



UFRR

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

**SIMONIA APARECIDA LIMA DO PRADO**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Aegiphila integrifolia***  
**(Jacq.)**

**Boa Vista, RR**

**2014**

SIMONIA APARECIDA LIMA DO PRADO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Aegiphila integrifolia*  
(Jacq.)**

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco das Chagas do Nascimento

**Boa Vista, RR**

**2014**

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

P896 e Prado, Simonia Aparecida Lima do  
Estudo fitoquímico e atividade biológica de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.) / Simonia Aparecida Lima do Prado. --  
Boa Vista, 2014.  
85 p. : il.

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

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

1 – Fitoquímica. 2 – Lamiaceae. 3 – Flavonoide. 4 – Triterpenos. I - Título. II – Nascimento, Francisco das Chagas do (orientador).

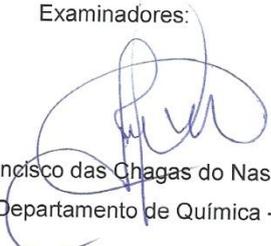
CDU 581.192

SIMONIA APARECIDA LIMA DO PRADO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Aegiphila integrifolia*  
(Jacq.)**

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

Examinadores:



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



Profª Dra. Adriana Akemi Okuma  
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG)



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

O importante não é vencer todos os  
dias, mas lutar sempre.  
Santo Agostinho.

O amor é a escala pela qual nos elevamos a DEUS.  
Friedrich Von Schiller.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por nunca me deixar desistir nos momentos de fraqueza e a NOSSA SENHORA APARECIDA pela sua proteção.

Aos meus pais Alcides e Dilce pelo amor e carinho que tem me dedicado durante toda minha vida.

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

Ao corpo docente do curso de Pós-Graduação em Química, em especial aos Coordenador Professor Dr. Antonio Alves de Melo Filho, Dr. Habel Nasser Rocha da Costa, Professora MSc Ednalva Dantas, Técnica Elenilda Rebouças e o Secretário Pedro Rômulo Estevão Ribeiro.

Ao Programa do curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Roraima.

À minha amiga querida e bolsista Wélida do Nascimento de Oliveira que foi fundamental para a realização da minha pesquisa.

Ao meu amigo doutorando Ricardo Carvalho dos Santos.

Ao Professor Dr. Reinaldo Imbrózio Barbosa, Pesquisador do Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA, pela ajuda na identificação Botânica da Planta.

Aos meus amigos alunos do Mestrado em Química do Laboratório de Produtos Naturais da UFRR, em especial Leandro da Silva Nascimento, Shirley Aparecida Carvalho Rabelo e Graciliano Rosa Silva, pela ajuda na realização do Ensaio de Toxicidade: *Artemia Salina* e principalmente pelo incentivo para seguir adiante.

Aos meus amigos mestrandos: Carlos Alberto Lima, Jomara Oliveira e Silva, Janes Santos e Oliveira Souza pela alegria que contagiava todos no Laboratório.

O Bibliotecário Lauro Sousa pela sua ajuda com as referências bibliográficas e pela sua amizade.

Ao Departamento de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, em especial o Professor Dr. Ângelo Cunha Pinto pela ajuda na interpretação dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , HMQC, HMBC.

Ao Instituto de Química – Universidade Federal de Minas Gerais, em especial a Dra. Vany Ferraz do Laboratório de Cromatografia- UFMG, pela ajuda na identificação dos óleos. Também ao Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios no Departamento de Química da UFMG a Professora Jacqueline Aparecida Takahashi pela ajuda na realização de alguns testes biológicos

Ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica – Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste, em especial a Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa pela ajuda nos espectros de massas.

Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, em especial o Professor Dr. José Ricardo Sabino.

Aos meus colegas da iniciação científica Francisco Santos, Náilon de Moraes e Wilson Botelho.

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

Ao REUNI pela bolsa de estudo de que foi de imensa importância para realização da minha pesquisa.

A todos aqueles que direta e indiretamente fizeram parte deste trabalho, meu muito obrigada.

## RESUMO

A presente dissertação apresenta o estudo fitoquímico e avaliação biológica do extrato etanólico das folhas de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.) pertencente à família Lamiaceae. O estudo fitoquímico realizado com eluato clorofômico do extrato etanólico das folhas levou ao isolamento e identificação de uma mistura de ácidos graxos na forma de seus ésteres metílicos, uma mistura de,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e lupeol glicosilados, um flavonoide conhecido como Pectolinarigenina. As misturas de ésteres metílicos foram analisadas e determinadas por Cromatografia Gasosa. As determinações estruturais foram realizadas por meio de métodos espectrométricos mono e bidimensionais como IV, RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz), RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz), HSQC, HMBC, ESI-EM e comparação com dados da literatura. O estudo biológico do extrato etanólico apresentou um bom resultado quanto à atividade antioxidante pelo método DPPH comparado ao padrão quercetina. A investigação da toxicidade, de acordo com o teste realizado frente à *Artemia salina* indicou a baixa toxicidade (DL 50% superior a  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e quando comparado com valores encontrados na Literatura confirma a baixa toxicidade do gênero *Aegiphila* frente à *Artemia salina*. Os ensaios da MIC para os fungos filamentosos, bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas e levedura, apresentaram baixa inibição comparadas com os antibióticos Ampicilina, exceto a levedura *Cândida albicans*. Esta apresentou inibição satisfatória, 96% aproximadamente para a amostra RR05 (do flavonoide) e 92% para amostra R06 (extrato etanólico) comparando aos antibióticos Nistatina e Miconazol (91%).

Palavra-chave: Fitoquímica. Lamiaceae. Flavonoide. triterpenos.

## ABSTRACT

This dissertation presents the phytochemical study and biological evaluation of the ethanol extract of *Aegiphila integrifolia* (Jacq.) belonging to the family Lamiaceae. The phytochemical study of chloroformic eluate of ethanol leaf extract led to the isolation and identification of a mixture of fatty acids as their methyl esters, a mixture of,  $\beta$  - sitosterol, stigmasterol and lupeol glycosylated a flavonoid known as Pectolarigenin. Mixtures of methyl esters were analyzed and determined by gas chromatography. Structural determinations were made by means of spectroscopic methods such as mono-and two-dimensional IR,  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz), HSQC, HMBC, ESI-MS and comparison with literature data. The biological study of the ethanol extract showed a good result for antioxidant activity by DPPH method compared to standard quercetin. The investigation of the toxicity of the test conducted according front *Artemia salina* indicated low toxicity (LD 50 % up to 500 mg mL<sup>-1</sup>) and compared to values found in literature confirming the low toxicity of the genus *Artemia salina* front *Aegiphila*. The MIC tests for filamentous fungi, Gram - Positive and Gram-Negative Bacteria and yeast showed low inhibition compared with Ampicillin antibiotics except the yeast *Candida albicans*. This inhibition was satisfactory, approximately 96% to RR05 sample (the flavonoid) and 92% for sample R06 (ethanol extract) comparing antibiotic Nystatin and Miconazole (91%).

Keyword: Phytochemistry. Lamiaceae. Flavonoid. triterpenes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa de distribuição da família Lamiaceae em amarelo.....	18
Figura 2 -	Substâncias isoladas das folhas e caules de <i>Hyptidendron canum</i> .....	21
Figura 3 -	Ligninas isoladas de <i>Eriope blanchetti</i> .....	22
Figura 4 -	Flavonoides isolados das folhas de <i>Leonurus sibiricus</i> .....	23
Figura 5 -	Metabólitos secundários isolados de <i>Hypenia salzmannii</i> (Benth).....	24
Figura 6 -	Metabólitos secundários isolados de <i>Rosmarinus officinalis</i> da família Lamiaceae.....	25
Figura 7 -	Apresenta as substâncias isoladas da espécie <i>Peltodon radicans</i> .....	26
Figura 8 -	Estrutura química esteróides: estigmasterol, campesterol e $\beta$ -sitosterol.....	27
Figura 9 -	Espécie <i>Aegiphila integrifolia</i> (Jacq.).....	29
Figura 10 -	Coluna cromatográfica clássica de <i>Aegiphila integrifolia</i> (Jacq.).....	35
Figura 11	Fitoconstituintes isolados da espécie <i>A. integrifolia</i> .....	45
Figura 12 -	Estruturas química Pectolarigenina.....	46
Figura 13 -	Mistura de $\beta$ -sitosterol glicosilado (1), estigmasterol glicosilado (2) e lupeol glicosilado (3) de <i>Aegiphila integrifolia</i> (Jacq.).....	47
Figura 14 -	Cromatograma dos ésteres metílicos em óleo de <i>Aegiphila integrifolia</i> (jacq.).....	49
Figura 15 -	Estrutura de ácidos graxos saturados e insaturados.....	51
Figura 16 -	Espectro na região do Infravermelho de AIEC-3.....	52
Figura 17 -	Espectro de massas de pectolarigenina.....	53
Figura 18 -	Espectro RMN de $^1\text{H}$ AIEC-3.....	54
Figura 19-	Mapa de contornos HSQC de AIEC-3 (500 X 125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	55
Figura 20 -	Mapa de contornos HMBC de AIEC-3 (500 x125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	56
Figura 21 -	Ortep do monocristal de AIEC-3.....	59
Figura 22 -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de AIEC-4.....	59
Figura 23 -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de AIEC-4.....	60
Figura 24 -	$\beta$ -Sitosterol Glicosilado e Estigmasterol Glicosilado.....	61
Figura 25 -	Lupeol Glicosilado.....	62
Figura 26 -	Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos.....	62
Figura 27 -	Estrutura básica dos flavonoides. A quercetina possui substituintes-OH nas posições 3, 5, 7, 3', 4'.....	65
Figura 28 -	Estabilização do Radical Livre DPPH.....	66
Figura 29 -	Curva da Concentração de <i>Aegiphila integrifolia</i> X Absorbância.....	66
Figura 30 -	Curva da Concentração de DPPH X Absorbância.....	68
Figura 31 -	Curva da Concentração de Quercetina X Absorbância.....	69
Figura 32	Curva analítica da Concentração de <i>Aegiphila integrifolia</i> X	

	Absorbância.....	70
Figura 33 -	N <sup>o</sup> de náuplios mortos x Concentração do E.E. da A. <i>integrifolia</i> .....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Porcentagem e composição do óleo essencial das folhas de <i>Aegiphila ihotzkiana</i> .....	28
Tabela 2 -	Coluna filtrante do extrato etanólico de <i>Aegiphila integrifolia</i> (Jacq.).....	34
Tabela 3 -	Fracionamento cromatográfico do eluato clorofórmico das folhas de <i>Aegiphila Integrifolia</i> (Jacq.).....	36
Tabela 4 -	Grupos originados do fracionamento cromatográfico do eluato clorofórmio das folhas de <i>Aegiphila integrifolia</i> (Jacq.).....	37
Tabela 5 -	Fracionamento cromatográfico do grupo 03.....	39
Tabela 6 -	Subgrupos originados da cromatografia do grupo 03.....	39
Tabela 7 -	Fracionamento cromatográfico das frações 19-25, proveniente do grupo 03.....	40
Tabela 8 -	Fracionamento cromatográfico das frações 26-34, proveniente do grupo 03.....	40
Tabela 9 -	Fracionamento cromatográfico do grupo 06.....	41
Tabela 10 -	Fracionamento cromatográfico do grupo 18.....	42
Tabela 11 -	Fracionamento cromatográfico das frações 2-9, proveniente do grupo 18.....	42
Tabela 12 -	Fracionamento cromatográfico das frações 101-109, proveniente do grupo 18.....	43
Tabela 13 -	Grupos originados do fracionamento cromatográfico das frações 101-109, proveniente do grupo 18.....	43
Tabela 14 -	Fracionamento cromatográfico do grupo 34.....	44
Tabela 15 -	Subgrupos originados da cromatografia do grupo 34.....	44
Tabela 16 -	Tempo de retenção por CG de ésteres metílicos.....	50
Tabela 17 -	Normalização da área do Tempo retenção de ésteres metílicos.....	50
Tabela 18 -	Correlações observadas no mapa de contornos HMBC de AIEC-3.....	56
Tabela 19 -	Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H de AIEC-3 e Pectolarigenina.....	57
Tabela 20 -	Comparação dos dados de RMN de <sup>13</sup> C (HMBC) de AIEC-3 e Pectolarigenina.....	58
Tabela 21 -	Comparação dos dados de RMN de <sup>13</sup> C da mistura de AIEC-4 com $\beta$ -Sitosterol glicosilado, Estigmasterol glicosilado e Lupeol glicosilado.....	63
Tabela 22 -	Preparo das soluções para a curva analítica do DPPH.....	67
Tabela 23 -	Valores de EC <sub>50</sub> do DPPH.....	68

Tabela 24 -	Valores de EC 50 da Quercetina.....	69
Tabela 25 -	Valores de EC <sub>50</sub> do extrato etanólico de <i>Aegiphila integrifolia</i> .....	70
Tabela 26 -	Letalidade frente à <i>Artemia salina</i> .....	72
Tabela 27 -	Valores de DL <sub>50</sub> frente à <i>Artemia salina</i> .....	73
Tabela 28 -	Bioensaio de MIC das amostras RR05 e RR06.....	76
Tabela 29 -	MIC para os Fungos Filamentosos e Bactérias Gram-Positivas, Gram-Negativas e Levedura.....	77

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Tratamento das folhas de <i>Aegiphila integrifolia</i> (Jacq.) .....	33
Esquema 2	Extratos das folhas de <i>Aegiphila integrifolia</i> (Jacq) .....	34
Esquema 3	Fracionamento e substâncias isoladas do extrato etanólico de <i>Aegiphila Integrifolia</i> .....	45

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Gêneros da Família Lamiaceae.....	20
Quadro 2	Classificação botânica de <i>Aegiphila integrifolia</i> .....	30

## ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\delta$	Deslocamento químico
$\mu\text{L}$	Microlitro
AIEC	Símbolo usado para as substâncias isoladas de <i>Aegiphila integrifolia</i> , extrato clorofórmico
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
$\text{CDCl}_3$	Clorofórmio deuterado
D	<i>Dupleto</i>
$\text{EC}_{50}$	Concentração máxima efetiva
$\text{DL}_{50}$	Dose letal mediana
eV	elétron-Volts
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlattion</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
Lit.	Literatura
MHz	Megahertz
m/z	Razão entre massa e carga
OMe	Metoxila
ORTEP	Oak Ridge Thermal-Ellipsoiol Plot Program
RMN de $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de $^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
S	<i>Singlete</i>
HR-ESI-MS	<i>Hligh Resolution Eletron Spray Ionization Mass Spectra</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>

DMSO	Dimetilsulfóxido
MIC	Mínima Concentração Inibitória
RR05	Flavonoide pectolinarigenina
RR06	Extrato etanólico
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazil
IK	índice de Kovats
SD	Desvio padrão
N	Número de amostras

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	17
2.1	Objetivo geral.....	17
2.2	Objetivo específico.....	17
3	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
3.1	Considerações gerais sobre a família lamiaceae.....	18
3.2	Considerações gerais sobre o gênero <i>Aegiphila</i> .....	27
3.3	<b>TAXONOMIA BOTÂNICA DA FAMÍLIA LAMIACEAE E DA ESPÉCIE</b> <i>Aegiphila</i> .....	29
3.4	Distribuição geográfica de <i>Aegiphila integrifolia</i> .....	30
4	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	31
4.1	Especificação de materiais, métodos e instrumentos utilizados...	31
4.2	Isolamento dos Constituintes Químicos de <i>Aegiphila integrifolia</i> .	32
4.2.1	<b>Coleta e Identificação do Material Vegetal</b> .....	32
4.2.2	<b>Extratos das folhas de <i>Aegiphila integrifolia</i></b>	33
4.2.3	<b>Coluna filtrante do extrato etanólico das folhas de <i>Aegiphila integrifolia</i></b> .....	34
4.2.4	<b>Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das folhas de <i>Aegiphila integrifolia</i></b> .....	34
4.2.4.1	Grupo 01 .....	37
4.2.4.2	Grupo 03 .....	38
4.2.4.3	Grupo 06 .....	41
4.2.4.4	Grupo 18 .....	41
4.2.4.5	Grupo 34 .....	43
4.2.5	<b>Resumo do estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de <i>Aegiphila integrifolia</i> (Jacq.)</b> .....	44
4.3	Dados físico-químicos de substância e misturas isoladas.....	46
4.3.1	<b>AICE-1 (Mistura de ésteres)</b> .....	46
4.3.2	<b>Flavonoide: AIEC-3 de</b> <b>(Pectolinarigenina)</b> .....	46
4.3.3	<b>AIEC-4 (Mistura de <math>\beta</math>-Sitosterol, Estigmasterol e Lupeol glicosilados)</b> .....	47
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	49
5.1	Determinações estruturais de substância e misturas isoladas.....	49
5.1.1	<b>Misturas de ésteres (AIEC-1)</b> .....	49
5.1.2	<b>AIEC-3 (Pectolinarigenina)</b> .....	52
5.1.3	<b>Mistura de <math>\beta</math>-sitosterol, estigmasterol e lupeol glicosilados (AIEC-4)</b> .....	60
6	<b>ENSAIOS BIOLÓGICOS</b> .....	64
6.1	<b>DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO DPPH</b> .....	64
6.2	<b>DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL</b> .....	67

6.3	.....	
	CÁLCULO DE CALIBRAÇÃO DO DPPH	68
7	<b>BIOENSAIO PRELIMINAR COM EXTRATO ETANÓLICO</b>	
	<b>AEGIPHILA</b>	
	<b>INTEGRIFOLIA</b>	70
7.1	.....	
	ENSAIO DE TOXICIDADE ORGANISMO BIOINDICADOR:	
	<i>ARTEMIA SALINA</i> .....	70
7.2	METODOLOGIA EMPREGADA .....	71
7.2.1	<b>Incubação</b>	71
7.2.2	<b>Exposição</b>	72
7.3	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO TESTE DE	
	TOXICIDADE .....	72
7.4	CÁLCULO DE CALIBRAÇÃO FRENTE À <i>Artemia salina</i>	73
8	<b>BIOENSAIO DE MIC (Mínima Concentração Inibitória) PARA</b>	74
	<b>FUNGOS FILMENTOSOS.....</b>	
8.1	METODOLOGIA.....	74
8.2	DADOS DA LEITURA:.....	74
8.3	TRATAMENTO	
	DADOS:.....	DOS 74
8.4	METODOLOGIA EMPREGADA PARA AS BACTÉRIAS GRAM-	
	POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS E LEVEDURA	75
8.5	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	76
10	<b>CONCLUSÃO.....</b>	78
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	80

## 1 INTRODUÇÃO

Registros históricos sobre a utilização de plantas para o tratamento de enfermidades existem desde 4000 a.C. O primeiro registro médico datado é de 2100 a. C. e está depositado no Museu da Pensilvânia. No qual inclui uma coleção de fórmulas de trinta diferentes drogas de origem vegetal, animal ou mineral (DUARTE, 2006).

O registro de plantas medicinais existem a muito tempo, segundo Duarte (2006), o Manuscrito Egípcio “Ebrs Papyrus” (1500 a.C.), contém 811 prescrições e 700 drogas e o primeiro texto Chinês sobre plantas medicinais (500 a.C.) relata nomes, doses e indicações de uso de planta para tratamento de doenças. Algumas dessas plantas ainda são utilizadas, como Ginseng (*Panax ssp*), *Ephedra ssp*, *Cássia ssp* e *Rheum palmatum* L., inclusive como fontes para indústrias farmacêuticas.

A cura de vários tipos de enfermidades com plantas medicinais é conhecida desde os tempos primórdios onde o ser humano pela necessidade e a carência de outros recursos, buscavam na natureza soluções para melhorar suas condições de vida, aumentando suas chances de sobrevivência (JESUS, 2008).

Nos últimos anos em função do desenvolvimento de técnicas avançadas de espectroscopia e cromatografia vem aumentando, significativamente, o estudo de produtos naturais. As substâncias naturais isoladas por meio de técnicas fornecem matéria-prima de grande importância na fabricação de diversos produtos industrializados, o que requer um conhecimento de suas propriedades físicas e químicas (JUNIOR, SOUZA, CHAVES, 2005).

A diversidade de plantas dos biomas brasileiros, tais como cerrado, a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica têm sido empregadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de muitas enfermidades tropicais, as quais incluem esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções fúngicas e bacterianas, dentre outras. Portanto, muitas plantas exóticas foram inseridas na cultura brasileira desde a colonização e incorporadas na medicina popular (DUARTE, 2006).

O conhecimento sobre plantas medicinais representam, na grande maioria, o único recurso terapêutico de diversas comunidades e etnias. Atualmente, em regiões mais carentes do nosso país e até mesmo nos grandes centros brasileiros, plantas

medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e cultivadas em residenciais (MACIEL, 2002).

Uso de plantas medicinais no Brasil pelos indígenas agregou-se ao conhecimento trazido pelos colonizadores europeus, desenvolvendo assim a fitoterapia. A utilização das plantas medicinais, o decorrer do tempo necessitou de aprofundamento dos estudos de suas técnicas, passando a exigir métodos e técnicas que possibilitem maior aproveitamento das plantas. Métodos modernos requerem a associação de profissionais de várias áreas de conhecimento, como biólogos, farmacologistas, químicos, bioquímicos, dentre outros, que contribuem no melhoramento e qualidade da pesquisa (BRAGA, 2011).

No Brasil, segundo Filho (2010), a relativa facilidade de coleta, a condição ambiental favorável para desenvolvimento sustentável, a biodiversidade estrutural de substâncias orgânicas naturais e a possibilidade de descoberta de princípios ativos entre tais constituintes químicos permitem diagnosticar e destacar as plantas brasileiras como a principal fonte renovável para o surgimento e desenvolvimento de novos fármacos, além de outros produtos que podem ser utilizados para finalidades sociais adicionais.

Os produtos da flora brasileira têm despertado grande interesse econômico científico desde a época da colonização até os dias atuais. A riqueza nacional é desvendada, principalmente na flora amazônica, onde são descobertas plantas com propriedades tintoriais, odoríficas, estimulantes, condimentosas, alucinogênicas, resinosas balsâmicas, além disso, plantas utilizadas pelos indígenas na caça e na pesca, além das que fornecem madeiras para fabricação de móveis entre outros fins, conseqüentemente, sujeitas a exploração (PACHÚ, 2007).

“A biodiversidade das florestas tropicais serve também como foco para a descoberta de novas plantas medicinais. A interação entre plantas tropicais e seus predadores naturais pode ser usada como suporte para a descoberta de substâncias ativas e, como conseqüência, orientar as investigações farmacológicas” (FILHO, 2010, p. 231).

O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribui de forma significativa para a divulgação dos benefícios terapêuticos dos vegetais, prescritos com freqüência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. O interesse de pesquisadores

pelos estudos em áreas multidisciplinares contribui enriquecendo os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL, 2002).

O metabolismo das plantas depende de sua fisiologia, portanto pode ser dividida em metabolismo primário e secundário (PROBST, 2012).

Segundo Medina (2006), a avaliação do potencial terapêutico das plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, entre outros, tem sido objeto de estudos, que comprovam suas ações farmacológicas por meio de testes pré-clínicos com animais.

Nos países industrializados observa-se uma crescente parcela da população que utiliza plantas medicinais. Uma grande variedade de plantas é utilizada pelas indústrias no preparo de um vasto espectro de derivados de extratos com um alto conteúdo de constituintes ativos, com capacidade inclusive, de chegar a produtos quimicamente puros para serem utilizados diretamente como medicamento ou como componente na elaboração de outros produtos (CORNELIUS, 2006).

No passado, acreditava-se que os compostos secundários eram produtos sem valores, ou mesmo resultantes de erro metabólico das plantas. Entretanto, a partir da década de 50, após vários estudos envolvendo diversas áreas do conhecimento, o metabolismo secundário passou a ser bem compreendido e aceito (PROBST, 2012).

O estudo dos constituintes químicos e das atividades biológicas de espécies vegetais vem tomando importantíssimo lugar em pesquisas científicas. Seja pelo conhecimento das estruturas das substâncias envolvidas na ação dos medicamentos das plantas, sejam para fazer modificações nas estruturas com intenção de adaptarem-se as atividades biológicas ao interesse da pesquisa (MEDINA, 2006).

A química de produtos naturais tem por objetivo principal o esclarecimento e o registro dos constituintes resultantes do metabolismo especiais dos seres vivos, por meio do isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares. Permitindo a descoberta de fontes de substâncias ativas, além de contribuir para o entendimento da biodiversidade, facilitando os estudos de composição química de animais e vegetais. Assim, contribuindo maiores números de trabalhos publicados no campo da fitoquímica (CORNELIUS, 2006).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o Estudo Fitoquímico e a investigação das atividades biológicas das folhas da espécie *Aegiphila integrifolia* (Jacq.).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar os fitoconstituintes do eluato clorofórmio do extrato etanólico da espécie *Aegiphila integrifolia* (Jacq.), através de técnicas cromatográficas em coluna.
- Monitorar as frações isoladas por meio de cromatografia em camada delgada de comparativa.
- Determinar a estrutura das substâncias isoladas através da utilização de técnicas espectroscópicas mono e bidimensional de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMQC, HMBC e espectrometria de massas.
- Realizar testes biológicos (teste de antioxidante por captura de DPPH, o teste toxicidade frente à *Artemia salina*, Bioensaio de Mínima Concentração Inibitória para os Fungos Filamentosos, Bactérias Gram-Positivas, Gram-Negativas e Levedura) com extratos e, frações da espécie em estudo.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA LAMIACEAE

A família Lamiaceae possui distribuição cosmopolitana incluindo cerca de 300 gêneros e 7500 espécies. No Brasil ocorrem 26 gêneros, com aproximadamente 350 espécies (ARAUJO et al., 2010).

São representadas por ervas, arbustos e árvores e possuem uma grande importância econômica tanto na horticultura quanto na medicina popular. Muitas das espécies dessa família são, particularmente, bem representadas nas regiões tropicais e temperadas, especialmente em climas com características sazonais, tais como na região Mediterrânea e nos planaltos das savanas tropicais. Enquanto algumas espécies vivem em condições semi-áridas, muitas outras estão adaptadas em habitat úmido, áreas inundáveis ou ao longo das margens de rios fluviais (LIMA et al., 2008). A figura 1 apresenta em destaque em amarelo, a família Lamiaceae.

Figura 1 - Mapa de distribuição da família Lamiaceae em amarelo



Fonte: <http://www.tropicos.org/Name/42000291?tab=maps>

Em Lamiaceae estão incluídas muitas ervas aromáticas cultivadas no Brasil, como a lavanda (*Lavandula angustifolia*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), o poejo (*Mentha pulegium*), a alfavaca (*Ocimum basilicum*), o alfavação (*Ocimum gratissimum*), o orégano (*Origanum vulgare*), o boldo-brasileiro (*Plectranthus*

*barbatus*), o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), o tomilho (*Thymus vulgaris*) e a hortelã (*Mentha* spp.). Além disso, várias espécies são cultivadas como ornamentais, com destaque para a sálvia (*Salvia splendens*), a lágrima-de-cristo (*Clerodendron thomsonae*) e o cóleus (*Solenostemon scutellarioides*). O rubim (*Leonurus japonicus*) e o cordão-de-frade (*Leonotis nepetifolia*) são duas invasoras de culturas comuns. Nos cerrados e campos rupestres brasileiros são frequentes espécies de *Eriope* e *Hyptis*. Entre as árvores destacam-se espécies de *Aegiphila* (Tamanqueira) e *Vitex* (Tarumã) (SOUZA e LORENZE, 2008, p.586).

Segundo Souza e Lorenze (2008), trabalhos recentes em filogenia evidenciaram que Lamiaceae apenas formaria um grupo monofilético com a inclusão de alguns gêneros tradicionalmente reconhecidos em Verbenaceae, os quais apresentam estilete terminal, característica utilizada, anteriormente, para distinção destas duas famílias. Com isto, ampliou-se a circunscrição e o número de gêneros em Lamiaceae. De acordo com a circunscrição atualmente aceita, Lamiaceae poderia ser distinta de Verbenaceae por possuir inflorescência cimosa e pólen com exina não espessada próximo às aberturas. O Quadro 1 p. 20, mostra vários gêneros nativos e introduzidos nessa família.

Quadro 1 – Gêneros da Família Lamiaceae

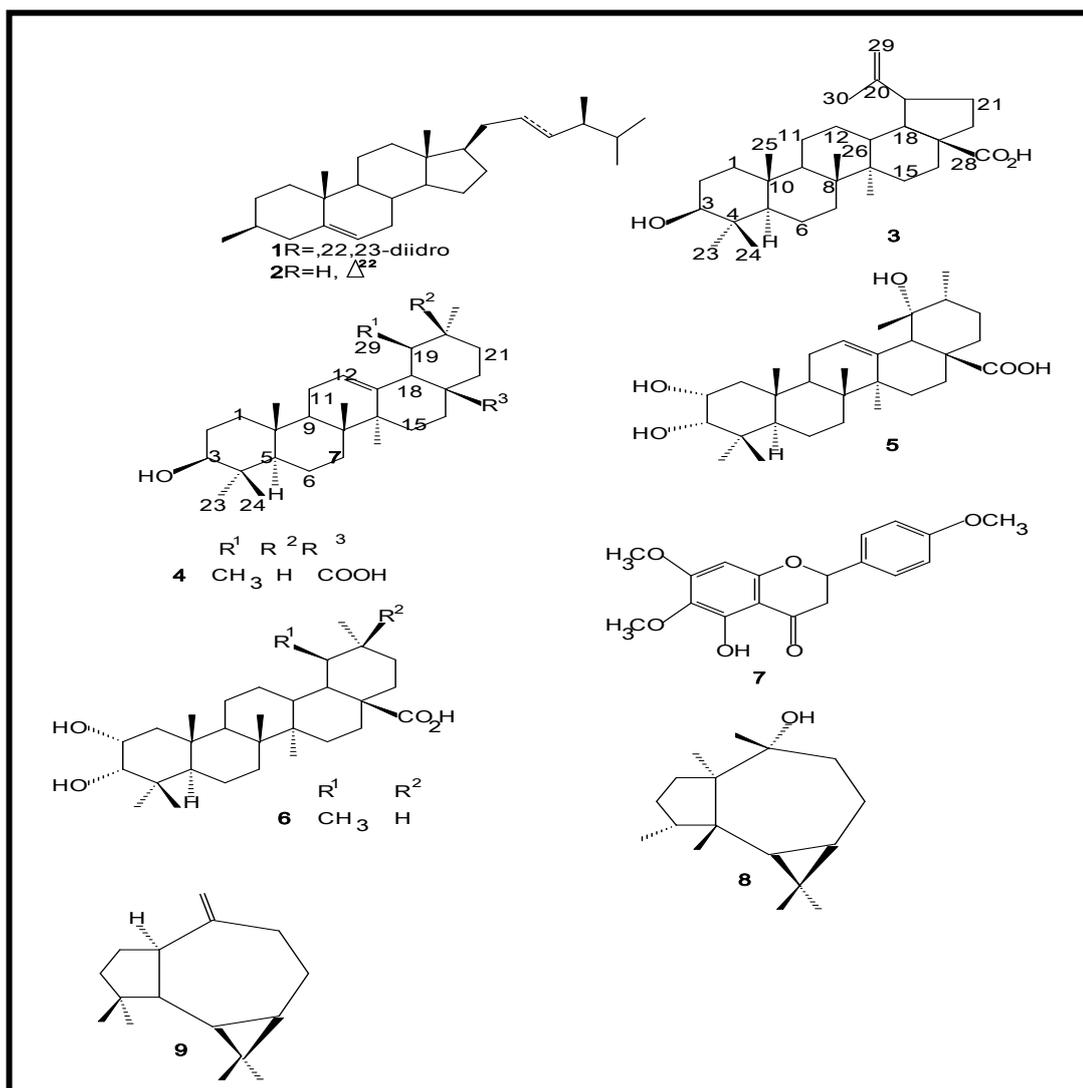
GÊNEROS NATIVOS	GÊNEROS INTRODUZIDOS
<i>Aegiphila</i>	<i>Aeolanthus</i>
<i>Amasonia</i>	<i>Ajuga</i>
<i>Clinopodium</i>	<i>Callicarpa</i>
<i>Cornutia</i>	<i>Clerodendron</i>
<i>Cunila</i>	<i>Glechoma</i>
<i>Eriope</i>	<i>Gmelina</i>
<i>Eriopidion</i>	<i>Holmskioldia</i>
<i>Eriothymus</i>	<i>Hyssopus</i>
<i>Glechon</i>	<i>Lamium</i>
<i>Hedeoma</i>	<i>Lavandula</i>
<i>Hesperozygis</i>	<i>Leonotis</i>
<i>Hoehnea</i>	<i>Leonurus</i>
(= <i>Keithia</i> )	<i>Leucas</i>
<i>Hypenia</i>	<i>Marrubium</i>
<i>Hyptidendron</i>	<i>Melissa</i>
<i>Hyptis</i>	<i>Mentha</i>
<i>Lepechinia</i>	<i>Molucella</i>
<i>Marsypianthes</i>	<i>Nepeta</i>
<i>Monochilus</i>	<i>Origanum</i>
<i>Ocimum</i>	<i>Perilla</i>
<i>Peltodon</i>	<i>Physostegia</i>
<i>Rhabdocaulon</i>	<i>Plectranthus (=Coleus)</i>
<i>Rhaphiodon</i>	<i>Pogostemon</i>
<i>Salvia</i>	<i>Prunella</i>
<i>Satureja</i>	<i>Romarinus</i>
<i>Scutellaria</i>	<i>Solenostemon</i>
<i>Stachys</i>	<i>Tectona</i>
<i>Teucrium</i>	<i>Tetradenia (= Iboza)</i>
<i>Vitex</i>	<i>Thymus</i>

Fonte: Souza e Lorenzei (2008).

As espécies da família Lamiaceae acumulam substâncias com grandes diversidades estruturais, tais como esteroides, flavonoides, iridoides e terpenoides, incluindo os triterpenos pentacíclicos. Estes, últimos são conhecidos por apresentarem atividades, antitumoral, anti-HIV, antiinflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, entre outras Connly Hill (2009 apud LEMES et al., 2011).

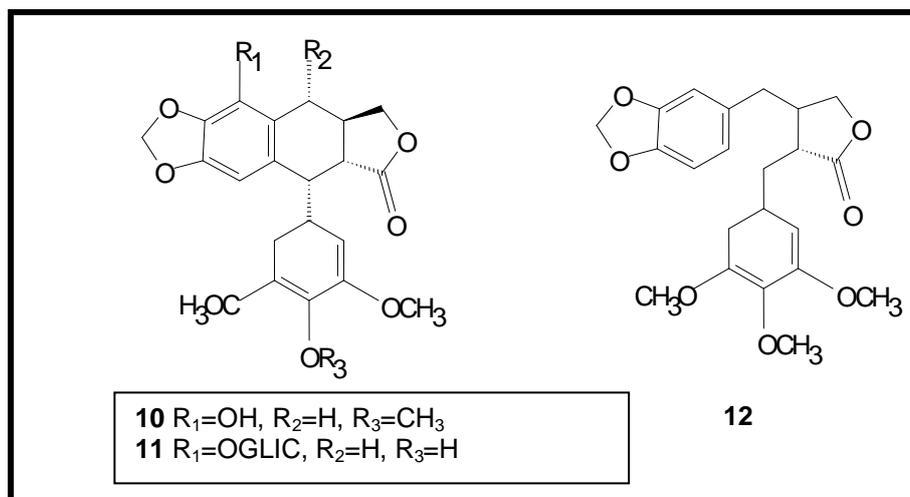
As substâncias descritas, Figura 2 p. 21, pertencem a família Lamiaceae e foram isoladas das folhas e caules de *Hyptidendron canum*. A mistura de sistosterol (1) e estigmasterol (2), ácidos betulínico (3), ursólico (4), do 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,19 $\alpha$ -tri-hidróxiurs-12-en-28-oico (ácido euscáfico) (5), 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -hidróxiurs-12-en-28-oico (6), flavona salvigenina (7), espatulenol (8) e globulol (9) (LEMES, 2011) e Lignanás (10, 11 e 12), Figura 3 p. 22 mostra substâncias isoladas de *Eriope blanchetti* (LIMA et al., 2009).

Figura 2 - Substâncias isoladas das folhas e caules de *Hyptidendron canum*



Fonte: Lemes (2011).

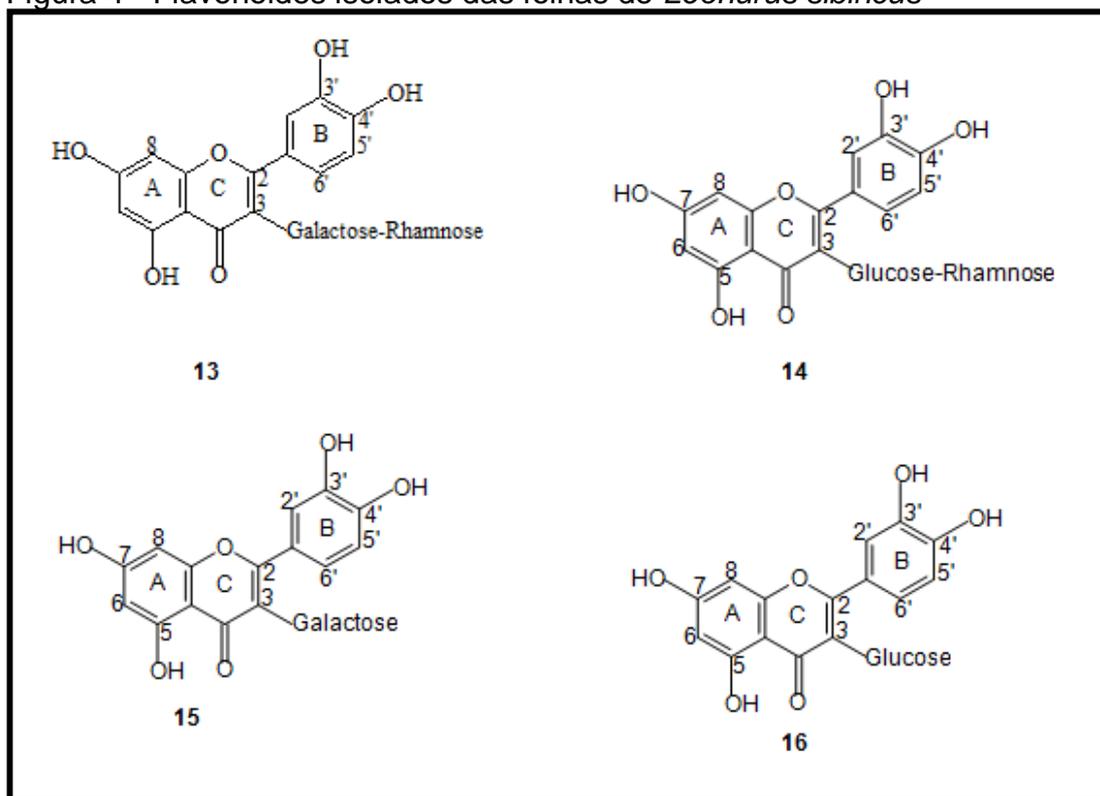
Figura 3 - Lignanais isoladas de *Eriope blanchetti*



Fonte: Lima et al. (2009)

Em diversas plantas da família Lamiaceae já foram isolados vários flavonóides. Os flavonóides compreendem um grupo de metabólitos amplamente distribuídos no reino vegetal, pouco presente em algas com alguns representantes identificados em briófitas, existindo poucos relatos de ocorrência em fungos. Em pteridófitas, foram encontrados também, mas a sua variabilidade estrutural é pequena. Todavia, estão presentes em abundância em angiosperma, apresentando neste grupo uma enorme variedade estrutural (LUCENA, 2012). Das folhas de *Leonurus sibiricus* foram isolados os flavonoides Quercentina (**13**), Rutina (**14**), Hiperina (**15**), Isoquercentina (**16**), como mostra a Figura 4 p. 23, (ALMEIDA, 2006).

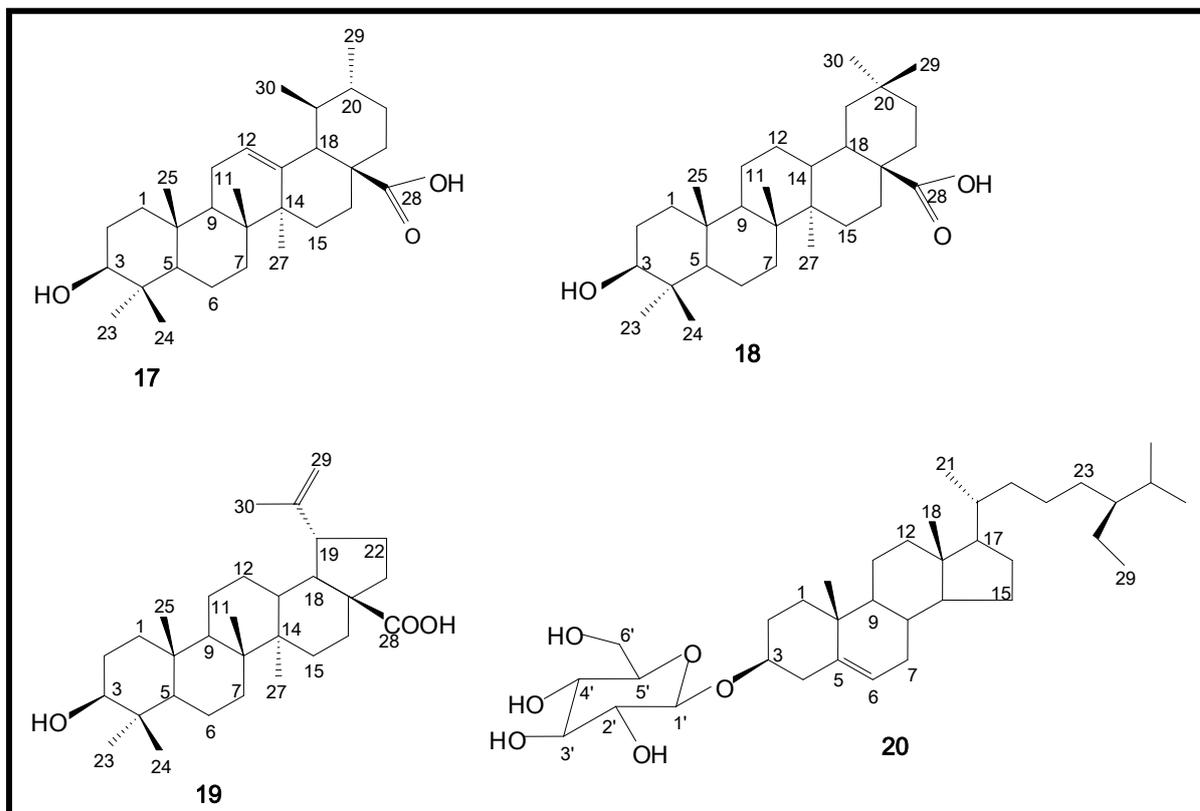
Figura 4 - Flavonoides isolados das folhas de *Leonurus sibiricus*



Fonte: Almeida (2006).

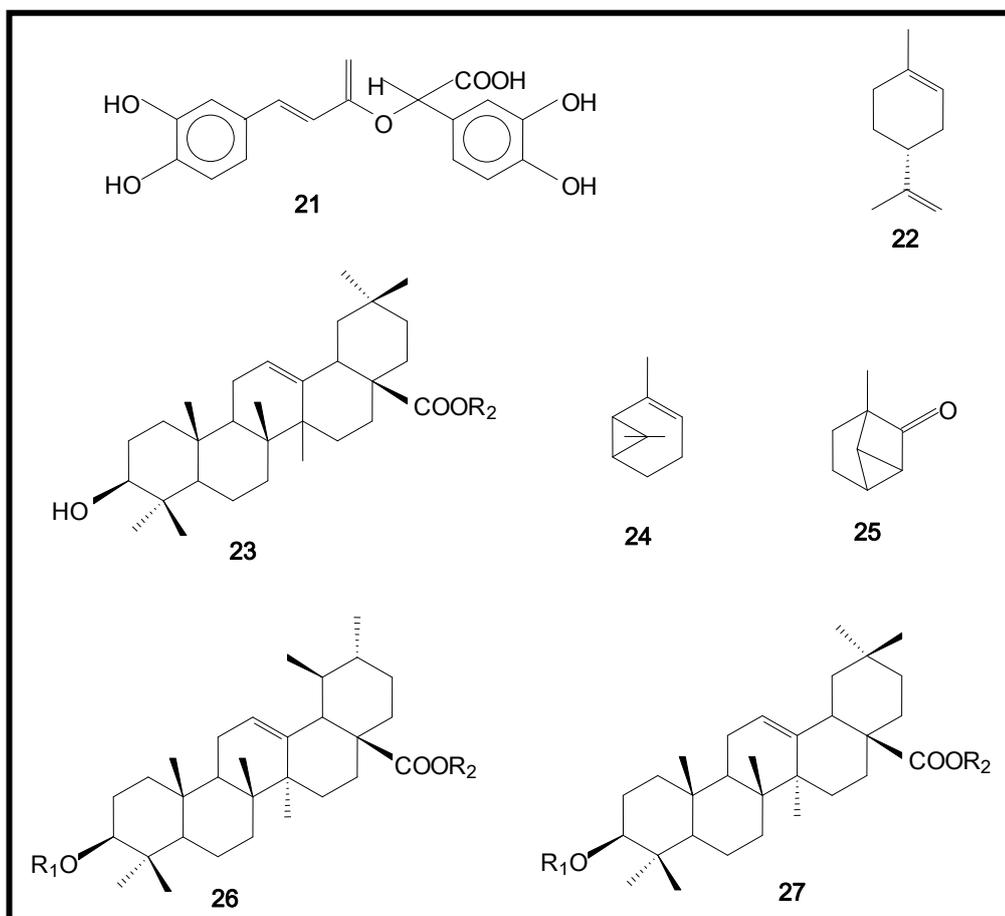
A família Lamiaceae é relativamente bem estudada do ponto de vista fitoquímico. Com respeito ao metabolismo especial, apresenta uma grande variedade de classes. Como ácido ursólico (**17**), ácido oleanóico (**18**), ácido betulínico (**19**) e  $\beta$ -sitosterol glicosilado (**20**). Metabólitos secundários isolados de partes aéreas se *Hypenia salzmannii* (Benth), espécie da família Lamiaceae, Figura 5 p. 24, (LUCENA, 2012).

Figura 5 - Metabólitos secundários isolados de *Hypernia salzmannii* (Benth)



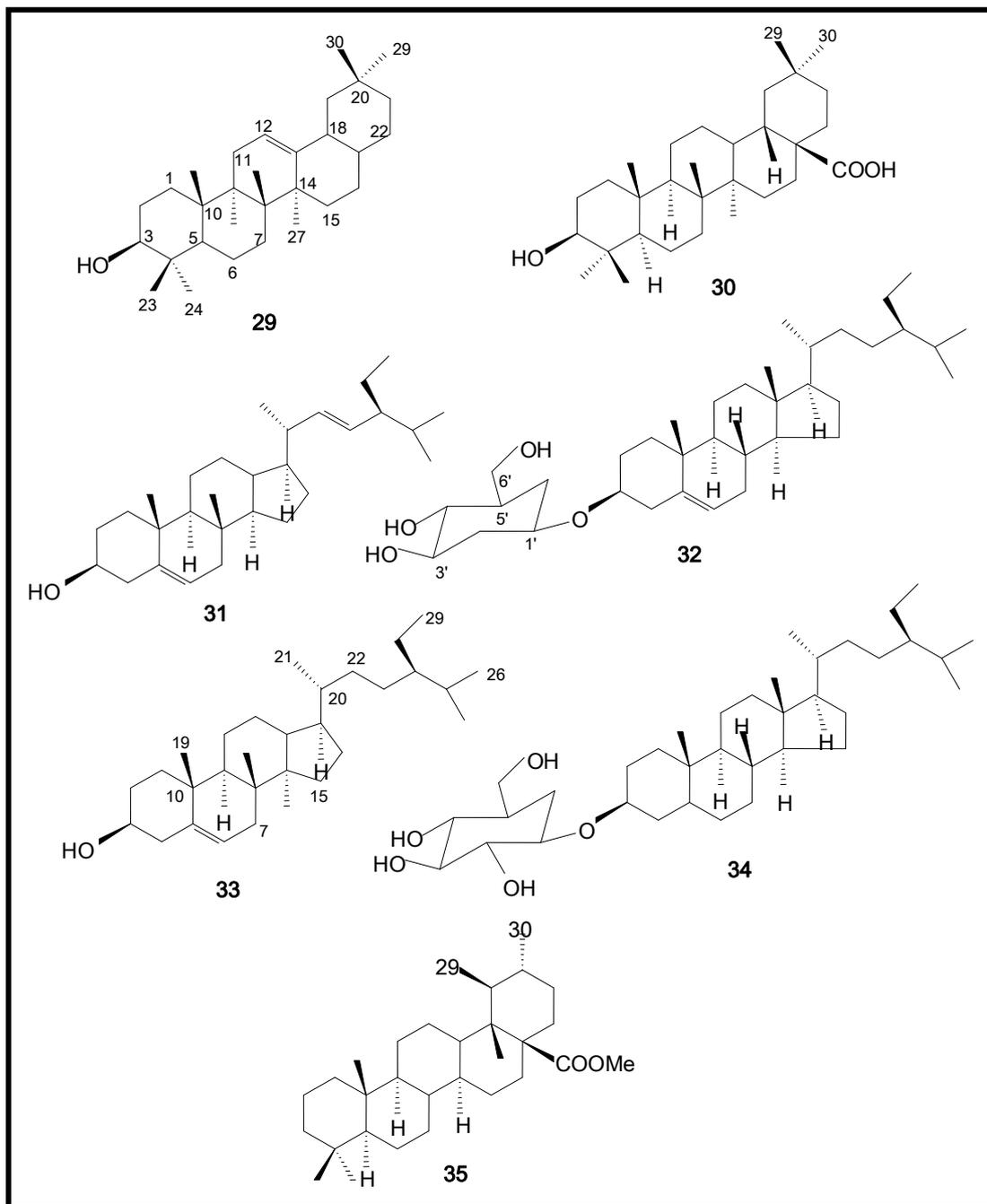
Fonte: Lucena (2012).

Alguns metabólitos secundários isolados de *Rosmarinus officinalis* da família Lamiaceae: ácido rosmarínico (**21**), limonemo (**22**), ácido oleanóico (**23**), pireno (**24**), cânfora (**25**),  $\alpha$ -amirina (**26**), ácido ursólico (**27**),  $\beta$ -amirina (**28**), Figura 6 p. 25, (MARCHIORI, 2004).

Figura 6 - Metabólitos secundários isolados de *Rosmarinus officinalis*

Fonte: Marchiori (2004).

Figura 7 - Apresenta as substâncias isoladas da espécie *Peltodon radicans*



Fonte: Costa (2008).

A família Lamiaceae tem grande importância econômica devido a sua abundância em espécies aromáticas (COSTA, 2008). Muitas espécies são utilizadas como condimentos na culinária, sendo apreciadas pelo aroma ou pelo sabor nos alimentos (MENEZES, 1994).

A área estimada cultivada, mundialmente, com plantas dessa família é de 500 mil hectares, grande parte ocupada por *Mentha arvensis L.*, *Mentha x piperita L.* e

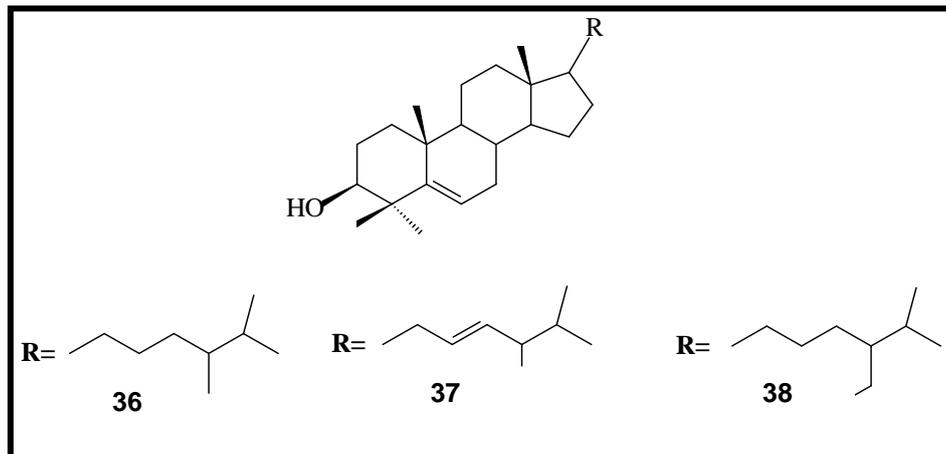
*Mentha spicata L.*, com produção anual de biomassa de 8.600, 2.367 e 880 toneladas, respectivamente (SIMÕES, SPITZER, 2000).

### 3.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO AEGIPHILA

A *Aegiphila* é um gênero constituído de 180 espécies, distribuídas desde o sul do México até o norte da Argentina e sul do Brasil Moldenke (1934 apud FERREIRA et al. 2006).

As espécies deste gênero têm sido comumente utilizadas na medicina tropical como remédio para picadas de cobra. São poucas as informações sobre estudos fitoquímicos deste gênero. A literatura reporta a presença dos esteroides: campesterol (**36**), estigmasterol (**37**) e  $\beta$ -sitosterol (**38**) isolados de *Aegiphila sellowiana*, Figura 8, Corrêa (1926 apud FERREIRA et al. 2006).

Figura 8 – Estrutura química esteroides: estigmasterol, campesterol e  $\beta$ -sitosterol



Fonte: Ferreira et al.( 2006).

Das folhas de *Aegiphila ihotzkiana* foram isolados vários constituintes do óleo essencial conforme Tabela 2 p. 28.

Tabela 1 - Porcentagem e composição do óleo essencial das folhas de *Aegiphila ihotzkiana*

Constituintes	IK	%
Linalol	1092	3,4
Terpinen-4-ol	1173	0,3
$\alpha$ -Terpineol	1187	0,6
Geraniol	1256	0,2
Ciclosativeno	1371	0,3
$\alpha$ -Copaeno	1380	12,1
$\beta$ -Bourbonene	1390	5,8
$\beta$ -Cariofileno	1428	27,5
$\beta$ -Copaeno	1432	1,0
$\alpha$ -Humuleno	1457	6,6
Germacreno D	1484	7,6
Biciclogermacreno	1496	4,8
$\delta$ -Cardineno	1552	2,1
Germacreno B	1571	0,5
Espatuleno	1574	4,9
Óxido de cariofileno	1583	10,5
Viridiflorol	1633	0,7
Epi- $\alpha$ -Muurolo		2,7

Fonte: Luciano et al. (2005).

IK: índice de Kovts.

A Figura 9 apresenta aspecto da planta *Aegiphila integrifolia* em solo roraimense.

Figura 9 - Espécie *Aegiphila integrifolia* (Jacq.)



Fonte: Silva (2012).

### 3. 3 TAXONOMIA BOTÂNICA DA FAMÍLIA LAMIACEAE E DA ESPÉCIE *Aegiphila*

A classificação taxonômica proposta por Dahlgren, a família Lamiaceae pertence à ordem Lamiales, superordem Lamiiflorae, que conta ainda com mais três ordens: Scrophulariales, Hippuridales e Hydrostachiales. Além da Lamiaceae, Lamiales e constituída de duas outras famílias, Verbenaceae e Callitrichaceae (FALCÃO, 2003).

A taxonomia de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.) obedece ao sistema de classificação proposto por (Jacq.) BD Jacks. Na Taxonomia série: 32229, conforme mostrado no Quadro 1.

Quadro 2 – Classificação botânica de *Aegiphila integrifolia*

Reino	Plantae
Divisão	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Dillenidae
Subdivisão	Spermatophytina
Ordem	Lamiales
Subordem	Asteranae
Família	Lamiaceae
Gênero	<i>Aegiphila</i> Jacq
Espécie	<i>Aegiphila integrifolia</i> (Jacq.) BD Jacks

Fonte: [http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=32229](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=32229)

Nome popular: cajuja, tarumã. Árvores, de até 12 m, extremidade dos ramos tomentosa, acinzentada, quadrangular; folha simples, oposta, sem estípula, pecíolo sulcado, 2 x 0,4 cm, tomentoso, lâmina elíptica a oboval-elíptica, ápice agudo, base atenuada, 31-39 x 13-17 cm, margem inteira, irregular, subcartácea a cartácea, venação camptódroma, 12-14 pares de nervuras secundárias, paralelas, conspícuas, esbranquiçadas na face abaxial, venação terciária formando retículo conspícuo, face adaxial tomentulosa, abaxial tomentosa, esbranquiçada (ELTINK, et al. 2008).

### 3. 4 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA *Aegiphila integrifolia*

Possui registros para quase todos os estados do Brasil, exceto Tocantins, Ceará, Rio Grande do Norte, Sergipe e Alagoas. Assim, é encontrada nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. A tamanqueira é uma espécie nativa, mas não é endêmica do Brasil.

Fonte: [http://www.nossasarvores.greennation.com.br/content/tree\\_specie/28](http://www.nossasarvores.greennation.com.br/content/tree_specie/28)

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 ESPECIFICAÇÕES DE MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTOS UTILIZADOS

Na preparação dos extratos hexânico e etanólico a frio foram utilizados os solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol o processo de maceração 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 (gradualmente) da Merck como fase estacionária.

Para a cromatografia em camada delgada comparativa (CCD) utilizou-se sílica gel 60 G (230 - 400 Mesh) da Merck, em suporte de vidro, ativada a 120 °C por 30 minutos.

As revelações cromatográficas foram feitas com revelador de vanilina, ativada a 120 °C, luz ultravioleta em comprimento de onda  $\lambda = 254 \text{ nm}$  e  $365 \text{ nm}$ .

A solução reveladora de vanilina sulfúrica foi preparada pela mistura de uma solução de 1% (p/v) de vanilina em metanol com uma solução de ácido sulfúrico 5% (p/v) em etanol (ALVES, 2007).

Os solventes utilizados na cromatografia líquida em coluna foram das marcas Vetec, Nuclear e Merck e Reagente Analítico, apresentando grau de pureza analítico e foram destilados e bidestilados.

Os critérios de pureza adotados foram:

- observação de uma mancha única por cromatografia em camada delgada comparativa (CCD), variando-se o sistema de eluentes.

- observações dos sinais de espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , RMN de  $^1\text{H}$ , ponto de fusão, espectro de massas comparação 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  $400 \text{ cm}^{-1}$  em pastilhas de KBr.

As técnicas unidimensionais e bidimensionais de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMQC e HMBC) foram realizadas em espectrômetro Bruker operado a 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$  no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. Cromatografia Gasosa (CG). Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade  $\delta$  (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ )

em Hz. Tetrametilsilano (TMS) foi empregado como padrão de referência interna, tendo  $\text{CDCl}_3$  como solvente.

As multiplicidades no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo as convenções: singlete (s), duplete (d), duplo duplete (dd), (triplete (t), quarteto (q), multiplete (m).

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.

Os dados cristalográficos foram obtidos em um difratômetro CAD 4, operando sob radiação de cobre (Cu) a temperatura ambiente pelo cristalógrafo Prof. Dr. José Ricardo Sabino, professor do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetro LCMS-IT-TOF (Shimadzu), equipado com fonte de ionização por *electrospray* do Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste da Universidade Federal do Ceará.

O método de antioxidante por captura de DPPH se baseia segundo Brand-Williams (1995), na redução do radical (DPPH $\cdot$ )<sub>2,2</sub> difenil-1-picril-hidrazil [PM = 394,3], que ao fixar um H $\cdot$  leva a uma diminuição da absorbância, permitindo calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do radical DPPH $\cdot$ . (removido do antioxidante em estudo), leva a uma diminuição da absorbância, permitindo calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do radical DPPH $\cdot$ .

## 4.2 ISOLAMENTOS DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Aegiphila integrifolia* (JACQ.).

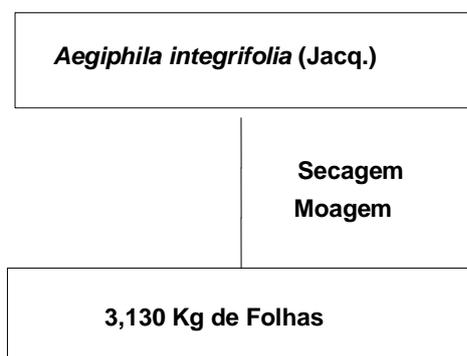
### 4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal

O material botânico de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.), selecionado para o estudo fitoquímico foi coletado no campus Cauamé pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Roraima, localizado no município de Boa Vista - Roraima, em Julho de 2011. A identificação botânica foi feita pelo Prof. Dr.

Reinaldo Imbrózio Barbosa, por comparação com o Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA. Uma exsicata com nº 187448 encontra-se depositada no Herbário do INPA em Manaus-AM.

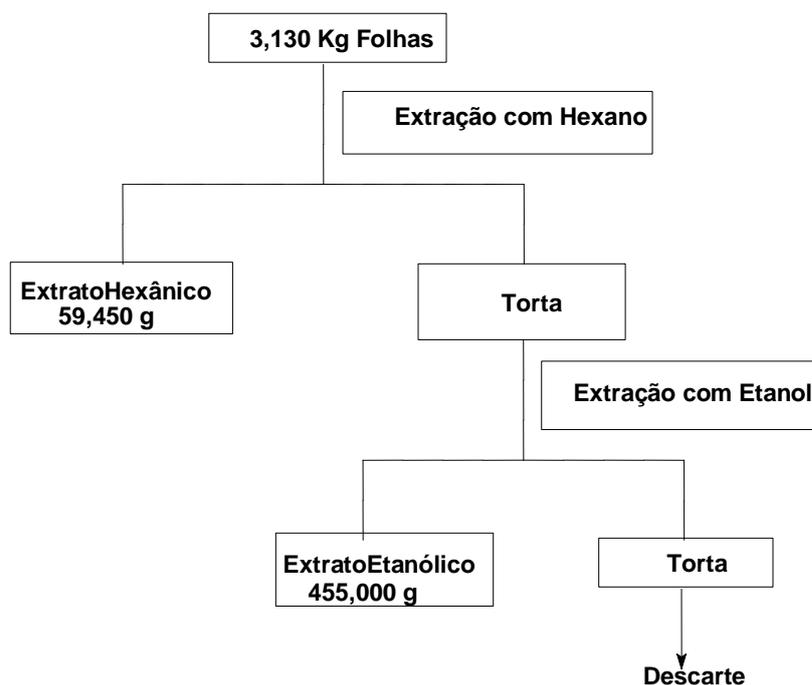
A parte coletada (folhas) foi submetida à secagem a temperatura ambiente e pulverizadas em moinho de facas, Esquema 1 pagina 36.

Esquema 1- Tratamento das folhas de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.).



#### 4.2.2 Extratos das folhas de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.)

As folhas de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.). (3,130Kg), após a secagem a temperatura ambiente, foram moídas e extraídas exaustivamente com hexano a frio e com etanol, sob as mesmas condições. Posteriormente, os extratos obtidos foram filtrados e concentrados sob pressão reduzida, em rotaevaporador, fornecendo 59,450g de extrato hexânico e 455 g de extrato etanólico (Esquema 2) p. 34.

Esquema 2 - Extratos das folhas de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.).

#### 4.2.3 Coluna filtrante do extrato etanólico das folhas de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.)

Parte do extrato etanólico (150,000 g) foi adsorvido a 248,000 g de sílica gel. Mistura foi acondicionada em funil cilíndrico de separação de 2000 mL sobre uma camada de 400,000 g de sílica gel. A Tabela 2 detalha os resultados obtidos da eluição com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.

Tabela 2- Coluna filtrante do extrato etanólico de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.)

Eluente	Massa (g)	Percentual
Hexano	0,030	0,020%
Clorofórmio	62,190	41,460%
Acetato de Etila	25,334	16,890%
Metanol	30,000	19,740%
Total	117,554	78,110%

#### 4.2.4 Fracionamento cromatográfico do extrato Clorofórmio das folhas de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.)

O Eluato Clorofórmico (62,190 g) foi submetido ao fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel, 60 G. 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 da Tabelas 3 e 4 p. 36 e 37. Foram coletadas 583 frações, as quais, após comparação em cromatografia em camada delgada, CCD foram reunidas em 40 grupos conforme a Tabela 4 p. 37. Desses, foram estudados os grupos 01, 06, 18, 34 por apresentarem maiores quantidades de massas e menores graus de complexidades. Os demais grupos serão analisados posteriormente.

A Figura 10 apresenta uma foto de uma coluna cromatográfica clássica com eluato clorofórmico de *Aegiphila integrifolia*.

Figura 10 - Coluna cromatográfica clássica de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.)



Tabela 3 - Fracionamento cromatográfico do eluato clorofórmico das folhas de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.)

Eluente	Frações
Hexano	1 – 2
Hexano / Clorofórmio 10%	3 – 6
Hexano / Clorofórmio 20%	7 – 26
Hexano / Clorofórmio 30%	27 – 29
Hexano / Clorofórmio 40%	30 – 33
Hexano / Clorofórmio 50%	34 – 142
Hexano / Clorofórmio 60%	143 – 1 50
Hexano / Clorofórmio 70%	151 – 161
Hexano / Clorofórmio 80%	162 – 182
Hexano / Clorofórmio 90%	183 – 191
Clorofórmio	192 – 269
Clorofórmio / Acetato de Etila 10%	270 – 352
Clorofórmio / Acetato de Etila 20%	353 – 404
Clorofórmio / Acetato de Etila 30%	405 – 429
Clorofórmio / Acetato de Etila 40%	430 – 435
Clorofórmio / Acetato de Etila 50%	436 – 498
Clorofórmio / Acetato de Etila 60%	499 – 501
Clorofórmio / Acetato de Etila 70%	502 – 506
Clorofórmio / Acetato de Etila 80%	507 – 518
Clorofórmio / Acetato de Etila 90%	519 – 528
Acetato de Etila	529 – 542
Metanol	543 – 583

Tabela 4 - Grupos originados do fracionamento cromatográfico do eluato clorofórmio das folhas de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.)

Grupos	Frações	Massas (g)
01	1 – 29	1,957
02	30 – 50	2,725
03	51 – 61	4,212
04	62 – 87	0,647
05	88 – 99	2,774
06	100 – 125	1,522
07	126 – 137	0,588
08	138 – 212	1,093
09	213 – 215	0,018
10	216 – 117	0,051
11	218 – 236	0,976
12	237- 240	0,376
13	241 – 259	0,090
14	260 – 269	0,307
15	270 – 276	0,522
16	277 – 281	0,483
17	282 – 296	0,309
18	297 – 311	0,368
19	312 – 314	0,442
20	315 – 322	0,538
21	323 – 326	0,277
22	327 – 341	0,961
23	342 – 344	0,165
24	345 – 353	0,205
25	354 – 372	2,263
26	373 – 387	0,757
27	388 – 390	0,153
28	391 – 404	0,175
29	405 – 407	0,427
30	408 – 411	2,997
31	412 – 419	2,577
32	420 – 434	0,675
33	435 – 439	0,725
34	450 – 494	4,020
35	495 – 504	0,291
36	505 – 519	0,511
37	520 – 525	0,195
38	526 – 528	0,066
39	529 – 542	0,461
40	543 – 583	5,067
	Massa total	42,96

#### 4.2.4.1 Grupo 01

O Grupo 01 com aspecto de graxa esbranquiçada foi submetido à esterificação e saponificação, conforme técnica descrita a seguir.

Dissolveu-se, em tubo criogênico de capacidade de 2 mL, aproximadamente 10 mg do óleo em 100  $\mu$ L de uma solução de etanol (95%)/hidróxido de potássio 1mol.L<sup>-1</sup> (5%). Após agitação em vórtex por 10 segundo, o óleo foi hidrolisado em um forno de microondas doméstico (Panasonic Piccolo), à potência de 80 W

(Potência 2), durante 5 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 400  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico a 20%, uma ponta de espátula de NaCl (~20 mg) e 600  $\mu\text{L}$  de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 10 segundo e repouso por 5 minutos, uma alíquota de 300  $\mu\text{L}$  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) (VANY FERRAZ, 2012).

Os ácidos graxos livres foram metilados com 100  $\mu\text{LBF}_3$ /metanol (14%) e aquecidos durante 10 minutos em banho de água a 60°C. Foram em seguida diluídos com 400  $\mu\text{L}$  de metanol e analisados por Cromatografia Gasosa.

A mistura (AIEC-1) 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  $\mu\text{m}$  com gradiente de temperatura: 100°C, 0 minuto, 7°C/minutos até 220°C; injetor (*split* de 1/30) a 250°C e detector a 260°C. Hidrogênio como gás de arraste (2  $\text{mL}^{-1}$  minutos) e volume de injeção de 1  $\mu\text{L}$  (VANY FERRAZ, 2012).

#### 4.2.4.2 Grupo 03

O Grupo 03 de massa 4,212g com aparência de um sólido esverdeado foi recromatografado em coluna de sílica gel 60 G, fornecendo 87 frações. Utilizou-se como eluentes os solventes, hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade (Tabela 5 p. 39).

Tabela 5 - Fracionamento cromatográfico do Grupo 03.

Eluente	Frações
Hexano / Clorofórmio 60%	1 – 3
Hexano / Clorofórmio 70%	4 – 6
Hexano / Clorofórmio 80%	7 – 9
Hexano / Clorofórmio 90%	10 – 14
Clorofórmio	15 – 22
Clorofórmio / Acetato de Etila 10%	23 – 36
Clorofórmio / Acetato de Etila 20%	37 – 44
Clorofórmio / Acetato de Etila 30%	45 – 47
Clorofórmio / Acetato de Etila 40%	48 – 53
Clorofórmio / Acetato de Etila 50%	54 – 56
Clorofórmio / Acetato de Etila 60%	57 – 61
Clorofórmio / Acetato de Etila 70%	62 – 65
Clorofórmio / Acetato de Etila 80%	66 – 69
Clorofórmio / Acetato de Etila 90%	70 – 71
Acetato de Etila	72 – 77
Metanol	78 – 87

Após comparação em CCDs foram reunidas frações iguais em 12 subgrupos, conforme a Tabela 6.

Tabela 6 -Subgrupos originados da cromatografia do Grupo 03

Subgrupos	Frações	Massa (g)
1	1 – 2	0,074
2	3 – 10	0,029
3	11 – 13	0,279
4	14 – 15	0,455
5	19 – 25	3,073
6	26 – 34	0,524
7	35 – 40	0,526
8	41 – 50	0,891
9	51 – 55	0,047
10	56 – 63	0,157
11	64 – 78	0,211
12	79 – 87	0,431
	Massa Total	4,138

Após analisados por CCDS as frações 19-25 e a 26-34 foram recromatografadas, conforme Tabelas 7 e 8 p. 40. As demais, não foi possível purificá-las por serem muito impuras.

a) Frações 19-25

As frações 19-25 de massa 3,073g com aparência de um sólido esverdeado foi recromatografado em coluna de sílica gel 60 G, fornecendo 44 frações.

Tabela 7 - Fracionamento cromatográfico das frações 19-25, proveniente do Grupo 03

Eluente	Frações
Hexano / Clorofórmio 50%	1 – 9
Hexano / Clorofórmio 60%	10 – 11
Hexano / Clorofórmio 70%	12 – 14
Hexano / Clorofórmio 80%	15 – 18
Hexano / Clorofórmio 90%	19 – 20
Clorofórmio	21 – 24
Clorofórmio / Acetato de Etila 10%	25 – 27
Clorofórmio / Acetato de Etila 20%	28 – 30
Clorofórmio / Acetato de Etila 30%	31 – 32
Clorofórmio / Acetato de Etila 40%	33 – 34
Clorofórmio / Acetato de Etila 50%	35 – 36
Clorofórmio / Acetato de Etila 60%	37 – 38
Clorofórmio / Acetato de Etila 70%	39 – 40
Acetato de Etila	41 – 42
Metanol	43 – 44

Após comparação CCDS as amostras continuaram apresentando-se complexas e não levou ao isolamento de substância pura.

b) Frações 26-34

As frações 26-34 de massa 5,240 g com aparência de um sólido esverdeado foi recromatografado em coluna de sílica gel 60 G, fornecendo 45 frações.

Tabela 8 -Fracionamento cromatográfico das frações 26-34, proveniente do Grupo 03

Eluente	Frações
Hexano / Clorofórmio 90%	1 – 2
Clorofórmio 100	3 – 6
Clorofórmio / Acetato de Etila 10%	7 – 19
Clorofórmio / Acetato de Etila 20%	20 – 21
Clorofórmio / Acetato de Etila 30%	22 – 24
Clorofórmio / Acetato de Etila 40%	25 – 27
Clorofórmio / Acetato de Etila 50%	28– 30
Clorofórmio / Acetato de Etila 60%	31 – 32
Clorofórmio / Acetato de Etila 70%	33– 34
Clorofórmio / Acetato de Etila 80%	35 – 37
Clorofórmio / Acetato de Etila 90%	38 – 40
Acetato de Etila	41 – 42
Metanol	43 – 45

Após comparação em CCDS das frações coletadas apresentaram misturas complexas com alto grau de impurezas.

#### 4.2.4.3 Grupo 06

O Grupo 06 de massa 1,522 g com aparência de um sólido de cor esverdeado, foi cromatografado em coluna de sílica gel 60 G e obtido 132 frações. Utilizou-se como eluentes os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol com polaridades crescentes, Tabela 9.

Tabela 9 - Fracionamento cromatográfico do grupo 06.

Eluente	Frações
Hexano / Clorofórmio 60%	1 – 3
Hexano / Clorofórmio 65%	4 – 5
Hexano / Clorofórmio 70%	6 – 26
Hexano / Clorofórmio 75%	27 – 38
Hexano / Clorofórmio 80%	39 – 45
Hexano / Clorofórmio 90%	46 – 75
Clorofórmio	76 – 84
Clorofórmio / Acetato de Etila 10%	85 – 88
Clorofórmio / Acetato de Etila 20%	89 – 93
Clorofórmio / Acetato de Etila 30%	94 – 101
Clorofórmio / Acetato de Etila 40%	102 – 105
Clorofórmio / Acetato de Etila 50%	106 – 108
Clorofórmio / Acetato de Etila 60%	109 – 110
Clorofórmio / Acetato de Etila 70%	111 – 113
Clorofórmio / Acetato de Etila 80%	114 – 116
Clorofórmio / Acetato de Etila 90%	117 – 120
Acetato de Etila	121 – 124
Metanol	125 – 132

Após comparação em CCDS as frações foram reunidas em 14 subgrupos. Subgrupo 02 forneceram 70 mg de um sólido puro. Subgrupo 06 forneceram 60 mg de um sólido amarelo, codificado como **AIEC-2** ambos foram enviadas para análise espectroscópica. Os demais subgrupos terão estudo continuado.

#### 4.2.4.4 Grupo 18

O Grupo 18 de massa 0,376 g com aparência de um sólido esverdeado foi recromatografado fornecendo 177 frações, reunidas em 14 subgrupos, Tabela 10 p. 42.

Tabela 10 - Fracionamento cromatográfico do grupo 18

Eluente	Frações
Hexano / Clorofórmio 60%	1
Hexano / Clorofórmio 70%	2 – 22
Hexano / Clorofórmio 80%	23 – 29
Hexano / Clorofórmio 90%	30 – 46
Clorofórmio	47 – 91
Clorofórmio / Acetato de Etila 10%	92 – 104
Clorofórmio / Acetato de Etila 20%	105 – 115
Clorofórmio / Acetato de Etila 30%	116 – 126
Clorofórmio / Acetato de Etila 40%	127 – 136
Acetato de Etila	137 – 149
Metanol	150 – 177

Após analisadas por CCDS as frações 2-9 e 101-109 foram recromatografadas.

a) Frações 2 - 9

As Frações 2-9 de massa 0,241mg com aparência de um sólido amarelado foi recromatografada, fornecendo 58 frações, Tabela 11.

Tabela 11 - Fracionamento cromatográfico das frações 2 - 9, proveniente do Grupo 18

Eluente	Frações
Hexano / Clorofórmio 85%	1 – 33
Hexano / Clorofórmio 90%	34 – 35
Clorofórmio	36 – 43
Acetato de Etila	44 – 55
Metanol	56 – 58

Após comparação em CCDS as frações 01-15 (51mg) e 16-30 (32 mg) apresentaram sólido puro de cor amarelo e foram enviadas para análise espectroscópicas.

b) Frações 101 - 109

As Frações 101-109 de massa 0,035 mg com aparência de um sólido amarelado foi recromatografado em coluna de sílica gel 60 G, fornecendo 94 frações, Tabela 12 p. 43.

Tabela 12 - Fracionamento cromatográfico das frações 101-109, proveniente do Grupo 18

ELUENTE	FRAÇÕES
Clorofórmio / Acetato de Etila 10%	1 – 16
Clorofórmio / Acetato de Etila 20%	17 – 23
Clorofórmio / Acetato de Etila 30%	24 – 34
Clorofórmio / Acetato de Etila 40%	35 – 44
Clorofórmio / Acetato de Etila 50%	45 – 54
Clorofórmio / Acetato de Etila 60%	55 – 64
Clorofórmio / Acetato de Etila 70%	65 – 74
Clorofórmio / Acetato de Etila 80%	75 – 79
Clorofórmio / Acetato de Etila 90%	80 – 84
Acetato de Etila 100%	85 – 88
Metanol 100%	89 – 94

Após comparação em CCDS as frações foram reunidas em 11 subgrupos, conforme a Tabela 13.

Tabela 13 - Grupos originados do fracionamento cromatográfico das frações 101-109, proveniente do grupo 18

Subgrupos	Frações	Massas (g)
01	1	0,002
02	2-3	0,019
03	4 – 10	0,001
04	11- 23	0,001
05	24 – 34	0,001
06	35 – 44	0,002
07	45 – 54	0,001
08	55 – 64	0,002
09	65 – 74	0,002
10	75 – 88	0,001
11	89 – 94	0,002
	Massa Total	0,034

O subgrupo 02 forneceram 19 mg de um sólido puro de cor amarelo cristalino. Análise espectroscópica permitiu identificá-lo com um flavonoide denominado **AIEC-3**. Os demais subgrupos serão estudados posteriormente.

#### 4.2.4.5 Grupo 34

O Grupo 34 de massa 402mg foi recromatografado, fornecendo 130 frações, Tabela 14 p. 44.

Tabela 14 - Fracionamento cromatográfico do grupo 34

Eluente	Frações
Hexano / Clorofórmio 80%	1 – 10
Hexano / Clorofórmio 90%	11 – 15
Clorofórmio	16
Clorofórmio / Acetato de Etila 20%	17 – 31
Clorofórmio / Acetato de Etila 30%	32 – 53
Clorofórmio / Acetato de Etila 40%	54 – 58
Clorofórmio / Acetato de Etila 50%	59 – 64
Clorofórmio / Acetato de Etila 60%	65 – 91
Clorofórmio / Acetato de Etila 70%	92 – 93
Clorofórmio / Acetato de Etila 80%	94 – 97
Clorofórmio / Acetato de Etila 90%	98 – 102
Acetato de Etila	103 – 121
Metanol	122 – 130

Após análise por CCD as frações foram reunidas em 16 subgrupos, Tabela 15.

Tabela 15 - Subgrupos originados da cromatografia do grupo 34

Subgrupos	Frações	Massas (g)
01	1 – 10	0,018
02	11 – 16	0,005
03	17 – 23	0,038
04	24 – 31	0,008
05	32 – 42	0,099
06	43 – 53	0,007
07	54 – 57	0,005
08	58 – 64	0,008
09	65 – 73	0,019
10	74 – 75	0,036
11	76 -80	0,024
12	81 – 91	0,010
13	92 – 102	0,010
14	103 – 112	0,001
15	113 – 121	0,006
16	122 – 130	0,005
	Massa total	0,299

Após analisadas as amostras por CCD, as frações 74-75 apresentaram um sólido branco puro por CCD. Análises dos espectros permitiram concluir tratar-se de uma mistura de  $\beta$ -Sitosterol, Estigmasterol e Lupeol glicosilados denominados **AIEC-4**. Os demais Subgrupos terão seus estudos continuados.

#### 4.2.5 Resumo do estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.)

O Esquema 03 sumariza a elaboração fitoquímica e os fitoconstituintes isolados do extrato etanólico das folhas de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.).

Esquema 03- Fracionamento e substâncias isoladas do extrato etanólico de *Aegiphila integrifolia*

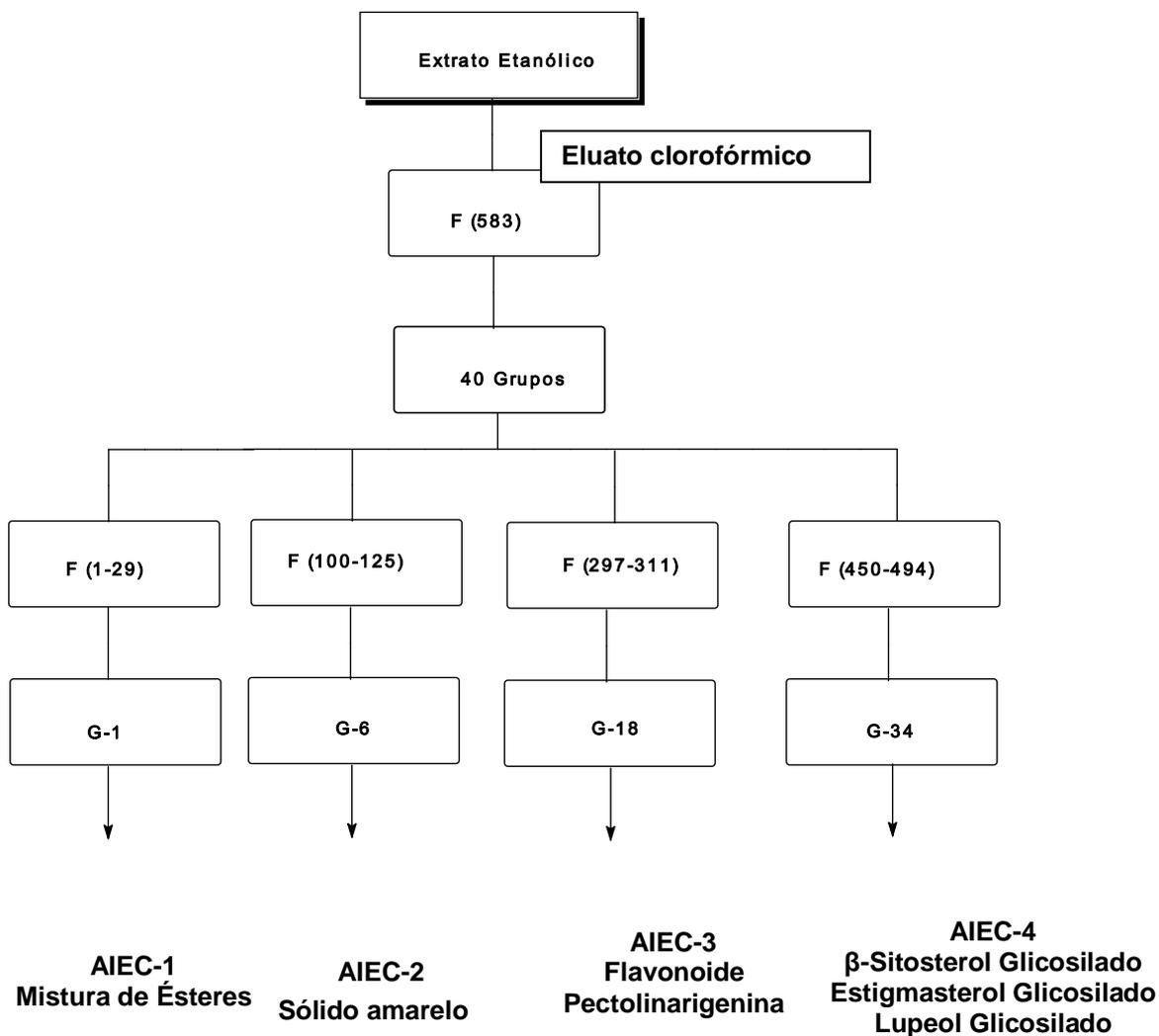
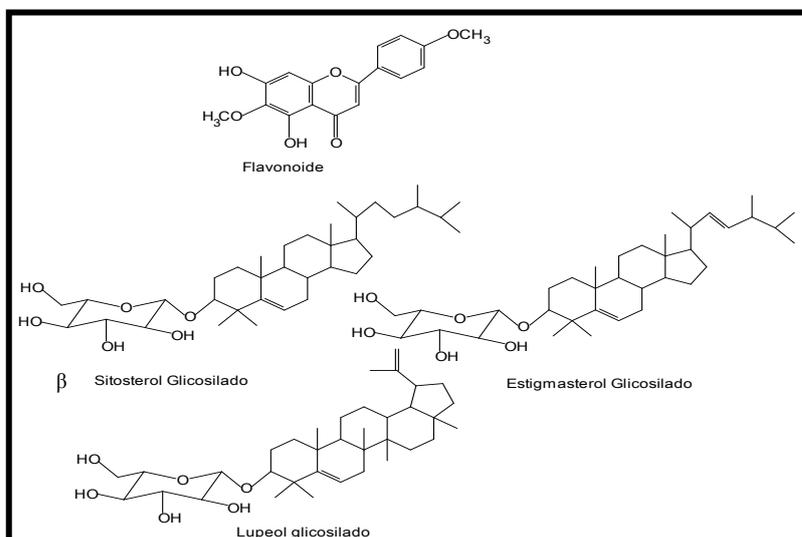


Figura 11- Fitoconstituintes isolados da espécie *A. integrifolia*



### 4.3 DADOS FÍSICO-QUÍMICOS DE SUBSTÂNCIA E MISTURAS ISOLADAS

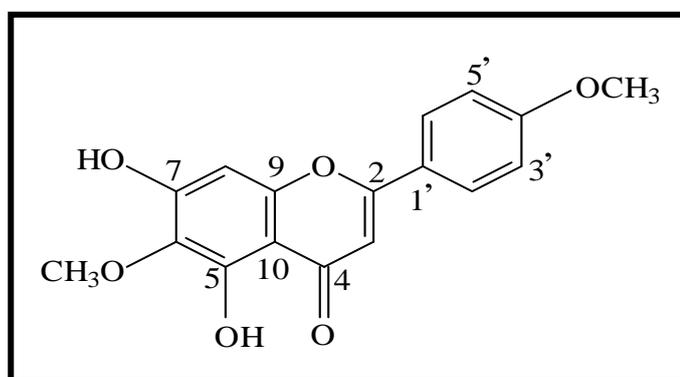
#### 4.3.1 AIEC-1(Mistura de Ésteres)

Aspecto: Graxa esbranquiçada.

#### 4.3.2 Flavonoide: AIEC-3 (Pectolarigenina)

O flavonoide isolado da espécie *Aegiphila integrifolia* denominado pectolarigenina apresenta sua estrutura na Figura 12.

Figura 12 - Estrutura química Pectolarigenina



Fórmula Molecular:  $C_{17}H_{14}O_6$

Aspecto físico: Agulhas amarelas

Faixa de fusão: 216,9-220,0 °C

Solubilidade: Clorofórmio

Massa molar: 314 g mol<sup>-1</sup>

a) IV (KBr.):  $\gamma$  (cm<sup>-1</sup>) (3500, 3329, 3057, 2946, 2843, 1662, 1605, 1514, 1357, 1273, 1186, 1079, 1021, 831, 643, 570, 593, 486.

b) RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 6,58 (s, H-3); 6,60 (s, H-8,); 7,85 (d,  $J=8,65$ ; H-2'); 7,03 (d,  $J=8,80$ ; H-3'); 7,03 (d,  $J=8,80$ ; H-5'); 7,85 (d,  $J=8,65$ ; H-6'); 4,05 (s, OMe-6); 3,90 (s, OMe-4'); 13,00 (s, OH-5); 6,51(s, OH-7)

c) RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 160,3 (C-2); 103,0 (C-3); 186 (C-4); 152 (C-5); 130,4 (C-6); 154,2 (C-7); 95,0 (C-8); 154,2 (C-9); 104,9 (C-10); 123,0 (C-1');

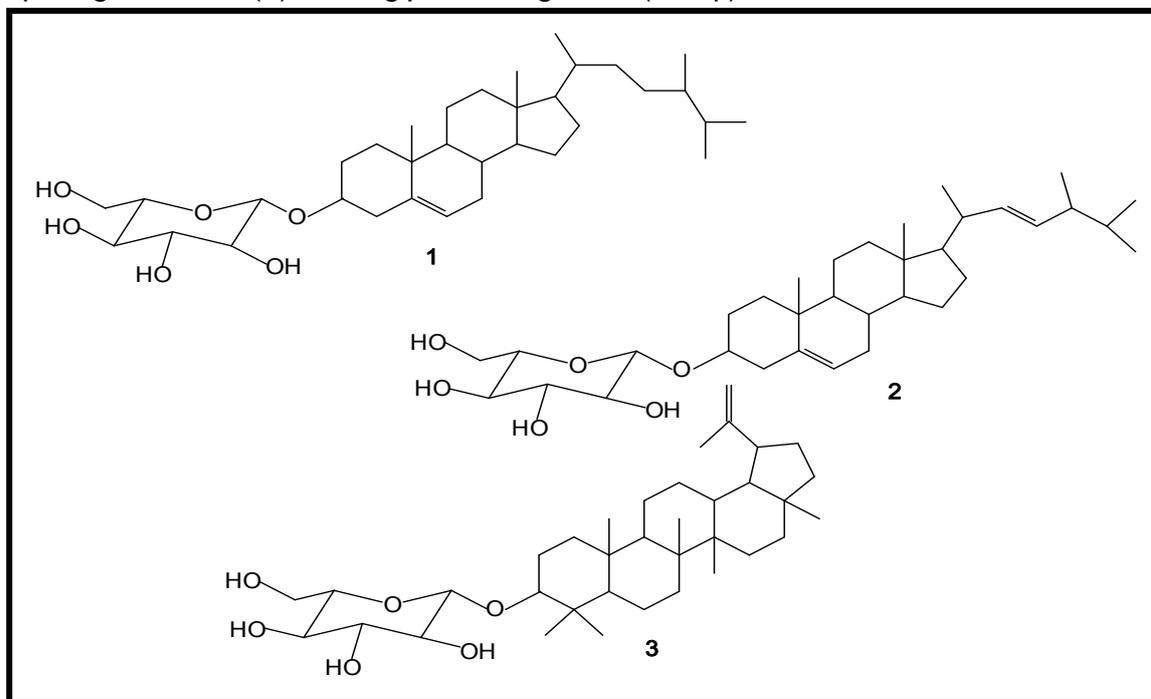
128,1 (C-2'); 114,0 (C-3'); 162,0 (C-4'); 114,0 (C-5'); 162,0 (C-6'); 114,0 (OMe-6);  
128,1 (OMe-4'); 56,0 (OH-5); 60,5 (OH-7).

d) ESI-MS (70 eV): 337 [M+Na]<sup>+</sup>; 315; 274.

#### 4.3.3 AIEC-4 (Mistura de $\beta$ -Sitosterol, Estigmasterol e Lupeol glicosilados)

A mistura de  $\beta$ -sitosterol glicosilado (1), estigmasterol glicosilado (2) e lupeol glicosilado (3) de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.), encontra-se na Figura 13.

Figura 13 - Mistura de  $\beta$ -sitosterol glicosilado (1), estigmasterol glicosilado (2) e lupeol glicosilado (3) de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.)



Aspecto físico: sólido branco em pó

Solubilidade: clorofórmio

Faixa de fusão: 273 – 276,8 °C

##### a) $\beta$ -Sitosterol glicosilado

RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 36,09 (C-1); 29,12 (C-2); 76, 28 (C-3);  
20,43 (C-4); 140, 07 (C-5); 121,01 (C-6); 25,04 (C-7); 31, 28 (C-8); 51, 23 (C-9); 36,  
69 (C-10); 39,70 (C-12); 41,61 (C-13); 56,12 (C-14); 28,10 (C-16); 56,12 (C-17);

11,74 (C-18); 19,74 (C-19); 36,09 (C-20); 38,23 (C-22); 31,25 (C-23); 49,47 (C-24); 29,12 (C-25); 19,00 (C-26); 18,90 (C-27); 23,72 (C-28); 11,82 (C-29); 100,73 (C-1'); 78,45 (C-2'); 78,12 (C-3'); 77,13 (C-4'); 73,22 (C-5'); 61,08 (C-6').

b) Estigmasterol glicosilado

RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 36,09 (C-1); 29,12 (C-2); 73,22 (C-3); 41,61 (C-4); 140,07 (C-5); 121,01 (C-6); 31,25 (C-7); 31,28 (C-8); 51,23 (C-9); 36,69 (C-10); 20,43 (C-11); 39,70 (C-12); 40,12 (C-13); 56,12 (C-14); 28,10 (C-16); 55,14 (C-17); 11,62 (C-18); 19,74 (C-19); 36,09 (C-20); 136,58 (C-22); 129,32 (C-23); 49,47 (C-24); 29,12 (C-25); 21,00 (C-26); 18,90 (C-27); 23,72 (C-28); 11,74 (C-29); 100,73 (C-1'); 78,45 (C-2'); 78,12 (C-3'); 77,13 (C-4'); 76,28 (C-5'); 62,08 (C-6').

c) Lupeol glicosilado

RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 36,09 (C-1); 29,12 (C-2); 73,22 (C-3); 38,86 (C-4); 55,14 (C-5); 18,90 (C-6); 31,25 (C-7); 31,28 (C-8); 51,23 (C-9); 36,69 (C-10); 20,43 (C-11); 25,04 (C-12); 38,23 (C-13); 41,61 (C-14); 27,00 (C-15); 55,14 (C-17); 49,47 (C-18); 47,00 (C-19); 147,42 (C-20); 29,00 (C-21); 40,12 (C-22); 28,10 (C-23); 11,74 (C-27); 19,74 (C-28); 109,42 (C-29); 100,73 (C-1');  $\delta$ : 78,45 (C-2'); 78,12 (C-3'); 77,13 (C-4'); 76,28 (C-5'); 61,08 (C-6').

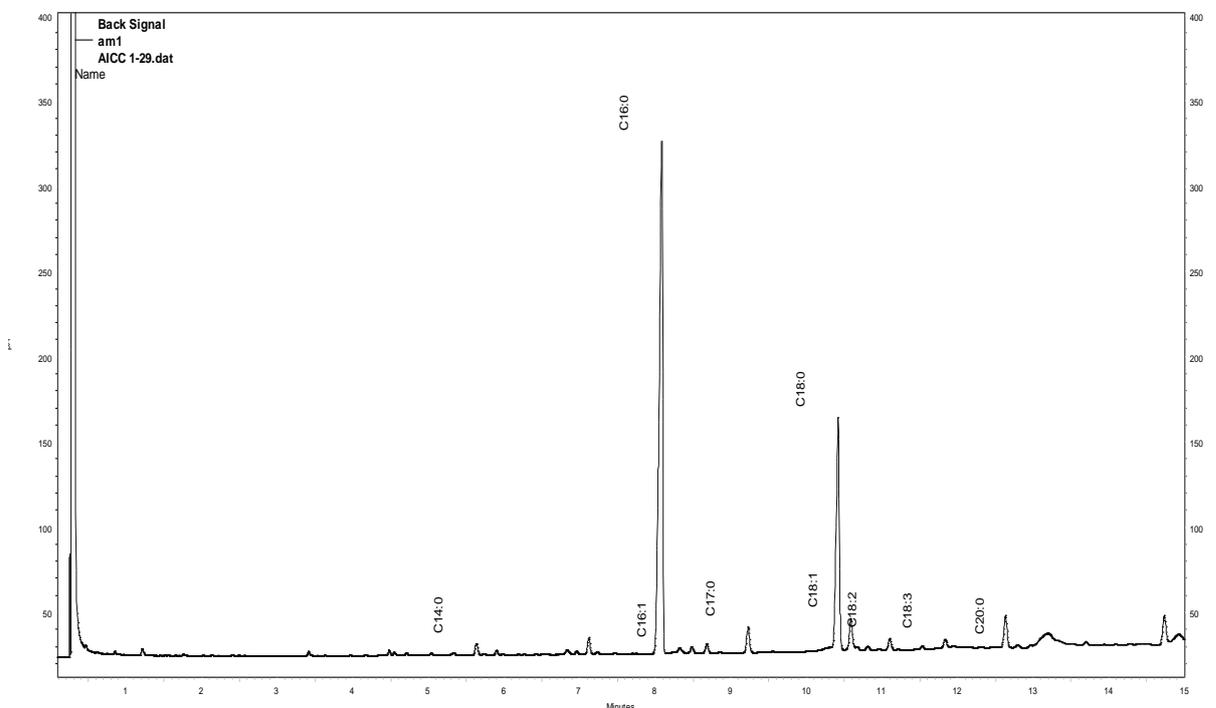
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 DETERMINAÇÕES ESTRUTURAIS DE SUBSTÂNCIA E MISTURAS ISOLADAS

#### 5.1.1 Misturas de ésteres (AIEC-1)

A mistura (AIEC-1) foi isolada como aspecto de graxa esbranquiçada devido à presença de impurezas. Este grupo foi submetido à saponificação e esterificação, conforme técnica descrita na p. 37, fornecendo os ésteres metílicos, os quais foram analisados por Cromatografia Gasosa. As comparações diretas dos tempos de retenção de padrões de ésteres metílicos (Figura 14) indicaram ser uma mistura constituída principalmente de ésteres especificados nas Tabelas 16 e 17 p. 50, conforme laudo de análise da Dra. Vany Ferraz, Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

Figura 14 - Cromatograma dos ésteres metílicos em óleo de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.)



Neste trabalho foi realizada a quantificação dos ácidos graxos por Cromatografia Gasosa e por meio do cromatograma dos ésteres metílicos do óleo de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.), foi obtido o perfil dos ácidos graxos saturados e insaturados presentes no óleo. A composição qualitativa foi determinada por

comparação dos tempos de retenção dos picos com os dos respectivos padrões de ácidos graxos. A composição quantitativa foi realizada por normalização de área, sendo expressa como porcentagem em massa. Os ésteres metílicos de ácidos graxos para a análise foram obtidos de acordo com o laudo da Dra. Vany Ferraz.

Tabela 16 - Tempo de retenção por CG de ésteres metílicos

Nome	RT (min)	Área	Fórmula	AIEC-1
Ácido Mirístico C14:0	5,63		$C_{14}H_{28}O_2$	134935
Ácido Palmítico C16:0	8,10		$C_{16}H_{32}O_2$	7456707
Ácido Palmitoleico C16:1	8,32		$C_{16}H_{30}O_2$	136883
Ácido Margárico C17:0	9,38		-	322614
Ácido Esteárico C18:0	10,49		$C_{18}H_{36}O_2$	3315763
Ácido Oleico C18:1 $\omega$ 9	10,73		$C_{18}H_{34}O_2$	464502
Ácido Linoléico C18:2 $\omega$ 6	11,16		$C_{18}H_{32}O_2$	164683
Ácido Linolênico C18:3 $\omega$ 3	11,84		$C_{18}H_{30}O_2$	219471
Ácido Eicosanóico C20:0	12,81		$CH_3(CH_2)_{18}CO_2H$	50715
Áreas identificadas				12266273
Área total				15118770

Fonte: Vany Ferraz (2012).

Tabela 17 - Normalização da área do Tempo retenção de ésteres metílicos

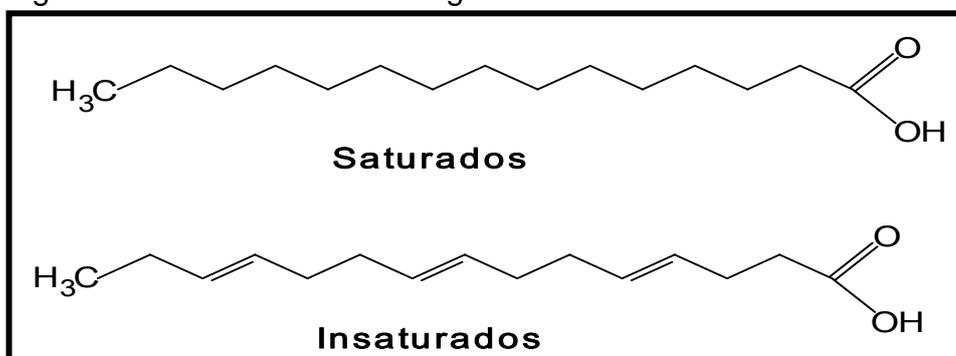
Nome	RT (min)	Normalização de Área (%)	AIEC-1
C14:0	5,63		0,89
C16:0	8,10		49,32
C16:1	8,32		0,91
C17:0	9,38		2,13
C18:0	10,49		21,93
C18:1	10,73		3,07
C18:2 $\omega$ 9	11,16		1,09
C18:3 $\omega$ 6	11,84		1,45
C20:0 $\omega$ 3	12,81		0,34
% identificados			81,13
% total			100,00

Fonte: Vany Ferraz (2012).

Conforme análise da Tabela 17, óleo de *Aegiphila integrifolia* mostra uma composição em média de 66,67% para os ácidos graxos saturados e 33,33% para os insaturados, portanto o ácido graxo saturado encontrou-se em maior quantidade.

Os ácidos graxos são nomeados de acordo número de carbonos e o número de ligações duplas presentes. Sua classificação é de acordo com as instaurações ou duplas ligações presentes em sua estrutura. Assim, os insaturados possuem ligação dupla e os saturados ligações simples o que os determinam, como mostra a Figura 15 (SILVA, 2011).

Figura 15- Estrutura de ácidos graxos saturados e insaturados



Fonte: Silva (2011).

Os ácidos graxos ômega-9 e ômega-3 mostrou uma composição em média de 0,761%. Eles são muito importantes para a saúde.

Segundo Paião (2010), revelou que os ácidos graxos insaturados ômega-3 e ômega-9 não apenas interrompem, mas também reverte o processo inflamatório causado por dietas ricas em gorduras saturadas numa região do cérebro chamada hipotálamo. O hipotálamo é responsável pelo controle da fome e do gasto energético. O processo inflamatório ocasiona a perda deste controle neural e abre espaço para o desenvolvimento da obesidade. O estudo revelou ainda, em descrição inédita na literatura, que o ômega-9, ao contrário do que se sabia até o momento, é mais potente em reverter essas condições do que o ômega-3, reconhecido como um clássico antiinflamatório.

Apenas uma pequena parcela da fração do lipídio total, segundo Venter (2003), obtido por meio da extração com uso de um solvente apolar consiste de ácidos carboxílicos de cadeia longa. A maior parte é encontrada como ésteres de glicerol. Os ácidos graxos mais conhecidos encontrados na natureza são de alto peso

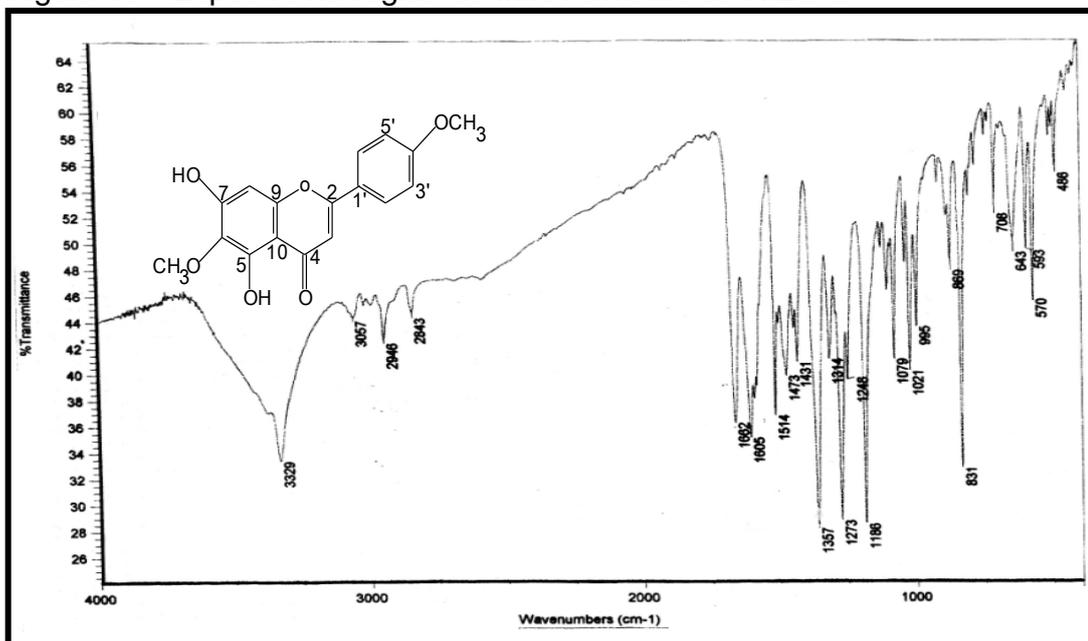
molecular, e em geral de cadeia linear, saturada ou insaturada. Também é possível terem substituintes na cadeia, como grupos metílicos, hidroxílicos ou carbonílicos.

### 5.1.2 AIEC-3 (Pectolarigenina)

A substância Pectolarigenina codificada como AIEC-3 foi obtida como um sólido amarelo cristalino, com faixa de fusão entre 216,9 - 220,0 °C. Em CCD apresentou uma única mancha quando eluída com diferentes sistemas de solventes.

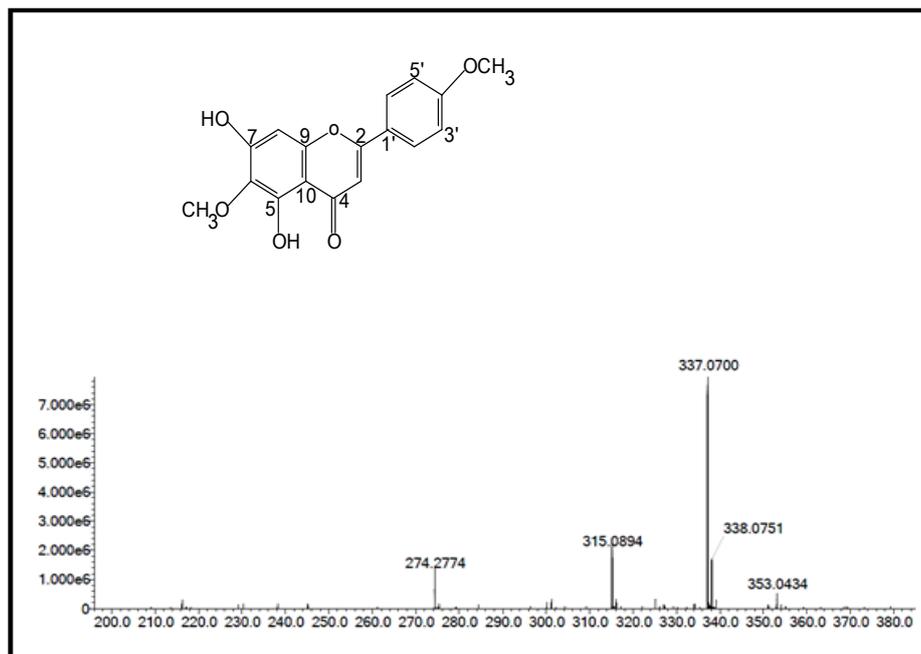
O espectro na região do infravermelho de AIEC-3, Figura 16, obtido em partilhas de KBr, apresentou absorção característica de hidroxila fenólica devido à presença de uma banda em  $3329\text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação axial de ligação O-H que corrobora com o sinal em  $1273\text{ cm}^{-1}$ , característico de estiramento C-O fenólico. Uma banda em  $1662\text{ cm}^{-1}$  compatível com uma carbonila conjugada, bandas em  $1606$  e  $1514\text{ cm}^{-1}$  referentes às vibrações de deformação axial de ligação  $\text{C}=\text{C}_{\text{arom}}$  e bandas em  $1186$  e  $1079\text{ cm}^{-1}$  características de deformação axial de ligação C-O.

Figura 16 - Espectro na região do Infravermelho de AIEC-3



O espectro de massas de alta resolução HR-ESI-MS a 70 eV, Figura 17 p. 53, forneceu o pico correspondente ao íon molecular com razão massa/carga(m/z) de 337,0700,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$ .

Figura 17 - Espectro de massas de pectolinarigenina (HR-ESI-MS a 70 eV)

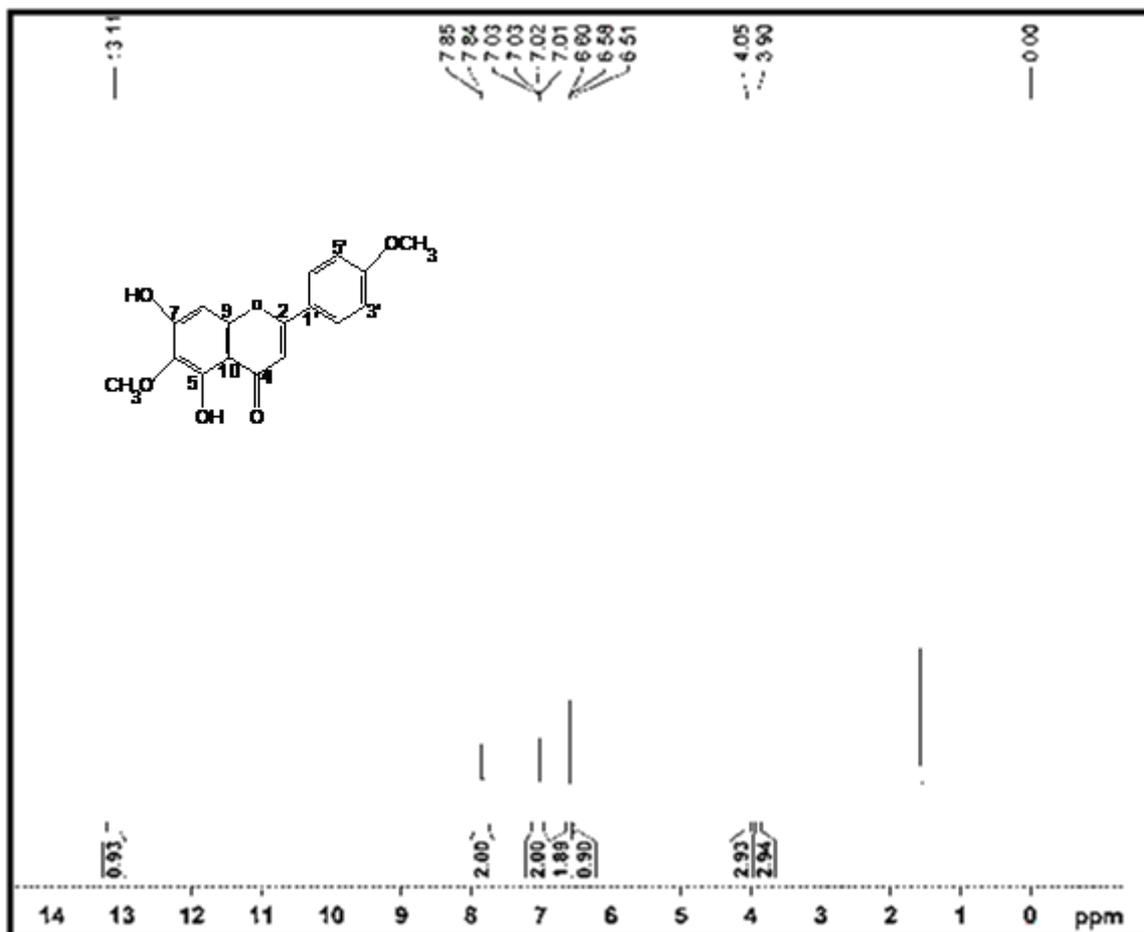


A identificação dos substituintes nos anéis A e B foram sugeridas a partir dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , Figura 18 p. 54 e comparação com a Literatura Tabela 19 p. 57. E as informações obtidas nos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear HSQC, HMBC Figuras 19 e 20 p.55 e 56 e comparação com a literatura, Tabela 20 p. 58.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi possível observar o sinal em  $\delta_{\text{H}}13,00$  atribuído ao hidrogênio da hidroxila quelada com a carbonila.

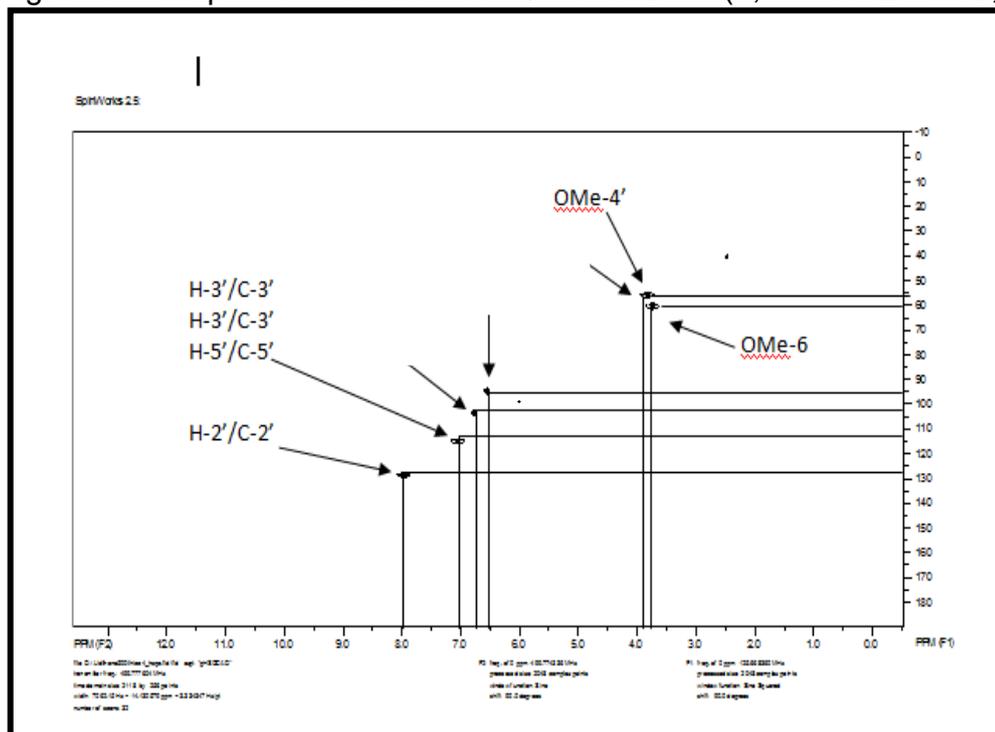
Os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}} 7,85$  (d;  $J=8,65$  Hz; H-2') e  $7,85$  (d;  $J= 8,65$  Hz; H-6') foram relacionados ao sistema AA'XX' no anel B. O duplete em  $\delta_{\text{H}} 7,85$  foi relacionado aos hidrogênios H-2' e H-6'desprotegidos devido ao efeito de conjugação com a carbonila, o duplete em  $\delta_{\text{H}} 7,03$  ( $J=8,80$ ) foi relacionado aos hidrogênios H-3' e H-5'.

Figura 18 - Espectro RMN de  $^1\text{H}$  AIEC-3 ( $\delta$ , 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



No espectro bidimensional de correlação heteronuclear HSQC, Figura 19, p.55, foi possível observar as correlações via  $^1J$  C-H entre os hidrogênios e seus respectivos carbonos. Nesse espectro foi observado o acoplamento entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,58 (H-3) com o carbono e  $\delta_{\text{C}}$  103,0 (C-3), do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,60 (H-8) com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  95,0 (C-8), dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7,85 (H-2' e H-6') com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  128,1 (C-2' e C-6'), dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7,03 (H-3' e H-5') com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  114,0 (C-3' e C-5') assim como, dos hidrogênios metoxilados em  $\delta_{\text{H}}$  4,05 e 3,90 com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  56,0 (6-OCH<sub>3</sub>) e 60,0 (4'-OCH<sub>3</sub>), respectivamente.

Figura 19 - Mapas de contornos HSQC de AIEC-3 ( $\delta$ , 500 X 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



A partir da análise do mapa de contornos HMBC, Figura 20, p. 56, que mostra as correlações C-H ( $^2J$ ) e ( $^3J$ ) foi possível confirmar o posicionamento do grupo metoxila em  $\delta_{\text{H}}$  3,90 já que foi observada uma correlação via ( $^3J$ ) com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  162,0. A correlação via ( $^3J$ ) entre os hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  4,05 com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  130,4 permitiu localizar outra metoxila em C-6. Ainda nesse espectro foi possível confirmar as correlações dos hidrogênios e carbonos mostrados na Tabela 18 p. 56.

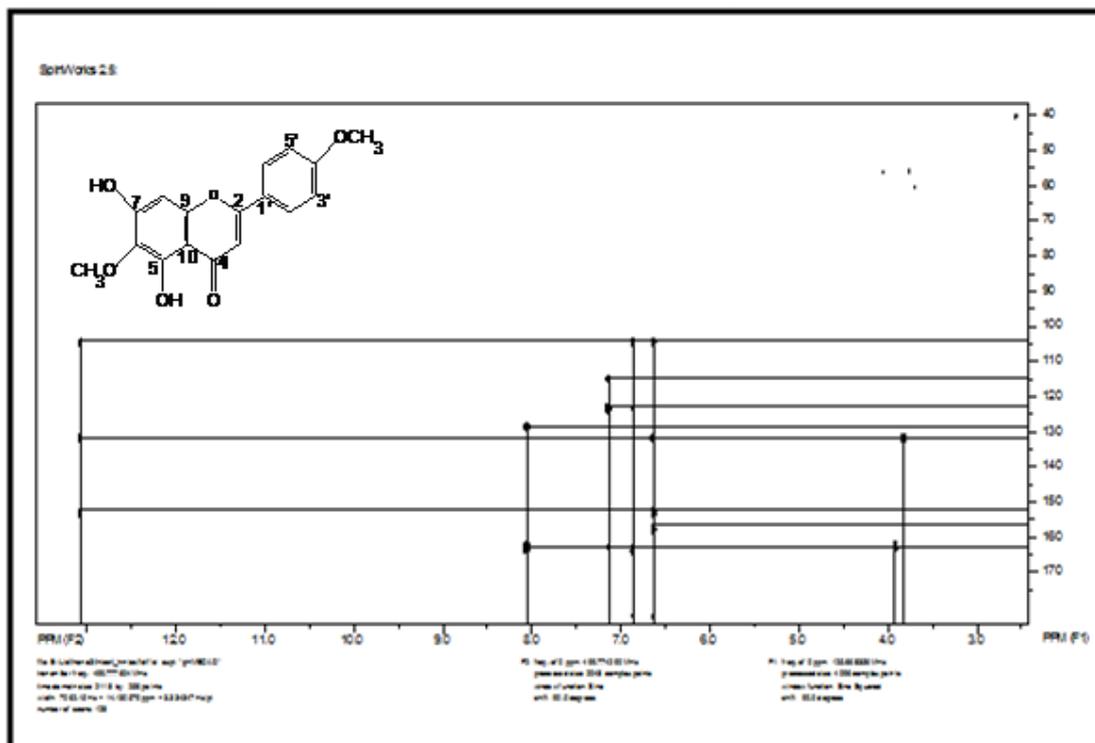
Figura 20 - Mapas de contornos HMBC de AIEC-3 ( $\delta$ , 500 x125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Tabela 18 - Correlações observadas no mapa de contornos HMBC de AIEC-3

$^1\text{H}$	$^2J$ $^{13}\text{C}$	$^3J$ $^{13}\text{C}$
H-3 $\delta$ 6,58	$\delta$ 160,3 (C-2)	$\delta$ 123,0 (C-1')
	$\delta$ 186,0 (C-4)	$\delta$ 104,9 (C-10)
H-8 $\delta$ 6,60	$\delta$ 154,2 (C-7)	$\delta$ 186,0 (C-4)
	$\delta$ 154,2 (C-9)	$\delta$ 104,9 (C-10)
H-2' e H-6' $\delta$ 7,85	$\delta$ 123,0 (C-1')	$\delta$ 128,1 (C-6')
	$\delta$ 114,0 (C-3')	$\delta$ 162,0 (C-4')
H-3' e H-5' $\delta$ 7,03	$\delta$ 128,1 (C-2')	$\delta$ 123,0 (C-1')
	$\delta$ 162,0 (C-4')	$\delta$ 114,0 (C-5')
OMe-6 $\delta$ 4,05	-	$\delta$ 130,4 (C-6)
OMe-4' $\delta$ 3,90	-	$\delta$ 162,0 (C-4)

As Tabelas 19 e 20 p. 57 e 58 mostram os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para AIEC-3 e os descritos na Literatura (BECCHI et al., 1980).

Tabela19 - Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  de AIEC-3 e Pectolinarigenina

Nº H	AIEC-3 $\delta^1\text{H}^a$ (multiplicidade, J Hz)	Pectolinarigenina $\delta^1\text{H}^b$ (multiplicidade, J Hz)
2	-	-
3	6,58(s)	6,58 (s)
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	6,60(s)	6,60 (s)
9	-	-
10	-	-
1'	-	-
2'	7,85 (d, 8,65)	7,84 (dd, 2,2; 9,0)
3'	7,03 (d, 8,80)	7,02 (dd, 2,0; 9,0)
4'	-	-
5'	7,03 (d, 8,80)	7,02 (dd, 2,0; 9,0)
6'	7,85 (d, 8,65)	7,84 (dd, 2,2; 9,0)
OMe-6	4,05 (s)	4,05 (s)
OMe-4'	3,90 (s)	3,90 (s)
OH-5	13,00 (s)	13,11 (s)
OH-7	6,51 (s)	6,51 (s)

a: registrado a 500 MHz, em  $\text{CDCl}_3$   
b: dados de BECCHI et al.,1980

Tabela 20 - Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (HMBC) de AIEC-3 e Pectolinarigenina

Nº C	AIEC-3	Pectolinarigenina
	$\delta^{13}\text{C}^{\text{a}}$	$\delta^{13}\text{C}^{\text{b}}$
2	160,3	163,8
3	103,0	103,7
4	186	183,0
5	152	152,1
6	130,4	130,4
7	154,2	154,8
8	95,0	93,3
9	154,2	154,1
10	104,9	105,8
1'	123,0	123,4
2'	128,1	128,0
3'	114,0	114,5
4'	162,0	162,7
5'	114,0	114,5
6'	128,1	128,0
OMe-6	56,0*	60,8
OMe-4'	60,5*	55,5
OH-5		-
OH-7		-

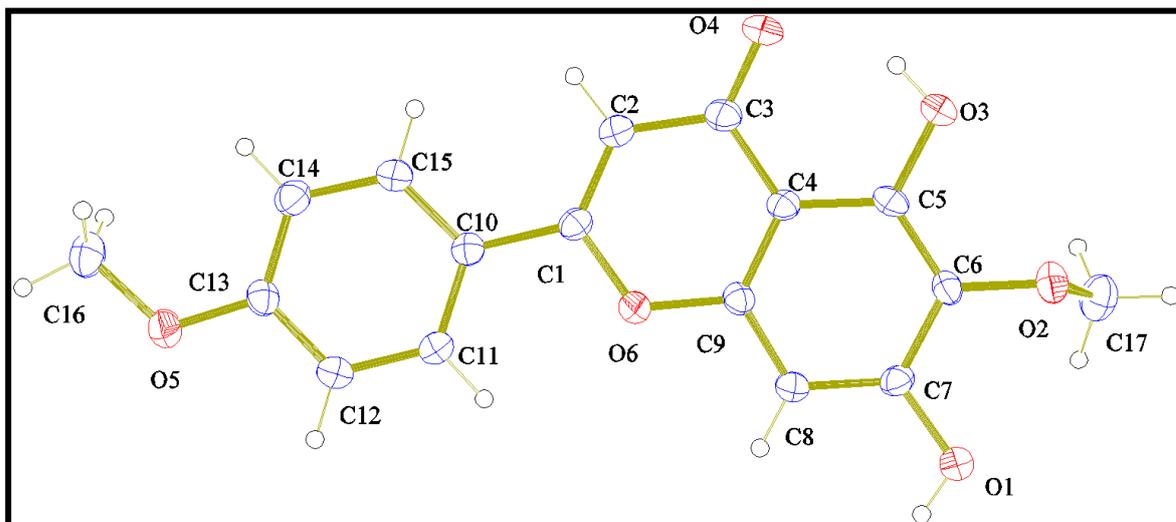
a: registrado a 125 MHz, em  $\text{CDCl}_3$

b: dados de BECCHlet al., 1980

\*podem estar trocados

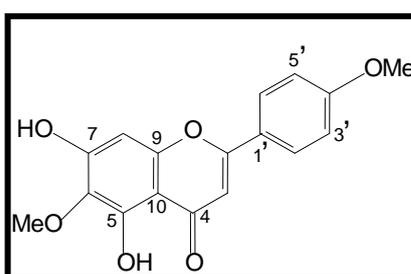
A estrutura da substância também foi analisada por difração de raios-X de monocristal. O diagrama ORTEP da estrutura cristalina deste composto está representado na Figura 21 p. 59. Segundo Marques (2009) em 1965, Carrol K. Johnson do Oak Ridge National Laboratory (ORNL) criou o ORTEP, *software* desenvolvido na linguagem de programação FORTRAN, para desenhar estruturas moleculares. Rapidamente ele se tornou o programa preferido dos cristalógrafos para a geração de ilustrações de estruturas para publicações e apresentações em conferências.

Figura 21- Programa Ortep do monocristal de AIEC-3



Comparando os dados obtidos com os da Literatura (BECCHI et al., 1980), foi possível propor que AIEC-3 trata-se do flavonóide 5,7-dihidroxi-6,4'-dimetoxi flavona conhecido como Pectolarigenina, com características antiinflamatória, inédito na espécie *Aegiphila integrifolia*, mas descrito anteriormente nas espécies *Santolina chamaecyparissus* (Asteraceae) (BECCHI et al., 1980) e *Clerodendron siphonanthus* (Tenebrionidae: Coleoptera) (SRİKUMAR et al., 1989).

Figura 22- Flavonoide (AIEC-3)



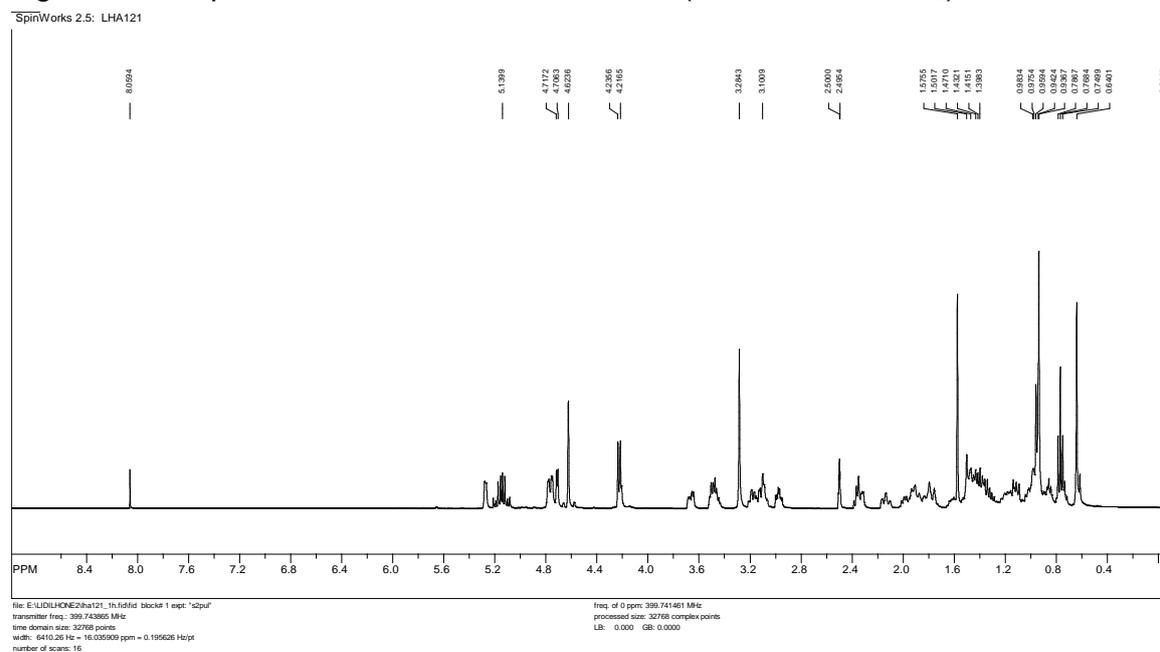
Os flavonoides constituem um grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza. Sua presença nos vegetais parece estar relacionada com funções de defesa (proteção contra raios ultravioletas, ações antifúngica e antibacteriana) (SIMÕES et al., 2004).

### 5.1.3 MISTURA DE $\beta$ -SITOSTEROL, ESTIGMASTEROL E LUPEOL GLICOSILADOS (AIEC-4)

AIEC-4 apresentou-se como cristais brancos de ponto de fusão 273 - 276,8°C.

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , Figura 23, permitiu identificar sinais característicos de uma mistura  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e lupeol glicosilados como:  $\delta_{\text{H}}$  5,00 referente ao hidrogênio da posição 6 no  $\beta$ -sitosterol e no estigmasterol;  $\delta_{\text{H}}$  3,00 - 4,00 envelope de sinais de hidrogênios da glicose + hidrogênios carbinólicos;  $\delta_{\text{H}}$  4,20 relativo ao hidrogênio anomérico da glicose (H-1'); além do envelope de sinais das metilas entre  $\delta_{\text{H}}$  0,68 - 1,10.

Figura 23 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de AIEC-4 ( $\delta$  500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

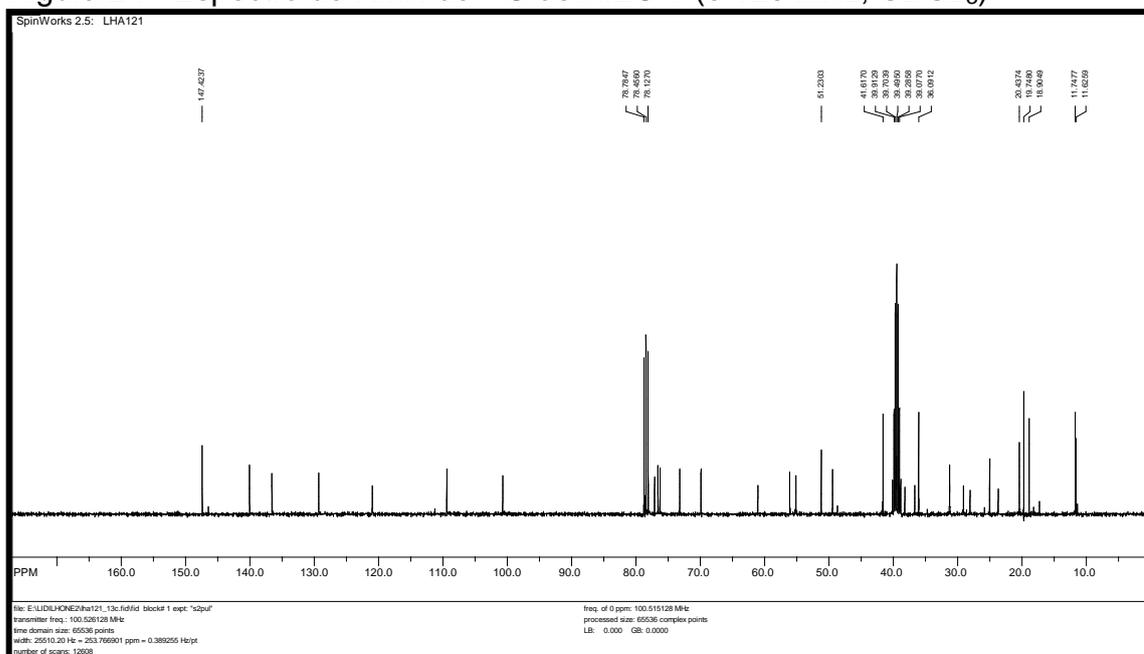


A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , Figura 24 p. 61, sugere que AIEC-4 é uma mistura de  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e lupeol glicosilados, nesse espectro, verificam-se seis sinais, os quais estão condizentes com a unidade glicosídica. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  100,73 é típico de carbono anomérico. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  140,07 e 121,01, foram atribuídos aos carbonos olefínicos C-5 e C-6 de ambos os esteróides, em  $\delta_{\text{C}}$  136,58 e 129,32, atribuídos a olefina C-22 e C-23 do estigmasterol e em  $\delta_{\text{C}}$  147,42 e 109,42, atribuídos a olefina C-20 e C-29 do lupeol.

Os esteróides como o estigmasterol e sitosterol são compostos de grande importância médica, usados no tratamento de muitas enfermidades, apresentando

propriedades analgésicas, antiinflamatórias e anticoncepcionais (OLIVEIRA & BUENO; BLOCK et al.; BATISTA, CHIARI, OLIVEIRA (1996, 1998 e 1999 apud SILVA, R. Z, 2000).

Figura 24 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de AIEC-4 ( $\delta$  125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



Estigmasterol difere do sitosterol somente pela presença de uma ligação dupla em C-22 na cadeia lateral (ROCHA et al., 2007).

Figura 25 - Estrutura química do  $\beta$ -sitosterol Glicosilado (1) e Estigmasterol Glicosilado (2)

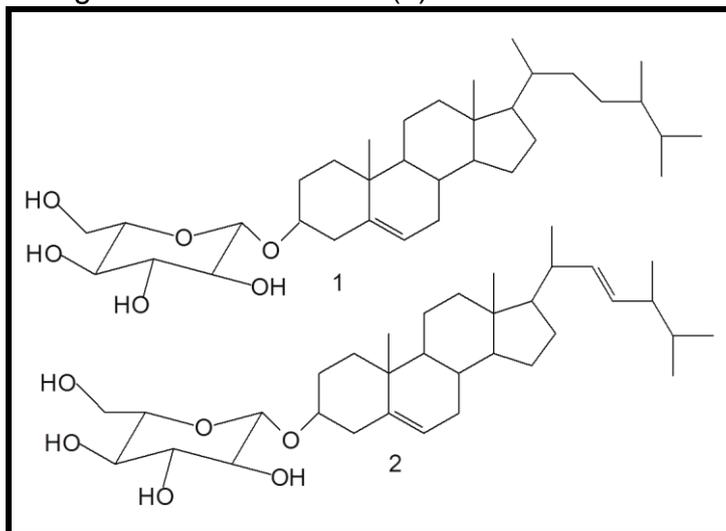
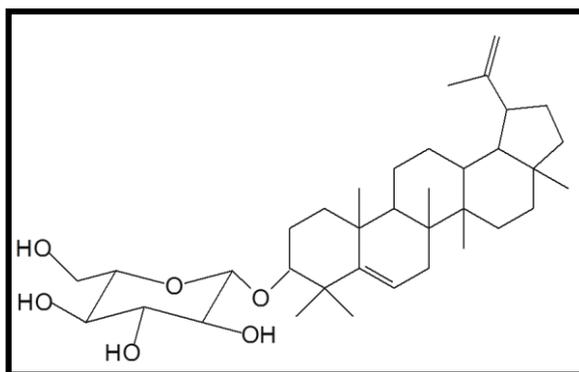


Figura 26 - Lupeol Glicosilado



Esse triterpeno é uma substância com potencial citotóxico para diferentes tipos de células cancerígenas (BEZERRA et al., 2011).

A comparação dos deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com os dados da Literatura, Tabela 21 p. 63, confirma as atribuições para AIEC-4.

Tabela 21- Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura de AIEC-4 com  $\beta$ -Sitosterol glicosilado, Estigmasterol glicosilado e Lupeol glicosilado.

C ppm	AIEC-4	$\beta$ -Sitosterol glicosilado (MANTRUC CIO, et al. 2005)	AIEC-4	Estigmasterol glicosilado (MANTRUCCIO, et. al 2005)	AIEC-4	Lupeol glicosilado (FALCÃO, D. Q., 2003)
1	36,09	37,30	36,09	37,1	36,09	38,69
2	29,12	29,79	29,12	31,5	29,12	27,40
3	76,28	75,11	73,22	71,7	73,22	78,90
4	20,43	21,09	41,61	42,1	38,86	38,83
5	140,07	140,76	140,07	140,6	55,14	55,28
6	121,01	121,69	121,01	121,6	18,90	18,31
7	25,04	26,27	31,25	31,8	31,25	34,27
8	31,28	31,90	31,28	31,8	31,28	40,81
9	51,23	50,20	51,23	50,0	51,23	50,42
10	36,69	36,74	36,69	36,4	36,69	37,20
11	-	22,70	20,43	21,1	20,43	20,492
12	39,70	39,79	39,70	39,7	25,04	25,12
13	41,61	42,30	40,12	42,1	38,23	38,04
14	56,12	56,66	56,12	56,7	41,61	42,80
15	-	24,32	-	24,2	27,00	27,41
16	28,10	28,34	28,10	28,8	-	35,57
17	56,12	56,10	55,14	55,9	55,14	42,99
18	11,74	11,79	11,62	11,9	49,47	48,28
19	19,74	19,77	19,74	19,3	47,00	47,98
20	36,09	36,20	36,09	40,4	147,42	150,96
21	-	19,23	-	21,1	29,00	29,83
22	38,23	34,06	136,58	138,2	40,12	40,00
23	31,25	30,07	129,32	129,1	28,10	27,98
24	49,47	45,90	49,47	51,1	-	15,37
25	29,12	29,29	29,12	31,8	-	16,20
26	19,00	19,04	21,00	21,0	-	16,11
27	18,90	18,83	18,90	18,9	11,74	14,52
28	23,72	23,23	23,72	25,3	19,74	17,99
29	11,62	11,97	11,74	12,1	109,42	109,32
30	-	-	-	-	-	19,30
1'	100,73	102,40	100,73	-	100,73	-
2'	78,45	78,38	78,45	-	78,45	-
3'	78,12	78,22	78,12	-	78,12	-
4'	77,13	77,94	77,13	-	77,13	-
5'	73,22	74,99	76,28	-	76,28	-
6'	61,08	62,67	61,08	-	61,08	-

Fonte: Mantruccio, et. al. 2005; Falcão, D. Q., 2003.

## 6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

### 6.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO DPPH

O termo antioxidante segundo Ferreira e Costa (2011), se refere a compostos que tem finalidade de reagir diretamente com os agentes oxidantes, assim como, os radicais livres. Esses compostos possuem a capacidade de doar elétrons, provendo uma inativação dos radicais livres.

Substâncias que combatem os radicais livres, diminuindo o seu poder de reação química, agem no organismo como mecanismo de defesa. Deste modo, em constante atividade estão esses antioxidantes, pois a produção de energia no organismo é uma das principais causas da formação dos radicais (RAMALHO; JORGE, 2006).

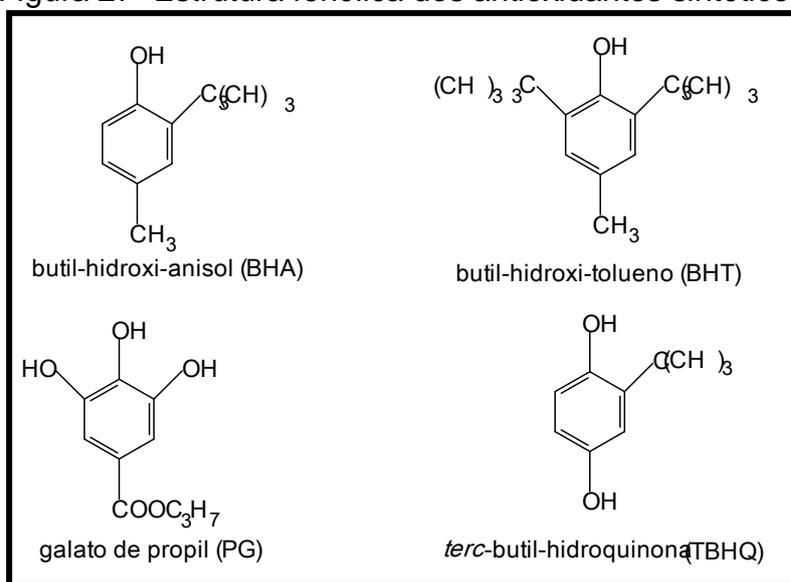
Os antioxidantes presentes em extratos de plantas segundo Costa e Ferreira (2011) vêm atraindo, cada vez mais, a atenção dos consumidores, assim como uso de plantas com propriedades terapêuticas, também, chama a atenção dos pesquisadores. Extratos de frutas, cereais, e de diferentes vegetais e, seus produtos derivados têm mostrado atividades antioxidantes efetivas em diferentes sistemas modelos. A atividade antioxidante de compostos orgânicos é dependente de algumas características estruturais, que incluem, na maioria dos casos, a presença de grupamentos fenólicos. Desta forma, flavonoides, fenilpropanoides e outros compostos aromáticos são os principais alvos da busca por antioxidantes.

Com a intenção de inibir ou adiar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos gordurosos, são utilizados compostos químicos conhecidos como antioxidantes. O desenvolvimento de compostos indesejáveis oriundos da oxidação lipídica é um importante problema a ser resolvido a fim de se obter uma prorrogação da vida saudável de óleos, gorduras e alimentos gordurosos. Portanto, tem surgido uma série de estudos para avaliar o potencial antioxidante de vários compostos para avaliar-se a concentração adequada, a influência do sistema lipídico e da temperatura, existindo também forte tendência de substituição dos antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais, visto que as pesquisas têm demonstrado a possibilidade dos sintéticos apresentarem algum efeito tóxico (RAMALHO; JORGE, 2006)

Antioxidantes sintéticos BHA, BHT, PG e TBHQ são os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos (RAMALHO; JORGE, 2006).

A estrutura fenólica destes compostos, Figura 27, permite adoção de um próton a um radical livre, regenerando, assim molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres. Entretanto, estes radicais podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação Buck (1981 apud Ramalho; Jorge, 2006).

Figura 27- Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos



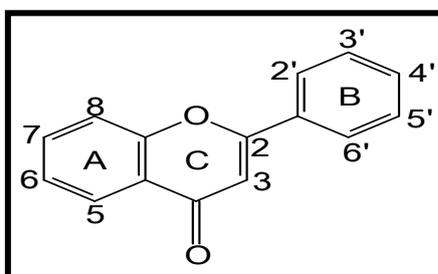
Fonte: Ramalho e Jorge (2006).

Os antioxidantes presentes em extratos de plantas vêm despertando o interesse de pesquisadores. A atividade antioxidante de compostos orgânicos é dependente de algumas características estruturais, que incluem, na maioria dos casos, a presença de grupamentos fenólicos. Desta forma, flavonoides, fenilpropanoides e outros compostos aromáticos são os principais alvos da busca por antioxidantes (FERREIRA, COSTA, 2011). Entre os antioxidantes naturais mais utilizados podem ser citados tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas.

Os flavonoides são segundo Behling (2004), uma classe de compostos naturais de considerável interesse científico e terapêutico. Eles são um grupo de substâncias naturais com estrutura fenólica variável. A quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona) é o principal flavonoide presente na dieta humana. Várias propriedades terapêuticas dos flavonoides, principalmente, da quercetina, têm sido estudadas nas

últimas décadas, destacando-se o potencial antioxidante, anticarcinogênico e seus efeitos protetores aos sistemas renal, cardiovascular e hepático.

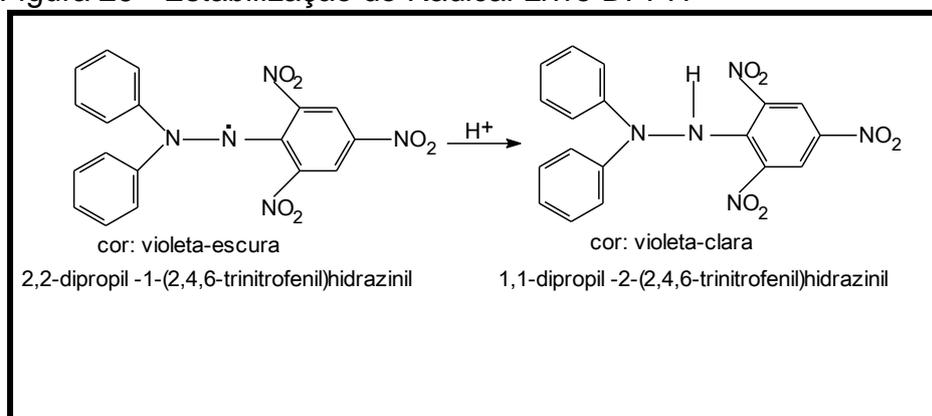
Figura 28 - Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: Behling (2004).

Segundo Rufino et al. (2007) e (SILVA, 2011), a avaliação ocorre principalmente em meio orgânico e a absorvância máxima do radical DPPH<sup>\*</sup> é medida em 515 nm. A sua coloração, inicialmente, violeta muda para amarelo quando ocorre à captura do hidrogênio radical hidroxila, e logo se observa a diminuição da absorvância, Figura 29.

Figura 29 - Estabilização do Radical Livre DPPH<sup>\*</sup>



Fonte: Silva (2011).

A Atividade Antioxidante foi realizada no Laboratório de Química Analítica sob supervisão da Técnica de laboratório da UFRR, Elenilda Rebouças.

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada *in vitro* através do teste de DPPH<sup>\*</sup> e com utilização do espectrofotômetro UV-Visível por comparação adaptada com a metodologia de (RUFINO et al., 2007).

A partir da solução inicial de DPPH<sup>\*</sup> (60 µmol.L<sup>-1</sup>) obtiveram-se soluções com as concentrações de 10 µmol.L<sup>-1</sup> a 50 µmol.L<sup>-1</sup> conforme a Tabela 22 p. 67.

Tabela 22 - Preparo das soluções para a curva analítica do DPPH<sup>\*</sup>

Solução de DPPH <sup>*</sup> (mL)	Álcool metílico (mL)	Concentração final DPPH <sup>*</sup> ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )
0	10	0
1,7	8,3	10
3,3	6,7	20
5,0	5,0	30
6,7	3,3	40
8,3	1,7	50
10	0	60

Fonte: Rufino et al. (2007).

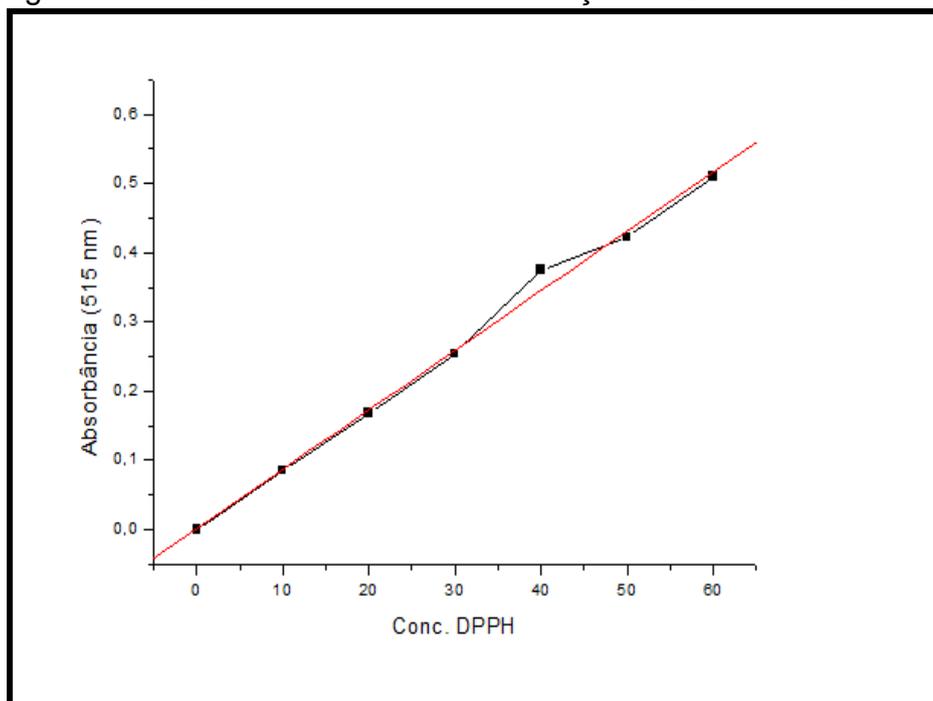
A determinação da percentagem de redução do DPPH<sup>\*</sup> foi realizada com a referência quercetina e o extrato da planta *Aegiphila integrifolia* em diferentes concentrações (10 mg.L<sup>-1</sup>, 20 mg.L<sup>-1</sup>, 30 mg.L<sup>-1</sup>, 40 mg.L<sup>-1</sup>, 50 mg.L<sup>-1</sup> e 60 mg.L<sup>-1</sup>) diluídas em metanol e a leitura em espectrofotômetro a 515 nm.

## 6.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

A partir do extrato obtido das folhas de *Aegiphila integrifolia* (5,0 mg), preparou-se em tubos de ensaio cinco diluições diferentes em triplicatas. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com aproximadamente 4,0mL do radical DPPH<sup>\*</sup>  $6 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>, homogeneizou-e em tubos de ensaio.

A atividade sequestrante do radical livre DPPH<sup>\*</sup> foi expressa em termos de EC<sub>50</sub> (concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% da concentração inicial do DPPH<sup>\*</sup>), por meio da média obtida nos gráficos que relacionam o percentual de atividade contra a concentração da substância ensaiada. Desta forma, segundo Ferreira, (2010), quanto menor o seu valor, maior é a capacidade antioxidante das substâncias presentes.

Figura 30 - Curva analítica da Concentração de DPPH' X Absorbância

Tabela 23 - Valores de EC<sub>50</sub> do DPPH

Regressão Linear Para DPPH				
Y = A + B * X				
Parâmetro	Valores	Erros		
A	0,00118	0,01002		
B	0,0086	2,77925 E - 4		
R	SD	N	P	
0,9974	0,01471	7	<0,0001	

SD: Desvio padrão.

N: Número de amostras.

### 6.3 CÁLCULO DE CALIBRAÇÃO DO DPPH'

Absorção igual 0,510 nm.

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

X = 59,165  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ou 0,023 g reduzindo a 50% igual DPPH = 0,012  $\text{g.L}^{-1}$ .

Figura 31 - Curva analítica da Cocentração de Quercetina X Absorbância

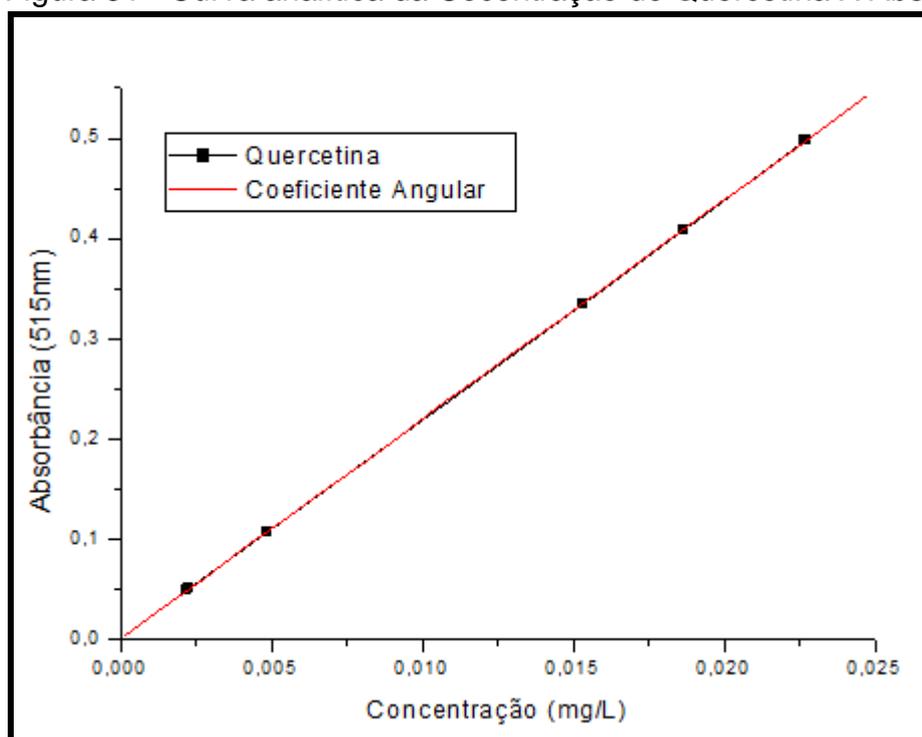


Tabela 24 - Valores de EC 50 da Quercetina

Regressão Linear para Quercetina			
Y = A + B * X			
Parâmetro	Valores	Erros	
A	9,83726 E-4	3,65289 E-4	
B	21,87033	0,0266	
R	SD	N	P
1	5,35318 E-4	6	<0,0001

SD: Desvio padrão.

N: Número de amostras

Figura 32 - Curva analítica da Concentração de *Aegiphila integrifolia* X Absorbância

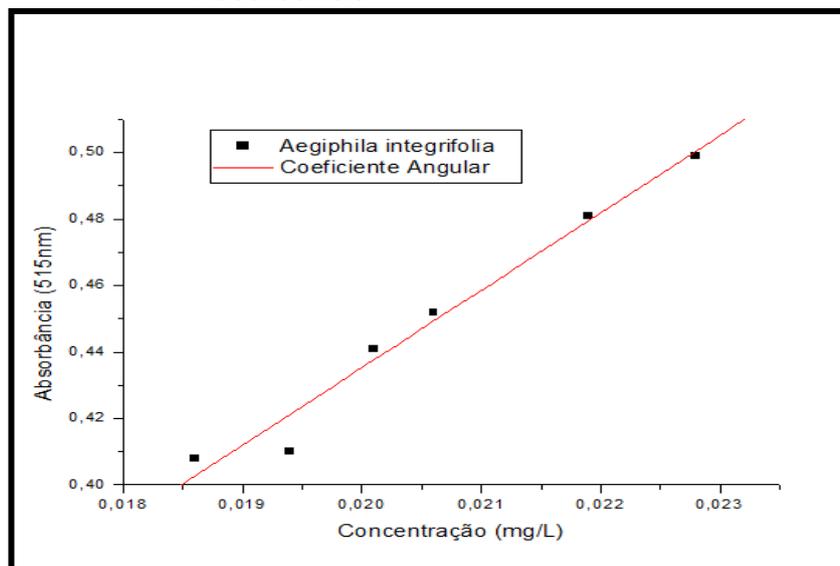


Tabela 25 - Valores de EC<sub>50</sub> do extrato etanólico de *Aegiphila integrifolia*

Regressão linear <i>Aegiphila integrifolia</i>				
Y = A+B*X				
Parâmetro	Valores	Erros		
A	- 0,03025	0,03953		
B	23,27784	1,91743		
R	SD	N	P	
0,9867	0,0067	6	2,64157E-4	

SD: Desvio padrão.

N: Número de amostras .

A análise foi feita com extrato etanólico da *Aegiphila integrifolia*. O valor de EC<sub>50</sub> foi de 59,165 µmol.L<sup>-1</sup>. Portanto são necessários 0,012 g.L<sup>-1</sup> de DPPH\* para reduzir 0,242 g.L<sup>-1</sup> do extrato etanólico de *Aegiphila integrifoliae* 0,257 g.L<sup>-1</sup> do padrão quercetina.

O teste antioxidante mostrou-se positivo nos extratos etanólico de *Aegiphila integrifolia* comparados ao padrão quercetina.

## 7 BIOENSAIO PRELIMINAR COM EXTRATO ETANÓLICO *AEGIPHILA INTEGRIFOLIA*

### 7.1 ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE AO MICROCRUSTÁCIO: *Artemia Salina*

A análise de toxicidade de substâncias e extratos aos náuplios de *Artemia salina* Leach é um método simples, rápido e de baixo custo para determinação da

toxicidade e para sugestão de compostos bioativos, que se baseia na viabilidade remanescente desses microcrustáceos após exposição ao tratamento em estudo. O método pode ser considerado um teste inicial para prever atividades farmacológicas de substâncias puras e extratos, os quais podem ser submetidos posteriormente a ensaios mais elaborados para determinar atividades biológicas específicas. São consideradas tóxicas aos náuplios de *artemia* todas as substâncias ou extratos que apresentam  $CL_{50} < 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (MEYER et al., 1982).

Bioensaio preliminar tem como objetivo de avaliar ou prever os efeitos de substâncias tóxicas nos sistemas biológicos, classificar a toxicidade de uma substância química. O teste possui caráter agudo-letal, que consiste de uma análise após curta exposição (24 - 48) do composto com o organismo bioindicador. Neste teste obtém-se uma taxa de sobrevivência deste ao produto testado, ou seja, observam-se os danos causados ao organismo teste e a concentração que provoca a morte de 50% dos mesmos, representada pela sigla  $LC_{50}$  ou  $DL_{50}$  (MEYER et al., 1982).

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 bioindicador capaz em uma avaliação toxicológica pré-clínica Hildebrandt et al. (2013 apud BARBOSA et al. 2003).

## 7.2 METODOLOGIA EMPREGADA

A toxicidade sobre *Artemia salina* empregou a metodologia segundo Mayer et al. (1982) e McLaughlin et al. (1993).

### 7.2.1 Incubação

Em um aquário de forma arredondada que serviu como incubadora, foi adicionada uma solução salina artificial (40 g de sal marinho para 1 Litro de água destilada) com o pH ajustado entre 8 e 9. A incubadora foi iluminada artificialmente com uma lâmpada fluorescente com aeração. Em um dos lados da incubadora, foram colocados aproximadamente 100 mg de cisto de *Artemia salina*. Parte do sistema foi coberto com papel alumínio para que os organismos ao nascerem,

permanecessem isolados em um dos lados do aquário devido à diferença de iluminação. Durante a incubação, a temperatura foi monitorada em torno dos 28° C entre 24 e 48 horas para eclodirem.

### 7.2.1 Exposição

O tempo de exposição partiu de uma solução de 11 mL contendo 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  da amostra do extrato etanólico de *Aegiphila integrifolia* solubilizada 1% de tween 80 e completado com água salina.

Após o período de incubação de 24 horas, os organismos (náuplios de *Artemia salina*), foram selecionados e expostos em tubos de ensaios com diferentes concentrações diluídas de 6,87: 13,75: 27,5: 55,0: 110,0 e 220 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) da amostra. Em cada tubo, foram transferidos com pipeta de Pastero 10 náuplios de *Artemia*. Os testes foram feitos em triplicata para cada concentração. Utilizou-se uma solução salina como controle positivo também em triplicata.

### 7.3 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO TESTE DE TOXICIDADE

Considerar-se baixa toxicidade quando a dose letal 50% ( $DL_{50}$ ) foi superior a 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; moderada para  $DL_{50}$  entre 100 a 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e muito tóxico quando a  $DL_{50}$  foi inferior 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Na leitura após 24 horas foi constatada ausência de mortalidade e após 48 horas os resultados obtidos encontram-se na Tabela 26.

Tabela 26 - Letalidade frente à *Artemia salina*

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	1000	500	250	125	62,5	31,25	Controle 1	Controle 2
Amostra	3	1	0	0	0	0	0	0
Duplicata	3	1	0	0	0	0	0	0
Triplicata	2	1	0	0	0	0	0	0

Figura 33 - N<sup>o</sup> de náuplios mortos x Concentração do E.E. da *A. integrifolia*

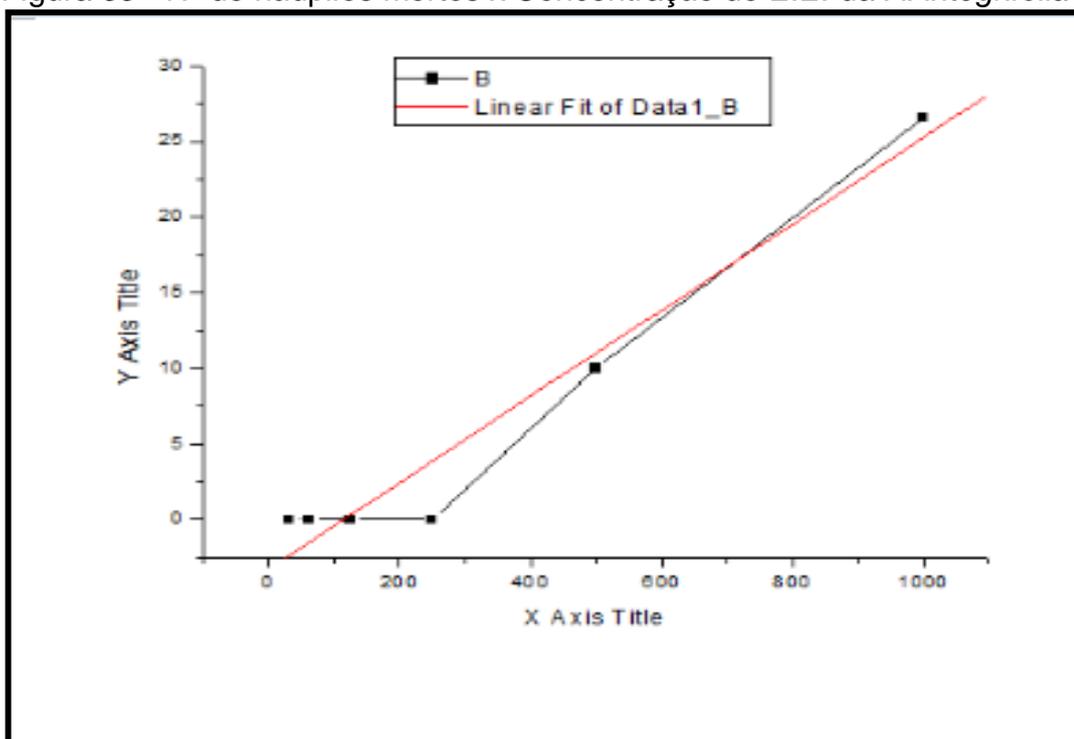


Tabela 27- Valores de DL<sub>50</sub> frente à *Artemia salina*

Parâmetro	Valores	Erros	
A	-3,25672	1,4403	
B	0,02852	0,00306	
R	SD	N	P
0,9778	2,53276	6	7,3405E-4

SD: Desvio padrão.

N: Número de amostras

#### 7.4 CÁLCULO DE CALIBRAÇÃO FRENTE À *Artemia salina*

$$Y = A + B \cdot X$$

$$50 = -3,25672 + 0,02852 \cdot X$$

$$X = 1867,346 \text{ ou } 1,867 \times 10^3$$

O extrato etanólico da planta *Aegiphila integrifolia* de acordo com o teste realizado frente à *Artemia salina* é considerado de baixa toxicidade (DL 50% superior a 500 µg.mL<sup>-1</sup>) tendo sido encontrado o valor de DL de 1,867x10<sup>3</sup> µg.mL<sup>-1</sup>.

O resultado encontrado está em acordo segundo Oliveira apud Zuque (2004), com valores encontrados na literatura onde é citada a baixa toxicidade do gênero *Aegiphila* frente à *Artemia salina*.

## 8 BIOENSAIO DE MIC (Mínima Concentração Inibitória) PARA MICROORGANISMOS (Fungos Filamentosos, Bactérias Gram-Positivas, Gram-Negativas e Levedura)

Os Fungos Filamentosos: *Aspergillus flavus* e *Fusarium proliferatum*. As Bactérias Gram-Positivas utilizadas no teste foram *S. aureus* (ATCC 25923) e *S. sanguinis* (ATCC 49456), Gram-Negativas foram *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. O antibiótico testado para as Bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas foi Ampicilina. E para leveduras *Candida albicans* os antibióticos comparados foram Nistatina e Miconazol.

Todos os ensaios da atividade biológica descritos abaixo foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) com a supervisão da Prof<sup>a</sup>. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi.

### 8.1 METODOLOGIA PARA OS FUNGOSFILAMENTOSOS

Fungos: *Aspergillus flavus* e *Fusariumproliferatum*.

Solvente utilizado para o preparo das amostras: Dimetilsulfóxido.

Concentração das amostras no teste: 250 µg.mL<sup>-1</sup>.

Meio utilizado para o crescimento dos micro-organismos: Caldo *Sabouraud*.

Concentração da suspensão de esporos: 5 x 10<sup>-5</sup> esporos mL<sup>-1</sup>.

Tempo de incubação das amostras: 48 horas.

### 8.2 DADOS DA LEITURA:

Realizada em leitor de placas de microtitulação.

Comprimento de onda utilizado na leitura: 490nm.

### 8.3 TRATAMENTO DOS DADOS:

Teste de outlier: Teste de Grubbs, com nível de significância de 95%.

Cálculo da porcentagem de inibição: Realizado por meio da fórmula

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

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.

#### 8.4 METODOLOGIA EMPREGADA PARA AS BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS E LEVEDURA

As amostras foram pesadas e solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em uma solução com concentração de 50 mg.mL<sup>-1</sup>(extratos) e 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> (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 horas. 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<sup>8</sup> 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 oito 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 horas). Posteriormente, foram incubadas em estufa a 37 °C e após 24 h foi realizada nova leitura das mesmas, encerrando o teste.

## 8.5 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

O bioensaio da Mínima Concentração Inibitória (MIC) para as Bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguinis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Candida albicans* realizado com amostras do flavonoide pectolinarigenina (RR05) e no extrato etanólico (RR06) apresentaram os seguintes resultados na Tabela 28.

Tabela 28 - Bioensaio de MIC das amostras RR05 e RR06

Concentração	<i>S. aureus</i>		<i>S. sanguinis</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>C. albicans</i>	
	RR05	RR06	RR05	RR06	RR05	RR06	RR05	RR06	RR05	RR06
% de inibição 01 (500 µg)	25,886	40,453	93,827	47,798	0,000	65,782	0,000	100	92,473	92,086
% de inibição 02 (250 µg)	22,638	28,740	34,998	32,365	0,000	30,917	0,000	71,425	95,410	91,339
% de inibição 03 (125 µg)	20,079	19,094	34,725	32,093	0,000	20,572	18,727	36,431	95,820	91,185
% de inibição 04 (62,5 µg)	15,748	10,433	26,827	23,196	1,125	14,952	23,593	39,640	96,202	91,601
% de inibição 05 (31,25 µg)	14,075	5,610	21,289	18,293	8,735	8,834	31,772	14,068	96,299	91,932
% de inibição 06 (15,625 µg)	11,024	0,591	19,383	15,933	13,012	11,371	33,635	46,888	97,200	92,194
% de inibição 07 (9,375 µg)	12,795	5,512	26,555	12,574	13,559	13,509	43,678	56,413	97,964	92,741
% de inibição 08 (3,90625 µg)	0,000	0,000	0,000	0,000	15,250	17,687	56,102	42,953	96,892	91,960

Cálculo das médias do Bioensaio de Mínima Concentração Inibitória para os Fungos Filamentosos (250 µg.mL<sup>-1</sup>), as Bactérias Gram-Positivas, Gram-Negativas e a Levedura (500 µg, 250 µg, 125 µg, 62,5 µg, 31,25 µg, 15,625 µg, 9,375 µg, 3,906 µg) apresenta-se o percentual de inibição na Tabela 29 p. 77.

Tabela 29 - MIC para os Fungos Filamentosos e Bactérias Gram-Positivas, Gram-Negativas e Levedura

FUNGOS									
S. <i>flavus</i> 250 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )					S. <i>proliferatum</i> 250 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				
(RR05) 0%					(RR06) 0%				
(RR06) 38%					(RR06) 20%				
BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS		BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS				LEVEDURA			
S. <i>aureus</i>	Antibiótico Ampicilina	S. <i>sanguinis</i>	Antibiótico Ampicilina	<i>E. coli</i>	Antibiótico Ampicilina	S. <i>tiphymurium</i>	Antibiótico Ampicilina	C. <i>albicans</i>	Antibiótico Nistatina e Miconazol
(RR05)		(RR05)		(RR05)		(RR05)		(RR05)	
15%	79%	32%	13%	06%	96%	26%	100%	96%	91%
(RR06)		(RR06)		(RR06)		(RR06)		(RR06)	
14%		23%		23%		51%		92%	

As médias das concentrações das amostras do flavonoide (RR05) e do extrato etanólico (RR0), referente às bactérias e fungos, foi observado baixa inibição, pois a maioria dos testes a inibição foi inferior a 50% comparadas ao antibiótico ampicilina.

A levedura *Cândida albicans* apresentou uma inibição satisfatória de 96% para amostra (RR05) e 92% (RR06) comparadas aos antibióticos Nistatina e Miconazol.

## 10 CONCLUSÃO

O estudo Fitoquímico do eluato clorofórmio do extrato etanólico realizado das folhas de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.) coletadas no Campus Caumé das Ciências Agrárias da Universidade Federal de Roraima.

A partir do eluato clorofórmio, isolou-se, purificou-se e caracterizou-se um flavonoide denominado Pectolinarigenina inédito na família Lamiaceae e no gênero *Aegiphila*. Além desse, foram isolados uma mistura de ésteres metílicos saturados e insaturados e uma mistura  $\beta$ -sitosterol, estigmaterol e lupeol glicosilados. Neste trabalho foram utilizadas várias técnicas de isolamento e purificação do extrato etanólico numa etapa preliminar, esse extrato foi submetido ao fracionamento por meio de técnica de cromatografia em coluna de sílica Gel 60 e através de associação de técnicas espectroscópicas como IV, RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , HMQC, HMBC, bem como espectrometria de massas em comparação com a literatura.

Para identificação dos ésteres metílicos foi utilizada a técnica de CG em comparação com padrões.

Os Ensaio biológicos mostraram que: o extrato etanólico de *Aegiphila integrifolia* ( $\text{EC}_{50}$  0,242  $\text{g.L}^{-1}$ ) possui um bom potencial antioxidante comparado ao padrão quercetina ( $\text{EC}_{50}$  0,257  $\text{g.L}^{-1}$ ), por se tratar de um extrato bruto. E o teste com a *Artemia Salina* apresentou baixa toxicidade, pois houve baixa mortalidade, condizente com a Literatura desse gênero.

Foram submetidos ao ensaio da Mínima Concentração Inibitória (MIC), fungos os *Aspergillus flavus* e *Fusarium proliferatum* com as amostras do flavonoide (RR05) e extrato etanólico (RR06). A amostra pura (RR05) não apresentou atividade antifúngica. E a amostra do extrato etanólico (06) apresentou uma atividade inferior a 50%. Não foi encontrado relato sobre esses fungos na Literatura.

As Bactérias testadas no bioensaio da Mínima Concentração Inibitória (MIC) foram *S. aureus*, *S. sanguinis*, *Escherichia coli* e *Salmonella tiphymurium*. A inibição das amostras (RR05) e (RR06) testadas com essas bactérias foi insatisfatória, pois a maior parte delas não atingiu o nível de inibição de 50%, comparado ao antibiótico ampicilina. Dessas bactérias apenas a *S. tiphymurium* inibiu mais de 50% para a amostra (RR06). Já a levedura *Candida albicans* apresentou inibição de mais 90% satisfatória para ambas as amostras comparados aos antifúngicos Nistatina e

Miconazol. Também não foi encontrado relato sobre esses bioensaios no gênero *Aegiphila*.

Este trabalho contribui com o estudo Fitoquímico das Lamiaceae fornecendo dados sobre o gênero *Aegiphila* e mediante a divulgação de novos dados sobre *Aegiphila integrifolia* na Literatura. Posteriormente poderá servir como referência para outros trabalhos.

As demais amostras se encontram depositadas no Laboratório de Produtos Naturais da UFRR. Terão se estudo continuado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P.K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. In: **Studies in Organic Chemistry 39**. Elsevier: New York, 1989. p. 135.

ALMEIDA, L. F. R. **Composição Química e Atividade Alelopática de Extratos Foliares de *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae)**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Fisiologia Vegetal) - Universidade Estadual Paulista - Instituto de GeoCiências. Botucatu - SP. 2006.

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

ARAÚJO, S. G.; MORAIS, M. I.; PINTO, M. E. A.; COELHO, F. V.; RIBEIRO, R. R.; JÚNIOR, C. A. C. D., LIMA, L. A. R. **Avaliação da Atividade Antioxidante de *Mentha* SP**. 1º Congresso de Farmácia da UFSJ. Divinópolis – MG. 2010.

BAROSA, J.; FERREIRA, A., FONSECA, B., SOUZA, I. **Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina*- Poluição e ecotoxicologia marinha**, Nov. 2003.

BECCHI, M and M.  **$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR assignments are based on  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spectra. 5,7- dihydroxy-4',6-dimethoxyflavone Carrier, *Planta medica*, 1980. 38 e 267 p.**

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

BRAND-WILLIAMS, M. E.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C.. **Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity**. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** 1995, n. 28, p. 25-30.

BEZERRA, et al. **Estudo fitoquímico bioquímico da atividade citotóxica da espécie *Vernonia brasiliensis***. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2011.

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

BRAGA, C. de M. **História da utilização de plantas medicinais**. Monografia (Obtenção de Grau pelo Consórcio Setentrional de Educação a Distância) – Universidade de Brasília, 2011.

CORNELIUS, M. T. F. **Constituintes Químicos Isolados da Espécies: *Plumeria lancifolia* Müll. ARG. (APOCYNACEAE) e *Solanum crinitum* LAM. (SOLONACEAE) e Identificação da Acetanilida Exsudada por *Xenohyla truncata* (IZECKSOHN), 1998)**. (Tese de Doutorado) – Instituto de Ciências Exatas - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 2006.

CORREA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis no Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Imprensa Nacional. Rio de Janeiro. 1926, vol.II, 369 p.

COSTA, H. N. R.; SANTOS, M. C.; ALCÂNTARA, A. F. C.; SILVA, M. C.; CABRAL, R. F.; VELOSO, D. P. **Constituintes químicos e atividades antiedematogênica de *Peltodon radicans* (Lamiaceae)**. Quím. Nova. São Paulo. 2008, vol.31 no. 4.

DUARTE, C. M. **Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil**. Construindo a História dos Produtos Naturais. MULTICIÊNCIA. 7, outubro 2006.

DUTRA, M. G. DA. **Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Saúde Pública: Um Diagnóstico Situacional em Anápolis, Goiás**. 2009. Dissertação (Mestrado em Sociedade, Tecnologia e meio Ambiente) – Centro Universitário de Anápolis, Goiás, 2009.

ELTINK, M. TORRES, R. B., RAMOS, E. ***Aegiphila integrifolia* (Jacq.) B.D. Jacks. Biblioteca Digital de Ciências**, 11 jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ib.unicamp.br>>. Acesso em: 20 maio 2012.

FALCÃO, D. Q. **Estudo Químico e Farmacológico de Quatro Espécies de *Hyptis* do Estado do Rio Grande do Sul**. 2003. 5 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências da Saúde Faculdade de Farmácia – UFRJ, Rio de Janeiro, 2003.

FERRAZ, V.; Laboratório de Cromatografia – Departamento de Química – UFMG, 2012.  
[vanyferraz@ufmg.br](mailto:vanyferraz@ufmg.br)

FERREIRA, M.; TURATTI, I. C. C.; CUNHA; W. R. ; CROTTI, A. E. M. **Constituintes químicos da fração hexânica do extrato hidrocoólico e *Aegiphila sellowiana* Verbenaceae**. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2006.

FERREIRA, M. A.; COSTA, M. C. D. **Utilização de Antioxidantes no Combate aos Radicais Livres Causadores de Envelhecimento Cutâneo**. Curso Superior de Tecnologia em Estética e Cosmética - UniFil. I Simpósio Nacional de iniciação científica. UniFil - Out. 2011. Disponível em: <http://www.unifil.br/portal/arquivos/publicacoes/paginas/>. Acesso em: 20 maio 2012.

FILHO, R. B. **Contribuição da Fitoquímica para o Desenvolvimento de um País Emergente**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Quím. Nova, v. 33, n. 1, 2010. p. 231.

GRAWAL, P.K., **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. In: **Studies in Organic Chemistry 39**. Elsevier: New York, 1989. p.135.

HILDEBRANDT, W. B.; HIROTA, B. C. K.; SILVA, C. B. DIAS, J. F. G.; MIYAZAKI, C. M. S.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. **FITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FLORES DE *Jacaranda micrantha* (Bignoniaceae)** Visão Acadêmica, Curitiba, v.14, n.3, Jul. - Set./2013 - ISSN 1518-8361

JESUS, A. M. **Saberes Populares em Plantas Mediciniais**. 2008. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Local) – Centro Universitário Augusto Motta, Programa de Pós – Graduação em desenvolvimento Local. Rio de Janeiro, 2008.

JÚNIOR, V. M. G. ; SOUZA, L. M. ; CHAVES, H. M. **Resina de *Protium Heptaphyllum*: Isolamento, Caracterização Estrutural e Avaliação das Propriedades Térmicas**. Química Nova. v.28, n. 2, 2005. p.183-187.

LEMES, G. de F.; FERRI, P. H. ; LOPES, M. N. **Constituintes Químicos De *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) R. Harley (LAMIACEAE)**. Química Nova, v. 34, n. 1, 2011. 39 – 42p.

LIMA, L. S.; LIMA, M. V. B.; MARTINS, L. C.; DAVID, J. M.; DAVID, J.P. **Lignanas ariltetralínicas de *Eriope blanchetti***. 32<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009.

LIMA, L. S. da.; SANTOS, E. O. dos.; MARTINS, L. C.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; REZENDE, L. C. de. **Lignanas Ariltetralínicas de *Eriope Latifolia* e *Eriope Blanchetii***. 31<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008.

LUCIANO, J. H. S. ; BARROS, M. C. P.; LIMA, M. A. S. ; NASCIMENTO, R. F. ; SILVEIRA E. R. **Volatile composition of leaves from *Aegiphila ihotzkiana* Cham.** Flavour and Fragrance Journal. Flavour Fragr. J. 2005. 20: 537 – 538 p.

LUCENA, J. F. S. **Uma nova lignana e outros constituintes químicos de *Hyphenia salzmannii* (Beth.) Harley (Lamiaceae).** 2012. 36 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa-PB, 2012, 36 p.

MACIEL, M. A. M. et al. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Química Nova [online]. v. 25, n.3, 2002. 429-438 p.

MONTRUCCHIO, et al. **COMPONENTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *PTYCHOPETALUM OLACOIDES* BENTHAM.** Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR. Visão Acadêmica, v. 6, n. 2, 2005. 51 p.

MARCHIORI, V. F. ***Rosmarinus officinalis*.** Fundação Herbarium Associação Argentina de Fitomedicina. 2004. 26. p.

MARQUES, B. F. VisualMOL – Visualização Molecular para auxiliar o Planejamento *in silico* de Fármaco. Centro de Informática – Universidade Federal de Pernambuco. Pernambuco, 2009.

McLAGHLIN, J. L.; CHANG. C. J.; SMITH, D. L. Simple Bench – Top Bioassays (BS e PD) for **Discovery of Plant Antitumor Compounds** – Review of Recent Progress, p. 112-137. In: Kinghorn, Balandrini, M. F. (Eds). Human Medicinal Agents from Plants, Oxford University Press, New York, USA, 1993.

MEDINA, J. C. M. de.; **Estudo Químico e Biológico de Espécies Vegetais da Família Boraginaceae (Gênero *Heliotropium* e *Tournefortia*).** 2006. 1-2 p. Tese (Doutorado) - Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá, 2006. 1-2 p.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAM, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., J.L.MCLAUGHLIN. **Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents.** Planta Medica, v. 45, n.1, 1982. 31-34 p.

MENEZES, F.S. **Base química de tendências filogenéticas em Lamiiflorae**. 1994. 94 p. Dissertação (Mestrado - Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1994. 94 p.

MOLDENKE, H. A. **Brittonia**. v.1, 1934. 245 p.

OLIVEIRA, A. L. F. et al. **Contribuição à Farmacognosia de Verbenaceae II – Indicação de bioatividade em extratos vegetais**. Revista Brasileira de Farmácia, v. 73, n.4, 1992. 83-84 p.

PACHÚ, C. O. **Processamento de Plantas Medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos**. 2007. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande, PB, junho de 2007.

PAIÃO, C. **Ômega-3 e ômega-9 protegem contra obesidade**. Diário da Saúde. Jornal da Unicamp, São Paulo, 17 set.2010. Disponível em: <<http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=omega-3-omega-9-obesidade&id=5741>> Acesso 23 julho de 2013.

PROBST, I. S. da. **Atividade Antibacteriana de Óleos Essenciais e Avaliação de Potencial Sinérgico**. 2012. 7 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” Campus de Botucatu, Botucatu - SP, 2012. 7 p.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C.de G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Embrapa, Fortaleza, Julho de 2007, CE. ISSN 1679-65.

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

ROCHA, H. E SILVA; SILVA, C. C. M.; NETO, L. B. C.; LOPES, A. D; CITÓ, A. M. DAS G. L.; CHAVES, M. H. **Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol**. São Paulo. Química Nova v. 30 n. 8, 2007.

ROCHA, M, S. **Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante (IN VITRO) de frutas do Cerrado Piauiense**. 2011. 48 p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011. 48 p.

SILVA, R.Z. **ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS PARTES AÉREAS DA *Mikania lanuginosa* DC. (ASTERACEAE)** Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Química- Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2000, 39 e 40 p.

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.** 2011. 28 p. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2011. 28 p.

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

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 5ª Ed. UFRGS. 2004. 421 p. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000, cap. 18.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II.** 2ª Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

SRIKUMAR PAL.; A. CHOWDHURY and N. ADITYACHAUDHURY. **Isolation of Rice Weevil Feeding Inhibitors Uncinatonone and Pectolinarigenin from *Cloredendron siphonotus*.** v.37, 1989. 234-236 p.

TAKAHASHI, J. A. **Ensaio da atividade biológica.** Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios: Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). 2014.

VENTER, S. A. de S. **Estudo da interação de blenda elastomérica Sbr-br com cargas particuladas na formação de Compósitos.** 2003. 5 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, 2003. 5 p.

ZUQUE, A. L. F., et al. **Avaliação das atividades antioxidantes, antimicrobiana e citotóxica de *Couepia grandiflora* Benth. (Chrysobalanaceae).** Revista Brasileira de Farmacognosia. v.14, n. 2, 2004. p.129-136.

**Distribuição Geográfica da *Aegiphila integrifolia*.** Disponível em: <[http://nossasarvores.greennationfest.com.br/content/tree\\_specie/28](http://nossasarvores.greennationfest.com.br/content/tree_specie/28)> Acesso em: 14 de outubro 2012.

**Taxonomia vegetal de *Aegiphila integrifolia* (Jacq.).** Disponível em <[http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=32229](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=32229)>Acesso em:12 março de 2013.

Disponível em <[http://www. Tropicos.org/Name/42000291?tab=maps](http://www.Tropicos.org/Name/42000291?tab=maps)>Acesso em: 01 julho de 2013.