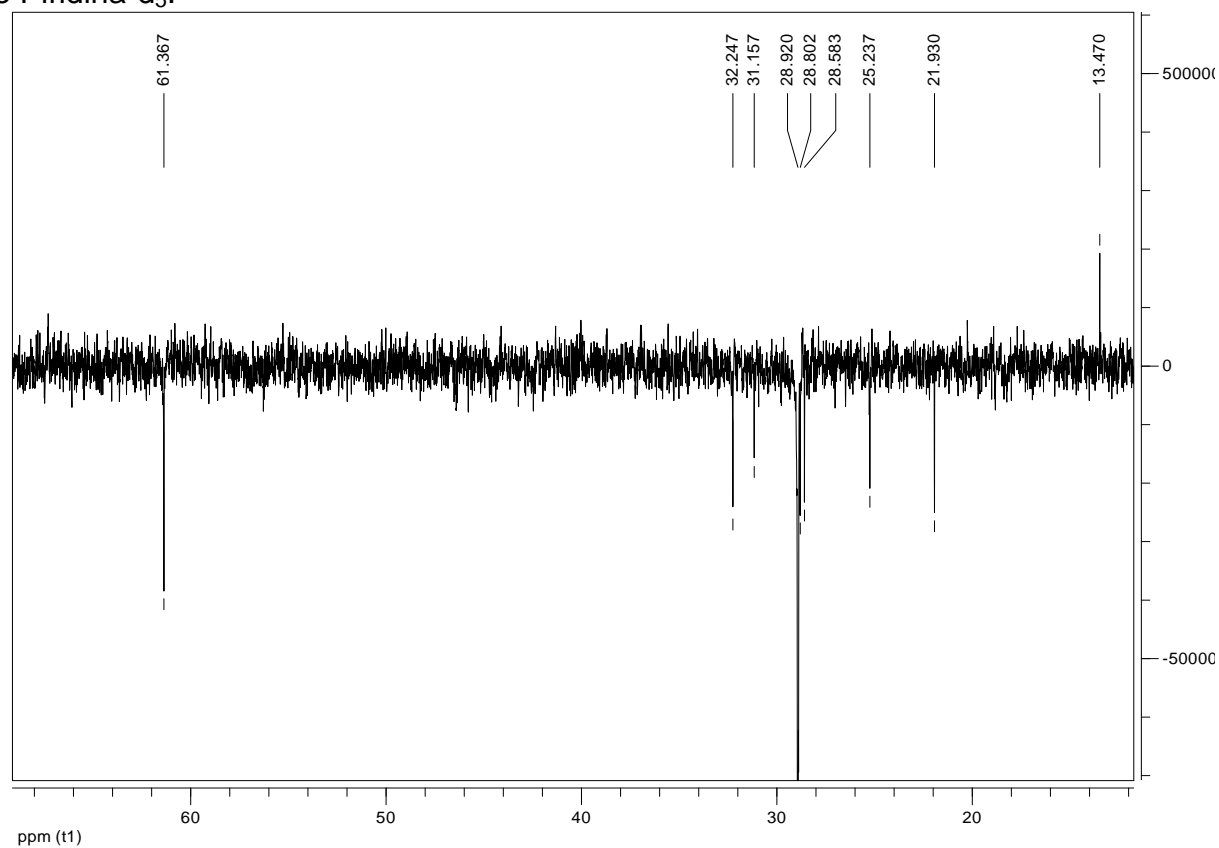


Figura 23 - Subespectro DEPT-135 (100 MHz) de DKF-3 em CDCl_3 + DMSO-d_6 e Piridina- d_5 .



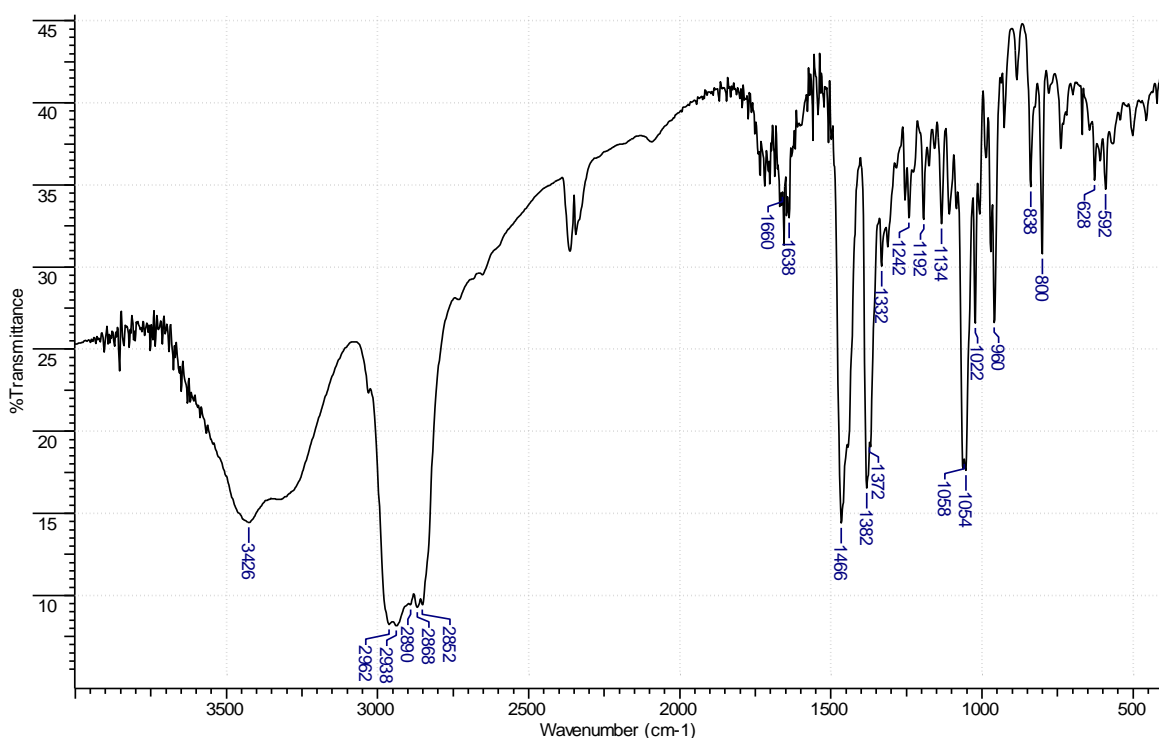
Com estas atribuições foi possível concluir que DKF-3 se tratava de um álcool de cadeia longa e, com base na integração dos sinais do espectro de RMN de ^1H e ^{13}C , foi possível sugerir para DKF-3 a estrutura do álcool Triacontan-1-ol (Álcool Melissílico). Segundo Castro et al. (1983), é um álcool alifático primário de cadeia longa presente na cera de abelhas e nas folhas de muitas plantas, com grande capacidade de estimular o crescimento dos vegetais, na absorção de água e no peso da matéria seca das plantas.

5.1.3 DKF-4 (Mistura de β – Sitosterol e Estigmasterol)

A mistura denominada DKF-4, foi obtida como um sólido branco cristalizado. Forneceu teste positivo para esteroide, quando tratada com reagente de Lieberman-Burchard. Em CCD apresentou uma única mancha quando eluída com diferentes sistemas de solventes.

O espectro obtido na região do infravermelho (Figura 25) apresentou banda de absorção larga na região de 3426 cm^{-1} que é característica de estiramentos de O-H em ligação de hidrogênio. Apresenta estiramentos em região de 2850 a 2900 cm^{-1} , típicas de C-H de alifáticos. O espectro, também, mostra absorção em 1638 cm^{-1} , típica de estiramento C=C. As absorções em 1466 , 1382 e 1372 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos C-C e a deformações C-H de cadeias alifáticas. As absorções entre 1242 e 1134 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramentos C-O assimétrico e simétrico, característicos de esteróis (ABREU, 2009).

Figura 24 – Espectro de absorção na região do IV de DKF-4 (KBr).



As Figuras 26, 27 e 28, apresentam os espectros de RMN de ^1H e expansão de RMN ^1H na região entre δ_H 2,4 – 0,6 ppm de DKF – 4, pode-se observar o deslocamento químico centrado em δ_H 5,355 ppm, apresentando-se

como duplete. Deslocamentos que podem representar o H – 6 de sistema esterol quando a interação de dois picos, um em δ_H 5,355 e o outro em δ_H 5,343 referentes ao H – 6 de β – Sitosterol e Estigmasterol.

Já os deslocamentos (Figura 26) em δ_H 5,163 e 5,010 ppm em forma de duplos dupletos apresenta-se como deslocamento típico de H – 22 e 23 da substância Estigmasterol. Segundo Lins (2008), estes deslocamentos por serem típicos de Estigmasterol, levam a entender que DKF–4 é uma mistura de β – Sitosterol e Estigmasterol.

O deslocamento tipo multiplete registrado em δ_H 3,521 ppm foi atribuído ao H – 3 do sistema β – Sitosterol e Estigmasterol. Os sinais (Figuras 27 e 28) entre δ_H 2,284 e 0,681 ppm, foram atribuídos a hidrogênios de grupos alifáticos típicos de misturas β – Sitosterol e Estigmasterol.

Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H , ampliação da região de δ_H (3,48 – 5,35) (400 MHz) de DKF–4 em CDCl_3 .

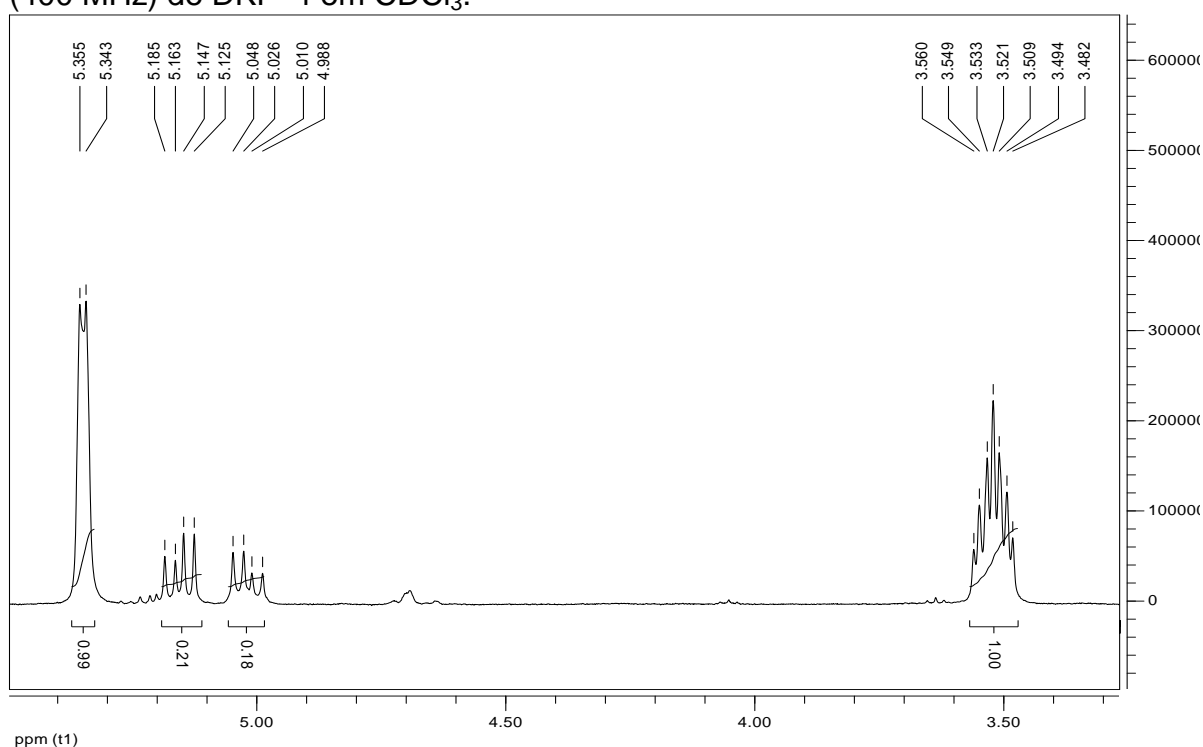


Figura 26 – Espectro de RMN de ^1H , ampliação da região de δH (1,15 – 2,30) (400 MHz) de DKF-4 em CDCl_3 .

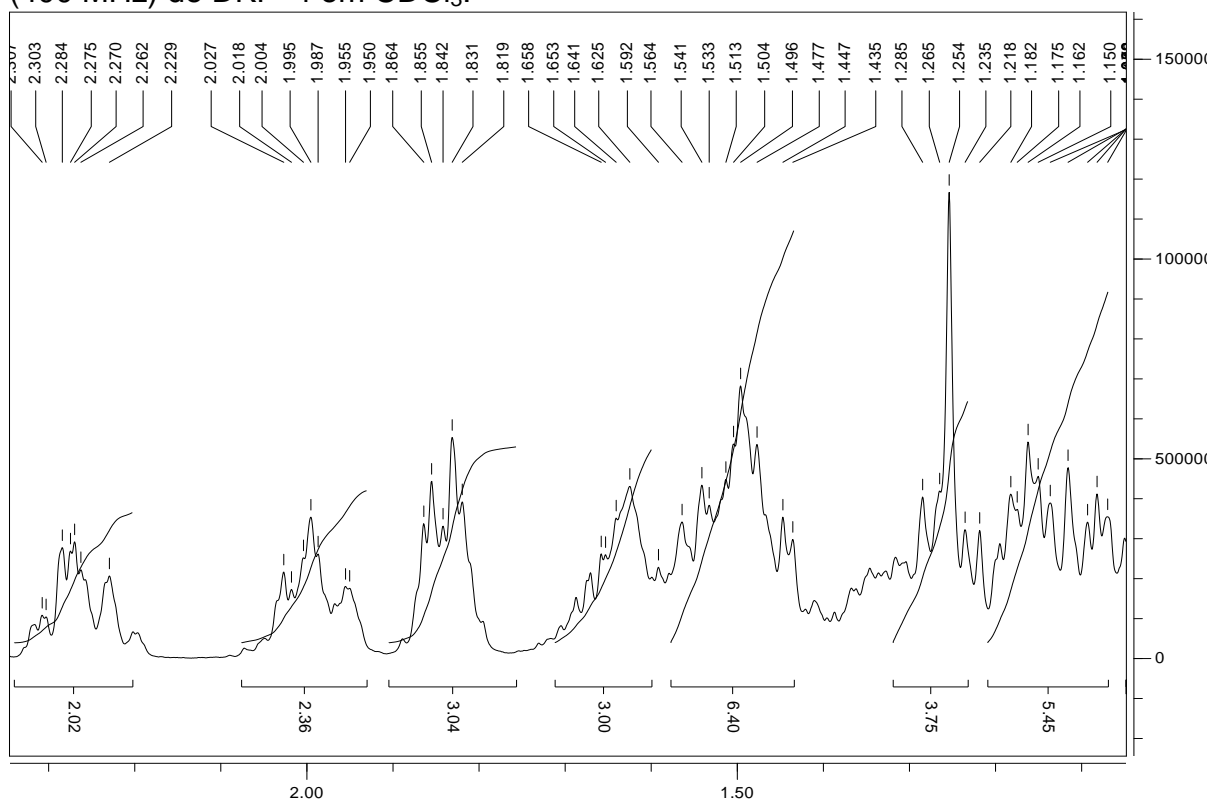
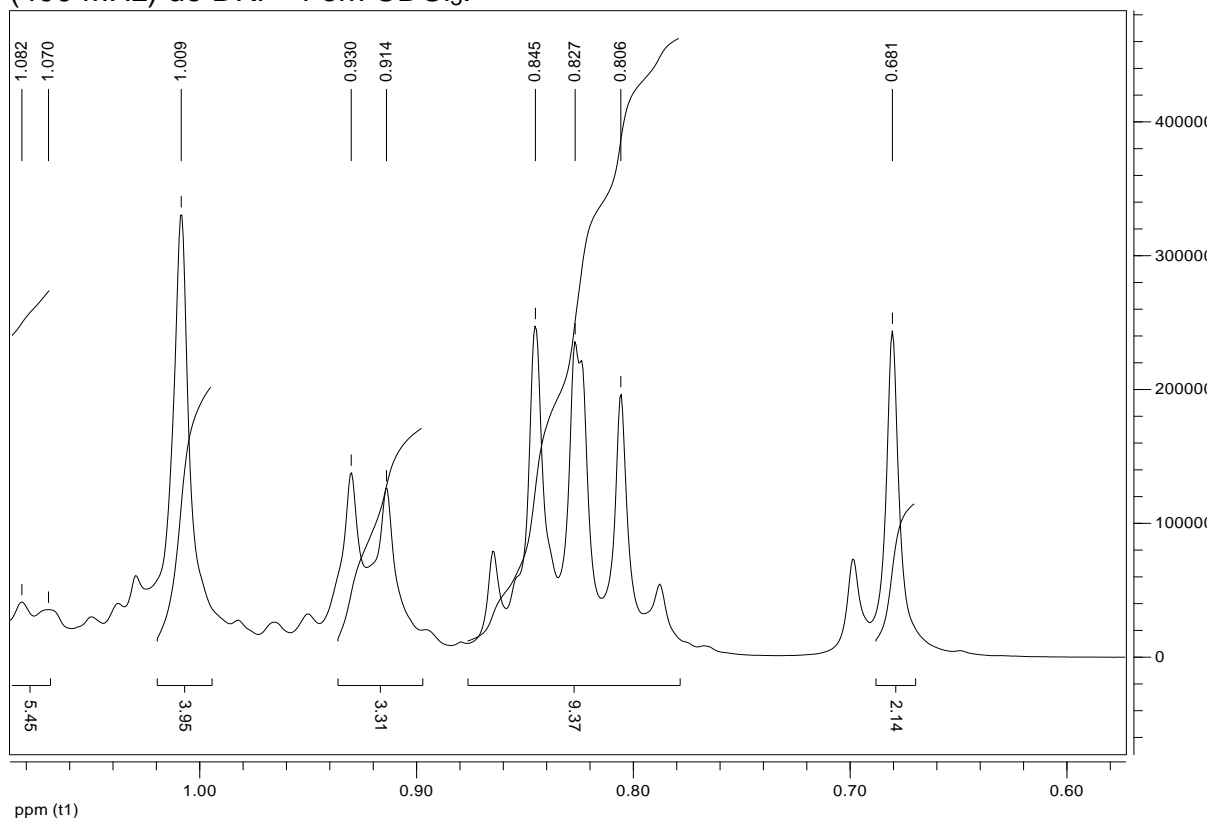


Figura 27 – Espectro de RMN de ^1H , ampliação da região de δH (0,60 – 1,08) (400 MHz) de DKF-4 em CDCl_3 .



A Tabela 16 apresenta os deslocamentos das metilas comparadas com a literatura (LINS, 2008).

Tabela 16 – Atribuições dos sinais de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de DKF – 4 comparadas com a literatura (LINS, 2008).

Hidrogênio	DKF – 4 (400 MHz, CDCl_3)		β – Sitosterol	Estigmasterol
	β – Sitosterol	Estigmasterol	(LINS, 2008)	(LINS, 2008)
	δ_H	δ_H	δ_H	δ_H
H – 3	3,521	5,521	3,520	3,520
H – 6	5,355	5,355	5,350	5,350
H – 18	0,681	0,700	0,680 s	0,690 s
H – 19	1,009	1,009	1,010 s	1,010
H – 21	0,930	1,070	0,920(J=6,3Hz)	1,020(J=5,9Hz)
H – 22	----	5,163	----	5,160(J=15;8,1)
H – 23	----	5,010	----	5,010(J=15;8,1)
H – 26	0,827	0,845	0,830(J=6,4Hz)	0,840(J=6,4Hz)
H – 27	0,806	0,845	0,810(J=6,3Hz)	0,790(J=6,3Hz)
H – 29	0,845(J=7,2Hz)	0,806(J=7,2Hz)	0,840(J=7,2Hz)	0,800(J=7,2Hz)

A análise das Figuras 29 e 30, respectivamente, indicam a expansão do espectro de RMN de ^{13}C e DEPT–135 de DKF–4, apresentando os deslocamentos químicos, que dão a entender, que a amostra é uma mistura β – Sitosterol e Estigmasterol.

O deslocamento químico em δ_C 140,781 ppm, correspondente ao carbono não hydrogenado, C_5 de sistema β – Sitosterol e Estigmasterol.

Da mesma forma, o δ_C 121,723 ppm, corresponde ao carbono metínico C_6 do mesmo sistema. Porém, os deslocamentos químicos em δ_C 138,319 e 129,309 ppm, ambos atribuídos aos carbonos metínicos C_{22} e C_{23} que são característicos apenas da substância Estigmasterol. O deslocamento químico em δ_C 71,824 corresponde ao carbono C_3 , carbono carbinólico das substâncias Estigmasterol e β - Sitosterol.

Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C , (100 MHz) de DKF-4 em CDCl_3 .

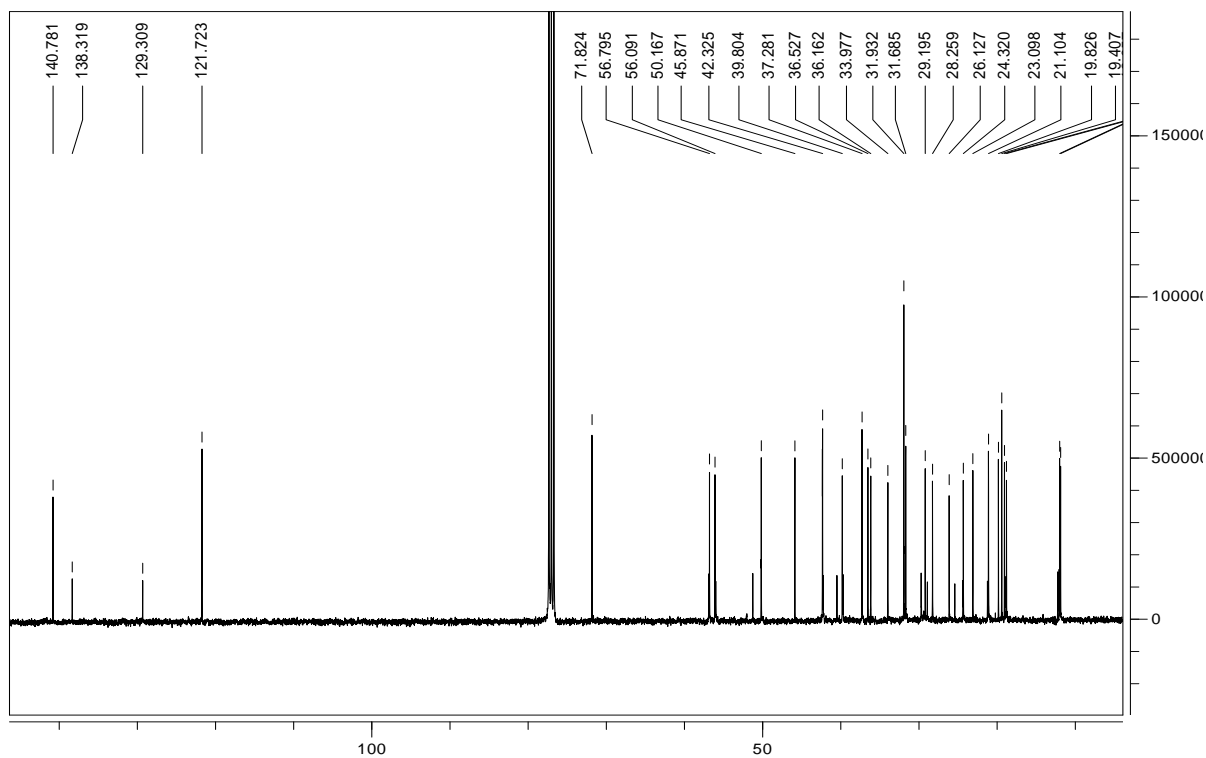
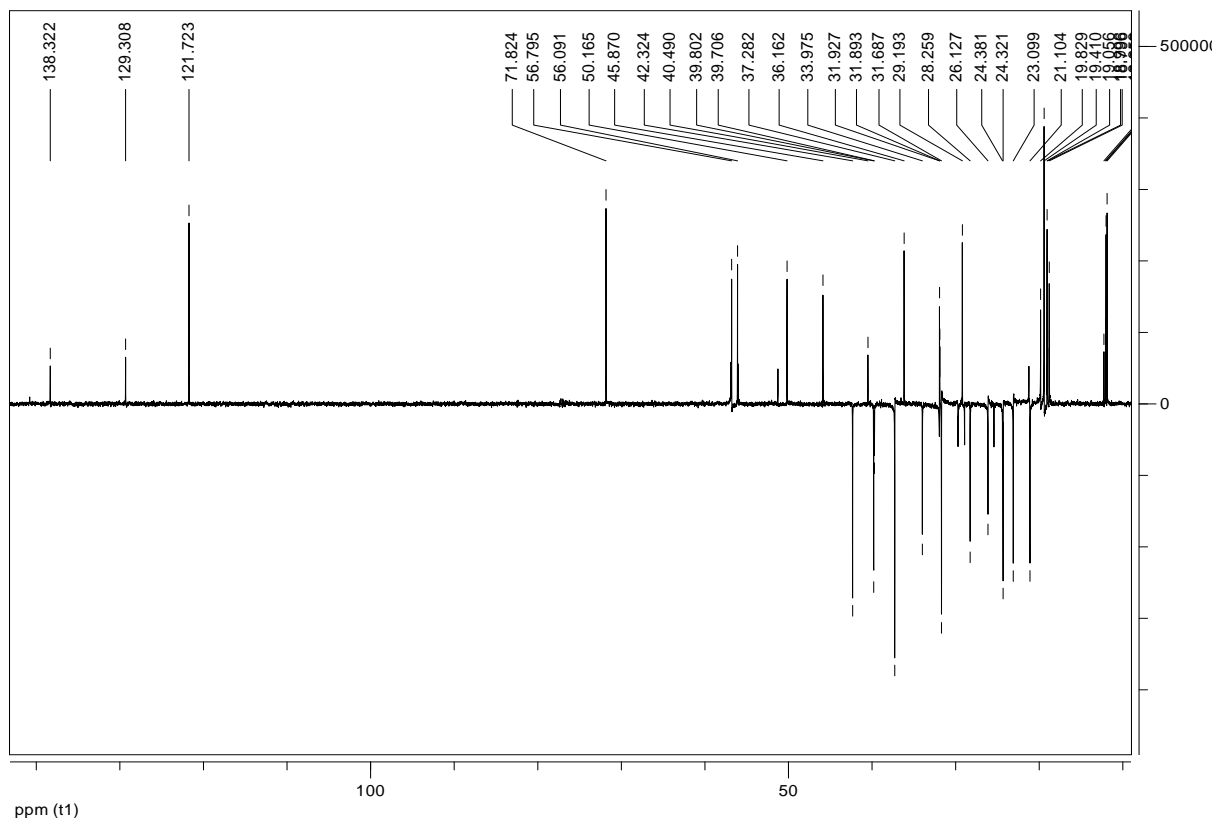


Figura 29 - Subespectro DEPT135 (100 MHz) de DKF-4 em CDCl_3 .



Os demais deslocamentos químicos podem ser atribuídos aos átomos de carbono da estrutura alifática desses esteroides, comparados com a literatura, Goulart et al. (1993), conforme Tabela 17.

Tabela 17 - Comparações entre sinais de RMN de ^{13}C de DKF-4 e sinais de Estigmasterol e β -Sitosterol.

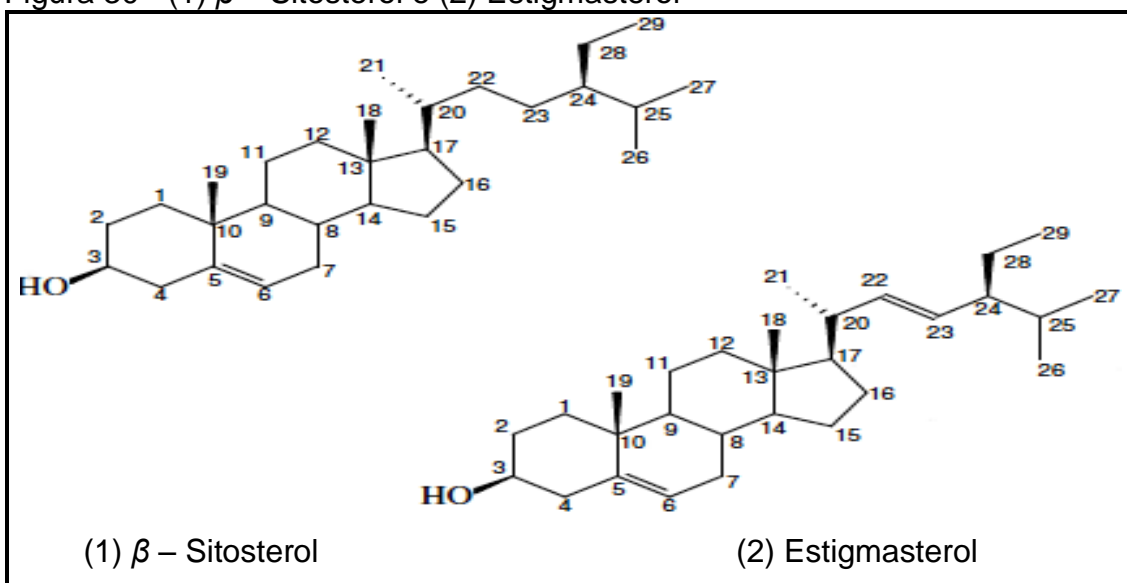
Átomo	Estigmasterol	DKF-4	β -Sitosterol	DKF-4
	δ_C	δ_C	δ_C	δ_C
C – 1	37,2	37,2	37,2	37,2
C – 2	31,8	31,9	31,6	31,6
C – 3	71,5	71,8	71,6	71,8
C – 4	42,2	42,3	42,2	42,3
C – 5	140,7	140,7	140,6	140,7
C – 6	121,6	121,7	121,5	121,7
C – 7	33,6	33,9	31,8	31,9
C – 8	33,6	33,9	31,8	31,9
C – 9	50,1	50,1	50,1	50,1
C – 10	36,4	36,5	36,4	36,5
C – 11	21,1	21,1	21,1	21,1
C – 12	39,7	39,8	39,7	39,8
C – 13	42,2	42,3	42,3	42,3
C – 14	56,7	56,7	56,7	56,7
C – 15	24,2	24,3	24,2	24,3
C – 16	28,3	28,2	28,2	28,2
C – 17	56,0	56,0	56,0	56,0
C – 18	12,07	11,8	11,9	11,9
C – 19	19,42	19,4	19,3	19,4
C – 20	40,30	39,8	36,1	36,1
C – 21	20,50	19,8	18,7	18,7
C – 22	138,5	138,3	33,9	33,9
C – 23	129,4	129,3	26,1	26,1
C – 24	51,2	50,1	45,8	45,8
C – 25	31,9	31,9	29,1	29,1
C – 26	21,2	21,1	19,7	19,8
C – 27	19,8	19,8	19,1	19,0
C – 28	25,4	26,1	23,0	23,0
C – 29	11,9	11,9	11,8	11,8

Todos os dados obtidos de **DKF-4**, reunidos e comparados com os dados da literatura permitiram identificar a amostra, como sendo uma mistura Figura 31. Segundo Rocha et al., (2007), o Estigmasterol difere do β - Sitosterol somente pela presença de uma ligação dupla em C-22 na cadeia lateral.

No organismo, os fitosteróis, dos quais os mais comuns são o campesterol, o Sitosterol e o Estigmasterol, atuam na diminuição da absorção de colesterol no intestino delgado por um mecanismo de competição, com consequente aumento na excreção fecal (SALGADO et al., 2008). Esta competição ocorre por que a estrutura química dos fitosteróis é semelhante à do colesterol, diferindo no tamanho (SALGADO et al., 2008 apud NESTEL et al., 2001).

A Figura 30 apresenta o Estigmasterol e β -Sitosterol com seus carbonos numerados respectivamente.

Figura 30 - (1) β – Sitosterol e (2) Estigmasterol



6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Ensaio biológico segundo a ANVISA (1988), “são procedimentos destinados a avaliar o potencial de princípios ativos contidos nas matérias-primas e preparações farmacopéicas, através do uso de reagentes biológicos tais como: Micro-organismos, Animais, Fluidos e órgãos isolados de animais”.

6.1 Teste de toxicidade geral frente à *Artemia salina*.

Este bioensaio de toxicidade e letalidade frente à *Artemia salina*, um microcrustáceo marinho, foi realizado com o extrato bruto etanólico de *Davilla kunthii* A. St. - Hil, com o objetivo de avaliar e classificar os efeitos do extrato no sistema biológico, através da adaptação da metodologia de (MEYER, 1982 apud MEDINA, 2006).

A utilização da *Artemia salina* como bioindicador em testes de toxicidade aguda, é devido à sua capacidade para formar cistos dormentes, sua praticidade de manuseio e cultivo, por ser um método rápido e barato, além de ser um bioindicador capaz em avaliação toxicológica pré-clínica (MEDINA, 2006).

O teste foi realizado em triplicata e com o material totalmente seco, juntamente, com o teste branco (Controle 1 e 2).

As amostras foram submetidas às mesmas condições de temperatura (25°C) e meio (água marinha – 20 g NaCl/L de água doce e destilada).

Os ovos foram colocados para eclodir na solução salina (em um aquário) por 48 horas, com aeração constante a 25°C conseguido com o auxílio de uma bomba externa de ar conectada ao fundo do sistema e difusor próprio para aquário, necessário para eclosão dos ovos em náupilos.

O extrato foi testado nas concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em volume de 10 mL, e para o branco chamados de controle 1 (C1) e controle 2 (C2), acrescentou-se no C1 10 mL de solução salina e no C2, 5 mL de solução de DMSO a 1 % em solução salina mais 5 mL de solução salina, fechando os 10 mL. E a contagem dos sobreviventes foi realizada após 24 – 48 horas com auxílio de uma lupa.

Obtendo o seguinte resultado, Tabela 18:

Tabela 18 – Número de nauplios mortos.

	1000µg.mL ⁻¹		500µg.mL ⁻¹		250µg.mL ⁻¹		125µg.mL ⁻¹		62,5µg.mL ⁻¹		31,25µg.mL ⁻¹		C1		C2	
	V*	M*	V*	M*	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M
A*	10	4	10	1	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
D*	10	3	10	1	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
T*	10	3	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
X*	10	3,3	10	0,7	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0

Fonte: o Autor. A = Amostra; D = Duplicata; T = Triplicata; X = média; V = Vivos; M = Mortos.

Após a contagem do número de exemplares de *Artemia salina* vivos, mortos ou imobilizados, realizou-se o seguinte cálculo formula 1:

$$M(\%) = \frac{\text{Número de organismos mortos} \times 100}{\text{Número de total organismos no tubo}} \quad (1)$$

Ressaltando que os valores da mortalidade foram corrigidos utilizando a fórmula de Abbott descrita a seguir formula 2 (LUCENA, 2012):

$$MC^* = \frac{(\text{mortalidade nos frascos teste} [\%] - \text{mortalidade no frasco controle} [\%]) \times 100}{(100\% - \text{mortalidade no frasco controle} [\%])} \quad (2)$$

MC = mortalidade corrigida

Considerar após os cálculos, baixa toxicidade quando a Dose Letal 50% (DL₅₀) for superior a 500 µg.mL⁻¹; moderada para DL₅₀ entre 100 a 500 µg.mL⁻¹ e muito tóxico quando a DL foi inferior a 100 µg.mL⁻¹ (LUCENA, 2012):

Obtendo os seguintes resultados, Tabela 19:

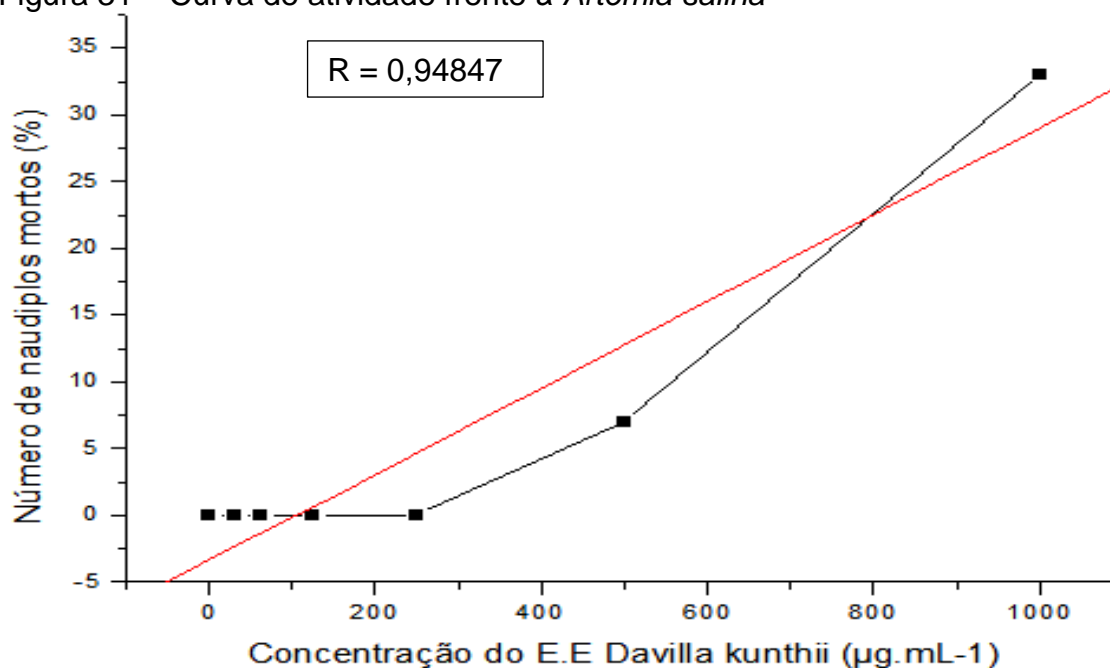
Tabela 19 – Dados de atividade frente à *Artemia salina* para DKExE

Concentração	Atividade para <i>A. salina</i> (% de Mortalidade)
1000 µg.mL⁻¹	33%
500 µg.mL⁻¹	7%
250 µg.mL⁻¹	0%
125 µg.mL⁻¹	0%
62,5 µg.mL⁻¹	0%
31,25 µg.mL⁻¹	0%
Controle 1	0%
Controle 2	0%

Fonte: o Autor

Como não houve mortalidade nos tubos controle não foi necessário aplicar a formula Abbott (Fórmula 2), pois os resultados não são alterados.

Calculando a média entre os valores obtidos do extrato, foram encontrados o resultados de 33% de mortalidade para a concentração 1000 µg.mL⁻¹ e 7% para a concentração 500 µg.mL⁻¹, Figura 32.

Figura 31 – Curva de atividade frente à *Artemia salina*

Fonte: o Autor

Utilizando a fórmula da regressão linear $Y = A + BX$ (Figura 31), podemos calcular a DL_{50} ($Y = 50$), onde -3,3985 e 0,0324 são os valores de A e B, respectivamente, encontrando X igual à 1648,10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Pela análise dos dados, pode-se verificar que o extrato etanólico de *Davilla kunthii* A. St. - Hil, não apresentou letalidade frente à *Artemia salina*, sendo considerado de baixa toxicidade (DL_{50} superior a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) tendo sido encontrado o valor de DL_{50} de 1648,10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

6.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do DPPH

Os radicais livres desempenham papel importante no organismo, mas o efeito cumulativo desses radicais está implicado em doenças, tais como câncer, aterosclerose, isquemia cerebral e envelhecimento (SILVA, 2006). Antioxidantes que sequestram os radicais livres, tanto previnem como apresentam alto potencial terapêutico em doenças que apresentam estes radicais (RAMALHO; JORGE, 2006).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por ex., superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras

fontes, destas últimas destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides (SILVA, 2006).

Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo, os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (SOUSA, 2007; SILVA, 2006).

A vitamina E, é a designação dada a um grupo de compostos antioxidantes lipossolúveis, entre os quais o α -tocoferol é a forma mais ativa. É encontrada em lipoproteínas e membranas, atuando no bloqueio da reação em cadeia da peroxidação lipídica, através do sequestro do radical peroxila (SOUSA, 2007).

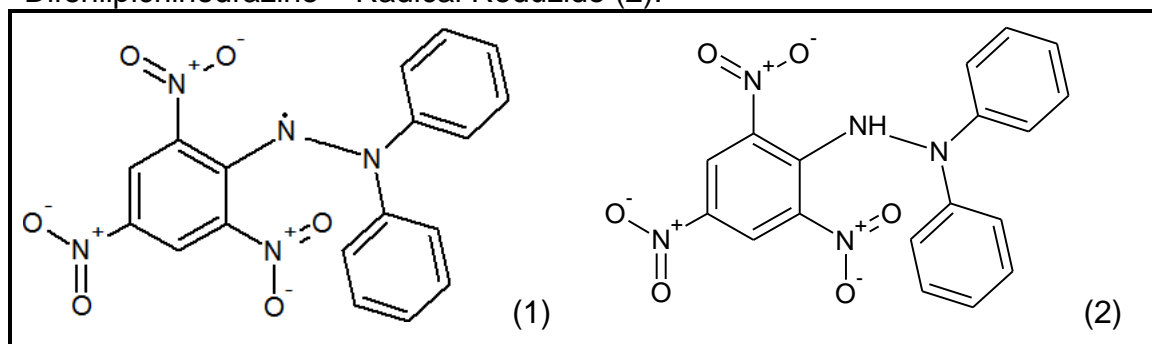
A vitamina C tem muitas funções fisiológicas, entre elas, o alto poder antioxidante de reciclar a vitamina E no processo de peroxidação lipídica das membranas e lipoproteínas (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os carotenos (CAR) protegem os lipídios dos danos peroxidativos inativando o oxigênio singlete, sem sofrer degradação, através da reação com os radicais peroxila, hidroxila e superóxido. A atividade antioxidante dos CAR é decorrente da habilidade de deslocalizar elétrons desemparelhados através da estrutura de ligações duplas conjugadas (FERREIRA; COSTA, 2011).

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato (KRINSKY, 1994).

Este método tem por base a redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) em solução de metanol, onde apresenta máxima absorção em 515 nm. Ao fixar um **H** (hidrogênio) (Figura 32), abstraído do antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição na absorbância, o que permite calcular, após estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH (CE_{50}) (ALPIOVEZZA et al., 2012).

Figura 32 – Estrutura Química do Difenilpicrilhidrazila - Radical Livre (1), e Difenilpicrilhidrazine – Radical Reduzido (2).



Fonte: MOLYNEUX, 2004.

Conforme o método descrito por Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995) adaptada, a extração do antioxidante da amostra foi obtida por meio de soluções de metanol. A análise foi realizada, adicionando-se aos extratos uma solução de DPPH e para o controle, foi utilizada a mistura de metanol e DPPH. Após a reação foi realizada a leitura da absorbância a 515 nm em espectrômetro (LOCATELLI et al., 2009).

6.2.1 Preparo das soluções

Dissolveu-se 2,4 mg de DPPH em álcool metílico e completou-se o volume para 100 mL em um balão volumétrico com álcool metílico, homogeneizou-se e transferiu-se para um frasco âmbar, devidamente etiquetado. Em seguida preparou-se a solução Quercetina, onde dissolveu-se 50 mg do flavonoide em álcool metílico e completou-se o volume para 100 mL em um balão volumétrico com álcool metílico, homogeneizar e transferir para o frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado, e o preparo do extrato etanólico de *Davilla kunthii* segue o mesmo procedimento da Quercetina (RUFINO et. al., 2007).

6.2.2 Preparo das Diluições

A partir da solução inicial de DPPH (0,06 mM), preparou-se em balões volumétricos de 10 mL, soluções variando a concentração de 10 M a 60 M conforme a Tabela 20. Em seguida transferiu-se 4 mL de cada solução de

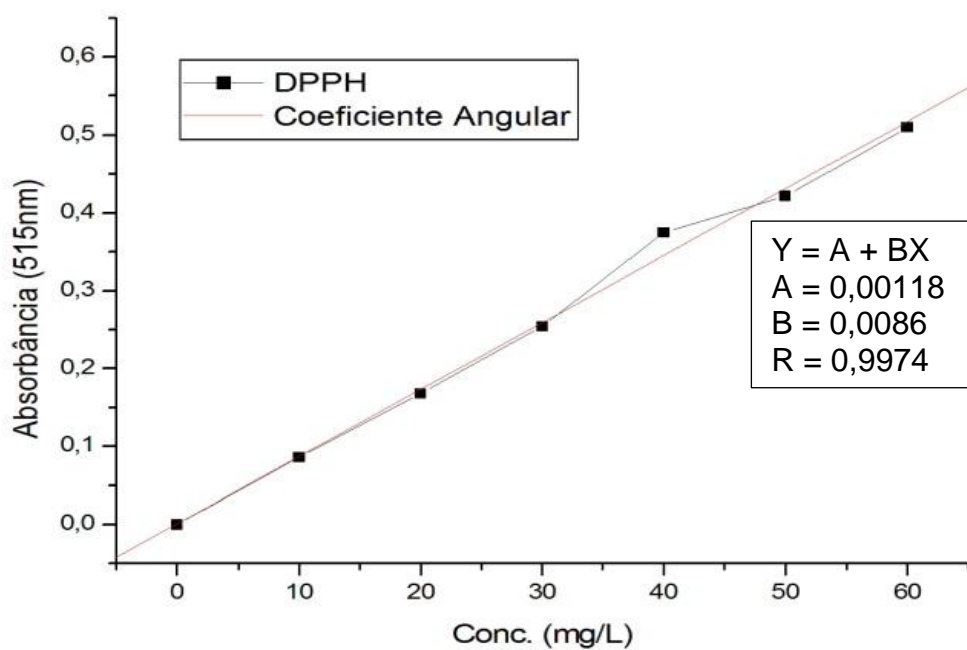
DPPH para cubetas e realizou-se as leituras em espectrofotômetro a 515 nm (Figura 33), e utilizou-se álcool metílico como branco.

Tabela 20 - Preparo das soluções para a curva do DPPH

Amostra	Solução de DPPH (mL)	Álcool metílico (mL)	Conc. de DPPH (μM)	Absorbância WL 515
1	0	10	0	0
2	1,7	8,3	10	0,086
3	3,3	6,7	20	0,168
4	5,0	5,0	30	0,254
5	6,7	3,3	40	0,375
6	8,3	1,7	50	0,422
7	10	0	60	0,510

Fonte: o Autor

Figura 33 - Curva do DPPH



Fonte: o Autor

A partir da equação $Y = A + BX$ (Figura 33), onde Y é a maior absorvância de acordo com a Tabela 20 e X é a concentração real do DPPH na solução:

$$Y = A + BX \quad (Y = 0,510)$$

$$0,510 = 0,00118 + 0,0086.X$$

$$X = \mathbf{59,1651 \mu M}$$

Em seguida, calculamos a massa em gramas de DPPH (massa molar de 394,3) que precisa ser oxidada pela amostra padrão Quercetina, e pelo extrato etanólico de *Davilla kunthii*:

$$\text{g DPPH} = (59,1651/1000000) \times 394,3$$

$$\text{g DPPH} = \mathbf{0,0233 \text{ g}}$$

Logo, multiplicamos essa massa de DPPH por 50% (CE_{50}), que é a massa total que precisa ser oxidada:

$$0,0233 \times 50\% = \mathbf{0,01166 \text{ g}}$$

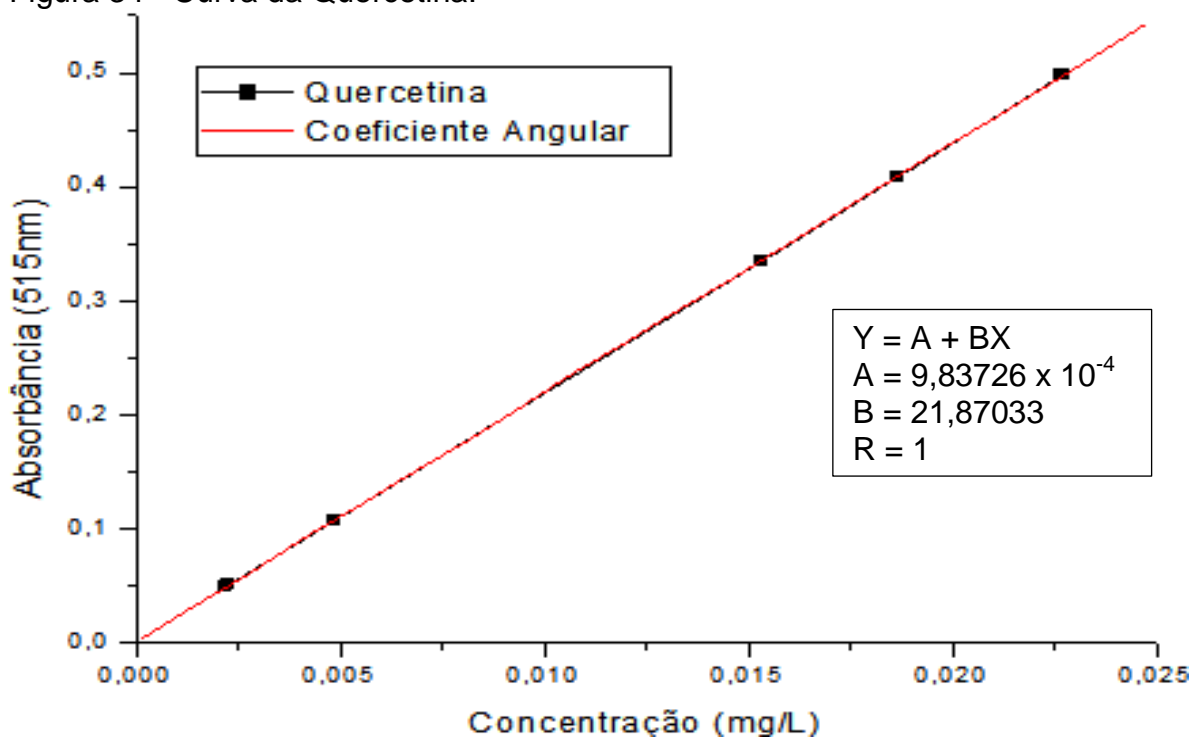
A partir da solução inicial de Quercetina (5 mg/mL) preparou-se em balões volumétricos de 10 mL, soluções variando a concentração de 50 a 250 $\mu\text{g/mL}$, mas para ser feito o gráfico, Figura 35, transformou-se a concentração para mg/L, conforme a Tabela 21.

Tabela 21 - Preparo das soluções para a curva de Quercetina

Amostra	Solução de Quercetina (mL)	Álcool metílico (mL)	Conc. Quercetina		Absorvância WL 515
			$\mu\text{g/mL}$	mg/L	
1	0	10	0	22,7	0,498
2	0,1	9,9	50	18,67	0,409
3	0,2	9,8	100	15,3	0,335
4	0,3	9,7	150	4,87	0,108
5	0,4	9,6	200	2,21	0,049
6	0,5	9,5	250	2,28	0,051

Fonte: o Autor

Figura 34 - Curva da Quercetina.



Fonte: o Autor

Com os valores encontrados na curva (Figura 34), podemos calcular o quanto de Quercetina é necessário para oxidar 0,01166 g de DPPH (CE₅₀) que será X, e Y será a massa utilizada:

$$Y = 9,83726 \times 10^{-4} + 21,87033 (0,01166)$$

$$Y = \mathbf{0,2559g} \text{ de Quercetina}$$

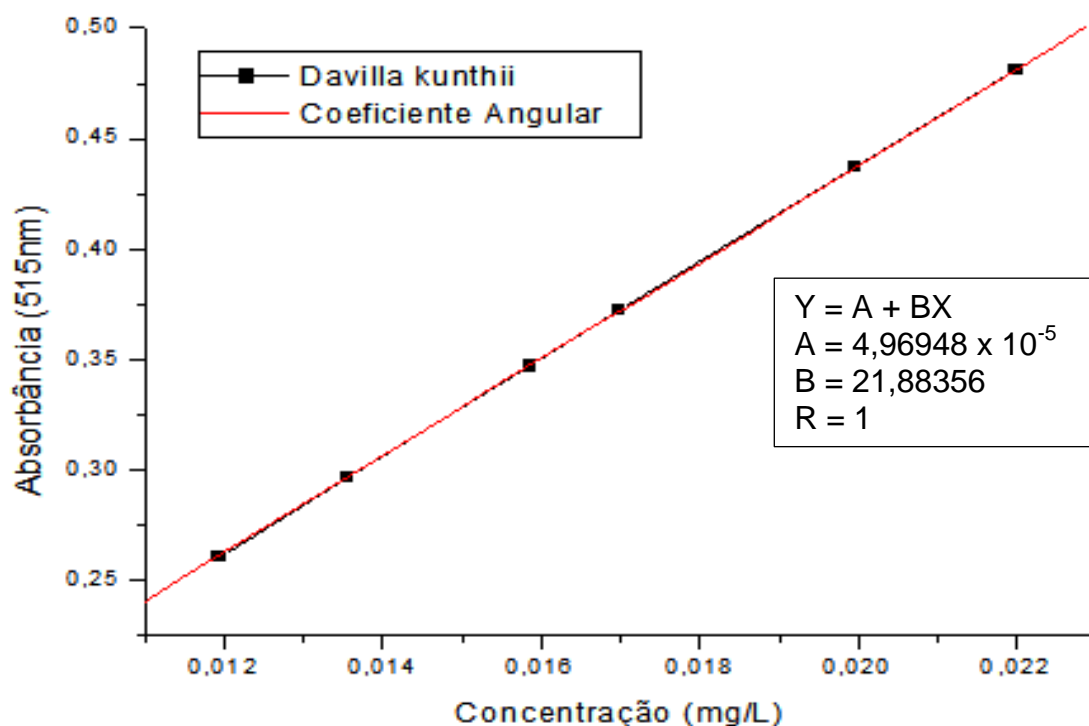
A partir da solução inicial do Extrato Etanólico de *Davilla kunthii* (5 mg/mL) preparou-se em balões volumétricos de 10 mL, soluções em triplicata, variando a concentração de 0 a 250 µg/mL conforme a Tabela 22.

Tabela 22 - Preparo das soluções para a curva de *Davilla kunthii*

Amostra	Sol. de <i>Davilla kunthii</i> (mL)	Álcool metílico mL	Conc. do Extrato		Absorbância WL 515 (Média)
			µg/mL	mg/L	
1	0	10	0	21,99	0,481
2	0,1	9,9	50	19,96	0,437
3	0,2	9,8	100	16,99	0,372
4	0,3	9,7	150	15,85	0,347
5	0,4	9,6	200	13,56	0,297
6	0,5	9,5	250	11,94	0,261

Fonte: o Autor

A partir dessas concentrações, foi construído um gráfico de Absorbância *versus* a concentração (mg/L), Figura 36, e calculada a CE₅₀.

Figura 35 – Curva do Extrato Etanólico de *Davilla kunthii* A. St. – Hil

Fonte: o Autor

Com os valores encontrados na curva (Figura 35), podemos calcular o quanto de extrato etanólico de *Davilla kunthii*, é necessário para oxidar 0,01166 g de DPPH que será X, e Y será a massa utilizada:

$$Y = 4,96948 \times 10^{-5} + 21,88356 \cdot (0,01166)$$

$$Y = \mathbf{0,2552 \text{ g}} \text{ de Extrato de } \mathbf{Davilla kunthii}$$

Os resultados do teste da atividade antioxidante do extrato etanólico de *Davilla kunthii*, estão expressos na Tabela 22. A atividade antioxidante expressa em CE₅₀ (concentração efetiva, que elimina 50% dos radicais livres) indica o quão antioxidante é a amostra, isto é, quanto menor o valor da CE₅₀ mais ativa é a amostra (ALPIOVEZZA et al., 2012; LOCATELLI et al., 2009).

Verificando-se, no resultado estimado da CE₅₀ (Y = A + BX) igual a 0,2552 g, que este extrato apresenta uma boa atividade antioxidante, comparada com a Quercetina 0,2559 g (SOUSA et al., 2007), destacando-se o fato de que o Extrato Etanólico de *Davilla kunthii* ser uma mistura bruta de centenas de substâncias, ou seja um fito constituinte complexo.

6.3 Bioensaio Microbiológico

Os bioensaios MIC (Mínima Concentração Inibitória) foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Jacqueline Aparecida Takahashi.

6.3.1 Procedimento para MIC Gram – Negativa (*Escherichia coli* e *Salmonella tiphymurium*), Gram – Positivas (*S. aureus* e *S. sanguinis*) e Levedura (*Candida albicans*)

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-inóculo no qual as bactérias (leveduras) estocadas em

tubos de ensaio foram transferidas 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-inóculo foram transferidos para 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 inóculos utilizados no teste.

Os testes foram realizados em placas de 96 micropoços, em duplicata. Em cada poço foram adicionados 100 µL do meio de cultura BHI. No poço 1 foram adicionados também 100 µL da solução de trabalho. Homogeneizou-se a solução e 100 µL foram transferidos para o próximo poço e assim sucessivamente. Desprezaram-se os 100 µL finais. Foram testadas 8 concentrações de cada amostra. A seguir, 100 µL do inóculo 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 inóculo (para se eliminar o efeito da coloração da solução de trabalho). Uma placa controle contendo 100 µL de meio de cultura BHI e 100 µL 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 0 h). Posteriormente, foram incubadas em estufa a 37 °C e após 24 h foram realizadas nova leitura das mesmas, encerrando o teste.

6.3.2 Procedimento de MIC para Fungos Filamentosos (*Aspergillus flavus* e *Fusarium proliferatum*)

As amostras foram pesadas e solubilizadas em Dimetilsulfóxido (DMSO) resultando em uma solução com concentração de 250 µg/mL. O meio utilizado para o crescimento dos micro-organismos foi o caldo Sabouraud, com concentração da suspensão de esporos de 5×10^5 esporos/mL e tempo de incubação das amostras de 48 horas.

A leitura dos dados foi realizada em leitor de placas de microtitulação com comprimento de onda a 490 nm.

O tratamento dos dados foi realizado através do teste de outlier: Teste de Grubbs, com nível de significância de 95%.

Cálculo da porcentagem de inibição foi realizado através da fórmula:

$$\%inibição = 100 - \frac{(EC-CC) \times 100}{CH-CM} \quad (3)$$

Sendo EC a absorbância do teste, CC a absorbância do controle da amostra, CH a absorbância do controle do fungo e CM a absorbância do controle do meio de cultura.

6.4 Bioensaio MIC para *Davilla kunthii*

O uso constante de antibióticos tem provocado uma série de problemas dentre os quais se destacam o desequilíbrio da ecologia humana e a resistência microbiana, fazendo com que se busquem novos antibióticos que sejam eficazes, abrindo caminhos para a evolução das pesquisas, pois o desenvolvimento de qualquer novo antimicrobiano vem acompanhado pela resistência dos microrganismos (ANTUNES et al., 2006). A emergência de patógenos resistentes é uma ameaça a esses avanços (MOELLERING Jr, 2000).

Esta vertente na pesquisa de novos compostos com ação antimicrobiana tem levado a comunidade científica a investigar a corrida medicamento x microrganismos, pois desde o início dos anos 80 o número de antimicrobianos em fase de desenvolvimento diminuiu consideravelmente, enquanto que a resistência dos microrganismos aos mesmos tem crescido de forma imensurável, porque eles estão cada vez mais desenvolvendo uma série de novos mecanismos de resistência (FILE Jr, 2000).

Observando isso, a comunidade científica avalia as atividades antimicrobianas de extratos vegetais, através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do

microrganismo-teste, esse valor é conhecido como Mínima Concentração Inibitória (MIC) (OSTROSKY et al., 2008).

Aspecto bastante relevante na determinação da MIC de extratos vegetais é a preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (PINTO et al., 2003).

De acordo com a literatura a espécie *Davilla elliptica* apresentou atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *B.cereus*, *Shigella* spp e *Candida albicans*, e que apenas o extrato Metanólico das folhas apresentou atividade contra *Enterococcus faecalis* e *Salmonella* spp (SORES et al., 2009). E segundo Lopes et al. (2007), observaram atividade antimicrobiana in vitro do extrato clorofórmico das folhas de *D. elliptica*, sugerindo efeito terapêutico potencial no controle microbiológico da tuberculose.

Através do ensaio da atividade antimicrobiana, foi possível verificar atividade do extrato etanólico bruto das folhas de *D. kunthii* frente às cepas de todos os microrganismos avaliados. O extrato etanólico bruto obtido da amostra coletada em Boa Vista-RR, apresentou uma variação MIC de 6,2% à 53,7% para as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. sanguinis*), MIC variando de 9,23% a 38,2% para as bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *S. typhimurium*) e MIC foi de 92,5% à 95,3% para a levedura *C. albicans* (Tabela 23).

Levando-se em conta, a MIC, mostrou que o extrato etanólico bruto da amostra coletada, foi mais ativo frente à levedura *Candida albicans*, em comparação com os antibióticos Miconazol e Nistatina.

As cepas Gram-positivas demonstram-se mais sensíveis aos extratos analisados do que as Gram-negativas em comparação com o antibiótico Ampicilina. E o bioensaio para fungos (*Aspergillus flavus* e *Fusarium proliferatum*), apresentou baixa atividade.

Como a amostra foi coletada em época seca, é possível que a época do ano e a localidade influenciaram na atividade antimicrobiana de *D. kunthii*. Porém, há a necessidade de novos estudos a partir de um número maior de coletas, pois não foram encontrados dados na literatura pesquisada sobre a atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto das folhas de *D. kunthii*.

Tabela 23 – Bioensaio de MIC do extrato etanólico de *Davilla kunthii*.

<i>Candida albicans</i>	% de Inibição do Crescimento	Miconazol	Nistatina
01 (500 µg)	92,519	92,325	93,300
02 (250 µg)	92,861	91,048	90,768
03 (125 µg)	92,644	90,706	90,141
04 (62,5 µg)	93,192	90,546	90,181
05 (31,25 µg)	93,431	91,150	90,917
06 (15,625 µg)	95,085	91,607	91,493
07 (9,375 µg)	95,381	91,515	91,259
08 (3,90625 µg)	94,800	91,282	91,424
<i>S aureus</i>	% de Inibição do Crescimento	Ampicillina	
01 (500 µg)	11,713	104,626	
02 (250 µg)	6,201	106,004	
03 (125 µg)	13,287	105,512	
04 (62,5 µg)	8,858	104,134	
05 (31,25 µg)	11,220	101,969	
06 (15,625 µg)	10,433	86,713	
07 (9,375 µg)	11,516	34,744	
08 (3,90625 µg)	0,000	14,862	
<i>S. sanguinis</i>	% de Inibição do Crescimento	Ampicillina	
01 (500 µg)	53,700	102,905	
02 (250 µg)	32,547	3,223	
03 (125 µg)	28,915	2,678	
04 (62,5 µg)	24,557	0,000	
05 (31,25 µg)	21,652	0,000	
06 (15,625 µg)	21,289	0,000	
07 (9,375 µg)	21,198	0,000	
08 (3,90625 µg)	0,000	0,000	
<i>Escherichia coli</i>	% de Inibição do Crescimento	Ampicillina	
01 (500 µg)	36,090	186,938	
02 (250 µg)	14,902	140,933	
03 (125 µg)	10,227	118,601	
04 (62,5 µg)	9,232	104,874	
05 (31,25 µg)	11,719	96,270	
06 (15,625 µg)	9,730	95,375	
07 (9,375 µg)	15,598	94,529	
08 (3,90625 µg)	11,371	79,559	
<i>Salmonella tiphymurium</i>	% de Inibição do Crescimento	Ampicillina	
01 (500 µg)	-1,980	228,381	
02 (250 µg)	-2,084	180,031	
03 (125 µg)	3,714	142,138	
04 (62,5 µg)	21,729	123,295	
05 (31,25 µg)	28,562	102,174	
06 (15,625 µg)	34,878	101,242	
07 (9,375 µg)	38,294	108,593	
08 (3,90625 µg)	34,981	100,932	
<i>Aspergillus flavus</i>	11,92		
<i>Fusarium proliferatum</i>	10,04		

Fonte: o Autor

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho cumpriu o objetivo principal que se fundamentou na ampliação do conhecimento, do gênero *Davilla kunthii* A. St. – Hil, através do estudo fitoquímico e ensaios biológicos das folhas.

O estudo fitoquímico realizado nas folhas de *Davilla kunthii* A. St. – Hil (Dilleniaceae), forneceu como resultado a substância Triacontan-1-ol (Álcool Melissílico), que é um estimulante, para promover a germinação das sementes, a taxa de germinação e o aumento no número de flores, e uma mistura de Estigmasterol e β - Sitosterol (Esteróides), e a mistura de Ésteres Metílicos. Suas estruturas foram elucidadas através da associação de técnicas espectroscópicas em IV, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C mono e bidimensional e DEPT 135.

Para a identificação dos ésteres metílicos foi usada a técnica de CG (Cromatografia Gasosa) em comparação com padrões, encontrando 48% de ácido Palmítico e 15,84% de ácido Oleico (C9).

No teste de toxicidade aguda do extrato etanólico da planta, não foi verificado uma grande quantidade de óbitos de *Artemia salina*, sendo considerado de baixa toxicidade (DL 50% superior a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), tendo sido encontrado o valor de DL_{50} de $1648,10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A notável atividade antioxidante frente ao DPPH é um bom indicativo de que a planta possui constituintes químicos detentores de forte capacidade de capturar radicais livres.

Foi possível, também, verificar atividade do extrato frente às cepas de todos os microrganismos avaliados, apresentando uma variação MIC (Mínima Concentração Inibitória) de 6,2 a 53,7% para as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. sanguinis*), MIC variando de 9,23 a 38,2% para as bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *S. typhimurium*) e MIC de 92,5 a 95,3% para a levedura *Candida albicans*, mostrando que o extrato etanólico bruto da amostra coletada, foi mais ativo frente à levedura *Candida albicans*, em comparação com os antibióticos Miconazol e Nistatina.

Este trabalho contribui com o estudo fitoquímico das Dilleniaceas, fornecendo dados sobre o gênero *Davilla*, através do lançamento de dados na literatura sobre a espécie *Davilla kunthii* A. St. -Hil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, V. G. C. **Estudo Fitoquímico e Biológico das Folhas, Caule e Flores de *Lychnophora pinaster* Mart.** Dissertação. (Departamento de Química do Instituto de Ciência Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais), Belo Horizonte, 2009.

ALDRICH-SIGMA, 2014. **Identification of The Substance/Mixture and of The Company/Undertaking.** Laboratory chemicals, Manufacture of substances, 2014.

AKIHISA T.; NAKAMURA Y.; TAGATA M.; TOKUDA H.; YASUKAWA, K.; UCHIYAMA, E.; SUZUKI, T.; KIMURA, Y.. **Anti-inflammatory and anti-tumor promoting effects of triterpene acids.** Chemical Biodiversid, vol. 4:2007. p. 224–231.

ALPIOVEZZA, A. R.; PINTO, M. S.; GOLÇALVES, 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. Vol 7 – nº 04, 2012.

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

ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária). **Procedimentos estatísticos aplicáveis aos Ensaio Biológicos.** Brasil IV, 1988.

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 antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes.** Revista brasileira de farmacognosia. 16(4): 517-524, Out./Dez. 2006.

ARAÚJO, M. E. M.; **Terpenóides, Sesquiterpenoides, Esteróides e Triterpenose carotenos: Química dos Produtos Naturais.** DQB, 2012.

AYMARD, G. **Dilleniaceae.** In **Flora of the Venezuela Guayana** (Berry, P., Holst, B. & Yatskievych, K. Mis. Bot. Gard. St. Louis. (eds). 4: 671-685, 1998.

AYMARD, G. **A New Species of Davilla (Dilleniaceae).** Amongst the Flora of São Paulo, Brasil. Caracas. Acta Botânica Venezuelica. 25 (2): p. 153-159, 2002.

AYMARD, G.; MILLER, J. **Dilleniaceae Novae Neotropicae III.** Sinopsis y adiciones a la Dilleniaceae del Peru. Candollea 49: 169-182, 1994.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. **Drug discovery from medicinal plants.** Life Sciences, 78, 431-441, 2005.

BARBOSA, C.S. **Avaliação Alelopática e Caracterização Fitoquímica do Extrato em Diclorometano de Folhas de *Curatella americana* L. (Lixeira).** Dissertação de Mestrado, Uberlândia – MG, 2011.

BARBOSA, R. I., OLIVEIRA, A. P. C.; LÔ, D. S. **Caracterização dos Ecossistemas Terrestres do Projeto de Assentamento Nova Amazônia (PANA) – Antiga Fazenda Bamerindus.** Ministério da Ciência e Tecnologia – IMPA – Base de Roraima, 2003.

BRASIL. **Câmara dos Deputados.** Base do pronunciamento do deputado Édio Lopes (PMDB/RR). Brasília: Imprensa Nacional. 2007. 12 p. anexo III GAB 574.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.

CALIXTO, J. B. **Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents).** Brazilian Journal and Biological Research, 33, p. 179-189, 2000.

CARREIRA, R. C. ***Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): Estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica.** São Paulo. 2007 199p. Tese (Biodiversidade vegetal e meio ambiente, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.). Universidade de São Paulo.

CASTRO, P. R. C; GONÇALVES, M. B.; SILVA, M. J.; RIBEIRO, S. A. **Ação de Estimulantes Vegetais no desenvolvimento do Girassol (*Helianthus annuus* L.).** Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, Scielo vol 40, nº 2 Piracicaba, 1983.

CORRÊA, N.M.; JUNIOR, F.B.C.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. **Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.41, n.1, p. 73-78, 2005.

DAVID, J. M.; SOUZA, J. C.; GUEDES, M. L. S.; DAVID, J. P.; **Estudo Fitoquímico de *Davilla rugosa*: flavonóides e terpenóides.** Scielo, 2005.

EL-AZIZI, M. M. ; ATEYA, A. M. SVOBODA, G. H. ; SCHIFF-JR., P. L. ; SLATKIN, D. J.; KNAPP, J. E. **Chemical constituents of *Curatella Americana* (Dilleniaceae).** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.69, p.360-361, 1980.

ESPINDOLA, A. P. D. M. **Triterpenóides de *Doliocarpus schottianus* Eichler E. Análise do Ácido Betulínico por Cromatografia Líquida de alta Eficiência.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2000.

FARIAS, E. S. **Propriedades físico-químicas e perfil dos ácidos graxos do óleo da semente de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet)**. Dissertação (Mestrado em química) UFRR, Boa Vista, 2013.

FERRAZ, V. P. **Certificado de Análise: Perfil de ácidos graxos**. Laboratório de Cromatografia – Instituto de Ciências Exatas/Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, 2012.

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 Cosmético – UNIFIL. I Simpósio Nacional de Iniciação Científica, 2011.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um modelo Multidisciplinar**. MultiCiência, 2006.

FONSECA, C. A. M.; **Estudo fitoquímico de *Curatella americana* L.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Roraima – Núcleo de Pesquisa e Pós – Graduação em Química, 2008.

FRAGA, C. N.; STEHMANN, J. R. **Novidades taxonômicas para Dilleniaceae brasileiras**. Rodriguésia: Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, vol. 61, p 7 – 12, 2010.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; BERG, C.V.D. **Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil**. Megadiversidade vol. 1 nº 1, 2005.

GOULART, M.O.F.; SANTANA, A.E.G.; LIMA, R.A.; CAVALCANTE, S.H.; CARVALHO, M.G.; BRAZ FILHO, R. **Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrofonas A e B**. Química Nova, v.16, n. 2, p.95-100, 1993.

GREGÓRIO, L.E. **Fitoquímica e atividade biológica de plantas do gênero *Mikania* (Asteraceae)**. Tese de doutorado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.

GUARALDO, L.; CHAGAS, D.A., KONNO, A.C.; KORN, G.P.; PFIFFER, T.; NASELLO, A.G. **Hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behavior**. J. Ethnopharmacology, 72: 61-67, 2000.

GURIB-FAKIM, A. **Medicinal plants: traditions of yesterday**. Molecular Aspect of Medicine, 27, 1-93, 2006.

GURNI, A.; KONIG, W. A.; KUBITZKI, K. **Flavonoid Glycosides and Sulphates from the Dilleniaceae**. *Phytochemistry*, v.20, p.1057-1059, 1981.

GURBUZ, I.; USTUN, O.; YESILADA, E.; SEZIK, E.; AKYUREK, N. **In vivo gastroprotective effects of live Turkish folk remedies against ethanol-induced lesions**. *Journal of Ethnopharmacology*, 83, 241-244, 2002.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. **Screening of some plants used in the brazilian medicine for treatment of infectious disease**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 97 (7), 1027-1031, 2002.

HORN, J.W. **Phylogenetics of Dilleniaceae using sequence data from four plastid loci**. *International Journal of Plant Sciences* 170: 794-813, 2009.

KIRKPATRICK, P. **Stitching together naturally**. *Nature*, 1, 748, 2002.

KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 1003-1010, 1994.

KUBITZKI, K.; SMITH, N. **Dilleniaceae: Flowering Plants of the Neotropics**. Princeton, New Jersey. Princeton University Press. p. 128 – 130, 2004.

KUSHIMA, H. **Avaliação da atividade antiulcerogênica dos extratos e frações das folhas de *Davilla elliptica* St. Hil e *Davilla nitida* (Vahl) kubitzki (Dilleniaceae)**. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2006.

LEHNINGER, A. L.; **Bioquímica: Tradução da 2^o edição Americana**, Supervisão: José Reinaldo Magalhães. São Paulo, 1976.

LINS, A. C. S. **Estudo Químico e Atividade Antioxidante de *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. Ex. Steud e Avaliação da Atividade Inibitória da Enzima DNA-Topoisomerase II- α Humana de Substâncias Naturais e Semi - Sintéticas**. Dissertação. (Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba João Pessoa, 2008.

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.

LOPES, F.C.M.; PLACERES, M.C.P.; JORDÃO Jr C.M.; HIGUCHI, C.T.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; LEITE, C.Q.F.; CARLOS, I.Z. **Immunological and microbiological activity of *Davilla elliptica* St. Hill. (Dilleniaceae) against *Mycobacterium tuberculosis***. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2007; 102(6): 769-72.

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

MASCARENHAS, R. E. B. **Plantas Daninhas de uma Pastagem Cultivada de Baixa Produtividade na Nordeste Paraense**. Planta Daninha, v. 17, n. 3, 1999.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B.; **Bioquímica básica**. – 3ªed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MEDINA, J. C. M. **Estudo químico e biológico de espécies vegetais da família Boraginaceae (Gêneros *Helitropium* e *Tournefortia*)**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá – Maringá, 2006.

MELO, M.C.; BARBOSA, R.I. **Arvores e Arbustos das savanas de Roraima: Guia de campo ilustrado**. Boa Vista, PMBV/CONSEMMA, 2007. 36p

MEYER, B. N. **Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents**. Planta medica, New York, v 45, p. 31 – 34, 1982.

MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DE RORAIMA (MPE-RR) 3ª PROMOTORIA DE JUSTIÇA CIVIL-MEIO AMBIENTE. **Legislação Ambiental: Federal, Estadual e Municipal**. Boa Vista-RR: Rio Branco Laminado Ltda, 2004.

MIRANDA, I.S.; ABSY, M.L.; REBÊLO, G.H. **Community structure of woody plants of Roraima Savannas, Brazil**. Plant Ecology, 164: 109-123, 2003.

MOELLERING Jr. **Novos desafios no campo das doenças infecciosas. In: Patógenos emergentes nas doenças infecciosas**. Relatório Especial Hospital Práctice. Euromédice. Ed. Médicas, 2000.

MOLYNEUX, P. **The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity**. Journal of Science Technology, v.26, n.3, p.211-219, 2004.

MOREIRA, M. S. A. **Análise Fitoquímica e Avaliação da Atividade Antiinflamatória de *Curatella americana* L.** Dissertação de Mestrado em Produtos Naturais Farmacologia e Química, Universidade Federal de Pernambuco, 1997.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KEN, J. **Biodiversity hotspots for conservation priorities**. Nature, v.403, p. 853 – 858, 2000.

NESTEL, P. et al. **Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters and non-esterified stanols in margarine, butter and low-fat foods**. European Journal of Clinical Nutrition, v. 55, n. 12, p. 1084-1090, 2001.

NIERO, R.; A. MALHEIROS. “**Terpenos**” in “**Química de Produtos Naturais. Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia**”, (R.A. Yunes, V. Cechinel Filho, eds.) Univali, Itajaí. 2007.

NOLDIN, V.F. **Estudo fitoquímico das folhas e rizomas de *Simaba ferrugínea* St. Hil. e avaliação da atividade antiúlcera e antinociceptiva dos extratos e compostos isolados.** Dissertação de mestrado, Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2005.

OLIVEIRA, H. H. **Razão entre ômega-6/ômega-3, AGPI/AGS e caracterização físico-química do óleo de *Colossoma macropomum* (tambaqui) cultivados no estado de Roraima.** Dissertação (Mestrado em Química), UFRR, Boa Vista, 2008.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais.** Revista Brasileira de Farmacognosia. 18(2): 301-307, Abr./Jun. 2008.

PAULA, V. F.; BARBOSA, L. C. A.; PILÓ-VELOSO, D.; DEMUNER, A. J.; HOWARTH, O. **Constituintes químicos da casca de *Ochroma lagopus swartz* (Bombacaceae).** Eclética Química, vol 23, São Paulo – 1998.

PINTO, J. E. B. P, LAMEIRA, O. A., SILVA, F. G. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares.** – Lavra: UFLA/FAEPE, 2006.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos.** 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p, 2003.

POTT, A; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal.** Embrapa – CPAP, Corumbá – MS, 1994.

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

RATES, S. M. K. **Plants as source of drugs.** Toxicon, 39, 603-613, 2001.

REBOUÇAS, F. S. **Cultivo *in vitro* de plantas Medicinais.** Dissertação de Mestrado. Cruz das Almas – Bahia, 2009.

RIBEIRO, et al. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central.** Manaus. INPA. p. 228 – 232, 1999.

ROCHA A. A. **Obtenção e Avaliação das Atividades Analgésica e Antiinflamatória do Extrato hidroalcoólico Bruto da Arnica Brasileira (*Solidago microglossa*, DC).** Franca, 2006. Dissertação. (Programa de Pós-Graduação da Universidade de Franca).

ROCHA, H. E. S.; SILVA, C. C. M.; NETO, L. B. C.; LOPES, A. D.; CITO, A. M. DAS G. L.; CHAVES, M. H. **Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol**. Química Nova, vol 30, nº8, São Paulo – 2007.

RODRIGUES, V. E.; CARVALHO, D. A. **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais do Cerrado na região do Alto Rio – Minas Gerais**. Ciência e Agrotecnologia, Lavras – MG, v.25, n.1, p. 102-123, 2001.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMENEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. **Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Comunicado técnico, Fortaleza - CE, 2007.

SALGADO, J. M.; BIN, C.; MANSI, D. N.; SOUZA, A. **Efeito do abacate (*Persea americana Mill*) variedade hass na lipídemia de ratos hipercolesterolêmicos**. Ciência e tecnologia de alimentos, Campinas, 28 (4), 2008.

SANTOS, V. B. **Caracterização físico – química e quantificação dos constituintes majoritários do óleo da semente da espécie *Charleston gray* (melancia) cultivada em Bonfim – RR**. Monografia (Graduação) – Licenciatura Plena em Química, UFRR – Boa Vista, 2008.

SILVA, D. A.; SILVA, T. M. S.; LINS, A. C. S.; COSTA, D. A.; CAVALCANTE, J. M. S.; MATIAS, W. N.; SOUZA, M. F. V. **Constituintes Químicos e Atividade Antioxidante de *Sida galheiros* Ulbr. (Malvaceae)**. Química Nova, Vol. 29, No. 6, 1250-1254, 2006.

SILVA, S. R. **Perfil dos Ácidos graxos, atividade antioxidante e caracterização Físico-química do óleo das sementes de três espécies de maracujá cultivadas no estado de Roraima**. Dissertação (Mestrado em química) UFRR, Boa Vista, 2011.

SILVA, D. F. **Extrato e fração de média polaridade de *Inga edulis*: estudos físico químicos, funcionais, citotóxicos e de penetração/retenção cutânea de formulações tópicas**. Dissertação de Mestrado - Ribeirão Preto, 2012.

SILVEIRA, J. H. **Uso da biodiversidade para produção de medicamentos**. Gazeta Mercantil, São Paulo, 2003.

SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T., **Antiinflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP, Tecmedd, p 480, 2004.

SILVA, S.R.; SILVA, A.P.; MUNHOZ, C.B.; SILVA JR., M.C.; MEDEIROS, M.B. **Guia de plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros**. Ed. WWF, Brasília, p.42, 2001.

SOARES M.L., REZENDE M.H., FERREIRA H.D., FIGUEIREDO A.D.L., BUSTAMANTE K.G.L., BARA M.T.F., PAULA J.R. **Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St. Hil. (Dilleniaceae).** *Rev Bras Farmacogn* 15: 352-360, 2005.

SCHULTZ A. **Introdução a Botânica Sistemática.** 4ª. Ed. Porto Alegre: Editora Universidade Federal do Rio Grande do Sul, vol. 2, p. 121, 1984.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.** *Química Nova* v.30, n.2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, M. P.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. N. E.; ROUQUAYROL, P. A. **Triterpenos de plantas do Nordeste brasileiro.** *Revista Brasileira de Farmacia*, p.67-70, 1970.

YOUNG, R. N. **Importance of biodiversity to the modern pharmaceutical industry.** *Pure Appl. Chem.*, vol. 71, n. 9, p. 1655 – 1661, 1999.

Respostas sobre RMN de ¹³C

<http://c13.usal.es/c13/usuario/views/inicio.jsp?lang=po&country=PO>
(NAPROC-13) > Acesso em: 18 de Outubro de 2013.

Distribuição geográfica de *Davilla kunthii*

<http://www.mobot.org/mobot/reserch/apweb/orders/dillenialesweb.html> >
Acesso em: 17 de Agosto de 2013.

[http://interbiota.org/portal/taxa/googlemap.php/taxon = *Davilla kunthii*](http://interbiota.org/portal/taxa/googlemap.php/taxon=Davilla_kunthii) > Acesso em: 17 de Agosto de 2013.

APÊNDICES

APENDICE A



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 41621-1	Data da Emissão: 07/10/2013 11:40
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Leandro da Silva Nascimento	CPF: 003.446.403-45
-----------------------------------	---------------------

SISBIO

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Taxons autorizados

#	Nível taxonômico	Taxon(s)
1	ESPECIE	<i>Davilla kunthii</i>
2	FILO	Magnoliophyta
3	REINO	Plantae

Fonte: o Autor.