

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Estudo químico de *Campomanesia pubescens* (D. C.)  
O. Berg. e *Campomanesia adamantium* O. Berg.  
(Myrtaceae)**

*José Ricardo Marconato da Silva*

CAMPO GRANDE

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Estudo químico de *Campomanesia pubescens* (D. C.)  
O. Berg e *Campomanesia adamantium* O. Berg  
(Myrtaceae)**

*José Ricardo Marconato da Silva*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) como um dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Química, área de concentração em Química Orgânica, sob orientação da Prof. Dra. Claudia Andréa Lima Cardoso e co-orientação da Prof. Dra. Nilva Ré Poppi.

CAMPO GRANDE

2008



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO EM QUÍMICA

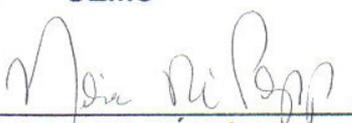
TERMO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO  
DE  
JOSÉ RICARDO MARCONATO DA SILVA

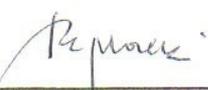
“ESTUDO QUÍMICO DE CAMPOMANESIA PUBESCENS E CAMPOMANESIA  
ADAMANTIUM (MYRTACEAE)”

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação – Nível de Mestrado em Química (Resolução nº 10/2008) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química – Área de Concentração: Química Orgânica.

Aprovada Por:

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. CLÁUDIA ANDRÉA LIMA CARDOSO  
Orientadora e Presidente da Comissão Examinadora  
UEMS

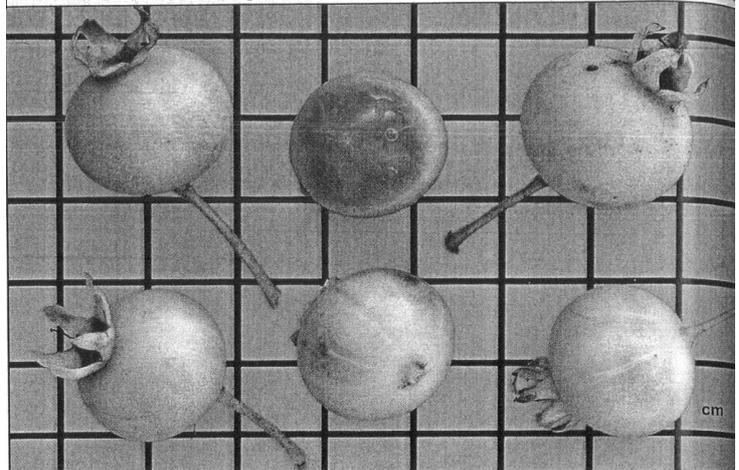
  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. NILVA RÉ POPPI  
Co-orientadora  
UFMS

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. RAQUEL REGINA DUARTE MOREIRA  
UNESP/Araraquara-SP

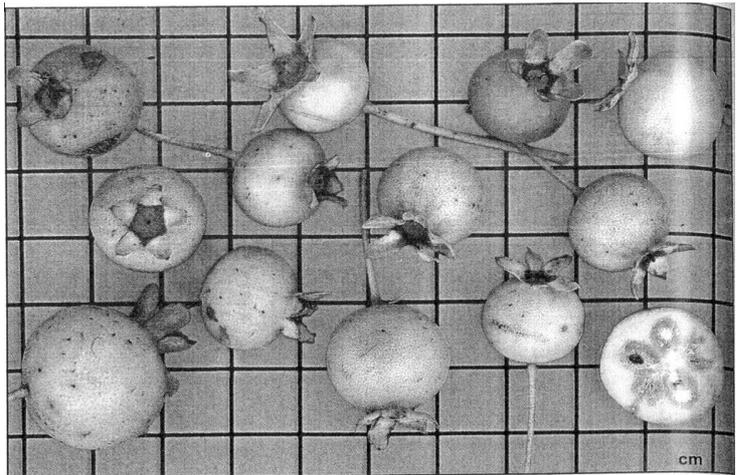
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. EUCLÉSIO SIMIONATTO  
UFMS

Campo Grande, 11 de abril de 2008.

*Campomanesia pubescens* (D. C.) O. Berg

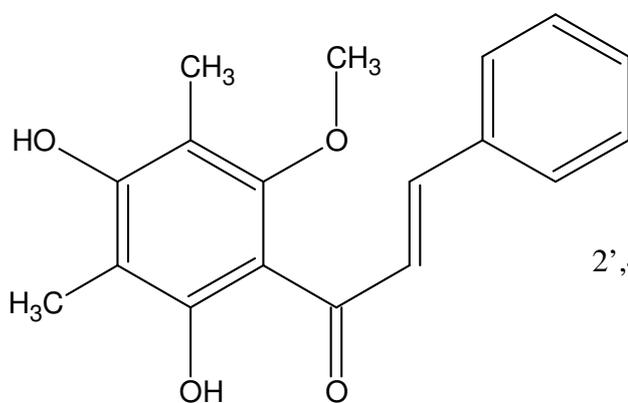


*Campomanesia adamantium* O. Berg

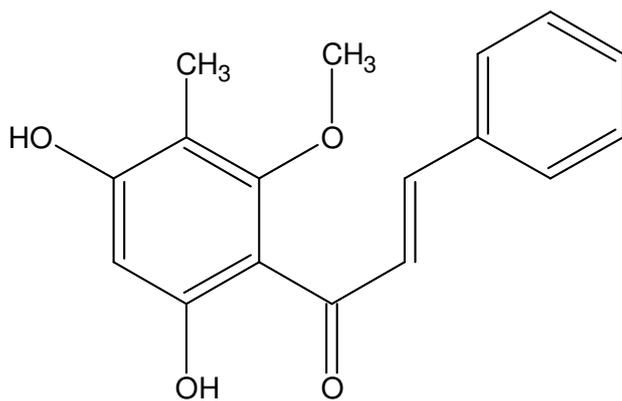


Fotos reproduzidas de Lorenzi *et al* (2006)

Substâncias isoladas de *C. pubescens*

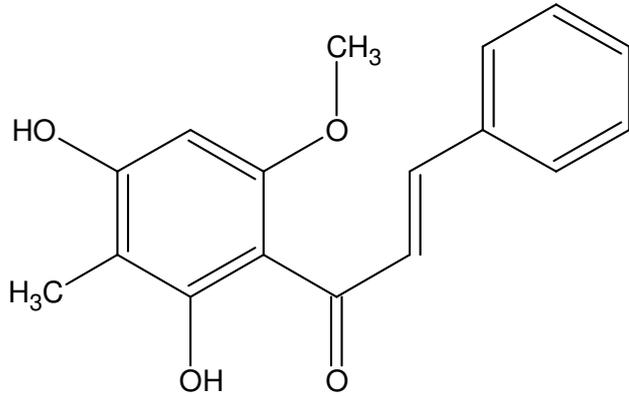


2',4'-diidroxi-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona

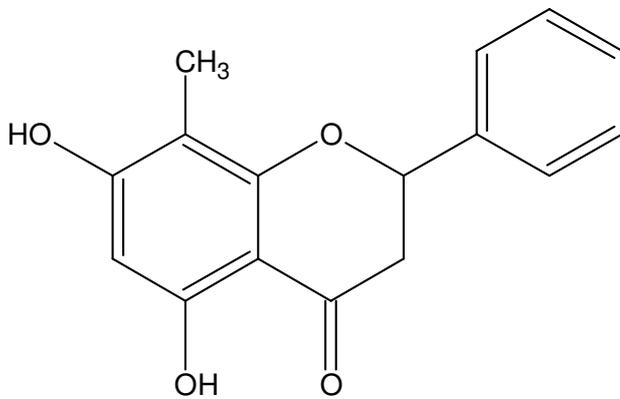


2',4'-diidroxi-5'-metil-6'-metoxichalcona

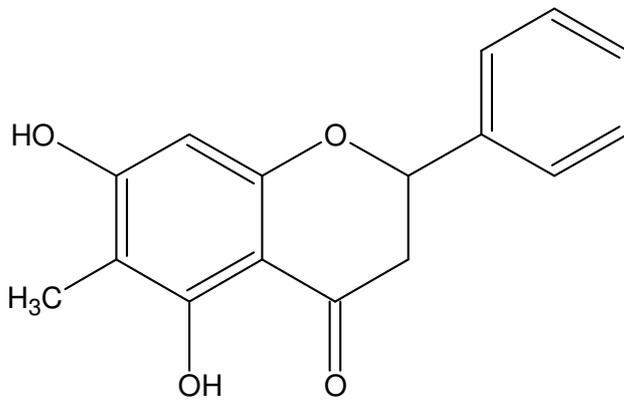
Substâncias isoladas de *C. adamantium*



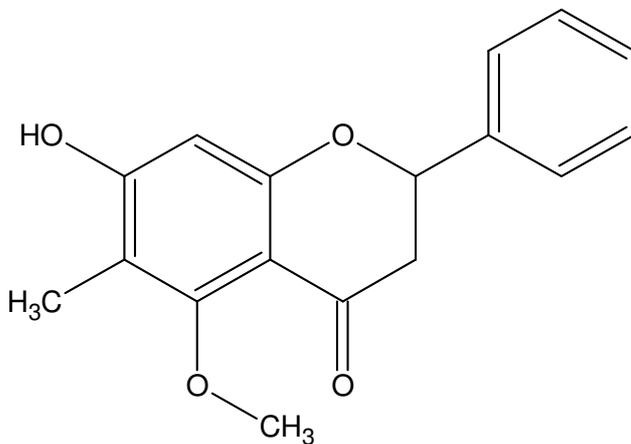
2',4'-diidroxi-3'-metil-6'-metoxichalcona



5,7-diidroxi-6-metilflavanona



5,7-diidroxi-8-metilflavanona



7-hidroxi-6-metil-5-metoxiflavanona

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha existência.

À minha orientadora, professora doutora Claudia Andrea Lima Cardoso, pela confiança, ensinamentos e pela paciência que teve comigo nesses dois anos.

À minha co-orientadora, professora doutora Nilva Ré Poppi, por todo apoio e acolhimento dedicado a mim.

A todos os integrantes do LP2, em especial às professoras doutoras Neli Kika Honda e Roberta Gomes Coelho, pela acolhida e ensinamentos.

À professora Adriana M. Mestriner Felipe de Melo, da UNIGRAN, pela realização dos testes de atividade antimicrobiana.

A todos os professores do mestrado, sempre acessíveis e dispostos a ajudar na descoberta do conhecimento científico.

Aos colegas do mestrado, aqui não citarei nomes por medo de cometer a injustiça de esquecer alguém, pela amizade e colaboração nessa etapa da minha vida, sintam-se todos bem quistos.

Aos alunos de iniciação científica e graduação pelo apoio e solicitude quando me ajudaram, também sem nomes, pois são muitos.

Aos professores Joaquim Corsino, Lucinéia Vizzoto e Glaucia Braz Alcantara, pela obtenção dos espectros e pelos esclarecimentos sobre RMN.

À minha família e amigos, por todo apoio, compreensão e incentivos. Com vocês tenho a certeza de sempre poder contar.

À Ana Claudia, pelo carinho e dedicação.

À Ana Paula, que me deu forças na reta final do curso.

Enfim, a todos e todas que de uma forma ou de outra colaboraram para que eu chegasse até aqui.

E aqui é exatamente o ponto de partida para um novo horizonte...

**Nunca ande pelo caminho  
traçado, ele leva  
onde os outros já  
foram!**

*Graham Bell*

# SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	IV
ÍNDICE DE TABELAS .....	VI
ABREVIATURAS .....	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT .....	IX
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Aspectos gerais.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Gênero <i>Campomanesia</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>6</b>
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1. Materiais e reagentes.....</b>	<b>7</b>
<b>3.2. Equipamentos .....</b>	<b>7</b>
<b>3.3. Condições cromatográficas.....</b>	<b>8</b>
3.3.1. CG-EM .....	8
3.3.2. CLAE-DAD.....	8
<b>3.4. Coleta e identificação do material vegetal.....</b>	<b>9</b>
<b>3.5. Obtenção dos extratos e óleos essenciais .....</b>	<b>9</b>
3.5.1. Preparação dos extratos a partir dos frutos de <i>C. pubescens</i> .....	9
3.5.1.1 Partição do extrato hexânico.....	9
3.5.2. Preparação do extrato das folhas de <i>C. pubescens</i> . .....	10
3.5.3. Obtenção do óleo essencial das folhas e frutos de <i>C. pubescens</i> .....	10
3.5.4. Preparação dos extratos a partir dos frutos de <i>C. adamantium</i> .....	11
3.5.4. Partição do extrato etanólico .....	11
<b>3.6. Isolamento dos metabólitos secundários .....</b>	<b>13</b>
3.6.1. <i>Campomanesia pubescens</i> .....	13
3.6.2. <i>C. adamantium</i> .....	14
<b>3.7. Análise por CG-EM.....</b>	<b>16</b>

<b>3.8. Análise por CLAE</b> .....	17
<b>3.9. Testes químicos e biológicos</b> .....	18
3.9.1. Teor de fenóis totais .....	18
3.9.2. Teor de flavonóides totais .....	19
3.9.3. Ensaio de atividade antioxidante utilizando o DPPH.....	19
3.9.4 Ensaio de atividade antioxidante utilizando o sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico .....	20
3.9.5. Teste de toxicidade sobre <i>Artemia</i> sp. ....	20
3.9.6. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	21
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	23
<b>4.1. Identificação das substâncias isoladas</b> .....	23
4.1.1. Substâncias isoladas de <i>C. pubescens</i> .....	23
4.1.1.1. Identificação estrutural de Cp1 .....	23
4.1.1.2. Identificação estrutural de Cp2.....	29
4.1.2. Substâncias isoladas de <i>C. adamantium</i> .....	33
4.1.2.1. Identificação estrutural de Ca2 .....	33
4.1.2.2. Identificação estrutural de Ca1 .....	38
4.1.2.3. Identificação estrutural de Ca3 .....	42
4.1.2.4. Identificação estrutural de Ca4 .....	46
4.1.3. Caracterização por CG-EM do óleo obtido por coluna cromatográfica da FButOH de <i>C. adamantium</i> . ....	51
<b>4.2 Análise por CG-EM de <i>C.pubescens</i></b> .....	52
<b>4.3 Análise por CLAE-DAD</b> .....	61
4.3.1 Avaliação do perfil cromatográfico.....	61
4.3.2 Identificação e determinação do teor das substâncias .....	67
<b>4.4 Testes químicos e biológicos</b> .....	70
4.4.1 Teor de compostos fenólicos .....	70
4.4.2 Teor de flavonóides .....	74
4.4.3 Atividade antioxidante.....	77
4.4.3.1. Ensaio com o radical livre DPPH.....	77
4.4.3.2. Ensaio com o sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico .....	80
4.4.5 Avaliação da toxicidade sobre <i>Artemia</i> sp. ....	82
4.4.6 Atividade antimicrobiana preliminar.....	83
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	85
<b>ANEXOS</b> .....	94
<b>Anexo 1</b> – Espectros de massa dos componentes voláteis isolados dos frutos de <i>C. adamantium</i> . ....	94
<b>Anexo 2</b> – Gráficos do teor de fenóis em função da concentração da solução. ....	97
<b>Anexo 3</b> – Gráficos do teor de flavonóides em função da concentração da solução. ....	98

<b>Anexo 4</b> – Gráficos do teor de flavonóides em função do teor de fenóis. ....	99
<b>Anexo 5</b> – Gráficos da atividade antioxidante no teste com o radical livre DPPH.....	100
<b>Anexo 6</b> – Gráficos do teor de fenóis (à esquerda) e do teor de flavonóides (à direita) em função do percentual de inibição no teste com DPPH. ....	101
<b>Anexo 7</b> – Gráficos da atividade antioxidante no teste com o sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. ....	103
<b>Anexo 8</b> – Gráficos do teor de fenóis (à esquerda) e do teor de flavonóides (à direita) em função do percentual de inibição no teste com $\beta$ -caroteno.....	104

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Rota biossintética dos terpenóides (adaptado de DEWICK, 2001).....	2
<b>Figura 2.</b> Etapas iniciais na biossíntese dos flavonóides (reproduzido de Dewick, 2001).....	3
<b>Figura 3.</b> Fluxograma representativo do processo de preparação dos extratos a partir dos frutos de <i>Campomanesia pubescens</i> .....	10
<b>Figura 4.</b> Fluxograma representativo do processo de preparação dos extratos a partir dos frutos de <i>Campomanesia adamantium</i> .....	12
<b>Figura 5.</b> Fluxograma representativo dos procedimentos de fracionamento e isolamento das substâncias dos frutos de <i>C. pubescens</i> .....	14
<b>Figura 6.</b> Fluxograma representativo dos procedimentos de fracionamento e isolamento dos componentes dos frutos de <i>C. adamantium</i> .....	16
<b>Figura 7:</b> Gráfico da FACN ilustrando a obtenção da CI <sub>50</sub> .....	21
<b>Figura 8.</b> Estrutura da 2',4'-diidroxí-6'-metoxi-3',5'-dimetilchalcona ( <b>Cp1</b> ).....	24
<b>Figura 9.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H da <b>Cp1</b> , com ampliação da região de δ 6,8 a 8,2.....	26
<b>Figura 10.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C de <b>Cp1</b> .....	26
<b>Figura 11.</b> Espectro de DEPT 135° de <b>Cp1</b> .....	27
<b>Figura 12.</b> Espectro NOESY 1D de <b>Cp1</b> .....	27
<b>Figura 13.</b> Experimento HMBC para a <b>Cp1</b> .....	28
<b>Figura 14.</b> Ampliação do experimento HMBC para a <b>Cp1</b> .....	28
<b>Figura 15:</b> Estrutura da 2',4'-dihidroxí-5'-metil-6'-metoxichalcona ( <b>Cp2</b> ).....	30
<b>Figura 16.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H da <b>Cp2</b> .....	31
<b>Figura 17.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C de <b>Cp2</b> .....	31
<b>Figura 18.</b> Experimento NOESY 2D de <b>Cp2</b> .....	32
<b>Figura 19.</b> Ampliação do experimento NOESY 2D de <b>Cp2</b> .....	32
<b>Figura 20.</b> Estrutura da 2',4'-diidroxí-3'-metil-6'-metoxichalcona ( <b>Ca2</b> ).....	34
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H para a substância <b>Ca2</b> .....	35
<b>Figura 22.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C para a substância <b>Ca2</b> .....	36
<b>Figura 23.</b> Espectro de DEPT 135° para a substância <b>Ca2</b> .....	36
<b>Figura 24.</b> Experimento NOESY 2D de <b>Ca2</b> .....	37
<b>Figura 25.</b> Ampliação do experimento NOESY 2D de <b>Ca2</b> .....	37
<b>Figura 26.</b> Estrutura da 5,7-diidroxí-6-metilflavanona ( <b>Ca1</b> ).....	39
<b>Figura 27</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H para a substância <b>Ca1</b> .....	40
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C para a substância <b>Ca1</b> .....	40
<b>Figura 29.</b> Espectro de DEPT 135° para a substância <b>Ca1</b> .....	41
<b>Figura 30.</b> Experimento de HMBC para a substância <b>Ca1</b> .....	41
<b>Figura 31.</b> Ampliação do experimento de HMBC da a substância <b>Ca1</b> .....	42
<b>Figura 32.</b> Estrutura de 5,7-diidroxí-8-metilflavanona ( <b>Ca3</b> ).....	43
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H para a <b>Ca3</b> .....	44
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C para a <b>Ca3</b> .....	44
<b>Figura 35.</b> Experimento de HMBC para a <b>Ca3</b> .....	45
<b>Figura 36.</b> Ampliação do experimento de HMBC para a <b>Ca3</b> .....	45
<b>Figura 37.</b> Ampliação do experimento de HMBC para a <b>Ca3</b> .....	46
<b>Figura 38.</b> Cristais da substância <b>Ca4</b> dentro do frasco de coleta.....	47
<b>Figura 39.</b> Estrutura da 7-hidroxí-6-metil-5-metoxiflavanona ( <b>Ca4</b> ).....	47
<b>Figura 40.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H para a <b>Ca4</b> .....	48
<b>Figura 41.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C para a <b>Ca4</b> .....	49
<b>Figura 42.</b> Experimento de HMBC para a <b>Ca4</b> .....	49

<b>Figura 43.</b> Ampliação do experimento de HMBC para a <b>Ca4</b> .....	50
<b>Figura 44.</b> Ampliação do experimento de HMBC para a <b>Ca4</b> .....	50
<b>Figura 45.</b> Estruturas dos compostos voláteis identificados na FButOH. ....	51
<b>Figura 46.</b> Cromatograma do óleo essencial dos frutos. ....	52
<b>Figura 47.</b> Cromatograma do óleo essencial das folhas. ....	53
<b>Figura 48.</b> Cromatograma do extrato hexânico dos frutos. ....	53
<b>Figura 49.</b> Cromatograma do extrato hexânico das folhas. ....	54
<b>Figura 50.</b> Gráfico comparativo dos dois métodos de extração de componentes voláteis empregados com base na área relativa. ....	58
<b>Figura 51.</b> Gráfico comparativo dos dois métodos de extração de componentes voláteis empregados com base no número de compostos identificados. ....	58
<b>Figura 52.</b> Espectros de absorção molecular obtidos na região do UV-Vis.....	62
<b>Figura 53.</b> Cromatograma representativo do EHex ( <i>C. pubescens</i> ).....	63
<b>Figura 54.</b> Cromatograma representativo do EAcOEt ( <i>C. pubescens</i> ),.....	63
<b>Figura 55.</b> Cromatograma representativo do EEtOH ( <i>C. adamantium</i> ).....	64
<b>Figura 56.</b> Cromatograma representativo da FButOH ( <i>C. adamantium</i> ).....	64
<b>Figura 57.</b> Cromatograma representativo da FAq ( <i>C. adamantium</i> ),.....	65
<b>Figura 58.</b> Cromatograma representativo da FACN ( <i>C. pubescens</i> ).....	65
<b>Figura 59.</b> Cromatograma representativo da FHex ( <i>C. pubescens</i> ).....	66
<b>Figura 60.</b> Comparação entre todos os cromatogramas na mesma escala de intensidade.....	66
<b>Figura 61.</b> Estruturas e espectros de UV-Vis para as substâncias isoladas de <i>C. pubescens</i> e <i>C. adamantium</i> . ....	68
<b>Figura 62.</b> Gráfico correlacionando os teores de fenóis com as concentrações das soluções para o EHex. ....	72
<b>Figura 63.</b> Gráficos comparativos entre o teor de fenóis e flavonóides pela concentração da solução. ....	76
<b>Figura 64.</b> Gráficos da comparação entre o teor de fenóis e flavonóides com a CI <sub>50</sub> do DPPH para FHex e FACN. ....	79
<b>Figura 65.</b> Gráficos da comparação entre o teor de fenóis e flavonóides com a CI <sub>50</sub> do β-caroteno para EHex e FHex.....	82
<b>Figura 66.</b> <i>Artemia</i> sp. ....	83

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Concentrações dos extratos e partições na análise por CLAE.....	18
<b>Tabela 2.</b> Valores de concentração das soluções dos extratos e partições utilizados nos testes espectrofotométricos (fenóis, flavonóides, DPPH e $\beta$ -caroteno). .....	18
<b>Tabela 3.</b> Comparação dos deslocamentos químicos ( $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ , $\delta$ em ppm) da <b>Cp1</b> com os encontrados na literatura.....	25
<b>Tabela 4.</b> Deslocamentos químicos ( $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ , $\delta$ em ppm) da <b>Cp2</b> . .....	30
<b>Tabela 5.</b> Deslocamentos químicos ( $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ , $\delta$ em ppm) da <b>Ca2</b> comparados aos da literatura (MUSTAFA, 2005). .....	35
<b>Tabela 6.</b> Deslocamentos químicos ( $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ , $\delta$ em ppm) da <b>Ca1</b> .....	39
<b>Tabela 7</b> Deslocamentos químicos ( $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ , $\delta$ em ppm) da <b>Ca3</b> .....	43
<b>Tabela 8.</b> Deslocamentos químicos ( $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ , $\delta$ em ppm) da <b>Ca4</b> .....	48
<b>Tabela 9.</b> Composição química dos óleos essenciais e extratos hexânicos de <i>C. pubescens</i> . .	56
<b>Tabela 10:</b> Comparação dos óleos essenciais de três espécies de <i>Campomanesia</i> .....	60
<b>Tabela 11.</b> Numeração dos picos correspondentes às substâncias conhecidas.....	67
<b>Tabela 12.</b> Dados de regressão linear das curvas analíticas para determinação das substâncias isoladas dos frutos de <i>C. adamantium</i> e <i>C. pubescens</i> . .....	69
<b>Tabela 13.</b> Teores (mg/g) das substâncias isoladas dos frutos de <i>C. adamantium</i> e <i>C. pubescens</i> .....	69
<b>Tabela 14.</b> Diferença entre os teores de fenóis calculados para concentrações altas e baixas.	71
<b>Tabela 15.</b> Parâmetros das curvas analíticas dos gráficos do teor de fenóis pela concentração das soluções. ....	72
<b>Tabela 16.</b> Teor de fenóis para os extratos e partições. ....	73
<b>Tabela 17.</b> Parâmetros das curvas analíticas dos gráficos do teor de flavonóides pela concentração das soluções. ....	74
<b>Tabela 18.</b> Teor de flavonóides para os extratos e partições. ....	75
<b>Tabela 19.</b> Valores de $\text{CI}_{50}$ das amostras frente ao radical livre DPPH. ....	77
<b>Tabela 20.</b> Atividade antioxidante de cinco das substâncias isoladas de <i>C. adamantium</i> e <i>C. pubescens</i> .....	78
<b>Tabela 21.</b> Valores de $\text{CI}_{50}$ no teste com $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. ....	81
<b>Tabela 22.</b> Resultados do teste de toxicidade sobre <i>Artemia</i> sp. ....	83
<b>Tabela 23.</b> Resultados dos testes de atividade antimicrobiana. Halo de inibição (em mm) $\pm$ desvio padrão. ....	84

## ABREVIATURAS

<b>1D</b>	Unidimensional
<b>2D</b>	Bidimensional
<b>AC</b>	Acetona
<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>AcOEt</b>	Acetato de etila
<b>ButOH</b>	Butanol
<b>CCDC</b>	Cromatografia em camada delgada comparativa
<b>CG</b>	Cromatografia gasosa
<b>CG-EM</b>	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>d</b>	Dubleto
<b>dd</b>	Duplo dubleto
<b>DEPT 135°</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C utilizando transferência de polarização
<b>EAcOEt</b>	Extrato acetato de etila dos frutos de <i>C. pubescens</i>
<b>EAG</b>	Equivalente ácido gálico
<b>EEtOH</b>	Extrato etanólico dos frutos de <i>C. adamantium</i>
<b>EHex</b>	Extrato hexânico dos frutos de <i>C. pubescens</i>
<b>EQ</b>	Equivalente quercetina
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FACN</b>	Fase acetonitrila, proveniente da partição do EHex
<b>FAq</b>	Fase aquosa, proveniente da partição do EEtOH
<b>FButOH</b>	Fase butanólica, proveniente da partição do EEtOH
<b>FHex</b>	Fase hexânica, proveniente da partição do EHex
<b>gHMBC</b>	Gradiente Heteronuclear Multiplite Bond Correlation
<b>gNOESY</b>	Gradiente Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
<b>Hex</b>	Hexano
<b>m</b>	Multiplete
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b>Tol</b>	Tolueno
<b>UV-Vis</b>	Absorção molecular na região do ultravioleta e visível
<b>δ</b>	Deslocamento químico em partes por milhão

## RESUMO

*Campomanesia adamantium* O. Berg. e *Campomanesia pubescens* (D.C) O. Berg. (Myrtaceae) são espécies encontradas no cerrado. Suas folhas são utilizadas na medicina popular como antidiarréico e em processos de inflamação urinária. O presente estudo descreve a composição química de *C. pubences* e *C. adamantium*. Pelas análises por CG-EM foram identificadas 22 e 58 substâncias nos extratos hexânicos das folhas e frutos, respectivamente e nos óleos essenciais das folhas e frutos foram identificadas 61 e 58 substâncias, respectivamente. No extrato etanólico dos frutos de *C. adamantium* foram caracterizadas 6 substâncias por CG-EM. A investigação fitoquímica do extrato etanólico dos frutos de *C. adamantium* resultou no isolamento de 4 substâncias (5,7-diidroxi-6-metilflavanona, **Ca1**; 2',4'-diidroxi-3'-metil-6'-metoxichalcona, **Ca2**; 5,7-diidroxi-8-metilflavanona, **Ca3**; 7-hidroxi-6-metil-5-metoxiflavanona, **Ca4**) e 2 outras substâncias (2',4'-diidroxi-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona, **Cp1** e 2',4'-diidroxi-5'-metil-6'-metoxichalcona, **Cp2**) foram isoladas a partir do extrato hexânico dos frutos de *C. pubescens*. Todas as substâncias isoladas foram monitoradas por CLAE nos extratos dos frutos de *C. adamantium* e *C. pubescens*. Os extratos e partições apresentaram moderada atividade antioxidante e estudos preliminares mostraram potencial atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

*Campomanesia adamantium* O. Berg. and *Campomanesia pubescens* (D.C) O. Berg. (Myrtaceae) are species found in the “cerrado”. The leaves are used in popular medicine as an anti-diarrhoeic and in inflammatory processes of the urine. The present study describes the chemical composition of the *C. pubescens* and *C. adamantium*. The analysis by GC-MS 22 and 58 compounds were identified in the hexanic extracts of leaves and fruits, respectively and 61 and 38 compounds were identified in the essential oils of the leaves and fruits, respectively. In etanolic extract of the fruits from *C. adamantium* were characterized 6 compounds by GC-MS. The phytochemical investigation of the etanolic extracts of the fruits from *C. adamantium* resulted in the isolation of 4 compounds (5,7-dihydroxy-6-methylflavanone, **Ca1**; 2',4'-dihydroxy-3'-methyl-6'-methoxychalcone, **Ca2**; 5,7-dihydroxy-8-methylflavanone, **Ca3**; 7-hydroxy-6-methyl-5-methoxyflavanone, **Ca4**) and 2 compounds (2',4'-dihydroxy-3',5'-dimethyl-6'-methoxychalcone, **Cp1**; 2',4'-dihydroxy-5'-methyl-6'-methoxychalcone, **Cp2**) were isolated of hexanic extract of the fruits from *C. pubescens*. All isolated compounds were monitored by HPLC in the extracts of fruits from *C. adamantium* and *C. pubescens*. The extracts and partitions of the two species showed moderate antioxidant activity and preliminary studies showed potential antimicrobial activity.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos gerais

O uso de plantas para fins terapêuticos é tão antigo quanto a civilização humana. Por séculos a humanidade utilizou-se exclusivamente de ervas, produtos animais e materiais inorgânicos como remédios. Além desses ingredientes naturais, os processos de cura envolviam feitiçaria, misticismo, astrologia ou religião. Esses conhecimentos foram acumulados ao longo do tempo até chegarem aos dias atuais e constituírem o conhecimento popular sobre as ervas medicinais (DEWICK, 2001).

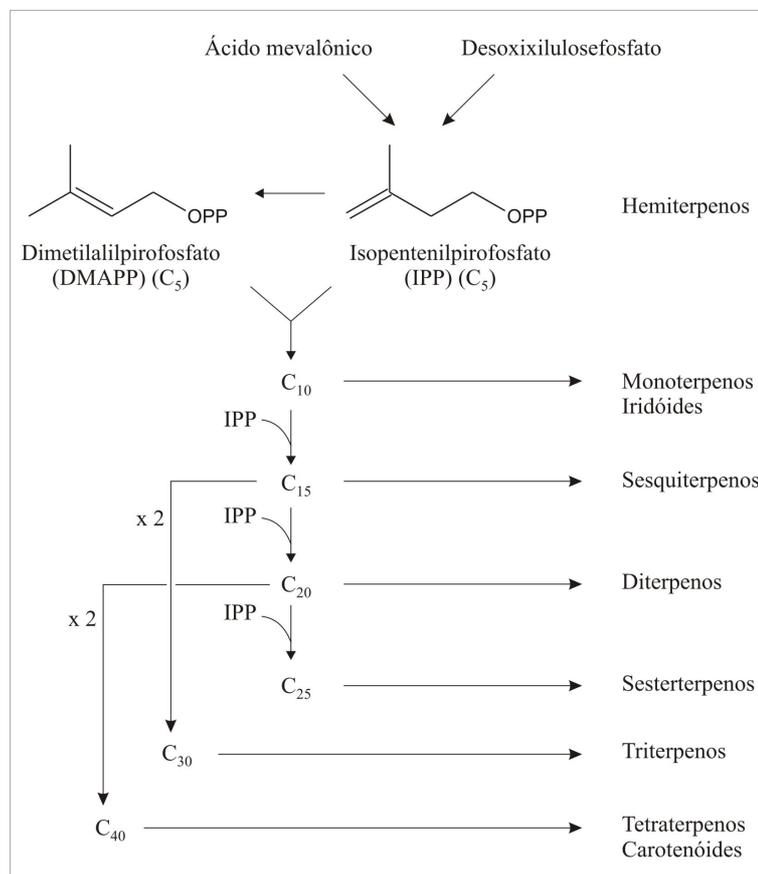
Com a Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica cresceu o uso de produtos sintéticos no tratamento de doenças. O aprimoramento das técnicas de isolamento e modificação das substâncias ativas aliado ao crescente poder econômico das companhias farmacêuticas gerou essa preferência pelos remédios sintéticos. Apesar disso, aproximadamente 25 % das drogas prescritas no mundo continuam sendo derivadas de plantas. Cerca de 11 % das 252 drogas consideradas essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS) são de origem vegetal e um grande número dos remédios sintéticos são baseados em produtos naturais (RATES, 2001).

Dados da OMS indicam que de 65 a 80 % da população mundial que vivem em países em desenvolvimento dependem diretamente das plantas medicinais para cuidar de sua saúde, devido à pobreza, que dificulta o acesso aos medicamentos industrializados (CALIXTO, 2000). Contudo, o uso indiscriminado de plantas no tratamento de doenças é preocupante. As plantas podem conter substâncias tóxicas que ao invés de ajudar no tratamento da doença causariam quadros de intoxicação. A população se expõe a riscos ao pensar que um remédio preparado a partir de um vegetal nunca lhe fará mal algum pelo simples fato de ser natural (SOARES, 2002).

Conhecer a composição química das plantas medicinais torna-se necessário para evitar esse tipo de problema, além de poder certificar a eficácia da erva utilizada como remédio pela confirmação da presença dos princípios ativos. A identificação dos componentes químicos de uma planta é o foco da química dos produtos naturais.

Dentro da Química de Produtos Naturais, destacam-se os metabólitos secundários. Entre as classes que compõe os metabólitos secundários destacaremos os terpenóides e os compostos fenólicos.

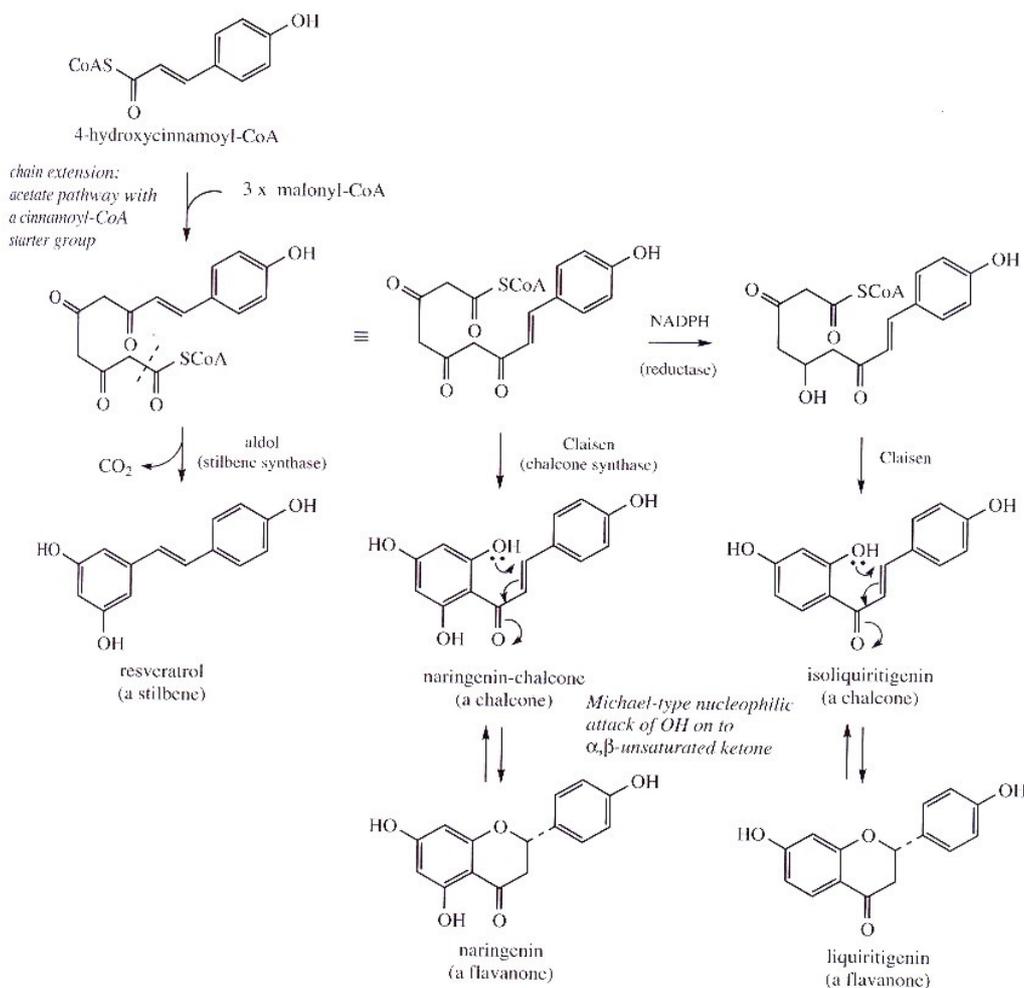
Em óleos essenciais, os terpenóides (Figura 1) que se destacam são os monoterpenos e sesquiterpenos. Ambos podem apresentar-se como hidrocarbonetos ou contendo funções oxigenadas (DEWICK, 2001).



**Figura 1.** Rota biossintética dos terpenóides (adaptado de DEWICK, 2001).

O isolamento de mono e sesquiterpenos é um trabalho que exige cuidados, pois são compostos voláteis ou de fácil volatilização o que pode acarretar em grande perda de massa durante o trabalho de isolamento. Uma forma rápida de analisar os componentes voláteis dos óleos essenciais, entre eles os mono e sesquiterpenos, sem grandes riscos de perder a amostra é utilizar a cromatografia gasosa (CG). Esta técnica de separação e análise é bastante empregada na identificação e quantificação de substâncias voláteis (ZHAO *et al*, 2005).

Os compostos fenólicos são substâncias contendo uma ou mais hidroxilas ligadas diretamente no anel aromático. Entre as classes mais comuns deste tipo de compostos estão: cumarinas, lignanas, taninos, xantonas, flavonóides (Figura 2, pág 3) e ácidos fenólicos (DEWICK, 2001).



**Figura 2.** Etapas iniciais na biossíntese dos flavonóides (reproduzido de Dewick, 2001).

No teste espectrofotométrico de quantificação de fenóis totais, a reação envolvida é de óxido-redução, onde o íon fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto reduz o complexo fosfotúngstico – fosfomolibdico, ficando a solução azul. Para o teste espectrofotométrico de quantificação de flavonóides totais, utiliza-se da facilidade com que essa classe de substâncias tem de formar complexos com o cátion alumínio, e assim deslocando para um comprimento de onda maior e intensificando a absorção (FUNARI; FERRO, 2006).

Os flavonóides tem grande importância, pois são considerados como promotores da saúde humana devido a sua atividade antioxidante, anticoagulante e anticâncer, entre outras (JULSING *et al*, 2006). Atualmente, a procura por fontes naturais de antioxidantes vem aumentando (MORAIS *et al.*, 2006). Os antioxidantes estão presentes em uma grande variedade de plantas medicinais, verduras, frutos e legumes. Embora muitas pessoas não saibam ou não utilizem esses produtos para esse fim, eles possuem capacidade de combater

radicais livres, que são precursores de muitas patologias, como por exemplo, cânceres e doenças cardiovasculares (WILHELM FILHO *et al.*, 2001). Até mesmo o envelhecimento pode ser retardado através de substâncias antioxidantes, protegendo as funções fisiológicas (MORAIS *et al.*, 2006).

## 1.2. Gênero *Campomanesia*

A família Myrtaceae apresenta cerca de 140 gêneros com aproximadamente 3000 espécies. Ela é dividida em duas subfamílias: Myrtoideae, de ampla ocorrência na América tropical, e Leptospermoideae, que ocorre principalmente na Austrália, Malásia e Polinésia (LIMBERGER *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 2004).

Um levantamento bibliográfico realizado por Crus e Kaplan (2004) revelou que as espécies da família Myrtaceae apresentam em sua composição química taninos, flavonóides, monoterpenos e sesquiterpenos, triterpenóides, derivados do floroglucinol, cromenos e estilbenóides como as substâncias majoritárias.

As espécies *Campomanesia pubescens* (D. C.) O. Berg. e *Campomanesia adamantium* O. Berg. são frutíferas de porte arbustivo, com 1-2 m e 0,5-1,5 m de altura, respectivamente. A floração de *C. pubescens* ocorre de agosto a setembro, enquanto *C. adamantium* floresce de setembro a outubro. Os frutos de ambas amadurecem em novembro-dezembro e apresentam polpa suculenta de sabor acidulado (LORENZI *et al.*, 2006).

No Estado de Mato Grosso do Sul as espécies são popularmente conhecidas como guavira sendo abundantes no cerrado sulmatogrossense. A guavira pode ser consumida fresca ou usada para fazer sucos, licores e doces. Em alguns lugares utilizam-se a infusão de suas folhas e talos como remédio para desintéria, problemas de estômago, febre entre outros (LORENZI, 2000; PIVA, 2002).

O estudo químico da espécie *C. xanthocarpa* indicou a presença de flavonóides, saponinas e taninos, também foram obtidos bons resultados em relação a atividade antiulcerogênica e toxicidade em ratos (MARKMAN *et al.*, 2004).

O tratamento com a infusão das folhas de *C. xanthocarpa* em ratos com dieta de alta caloria, mostrou uma redução significativa em ganho de peso e diminuição da glicemia, e não se observou redução significativa de triglicérides e colesterol (BIAVATTI *et al.*, 2004).

Estudos químicos, empregando CLAE, com as folhas relataram a presença de quercetina, miricitrina e rutina em *C. xanthocarpa*; miricitrina em *C. pubescens* e miricitrina e quercetina em *C. guazumaefolia* (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1995).

Estudos químicos do extrato metanólico das sementes de *C. lineatifolia*, levaram ao isolamento de  $\beta$ -tricetonas denominadas champanonas (BONILLA *et al*, 2005).

Os óleos essenciais extraídos das folhas de algumas espécies de *Campomanesia* revelaram atividade antimicrobiana contra ao *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (MARKMAN, 2002).

Foram caracterizados os componentes voláteis da polpa, casca, folhas e sementes de champa (*C. lineatifolia*), onde foram encontrados ésteres,  $\beta$ -tricetonas, álcoois e C<sub>13</sub>-norisoprenóides, terpenos como 1,8 cineole,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -cariofileno (OSORIO *et al*, 2006).

Os óleos essenciais das folhas de *C. guazumifolia*, *C. rhombea* e *C. xanthocarpa* foram analisados e mostraram-se ricos em sesquiterpenos e em *C. aurea* houve predominância de monoterpenos (LIMBERGER *et al*, 2001). Segundo Menut *et al* (1996) o óleo essencial de *C. xanthocarpa* é rico em sesquiterpenos, tanto de estruturas cíclicas como acíclicas.

O estudo do óleo essencial das folhas de *C. guazumaefolia* (Cambess.) O. Berg permitiu a identificação através de CG-EM de várias substâncias, sendo os componentes majoritários o germacreno D,  $\alpha$ -copaeno, óxido de cariofileno e espatulenol (RODRIGUES *et al.*, 2006). No estudo com *C. phaea* foram identificados 35 componentes através de análise em CG-EM, sendo predominante a presença de sesquiterpenos hidrocarbonados e oxigenados (ADATI; FERRO, 2006).

Em *C. adamantium* o óleo essencial dos frutos apresentou baixo rendimento (VALLILO *et al.*, 2004). As substâncias voláteis dos frutos de *C. adamantium* foram analisadas por CG-EM sendo identificados 30 componentes divididos em monoterpenos e sesquiterpenos (VALLILO *et al.*, 2006a). Em outro estudo, com os frutos de *C. adamantium* por CG-EM, foram identificados 93,3% dos componentes presentes no óleo essencial. Os monoterpenos  $\alpha$ -pineno, limoneno e  $\beta$ -(Z)-ocimeno, e os sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno, ledeno e globulol foram os componentes majoritários. Também foi avaliada a composição dos frutos em relação aos macroelementos (K, Ca, P e Mg) e os microelementos (Fe, Al e S) (VALLILO *et al.*, 2006b).

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivos:

Avaliar os extratos hexânicos e óleos essenciais dos frutos e folhas de *C. pubescens* empregando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM);

Isolar substâncias do extrato hexânico dos frutos de *C. pubences* e do extrato etanólico dos frutos de *C. adamantium*;

Realizar testes para avaliar o teores de fenóis e flavonóides totais, toxicidade, atividades antioxidante *in vitro* e antimicrobiana dos extratos de *C. adamanitum* e *C. pubescens*.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Materiais e reagentes

Para a cromatografia em coluna (CC) foi utilizado sílica gel 60 (63-200  $\mu\text{m}$ /70-230 mesh e 40-63  $\mu\text{m}$ /230-400 mesh, *Merck*) e sephadex LH-20 (*Pharmacia*). As colunas empregadas foram de vidro e com diferentes diâmetros e comprimentos, sendo que estas medidas serão especificadas na descrição do processo de fracionamento.

Na cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram utilizadas cromatoplasmas de alumínio recobertas por filme de 200  $\mu\text{m}$  de sílica gel, com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm. As placas foram reveladas sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) e por aspersão de solução ácida de vanilina seguida de aquecimento.

Os eluentes utilizados nas colunas cromatográficas foram hexano, tolueno, acetona, metanol (*Dinâmica*) e acetato de etila (*Chenco*), todos de grau P.A.

A partição do extrato etanólico dos frutos de *C. adamantium* foi feita com água ultrapura e butanol p.A (*Grupo Química*, 99,5%).

A partição do extrato hexânico dos frutos de *C. pubescens* foi feita com acetonitrila, grau cromatográfico (*Vetec*, 99,9%).

Utilizou-se clorofórmio deuterado (*Cambridge Isotope Laboratories, Inc.*, D 99,8%) ou acetona deuterada (*Cambridge Isotope Laboratories, Inc.*, D 99,9%) e TMS como padrão interno para a obtenção dos espectros de RMN.

Os solventes utilizados nos testes de teor de fenóis, flavonóides e atividade antioxidante foram metanol grau cromatografico (*J.T. Baker*) e água ultrapura. Foram utilizados os reagentes 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) e ácido linoleico ambos da *Sigma Aldrich*,  $\beta$ -caroteno (*Calbiochem*) e reagente de Folin-Ciocalteu (*Merck*).

Os padrões empregados nas análises cromatográficas foram extraídos e purificados dos frutos de *C. pubescens*.

#### 3.2. Equipamentos

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram registrados em espectrômetro Bruker DPX-300. O experimento NOESY 1D de **Cp1** foi obtido em espectrômetro Varian, INOVA 500.

As medidas de absorvância nos testes empregando espectrofotometria (atividade antioxidante, fenóis e flavonóides) foram realizadas em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1100.

As análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em cromatógrafo Varian, GC 3900, equipado com detector de massas Varian Saturn 2100.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas empregando cromatógrafo, Varian 210, equipamento com detector de arranjo de diodos.

### 3.3. Condições cromatográficas

#### 3.3.1. CG-EM

Foi empregada uma coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de poli-dimetil-siloxano com 5% de fenila (ZB-5, Varian), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e fase de 0,25  $\mu\text{m}$ , sob duas condições: **Condição 1:** gás de arraste helio (fluxo de 1 mL/min); volume de injeção de 1  $\mu\text{L}$ , razão de split (1:20), com temperatura inicial de 50°C e aquecimento de 50 °C a 250 °C a 3 °C /min. As temperaturas do injetor e do detector ion-trap foram de 240 °C e 200 °C, respectivamente, manifold a 70 °C e linha de transferência 240 °C. Os parâmetros do espectrômetro de massas incluíram impacto eletrônico a 70 eV, com intervalo de massas de 40-450 m/z e um intervalo de varredura de 0.5s. **Condição 2:** gás de arraste hélio (fluxo de 1 mL/min), volume de injeção de 1  $\mu\text{L}$ , razão de split (1:20), com temperatura inicial de 150 °C e aquecimento de 150 °C a 250 °C a 10 °C/min. As temperaturas do injetor e do detector “ion trap” foram de 250 °C e 200 °C, respectivamente, manifold a 70 °C e linha de transferência a 250 °C. Os parâmetros do espectrômetro de massas incluíram impacto eletrônico a 70 eV, com intervalo de massas de 40-550 m/z e intervalo de varredura de 0.5 s.

#### 3.3.2. CLAE-DAD

Foi empregado o detector de arranjo de diodos (DAD), com varredura entre 200-800 nm. Utilizou-se uma coluna de fase reversa C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5  $\mu\text{m}$ , Phenomenex) e pré-coluna (2,5 cm x 3 mm, Varian) de mesma fase da coluna. Nas seguintes condições:

Início com 40% de metanol, 50% de água e 10% de acetonitrila levando 40 minutos para atingir 80% de metanol, 10% de água e 10% de acetonitrila e 20 minutos para voltar à condição inicial. Tempo de análise foi de 60 minutos. Vazão de fluxo da bomba de 1 mL/min.

### **3.4. Coleta e identificação do material vegetal**

Os frutos e folhas de *C. pubescens* (D.C.) O. Berg foram coletados em dezembro de 2006, no Estado do Mato Grosso do Sul, na cidade de Campo Grande-MS. Os frutos de *C. adamantium* O. Berg foram coletados em novembro de 2005 na cidade de Bela Vista - MS. As espécies foram identificadas por Marcos Sobral da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e as exsiccatas [ 2031 (*C. pubescens* (D.C.) O. Berg ) e 2001 (*C. adamantium* O. Berg)] foram depositadas no Herbário da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) em Dourados.

### **3.5. Obtenção dos extratos e óleos essenciais**

#### **3.5.1. Preparação dos extratos a partir dos frutos de *C. pubescens***

Os frutos frescos, sem as sementes, (1800 g) de *C. pubescens* foram triturados em liquidificador e extraídos por maceração com hexano (2 L), à temperatura ambiente por 7 dias. O solvente foi removido sob pressão reduzida em rotoevaporador. Esse procedimento foi realizado 3 vezes e ao final forneceu 24,51 g de extrato hexânico (EHex).

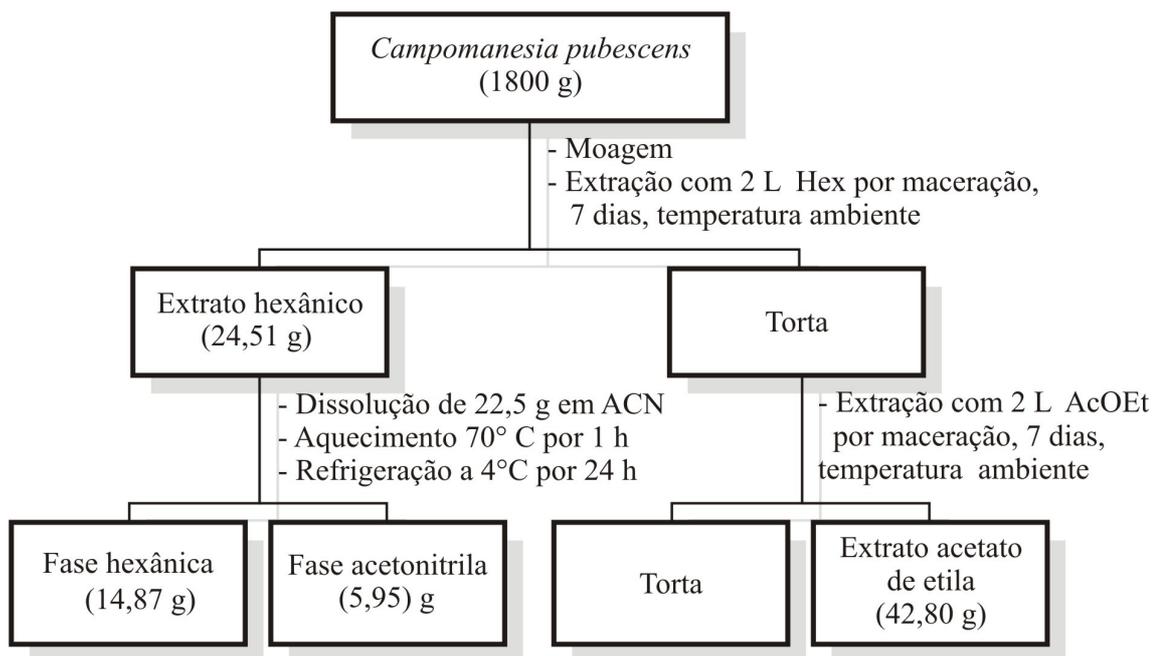
A torta resultante da extração dos frutos com hexano foi submetida a nova extração com acetato de etila (2 L) por 7 dias à temperatura ambiente. O extrato foi filtrado e o solvente removido sob pressão reduzida. Esse procedimento também foi repetido 3 vezes, fornecendo 42,80 g de extrato acetato de etila (EAcOEt).

##### **3.5.1.1 Partição do extrato hexânico**

Estudos preliminares com outros extratos de *C. pubescens* revelaram a presença de uma substância ainda não identificada, de baixa polaridade e que dificulta o isolamento de outras substâncias. No intuito de retirar essa substância, parte do extrato hexânico dos frutos (22,50 g) foi solubilizado em 250 mL de acetonitrila (ACN) e levado a aquecimento (70°C

por uma hora). Em seguida, a amostra foi resfriada e mantida sob refrigeração a 4°C por 24 horas. Logo após ser retirada do resfriamento a amostra foi filtrada. O material retido no filtro foi novamente submetido a esse procedimento, porém utilizando-se 200 mL de acetonitrila. O processo gerou a fração hexânica (FHex, 14,87 g) e a fração acetonitrila (FACN, 5,95 g). Nesse processo houve perda de 7,5% da massa inicial.

A Figura 3 mostra o procedimento de extração realizado nos frutos de *C. pubescens*.



**Figura 3.** Fluxograma representativo do processo de preparação dos extratos a partir dos frutos de *Campomanesia pubescens*.

### 3.5.2. Preparação do extrato das folhas de *C. pubescens*.

As folhas frescas (800g) foram extraídas, três vezes consecutivas, por maceração com 2 L de hexano, à temperatura ambiente por 7 dias. O solvente foi removido sob pressão reduzida, fornecendo 7,39 g.

### 3.5.3. Obtenção do óleo essencial das folhas e frutos de *C. pubescens*

Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação com um aparelho tipo Clevenger, a partir de 400g de folhas e frutos frescos de *C. pubescens*. O óleo das folhas teve

rendimento de 0,20 % e o dos frutos de 0,10 %. A percentagem foi expressa como m/m em relação ao material de partida.

#### 3.5.4. Preparação dos extratos a partir dos frutos de *C. adamantium*

Os frutos frescos e sem sementes de *C. adamantium* (3300,0 g) foram triturados e extraídos por maceração com solventes orgânicos (hexano, clorofórmio e etanol 95 %). Primeiramente, adicionou-se 5 L de hexano permanecendo em contato com o material vegetal por 55 dias. O extrato foi filtrado e à torta foi adicionado 5 L de hexano deixando em contato por 5 horas, e por mais 40 minutos em ultrassom, então efetuou-se a filtração. Uniu-se os dois filtrados e concentrou-os em rotoevaporador sob pressão reduzida, obtendo-se o extrato hexânico (7,12 g).

A torta resultante da extração com hexano foi então submetida à extração com 2 L de clorofórmio permanecendo em contato por 4 dias, o solvente foi filtrado. Então se adicionou o clorofórmio à torta obtida da primeira extração juntamente com o volume necessário para completar o volume inicial, deixando em contato por 4 horas e mais 40 minutos em ultrassom, então, filtrou-se e concentrou-se novamente. Repetiu-se esse procedimento por mais uma vez, obtendo-se 8,90 g.

O extrato etanólico foi preparado a partir da torta resultante do extrato clorofórmico, adicionando-se à amostra 5 L de etanol 92,8 GL, com o qual permaneceu em contato por 2 dias, filtrou-se e concentrou-se o extrato obtendo-se a primeira extração etanólica. A torta resultante foi submetida ao mesmo processo, mas o tempo de contato foi alterado para 7 dias (segunda extração). A terceira extração também seguiu o mesmo processo, porém o tempo de contato foi de 10 dias. As três extrações etanólicas foram reunidas em um recipiente fornecendo 232,50 g de extrato etanólico (EEtOH).

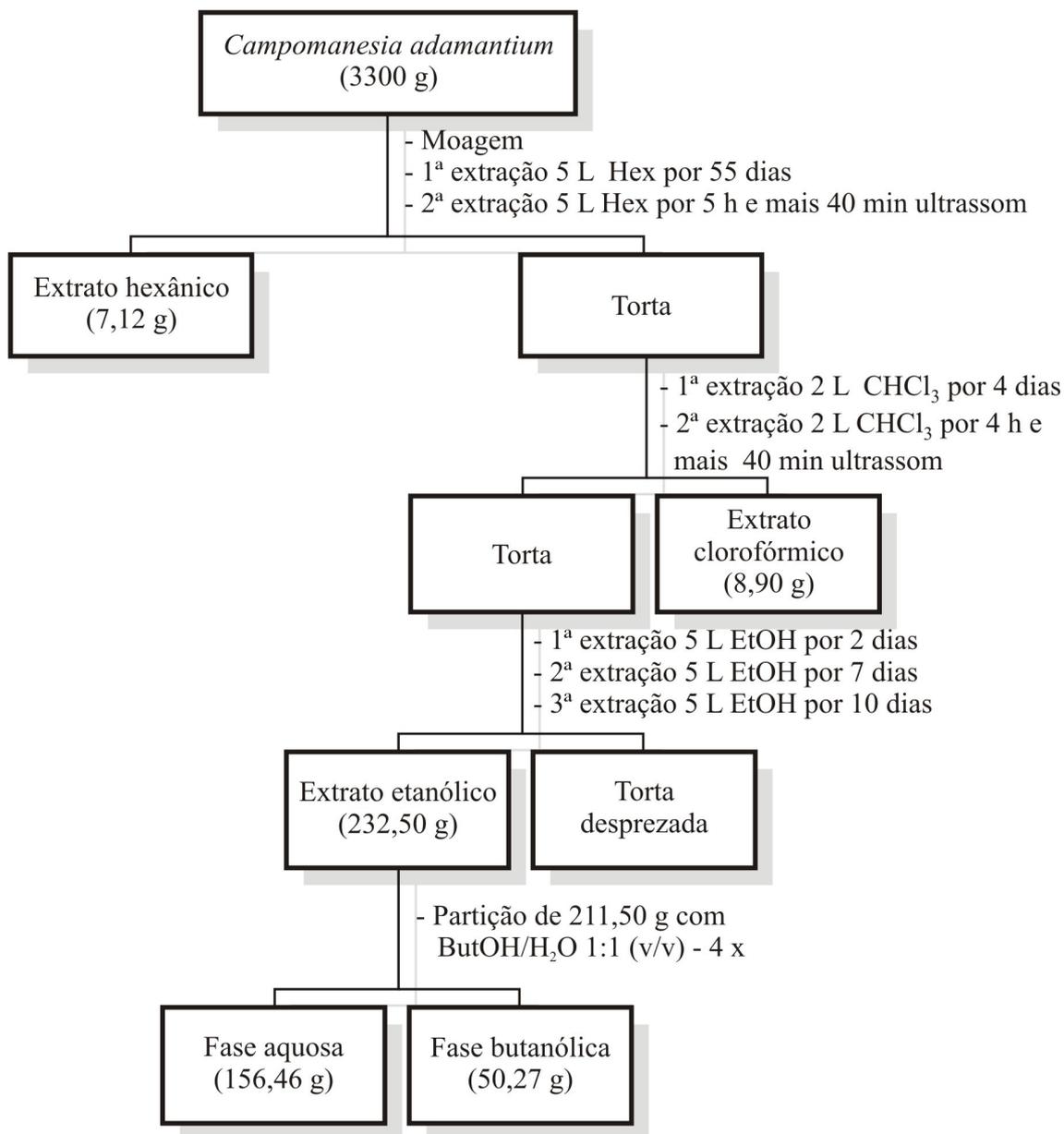
Neste trabalho utilizou-se o extrato etanólico, sendo os outros extratos (hexânico e clorofórmico) estudados por outros membros do grupo de pesquisa.

#### 3.5.4. Partição do extrato etanólico

O extrato etanólico (211,50 g) foi separado em duas partes (aproximadamente 105 g) e cada uma delas foi dissolvida em 300 mL de água destilada, sendo submetidas à partição com butanol, na proporção de 1:1 (v/v), em funil de separação. O processo foi repetido 4 vezes para cada uma das partes. Ao final do processo reuniu-se todas as fases aquosas e também todas as fases butanólicas e ambas foram secas em capela. Desse procedimento resultaram

duas frações que foram denominadas fase aquosa (FAq, 156,46 g) e fase butanólica (FButOH, 50,27 g). Nesse processo houve perda de 2,5 % de massa.

A Figura 4 (pág. 12) mostra o procedimento de extração realizado com os frutos de *C. adamantium*.



**Figura 4.** Fluxograma representativo do processo de preparação dos extratos a partir dos frutos de *Campomanesia adamantium*.

### 3.6. Isolamento dos metabólitos secundários

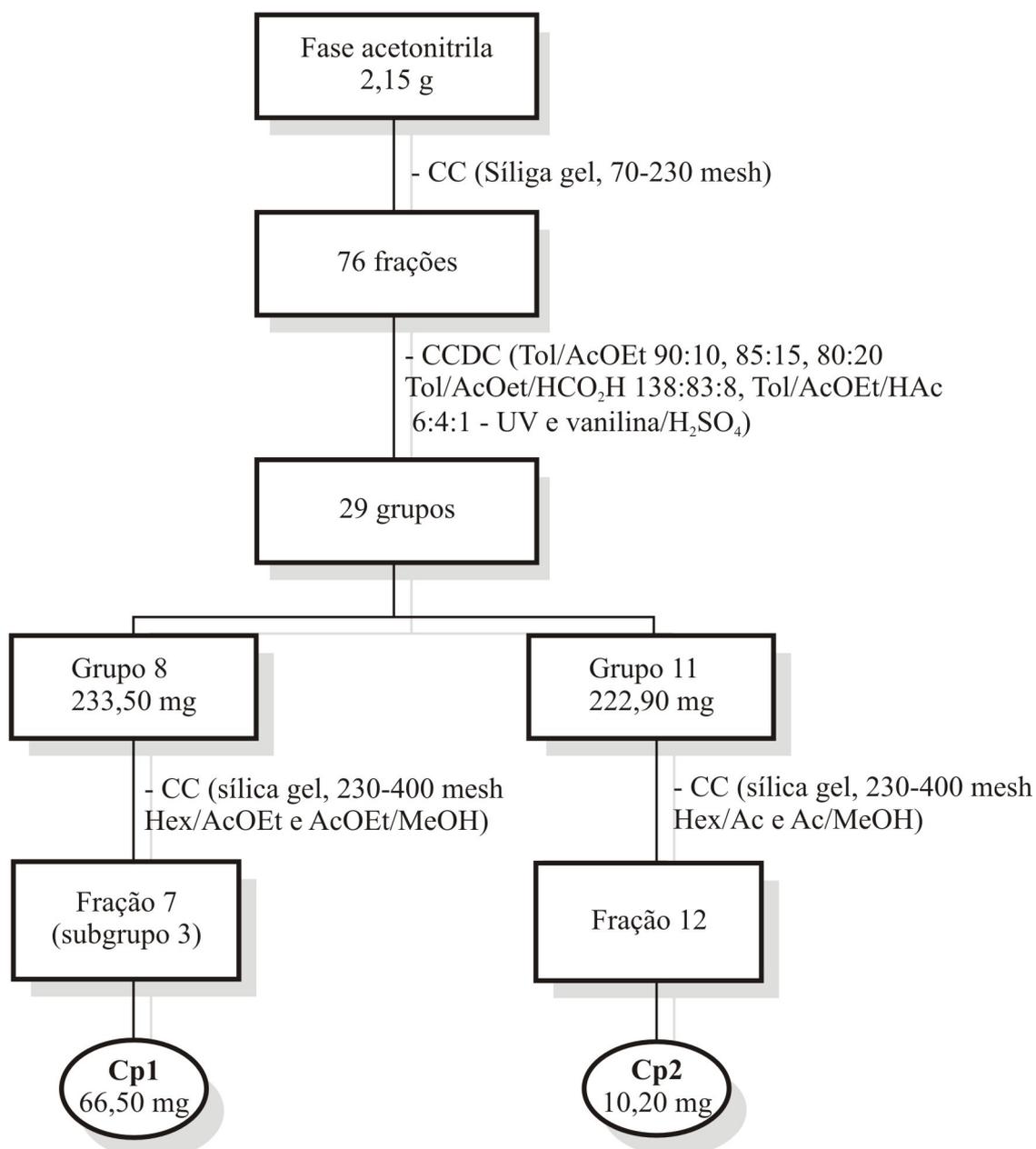
#### 3.6.1. *Campomanesia pubescens*

Parte da FACN (2,15 g), proveniente do extrato hexânico de *C. pubescens*, foi submetida à separação em coluna cromatográfica (5 x 70 cm) contendo 52,3 g de sílica gel (70-320 mesh, *Merck*) (Figura 5, pág. 14). Foram utilizados hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol em ordem crescente de polaridade e foram coletadas alíquotas de 50 mL. Dessa coluna foram obtidas 76 frações, as quais foram reagrupadas em 29 grupos após análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). Foram utilizados como eluentes: tolueno/acetato de etila 90:10 v/v, 85:15 v/v, 80:20 v/v, tolueno/acetato de etila/ácido fórmico 138:83:8 v/v/v, tolueno/acetato de etila/ácido acético 6:4:1 v/v/v. As placas foram reveladas em luz UV (254 e 365 nm) e vanilina/ácido sulfúrico (10 %). Os grupos 8 (CP-8, 233,50 mg) e 11 (CP-11, 222,90 mg) mostraram-se promissores por apresentarem elevada massa e poucas manchas no perfil em CCDC.

Os grupos CP-8 e CP-11 foram submetidos a refracionamento em sílica gel (230-400 mesh, *Merk*), utilizando sistemas com gradientes de solventes (hexano, acetato de etila, metanol para CP-8 e hexano, acetona e metanol para CP-11) em ordem crescente de polaridade.

Do grupo CP-8 foram obtidas 22 frações (aproximadamente 12 mL cada), sendo reagrupadas em 7 subgrupos após análise por CCDC. O subgrupo 3 apresentou uma única mancha em CCDC (hexano/acetato de etila 8:2 v/v), sendo então submetido a análise espectrométrica (RMN  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  1D e 2D). A substância isolada desse subgrupo foi denominada **Cp1** (66,50 mg).

O grupo CP-11 forneceu 39 frações (aproximadamente 15 mL cada), sendo que a fração 12 mostrou apenas uma mancha em CCDC (hexano/acetato de etila 7:3 v/v), e também foi submetida à análise espectrométrica (RMN  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  1D e 2D). Essa substância foi denominada **Cp2** (10,20 mg).



**Figura 5.** Fluxograma representativo dos procedimentos de fracionamento e isolamento das substâncias dos frutos de *C. pubescens*.

### 3.6.2. *C. adamantium*

A fase butanólica do extrato etanólico foi submetida à separação cromatográfica em sephadex (LH-20) (Coluna SBut). 3,85 g da FButOH foram totalmente dissolvidos em 15 mL de metanol e eluídos em uma coluna (4 x 90 cm) contendo aproximadamente 80 g de sephadex LH-20. A eluição foi isocrática utilizando-se metanol como eluente. A coluna

forneceu 178 frações que foram reagrupadas em 50 grupos após análise de seus perfis cromatográficos em CCDC (eluentes: acetato de etila /*n*-propanol/água 140:8:80 v/v/v, *n*-butanol/ácido acético/água 65:25:15 v/v/v, acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético/água 100:11:11:27 e 130:11:11:27 ambos v/v/v).

Do grupo 48 destacou-se um líquido com leve coloração amarela e insolúvel em solventes polares, como metanol e acetona. Esse material foi separado e submetido a análise em cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), utilizando a condição 1 (Item 3.3.1, pág. 8).

As demais frações dessa coluna apresentaram elevado número de substâncias e pouca massa, motivo pelo qual não foram analisadas.

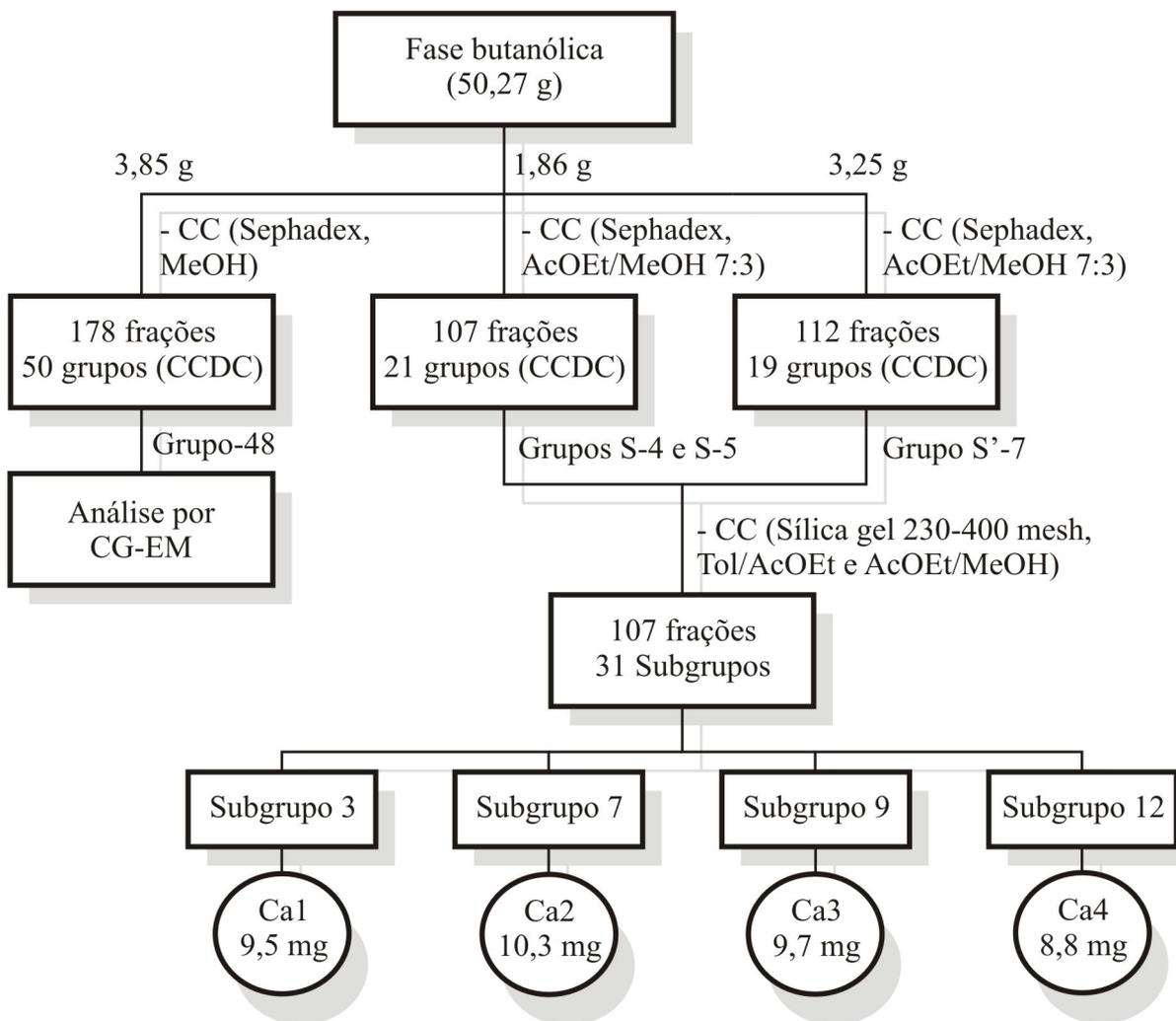
Devido a pouca quantidade de massa das frações obtidas optou-se por realizar novamente o fracionamento da FButOH utilizando sephadex LH-20, mas como eluente uma mistura de acetato de etila/metanol (7:3, v/v). A amostra (3,69 g) foi dissolvida em 20 mL da mistura acetato de etila/metanol 7:3 v/v. A parte solúvel nessa mistura de solventes (1,86 g) foi eluída em uma coluna (4 x 90 cm) contendo aproximadamente 80 g de sephadex LH-20 e eluída com acetato de etila/metanol 7:3 v/v (Coluna S). Essa coluna forneceu 107 frações que foram reagrupadas em 21 grupos após análise de seus perfis em CCDC (eluentes: acetato de etila/*n*-propanol/água 140:8:80 v/v/v e tolueno/acetato de etila/ácido acético 6:4:1 v/v/v). Esses grupos foram codificados de S-1 até S-21.

Esse processo foi repetido nessas mesmas condições com a eluição de 3,25 g (massa solúvel), o que gerou um total de 112 frações, reagrupadas em 19 grupos após análise dos perfis cromatográficos por CCDC (eluentes: acetato de etila/*n*-propanol/água 140:8:80 v/v/v e tolueno/acetato de etila/ácido acético 6:4:1 v/v/v). Os grupos foram codificados com o prefixo S' e seus respectivos números.

As frações S-4, S-5 e S'-7 foram reunidas, visto que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, e refracionadas em sílica gel (230-400 mesh) utilizando gradiente tolueno/acetato de etila e acetato de etila/metanol (v/v). Esse processo forneceu 107 frações (aproximadamente 15 mL cada), que foram reagrupadas em 31 subgrupos após análise em CCDC (eluentes tolueno/acetato de etila 8:2 v/v e 7:3 v/v, tolueno/acetato de etila/ácido acético 6:4:1 v/v/v). Os subgrupos SA-3 e SA-7 mostraram uma única mancha em CCDC (tolueno/acetato de etila 8:2 v/v), já nos subgrupos SA-9 e SA-12 houve a formação de cristais, que foram cuidadosamente separados, dissolvidos em acetona e cromatografados (CCDC - tolueno/acetato de etila 7:3 v/v) apresentando apenas uma mancha para cada fração. As substâncias dos subgrupos SA-3, SA-7, SA-9 e SA-12 foram denominadas **Ca1** (9,5 mg),

**Ca2** (10,3 mg), **Ca3** (9,7 mg) e **Ca4** (8,8 mg), respectivamente, e submetidas a análise espectroscópica (RMN  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  1D e 2D).

A Figura 6 mostra os procedimentos realizados para o isolamento de substâncias dos frutos de *C. adamantium*.



**Figura 6.** Fluxograma representativo dos procedimentos de fracionamento e isolamento dos componentes dos frutos de *C. adamantium*

### 3.7. Análise por CG-EM

Os óleos essenciais dos frutos (2,28 mg/mL) e das folhas 2,36 (mg/mL) de *C. pubescens* foram diluídos em hexano e analisados. O extrato hexânico das folhas e dos frutos

de *C. pubescens* foram analisados na concentração de 2,20 mg/mL. As análises foram realizadas nas condições 1 e 2 (Item 3.3.1, pág. 8).

A identificação das substâncias foi realizada através da comparação de seus índices de retenção e espectros de massas com os dados da literatura (ADAMS, 1995) e com a biblioteca do equipamento (Nist 2.0). Foi utilizada uma mistura de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub>) como referência externa (1,56 mg/mL). Os índices de retenção foram calculados pelas fórmulas de Van den Dool e Kratz's (ZHAO, 2005):

$$I = \frac{(T_{rx} - Tr_z)}{(T_{rz+1} - Tr_z)} 100 + 100z$$

O índice de retenção para isoterma (*IK*, índice de Kovat's) foi calculado pela fórmula (GIESE, 2005):

$$IK = \frac{(\log T_{rx} - \log Tr_z)}{(\log T_{rz+1} - \log Tr_z)} 100 + 100z$$

Empregando estas fórmulas: *I* é o índice de retenção para temperatura programada do analito, *Tr<sub>z</sub>*, *Tr<sub>z+1</sub>*, e *Tr<sub>x</sub>* são os tempos de retenção (em minutos) dos dois padrões de *n*-alcanos contendo *z* e *z+1* átomos de carbono e da substância de interesse, respectivamente.

### 3.8. Análise por CLAE

Todos os extratos e partições estudados neste trabalho (exceto o extrato hexânico das folhas de *C. pubescens*) foram submetidos à análise por cromatografia líquida de alta eficiência. O intuito foi de obter um perfil cromatográfico dos mesmos e possibilitar a quantificação de substâncias nessas amostras.

As soluções dos extratos e partições foram preparadas utilizando como solvente uma mistura de etanol/água (8:2, v/v). As concentrações dessas soluções (Tabela 1, pág. 18) correspondem à massa solúvel nessa mistura de solventes. Foram injetados 30 µL para o EHex e a FHex e 50 µL para os demais extratos e partições.

As substâncias isoladas através das colunas cromatográficas foram utilizadas como padrões para a quantificação das mesmas nos extratos e partições. Para isso foram purificadas por CLAE, e em seguida construídas suas curvas analíticas, também por CLAE, nas mesmas condições de análise dos extratos e partições.

**Tabela 1.** Concentrações dos extratos e partições na análise por CLAE.

Espécie	Amostra	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>C. pubescens</i>	EHex	1000
	FHex	1000
	FACN	1140
	EAcOEt	910
<i>C. adamantium</i>	EEtOH	840
	FButOH	1190
	FAq	1050

### 3.9. Testes químicos e biológicos

Os extratos e partições utilizados nos testes químicos estão listados na Tabela 2. Esses mesmos extratos foram utilizados para os testes biológicos, porém em concentrações diferentes.

**Tabela 2.** Concentrações das soluções dos extratos e partições utilizados nos testes espectrofotométricos (fenóis, flavonóides, DPPH e  $\beta$ -caroteno).

Espécie	Amostra	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>C. pubescens</i>	EHex	200, 400, 800, 1200 e 2000
	FACN	200, 400, 800, 1200 e 2000
	FHex	200, 400, 800, 1200 e 2000
	EAcOEt	40, 120, 200, 400, 800, 1200 e 2000
<i>C. adamantium</i>	EEtOH	10, 40, 100, 200, 400, 800 e 1000
	FButOH	10, 40, 100, 200, 400, 800 e 1000
	FAq	100, 200, 400, 800, 1000, 1200 e 1400

#### 3.9.1. Teor de fenóis totais

O teor de compostos fenólicos foi determinado usando o reagente de Folin-Ciocalteu conforme descrito por Chen *et al* (2007). As concentrações das soluções testadas estão na Tabela 2, pág. 18. Alíquotas dessas soluções (100  $\mu\text{L}$ ) foram adicionadas a 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Após 2 minutos 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu a 50 % foi adicionado à mistura. Após 30 minutos a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 750 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O teor de fenóis foi calculado através da equação linear de uma curva analítica, sendo o ácido gálico utilizado como padrão. As concentrações das soluções do padrão foram 10, 50, 100, 150 e 200 µg/mL. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico.

### 3.9.2. Teor de flavonóides totais

O teor de flavonóides foi determinado com base no trabalho de Lin e Tang (2007). As concentrações das soluções testadas estão na Tabela 2, pág. 18. Alíquotas dessas soluções (0,5 mL) foram adicionadas a 1,5 mL de metanol, 0,1 mL de solução de  $AlCl_3$  10%, 0,1 mL de  $CH_3CO_2K$  e 2,8 mL de água destilada. A mistura foi mantida em temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse tempo a absorbância das soluções foi lida em espectrofotômetro a 415 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O teor de flavonóides foi calculado por comparação com uma curva analítica onde a quercetina foi utilizada como padrão. As concentrações das soluções de quercetina foram de 0,14, 0,56, 0,98, 2,10 e 4,90 µg/mL. Os resultados foram expressos em equivalentes de quercetina.

### 3.9.3. Ensaio de atividade antioxidante utilizando o DPPH

O ensaio com o radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), baseado no trabalho de Blois (1958), foi realizado pela adição de 1,0 mL de cada extrato, em diferentes concentrações (Tabela 2, pág. 18), a 2,0 mL de uma solução metanólica de DPPH a  $4 \times 10^{-3}$  %. Após incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, a absorbância de cada amostra foi lida à 517 nm. As substâncias isoladas foram testadas na concentração de 300 µg/mL. Utilizou-se o butilidroxianisol (BHA) como padrão antioxidante. Todas as análises foram feitas em triplicata. A porcentagem de inibição (% I) foi calculada pela fórmula (MOKBEL; HASHINAGA, 2006):

$$\% I = \frac{A_{DPPH} - (A_A - A_{A'})}{A_{DPPH}} 100$$

Onde  $A_{DPPH}$  é a absorbância máxima do DPPH,  $A_A$  é a absorbância da amostra após 30 minutos de reação e  $A_{A'}$  é a absorbância da amostra em metanol.

O valor da  $CI_{50}$ , que é a concentração capaz de reagir com 50 % do DPPH presente, foi obtido através das curvas dos gráficos como mostrado na Figura 7 (pág. 21).

#### 3.9.4 Ensaio de atividade antioxidante utilizando o sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

O teste de atividade antioxidante utilizando  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foi baseado no trabalho de Amin *et al* (2006), com algumas modificações. Preparou-se uma solução a 1 mg/mL de  $\beta$ -caroteno em clorofórmio. Adicionou-se 0,5 mL dessa solução a um recipiente contendo 200 mg de Tween 20 e 25  $\mu$ L de ácido linoleico. A mistura foi homogeneizada e o solvente removido sob nitrogênio. A mistura foi colocada em balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água ultrapurificada. Alíquotas de 2,5 mL dessa solução foram adicionadas a 0,3 mL das amostras em diferentes concentrações (Tabela 2, pág. 18), sendo a absorbância medida a 470 nm imediatamente após essa mistura. As amostras permaneceram sob aquecimento em banho maria a 50 °C por 2 horas e novamente tiveram suas absorbâncias medidas a 470 nm. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. Utilizou-se o BHA como padrão positivo. O percentual de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno foi calculado pela fórmula:

$$\% I = \frac{A_{2h}}{A_{0h}} 100$$

Onde  $A_{2h}$  é a absorbância da amostra após duas horas de reação e  $A_{0h}$  é a absorbância da amostra logo após a adição da solução de  $\beta$ -caroteno.

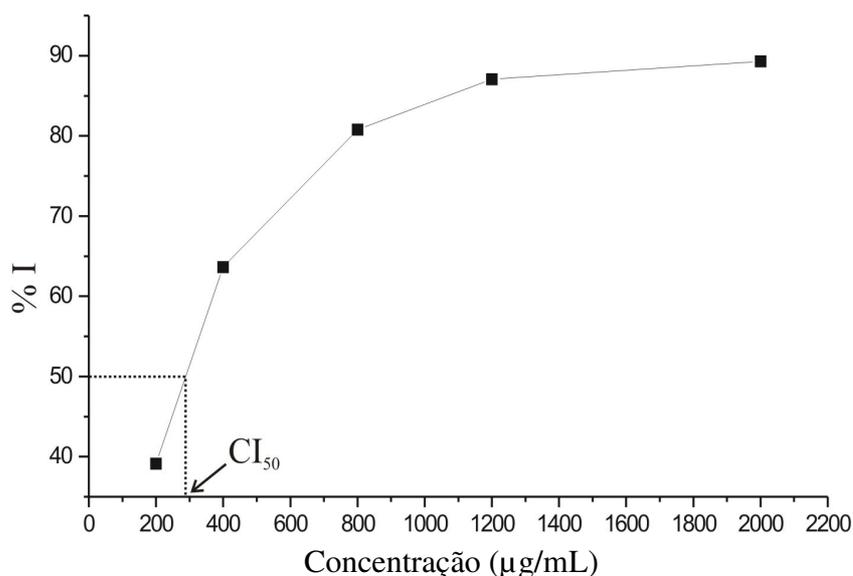
Os resultados foram expressos em  $CI_{50}$ , que é a concentração capaz de inibir em 50 % a oxidação do  $\beta$ -caroteno. Os valores também foram obtidos pela análise do gráfico, tal como no teste com DPPH (Figura 7, pág. 21).

#### 3.9.5. Teste de toxicidade sobre *Artemia* sp.

Todos os extratos e partições foram testados quanto à sua toxicidade sobre as larvas recém eclodidas de *Artemia* sp.

Os ovos de *Artemia* sp. foram colocados em um béquer contendo água marinha artificial (38,0 g sal marinho/L), ficando sob luz e oxigenação por 24 horas. Após esse período foram colocadas dez larvas recém eclodidas (em média) em frascos contendo 250,

500 e 1000  $\mu\text{g}$  dos extratos (EHex, EAcOEt e EEtOH) e partições (FHex, FACN, FButOH e FAq) dissolvidos em 5 mL de água marinha artificial. A contagem das larvas foi realizada 24 horas após o contato das mesmas com as soluções. Os dados foram tratados em um programa que utiliza o sistema Probitos de análise para o cálculo da  $DL_{50}$ , que é a dose letal para 50% dos indivíduos de uma população.



**Figura 7:** Gráfico da FACN ilustrando a obtenção da  $CI_{50}$ .

### 3.9.6. Avaliação da atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados na Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde do Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN), empregando o método ágar de difusão em disco. As amostras testadas foram os extratos EHex (440  $\mu\text{g/mL}$ ), EAcOEt (910  $\mu\text{g/mL}$ ) e EEtOH (840  $\mu\text{g/mL}$ ) e as partições FHex (130  $\mu\text{g/mL}$ ), FACN (1140  $\mu\text{g/mL}$ ), FButOH (1190  $\mu\text{g/mL}$ ) e FAq (1050  $\mu\text{g/mL}$ ).

Os microorganismos testados foram as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (Hospitalar), *Staphylococcus aureus* (Hospitalar), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e o fungo leveduriforme *Candida albicans* (ATCC 10231).

Os discos estéreis de papel filtro com 6,00 mm (Whatman n. 1) foram impregnados com 20,00  $\mu\text{L}$  de amostra e colocados para secar em ambiente também estéril. Após solidificação do ágar, as placas foram inoculadas com uma suspensão bacteriana, correspondente a escala 0,50 de Mac Farland (0,1 mL of  $10^8$  UFC/mL) e uniformemente

distribuída com Swab estéril. Os discos foram aplicados nas placas e as mesmas foram levadas para incubação a 37°C durante 24 horas. Cada teste foi realizado em triplicada. O controle foi realizado com etanol 80%. Para determinar o controle positivo realizou-se um antibiograma. Padronizou-se a utilização de discos de antibióticos (Cecon®), adquiridos comercialmente, para cada cepa teste, sendo Imipenen (10 µg) para *P. aeruginosa*, Nitrofurantoína (300 µg) para *S. aureus*, ciprofloxacina e fluconazol (10 µg) para *C. albicans*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Identificação das substâncias isoladas

#### 4.1.1. Substâncias isoladas de *C. pubescens*

O estudo dos frutos de *C. pubescens* foi iniciado pela FACN. Dessa amostra foram isoladas por cromatografia em coluna as chalconas (2',4'-diidroxí-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona (**Cp1**) e 2',4'-diidroxí-5'-metil-6'-metoxichalcona (**Cp2**). Suas estruturas foram determinadas com base em experimentos de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais. A seguir será detalhada a determinação estrutural dessas duas substâncias.

##### 4.1.1.1. Identificação estrutural de **Cp1**

A substância **Cp1** isolada da fração CP-8.3 mostrou-se como um sólido amorfo e de tom alaranjado. Sua estrutura está representada na Figura 8 (pág. 24).

Seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 9, pág. 26) mostrou multipletos na região de hidrogênios aromáticos de  $\delta$  7,3 a  $\delta$  7,7 e dois dubletos com  $\delta$  7,98 (H- $\alpha$ ) e outro com  $\delta$  7,83 (H- $\beta$ ), ambos com uma constante de acoplamento  $J = 15,7$  Hz, que é compatível com uma dupla ligação *trans*-disubstituída. Dois sinais intensos, em  $\delta$  2,15 e  $\delta$  2,12, indicaram a presença de duas metilas ligadas a anel aromático. Um singlete em  $\delta$  3,65 foi atribuído a uma metoxila também ligada a anel aromático. Outro singlete em  $\delta$  13,59 indicou a existência de uma hidroxila quelada a uma carbonila.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 10, pág. 26) apresentou um sinal em  $\delta$  193,4 que comprovou a presença de uma carbonila. Sinais para dois carbonos em  $\delta$  128,9 referentes à C-2 e C-6 e para outros dois em  $\delta$  128,4 para C-3 e C-5, além de sinais em  $\delta$  130,2 para o C-4 e  $\delta$  135,3 para C-1 que puderam ser atribuídos aos carbonos do anel B. Observaram-se outros seis sinais na região de aromáticos sendo todos carbonos quaternários, como revelou o DEPT 135° (Figura 11, pág. 27), indicando que o anel A estaria hexasubstituído. Os sinais em  $\delta$  62,3 (6'-OMe), 8,2 (3'-Me) e 7,6 (5'-Me) foram atribuídos a metoxila e às duas metilas, respectivamente.

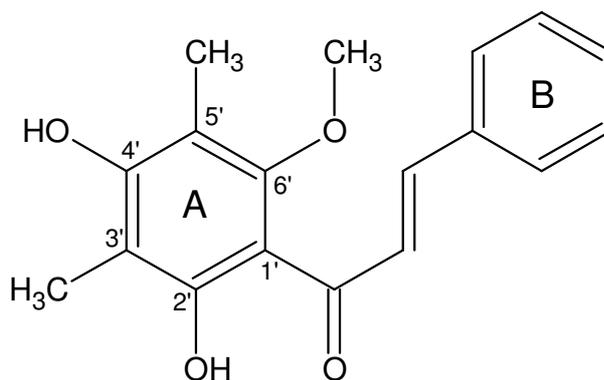
A posição da metoxila foi confirmada por NOESY 1D (Figura 12, pág. 27). O experimento mostrou correlação entre a metoxila ( $\delta$  3,65) e apenas uma das metilas ( $\delta$  2,15) e

também com o hidrogênio em  $\delta$  7,98 (H- $\alpha$ ), confirmando então que a metoxila encontra-se em posição *orto* em relação ao carbono ligado à carbonila.

A atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos do anel A foi concluída pela análise do experimento de HMBC (Figuras 13 e 14, pág. 28). Os hidrogênios da metoxila ( $\delta$  3,65) mostraram correlação com o carbono em  $\delta$  158,8 (C-6'). Os hidrogênios da metila em  $\delta$  2,15 tiveram correlação com o carbono da metoxila ( $\delta$  62,3), com o sinal em  $\delta$  109,1, que foi atribuído ao C-5' (onde essa metila está ligada) e com os carbonos em  $\delta$  158,9 (C-6') e 159,4 (C-4'). Os hidrogênios da outra metila ( $\delta$  2,12) apresentaram correlação com o carbono em  $\delta$  106,6 (C-3') e com os carbonos em  $\delta$  159,4 (C-4') e 162,0 (C-2'). O hidrogênio  $\alpha$  mostrou correlação do o carbono em  $\delta$  108,9, deslocamento atribuído ao C-1'. Também foi possível verificar que os hidrogênios em  $\delta$  2,15 correlacionam com o carbono em  $\delta$  8,2, enquanto que os hidrogênios em  $\delta$  2,12 correlacionam com o carbono em  $\delta$  7,6.

Os carbonos do anel B tiveram seus deslocamentos comparados com a literatura.

Sendo assim sugere-se que a substância **Cp1** seja a 2',4'-diidroxí-6'-metoxi-3',5'-dimetilchalcona (MALTERUD *et al*, 1977; YE *et al* 2004a e 2004b; YE *et al*, 2005; SALEM e WERBOVETZ 2005; MUSTAFA *et al*, 2005) encontrada também na literatura com o nome de 4',6'-diidroxí-2'-metoxi-3',5'-dimetilchalcona (SRIVASTAVA *et al*, 1995; BELOFSKY *et al*, 2004). Seu nome sistemático é (2E)-1-(2,4-diidroxí-6-metoxi-3,5-dimetilfenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona. A Tabela 3 (pág. 25) mostra os valores de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da **Cp1** comparados com os dados da literatura.

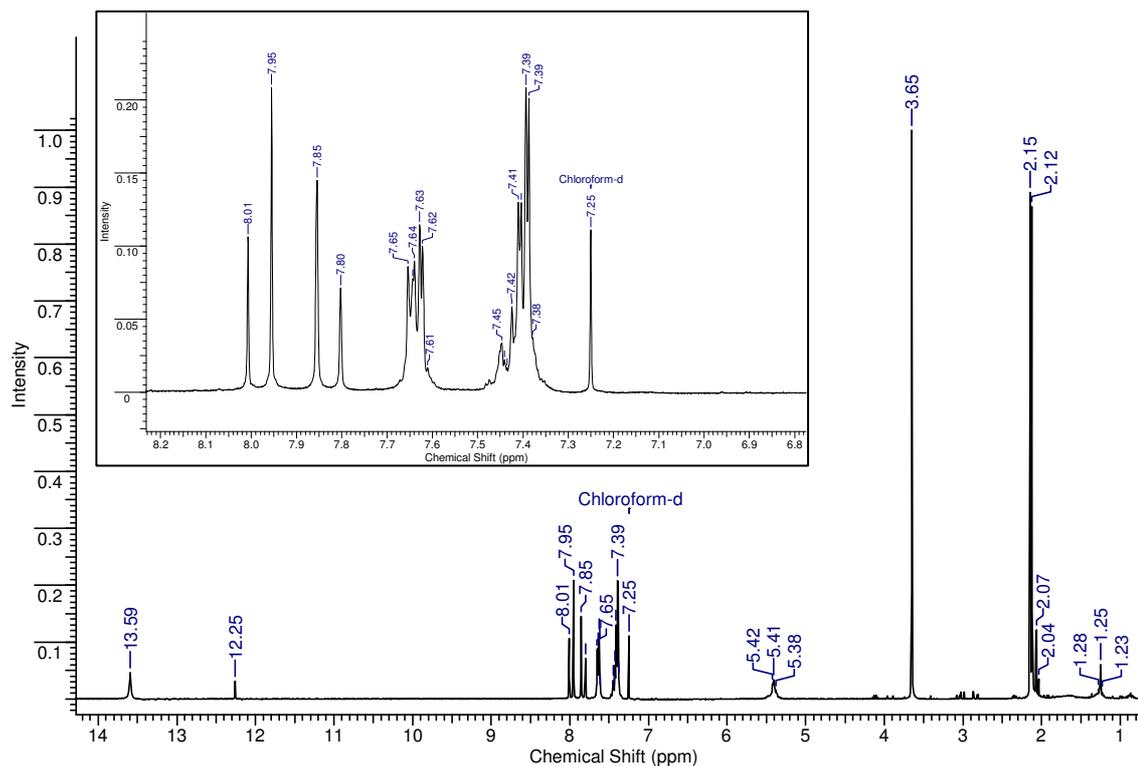


**Figura 8.** Estrutura da 2',4'-diidroxí-6'-metoxi-3',5'-dimetilchalcona (**Cp1**).

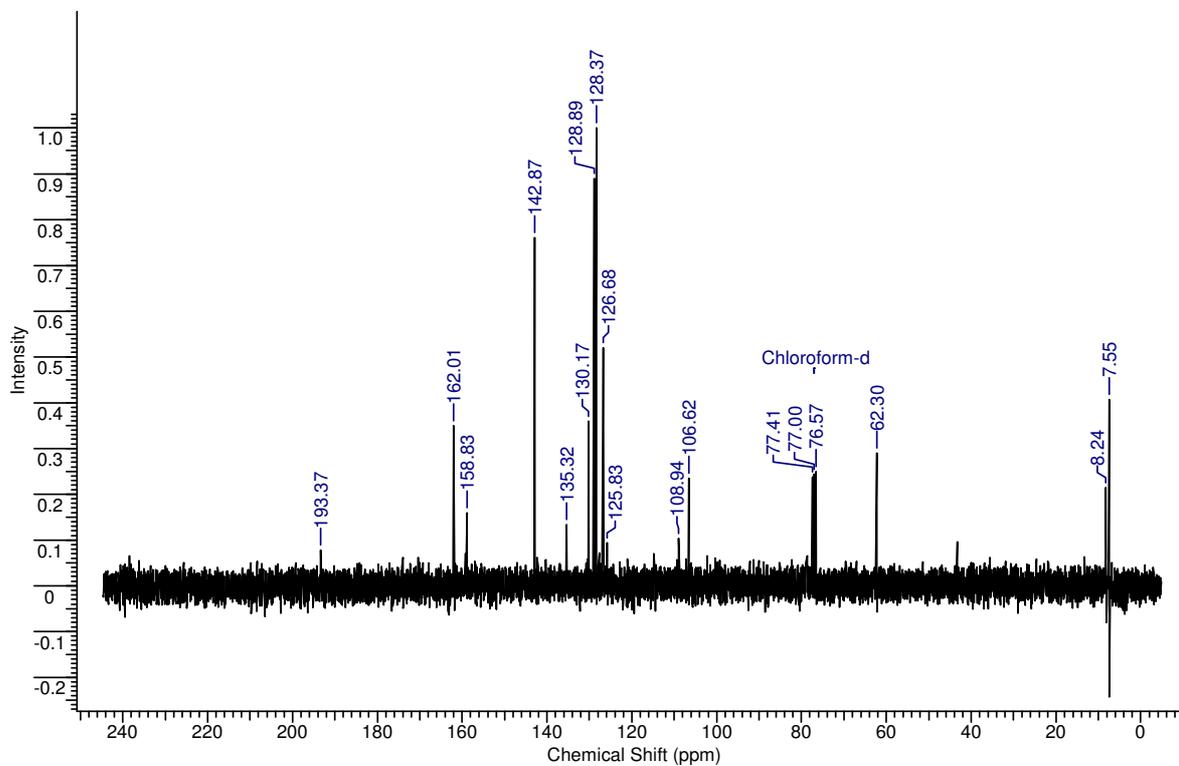
**Tabela 3.** Comparação dos deslocamentos químicos ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$  em ppm) da **Cp1** com os encontrados na literatura.

Posição	Salem & Werbovetz (2005)		Belofsky <i>et al</i> (2004)		Srivastava <i>et al</i> (1995)		Malterud <i>et al</i> (1977)	<b>Cp1</b> - <i>C. pubescens</i>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult, <i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult, <i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult, <i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (mult, <i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult, <i>J</i> em Hz)
1	134,9	-	135,7	-	135,4	-	-	135,3	-
2	127,9	7,65 (d;7,2)	128,7	7,67 (m)	128,9	7,65 (m) <sup>a</sup>	7,2-7,9 (m)	128,9	7,64 (m)
3	128,4	7,41 (m)	129,2	7,43 (m)	128,4	7,42 (m) <sup>a</sup>	7,2-7,9 (m)	128,4	7,39 (m)
4	129,7	7,41 (m)	130,4	7,43 (m)	130,2	7,42 (m) <sup>a</sup>	7,2-7,9 (m)	130,2	7,39 (m)
5	128,4	7,41 (m)	129,2	7,43 (m)	128,4	7,42 (m) <sup>a</sup>	7,2-7,9 (m)	128,4	7,39 (m)
6	127,9	7,65 (d;7,2)	128,7	7,67 (m)	128,9	7,65 (m) <sup>a</sup>	7,2-7,9 (m)	128,9	7,64 (m)
$\alpha$	126,2	7,99 (d; 15,7)	127,0	8,2 (d;15,8)	126,8	8,00 (d; 16,0) <sup>a</sup>	7,93 (d;16,0)	126,7	7,98 (d;15,7) <sup>b</sup>
$\beta$	142,4	7,84 (d; 15,7)	143,1	7,86 (d; 15,7)	142,9	7,87 (d; 16,0) <sup>a</sup>	7,86 (d;16,0)	142,9	7,83 (d;15,7) <sup>b</sup>
1'	108,6	-	109,4	-	106,6	-	-	108,9	-
2'	161,6	-	159,2	-	162,1	-	-	162,0	-
3'	106,1	-	109,1	-	108,9	-	-	106,7	-
4'	158,7	-	159,4	-	159,3	-	-	159,4	-
5'	108,4	-	106,8	-	109,1	-	-	109,1	-
6'	158,4	-	162,3	-	130,2	-	-	158,8	-
OH-2'	-	13,60 (s)	-	13,63 (s)	-	13,62 (s)	13,6 (s)	-	13,59 (s)
OH-4'	-	-	-	5,36 (s)	-	5,37 (s)	5,6 (s)	-	5,4 (s)
CH <sub>3</sub> -3'	7,1	2,14 (s)	7,8	2,16 (s)	7,5 <sup>a</sup>	2,17 (s) <sup>a</sup>	2,11 (s) <sup>a</sup>	7,6	2,12 (s)
CH <sub>3</sub> -5'	7,7	2,16 (s)	8,5	2,18 (s)	8,2 <sup>a</sup>	2,20 (s) <sup>a</sup>	2,14 (s) <sup>a</sup>	8,2	2,15 (s)
OCH <sub>3</sub> -6'	61,9	3,66 (s)	62,6	3,69 (s)	62,3	3,70 (s)	3,65 (s)	62,3	3,65 (s)
CO	192,9	-	193,6	-	193,4	-	-	193,4	-

<sup>a</sup> ordem não atribuída pelo autor. <sup>b</sup> valores atribuídos com base na literatura.



**Figura 9.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da **Cp1**, com ampliação da região de  $\delta$  6,8 a 8,2 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$ ).



**Figura 10.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **Cp1** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$ ).

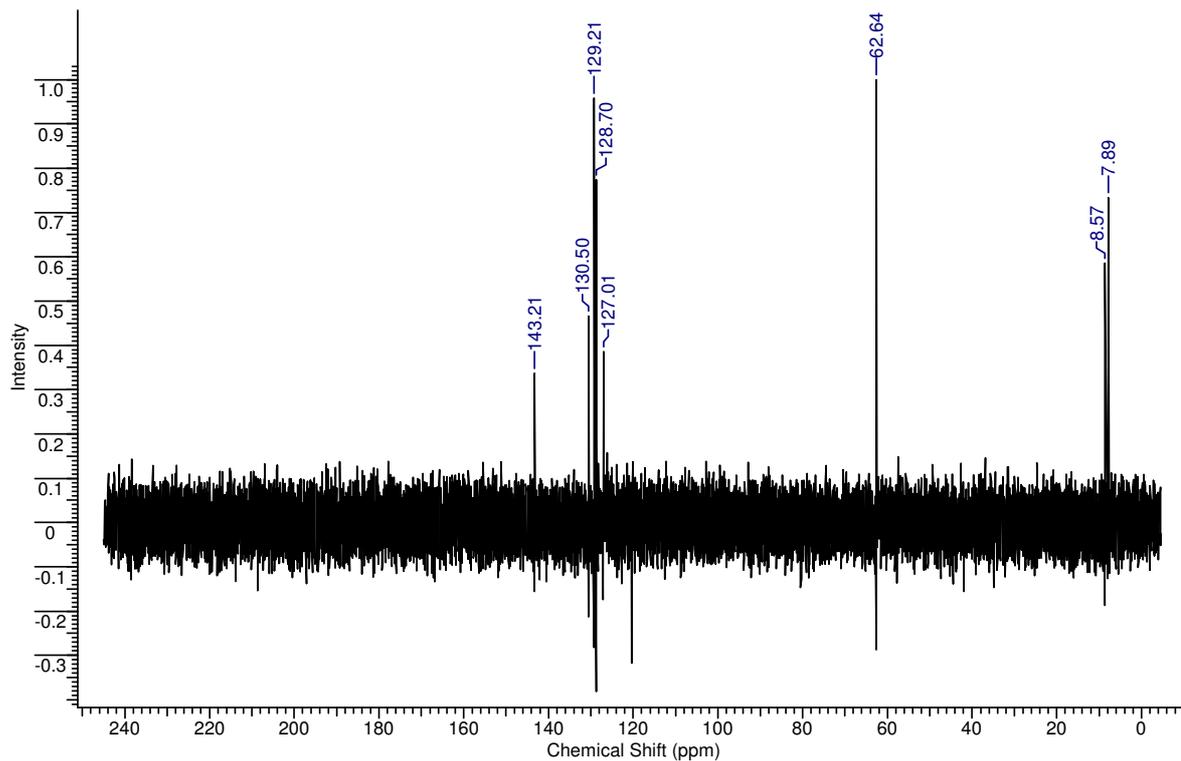


Figura 11. Espectro de DEPT 135° de **Cp1** (CDCl<sub>3</sub>, TMS, δ)

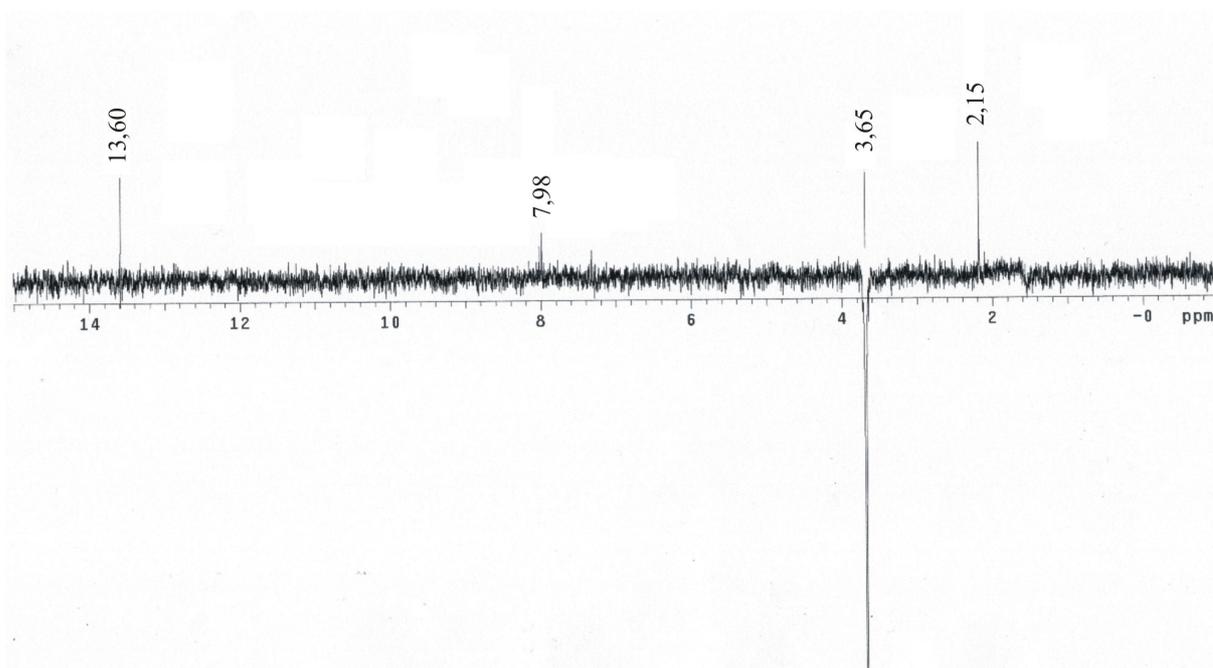


Figura 12. Espectro NOESY 1D de **Cp1** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, δ)

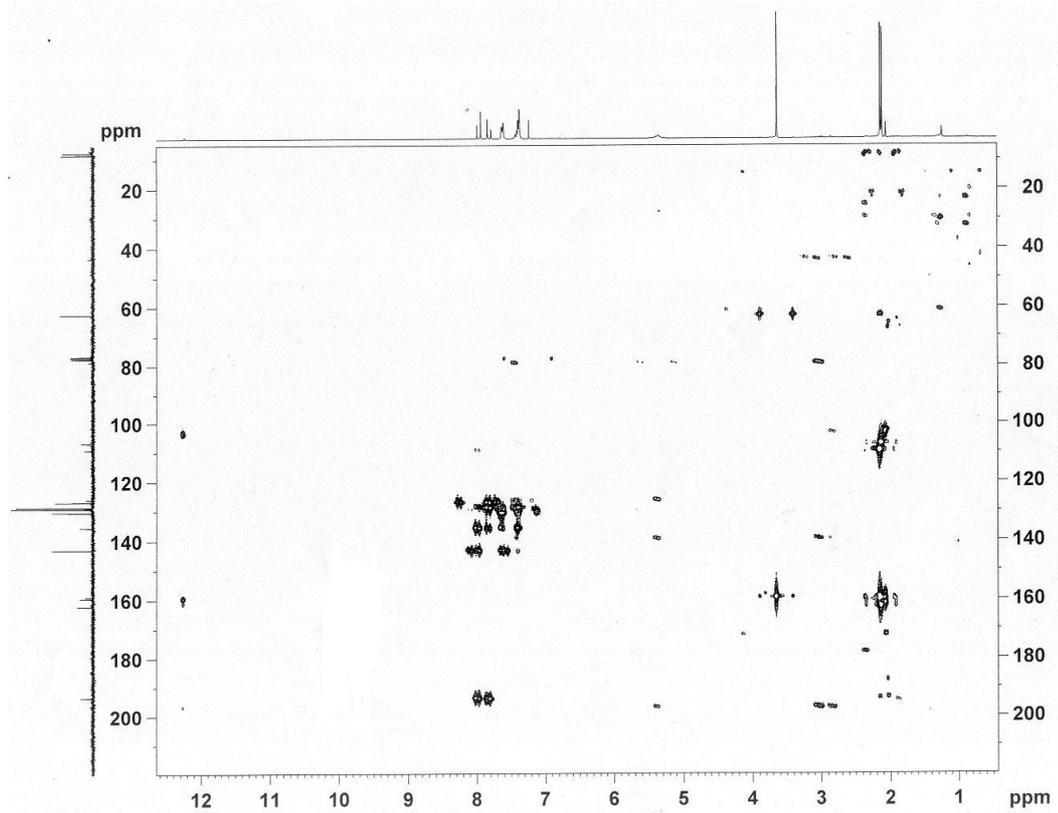


Figura 13. Experimento HMBC para a Cp1 (CDCl<sub>3</sub>, TMS, δ).

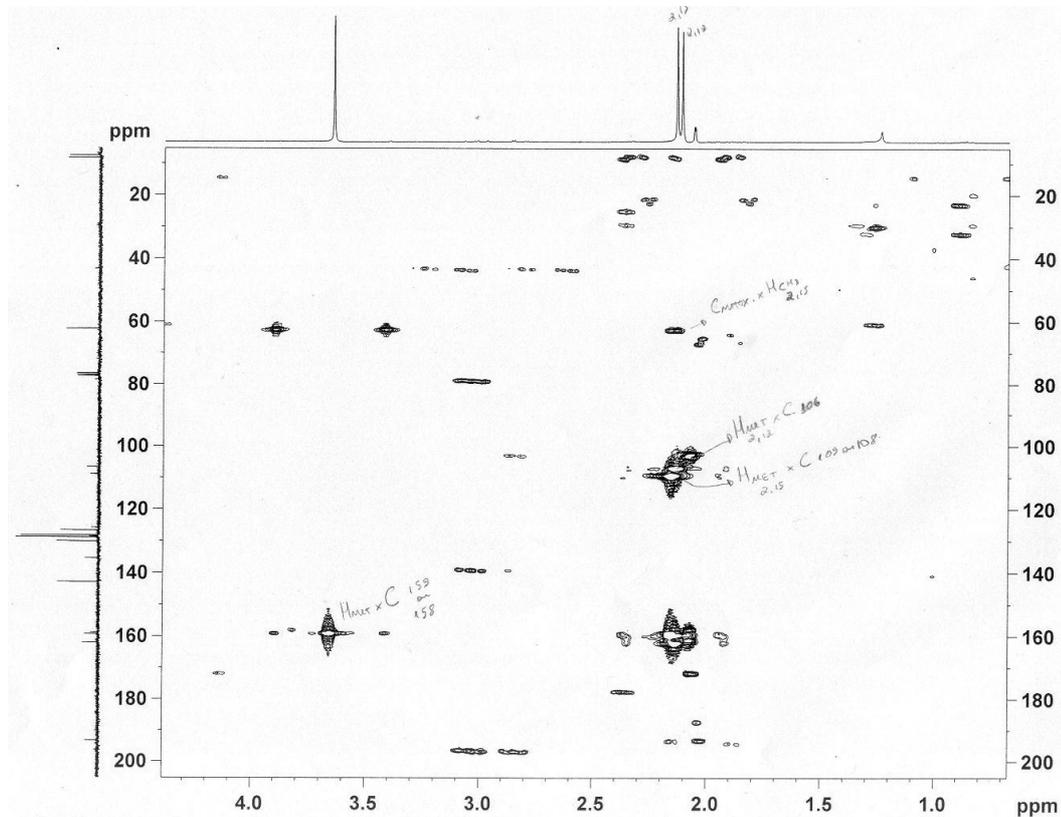


Figura 14. Ampliação do experimento HMBC para a Cp1 (CDCl<sub>3</sub>, TMS, δ).

#### 4.1.1.2. Identificação estrutural de **Cp2**

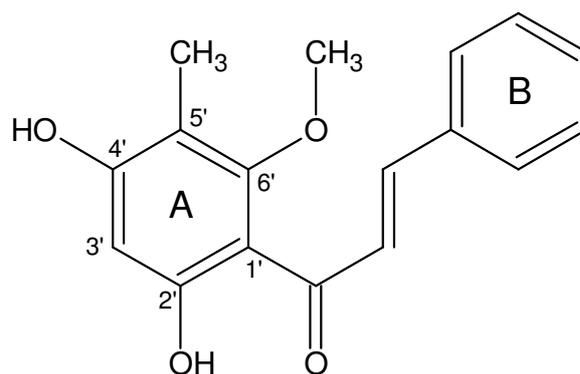
A substância **Cp2** isolada do grupo CP-11, proveniente da FACN, mostrou-se como um sólido amorfo de coloração amarela. A Figura 15 (pág. 30) mostra a estrutura proposta para essa substância.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 16, pág. 31) apresentou sinais semelhantes aos de **Cp1**, sugerindo tratar-se também de uma chalcona, mas com substituições diferentes para o anel A. Foram observados multipletos entre  $\delta$  7,3 e  $\delta$  7,7 caracterizando o anel aromático B mono substituído. Dois dubletos em  $\delta$  7,83 (H- $\beta$ ) e 7,98 (H- $\alpha$ ), com  $J = 15$  Hz, compatíveis com dupla ligação *trans*-disubstituída. Um singleto em  $\delta$  6,26 indicou a presença de um hidrogênio aromático. Singletos em  $\delta$  3,68 e  $\delta$  2,12 indicaram, respectivamente, a presença de uma metoxila e uma metila ligadas ao anel aromático A. Outro singleto, em  $\delta$  13,42, foi atribuído a uma hidroxila fenólica quelada ao grupo carbonila.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 17, pág. 31) apresentou um sinal em  $\delta$  193,2 confirmando a presença da carbonila. O sinal em  $\delta$  62,2 foi atribuído à metoxila. A metila aromática apresentou sinal em  $\delta$  8,1. Os sinais para os carbonos aromáticos do anel B foram em  $\delta$  128,9 para C-2/C-6, em  $\delta$  128,4 para C-3/C-5,  $\delta$  130,3 para C-4 e  $\delta$  135,3 para C-1. Esses sinais dos carbonos do anel A e do anel B foram atribuídos por comparação com a substância **Cp1**. A Tabela 4 (pág. 30) mostra todas as atribuições feitas para os carbonos e hidrogênios da substância **Cp2**.

Para confirmar a localização da metoxila no anel A fez-se o experimento NOESY 2D (Figuras 18 e 19, pág. 32). No experimento obtido observou-se claramente uma correlação entre os hidrogênios da metoxila ( $\delta$  3,66) e os hidrogênios da metila ( $\delta$  2,10). Outra correlação observada foi entre os hidrogênios da metoxila ( $\delta$  3,66) e o hidrogênio  $\alpha$  ( $\delta$  7,98). Esses dados confirmam a presença da metoxila ligada ao carbono *orto* em relação ao carbono ligado à carbonila e a metila ligada no carbono vizinho ao ligado à metoxila.

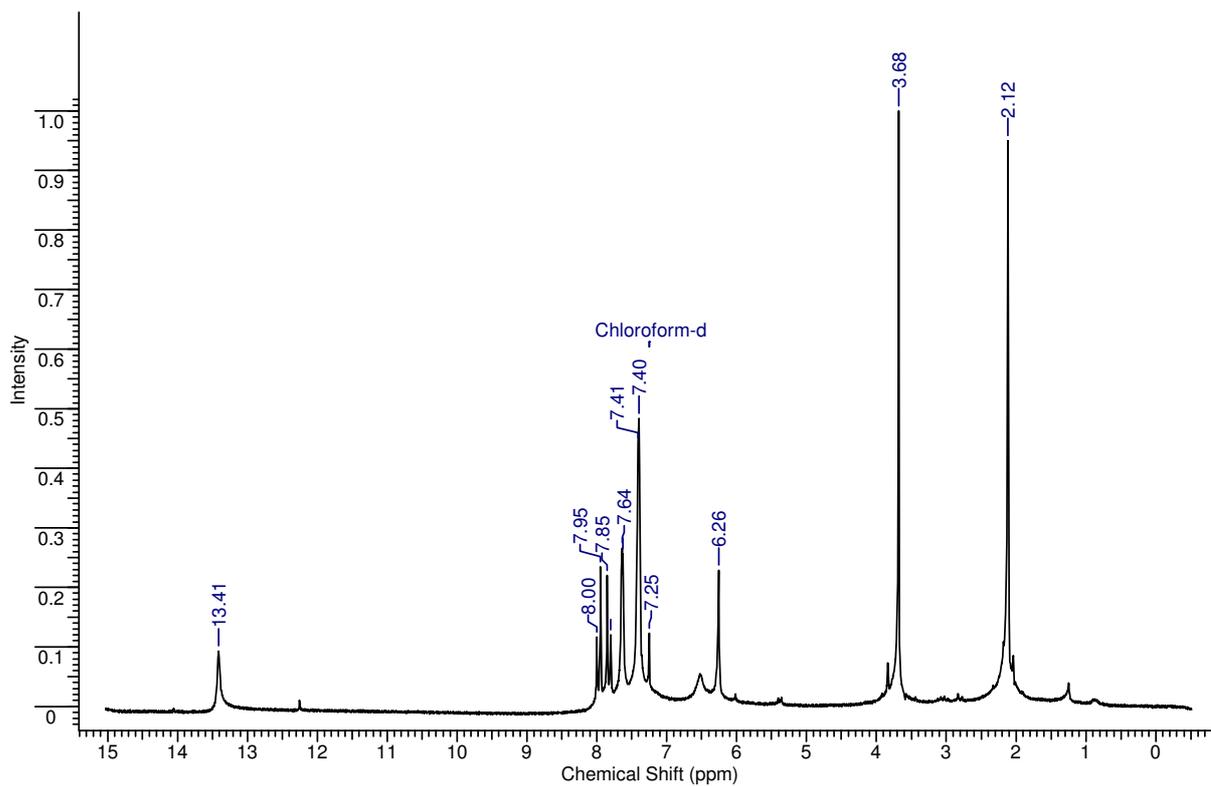
Com base nesses dados sugere-se que a substância **Cp2** seja a 2',4'-dihidroxi-5'-metil-6'-metoxichalcona, conhecida como aurentiacina A (ADITYACHAUDHURY; DASKANUNGO, 1975). Seu nome sistemático é (2*E*)-1-(4,6-diidroxi-3-metil-2-metoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona.



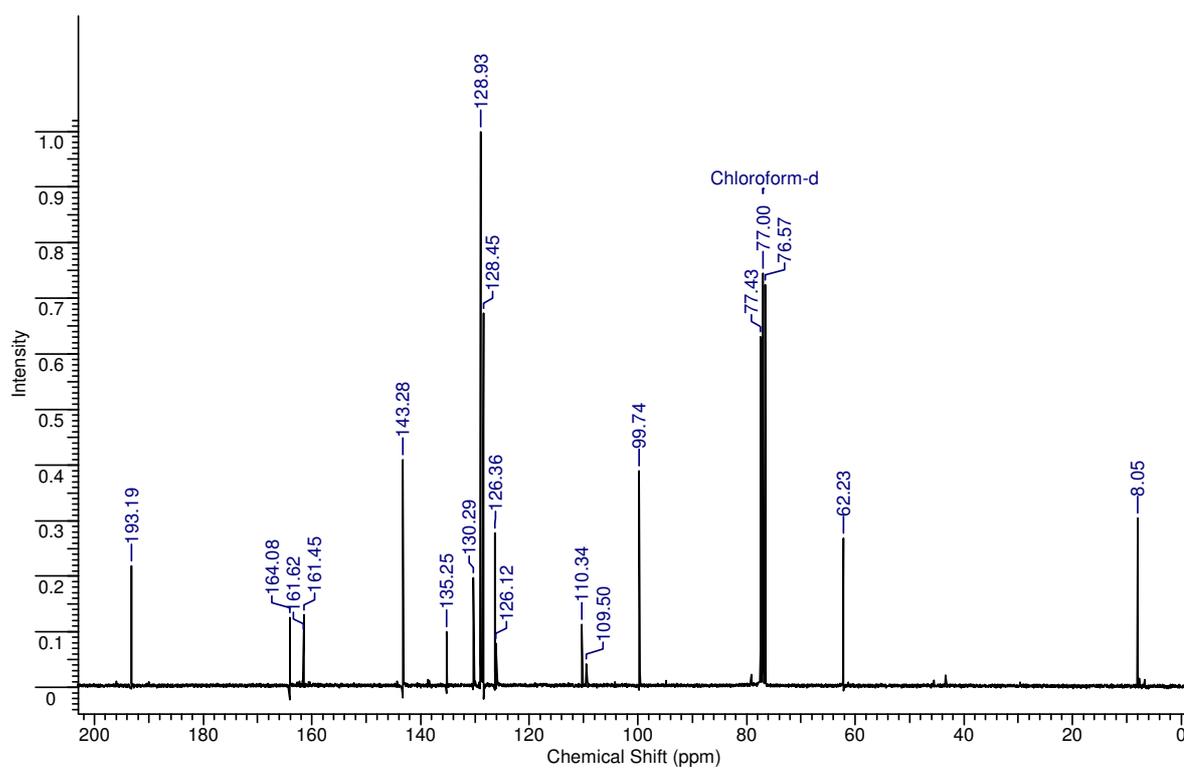
**Figura 15:** Estrutura da 2',4'-dihidroxi-5'-metil-6'-metoxichalcona (**Cp2**).

**Tabela 4.** Deslocamentos químicos ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$  em ppm) da **Cp2**.

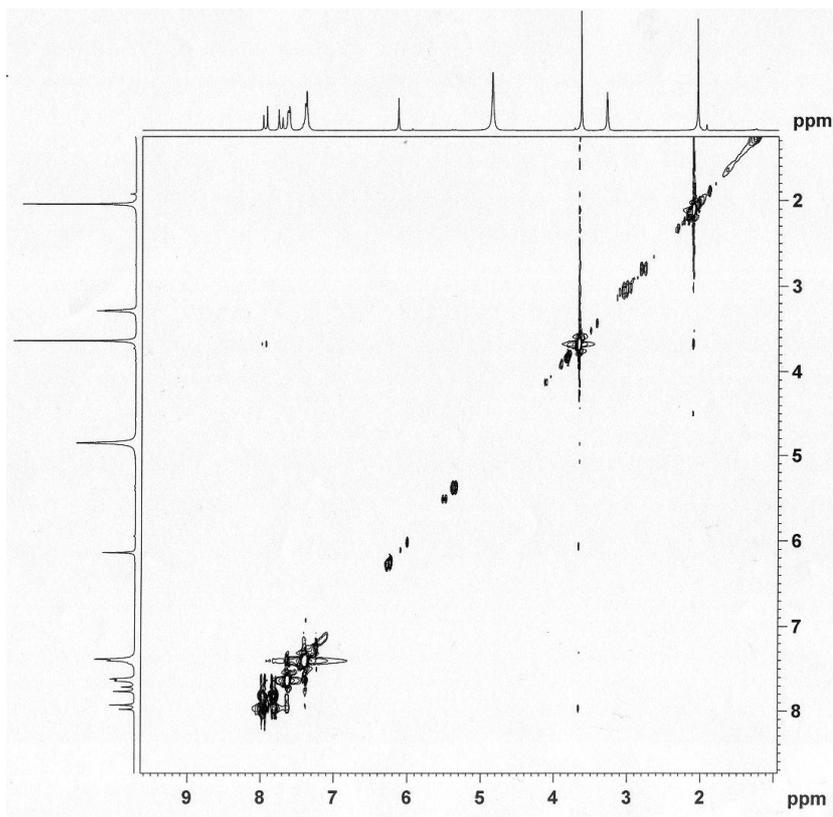
Posição	$\delta$ H (mult.; $J$ em Hz)	$\delta$ C
1	-	135,3
2	7,63 (m)	128,5
3	7,39 (m)	129,0
4	7,39 (m)	130,3
5	7,39 (m)	129,0
6	7,63 (m)	128,5
$\alpha$	7,96 (d; 15,0)	126,4
$\beta$	7,81 (d; 15,0)	143,3
1'	-	110,3
2'	-	164,1
3'	6,14 (s)	99,8
4'	-	161,6
5'	-	109,5
6'	-	161,5
OH-2'	13,40 (s)	-
CH <sub>3</sub> -5'	2,10 (s)	8,1
OCH <sub>3</sub> -6'	3,66 (s)	62,2
CO	-	193,2



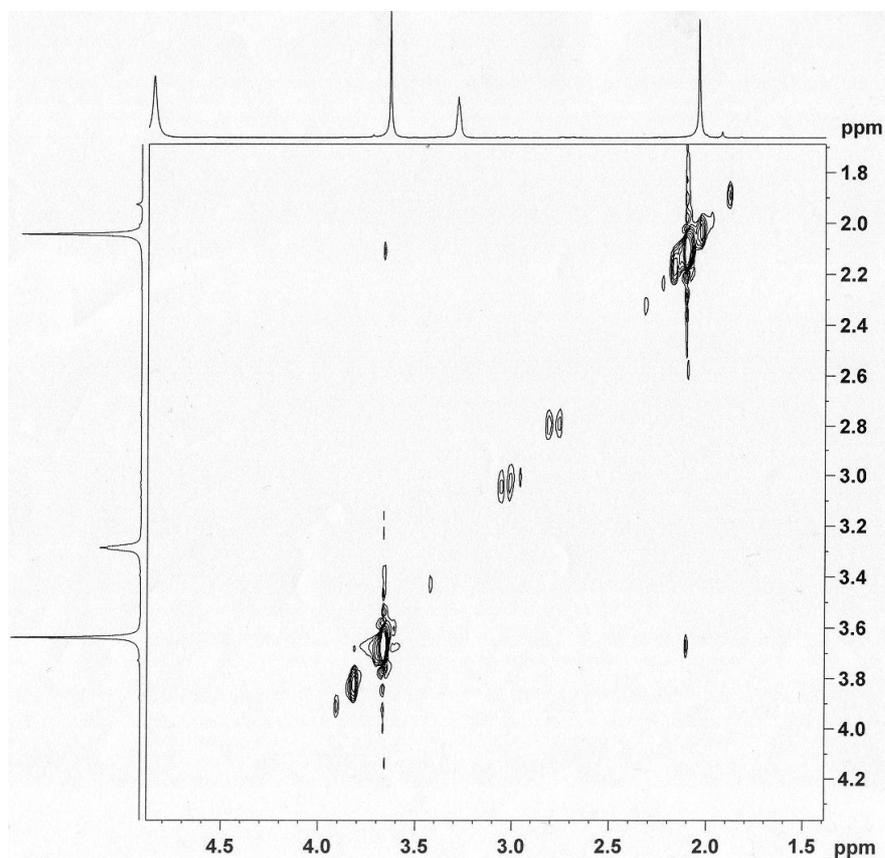
**Figura 16.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da **Cp2** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$ ).



**Figura 17.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **Cp2** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$ ).



**Figura 18.** Experimento NOESY 2D de **Cp2** (CDCl<sub>3</sub>, TMS,  $\delta$ ).



**Figura 19.** Ampliação do experimento NOESY 2D de **Cp2** (CDCl<sub>3</sub>, TMS,  $\delta$ ).

#### 4.1.2. Substâncias isoladas de *C. adamantium*

O extrato etanólico foi particionado em FButOH e FAq. Optou-se por iniciar o trabalho de investigação química com a FButOH, pelas condições de trabalho disponíveis. Dessa amostra foram isoladas a chalcona 2',4'-diidroxí-3'-metil-6'-metoxichalcona (**Ca2**) e as flavanonas 5,7-diidroxí-6-metilflavanona (**Ca1**), 5,7-diidroxí-8-metilflavanona (**Ca3**) e 7-hidroxí-6-metil-5-metoxiflavanona (**Ca4**). As estruturas destes flavonóides foram elucidadas pela interpretação dos dados de ressonância magnética nuclear e por comparação destes com os disponíveis na literatura.

O grupo 48 da coluna SBut (proveniente da FButOH) apresentou-se com aspecto oleoso e por isso foi analisado utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (item 3.6.2.). Dessa fração puderam ser identificadas seis substâncias de um total de treze compostos detectados por CG-EM.

A descrição do processo de elucidação estrutural dos flavonóides isolados da FButOH e a identificação dos componentes do grupo 48 da coluna SBut serão apresentados a seguir.

##### 4.1.2.1. Identificação estrutural de **Ca2**

A substância **Ca2** apresentou espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $135^\circ$  muito semelhantes ao da substância **Cp2**. Por isso, resolvemos começar a elucidação estrutural por ela. Por CCDC verifica-se que as substâncias são realmente diferentes, pois apresentam  $R_f$  distintos no mesmo eluente. Sua estrutura está mostrada na Figura 20 (pág. 34).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **Ca2** (Figura 21, pág. 35) apresentou multipletos entre  $\delta$  7,42 e  $\delta$  7,78 caracterizando o anel B mono substituído. Dois dubletos, em  $\delta$  7,76 (H- $\beta$ ) e  $\delta$  8,00 (H- $\alpha$ ), com  $J = 15$  Hz, indicaram a presença da dupla ligação *trans*-disubstituída. Um singleto em  $\delta$  6,16 indicou a presença de um hidrogênio aromático. Os singletos em  $\delta$  14,49,  $\delta$  3,93 e  $\delta$  2,00 foram atribuídos à hidroxila fenólica, uma metoxila e uma metila aromática, respectivamente, todas ligadas ao anel A.

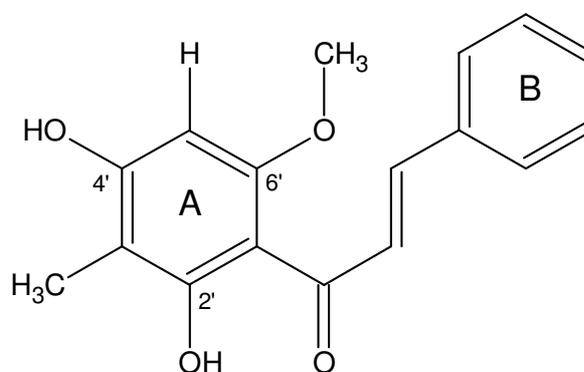
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 22, pág. 36) apresentou o sinal da carbonila em  $\delta$  192,4. Os sinais em  $\delta$  6,6 e  $\delta$  55,3 foram atribuídos à metila e à metoxila, respectivamente. Os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  apresentaram  $\delta$  127,9 e 141,5, respectivamente. Os sinais para carbonos aromáticos do anel B apresentaram valores para C-2/C-6 e C-3/C-5 em  $\delta$  128,9 e  $\delta$  128,3 respectivamente. O espectro também forneceu sinais atribuídos ao C-1 em  $\delta$  135,7 e ao C-4 em  $\delta$  130,0. O espectro de DEPT  $135^\circ$  (Figura 23, pág. 36) apresentou na região de

aromáticos os sinais dos carbonos C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6 do anel B e mais um sinal, em  $\delta$  90,7, que foi atribuído ao carbono não substituído no anel A.

A localização da metoxila no anel A foi confirmada com base no experimento NOESY 2D (Figuras 24 e 25, pág. 37). No experimento obtido observou-se apenas uma correlação entre os hidrogênios da metoxila ( $\delta$  3,93) e o hidrogênio do anel A ( $\delta$  6,15). Essa informação mostra que o hidrogênio aromático é vizinho ao carbono ao qual a metoxila está ligada. Caso a metoxila estivesse ligada no carbono 4' correlações entre a metoxila e a metila e entre a metoxila e o hidrogênio aromático do anel A seriam observadas. No entanto não foram verificadas essas correlações.

A atribuição dos deslocamentos químicos para os carbonos foi baseada nas outras substâncias identificadas anteriormente e em dados da literatura (MUSTAFA, 2005). A Tabela 5 (pág. 35) traz as atribuições dos deslocamentos químicos para a **Ca2**.

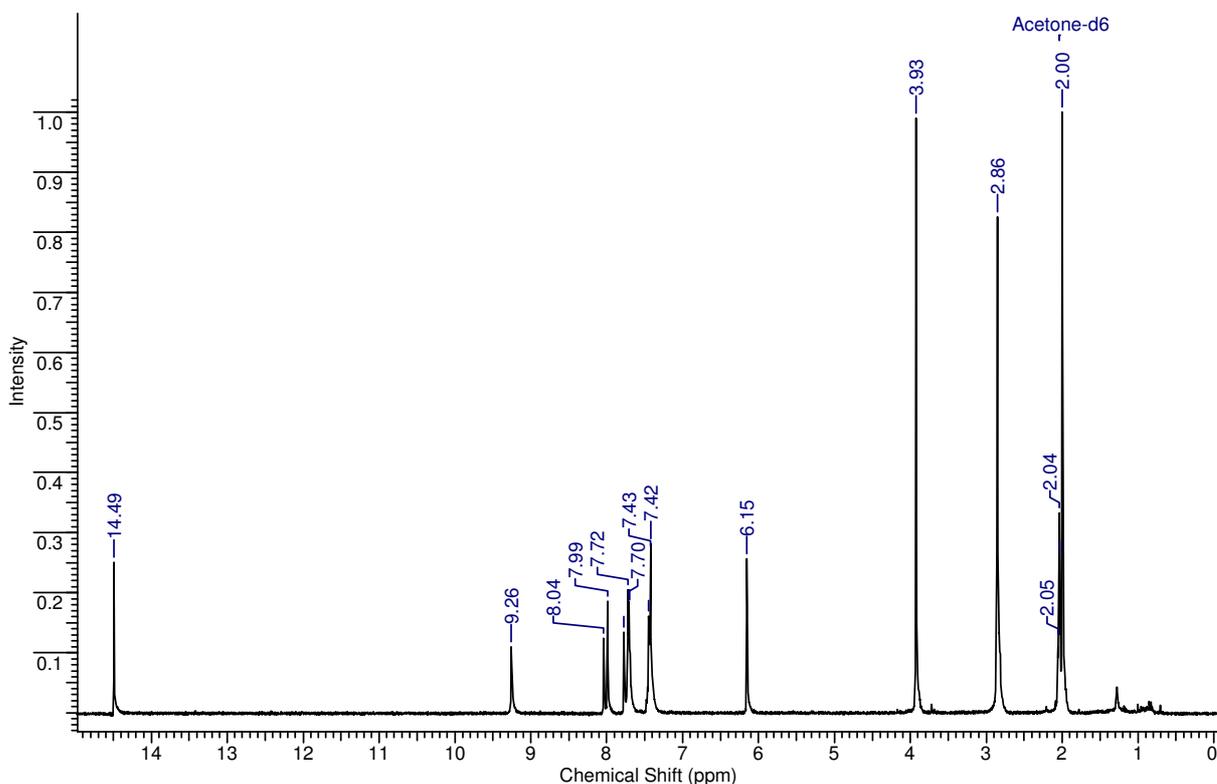
Sugere-se com base nesses dados que a substância **Ca2** seja a 2',4'-diidroxil-3'-metil-6'-metoxichalcona (MUSTAFA *et al*, 2005). Seu nome sistemático é (2E)-1-(2,4-diidroxil-3-metil-6-metoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona.



**Figura 20.** Estrutura da 2',4'-diidroxil-3'-metil-6'-metoxichalcona (**Ca2**).

**Tabela 5.** Deslocamentos químicos ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$  em ppm) da **Ca2** comparados aos da literatura (MUSTAFA, 2005).

Posição	Ca2		Dados da literatura	
	$\delta$ H (mult.; J em Hz)	$\delta$ C	$\delta$ H (mult.; J em Hz)	$\delta$ C
1	-	135,7	-	137,2
2	7,70 (m)	128,3	7,72 (m)	130,5
3	7,43 (m)	128,9	7,43 (m)	129,8
4	7,43 (m)	130,0	7,43 (m)	131,6
5	7,43 (m)	128,9	7,43 (m)	129,8
6	7,70 (m)	128,3	7,72 (m)	130,5
$\alpha$	7,99 (d; 15,0)	127,9	8,02 (d; 15,5)	129,4
$\beta$	7,74 (d; 15,0)	141,5	7,75 (d; 15,5)	143,0
1'	-	105,3	-	106,8
2'	-	164,1	-	167,3
3'	-	103,7	-	105,2
4'	-	161,6	-	164,4
5'	6,15 (s)	90,7	6,21 (s)	92,4
6'	-	161,5	-	162,6
OH-2'	14,49(s)	-	14,50 (s)	-
OH-4'	9,24 (s)	-	9,60 (s)	-
CH <sub>3</sub> -5'	1,94 (s)	6,6	2,00 (s)	8,2
OCH <sub>3</sub> -6'	3,93 (s)	55,3	3,94 (s)	56,9
CO	-	193,2	-	193,9

**Figura 21.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para a substância **Ca2** (300 MHz, acetona-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$ )

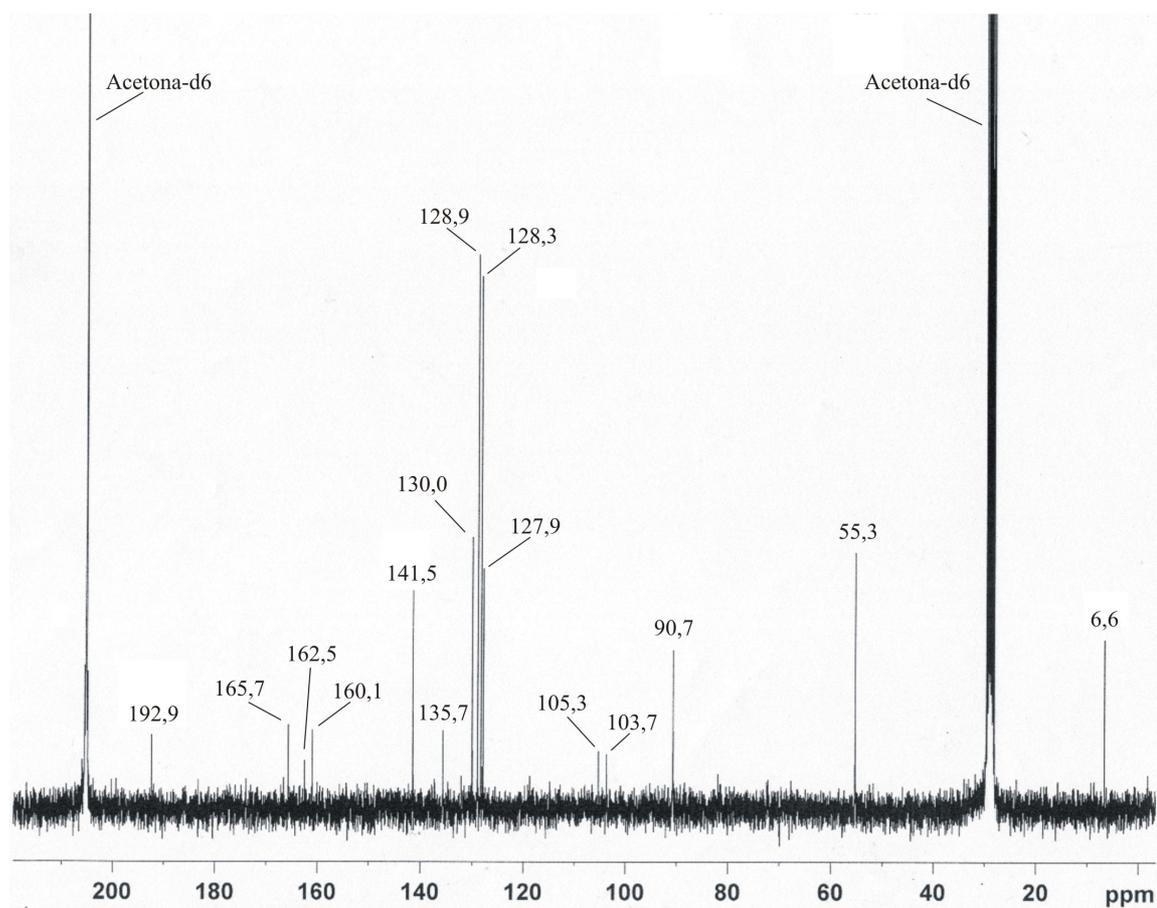


Figura 22. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para a substância **Ca2** (75 MHz, acetona-d6, TMS,  $\delta$ ).

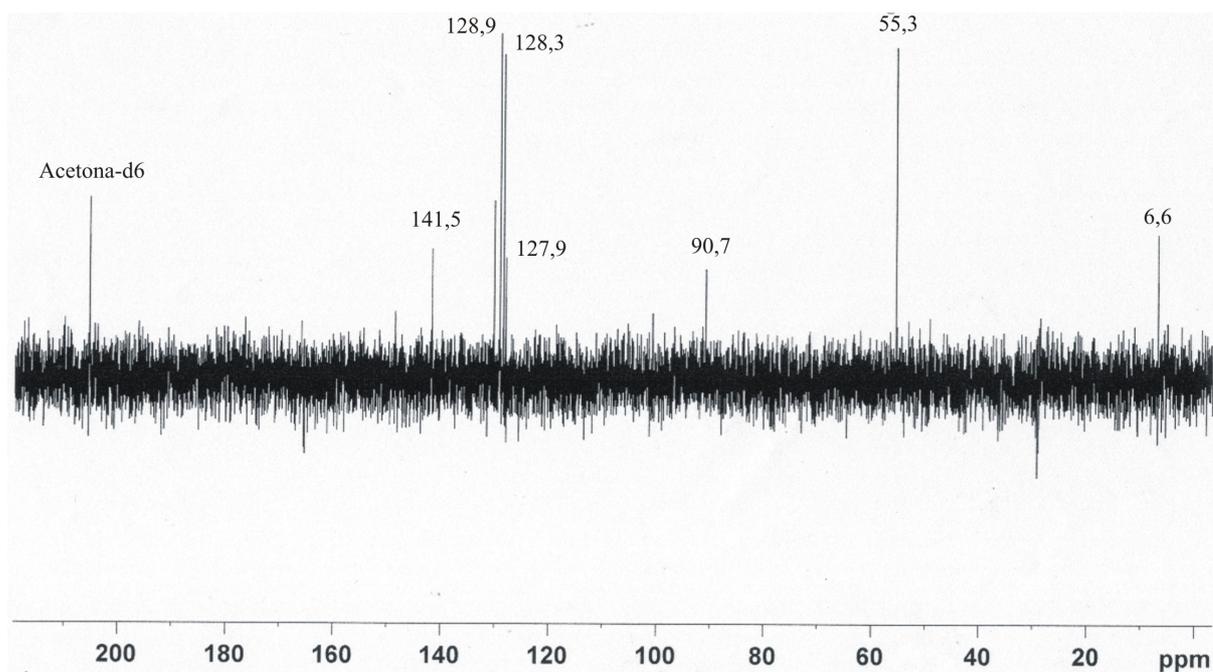
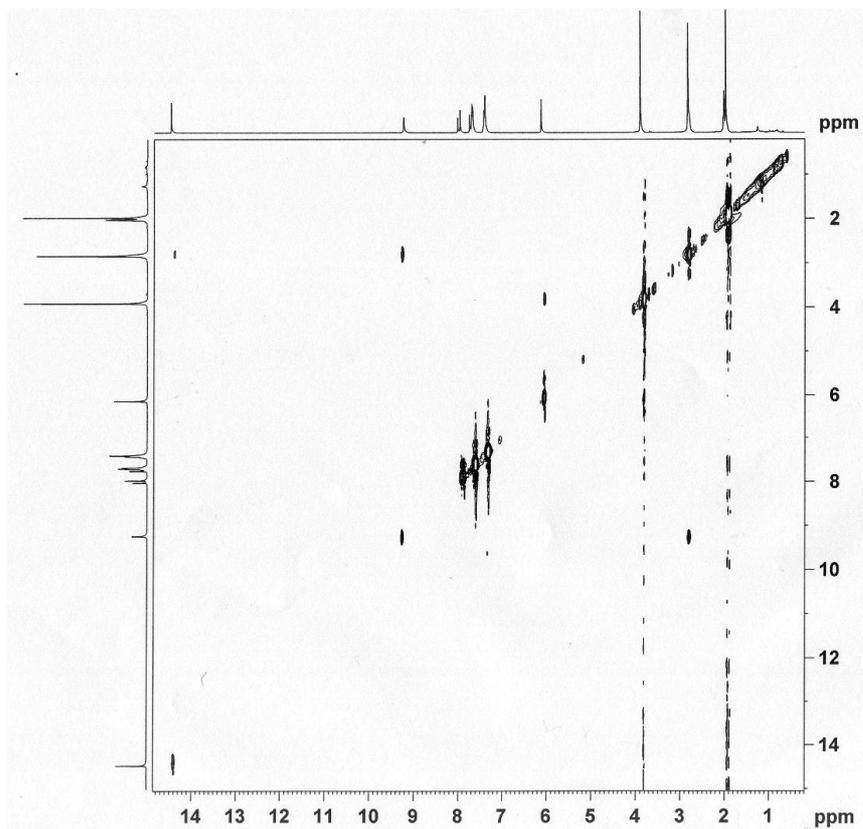
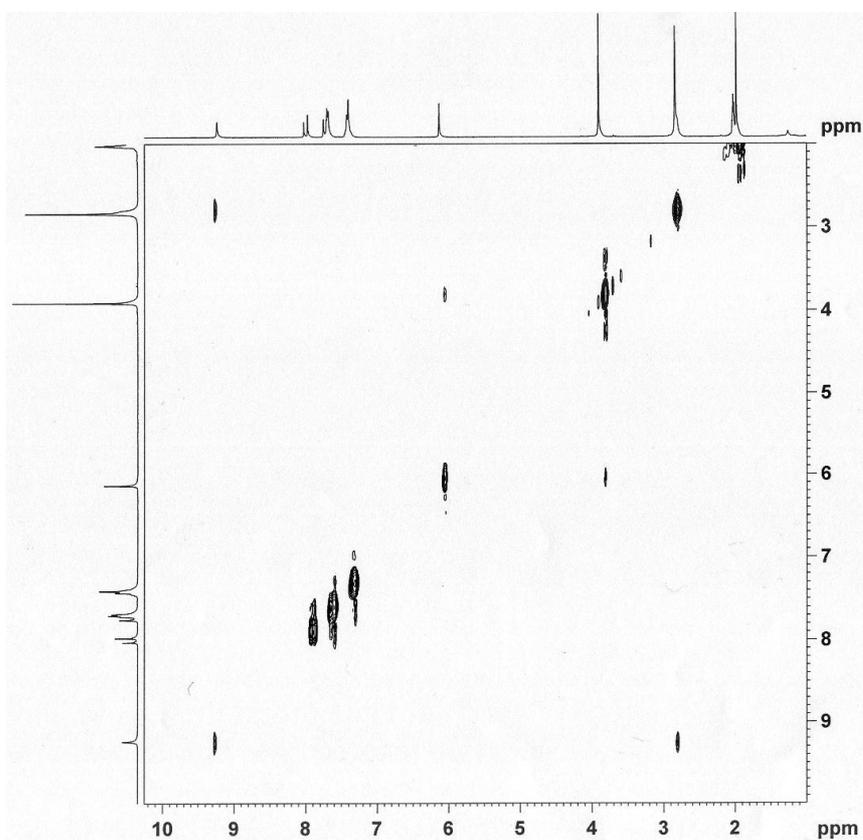


Figura 23. Espectro de DEPT  $135^\circ$  para a substância **Ca2** (75 MHz, acetona-d6, TMS,  $\delta$ ).



**Figura 24.** Experimento NOESY 2D de **Ca2** (CDCl<sub>3</sub>, TMS,  $\delta$ ).



**Figura 25.** Ampliação do experimento NOESY 2D de **Ca2** (CDCl<sub>3</sub>, TMS,  $\delta$ ).

#### 4.1.2.2. Identificação estrutural de **Ca1**

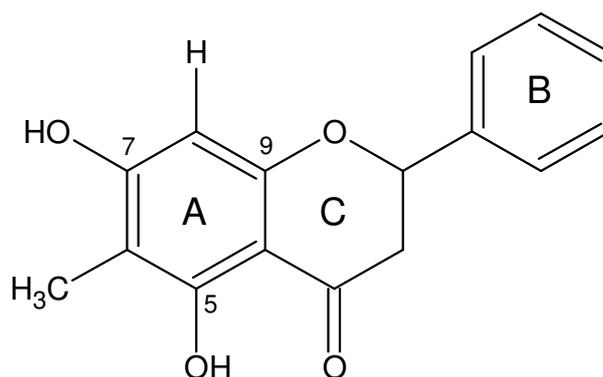
A estrutura proposta para a **Ca1** é dada na Figura 26 (pág. 39).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 27, pág. 40) dessa substância apresentou sinais característicos de flavanonas. Os três duplos-dubletos, referentes aos hidrogênios equatorial e axial ligados ao carbono 3 e ao hidrogênio ligado ao carbono 2, tiveram deslocamentos em  $\delta$  2,77 (H-3 equatorial,  $J = 3,0$  e  $18,0$  Hz),  $\delta$  3,13 (H-3 axial,  $J = 12,0$  e  $18,0$  Hz) e  $\delta$  5,52 (H-2,  $J = 3,0$  e  $12,0$  Hz), respectivamente. Observou-se também singletos para uma metila ( $\delta$  1,97), um hidrogênio aromático ( $\delta$  6,07), uma hidroxila fenólica com ligação de hidrogênio ( $\delta$  12,42) e outro sinal em  $\delta$  9,62 atribuído à hidroxila ligada ao carbono 7. Os multipletos entre  $\delta$  7,33 e  $\delta$  7,55 foram atribuídos aos cinco hidrogênios do anel B.

Os sinais em  $\delta$  42,9 (C-3),  $\delta$  79,0 (C-2) e  $\delta$  196,0 (C-4) no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 28, pág. 40) confirmam o esqueleto de uma flavanona. O espectro de DEPT  $135^\circ$  (Figura 29, pág. 41) confirma o sinal em  $\delta$  42,8 como um  $\text{CH}_2$ . O sinal em  $\delta$  6,1 refere-se a uma metila e  $\delta$  94,3 a um grupo metino aromático (C-8). As presenças da metila e do hidrogênio aromático sugeriram um padrão de substituição no anel A semelhante ao das substâncias **Cp2** e **Ca2**.

A posição da metila no anel A pôde ser confirmada com a análise do experimento de HMBC (Figuras 30 e 31, pág. 41 e 42). O experimento revelou correlações entre os hidrogênios da metila ( $\delta$  1,97) e o carbono em  $\delta$  104,0 (indicando o carbono ao qual está ligada essa metila), entre o hidrogênio da hidroxila do carbono 5 e o sinal de carbono em  $\delta$  161,6 (indicando que este é o sinal do carbono 5), entre os hidrogênios da metila e os carbonos 5 ( $\delta$  161,6) e 7 ( $\delta$  164,0). O hidrogênio aromático do anel A apresentou correlação com os sinais dos carbonos em  $\delta$  160,7 e 164,0. Analisando esses dados, concluiu-se que a metila está ligada no carbono 6 e o hidrogênio aromático ligado ao carbono 8.

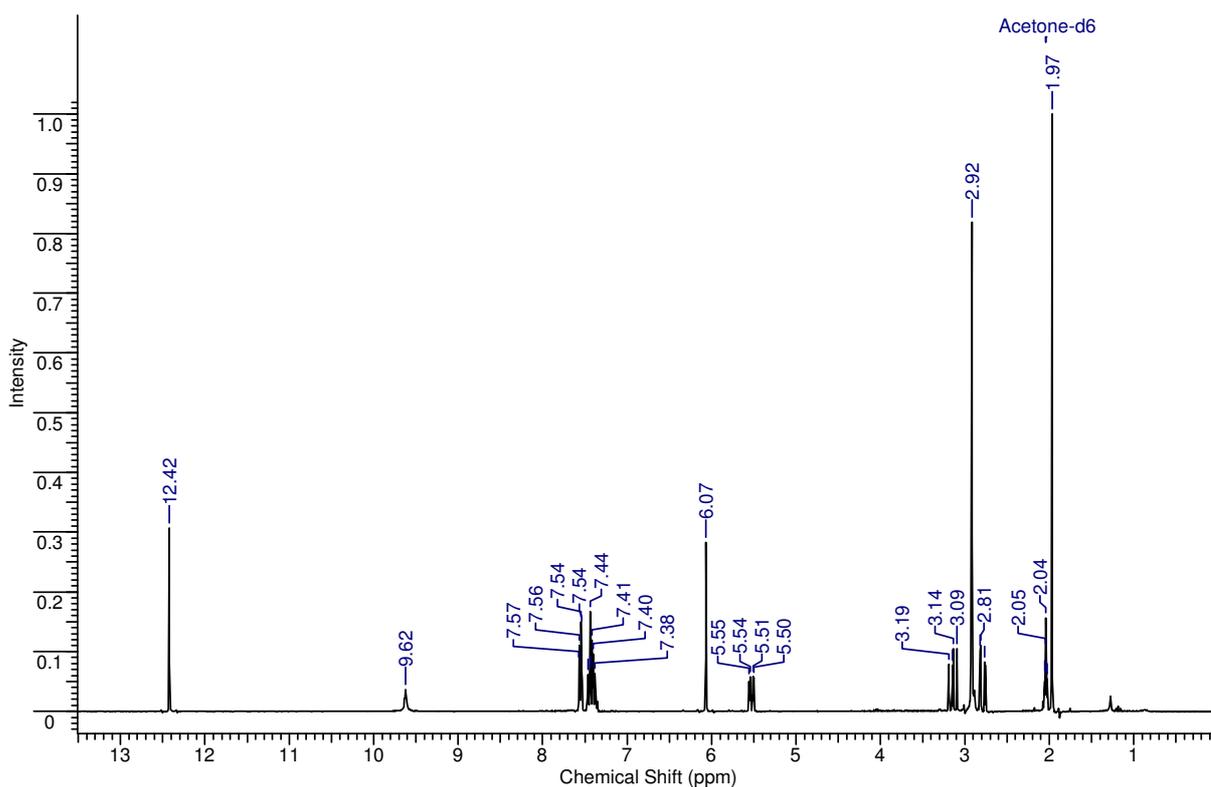
Sendo assim, sugere-se que a substância **Ca1** seja a 5,7-diidroxil-6-metilflavanona (HIDEYUKI *et al*, 2004; PORTET *et al*, 2007). Seu nome sistemático é 5,7-diidroxil-6-metil-2-fenil-2,3-diidro-4*H*-cromen-4-ona. Os deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio são dados na Tabela 6 (pág. 39).



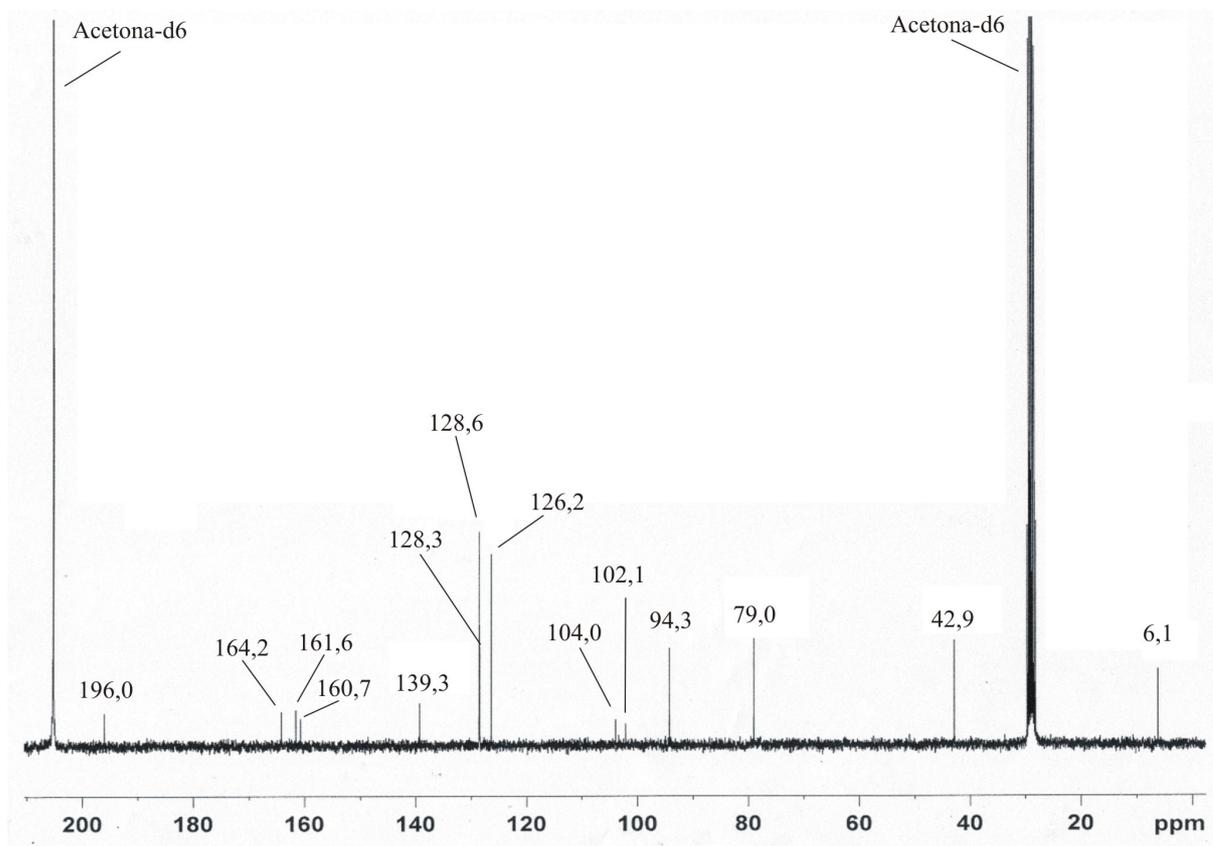
**Figura 26.** Estrutura da 5,7-diidroxi-6-metilflavanona (**Ca1**).

**Tabela 6.** Deslocamentos químicos ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$  em ppm) da **Ca1**.

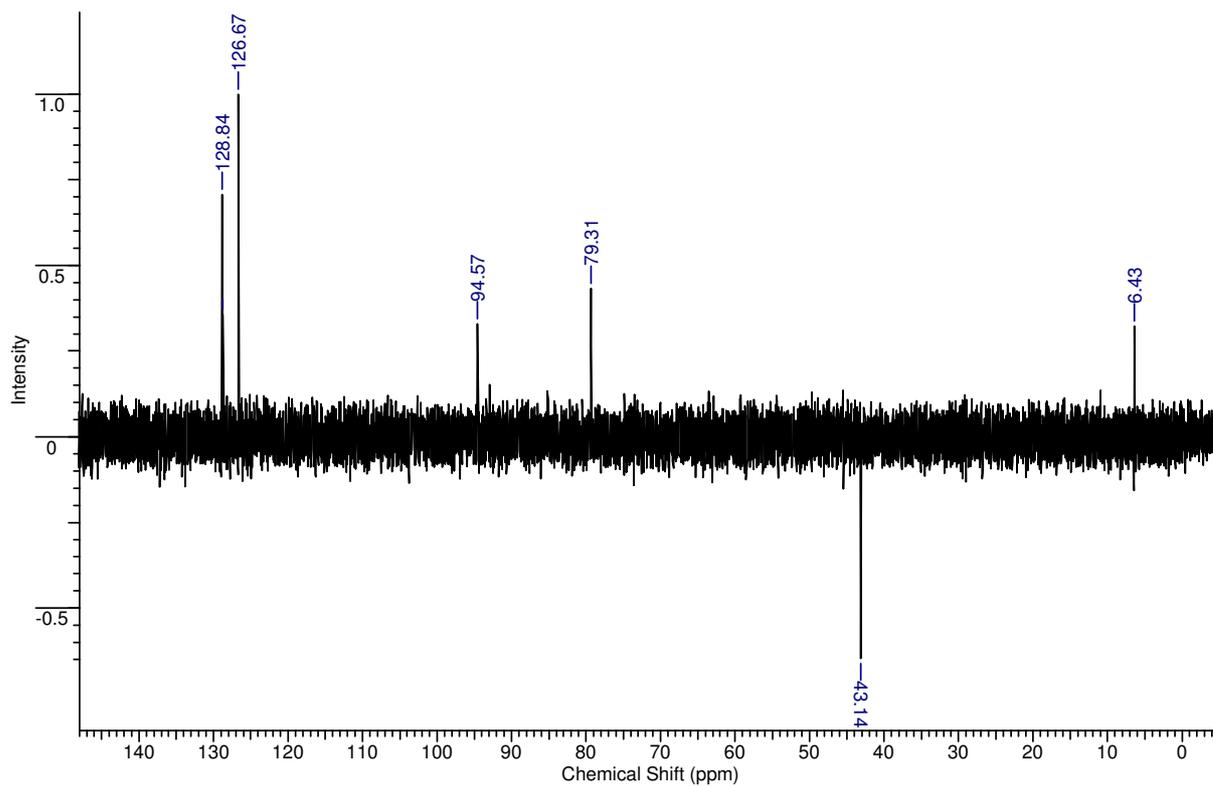
Posição	$\delta$ H (mult.; J em Hz)	$\delta$ C
1'	-	139,1
2'	7,53 (m)	126,4
3'	7,38 (m)	128,5
4'	7,38 (m)	128,6
5'	7,38 (m)	128,5
6'	7,53 (m)	126,4
2	-	79,0
3	-	42,9
4	-	196,0
5	-	161,6
6	-	104,0
7	-	164,4
8	6,07 (s)	94,3
9	-	160,7
10	-	102,1
H-2	5,52 (dd; 3,0 e 12,0)	-
H-3 ax.	3,13 (dd; 12,0 e 18,0)	-
H-3 eq.	2,77 (dd; 3,0 e 18,0)	-
OH-5	12,42(s)	-
OH-7	9,62(s)	-
CH <sub>3</sub> -6	1,97 (s)	6,1



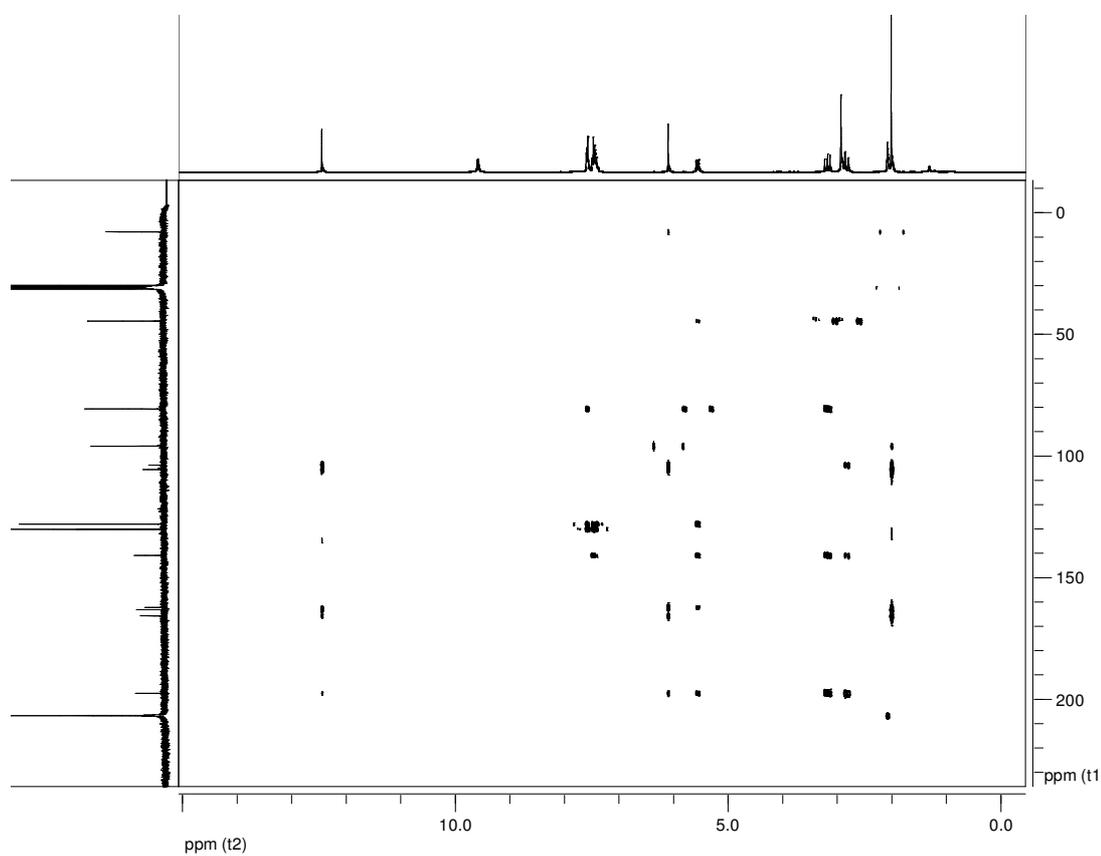
**Figura 27** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para a substância **Ca1** (300 MHz, acetona-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$ ).



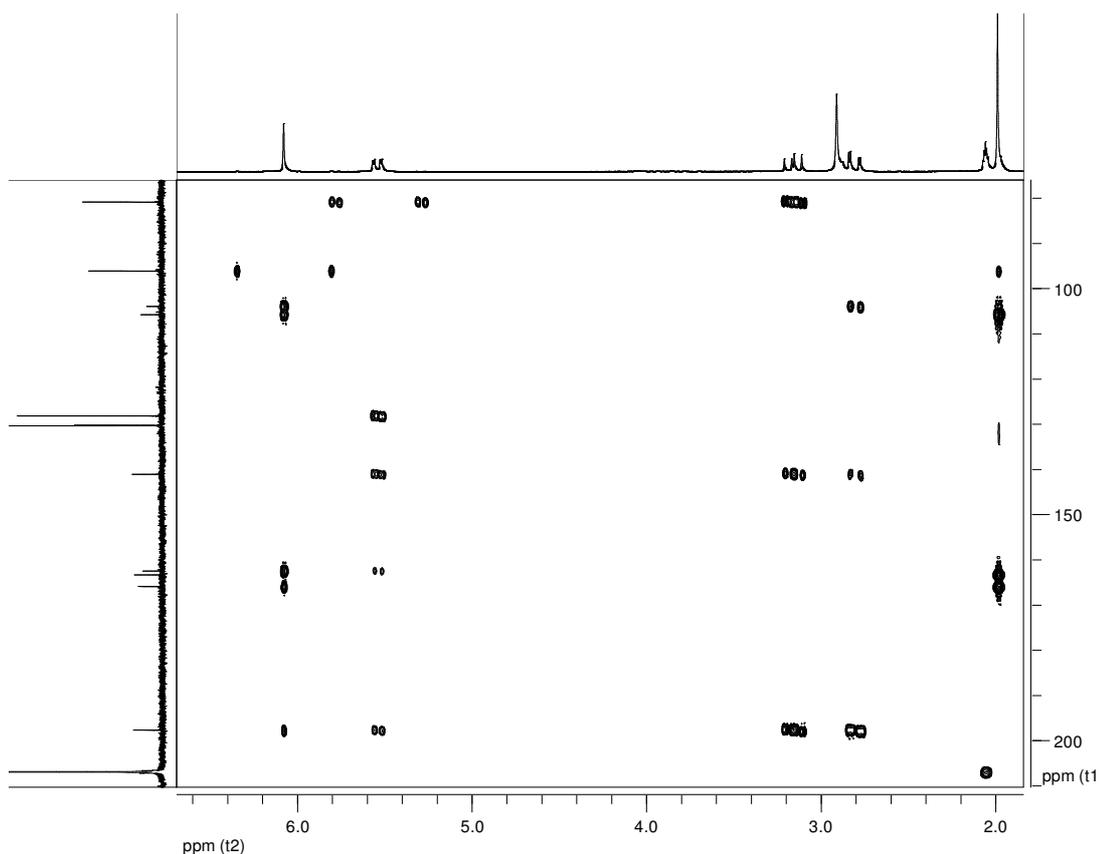
**Figura 28.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para a substância **Ca1** (75 MHz, acetona-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$ ).



**Figura 29.** Espectro de DEPT 135° para a substância **Ca1** (75 MHz, acetona-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$ ).



**Figura 30.** Experimento de HMBC para a substância **Ca1** (acetona-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$ ).



**Figura 31.** Ampliação do experimento de HMBC da substância **Ca1** (acetona-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$ ).

#### 4.1.2.3. Identificação estrutural de **Ca3**

A estrutura proposta para a **Ca3** é dada na Figura 32 (pág. 43).

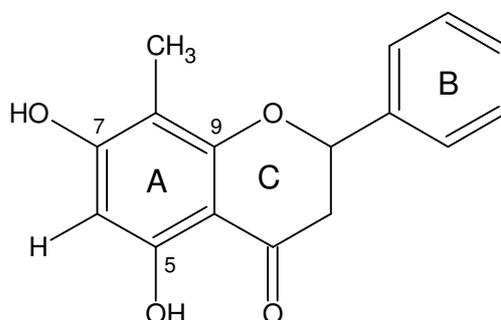
O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 33, pág. 44) dessa substância foi muito parecido ao da substância **Ca1**. Apresentou os duplos-dubletos em  $\delta$  2,83 (H-3 equatorial,  $J = 3,0$  e  $18,0$  Hz), 3,10 (H-3 axial,  $J = 12,0$  e  $18,0$  Hz) e 5,56 (H-2,  $J = 3,0$  e  $12,0$  Hz). Singletos para a metila em  $\delta$  1,97, um hidrogênio aromático em  $\delta$  6,02 e uma hidroxila fenólica em  $\delta$  12,10. Os multipletos entre  $\delta$  7,34 e  $\delta$  7,58 foram atribuídos aos cinco hidrogênios do anel B.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 34, pág. 44) de **Ca3** mostrou os sinais característicos de flavanonas em  $\delta$  42,6 (CH<sub>2</sub>, C-3),  $\delta$  78,7 (C-2) e  $\delta$  196,3 (CO). Observaram-se também os sinais para a metila em  $\delta$  6,8 e para o metino aromático em  $\delta$  95,4. Além dos outros sinais para os carbonos do anel A ( $\delta$  102,3, C-10; 103,1, C-8; 160,1, C-9; 161,9, C-5 e 164,4, C-7) e dos carbonos do anel B ( $\delta$  126,2, C-2'/C-6'; 128,3, C-3'/C-5'; 128,6, C-4'; e 139,5, C-1').

A posição da metila no anel A também foi confirmada pela análise do experimento de HMBC (Figura 35 a 37, pág. 45 e 46). Esse experimento revelou correlações entre o hidrogênio da hidroxila em  $\delta$  12,10 e o metino aromático em  $\delta$  95,4 (C-6) e entre o hidrogênio

aromático em  $\delta$  6,02 e o carbono com  $\delta$  161,9. Este carbono em  $\delta$  161,9 apresentou uma correlação com o hidrogênio da hidroxila, indicando ser o carbono 5. Os hidrogênios da metila apresentaram correlação com o carbono em  $\delta$  103,1 (C-8) e com os carbonos em  $\delta$  160,1 (C-9) e  $\delta$  164,4 (C-7). Com base nessas informações concluiu-se que o hidrogênio está ligado ao carbono 6 ( $\delta$  95,4) e a metila ligada no carbono 8 ( $\delta$  103,1).

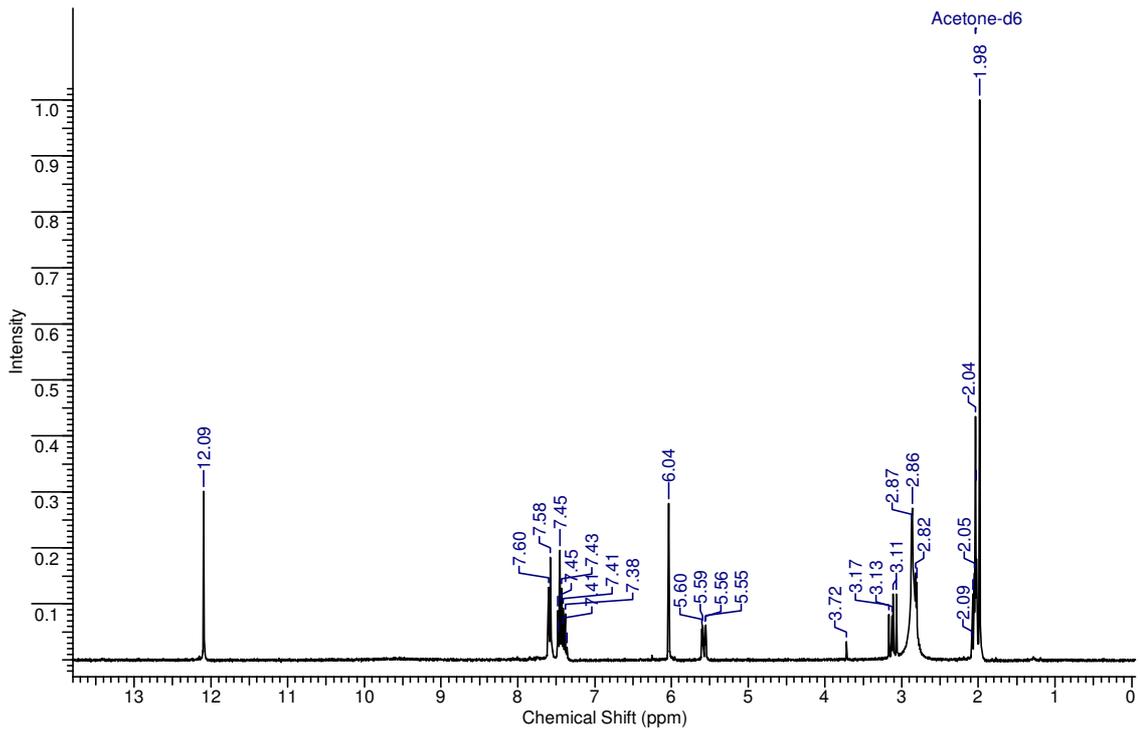
Assim, sugere-se que a substância **Ca3** seja a 5,7-diidroxi-8-metilflavanona, conhecida como criptostrobina (HIDEYUKI *et al*, 2004). Seu nome sistemático é 5,7-diidroxi-8-metil-2-fenil-2,3-diidro-4*H*-cromen-4-ona. Os deslocamentos químicos foram atribuídos com base nos dados de HMBC e por comparação com as demais substâncias isoladas e são dados na Tabela 7.



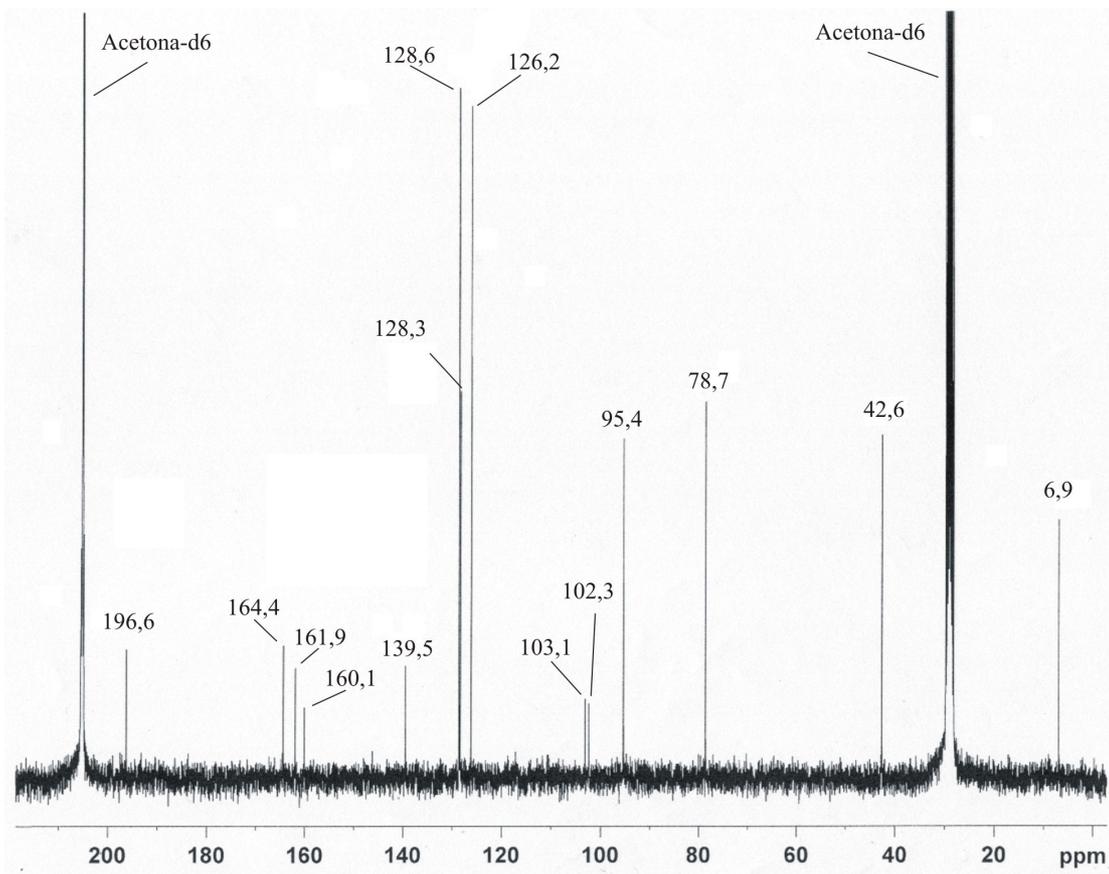
**Figura 32.** Estrutura de 5,7-diidroxi-8-metilflavanona (**Ca3**).

**Tabela 7** Deslocamentos químicos ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$  em ppm) da **Ca3**.

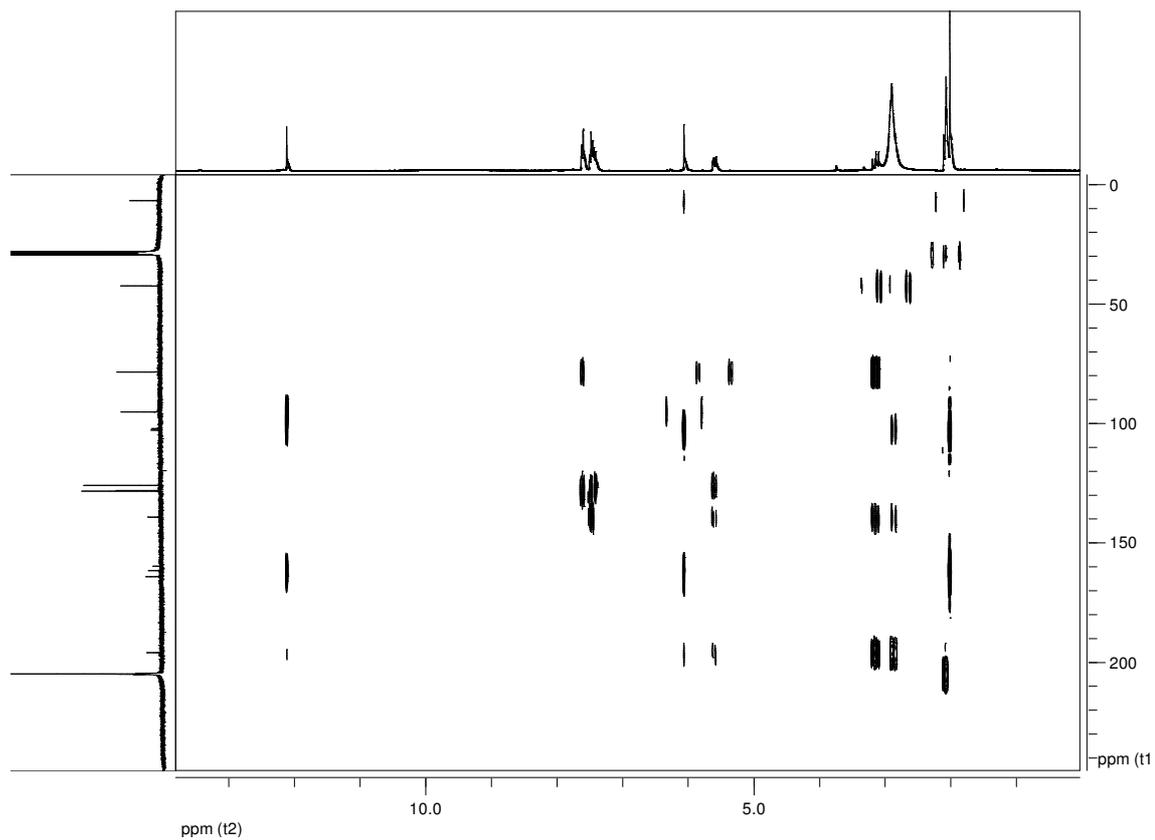
Posição	$\delta$ H (mult.; <i>J</i> em Hz)	$\delta$ C
1'	-	139,5
2'	7,57 (m)	126,2
3'	7,37 (m)	128,3
4'	7,37 (m)	128,6
5'	7,37 (m)	128,3
6'	7,57 (m)	126,2
2	-	78,7
3	-	42,6
4	-	196,3
5	-	161,9
6	-	95,4
7	-	164,4
8	-	103,1
9	-	160,1
10	-	102,3
H-2	5,56 (dd; 3,0 e 12,0)	-
H-3 ax.	3,10 (dd; 12,0 e 18,0)	-
H-3 eq.	2,82 (dd; 3,0 e 18,0)	-
OH-5	12,10(s)	-
CH <sub>3</sub> -8	1,97(s)	6,9



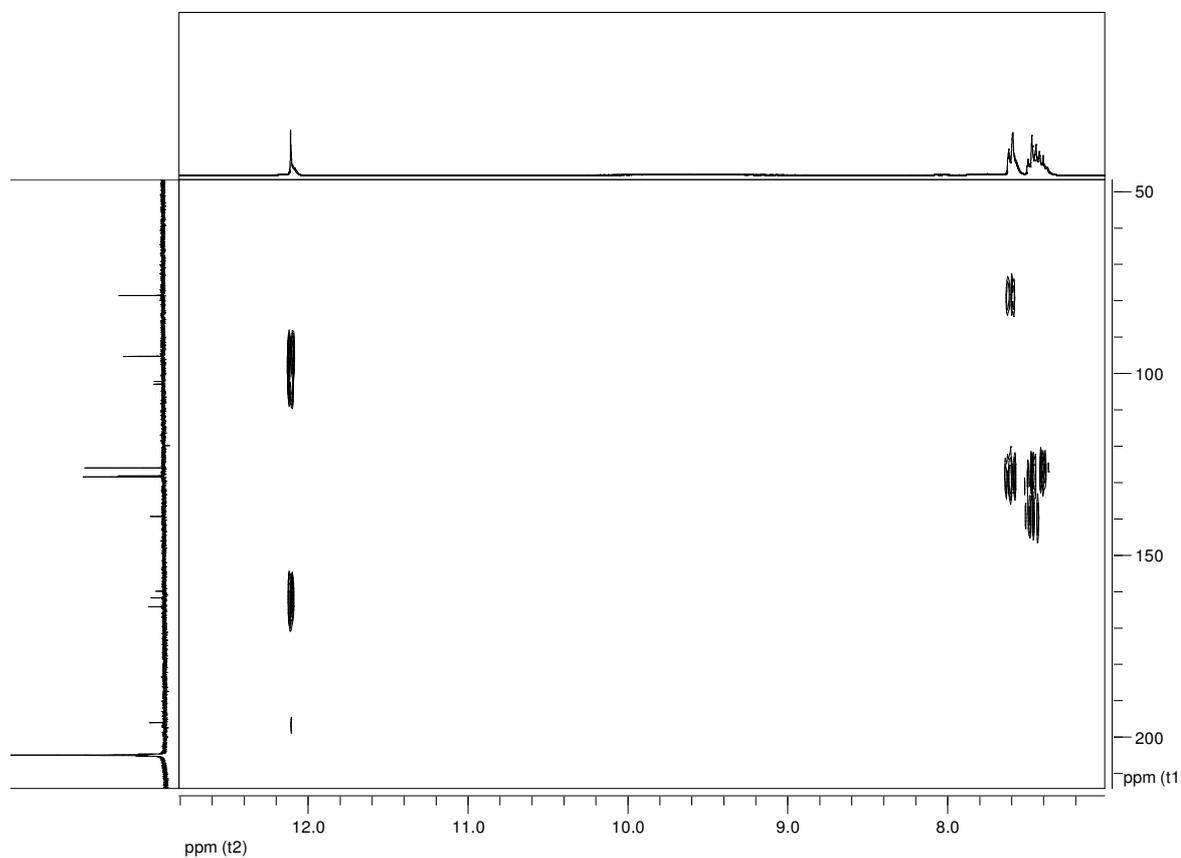
**Figura 33.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para a **Ca3** (300 MHz, acetona-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$ ).



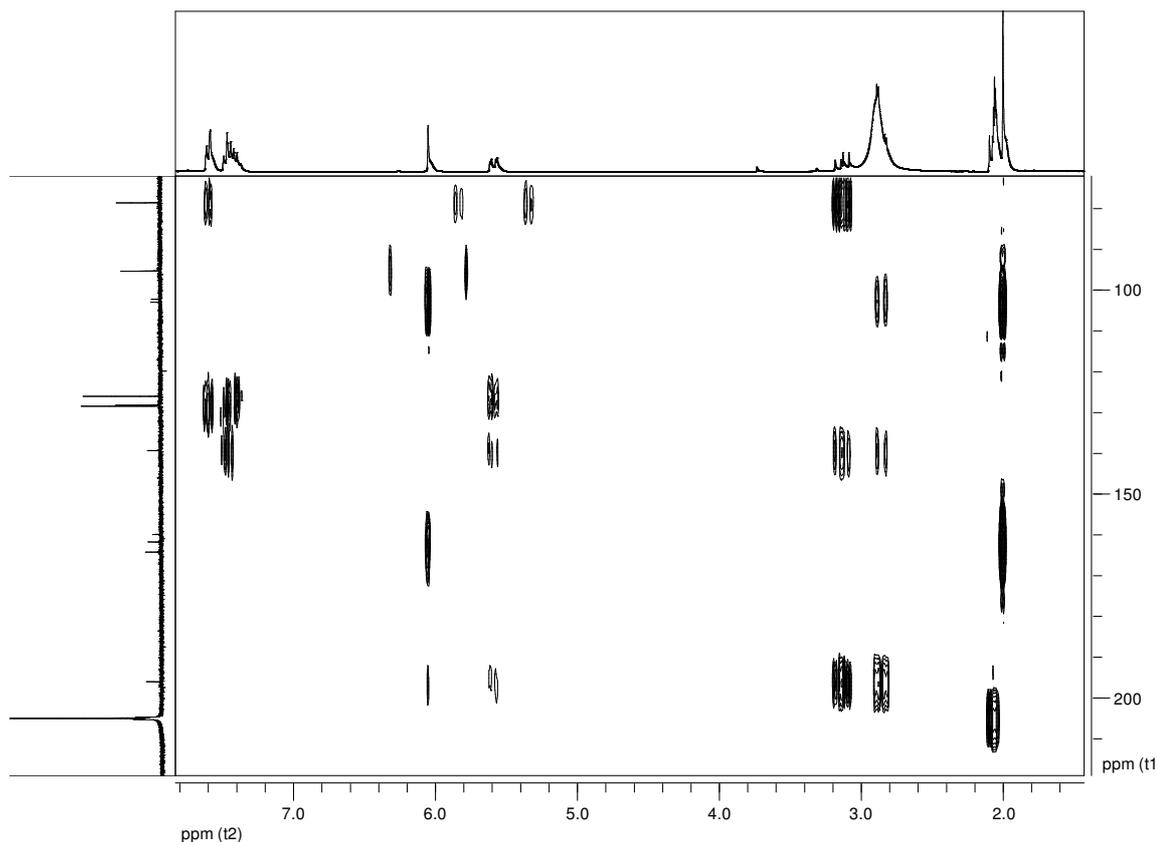
**Figura 34.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para a **Ca3** (75 MHz, acetona-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$ ).



**Figura 35.** Experimento de HMBC para a **Ca3** (acetona-d6, TMS,  $\delta$ ).



**Figura 36.** Ampliação do experimento de HMBC para a **Ca3** (acetona-d6, TMS,  $\delta$ ).



**Figura 37.** Ampliação do experimento de HMBC para a **Ca3** (acetona-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$ ).

#### 4.1.2.4. Identificação estrutural de **Ca4**

Essa substância foi isolada em forma cristalina como pode ser observado na Figura 38 (pág. 47). A sua estrutura é dada na Figura 39 (pág. 47).

Seu espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 40, pág. 48) mostrou os três duplos-dubletos característicos das flavanonas em  $\delta$  5,45 (H-2;  $J = 3$  e 12 Hz), 2,94 (H-3, axial;  $J = 3$  e 12 Hz) e 2,65 (H-3, equatorial;  $J = 3$  e 12 Hz). Os singletos em  $\delta$  3,74,  $\delta$  6,31 e  $\delta$  9,44 foram atribuídos a uma metoxila, um hidrogênio aromático e uma hidroxila, respectivamente. Os multipletos que caracterizam o anel B não oxigenado apresentaram deslocamentos entre  $\delta$  7,32 e 7,54.

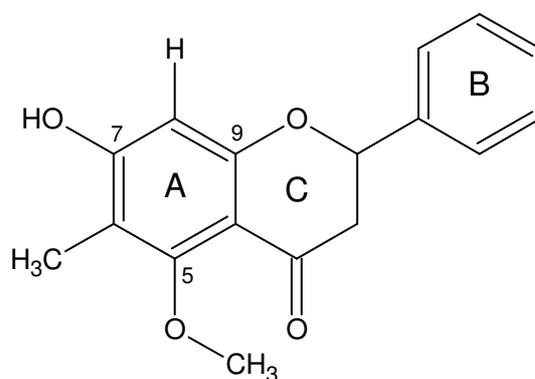
O espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 41, pág. 49) apresentou o sinal da carbonila em campo mais alto do que as outras substâncias ( $\delta$  187,6). Com isso concluiu-se que a metoxila estaria ligada no carbono 5. Os demais sinais do espectro confirmam o esqueleto de uma flavanona:  $\delta$  45,4 (CH<sub>2</sub>, C-3), 78,8 (C-2), sinais do anel B entre  $\delta$  126,3 e 139,6 e sinais do anel A entre 98,7-112,5 e 160,3-162,3. A metila apresentou sinal em  $\delta$  7,2 e a metoxila em  $\delta$  60,2.

A posição da metila foi confirmada após análise do experimento de HMBC (Figuras 42 a 44, pág. 49 e 50). Observou-se a uma única correlação dos hidrogênios da metoxila com o sinal de carbono em  $\delta$  160,3. Os hidrogênios da metila apresentaram correlação com dois carbonos, o de  $\delta$  112,5 (carbono ao qual a metila está ligada) e o de  $\delta$  160,3 (aquele ao qual a metoxila está ligada). Esses dados sugerem que a metila está ligada no carbono adjacente àquele que contém a metoxila.

Sendo assim a estrutura proposta para a substância **Ca4** é a da 7-hidroxi-6-metil-5-metoxiflavanona, conhecida também como comptonina. Seu nome sistemático é 2-fenil-7-hidroxi-6-metil-5-metoxi-2,3-diidro-4*H*-cromen-4-ona. Essa substância foi isolada pela primeira vez de *Comptonia peregrina* (WOLLENWEBER et al, 1985). A atribuição dos deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio está na Tabela 8 (pág. 48).



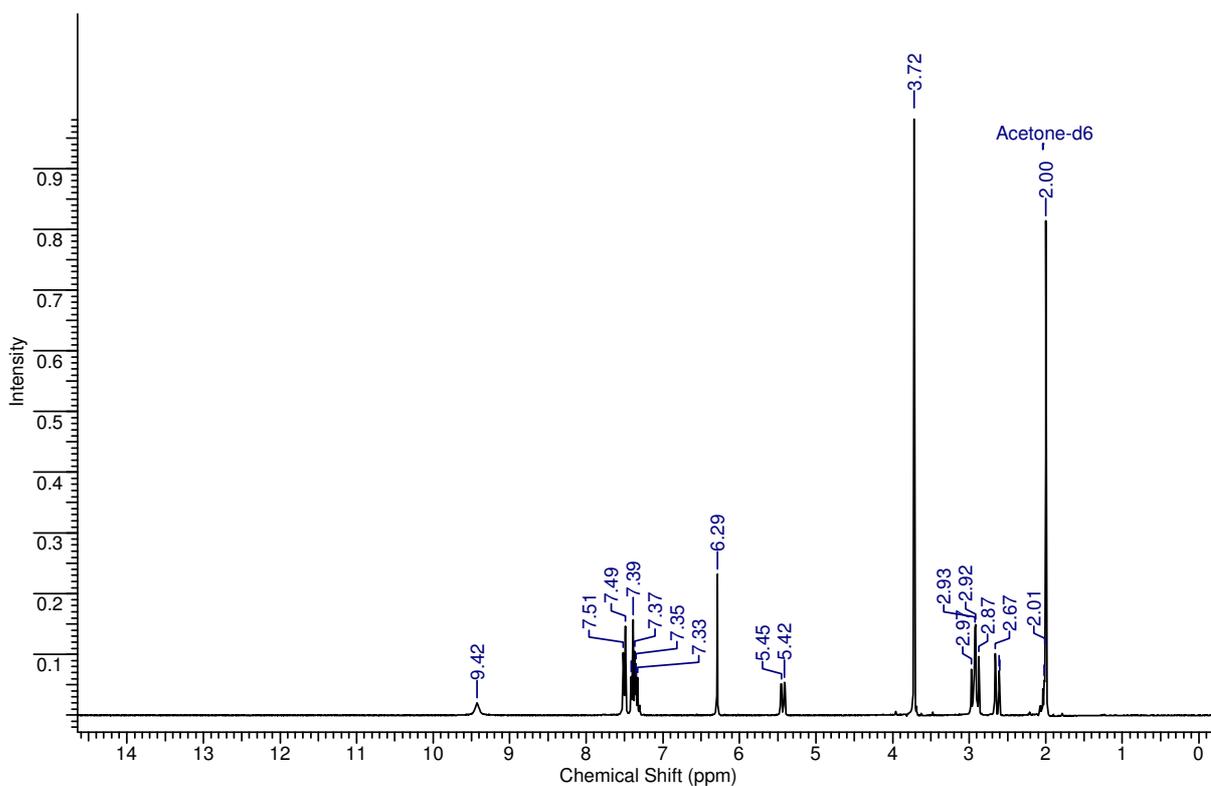
**Figura 38.** Cristais da substância **Ca4** dentro do frasco de coleta.

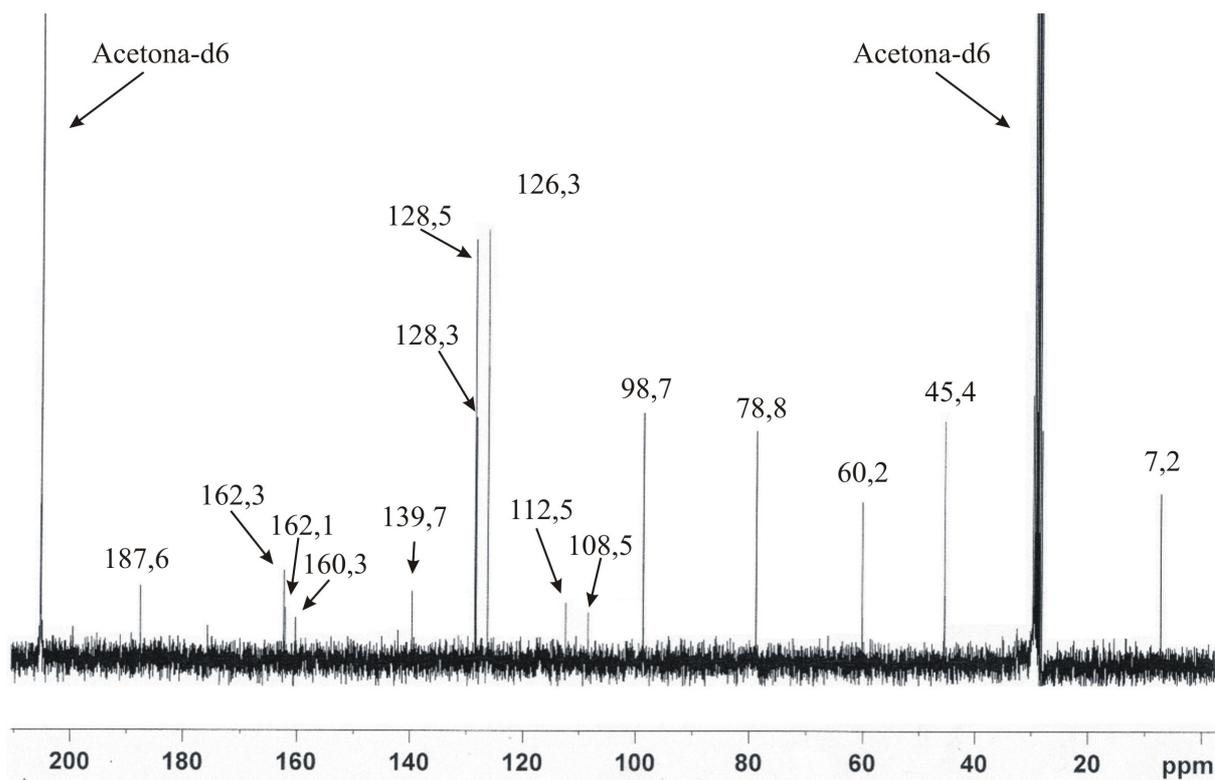


**Figura 39.** Estrutura da 7-hidroxi-6-metil-5-metoxiflavanona (**Ca4**).

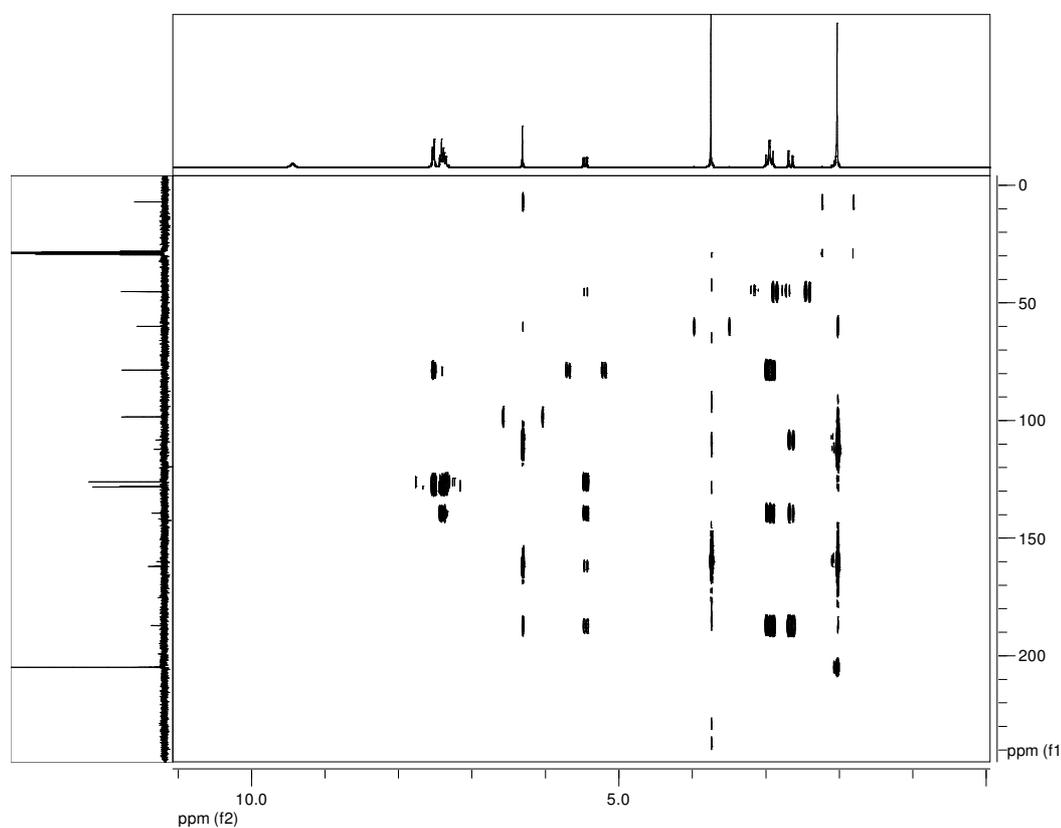
**Tabela 8.** Deslocamentos químicos ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$  em ppm) da **Ca4**.

Posição	$\delta$ H (mult.; J em Hz)	$\delta$ C
1'	-	139,7
2'	7,53 (m)	126,3
3'	7,37 (m)	128,3
4'	7,37 (m)	128,5
5'	7,37 (m)	128,3
6'	7,53 (m)	126,3
2	-	78,8
3	-	45,4
4	-	187,6
5	-	160,3
6	-	112,5
7	-	162,3
8	6,31 (s)	98,7
9	-	162,1
10	-	108,5
H-2	5,45 (dd; 3,0 e 12,0)	-
H-3 ax.	2,94 (dd; 12,0 e 18,0)	-
H-3 eq.	2,65 (dd; 3,0 e 18,0)	-
OH-7	9,44 (s)	-
CH <sub>3</sub> -8	2,02 (s)	7,2
OCH <sub>3</sub> -5	3,74 (s)	60,2

**Figura 40.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para a **Ca4** (300 MHz, acetona-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$ ).



**Figura 41.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para a **Ca4** (75 MHz, acetona-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$ ).



**Figura 42.** Experimento de HMBC para a **Ca4** (acetona-d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$ ).

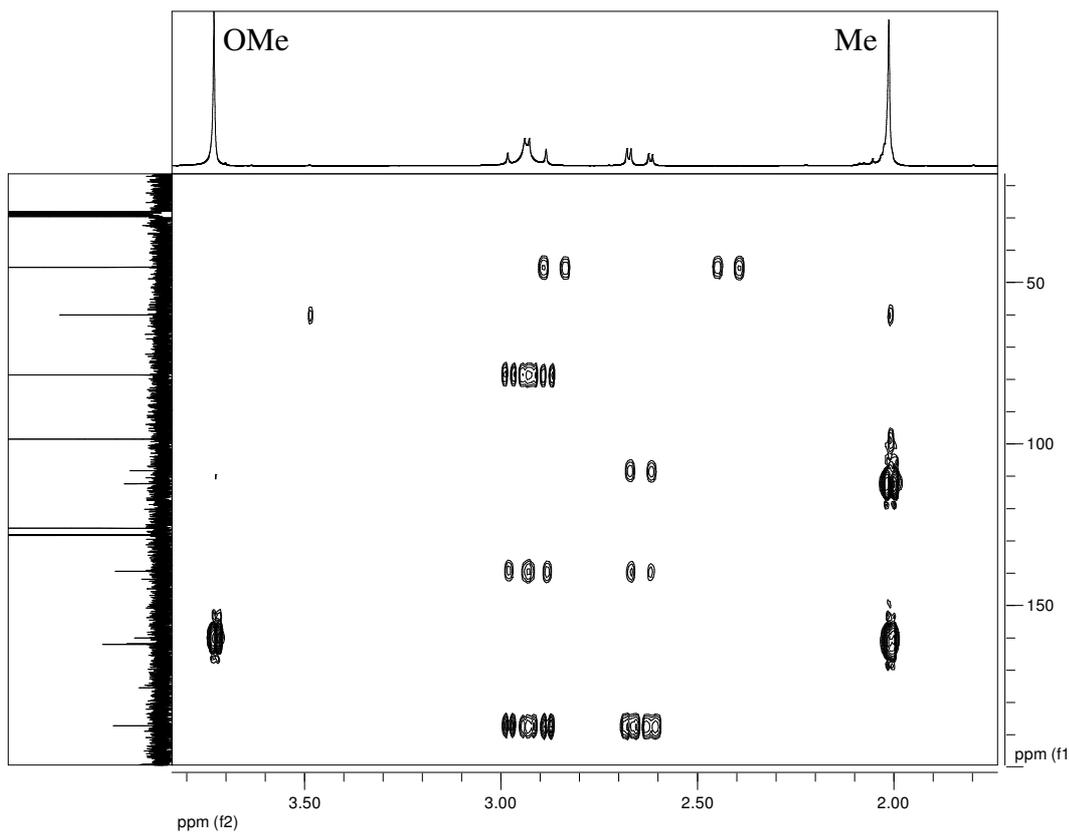


Figura 43. Ampliação do experimento de HMBC para a **Ca4** (acetona-d6, TMS,  $\delta$ ).

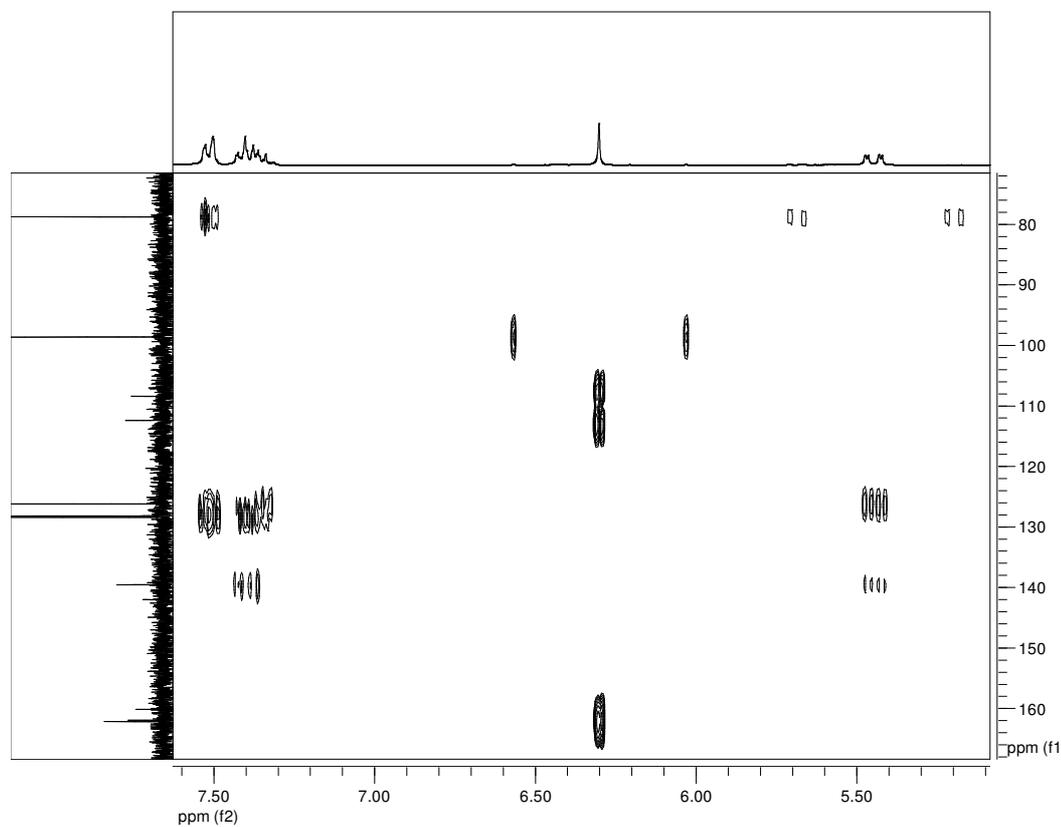
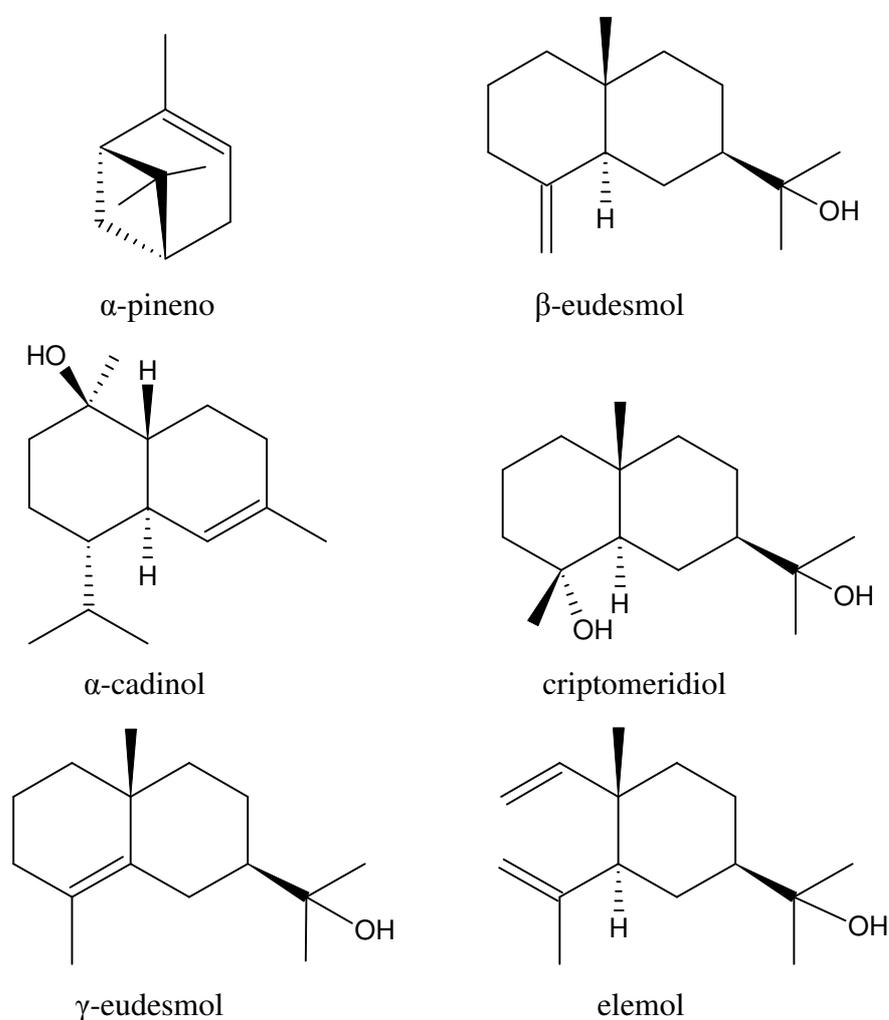


Figura 44. Ampliação do experimento de HMBC para a **Ca4** (acetona-d6, TMS,  $\delta$ ).

#### 4.1.3. Caracterização por CG-EM do óleo obtido por coluna cromatográfica da FButOH de *C. adamantium*.

O óleo isolado do grupo SBut-48 apresentou 13 substâncias, das quais 6 puderam ser identificadas através de seus índices de retenção e espectros de massas. Os índices de retenção foram calculados conforme descrito no item 3.7 (pág. 16).

As substâncias identificadas foram: criptomeridiol (35,7 %),  $\alpha$ -cadinol (8,7 %),  $\beta$ -eudesmol (7,1 %),  $\alpha$ -pineno (6,2 %),  $\gamma$ -eudesmol (5,1 %) e elemol (2,4 %). As estruturas desses compostos são dadas na Figura 45. Seus espectros de massa compõem o Anexo 1 (pág. 94).



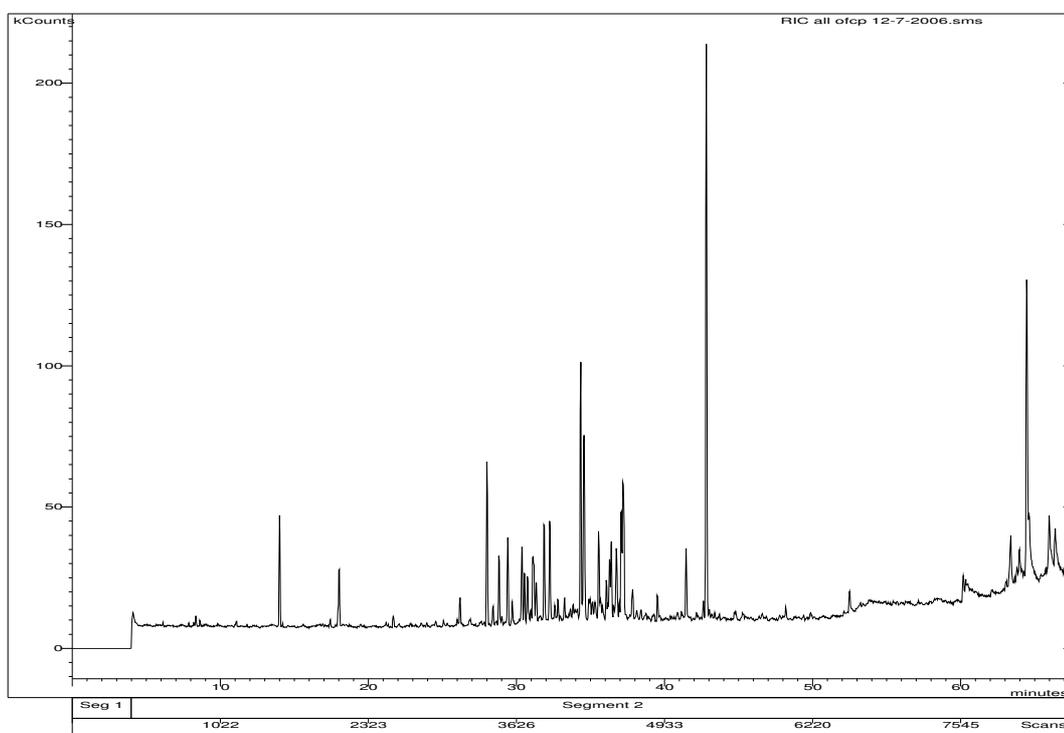
**Figura 45.** Estruturas dos compostos voláteis identificados na FButOH.

Todas essas substâncias foram identificadas nos óleos essenciais e extratos hexânicos dos frutos e folhas de *C. pubescens* (item 4.2, pág. 52). Criptomeridiol,  $\alpha$ -pineno e  $\alpha$ -cadinol

estão entre os componentes majoritários em algumas das amostras analisadas. Supõe-se que nos frutos de *C. adamantium* também haja quantidades significativas desses compostos, pois mesmo após extrações sucessivas com hexano e clorofórmio ainda estavam presentes na extração com etanol. O monoterpene  $\alpha$ -pineno e o sesquiterpene  $\alpha$ -cadinol foram anteriormente encontrados no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg, por Valillo e colaboradores (2006b).

## 4.2 Análise por CG-EM de *C. pubescens*

O óleo das folhas de *C. pubescens* teve rendimento de 0,20% e dos frutos 0,10%. Os rendimentos dos extratos hexânicos das folhas e frutos foram de 0,92 % e 1,36 %, respectivamente. Destas amostras foram preparadas soluções em hexano, as quais foram analisadas por CG-EM. As Figuras 46 a 49 (pág. 52-54) apresentam os cromatogramas obtidos para os óleos essenciais dos frutos (OFr) e das folhas (OFo) e para os extratos hexânicos dos frutos (HexFr) e das folhas (HexFo).



**Figura 46.** Cromatograma do óleo essencial dos frutos.

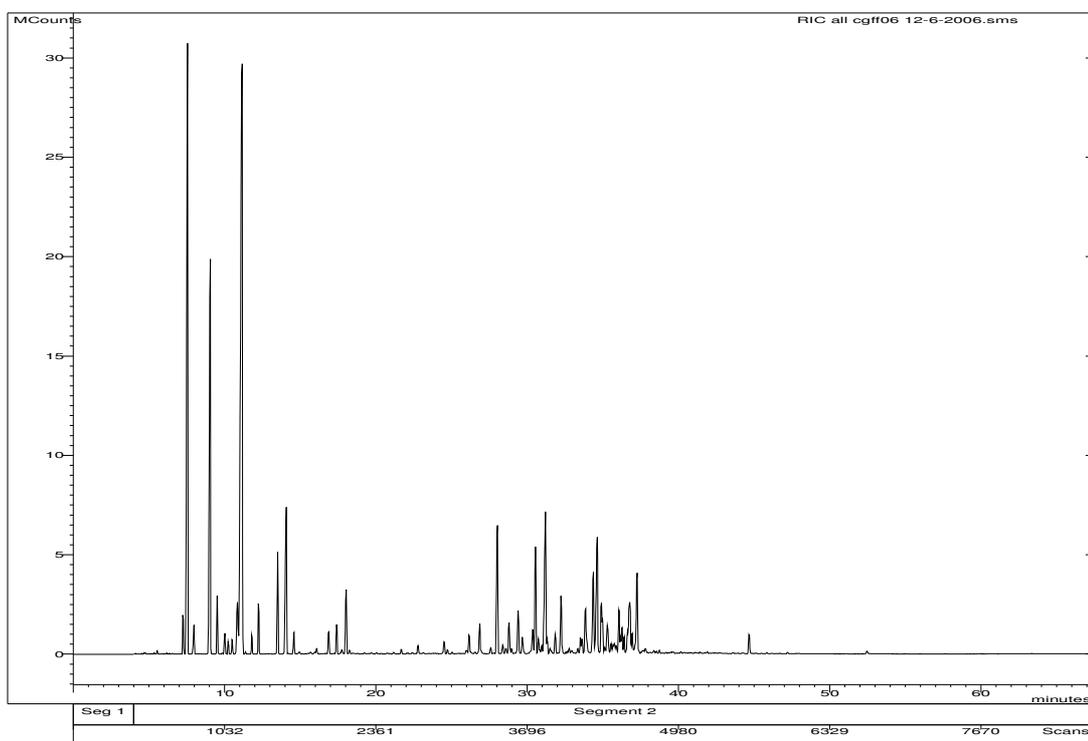


Figura 47. Cromatograma do óleo essencial das folhas.

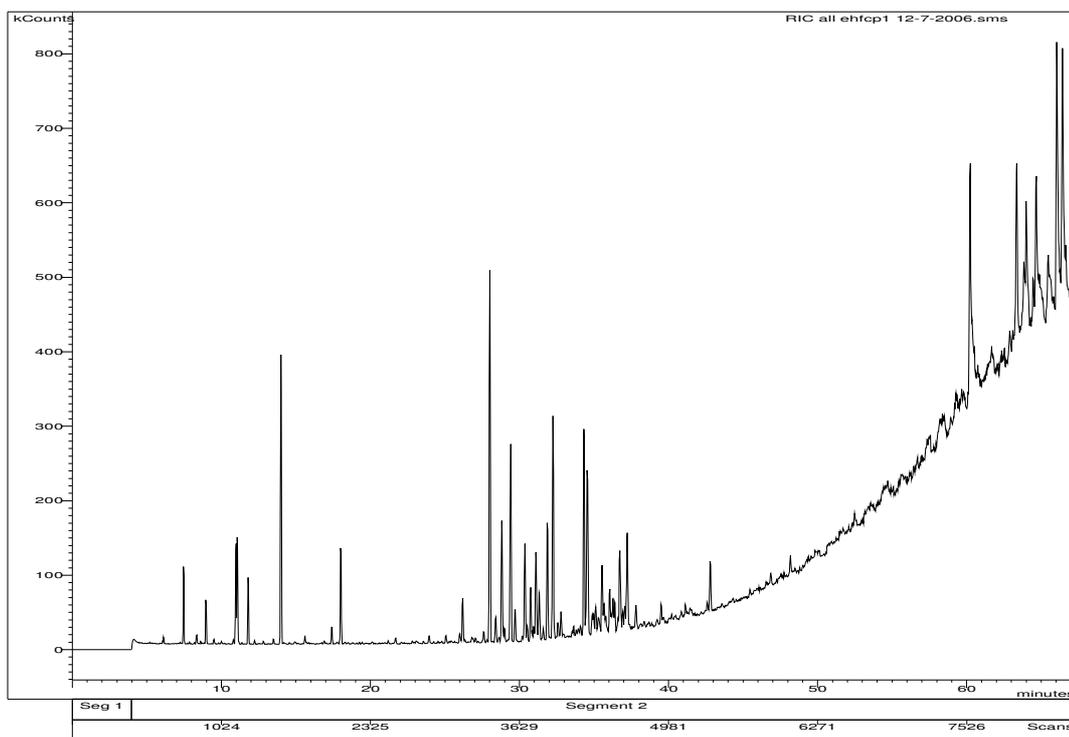
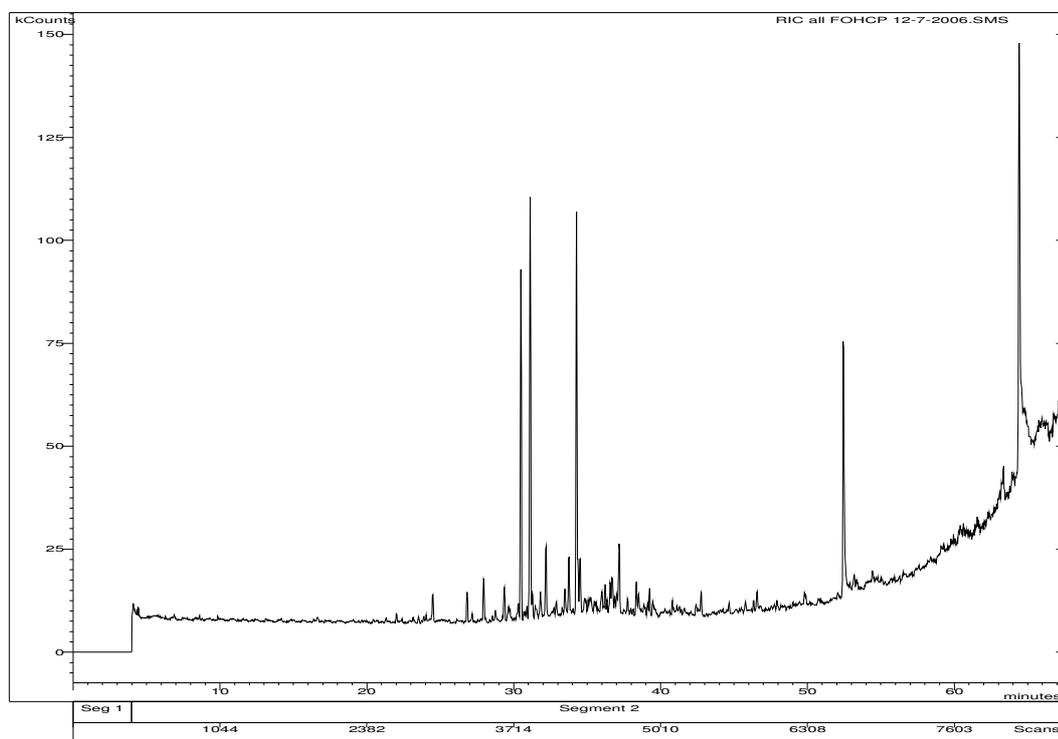


Figura 48. Cromatograma do extrato hexânico dos frutos.



**Figura 49.** Cromatograma do extrato hexânico das folhas.

A Tabela 9 (pág. 56) apresenta a composição química dos óleos essenciais e dos extratos hexânicos das folhas e dos frutos, onde a percentagem relativa foi obtida empregando a área de cada pico em relação ao somatório das áreas de todos os picos do cromatograma. As amostras analisadas mostraram-se ricas em mono e sesqui terpênos.

No óleo essencial dos frutos de *C. pubescens* foram identificados trinta e oito compostos, representando 76,0 % da amostra. Entre os componentes identificados os sesquiterpenos foram a fração dominante com 71,7 % do total da área relativa, sendo que destes 46,7% são oxigenados. Os monoterpenos apresentaram 4,0 % e o benzaldeído, única substância não terpênica, apresentou 0,3 % do total da área relativa. Os constituintes majoritários foram criptomeridiol (13,9%), espatulenol (6,4%), globulol (6,0%),  $\alpha$ -cadinol (5,5%) e  $\beta$ -cariofileno (3,8%).

O óleo essencial das folhas em relação a área relativa apresentou o limoneno como maior constituinte (22,4%), seguido por  $\alpha$ -pineno (13,3%),  $\beta$ -pineno (9,5%), biciclogermacreno (4,4%) e linalol (3,9%). Os sessenta e um compostos identificados nas folhas representam 94,7 % da área relativa total. Os monoterpenos predominam no óleo das folhas (60,2 %), ao contrário do obtido para o óleo dos frutos. Os três componentes

majoritários são hidrocarbonetos e somam 45,2 % da área relativa, enquanto os monoterpenos oxigenados respondem a 7,7 %. Entre os sesquiterpenos, 18,6 % são hidrocarbonetos, com destaque para o biciclogermacreno com 4,4 % da área relativa, e 15,9 % são oxigenados, sendo o globulol o mais abundante entre estes com 3,8 % de área relativa.

No extrato hexânico dos frutos foram identificados cinquenta e oito componentes. Os compostos mais abundantes foram  $\beta$ -cariofileno (6,0 %),  $\delta$ -cadineno (4,3%), linalol (3,7 %), globulol (3,6 %) e espatulenol (3,4%). Com 42,7 % da área relativa, os sesquiterpenos predominaram no extrato hexânico dos frutos, sendo que os oxigenados representam 26,1% e os hidrocarbonados 16,6 %. Os monoterpenos hidrocarbonados somaram 3,9 % e os oxigenados totalizaram 7,1 % da área relativa.

No extrato hexânico das folhas foram identificados somente sesquiterpenos. Foram vinte e dois compostos representando 58,8 % da área relativa da amostra, sendo que destes os hidrocarbonetos corresponderam a 34,8 % da área relativa, enquanto os sesquiterpenos oxigenados representaram 24,0 %. Os majoritários foram biciclogermacreno (13,6%), espatulenol (12,6%), germacreno D (10,4%),  $\delta$ -cadineno (2,6%) e  $\alpha$ -cadinol (2,6%).

As Figuras 50 e 51 (pág. 58) mostram uma comparação entre os resultados obtidos para os frutos e folhas nos dois métodos de extração utilizados. Traçando uma comparação, baseada na área relativa das substâncias observa-se que para os frutos, a extração com hexano extraiu monoterpenos hidrocarbonados (3,9 %), enquanto que empregando o processo de hidrodestilação estes componentes não foram identificados. Para as folhas observa-se que os monoterpenos apresentam área significativa (11,0 %) no óleo essencial e não foram detectados no extrato hexânico (Tabela 9, pág. 56).

Comparando o número de substâncias identificadas, verificamos que a hidrodestilação dos frutos extraiu maior número de substâncias do que a extração sólido-líquido, enquanto que para as folhas ocorreu um fato oposto. Para avaliar estas extrações e traçar um padrão, em relação ao tipo de extração mais adequada para cada substância, teríamos que otimizar os processos de extração e realizar toda a análise em triplicata.

A condição 2 de análise para a cromatografia gasosa (item 3.3.1., pág. 8) foi utilizada para verificar a presença de diterpenos ou triterpenos nas amostras. No entanto, os cromatogramas obtidos não apresentaram nenhum pico com espectro de massas que possa ser atribuído a esse tipo de substâncias.

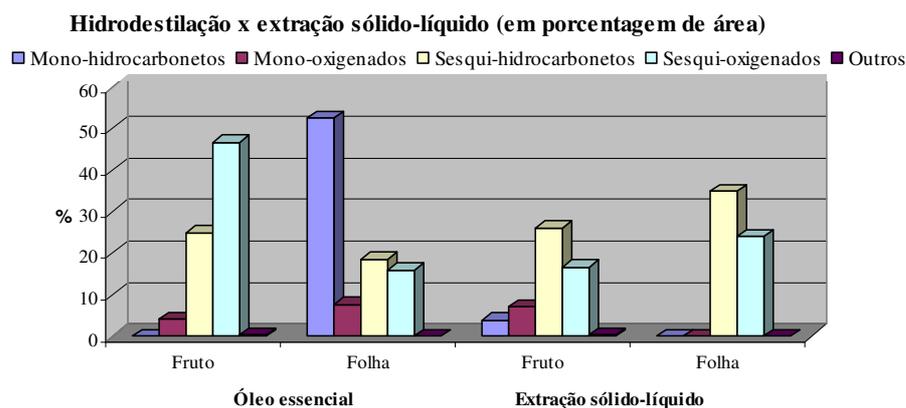
**Tabela 9.** Composição química dos óleos essenciais e extratos hexânicos de *C. pubescens*.

Compostos <sup>1</sup>	Área relativa (%)				Índice de Retenção		
	OFr	Ofo	HexFr	HexFo	<i>I</i> <sub>Cal.</sub>	<i>KI</i> <sub>Cal.</sub>	<i>I</i> <sub>Lit.</sub>
1 $\alpha$ -Tujeno	-	0,6	-	-	925	931	931
2 $\alpha$ -Pineno	-	13,3	1,2	-	932	937	939
3 $\alpha$ Fencheno	-	0,4	-	-	946	952	951
4 Benzaldeído	0,3	-	0,1	-	957	962	961
5 $\beta$ -Pineno	-	9,5	0,5	-	975	979	976
6 Mirceno	-	1,0	0,0	-	991	992	991
7 $\alpha$ -Felandreno	-	0,3	0,1	-	1004	1005	1005
8 $\delta$ -3-Careno	-	0,2	-	-	1010	1011	1011
9 $\alpha$ -Terpineno	-	0,3	-	-	1016	1019	1018
10 <i>o</i> -Cimeno	-	1,6	0,0	-	1023	1027	1022
11 Limoneno	-	22,4	1,1	-	1028	1031	1031
12 1,8-Cineole	-	0,6	1,2	-	1030	1034	1033
13 <i>E</i> - $\beta$ -ocimeno	-	0,3	0,8	-	1047	1052	1050
14 $\gamma$ -Terpineno	-	0,9	0,1	-	1058	1062	1062
15 <i>cis</i> -Óxido de Linalol	-	-	0,0	-	1072	1075	1074
16 Terpinoleno	-	1,8	0,1	-	1088	1089	1088
17 Linalol	2,2	3,9	3,7	-	1100	1100	1098
18 <i>endo</i> -Fenchol	-	0,4	-	-	1113	1114	1112
19 Nopinona	-	-	0,2	-	1136	1139	1137
20 Borneol	-	0,4	0,1	-	1165	1168	1165
21 Terpin-4-ol	0,2	0,6	0,4	-	1176	1179	1177
22 <i>p</i> -Cimen-8-ol	-	0,1	-	-	1184	1186	1183
23 $\alpha$ -Terpineol	1,6	1,4	1,3	-	1190	1191	1189
24 Perila aldeído	-	0,1	0,1	-	1272	1275	1271
25 Perila álcool	-	0,2	0,0	-	1298	1298	1295
26 Geranato de metila	-	-	0,2	-	1324	1326	1323
27 $\delta$ -Elemeno	-	0,3	-	0,7	1337	1339	1339
28 $\alpha$ -Cubebeno	-	0,0	0,2	-	1351	1353	1351
29 $\alpha$ -Ilangene	-	0,1	0,2	-	1372	1373	1372
30 $\alpha$ -Copaeno	0,8	0,4	0,8	-	1376	1378	1376
31 $\beta$ -Elemeno	-	0,7	-	1,0	1392	1393	1391
32 $\alpha$ -Gurjuneno	-	0,2	0,2	-	1410	1411	1409
33 <i>E</i> -Caryofileno	3,8	3,1	6,0	1,5	1420	1421	1418
34 $\beta$ -Gurjuneno	0,6	0,2	0,4	-	1429	1431	1432
35 $\gamma$ -Elemeno	-	0,1	0,1	-	1434	1436	1433
36 Aromadendreno	1,9	0,8	1,8	-	1440	1441	1439
37 $\alpha$ -Humuleno	2,2	1,0	2,9	1,3	1454	1456	1454
38 Seicheleno	0,6	0,4	0,6	-	1461	1463	1460
39 $\gamma$ -Gurjuneno	0,1	-	0,1	-	1473	1474	1473
40 $\gamma$ -Muuroleno	2,1	0,7	1,7	0,7	1477	1479	1477

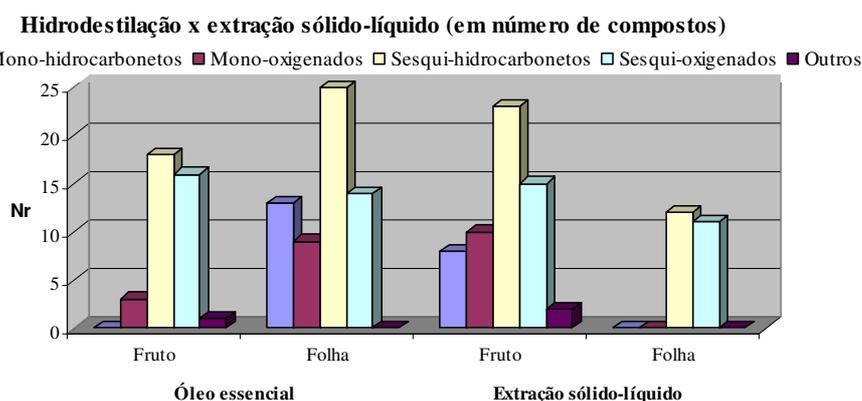
**Tabela 9.** Continuação

Compostos	Área relativa (%)				Índice de Retenção		
	OFr	OFo	HexFr	HexFo	$I_{Cal.}$	$KI_{Cal.}$	$I_{Lit.}$
41 Germacreno D	1,4	2,6	0,2	10,4	1481	1482	1480
42 $\beta$ -Selineno	1,1	0,3	1,0	-	1487	1487	1485
43 Valenceno	-	-	0,0	-	1489	1490	1491
44 Viridifloreno	0,5	0,2	0,2	-	1492	1492	1493
45 $\alpha$ -Selineno	1,7	-	1,7	-	1496	1496	1494
46 Biciclogermacreno	0,6	4,4	-	13,6	1497	1497	1494
47 <i>trans</i> - $\beta$ -Guaieno	1,2	0,3	0,8	0,6	1501	1501	1500
48 Germacreno A	-	0,1	-	0,3	1506	1506	1503
49 $\beta$ -Bisaboleno	-	0,1	0,2	-	1508	1508	1509
50 $\gamma$ -Cadineno	2,8	0,5	2,1	1,2	1515	1515	1513
51 $\delta$ -Cadineno	2,8	1,6	4,3	2,6	1524	1525	1524
52 Cadina-1,4-dieno	0,4	0,0	0,2	-	1533	1534	1532
53 $\alpha$ -Cadineno	0,5	0,1	0,4	-	1538	1540	1538
54 Germacreno B	-	0,4	-	0,8	1557	1558	1556
55 <i>epi</i> -Longipinanol	0,3	0,3	0,1	-	1560	1562	1561
56 <i>E</i> -Nerolidol	0,7	1,5	0,1	2,1	1564	1565	1564
57 Espatulenol	6,4	2,1	3,4	12,6	1577	1579	1576
58 Globulol	6,1	3,8	3,6	2,5	1583	1584	1583
59 Viridiflorol	0,6	1,2	0,3	-	1591	1592	1590
60 Guaiol	0,3	0,2	0,6	-	1598	1598	1595
61 $\beta$ -óxido de Himachaleno	2,4	0,2	1,2	0,4	1609	1609	1610
62 1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	0,4	0,3	-	-	1616	1616	1614
63 1- <i>epi</i> -Cubenol	0,5	0,4	0,3	-	1626	1627	1627
64 $\alpha$ -Acorenol	1,8	0,6	0,6	1,0	1628	1629	1630
65 $\gamma$ -Eudesmol	2,1	0,4	0,5	0,3	1632	1633	1630
66 <i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinol	2,7	2,0	1,9	0,9	1641	1642	1640
67 $\alpha$ -Muurolol	0,3	0,5	0,2	0,3	1646	1648	1645
68 $\beta$ -Eudesmol	2,8	-	0,4	0,5	1650	1651	1649
69 $\alpha$ -Cadinol	5,6	2,4	2,4	2,6	1654	1655	1653
70 Criptomerediol	13,9	-	1,0	0,8	1809	1809	1808
Total monoterpênos	4,0	60,2	11,0	-			
Hidrocarbonetos	-	52,5	3,9	-			
Oxigenados	4,0	7,7	7,1	-			
Total sesquiterpênos	71,7	34,4	42,7	58,8			
Hidrocarbonetos	24,9	18,5	26,1	34,8			
Oxigenados	46,8	15,9	16,6	24,0			
Outros compostos	0,3	-	0,3	-			
Total	76,0	94,7	54,0	58,8			

<sup>1</sup>Compostos em ordem de eluição. OFr = óleo essencial dos frutos; OFo = óleo essencial das folhas; HexFr = extrato hexânico dos frutos; HexFo = extrato hexânico das folhas.  $I_{Cal.}$  = índice de retenção de temperatura-programada e  $KI_{Cal.}$  = índice de Kovats calculados;  $I_{Lit.}$  = índice da literatura (ADAMS, 1995).



**Figura 50.** Gráfico comparativo dos dois métodos de extração de componentes voláteis empregados com base na área relativa.



**Figura 51.** Gráfico comparativo dos dois métodos de extração de componentes voláteis empregados com base no número de compostos identificados.

A Tabela 10 (pág. 60) traz uma comparação dos óleos essenciais estudados neste trabalho com dados de duas espécies de *Campomanesia* encontrados na literatura (VALLILO *et al*, 2006; ADATI; FERRO, 2006). Verifica-se grande semelhança entre essas espécies em relação aos componentes em maior concentração. Das trinta e quatro substâncias apresentadas na Tabela 10, vinte e uma aparecem em pelo menos três das amostras comparadas. Apenas quatro compostos citados pela literatura não foram identificados nos óleos de *C. pubescens*. Seis componentes do óleo dos frutos e folhas deste trabalho (biciclogermacreno,  $\beta$ -óxido de cariofileno,  $\gamma$ -eudesmol, *epi*- $\alpha$ -cadinol,  $\beta$ -eudesmol e criptomeridiol) não estão descritos nos frutos de *C. adamantium* e nas folhas de *C. phaea*.

Alguns dos compostos voláteis majoritários, nos óleos essenciais e extratos hexânicos dos frutos e folhas de *C. pubescens*, tiveram suas atividades biológicas estudadas e encontram-se relatadas na literatura. Por exemplo, o criptomeridiol apresenta atividade antiespasmolítica (evita a contração involuntária dos músculos) como revelado nos trabalhos de Evans *et al* (1982), Locksley *et al* (1982), Ruangrunsi *et al* (1985) e Rizk *et al* (1986). Esse composto, considerado um precursor direto da série eudesmano (SUMIMOTO *et al* 1963), apresentou baixa atividade antifúngica sobre *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, e *Candida albicans* e nenhuma atividade antimicrobiana sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, e *Escherichia coli* (RAGASA *et al*, 2005).

Um estudo com o óleo essencial das partes aéreas de *Cordia curassavica* (Boraginaceae) (HERNANDEZ *et al*, 2007), mostrou que este foi ativo sobre as bactérias *Sarcina lutea* e *Vibrio cholerae*, com concentração inibitória mínima (CIM) de 62 µg/mL, e sobre o fungo *Rhizoctonia solani* (CIM<sub>50</sub> = 180 µg/mL). Esse óleo apresentou entre os compostos majoritários o β-eudesmol (19,21%) e o espatulenol (11,25%), componentes que estão presentes no óleo dos frutos de *C. pubescens* com 2,8 % e 6,4 %, respectivamente. Porém este artigo não relata qual das substâncias majoritárias é responsável pela atividade biológica determinada. O β-eudesmol, entretanto, apresenta algumas atividades biológicas como: atividade anti-hepatotóxica *in vitro* (KISO, *et al*, 1983), atividade hipotensiva em gatos (ARORA, *et al*, 1967) e inibição da secreção gástrica e úlceras em ratos (NOGAMI, *et al*, 1986).

O limoneno é o principal componente do óleo essencial de frutas cítricas contribuindo para o aroma característico destas (ARAÚJO; FARIAS, 2003). Na laranja o percentual do isômero *D*-limoneno chega a 90 % e no limão varia entre 65-70 % (TRUCOM, 2005). Esse composto apresenta atividade antimicrobiana (VAN VUUREN; VILJOEN, 2007) e anti-tumoral (JI *et al*, 2006) dentre outras.

Glisic *et al* (2007) relataram que as frações ricas em α-pineno e misturas de α-pineno e sabineno, extraídas do óleo essencial de *Juniperus communis* L., apresentaram alta atividade antimicrobiana, especialmente sobre fungos, sendo mais ativas que os antibióticos testados. O α-pineno mostrou alta atividade contra a bactéria *Clostridium perfringens*, responsável por males intestinais (HWANG; LEE, 2002).

A presença desses compostos com atividade biológica em espécies do gênero *Campomanesia*, mostra que são necessários estudos mais aprofundados e focalizados nas atividades biológicas para a espécie em estudo.

**Tabela 10:** Comparação dos óleos essenciais de três espécies de *Campomanesia*.

Compostos <sup>1</sup>	<i>C. pubescens</i> frutos <sup>2</sup>	<i>C. pubescens</i> folhas <sup>2</sup>	<i>C. adamantium</i> frutos <sup>3</sup>	<i>C. phaea</i> folhas <sup>4</sup>	KI <sup>5</sup>
$\alpha$ -Pineno	-	13,3	10,6	2,1	939
$\beta$ -Pineno	-	9,5	2,5	1,4	976
Mirceno	-	1,0	3,5	-	991
<i>p</i> -Cimeno	-	-	2,0	0,5	1026
Limoneno	-	22,4	10,1	1,8	1031
(Z)- $\beta$ -ocimeno	-	-	9,2	-	1040
Terpinoleno	-	1,8	2,2	-	1088
Linalol	2,2	3,9	3,1	11,1	1098
$\alpha$ -Terpineol	1,6	1,4	1,9	2,4	1189
$\alpha$ -Copaeno	0,8	0,4	0,8	3,3	1376
$\beta$ -Elemeno	-	0,7	0,6	3,6	1391
$\beta$ -Caryofileno	3,8	3,1	7,0	6,3	1418
$\beta$ -Gurjuneno	0,6	0,2	2,6	-	1432
Aromadendreno	1,9	0,8	-	1,8	1439
$\alpha$ -Humuleno	2,2	1,0	2,3	1,8	1454
Aloaromadendreno	-	-	1,0	2,1	1461
$\gamma$ -Muuroleno	2,1	0,7	-	3,2	1477
Germacreno D	1,4	2,6	1,2	-	1480
$\beta$ -Selineno	1,1	0,3	0,4	6,9	1485
Viridifloreno	0,5	0,2	5,2	-	1493
$\alpha$ -Selineno	1,7	-	-	3,9	1494
Biciclogermacreno	0,6	4,4	-	-	1494
$\gamma$ -Cadineno	2,8	0,5	1,4	1,2	1513
$\delta$ -Cadineno	2,8	1,6	3,2	-	1524
Espatuleno	6,4	2,1	-	4,4	1576
Óxido de cariofileno	-	-	0,9	11,8	1581
Globulol	6,1	3,8	3,2	2,5	1583
Viridiflorol	0,6	1,2	1,5	-	1590
$\beta$ -Óxido de himachaleno	2,4	0,2	-	-	1610
$\gamma$ -Eudesmol	2,1	0,4	-	-	1630
<i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinol	2,7	2,0	-	-	1640
$\beta$ -Eudesmol	2,8	-	-	-	1649
$\alpha$ -Cadinol	5,6	2,4	2,1	1,9	1653
Criptomeridiol	13,9	-	-	-	1808

<sup>1</sup>Compostos em ordem de eluição. <sup>2</sup>Área relativa por CG-EM, <sup>3</sup>Área por CG-DIC (VALLILO *et al*, 2006b).

<sup>4</sup>Área por CG-DIC (ADATI; FERRO, 2006). <sup>5</sup>Índice de retenção da literatura (ADAMS, 1995).

### 4.3 Análise por CLAE-DAD

#### 4.3.1 Avaliação do perfil cromatográfico.

Os extratos e partições foram analisados por CLAE com a intenção de se obter o perfil cromatográfico das amostras e permitir a identificação e determinação do teor das substâncias em *C. pubescens* e em *C. adamantium*.

A avaliação do perfil cromatográfico foi realizada através dos espectros de absorção molecular, obtidos na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) dos picos, e de seus tempos de retenção utilizando o programa computacional do próprio equipamento. Um total de vinte e nove picos (somando todas as amostras analisadas) apresentaram espectros de UV-Vis. No entanto, alguns deles (1-3, 20, 21, 26-28) apresentaram espectros diferentes quando obtidos de pontos diferentes no pico, indicando a co-eluição. Os espectros dos picos que mantiveram um perfil constante ao longo do pico são dados na Figura 52 (pág. 62). Outros picos não apresentaram nenhum espectro de UV-Vis, então foram identificados por letras (A-M).

Os cromatogramas apresentados nessa discussão foram obtidos no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 284 nm. A escolha deste  $\lambda$  foi baseada no número de picos observados, sendo  $\lambda$  284 nm o que apresentou maior quantidade de picos.

A análise por CLAE mostrou que os perfis cromatográficos do EHex e do EAcOEt de *C. pubescens* (Figuras 53 e 54, pág. 63) são muito semelhantes em relação às substâncias majoritárias. Pela comparação destes dois cromatogramas, percebe-se que a substância indicada com a letra A apresenta um tempo de retenção muito próximo à substância 6 presente no EAcOEt, podendo tratar-se do mesmo composto. Outras possibilidades seriam a substância B corresponder a número 9 e a C ser a substância 12. Porém, como os picos A, B e C não apresentaram um espectro de UV-Vis, a afirmação de que elas realmente seriam essas substâncias (6, 9 e 12, respectivamente) ficaria baseada somente no tempo de retenção, o que poderia conduzir a uma afirmação incorreta.

Em *C. adamantium* o EEtOH (cromatograma na Figura 55, pág. 64) apresentou os picos 7, 13, 14, 19 e 23, porém com intensidades menores do que no EHex e no EAcOEt. A partição do EEtOH concentrou essas substâncias na FButOH, como pode ser observado no cromatograma dessa amostra (Figura 56, pág. 64). Os picos 7, 13 e 14 na FButOH mostraram-se tão intensos quanto nos extratos de *C. pubescens* (EHex e EAcOEt).

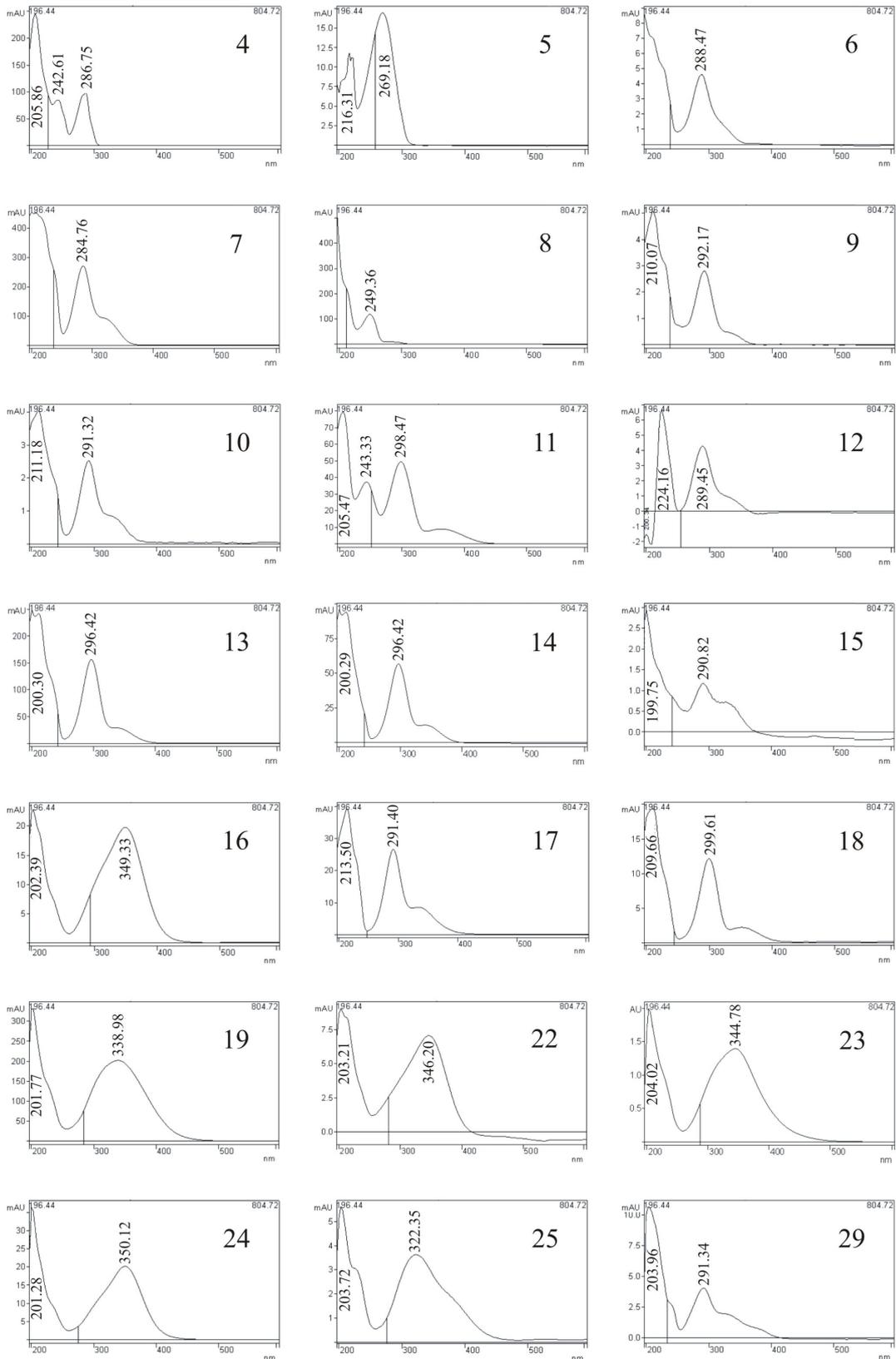
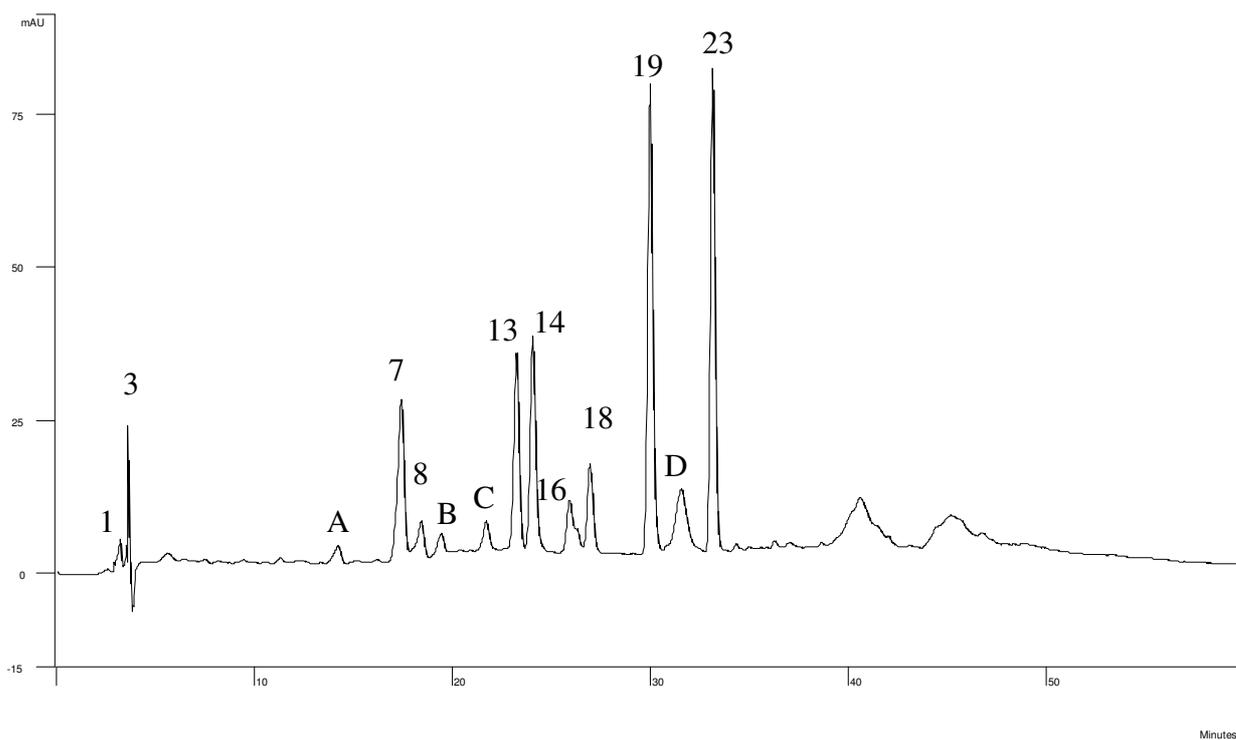
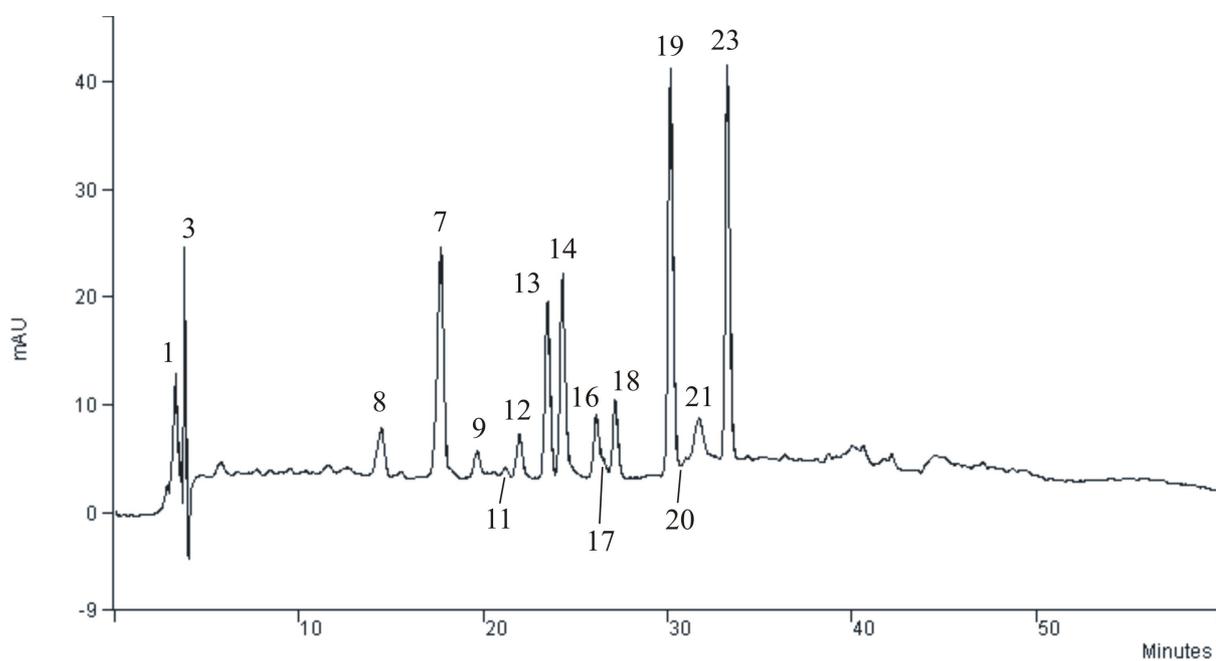


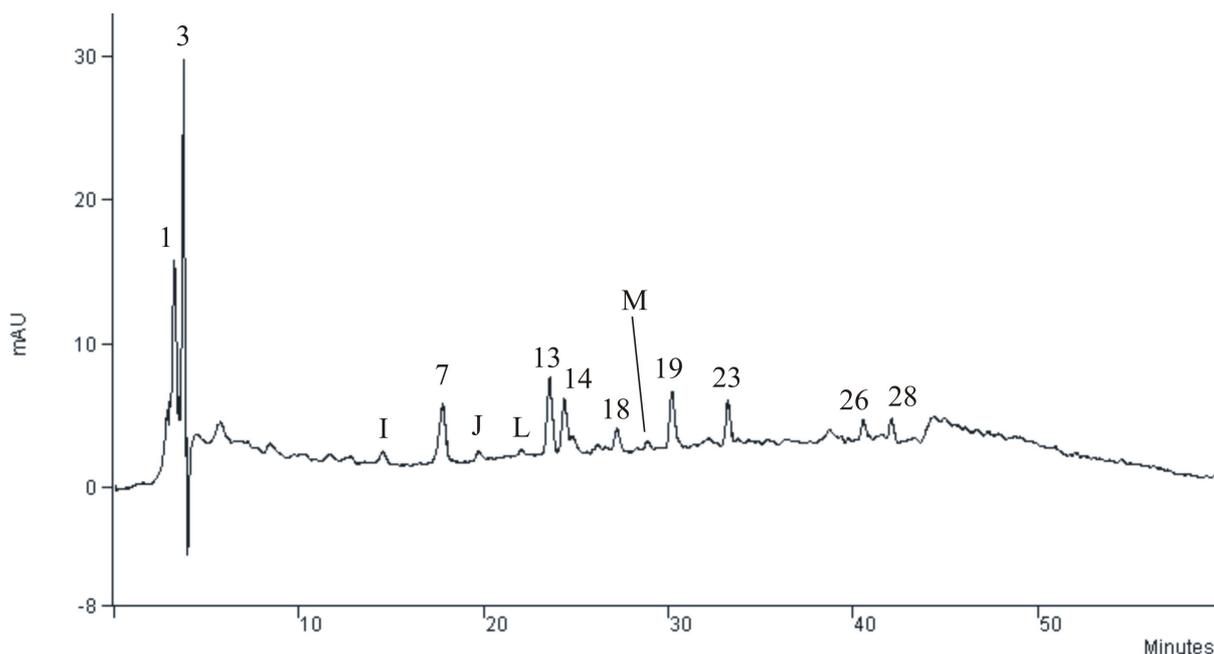
Figura 52. Espectros de absorção molecular obtidos na região do UV-Vis



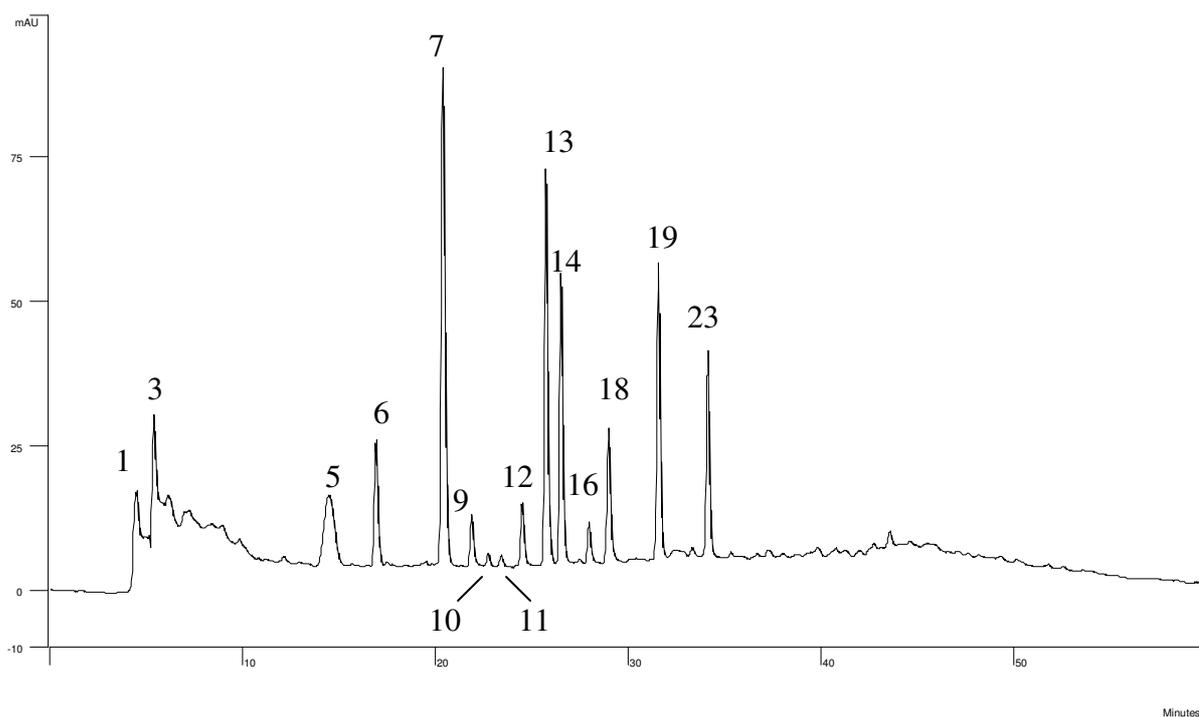
**Figura 53.** Cromatograma representativo do EHex (*C. pubescens*), obtido em 284 nm.



**Figura 54.** Cromatograma representativo do EAcOEt (*C. pubescens*), obtido em 284 nm

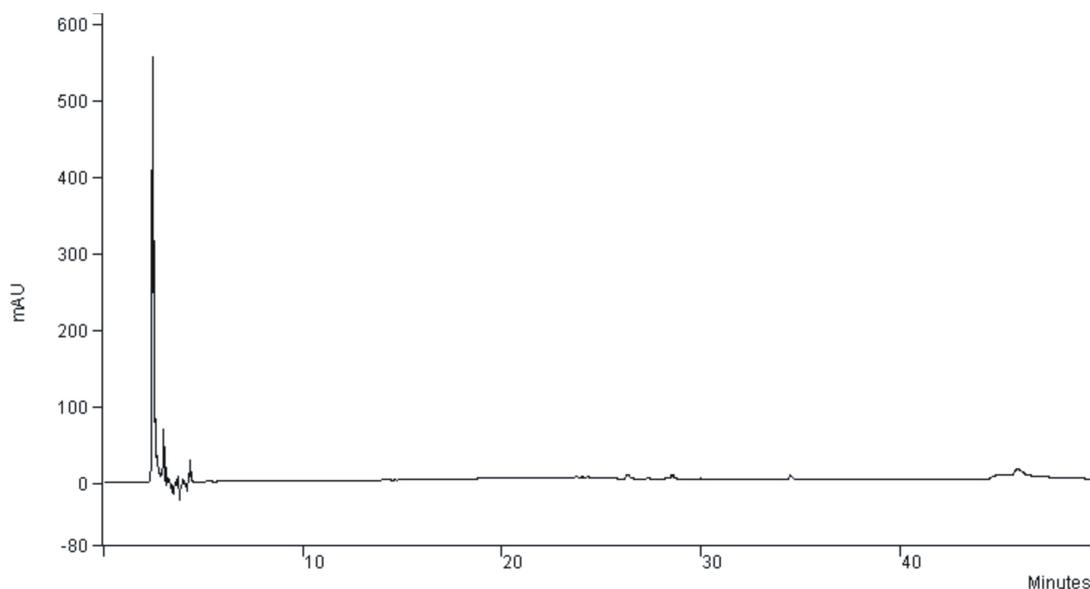


**Figura 55.** Cromatograma representativo do EEtOH (*C. adamantium*), obtido em 284 nm.



**Figura 56.** Cromatograma representativo da FButOH (*C. adamantium*), obtido em 284 nm.

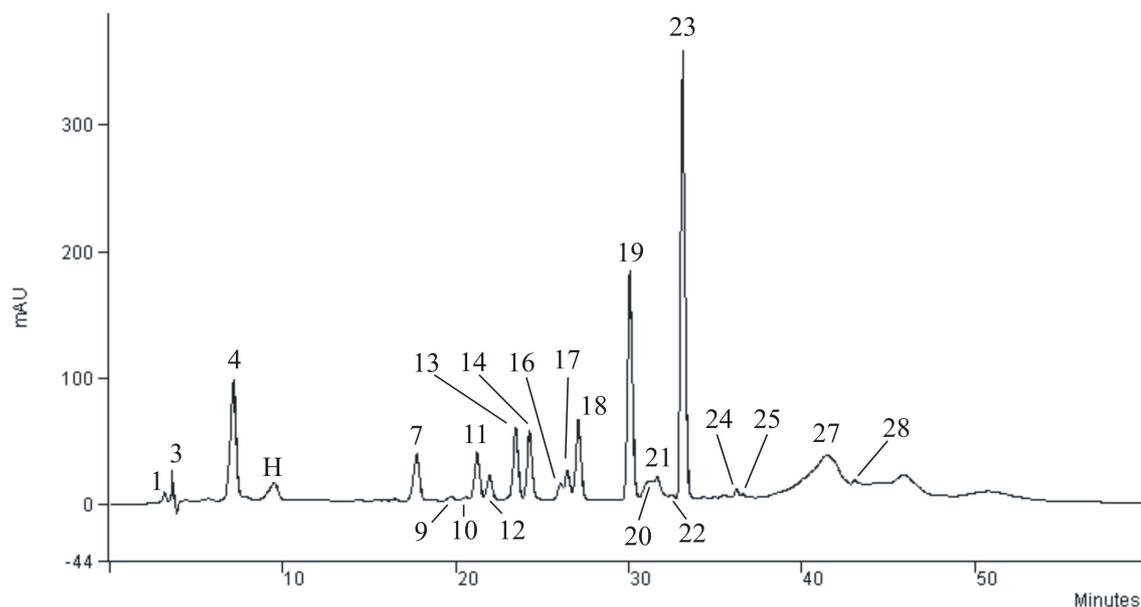
Na FAq não foram identificados nenhum dos vinte e nove picos, cujos espectros na região do ultravioleta e visível foram obtidos (Figura 57, pág. 65). Observou-se nessa amostra, um pico de grande intensidade em 2,4 minutos e outros menos intensos na mesma região, porém nenhum deles apresentou um espectro de UV-Vis bem definido.



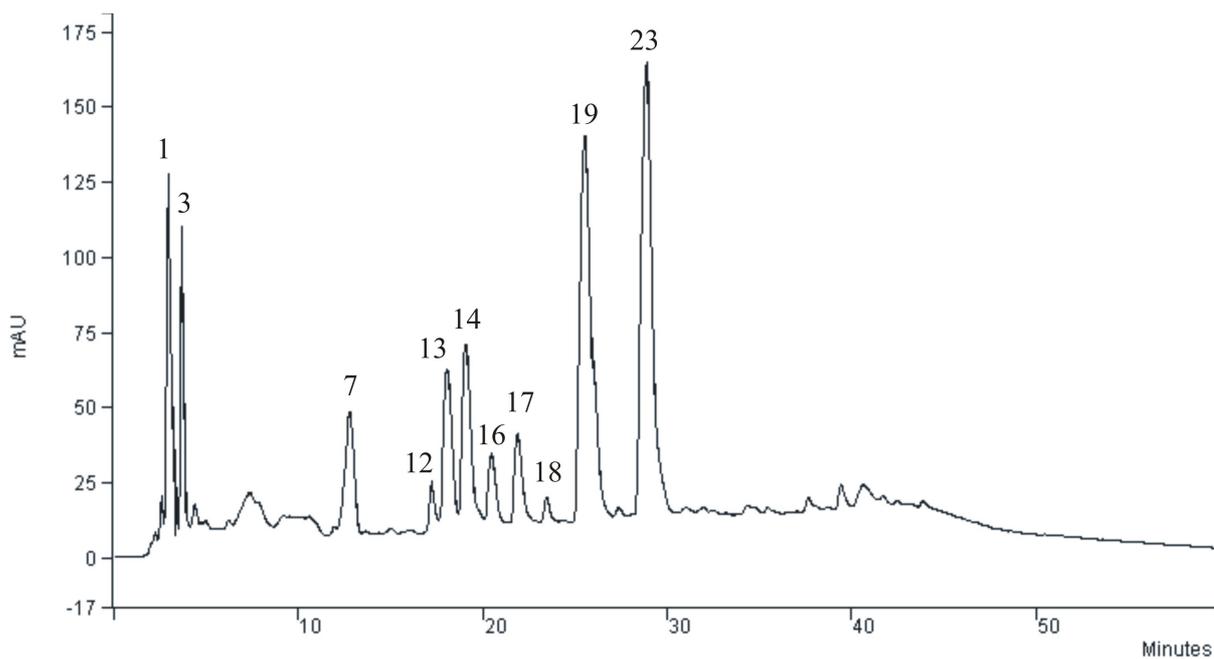
**Figura 57.** Cromatograma representativo da FAq (*C. adamantium*), obtido em 284 nm.

Com as frações FACN e FHex o perfil mostrou-se praticamente o mesmo, porém com intensidades extremamente diferentes (Figuras 58 e 59, pág. 65 e 66). Na FACN o pico 23 supera os 300 mAU enquanto que na FHex esse valor não chega a 25 mAU. Em *C. adamantium* a FAq apresenta picos intensos no início do cromatograma, indicando que substâncias mais polares estão presentes nessa amostra.

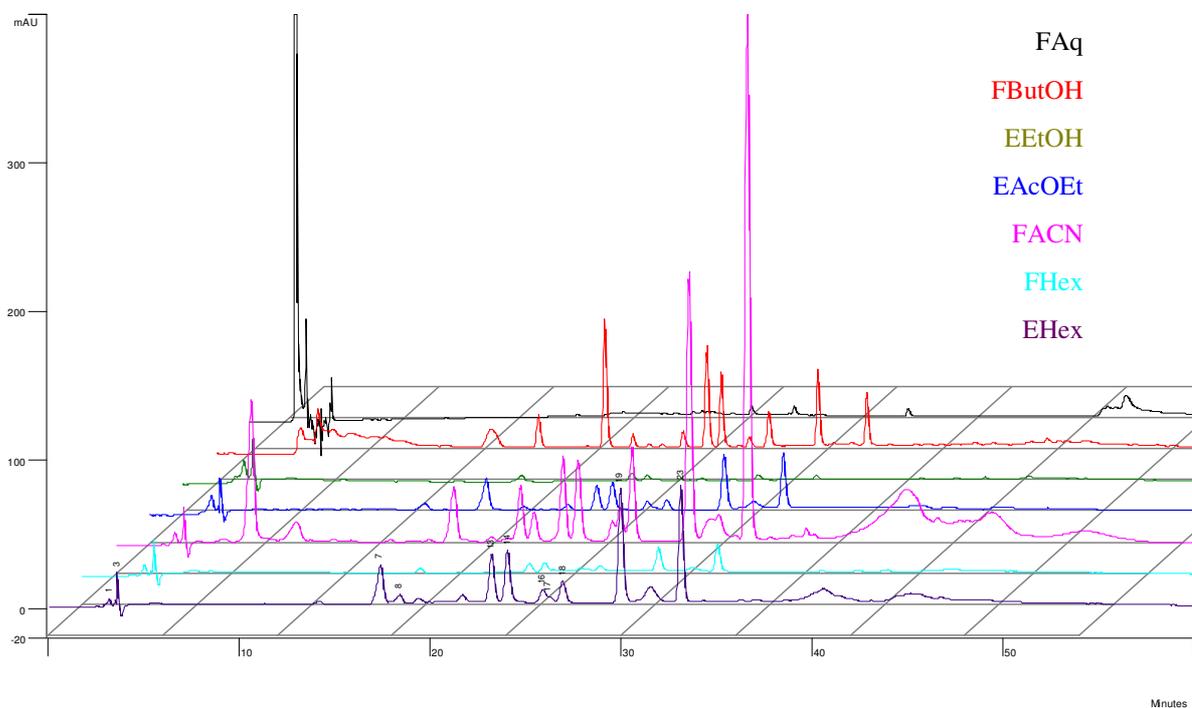
A Figura 60 (pág. 66) mostra todos os cromatogramas (*C. adamantium* e *C. pubescens*), sobrepostos em uma imagem com a escala fixada em 400 mAU. Através desta figura percebe-se que a FACN apresenta picos mais intensos dos que as outras amostras.



**Figura 58.** Cromatograma representativo da FACN (*C. pubescens*), obtido em 284 nm.



**Figura 59.** Cromatograma representativo da FHex (*C. pubescens*), obtido em 284 nm.



**Figura 60.** Comparação entre todos os cromatogramas na mesma escala de intensidade, obtidos em 284 nm.

### 4.3.2 Identificação e determinação do teor das substâncias

O isolamento e elucidação estrutural das substâncias **Cp1**, **Cp2**, **Ca1**, **Ca2**, **Ca3** e **Ca4** dos frutos de *C. pubescens* e *C. adamantium* permitiu utilizá-las como padrões para a identificação e determinação do teor das mesmas nos extratos e partições estudados. A Figura 61 (pág. 68) traz as estruturas dessas substâncias e seus respectivos espectros de UV-Vis.

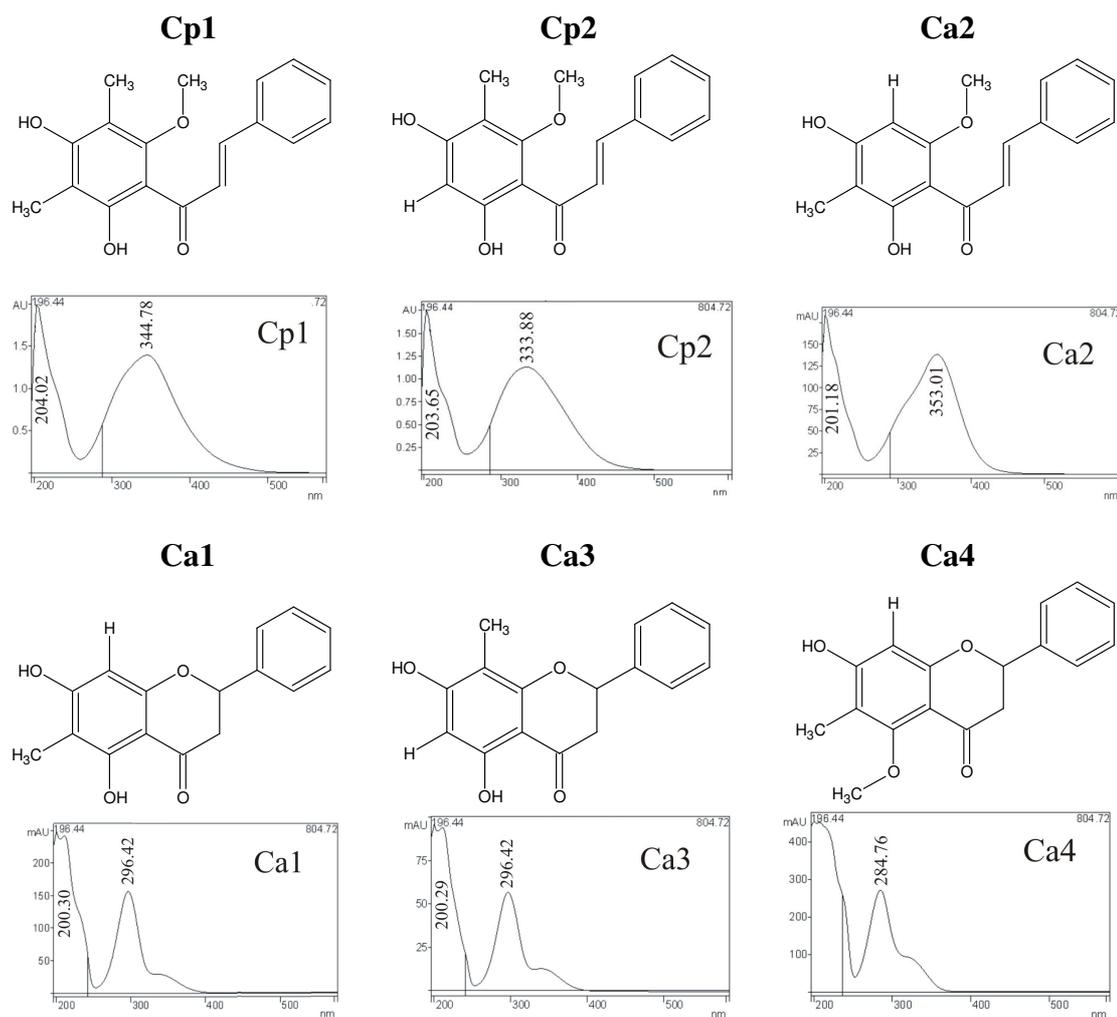
As substâncias isoladas foram injetadas no mesmo equipamento e sob as mesmas condições utilizadas para os extratos e partições. Comparando o tempo de retenção e espectros na região do ultravioleta e visível dos padrões, com aqueles apresentados pelos picos detectados nos extratos e partições foi possível identificar quais deles correspondiam às substâncias isoladas. A correlação entre o código da substância e o número dado no cromatograma está na Tabela 11.

Com a análise dos espectros de UV-Vis (Figura 61, pág. 68) e tempos de retenção das substâncias **Ca2** e **Cp2** foi possível determinar que ambas co-eluem formando o pico 19. A substância **Cp2** deve estar em maior proporção, pois, na maior parte do pico, o espectro de UV-Vis obtido assemelha-se mais ao dessa substância.

**Tabela 11.** Numeração dos picos correspondentes às substâncias conhecidas.

Substância	Número do pico
<b>Cp1</b>	23
<b>Cp2</b>	19
<b>Ca1</b>	13
<b>Ca2</b>	19
<b>Ca3</b>	14
<b>Ca4</b>	7

Os espectros de absorção molecular na região do ultravioleta e visível das substâncias conhecidas também foram úteis para sugerir a natureza de outros compostos presentes nos extratos e partições. Os picos 6, 9, 10, 12, 15, 17, 18 e 29 apresentaram espectros (Figura 52, pág. 62) com perfis semelhantes ao das flavanonas **Ca1** (13), **Ca3** (14) e **Ca4** (7), diferenciando-se dessas no valor da absorção máxima, indicando que essas substâncias podem ser flavanonas. O mesmo aconteceu com os picos 16, 22, 24 e 25, que apresentaram espectros (Figura 52, pág. 62) semelhantes ao das substâncias **Cp1** (23), **Cp2** (19) e **Ca2** (19). Esses dados sugerem que, nos extratos e partições (exceto a FAq), os flavonóides são as substâncias predominantes dentre aquelas possíveis de se detectar com a metodologia utilizada.



**Figura 61.** Estruturas e espectros de UV-Vis para as substâncias isoladas de *C. pubescens* e *C. adamantium*.

As substâncias isoladas foram utilizadas como padrões para obtenção das curvas analíticas por CLAE. Esse procedimento foi realizado utilizando o mesmo equipamento e método das demais análises por CLAE. Como as substâncias **Cp2** e **Ca2** coeluem, o qual não se conseguiu separar nas diferentes condições testadas, estas não foram quantificadas. Os parâmetros obtidos para cada curva são dados na Tabela 12 (pág. 69).

Os teores das substâncias **Cp1**, **Ca1**, **Ca3** e **Ca4** foram expressos em miligrama de substância por grama de extrato (mg/g) e são apresentados na Tabela 13 (pág. 69).

**Tabela 12.** Dados de regressão linear das curvas analíticas para determinação das substâncias isoladas dos frutos de *C. adamantium* e *C. pubescens*.

Parâmetros	Cp1	Ca1	Ca3	Ca4
IL (µg)	2,20-36,00	0,16-4,10	0,12-3,67	0,04-10,80
B	3363600	6580150	18035100	4959190
A	1637750	-1130730	-2371140	-161369
R	0,99974	0,99889	0,99978	0,99962
N	5	5	5	6

IL: intervalo linear em micrograma, B: coeficiente angular, A: coeficiente linear, R: coeficiente de correlação, N: número de amostras. Regressão linear, fórmula:  $Y = A + BX$ , onde Y: razão da área do pico, A: coeficiente angular, B: coeficiente linear, X: concentração (µg).

**Tabela 13.** Teores (mg/g) das substâncias isoladas dos frutos de *C. adamantium* e *C. pubescens*.

Espécie	Amostra	Cp1	Ca1	Ca3	Ca4
<i>C. pubescens</i>	EHex	172,26	21,66	9,94	17,17
	FHex	30,47	3,31	1,52	2,31
	FACN	459,63	26,88	10,77	18,46
	EAcOEt	34,47	8,18	4,54	8,80
<i>C. adamantium</i>	EEtOH	ND	5,78	3,23	2,60
	FButOH	ND	29,2	15,37	16,62

ND = não determinado

Em *C. pubescens* verifica-se que a partição do EHex concentrou os flavonóides na FACN, principalmente a substância **Cp1** que correspondeu a quase 50 % da FACN, enquanto a FHex apresentou teores mais baixos. Em função das estruturas e polaridade das substâncias isoladas este resultado era esperado. No EAcOEt observaram-se valores menores do que para o EHex. Como este extrato foi obtido a partir da borra resultante da extração com hexano, os teores apresentados também são coerentes, pois essas substâncias já haviam sido extraídas em grande quantidade no EHex.

A presença dessas substâncias no EEtOH dos frutos de *C. adamantium* indica que elas devem ser realmente as substâncias majoritárias nos frutos dessas duas espécies, pois continuam sendo detectadas mesmo após várias extrações com diferentes solventes (hexano e clorofórmio). Na partição do EEtOH também se observou a concentração dos flavonóides em uma das fases, mas nesse caso a separação foi total em relação às substâncias conhecidas. Na FAq não foi observado nenhum dos 29 picos encontrados nas outras amostras, enquanto que

na FButOH os teores para **Ca1** e **Ca3** foram superiores aos da FACN (*C. pubescens*) e o da **Ca4** foi muito próximo ao valor dessa amostra.

A chalcona **Cp2**, apesar de não ser quantificada por estar em mistura com a substância **Ca2**, também é uma das majoritárias nesses extratos. O pico 19, que contém essas duas substâncias, é tão intenso quanto o pico 23 (**Cp1**). A maior parte da área desse pico deve ser da substância **Cp2**, pois o espectro de UV-Vis, quando analisado em toda a extensão do pico, se assemelha muito mais ao espectro obtido para a **Cp2**.

A substância **Cp1** não foi determinada no EEtOH e na FButOH pois a área do pico dessa substância foi menor do que a área mínima da curva analítica.

As substâncias **Cp1** e **Ca2** foram quantificadas por CLAE em espécies do gênero *Metrosideros*, também pertencente à família Myrtaceae (MUSTAFA *et al*, 2005). Neste trabalho foram encontrados teores de 1,5 a 10,9 mg/g de **Cp1** em amostras de *M. fulgens* e de 3,6 a 5,3 mg/g de **Ca2** em uma amostra de *M. excelsa* (esses valores foram expressos em mg de substância por g de folhas secas). Nas espécies *M. carminea*, *M. colensoi* e *M. diffusa* não foram detectadas estas substâncias. Em *C. pubescens* o teor de **Cp1** em miligrama por grama de fruto, determinado pela soma do valor obtido para EHex (2,35 mg/g) e o EAcOEt (0,82 mg/g), é de 3,17 mg/g, valor que é superior ao obtido para uma das *M. fulgens*.

## 4.4 Testes químicos e biológicos

### 4.4.1 Teor de compostos fenólicos

Os teores para cada extrato testado foram calculados pela equação linear baseada na curva de calibração do ácido gálico, que é dada abaixo:

$$A: 0,0539.C - 0,0168, R = 0,9984$$

onde A é a média da absorbância, C é a concentração em microgramas de equivalentes de ácido gálico por mililitro de solução ( $\mu\text{g EAG/mL}$ ), R é o coeficiente de correlação, 0,0539 é o valor do coeficiente angular e -0,0168 é o coeficiente linear.

Constatamos que o resultado em miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g) variava dependendo da concentração utilizada no cálculo, com isso obtendo-se um valor diferente de teor de fenóis (em mg EAG/g) para cada concentração de

solução. Empregando cada concentração individualmente para o cálculo, há tendência das amostras em apresentar altos teores de fenóis para concentrações baixas de solução e valores menores de fenóis para soluções de concentração mais elevada. A Tabela 14 (pág. 71) traz o percentual da diferença entre o teor de fenóis (em mg EAG/g) para uma concentração mais baixa (200 µg/mL) e uma concentração mais alta (maior ou igual a 1000 µg/mL) de cada amostra. Esses dados evidenciam que o resultado do teste de fenóis (para as amostras estudadas neste) trabalho foi dependente da concentração da solução teste.

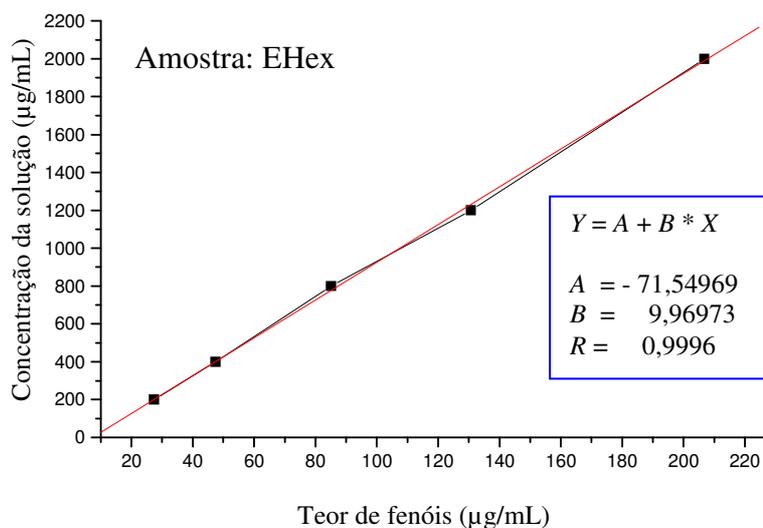
Verificou-se que plotando um gráfico com o teor de fenóis obtido para cada solução (em µg/mL, abscissa) e a concentração dessa solução (em µg/mL, ordenada) a relação era linear, como ilustra o gráfico na Figura 62 (pág. 72).

Sendo assim, para cada amostra foi plotado um gráfico de teor de fenóis em função da concentração da solução (Anexo 2, pág. 97). Fazendo a regressão linear das curvas desses gráficos obteve-se as equações lineares para cada uma delas (parâmetros na Tabela 15, pág. 72).

**Tabela 14.** Diferença entre os teores de fenóis calculados para concentrações altas e baixas.

Espécie	Amostra	Concentração da solução (µg/mL)	Teor de fenóis (mg EAG/g)	Diferença (%) <sup>1</sup>
<i>C. pubescens</i>	EHex	200	137	- 24,6
		2000	103,4	
	FHex	200	111,8	- 53,0
		2000	52,5	
	FACN	200	166,9	- 40,4
		2000	99,6	
EAcOEt	200	111,2	- 15,6	
	2000	93,8		
<i>C. adamantium</i>	EEtOH	200	68,3	- 41,4
		1000	40,1	
	FButOH	200	147,9	- 23,6
		1000	113	
	FAq	200	71	- 46,3
		1200	38,1	

<sup>1</sup>Diferença(%) = [(C<sub>MAIOR</sub> - C<sub>MENOR</sub>)/C<sub>MENOR</sub>] x 100. Onde C é a concentração da solução.



**Figura 62.** Gráfico correlacionando os teores de fenóis com as concentrações das soluções para o EHex.

**Tabela 15.** Parâmetros das curvas analíticas dos gráficos do teor de fenóis pela concentração das soluções.

Espécie	Amostra	A	B	R
<i>C. pubescens</i>	EHex	-71,55	9,9697	0,9992
	FHex	-337,73	19,815	0,9620
	FACN	-194,74	10,875	0,9976
	EAcOEt	-33,472	10,842	0,9998
<i>C. adamantium</i>	EEtOH	-219,96	30,368	0,9961
	FButOH	-75,474	9,4513	0,9995
	FAq	-202,58	29,567	0,9922

A: coeficiente linear. B: coeficiente angular. R: coeficiente de correlação.

Para calcular os valores apresentados na Tabela 16 (pág. 73) as concentrações das soluções obtidas tiveram seus valores primeiramente ajustados para 1 g/mL.

Não foi encontrada na literatura nenhuma referência sobre esse procedimento para calcular o teor de fenóis a partir da correlação com as soluções. Os métodos descritos procedem à determinação do conteúdo fenólico partindo de uma única solução do extrato, sendo essas em concentrações variadas (AMIM *et al*, 2006; ARABSHAHI-DELOUEE; UROOJ, 2006; DURMAZ *et al*, 2007). Um estudo mais aprofundado e com outras matrizes

vegetais devem ser realizados para que se possa propor uma alteração no tratamento dos dados obtidos nesse método, já consagrado de determinação do teor de fenóis.

Efetuada o cálculo a partir desse valor (1 g/mL), obteve-se o teor de fenóis (em µg EAG/mL) correspondente a um grama de extrato. Transformando a unidade do teor de fenóis de µg EAG para mg EAG obteve-se o resultado desejado, em mg EAG/g (Tabela 16, pág. 73).

Em *C. pubescens* o EHex apresentou o maior teor de compostos fenólicos (100,3 mg EAG/g). A partição desse extrato com acetonitrila concentrou esses compostos na FACN, que mostrou-se cerca de 82 % mais rica em fenóis do que a FHex. O EAcOEt mostra um teor de fenóis próximo ao do EHex. Somando os valores de EHex e EAcOEt obtemos 192,3 mg EAG/g, indicando que 19,2 % da massa extraída dos frutos é de substâncias fenólicas.

Em *C. adamantium* a FButOH mostrou-se mais rica em fenóis (105,8 mg EAG/g) indicando que a partição realizada com o EEtOH foi importante para concentrar os compostos fenólicos nessa fase, de onde foi possível isolar quatro flavonóides.

**Tabela 16.** Teor de fenóis totais para os extratos e partições.

<b>Espécie</b>	<b>Amostra</b>	<b>Teor de fenóis (mg EAG/g)</b>
<i>C. pubescens</i>	EHex	100,3
	FHex	50,5
	FACN	92,0
	EAcOEt	92,2
<i>C. adamantium</i>	EEtOH	32,9
	FButOH	105,8
	FAq	33,8

Neste trabalho não foram analisados todos os extratos obtidos com *C. pubescens* e *C. adamantium* e, provavelmente, por este fato os teores encontrados para os extratos e partições sejam inferiores aos encontrados para outras espécies de Myrtaceae como, por exemplo, em *Psidium guajava* (TACHAKITTIRUMGROD *et al*, 2007) e *Myrtus communis* L. (CHRYSSAVGI, 2008).

A quantificação de fenóis utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu tem suas desvantagens. Substâncias como açúcares, amins aromáticas, dióxido de enxofre e outras

substâncias inorgânicas agem como interferentes nesse teste (CHRYSSAVGI, 2008). Por isso esses resultados não devem ser considerados absolutos, mas sim um dado auxiliar na pesquisa de produtos naturais.

#### 4.4.2 Teor de flavonóides

O cálculo do teor de flavonóides em microgramas de equivalentes quercetina por grama de extrato (mg EQ/g) também apresentou um valor diferente para cada concentração da solução. Seguindo a mesma linha de raciocínio do caso dos compostos fenólicos fez-se a correlação entre o teor de flavonóides e a concentração das soluções. A equação da reta para o padrão quercetina está apresentada abaixo:

$$A: 0,0753.C - 0,0185, R = 0,995$$

onde  $A$  é a média da absorbância,  $C$  é a concentração em microgramas de equivalentes de quercetina por mililitro de solução ( $\mu\text{g EQ/mL}$ ),  $R$  é o coeficiente de correlação, 0,0753 é o valor do coeficiente angular e -0,0185 é o coeficiente linear.

A partir dessa equação calculou-se o teor de flavonóides em  $\mu\text{g EQ/mL}$ . Esses valores foram então graficados em função da concentração das soluções (em  $\mu\text{g/mL}$ ). Todos os gráficos obtidos apresentaram boa linearidade, como pode ser observado no Anexo 3 (pág. 98). A Tabela 17 traz os parâmetros das regressões lineares obtidas para gráficos.

**Tabela 17.** Parâmetros das curvas analíticas dos gráficos do teor de flavonóides pela concentração das soluções.

Espécie	Amostra	$A$	$B$	$R$
<i>C. pubescens</i>	EHex	68,14	5,9389	0,9995
	FHex	52,696	8,6946	0,9994
	FACN	81,68	6,8643	0,9971
	EAcOEt	-57,759	27,786	0,9991
<i>C. adamantium</i>	EEtOH	-747,13	299,34	0,9975
	FButOH	-84,559	35,18	0,9922
	FAq	-1396,6	548,53	0,9833

$A$ : coeficiente linear.  $B$ : coeficiente angular.  $R$ : coeficiente de correlação.

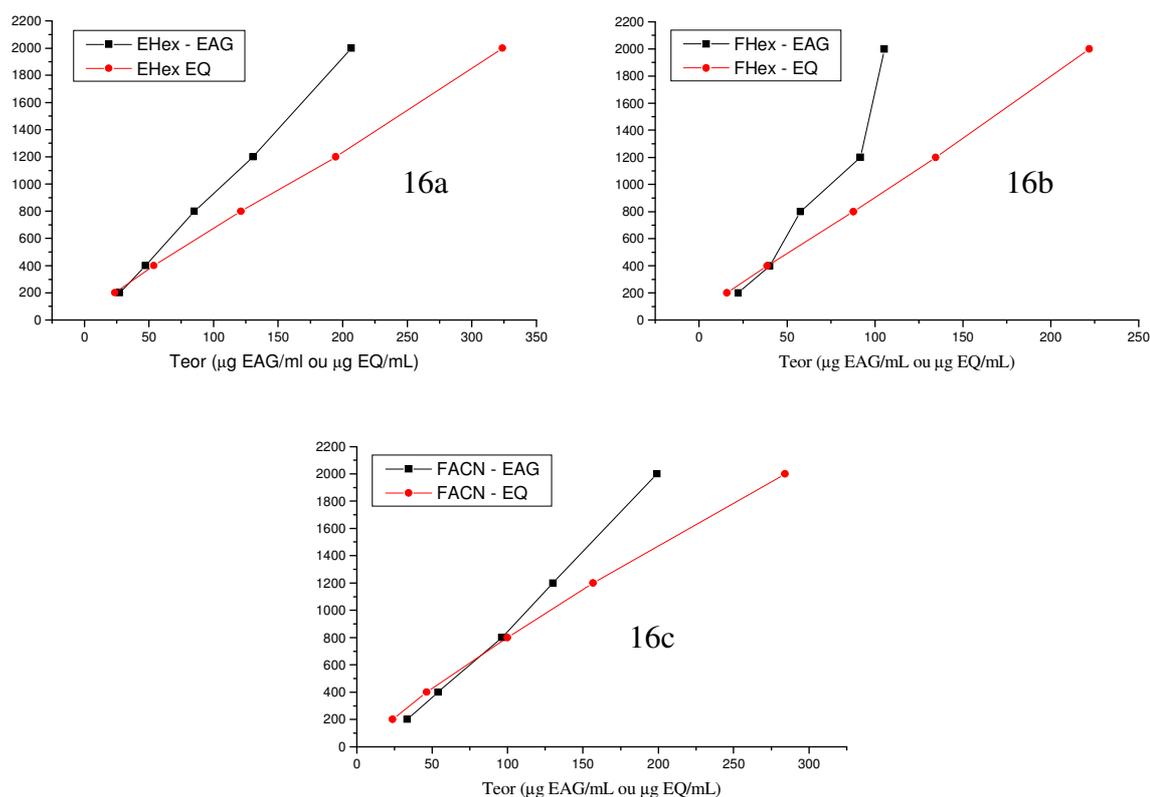
Os teores de flavonóides são dados na Tabela 18 (pág. 75). Para o EHex, a FHex e a FACN esses valores mostraram-se maiores do que os teores de fenóis (Tabela 16, pág. 73) para as mesmas amostras. Essa inversão aconteceu em outros extratos apolares do gênero *Campomanesia* estudados pelo grupo de pesquisa.

Os gráficos apresentados na Figura 63 (pág. 76) mostram a comparação entre as curvas utilizadas para calcular os teores de fenóis e o de flavonóides em miligramas de equivalente por grama de extrato. Nesta figura percebe-se que em concentrações baixas a tendência é de que esses valores sejam invertidos, ou seja, o teor de fenóis seja maior do que o teor de flavonóides.

O teste de flavonóides foi repetido para essas amostras, mas os resultados não foram alterados. Para tentar explicar essa inversão buscou-se avaliar a correlação entre o teor de fenóis e o de flavonóides graficando os dados. Todos os gráficos obtidos são mostrados no Anexo 4 (pág. 99).

**Tabela 18.** Teor de flavonóides para os extratos e partições.

<b>Espécie</b>	<b>Amostra</b>	<b>Teor de flavonóides (mg EQ/g)</b>
<i>C. pubescens</i>	EHex	168,4
	FHex	115,0
	FACN	145,7
	EAcOEt	36,0
<i>C. adamantium</i>	EEtOH	3,3
	FButOH	28,4
	FAq	1,8



**Figura 63.** Gráficos comparativos entre o teor de fenóis (linha em preto) e flavonóides (linha em vermelho) pela concentração da solução. 16a: extrato hexânico. 16b: fase hexânica. 16c: fase acetonitrila.

Os teores de fenóis e de flavonóides para os extratos e partições (EHex, FACN, EAcOEt, EEtOH e FButOH) apresentaram um coeficiente de correlação de 0,99, indicando boa linearidade. Enquanto para as partições (FHex e a FAq) essa linearidade não foi tão boa ( $R = 0,96$ ) (Anexo 4, pág. 99). Supõe-se que alguma outra substância não fenólica possa estar respondendo no teste para flavonóides e assim tirando a linearidade de algumas amostras. Um estudo da FHex vem sendo realizado por um aluno de iniciação científica e dados preliminares deste trabalho indicam que aproximadamente 78 %, em massa, dessa amostra é de uma substância não identificada que está presente em alguns extratos desta planta (ver Item 3.5.1, pág. 9). Outra constatação foi que essa substância responde ao teste para flavonóides, mostrando-se como um interferente neste.

Para a FHex sugere-se que essa substância tenha influenciado na resposta do teste de flavonóides e, por conseqüência, prejudicado na linearidade entre o teor de fenóis e o teor de flavonóides.

Sabemos, pelos dados da análise por CLAE, que a FAq não contém os flavonóides identificados em outros extratos dessas espécies. Também não deve conter a substância não identificada predominante na FHex pela polaridade da mesma. É necessário identificar os componentes químicos da FAq para tentar explicar o comportamento dessa amostra no teste.

#### 4.4.3 Atividade antioxidante

##### 4.4.3.1. Ensaio com o radical livre DPPH

Os valores das  $CI_{50}$  para os extratos e partições são dados na Tabela 19 (pág. 77). Os gráficos construídos para cada amostra compõe o Anexo 5 (pág. 100).

Em *C. pubescens* foram comparados os dois extratos brutos e observou-se que o EAcOEt apresentou atividade muito superior ao EHex, sendo cerca de doze vezes mais ativo. Por ser um solvente mais polar o acetato de etila deve ter extraído substâncias mais polares que podem ter conferido essa ação antioxidante ao extrato.

A análise por CLAE nos extratos e partições deste trabalho indicou a presença de outros flavonóides, além daqueles isolados. Faz-se necessária, então, a busca de uma correlação entre a atividade antioxidante e a quantidade de fenóis e flavonóides presentes nas amostras visando explicar os resultados obtidos.

**Tabela 19.** Valores de  $CI_{50}$  das amostras frente ao radical livre DPPH.

Espécie	Amostra	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>C. pubescens</i>	EHex	1844,7
	FHex	>2000,0
	FACN	294,9
	EAcOEt	149,5
<i>C. adamantium</i>	EEtOH	228,3
	FButOH	170,4
	FAq	306,0
	BHA (padrão)	0,86

A tentativa de justificar esta atividade com base em fenóis e flavonóides está baseada em dados da literatura, que relatam que entre as diversas classes de substâncias polares os fenóis se apresentam como antioxidantes potencialmente ativos (JAYATHILAKAN *et al*, 2007). Entre as substâncias fenólicas naturais largamente distribuídas no Reino Plantae, os flavonóides apresentam características estruturais que lhes dão a possibilidade de agir como antioxidantes (SEYOUM *et al*, 2006).

O EAcOEt apresenta teores de fenóis e flavonóides menores do que o EHex, porém apresenta maior atividade antioxidante, indicando que o determinante nesse resultado não foi a quantidade de substâncias fenólicas presentes, mas sim a ação das mesmas. O EAcOEt deve conter substâncias mais ativas frente ao teste que, por isso, mesmo sendo substâncias minoritárias, conferem elevada atividade à amostra.

Cinco dos flavonóides isolados dos frutos de *C. adamantium* e *C. pubescens* foram testados frente ao radical livre DPPH. A análise foi feita para apenas uma concentração (300 µg/mL) devido a pouca massa disponível de cada substância. Os resultados são dados na Tabela 20 (pág. 78).

Comparando os flavonóides isolados ao padrão BHA percebe-se que estes são fracamente ativos. Uma solução a 0,86 µg/mL de BHA é capaz de sequestrar 50,0 % do DPPH, enquanto que a substância **Ca4**, mais ativa dentre as testadas, sequestra apenas 23,4 % do DPPH em uma concentração cerca de 350 vezes superior à do BHA.

**Tabela 20.** Atividade antioxidante de cinco das substâncias isoladas de *C. adamantium* e *C. pubescens*.

Cp1 <sup>1</sup>	Cp2 <sup>1</sup>	Ca1 <sup>1</sup>	Ca3 <sup>1</sup>	Ca4 <sup>1</sup>	Padrão <sup>2</sup>
16,7	14,1	6,8	5,7	23,4	0,86

<sup>1</sup> Percentual de inibição na concentração de 300 µg/mL. <sup>2</sup> Valor da CI<sub>50</sub> para o BHA.

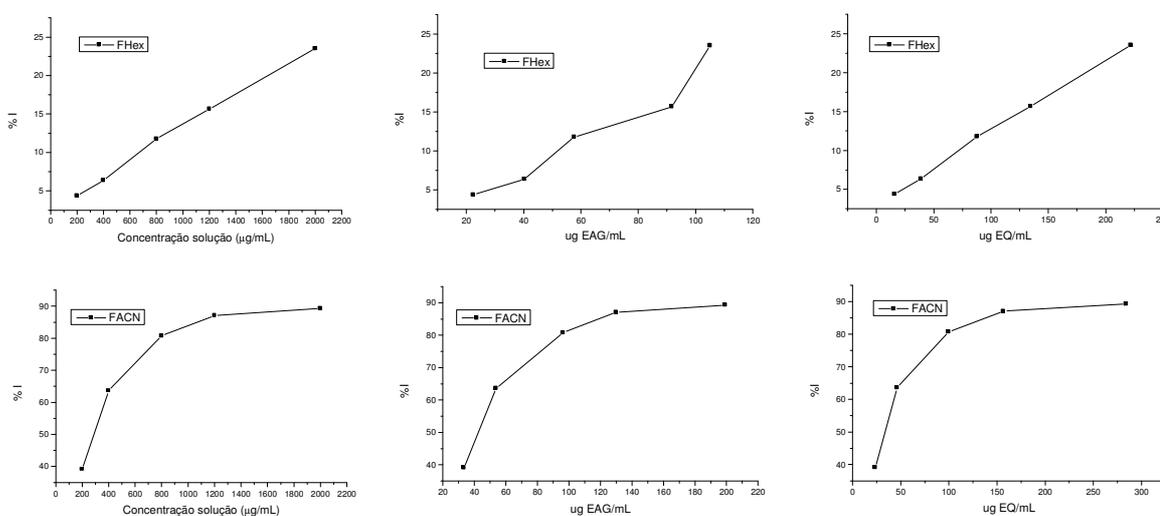
Com base nos dados apresentados na Tabela 20, as substâncias conhecidas nos extratos isoladamente não contribuem com grande intensidade para a atividade antioxidante observada.

No caso do EAcOEt o teor das substâncias conhecidas é menor do que no EHex e na FACN, mas mesmo assim este extrato apresentou a maior atividade o que nos auxilia a sugerir que a atividade antioxidante do EAcOEt seja relativa à substâncias minoritárias não identificadas nos demais extratos.

Comparando a atividade do EHex com suas partições (FHex e FACN) verifica-se que o tratamento com acetonitrila, separou de forma significativa as substâncias ativas frente ao teste com DPPH. A FACN mostrou um  $CI_{50}$  de 294,9  $\mu\text{g/mL}$  enquanto que na FHex a  $CI_{50}$  nem foi obtida, pois uma solução de 2000  $\mu\text{g/mL}$  desta última apresentou percentual de inibição de apenas 23,5 %, então por se tratar de um valor baixo obtido em concentração elevada não foi testado o comportamento desta fração em concentrações superiores.

Na fase ACN, suspeita-se que a atividade antioxidante tenha sido influenciada pelo alto teor das substâncias **Cp1** (459,6 mg/g) e **Cp2** nessa amostra. Apesar de não ser quantificada, acredita-se que a substância **Cp2** também esteja em alta concentração na FACN. O espectro de UV-Vis do pico que contém a mistura **Ca2/Cp2** é mais próximo ao apresentado pela **Cp2** e este pico tem uma área próxima à da **Cp1**.

Foram plotados gráficos com os teores de fenóis ( $\mu\text{g EAG/mL}$ ) e também de flavonóides ( $\mu\text{g EQ/mL}$ ) de cada solução em função do percentual de inibição (%I) gerado por essa solução. Os gráficos para todas as amostras são dados no Anexo 6 (pág. 101). Na Figura 64 (pág. 79) são mostrados os gráficos correspondentes a FHex e a FACN. Percebe-se que no caso da FHex o gráfico dos fenóis tem um perfil diferente do apresentado para a concentração da solução, enquanto que o dos flavonóides é muito semelhante ao da solução indicando que as substâncias que responderam ao teste do DPPH nessa amostra são as mesmas que foram quantificadas no ensaio de flavonóides. Provavelmente a atividade antioxidante observada para a FHex tenha sido influenciada pela substância não identificada presente em grande quantidade nesta fração.



**Figura 64.** Gráficos da comparação entre o teor de fenóis e flavonóides com a  $CI_{50}$  do DPPH para FHex (acima) e FACN (abaixo).

No caso da FACN observa-se que ambos os gráficos (com fenóis e flavonóides) apresentam um perfil semelhante ao da concentração das soluções. O EHex e o EAcOEt também apresentaram comportamento semelhante ao da FACN (comparar os dados do Anexo 5, pág. 100 com os do Anexo 6, pág. 101).

Em *C. adamantium* o EEtOH mostrou uma atividade considerável ( $CI_{50} = 228,3 \mu\text{g/mL}$ ). A partição desse extrato não resultou em atividades tão discrepantes como observado em *C. pubescens*. Isso significa que as substâncias ativas nesse teste foram distribuídas de forma mais homogênea entre as partições. Essas substâncias, porém, devem ser diferentes, pois na análise por CLAE não foram identificados flavonóides na FAq, enquanto que na FButOH foram identificadas essas substâncias.

A FButOH apresentou  $CI_{50}$  de  $170,4 \mu\text{g/mL}$  e a FAq de  $306,0 \mu\text{g/mL}$ . Comparando os gráficos de teor de fenóis e flavonóides em função do percentual de inibição do DPPH (Anexo 6, pág. 101) com aqueles utilizados para avaliar a atividade antioxidante (Anexo 5, pág. 100), percebemos que, para essas duas partições, a melhor resposta frente ao teste com DPPH foi das substâncias quantificadas como fenóis. No caso do EEtOH verifica-se que tanto fenóis, como flavonóides apresentaram um perfil semelhante ao do gráfico das concentrações das soluções.

Sugere-se que a atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH apresentada pela FButOH seja proveniente de substâncias fenólicas, entre elas os flavonóides. Enquanto a atividade da FAq deve ter origem em outras substâncias fenólicas presentes nessa amostra.

#### 4.4.3.2. Ensaio com o sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

Os valores de  $CI_{50}$  para o teste com o  $\beta$ -caroteno são dados na Tabela 21 (pág. 81) e os gráficos obtidos para cada amostra compõe o Anexo 7 (pág. 103).

O EAcOEt mostrou-se novamente como o mais ativo entre os extratos e partições de *C. pubescens*, com  $CI_{50}$  de  $383,5 \mu\text{g/mL}$ , indicando que seu estudo pode revelar substâncias com alta atividade antioxidante.

O EHex apresentou neste teste uma atividade antioxidante maior do que a FACN sugerindo que as substâncias que foram concentradas pela partição na FACN apresentam comportamentos diferentes frente aos dois métodos.

A FHex, apesar de não ter sua  $CI_{50}$  determinada (pelos mesmos fatores ocorridos no teste com DPPH), apresentou um aumento em sua atividade antioxidante. Para a maior concentração testada nessa amostra ( $2000 \mu\text{g/mL}$ ) o percentual de inibição no teste com o

radical livre DPPH foi igual a 23,5 %, enquanto que o valor obtido para o teste com  $\beta$ -caroteno foi de 45,2 %. Segundo Becker *et al* (2004), diferenças como essas podem estar relacionadas a vários fatores, tais como a estrutura das substâncias presentes em cada extrato, o mecanismo das reações envolvidas, a presença de interferentes e a influência do solvente sobre as substâncias antioxidantes.

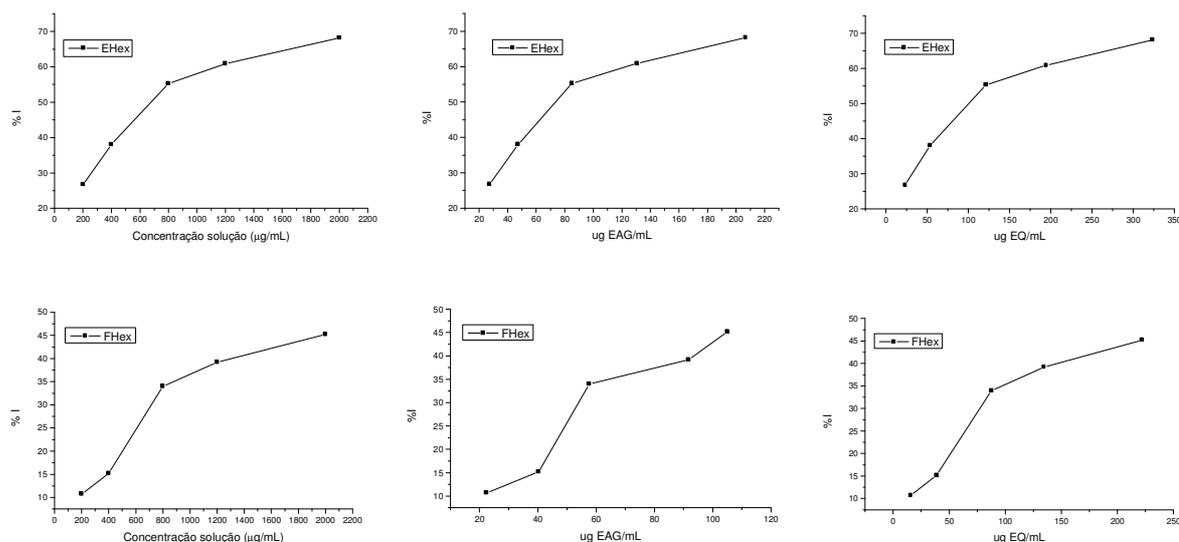
Em *C. adamantium* o EEtOH mostrou-se o mais ativo ( $CI_{50} = 374, \mu\text{g/mL}$ ). É interessante notar que, assim como em *C. pubescens*, as partições mostraram-se menos ativas do que seus extratos de origem no teste com  $\beta$ -caroteno. Baseado nestes dados é possível que exista um efeito sinérgico das substâncias desses extratos frente a esse teste. O sinergismo é um fenômeno em que alguns compostos quando juntos em um mesmo sistema apresentam uma atividade superior àquela esperada pela soma de suas atividades individuais (BECKER *et al*, 2004).

Assim como na discussão do teste de atividade antioxidante com DPPH, buscou-se correlacionar as atividades observadas para cada amostra com seus conteúdos de fenóis e flavonóides. Foram plotados gráficos correlacionando o teor de fenóis e o teor de flavonóides em função dos percentuais de inibição para o teste com  $\beta$ -caroteno, com o objetivo de verificar a influência dessas substâncias na atividade observada. Esses gráficos encontram-se no Anexo 8 (pág. 104). A Figura 65 (pág. 82) mostra os gráficos obtidos para o EHex e a FHex.

**Tabela 21.** Valores de  $CI_{50}$  no teste com  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.

Espécie	Amostra	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>C. pubescens</i>	EHex	677,1
	FHex	>2000,0
	FACN	1058,5
	EAcOEt	383,5
<i>C. adamantium</i>	EEtOH	374,2
	FButOH	942,7
	FAq	787,9
	BHA (padrão)	0,45

Com a análise desses gráficos (Anexo 8, pág. 104) percebe-se que para o EHex, a FACN e o EAcOEt as curvas com teor de fenóis e flavonóides são próximas às obtidas para a concentração da solução, enquanto que as demais amostras assemelham-se somente ao perfil de flavonóides, como no caso da FHex, ou ao perfil de fenóis, como no caso dos extratos e partições de *C. adamantium*.



**Figura 65.** Gráficos da comparação entre o teor de fenóis e flavonóides com a  $CI_{50}$  do  $\beta$ -caroteno para EHex (acima) e FHex (abaixo).

Essas observações indicam que os compostos fenólicos são responsáveis pela atividade de quase todas as amostras analisadas, exceto a FHex. Nos extratos e partições de *C. pubescens* estudados esses fenóis devem ser flavonóides, enquanto que as amostras analisadas de *C. adamantium* devem conter, em sua maioria, outros tipos de substâncias fenólicas.

O isolamento, identificação e avaliação das atividades antioxidantes de outras substâncias presentes nestes extratos e partições poderiam auxiliar na explicação das atividades observadas.

#### 4.4.5 Avaliação da toxicidade sobre *Artemia* sp.

O monitoramento de substâncias bioativas vem sendo inserido nos laboratórios de produtos naturais desde os anos 90. Um dos ensaios utilizados para esse fim é o teste de toxicidade de *Artemia salina* (TAS), que é um microcrustáceo de água salgada (Figura 66,

pág. 82, disponível em <<http://seplelessons.org/node/352>>) utilizado como alimento para peixes. Uma das vantagens desse teste consiste em seu baixo custo e fácil execução (SIQUEIRA *et al*, 1998).

Os extratos e partições de *C. pubescens* e *C. adamantium* tiveram sua toxicidade testada sobre as larvas recém eclodidas de *Artemia* sp. e os resultados são mostrados na Tabela 22.

**Tabela 22.** Resultados do teste de toxicidade sobre *Artemia* sp.

Espécie	Amostra	DL <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>C. pubescens</i>	EHex	> 1000
	FHex	> 1000
	FACN	> 1000
	EAcOEt	> 1000
<i>C. adamantium</i>	EEtOH	> 1000
	FButOH	> 1000
	FAq	> 1000



**Figura 66.** *Artemia* sp.

As amostras foram testadas nas concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL e não apresentaram nenhuma toxicidade. Os testes não foram refeitos em concentrações mais altas, pois segundo Meyer (In: SIQUEIRA *et al*, 1998) um extrato pode ser considerado tóxico se apresentar DL<sub>50</sub> menor que 1000 µg/mL.

#### 4.4.6 Atividade antimicrobiana preliminar

O teste de atividade antimicrobiana foi realizado com três bactérias (*Pseudomonas aeruginosa* - Hospitalar; *Staphylococcus aureus* - Hospitalar; *Escherichia coli* - ATCC 25922) e um fungo leveduriforme (*Candida albicans* - ATCC 10231). Os resultados para as amostras testadas são mostrados na Tabela 23.

Os padrões utilizados foram Nitrofurantoína 300 µg para *S. aureus*, Imipenen 10 µg para *P. aeruginosa*, Tetraciclina 30 µg para *E. coli* e Fuconazol 50 µg para *C. albicans*. O controle negativo foi realizado com etanol 80%.

**Tabela 23.** Resultados dos testes de atividade antimicrobiana. Halo de inibição (em mm)  $\pm$  desvio padrão.

Amostra	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
EHex	10,00 $\pm$ 0,03	4,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,00	24,00 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
FACN	4,00 $\pm$ 0,001	6,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	28,00 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
FHex	14,00 $\pm$ 0,03	8,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,00	26,00 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
EAcOEt	4,00 $\pm$ 0,03	6,00 $\pm$ 0,00	4,00 $\pm$ 0,00	26,00 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
EEtOH	12,00 $\pm$ 0,03	10,00 $\pm$ 0,00	4,00 $\pm$ 0,00	26,00 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
FBut	0,00 $\pm$ 0,00	10,00 $\pm$ 0,01	4,00 $\pm$ 0,00	22,00 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
FAq	16,00 $\pm$ 0,03	8,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,00	20,00 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
Padrão	24,00 $\pm$ 0,03	16,00 $\pm$ 0,00	4,00 $\pm$ 0,00	20,00 <sup>a</sup> e 22,00 <sup>b</sup>
Controle	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

<sup>a</sup>Halo de inibição do padrão referente às amostras indicadas com “a”. <sup>b</sup>Halo de inibição do padrão referente às amostras indicadas com “b”.

Os resultados obtidos revelam que os extratos e partições das duas espécies estudadas são potencialmente ativos sobre os microorganismos testados, especialmente sobre *C. albicans*. No entanto, a comparação dos resultados a fim de saber qual amostra foi mais ativa frente a cada microorganismo ficou prejudicada pelo fato de as concentrações das soluções testadas não terem sido as mesmas (Item 3.9.6, pág. 21). São necessários novos testes para verificar essas atividades.

Outro fato que justifica a necessidade de outros testes é o baixo valor do halo de inibição para o padrão utilizado no teste com *E. coli*. O valor do halo de inibição para a tetraciclina encontrado na literatura foi de 25,0 mm (VORAVUTHIKUNCHAI *et al*, 2004). Este mesmo artigo traz ainda os halos de outros antibióticos como amicacina (25,0 mm), gentamicina e canamicina (24,0 mm) e ampicilina (12,0 mm), para concentrações que variaram de 10 a 30  $\mu$ g por disco. Em outro trabalho a ampicilina apresentou um halo de inibição de 17,0 mm na concentração de 40  $\mu$ g/mL e a neomicina de 18,0 mm na mesma concentração (ABDELRAHIM *et al*, 2002). Este fato sugere que o teste realizado para as amostras de *C. pubescens* e *C. adamantium* pode ter sofrido alguma interferência, colocando em dúvida os valores obtidos. Contudo pode-se afirmar que as amostras apresentam potencial atividade antimicrobiana, mas devem ser realizados novos testes para quantificar essa ação antibiótica.

## 5. CONCLUSÃO

Foram isoladas e identificadas nos frutos de *C. adamantium* a chalcona 2',4'-diidroxil-3'-metil-6'-metoxichalcona (**Ca2**) e as flavanonas 5,7-diidroxil-6-metilflavanona (**Ca1**), 5,7-diidroxil-8-metilflavanona (**Ca3**) e 7-hidroxil-6-metil-5-metoxiflavanona (**Ca4**) e nos frutos de *C. pubescens* as chalconas 2',4'-diidroxil-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona (**Cp1**) e 2',4'-diidroxil-5'-metil-6'-metoxichalcona (**Cp2**).

Pela análise por CLAE-DAD verificou-se que essas seis substâncias estão presentes nas duas espécies. Os teores das substâncias **Ca1**, **Ca3** e **Ca4** nos extratos e partições de *C. adamantium* foram de: 5,78; 3,23; 2,60 mg/g para o EEtOH e 29,20; 15,37; 16,62 mg/g para o FButOH, respectivamente. Em *C. pubescens* as substâncias **Cp1**, **Ca1**, **Ca3** e **Ca4** apresentaram teores de 172,26; 21,66; 9,94; 17,17 mg/g para o EHex; 30,47; 3,31; 1,52; 2,31 mg/g, para a FHex, 459,63; 26,88; 10,77; 18,46 mg/g para a FACN e 34,47; 8,18; 4,54; 8,80 mg/g para a EAcOEt, respectivamente.

Por CG-EM foram identificadas 22 substâncias no extrato hexânico das folhas e 58 no extrato hexânico dos frutos de *C. pubescens*, além de 6 substâncias no extrato etanólico dos frutos de *C. adamantium*. A composição do óleo essencial foi caracterizada pela predominância dos monoterpenos e sesquiterpenos, sendo identificadas 61 substâncias nas folhas e 38 substâncias nos frutos de *C. pubescens*.

Em *C. pubescens* a fase hexânica dos frutos apresentou baixa atividade antioxidante ( $CI_{50} > 2000 \mu\text{g/mL}$ ), enquanto o extrato acetato de etila mostrou uma atividade mais acentuada nos dois ensaios realizados ( $CI_{50} = 149,5 \mu\text{g/mL}$ , DPPH e  $383,5 \mu\text{g/mL}$ ,  $\beta$ -caroteno). Em *C. adamantium* a fase butanólica foi a mais ativa frente ao teste com DPPH ( $CI_{50} = 170,4 \mu\text{g/mL}$ ) e o extrato etanólico foi o mais ativo no teste com  $\beta$ -caroteno ( $CI_{50} = 374,2 \mu\text{g/mL}$ ).

Os testes de atividade antimicrobiana indicaram que os extratos têm atividade sobre os microorganismos testados, porém outros estudos são necessários para se quantificar essa atividade. Foi determinada a ausência de efeito tóxico desses extratos sobre as larvas de *Artemia salina*.

Este estudo colaborou para ampliar o conhecimento científico destas espécies, de importância econômica e cultural no estado de Mato Grosso do Sul, e do gênero *Campomanesia*.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABDELRAHIM, S.I.; ALMAGBOUL, A.Z.; OMER, M.E.A.; ELEGAMI, A. Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. **Fitoterapia**, v. 73, 713–715, 2002.
- ADAMS, R. P.; **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**, Allured Publishing: Illinois- USA, 1995.
- ADATI, R. T.; FERRO, V. O. Volatile oil constituents of *Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum. (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**. v. 18, p. 691-692, 2006.
- ADITYACHAUDHURY, N.; DASKANUNGO, P. Structure of aurentiacin-A, a new chalcone isolated from *Didymocarpus aurentiaca*. **Plant Biochemical Journal** v. 2(2), 65-70, 1975.
- AMIN, I.; NORAZAIDAH, Y.; HAINIDA, K. I. E. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus species*. **Food Chemistry**, v. 94, 47-52, 2006.
- ARABSHAHI-DELOUEE, S. UROOJ, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.). **Food Chemistry**, 2006. doi:10.1016/j.foodchem.2006.07.013.
- ARAÚJO, J. M. A.; FARIAS, A. P. S. F. Redução do teor de limoneno e bergapteno no óleo essencial de bergamota adsorvido em sílica gel pelo CO<sub>2</sub> - supercrítico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23(2), 112-115, 2003.
- ARORA, C. K.; ARORA, R. B.; MESTA, C. K.; SHANBAG, S. N.; SESHARI, R.; MAHESHWARI, M. L.; BHATTACHARYA, S. C. Hypotensive activity of  $\beta$ -eudesmol and some related sesquiterpenes. **Indian Journal of Medical Research (1913-1988)**, v. 55(5), 463-72, 1967.
- BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research Technology**, v. 219, 561-571, 2004.
- BELOFSKY, G.; PERCIVILL, D.; LEWIS, K.; TEGOS, G. P.; EKART, J.; Phenolic Metabolites of *Dalea versicolor* that Enhance Antibiotic Activity against Model Pathogenic Bacteria. **Journal of Natural Products**, v. 67, 481-484, 2004.

- BIAVATTI, M. W.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L. M.; HORT, S.; SCHUSTER, L.; LEITE, S. N.; PRADO, S. R. T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenesis* (Jacq.) J. F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of the Ethnopharmacology**, v. 93, 385-389, 2004.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, 1199-1200, 1958.
- BONILLA, A.; DUQUE, C.; GARZÓN, C.; TAKAISHI, Y.; YAMAGUCHI, K.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y. Champanones, yellow pigments from the seeds of champa (*Campomanesia lineatifolia*). **Phytochemistry**, v. 66, 1736-1740, 2005.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v. 33, 179-189, 2000.
- CHEN, H-Y.; LIN, Y-C.; HSIEH, C-L. Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. **Food Chemistry**, v. 104, 1418-1424, 2007.
- CHRYSSAVGI, G.; VASSILIKI, P.; ATHANASIOS, M.; KIBOURIS, T.; MICHAEL, K. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. **Food Chemistry**, v. 107, 1120–1130, 2008..
- CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Estudo Comparativo do Perfil Químico e do Uso Popular de Espécies das Famílias Myrtaceae e Melastomataceae. In: **XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares**, Rio de Janeiro. Resumos... Rio de Janeiro, 2004.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. Wiley, England, 2001.
- DURMAZ, G.; ALPASLAN. Antioxidant properties of roasted apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel. **Food Chemistry**, v. 100, 1177-1181, 2007.
- EVANS, F. E.; MILLER, DWIGHT W.; CAIRNS, T.; BADDELEY, G. V.; WENKERT, E. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally occurring substances. Part 74. Structure analysis of proximadiol (cryptomeridiol) by carbon-13 NMR spectroscopy. **Phytochemistry**, v. 21(4), 937-938, 1982.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, 1, 171-178, 2006.

GIESE, S. O. **Estudo da composição química dos óleos florais de *Byrsonima brachybotrya* (Malpighiaceae)**. Paraná, 2005. [Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná].

GLISIC, S. B.; MILOJEVIC, S. Z.; DIMITRIJEVIC, S. I.; ORLOVIC, A. M.; SKALA, D. U. Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72(4), 311-320, 2007.

HERNANDEZ, T.; CANALES, M.; TERAN, B.; AVILA, O.; DURAN, A.; GARCIA, A. M.; HERNANDEZ, H.; ANGELES-LOPEZ, O.; FERNANDEZ-ARAIZA, M.; AVILA, G. Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111(1), 137-141, 2007.

HIDEYUKI, I.; HITOMI, I.; NAOKI, K.; MIYUKI, K.; TAKASHI, Y. Kunzeanones A, B, and C: novel alkylated phloroglucinol metabolites from *Kunzea ambigua*. **Tetrahedron**, v. 60, 9971-9976, 2004.

HWANG, Y-H; LEE, H-S. Antibacterial activity of *Pinus densiflora* leaf-derived components toward human intestinal bacteria. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12(4), 610-616, 2002.

JAYATHILAKAN, K.; SHARMA, G. K.; RADHAKRISHNA, K.; BAWA, A. S. Antioxidant potential of synthetic and natural antioxidants and its effect on warmed-over-flavour in different species of meat. **Food Chemistry**, v. 105, 908-916, 2007.

JL, J.; ZHANG, L.; WU, Y-Y.; ZHU, X-Y.; LV, S-Q.; SUN, X-Z. Induction of apoptosis by *D*-limonene is mediated by a caspase-dependent mitochondrial death pathway in human leukemia cells. **Leukemia & Lymphoma**, v. 47(12), 2617-2624, 2006.

JULSING, M. K.; KOULMAN, A.; WOERDENBAG, H. J.; QUAX, W. J.; KAYSER, O. Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. **Biomolecular Engineering**, v. 23, 265-27, 2006.

KISO Y; TOHKIN M; HIKINO H. Antihepatotoxic principles of *Atractylodes rhizomes*. **Journal of Natural Products**, v. 46(5), 651-654, 1983.

- LIMBERGER, R. P.; APEL, M.A.; SOBRAL, M. Aromatic Plant from Brazil - Chemical Composition of Essential Oils from Some *Campomanesia* species (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 13(2), 113-115, 2001.
- LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J-M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27(6), 916-919, 2004.
- LIN, J-Y.; TANG, C-Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation **Food Chemistry**, v.101, 140-147, 2007.
- LOCKSLEY, H. D.; FAYEZ, M. B. E.; RADWAN, A. S.; CHARI, V. M.; CORDELL, G. A.; WAGNER, H. Constituents of local plants. XXV. Constitution of the antispasmodic principle of *Cymbopogon proximus*. **Planta Medica**, v. 45(1), 20-22, 1982.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Vol.1, 3ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000
- LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*)**. Novo Odessa-SP. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2006, 178-190.
- MALTERUD, K. E.; ANTHONSEN, T.; LORENTZEN, G. B. Two new C-methylated flavonoids from *Myrica gale*. **Phytochemistry**, v. 16, 1805-1809, 1977.
- MARCONDES, A. A.; CORRÊA, M. A.; GUIMARÃES, O. A.; NAKASHIMA, T. **Extração e análise química de óleos essenciais de folhas verdes e frescas de *Campomanesia sessiflora* (Berg.) Mattos, VIA GC/MS-MSD**. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2000, Cuiabá. Resumos... Cuiabá: Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais, 2002. CD ROM.
- MARKMAN, B. E. O.; BACCHI, E. M.; KATO, E. T. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 94, 55-57, 2004.
- MARKMAN, B. E. O.; BUGNO, A.; TABA, M. O.; KATO, E. T. M. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *campomanesia xanthocarpa*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36, 55, 2002.

MENUT, C.; VERIN, P.; BESSIERE, J. M.; LAMATY, G.; HENRIQUES, A. T.; von POSER, G. L.; TOFFOLI, M. E.; SOBRAL, M. E. Chemical exploration of brazilian aromatic species belonging to the myrtaceae family. In: **Proceedings of 27<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils**, Vienna, Resumos... Vienna, 1996, 171-183.

MOKBEL, M. S.; HASHINAGA, F. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. **Food Chemistry**, v. 94, 529-534, 2006.

MORAIS, S. M.; JUNIOR, F. E. A. C.; SILVA, A. R. A.; NETO, J. S. M. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29(5), 907-910, 2006.

MUSTAFA, K.; PERRY, N. B.; WEAVERS, R. T. Lipophilic C-methylflavonoids with no B-ring oxygenation in *Metrosideros* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, 1049-1059, 2005.

NOGAMI, M.; MORIURA, T.; KUBO, M.; TANI, T. Studies on the origin, processing and quality of crude drugs. II Pharmacological evaluation of the Chinese crude drug "Zhu" in experimental stomach ulcer. (2). Inhibitory effect of extract of *Atractylodes lancea* on gastric secretion. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34(9), 3854-3860, 1986.

Óleos essenciais: plantas aromáticas brasileiras. **Aromas Tropicais**. Disponível em: <[http://www.aromastropicais.hpg.ig.com.br/outros\\_oleos.htm](http://www.aromastropicais.hpg.ig.com.br/outros_oleos.htm)>. Acesso em: 12/09/2005

OSÓRIO, C.; ALARCON, M.; MORENO, C.; BONILLA, A.; BARRIOS, J.; GARZÓN, C.; DUQUE, C. Characterization of Odor-Active Volatiles in Champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, 509-516, 2006

PIVA, M. G. **O Caminho das Plantas Medicinais: Estudo Etnobotânico**. Rio de Janeiro: Mondiran, (2002).

PORTET, B.; FABRE, N.; ROUMY, V.; GORNITZKA, H.; BOURDY, G.; CHEVALLEY, S.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; MOULIS, C. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. **Phytochemistry**, v. 68, 1312–1320, 2007.

RAGASA, C. Y.; CO, A. L. K. C.; RIDEOUT, J. A. Antifungal metabolites from *Blumea balsamifera*. **Natural Product Research**, v. 19(3), 231-237, 2005

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

- RIZK, A. M.; RIMPLER, H.; GHALEB, H.; HEIBA, H. I. Constituents of plants growing in Qatar. IX. The antispasmodic components of *Cymbopogon parkeri* Stapf. *International Journal of Crude Drug Research*, v. 24(2), 69-74, 1986.
- RODRIGUES, R.; RIBEIRO, B. B.; FOGLIO, M. A.; DUARTE, M. C. T.; CARVALHO, J. E.; NONAKA, J.; NAVARRO FILHO, C. V.; SACOMAN, J. L. Estudo sazonal fitoquímico, microbiológico e farmacológico do óleo essencial da *Campomanesia guazumaefolia* (Cambess.) O. Berg. In: **XIX-SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, Salvador. Resumos... Salvador, 2006. CD ROM.
- RUANGRUNGSI, N.; TANTIVATANA, P.; TAPPAYUTHPIJARN, P.; BORRIS, R. P.; CORDELL, G. A. Traditional medicinal plants of Thailand. VI. Isolation of cryptomeridiol from *Blumea balsamifera*. *Journal of the Science Society of Thailand*, v. 11(1), 47-50, 1985.
- SALEM, M. M.; WERBOVETZ, K. A. Antiprotozoal Compounds from *Psorothamnus polydenius*. *Journal of Natural Products*, v. 68, 108-111, 2005.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from Calycorectes, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. *Fitoterapia*, v. 66, 373-374, 1995.
- SEYOUM, A.; ASRES, K.; EL-FIKY, F. K. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, v. 67, 2058-2070, 2006.
- SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo químico de *Unonopsis lindmani* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, v. 21(5), 557-559, 1998.
- SOARES, A. C. Se bem não fizer, mal também não fará. *Revista Eletrônica de Ciências*, n 12, 2002. Disponível em: [http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigo/art\\_12/medicamento.html](http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigo/art_12/medicamento.html). Acesso em 14/01/2008.
- SRIVASTAVA, R.; SHAW, A. K.; KULSHRESHTHA, D. K. Triterpenoids and chalcone from *Syzygium samarangense*. *Phytochemistry*, v. 38, 687-689, 1995.
- SUMIMOTO, M.; ITO, H.; HIRAI, H.; WADA, K. Cryptomeridiol, the direct precursor of the endesmane series. *Chemistry & Industry*, v. 19, 780-781, 1963.
- TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOJI, S.; CHOWWANAPHOONPHON, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*, v. 103, 381-388, 2007.

TRUCOM, C. **A casca do limão contém D-limoneno.** 2005. Disponível em: <http://www.omarcardoso.com.br/modules.php?name=News&file=article&sid=47>. Acesso em: 14/01/2008.

VALLILO, M. I.; AGUIAR, O. T.; FIUMARELLI, J.; MARTINS JUNIOR, H. A.; SASSINE, A.; BUSILLOS, O. V. Identificação de terpenos no óleo dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. Landrum – Myrtaceae. **Arquivo do Instituto Biológico.** v.71 (supl.), 115-116, 2004.

VALLILO, M. I.; BUSTILLOS, O. V.; AGUIAR, O.T. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg – Myrtaceae. **Revista Instituto Florestal**, São Paulo, v. 18, 15-22, 2006a.

VALLILO, M. I.; GABERLOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E.; LAMARDO, L. C. A. Características físicas e químicas dos frutos do Cambucizeiro (*Campomanesia phaea*). **Revista Brasileira de Fruticultura.** v. 27 (2), 241-244, 2005.

VALLILO, M. I.; LAMARDO, L. C. A.; GABERLOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E.; MORENO, P. R. H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. **Ciência, Tecnologia e Alimentos.** Campinas, v. 26(4), 805-810, 2006b.

VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22(6), 540-544, 2007.

VIEIRA, T. R.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; PAULA, V. F.; NASCIMENTO, E. A. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 27(4), 536-539, 2004.

VORAVUTHIKUNCHAI, S.; LORTHEERANUWAT, A.; JEEJU, W.; SRIRIRAK, T.; PHONGPAICHIT, S.; SUPAWITA, T. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, 49-54, 2004.

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, A. R.; CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais sob a ótica da Química Medicinal Moderna.** UNOESC- Campus Chapecó: Argos-Editora Universitária, 2001. p. 317-334.

WOLLENWEBER, E.; KOHORST, G.; MANN, K.; Bell, J. M. Leaf gland flavonoids in *Comptonia peregrina* and *Myrica pensylvanica* (Myricaceae). **Journal of Plant Physiology**, v. 117(5), 423-430, 1985.

YE, C-H.; QIAN, F.; WEI, D-Z.; LU, Y-H.; LIU, J-W. Induction of apoptosis in K562 human leukemia cells by 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone. **Leukemia Research**, v. 29, 887-892, 2005.

YE, C-L.; LIU, J-W.; WEI, D-Z.; LU, Y-H.; QIAN, F. In vitro anti-tumor activity of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone against six established human cancer cell lines. **Pharmacological Research**, v. 50, 505-510, 2004b.

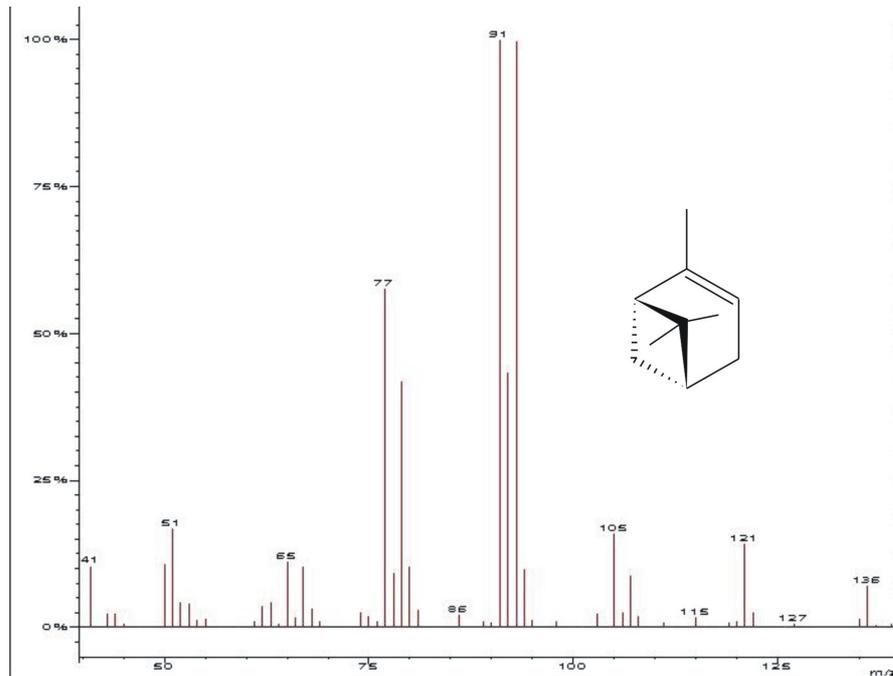
YE, C-L.; LU, Y-H.; WEI, D-Z. Flavonoids from *Cleistocalyx operculatus*. **Phytochemistry**, v. 65, 445-447, 2004a.

ZHAO, C-X.; LIANG, Y-Z.; FANG, H-Z.; LI, X-N. Temperature-programmed retention indices for gas chromatography-mass spectroscopy analysis of plant essential oils. **Journal of Chromatography A**, v. 1096, 76-85, 2005.

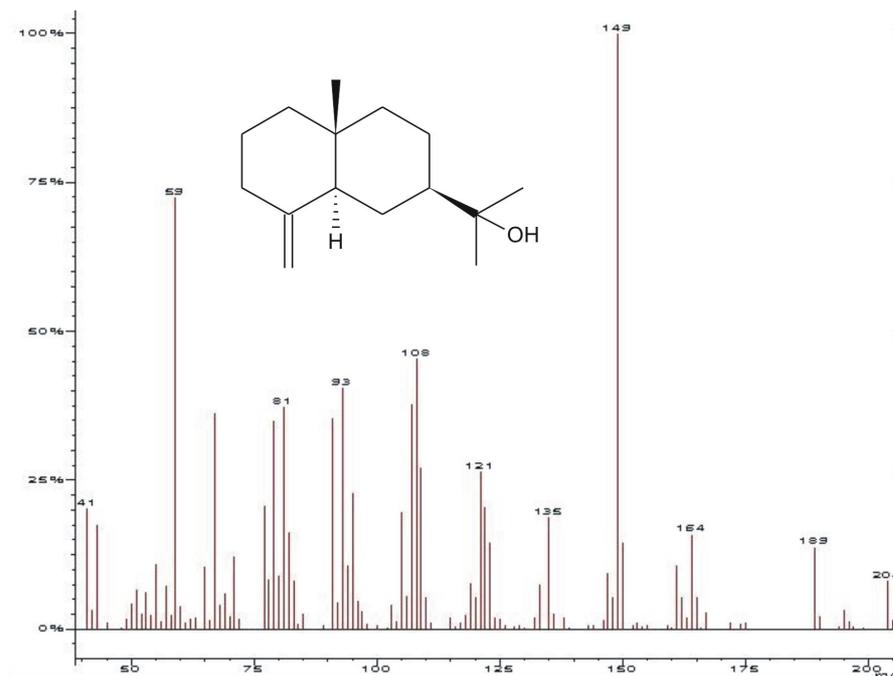
## ANEXOS

**Anexo 1** – Espectros de massa dos componentes voláteis isolados dos frutos de *C. adamantium*.

- $\alpha$ -pineno

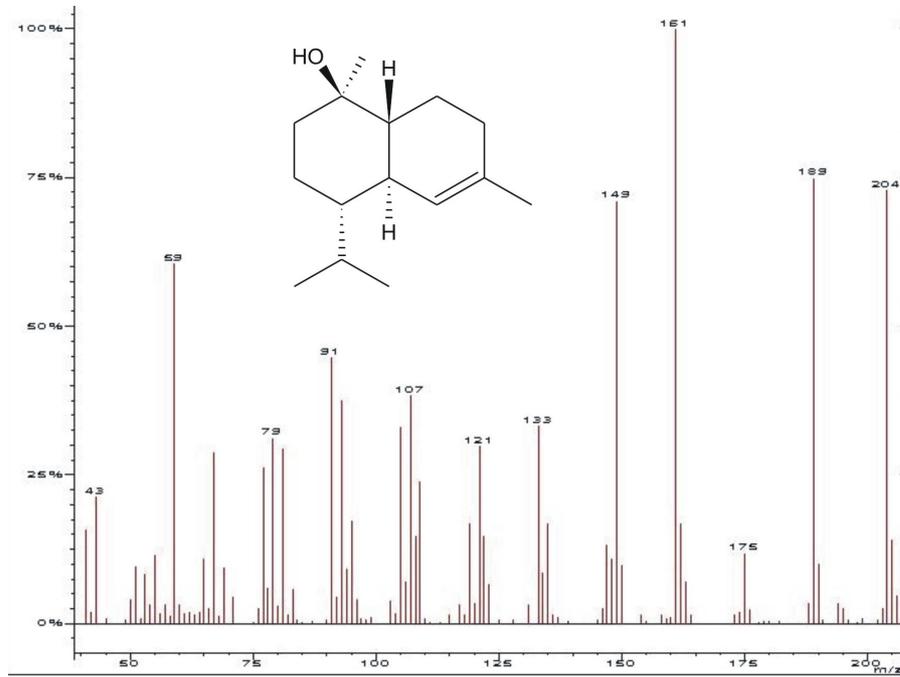


- $\beta$ -eudesmol

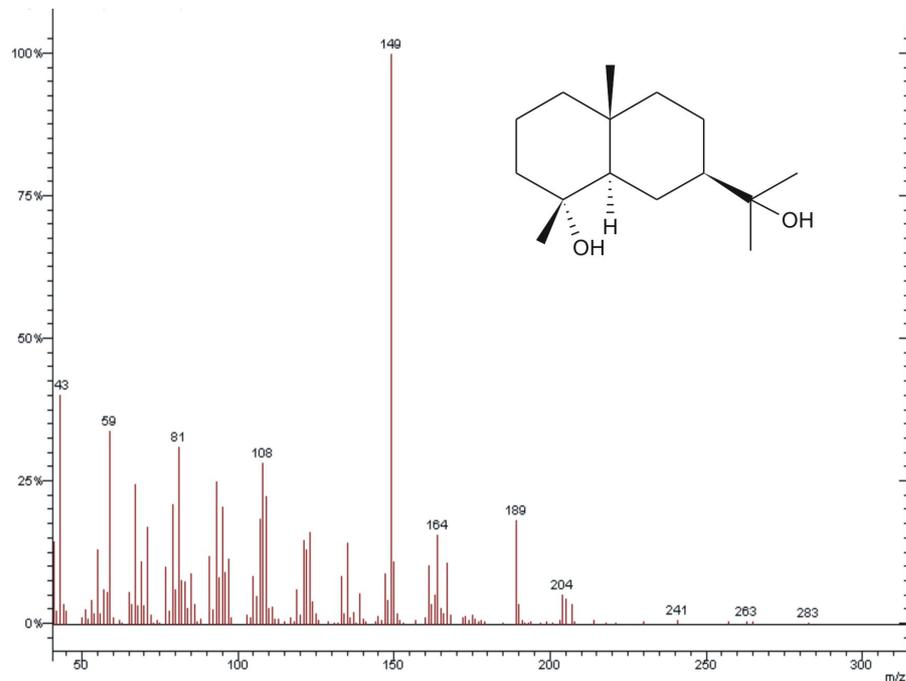


**Anexo 1** – Espectros de massa dos componentes voláteis isolados dos frutos de *C. adamantium* (continuação).

- $\alpha$ -cadinol

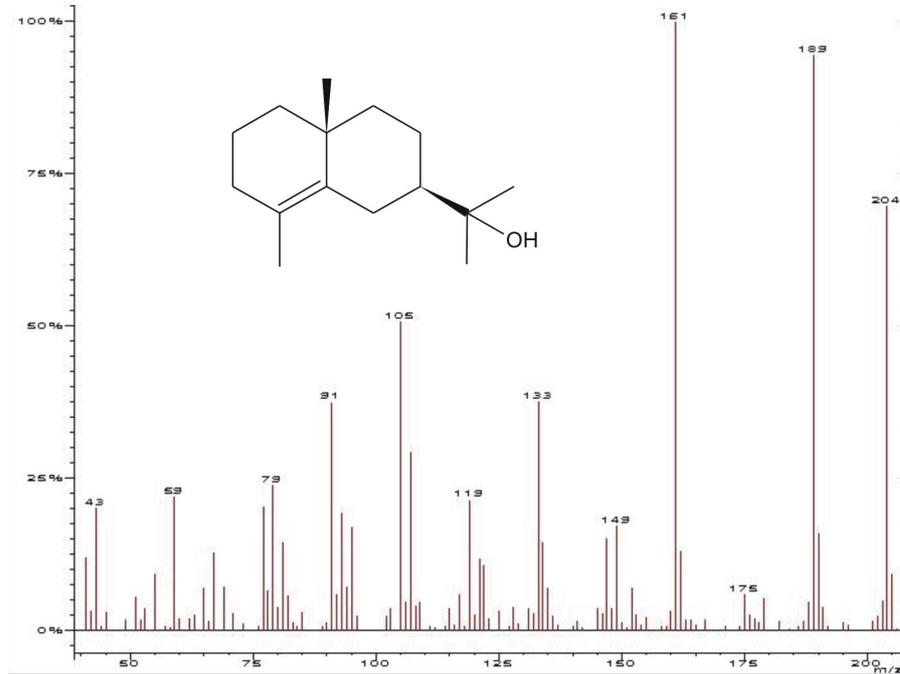


- Criptomeridiol

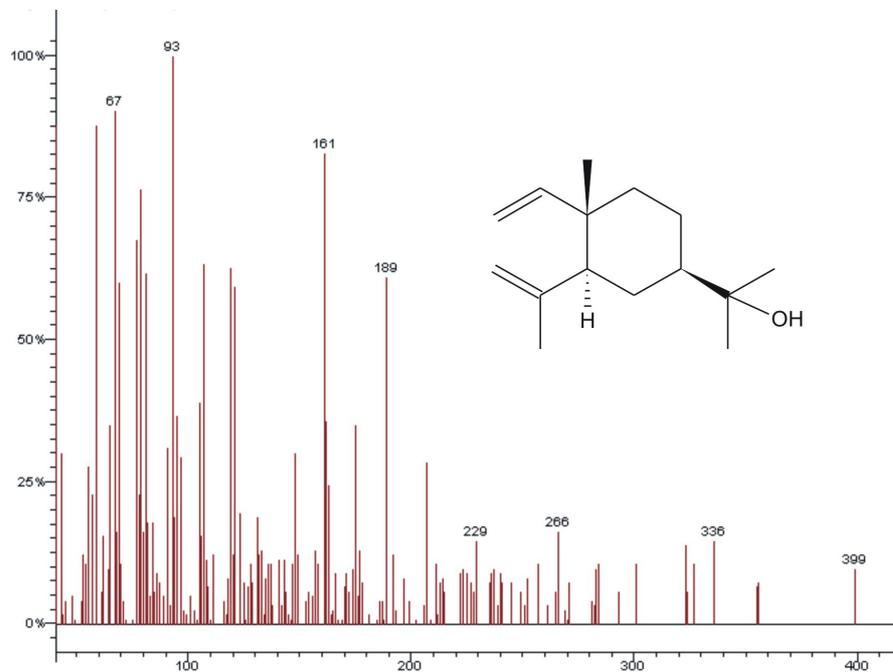


**Anexo 1** – Espectros de massa dos componentes voláteis isolados dos frutos de *C. adamantium* (continuação).

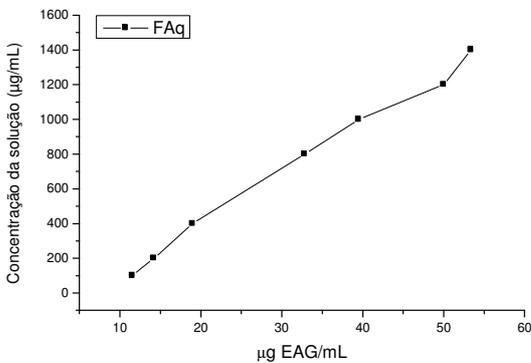
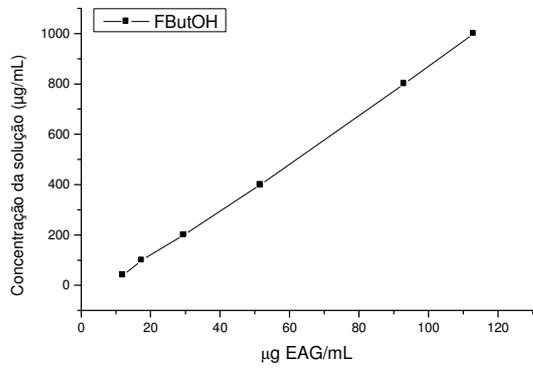
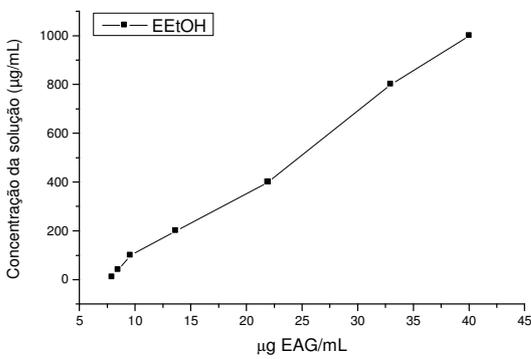
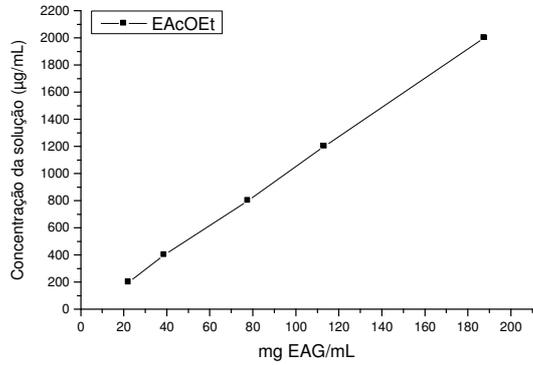
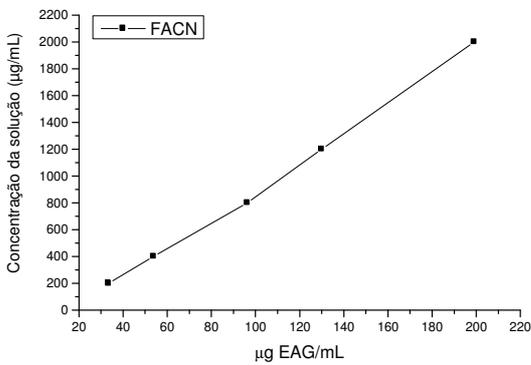
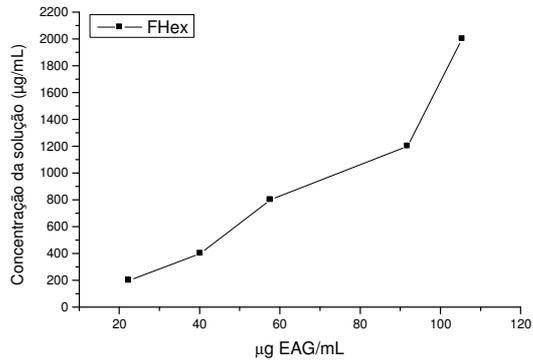
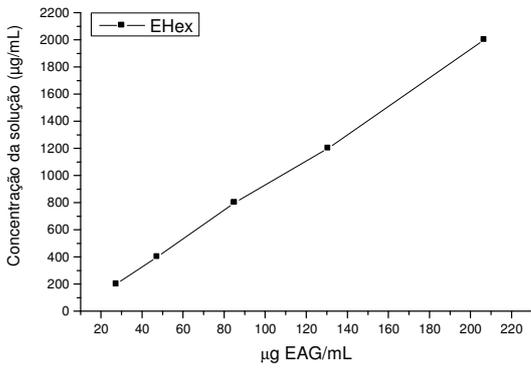
- $\gamma$ -eudesmol



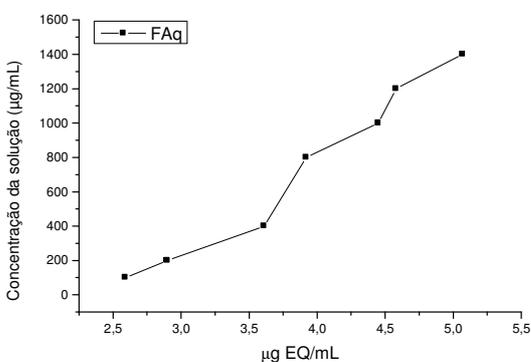
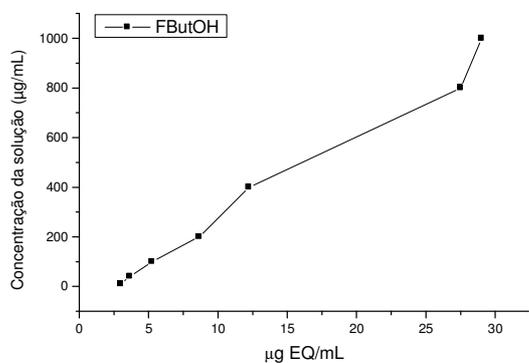
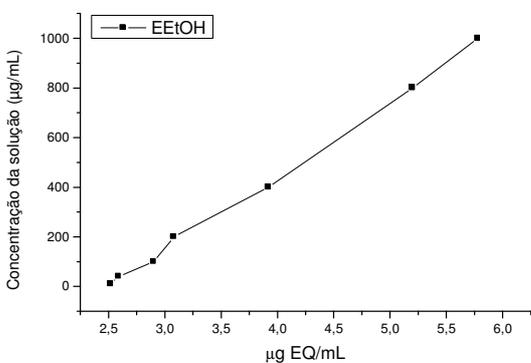
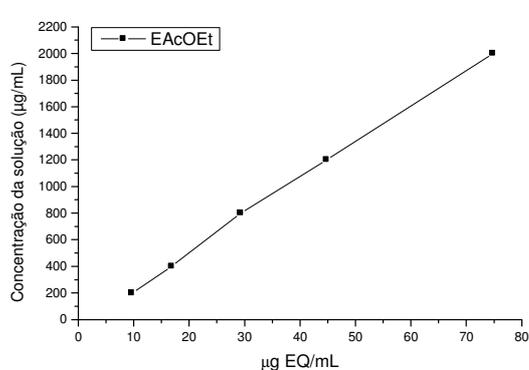
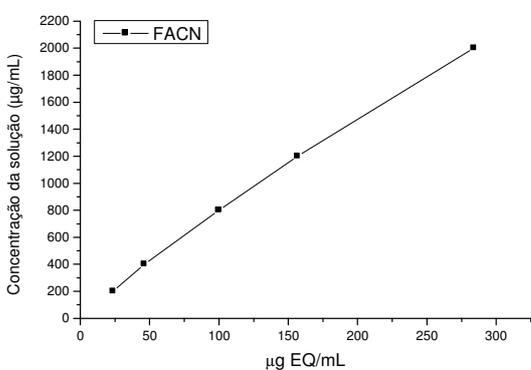
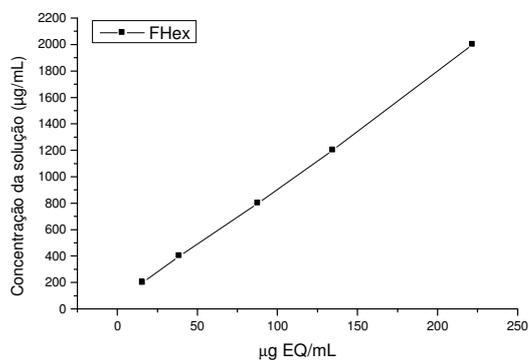
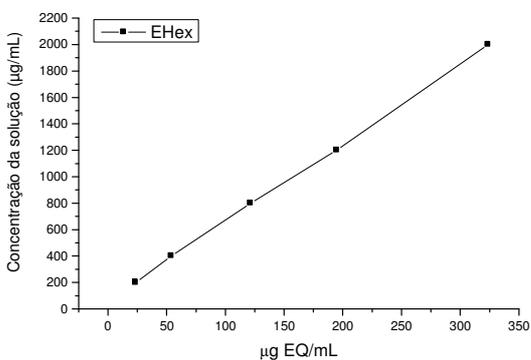
- Elemol



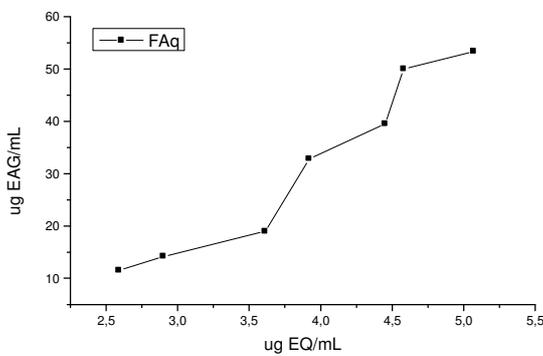
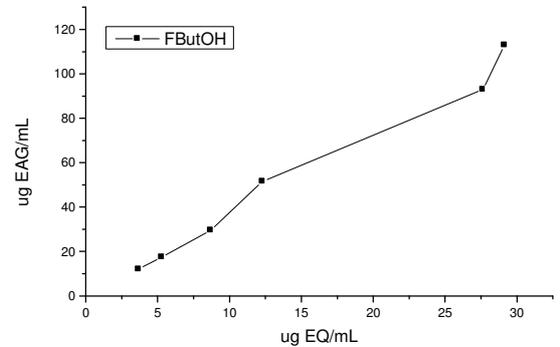
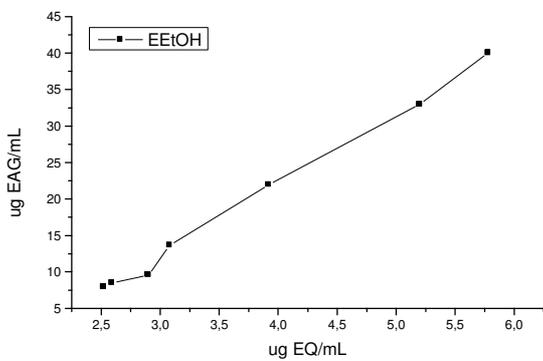
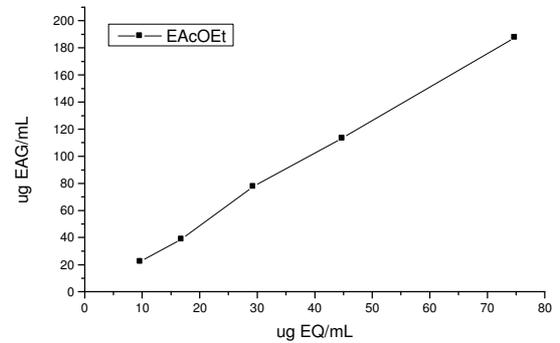
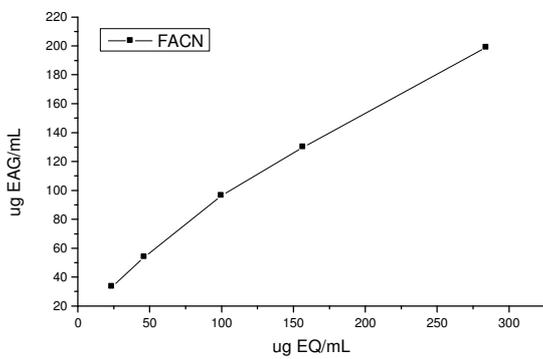
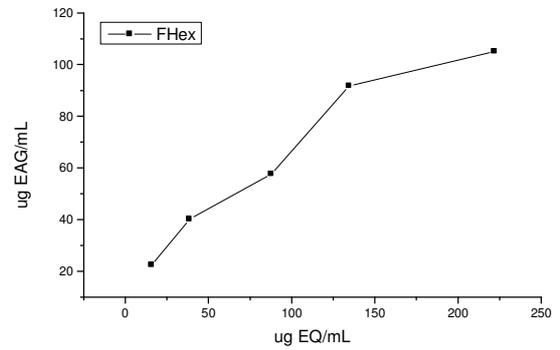
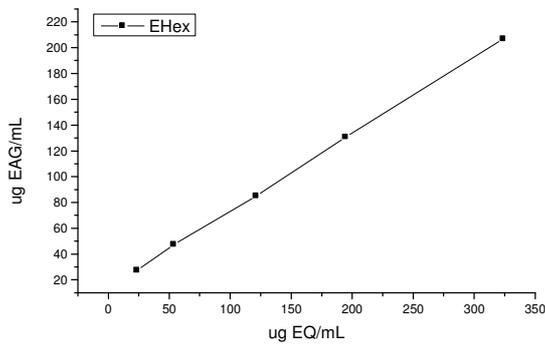
Anexo 2 – Gráficos do teor de fenóis em função da concentração da solução.



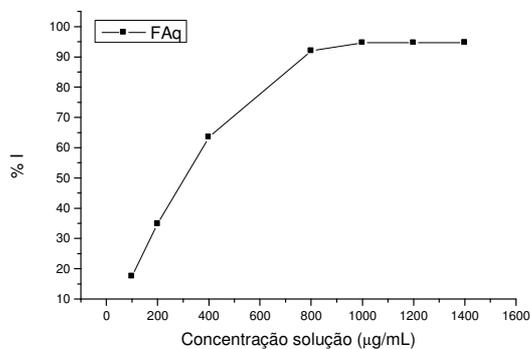
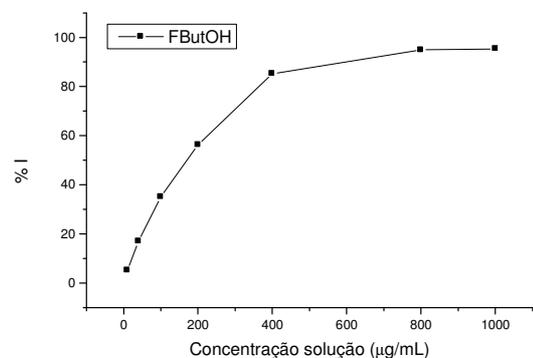
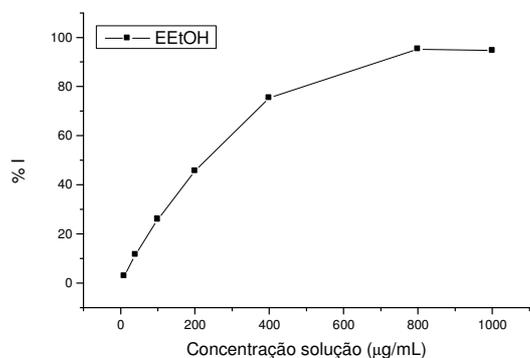
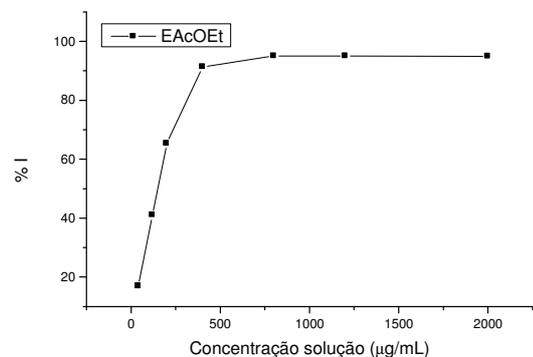
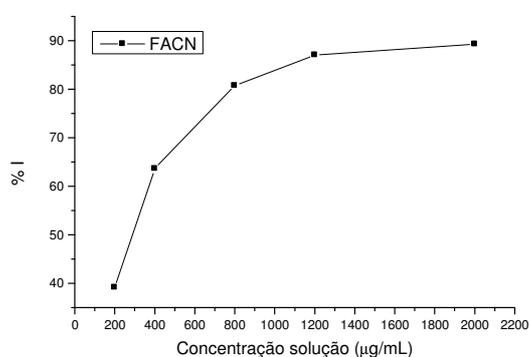
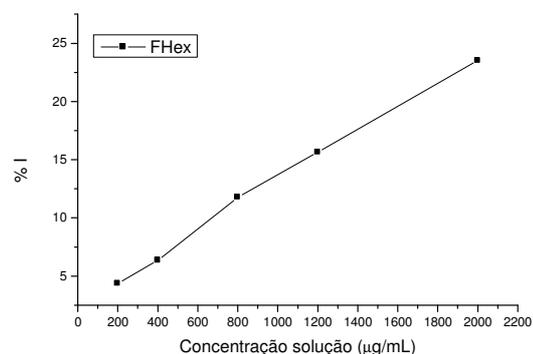
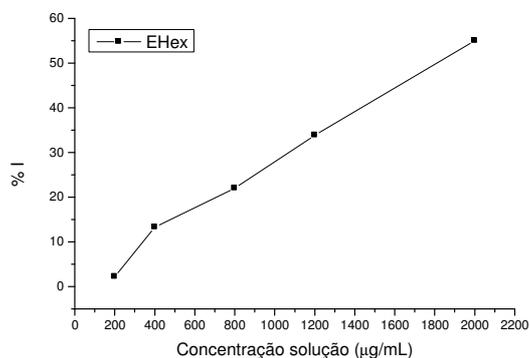
**Anexo 3** – Gráficos do teor de flavonóides em função da concentração da solução.



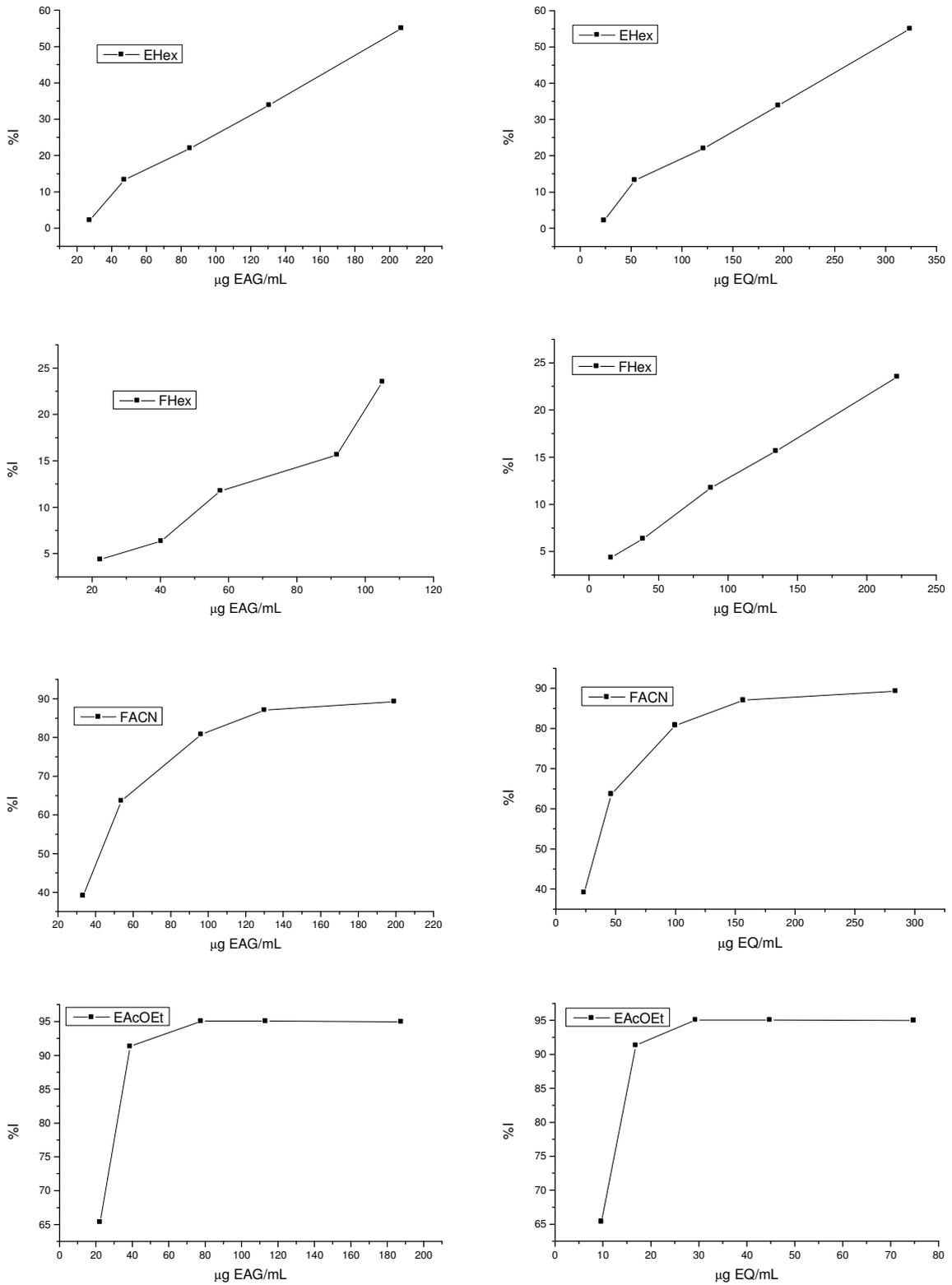
Anexo 4 – Gráficos do teor de flavonóides em função do teor de fenóis.



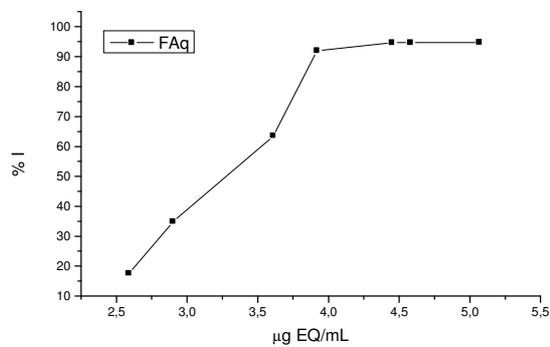
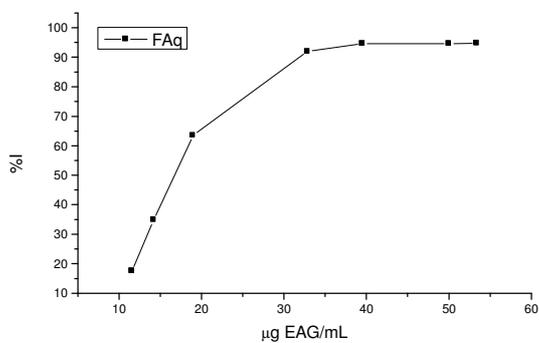
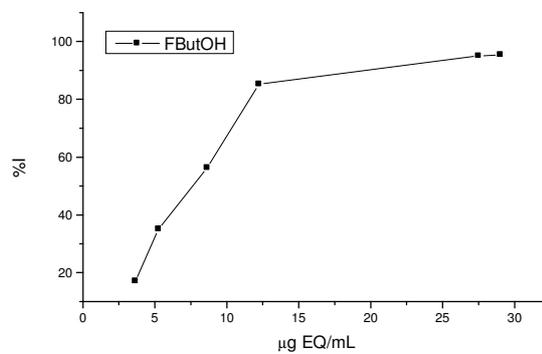
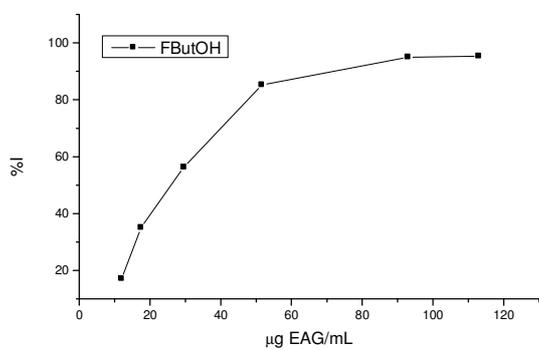
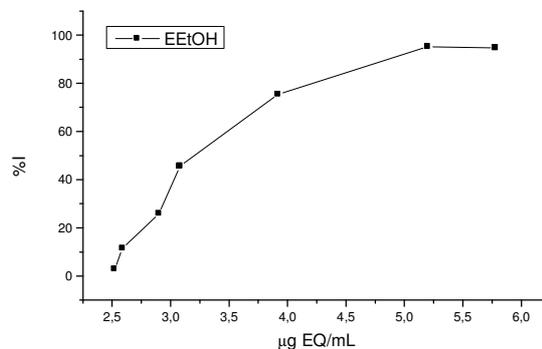
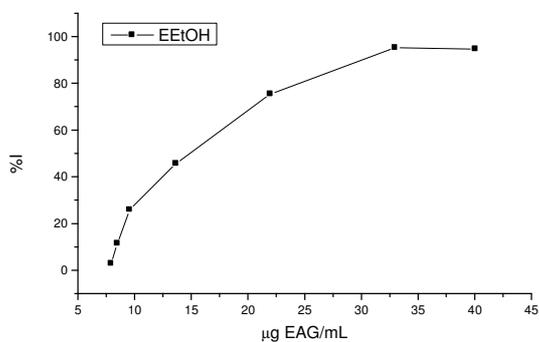
Anexo 5 – Gráficos da atividade antioxidante no teste com o radical livre DPPH.



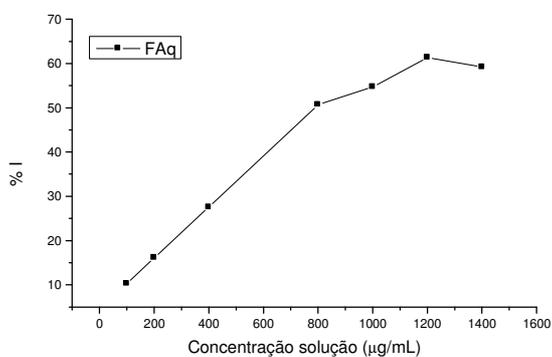
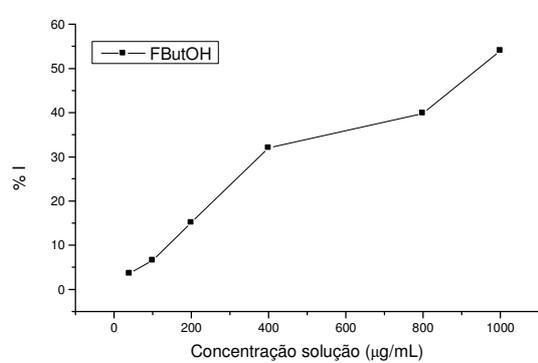
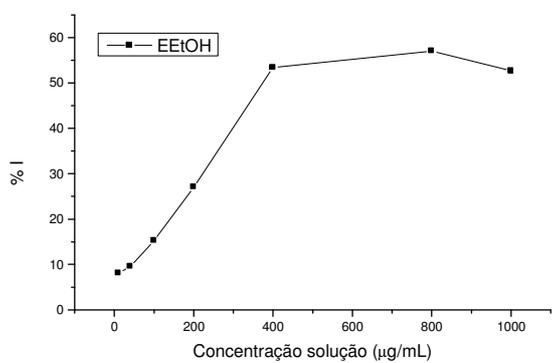
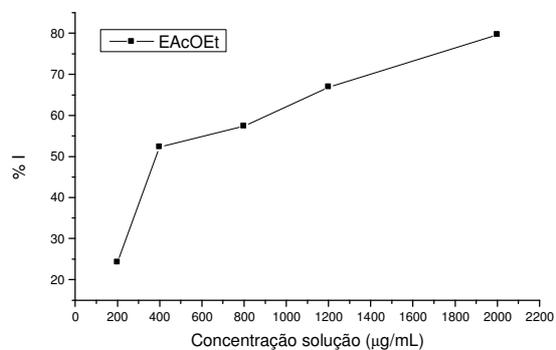
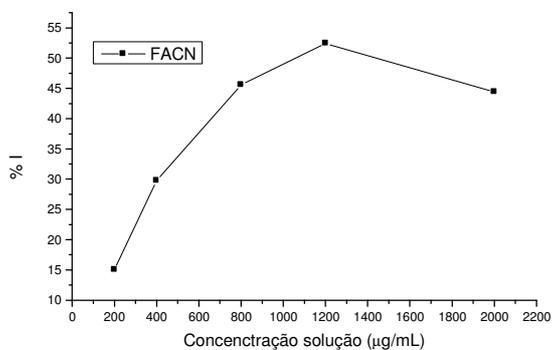
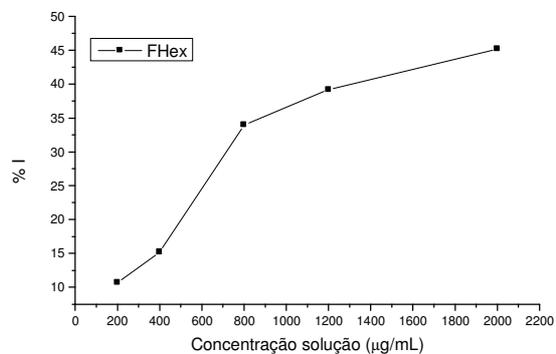
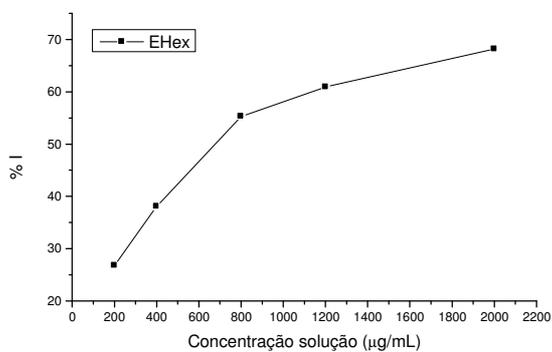
**Anexo 6** – Gráficos do teor de fenóis (à esquerda) e do teor de flavonóides (à direita) em função do percentual de inibição no teste com DPPH.



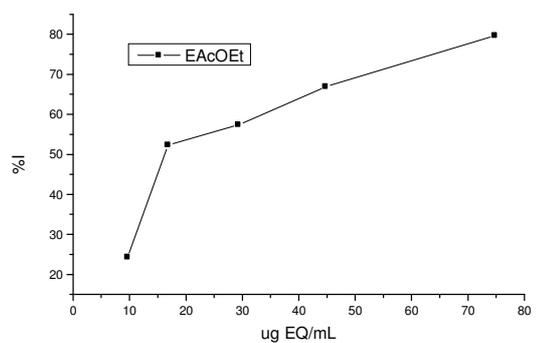
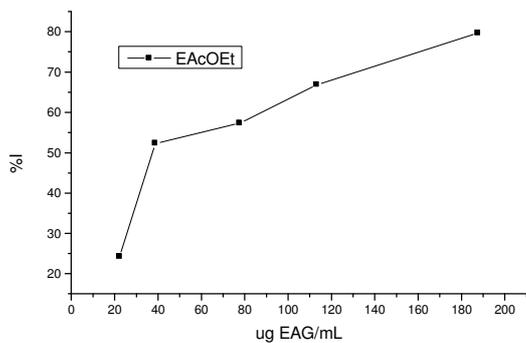
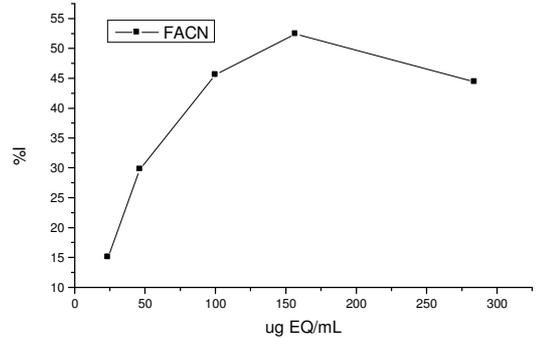
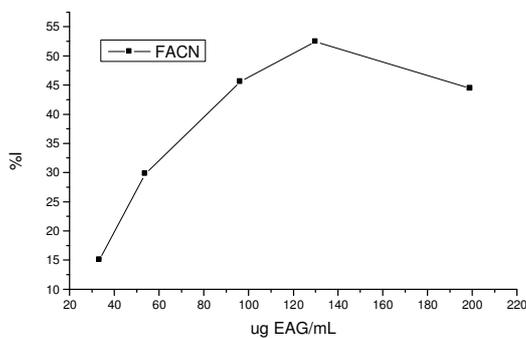
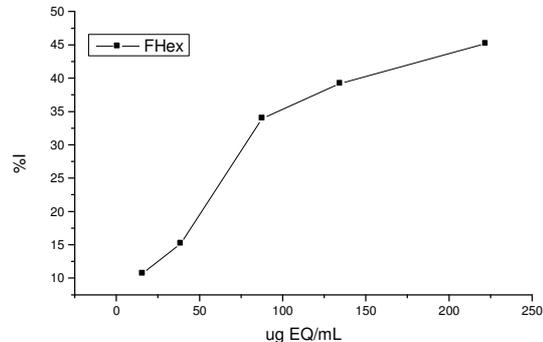
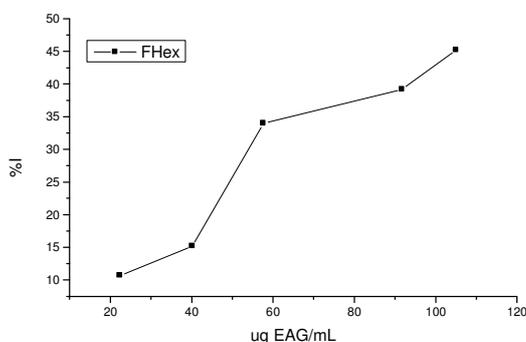
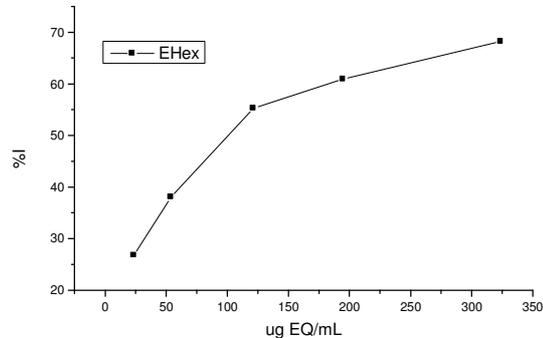
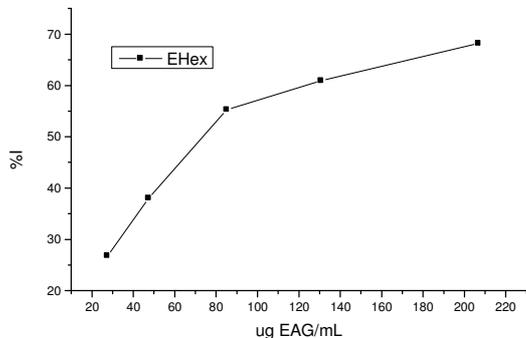
**Anexo 6** – Gráficos do teor de fenóis (à esquerda) e do teor de flavonóides (à direita) em função do percentual de inibição no teste com DPPH (continuação).



**Anexo 7** – Gráficos da atividade antioxidante no teste com o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.



**Anexo 8** – Gráficos do teor de fenóis (à esquerda) e do teor de flavonóides (à direita) em função do percentual de inibição no teste com  $\beta$ -caroteno.



**Anexo 8** – Gráficos do teor de fenóis (à esquerda) e do teor de flavonóides (à direita) em função do percentual de inibição no teste com  $\beta$ -caroteno (continuação).

