



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Determinação dos Constituintes Químicos e Avaliação das Atividades
Biológicas da Espécie *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae)**

Carla Karine Barbosa Pereira

Maceió-AL

2015



CARLA KARINE BARBOSA PEREIRA

**Determinação dos Constituintes Químicos e Avaliação das Atividades
Biológicas da Espécie *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae).**

Tese apresentada à Rede Nordeste de Biotecnologia como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, com área de concentração em Biotecnologia em Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana

Maceió-AL
2015

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Maria Auxiliadora G. da Cunha

P436d Pereira, Carla Karine Barbosa.
Determinação dos constituintes químicos e avaliação das atividades
Biológicas da espécie *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae) / Carla
Karine Barbosa. – 2015.
148 f. : il. tabs., grafs.

Orientador: Antônio Euzébio Goulart Santana.
Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO.
Maceió, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Composto fenólico - Embaúba. 2. Atividade alelopática.
3. Antioxidantes. 5. Ácido Tormêntico. I. Título.

CDU: 535.243:661.72

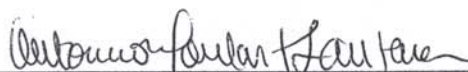
CARLA KARINE BARBOSA PEREIRA

Determinação dos Constituintes Químicos e Avaliação das Atividades Biológicas da Espécie *Cecropia pachystachya* Trécul. (Urticaceae).

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Aprovada em: 29/05/2015.

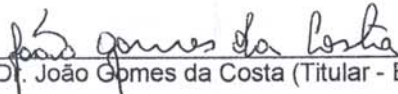
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Antonio Euzébio Goulart Santana (Orientador/UFAL)



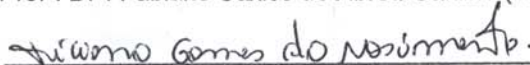
Prof.ª Dr.ª Márcia Vanusa da Silva RENORBIO (Titular - UFPE)



Prof. Dr. João Gomes da Costa (Titular - EMBRAPA - AL)



Prof.ª Dr.ª Fabiane Caxico de Abreu Galdino (Titular - IQB - UFAL)



Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento (Titular - ESENFAR - UFAL)

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por me dar forças e esperança em toda a minha caminhada.

Ao meu amado esposo Marcos André Rodrigues da Silva Júnior, presente de Deus na minha vida, por seu amor, cuidado e carinho, por estar sempre presente em todos os momentos, me incentivando e auxiliando (parceiro, amigo e conselheiro).

A minha querida família, dádivas de Deus, por serem meu porto seguro, meus pais, Carlos Alberto Feijó Pereira e Benicia Maria Barros Barbosa Pereira, por seu amor, carinho, conselhos sábios e por serem meu alicerce, aos meus irmãos Herisson Barbosa Pereira, Alyson Barbosa Pereira e Vanessa Kelly Barbosa Pereira da Silva, a minha avó Maria José Barros Barbosa, aos meus cunhados Rosana Maria de Oliveira Pereira e José Maciel da Silva e a minha sobrinha Alycia Rebeca de Oliveira Pereira (pinguim de gente!) por suas orações, amor e por sempre entenderem as minhas ausências.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana, pela confiança, paciência, oportunidade e ensinamentos.

A quatro Amigos especiais, Aldy dos Santos, Cenira Monteiro de Carvalho, Isis Torres Souza e Fátima Lúcia de Brito, com os quais pude contar inúmeras vezes, obrigada por seu companheirismo, carinho e cuidado comigo e por me acolherem, junto com suas famílias, me fazendo sentir em casa.

As queridas amigas Suely Torres (Susu) e Thaysa Torres (Zismã), por tanto carinho e cuidado comigo.

A pessoas muito especiais que foram importantes no andamento desse trabalho, as quais tenho um enorme carinho e respeito, Aldenir Feitosa, João Gomes da Costa e Margarida Teodoro.

Aos amigos de laboratório e de muitas horas, Daniel Lira, Ingrid Vieira de Melo, Junia Porto, Mariana Gomes, Merybeth, Nadia Jelves, Paulo Barcelos, Pedro Gregório e Vanderson Barbosa, por dividir experiências e pelos grandes momentos que tivemos juntos.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais, Mannoella Arcanjo, Edjane Vieira, Danielle de Lima, Henrique Fonseca, Kirley Michelly, Wbyratan Luis da Silva, Domingos Lusitâneo, Núbia, Thiago Ribeiro, Demetrius Albuquerque, Sheila, Ariana Nogueira, Arthur, Kelly Barbosa e Renara Kariny, por tantos momentos bons vividos.

As minhas queridas colaboradoras (ICs): Deise Veríssimos, Ihanara Lima, Krysthal Marrie, Grazielle Silmara, Lília Yamar e Keilane (valeu meninas!!).

Ao Prof. Dr. Edson Bento, a Adilson Sabino e Maria dos Prazeres, pela enorme contribuição com RMN e pela atenção.

A Prof. Dr. Marília O. F. Goulart, Iara Valentim e Jadriane, pela ajuda e contribuição no trabalho.

A Prof. Silvia Uchôa, e ao pessoal do NIT, pela ajuda no depósito da patente.

À FAPEAL e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa durante o doutorado.

MUITO OBRIGADA!!

"Portanto quer comais, quer bebais,
ou façais, qualquer outra coisa,
fazei tudo para a glória de Deus."

1 Coríntios 10:31

Resumo

O gênero *Cecropia* é composto por cerca de 60 espécies, com ampla distribuição, principalmente na Argentina, Brasil, México e Paraguai. Geralmente as espécies desse gênero são árvores encontradas na vegetação secundária com alturas entre 5 e 25 metros. As espécies deste gênero são conhecidas no Brasil por diversos nomes populares, dentre eles, embaúba, imbaúba, umbaúba e embaúva. O uso popular destas espécies está associado a chás, empregados nos tratamentos de doenças respiratórias, hipertensão, controle da glicemia e também como diurético. Algumas atividades biológicas já foram descritas para a espécie, dentre elas: efeitos cardiovasculares, efeito hipoglicemiante, efeito sedativo, atividade antioxidante e ação anti-inflamatória. O objetivo desse estudo foi isolar e identificar os princípios ativos da espécie *Cecropia pachystachya* e avaliar as atividades alelopática e antioxidante dos extratos etanólicos de diversas partes da planta, visando a obtenção de um produto. Os ensaios alelopáticos foram realizados frente a *Lactuca sativa*, para avaliar as alterações na germinação das sementes e no desenvolvimento do crescimento das plântulas. A atividade antioxidante, foi avaliada pela capacidade de sequestro do radical DPPH*, pelo efeito de proteção à peroxidação da membrana lipídica e pela capacidade de redução do ferro, sendo também determinado o teor de compostos fenólicos e quantificação de flavonóides. O estudo químico da espécie foi realizado pelo isolamento e identificação dos compostos oriundos dos extratos etanólicos, através do uso de técnicas cromatográficas e espectroscópicas; padronização de um método de obtenção do triterpeno ácido tormêntico e avaliação sazonal desse constituinte químico presente nos extratos. Os resultados obtidos indicam que os extratos etanólicos da *C. pachystachya*, apresentam efeito inibidor na germinação e crescimento de *L. sativa* e apresentam potente capacidade antioxidante. Além disso, os extratos possuem altos teores de compostos fenólicos e flavonóides. Na análise química dos extratos etanólicos, foi possível isolar e elucidar 4 substâncias, o ácido tormêntico, o ácido tormêntico acetilado e outras duas substâncias, denominadas de I.S.I. e FR2. O método de obtenção e isolamento do ácido tormêntico foi padronizado e observado a variação sazonal deste composto, demonstrando que o mês de maior produção do composto foi em maio de 2014, e a parte da planta que tem a maior produção desta substância é a raiz, sendo os extratos obtidos a frio. Diante de todas as atividades apresentadas e da identificação química, de classes de compostos e substâncias para esta espécie, ela pode ser considerada como uma importante fonte renovável destas substâncias.

Palavras-chaves: embaúba, variação sazonal, atividade alelopática, atividade antioxidante, ácido tormêntico.

Abstract

The *Cecropia* genus consists of about 60 species, widely distributed, mainly in Argentina, Brazil, Mexico and Paraguay. Generally the species of this genus are found in secondary forest trees with heights between 5 and 25 meters. The species of this genus are known in Brazil by several common names, including, embaúba, imbaúba, umbaúba and embaúva. The popular use of these species is associated with teas, employed in the treatment of respiratory diseases, hypertension, glycemic control and as a diuretic. Some biological activities have been described for the species, such as: cardiovascular effects, hypoglycemic effect, sedative effect, antioxidant and anti-inflammatory action. The objective of this study was to isolate and identify the active principles of *Cecropia pachystachya* species and evaluate the allelopathic and antioxidant activities of ethanol extracts from different parts of the plant, in order to obtain a product. The allelopathic assays were performed against *Lactuca sativa*, to evaluate changes in seed germination and development of seedling growth. The antioxidant activity was evaluated by the scavenging capacity of DPPH[•] at peroxidation protective effect of the lipid membrane and the iron reduction capacity, and also determined the content of phenolic compounds and quantification of flavonoids. The study of the chemical species was performed by the isolation and identification of compounds originating from the ethanol extracts by the use of chromatographic and spectroscopic techniques; standardization of a method of obtaining the triterpene tormêntico acid and seasonal evaluation of this chemical constituent present in the extracts. The results indicate that ethanol extracts of *C. pachystachya*, have inhibitory effect on the germination and growth of *L. sativa* and have potent antioxidant capacity. Moreover, extracts have high levels of flavonoids and phenolic compounds. In the chemical analysis of the ethanol extracts, it was possible to isolate and elucidate 4 substances, tormêntico acid, acetylated tormêntico acid and two other substances, called ISI and FR2. The method of production and isolation of tormêntico acid was standardized and observed seasonal variation, showing that the month of increased production of the compound was in may 2014, and the part of the plant has the highest production of the substance is the root, and the extracts cold. Due to all the presented activities and chemical identification of classes of compounds and substances for this species, it may be considered as an important renewable source of these substance.

Keywords: *Cecropia pachystachya*, ethanol extracts, allelopathic activity, antioxidant activity and phenolics.

Lista de Ilustrações

Introdução

Quadro 1. Estruturas dos principais constituintes químicos isolados de *Cecropia pachystachya* e suas atividades biológicas 16

Revisão de literatura

Figura 1. Foto da espécie *Cecropia pachystachya*, raiz e tronco..... 21

Figura 2. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários..... 26

Figura 3. Biossíntese dos terpenos pelas vias do mevalonato (MVA) e do metileritritol (MEP)..... 27

Artigo 1: Potential allelopathic effect of *Cecropia pachystachya* Trecul on *Lactuca sativa*.

Figure 1. Effect of Embauba plant extracts obtained from different parts of the plant on lettuce seed germination. 51

Figure 2. Effect of extracts obtained from of the Embauba plant on the development of the shoot length. 52

Figure 3. Effect of extracts obtained from different parts of the Embauba plant on the root length of lettuce seedlings. 53

Artigo 2: Antioxidant capacity in vitro and chemical profile of *Cecropia pachystachya* Trecul extracts.

Figure 1. Lipid peroxidation protection (%) provided by the ethanolic extracts of *Cecropia pachystachya* (0.5 mg/mL) and positive control (Trolox 10 µmol/L)..... 69

Figure 2. Chromatograms of the leaves ethanol extract of *Cecropia pachystachya* and standards. 71

Figure 3. Chromatograms of the stem ethanol extract of *Cecropia pachystachya* and standards. 71

Figure 4. Chromatograms of the root ethanol extract of *Cecropia pachystachya* and standards..... 72

Figure 5. Chromatograms of the root bark ethanol extract of *Cecropia pachystachya* and standards..... 72

Figure 6. Chromatograms of the stem bark ethanol extract of *Cecropia pachystachya* and standards..... 73

Artigo 3: Constituintes químicos dos extratos de *Cecropia pachystachya* Trécul.

Figura 1. Espectro na região do infravermelho da amostra I.F.1.A. em ATR..... 86

Figura 2. Espectro de RMN 1H do composto 1, solvente CDCl₃ obtido a 600 MHz..... 87

Figura 3. Espectro de RMN 13C do composto 1, solvente CDCl₃ obtido a 600 MHz..... 87

Figura 4. Espectro de RMN DEPTQ-135 do composto 1, solvente CDCl₃ obtido a 600 MHz..... 88

Figura 5. Espectro de RMN 2D HMBC do composto 1, solvente CDCl₃ obtido a 600 MHz..... 88

Figura 6. Espectro de RMN 2D HSQC do composto 1, solvente CDCl ₃ obtido a 600 MHz.....	89
Figura 7. Espectro de RMN 2D COSY do composto 1, solvente CDCl ₃ obtido a 600 MHz.....	89
Figura 8. Espectro na região do infravermelho da amostra I.S.I. usando ATR.....	90
Figura 9. Espectro de RMN 1H do composto 2, solvente CDCl ₃ obtido a 400 MHz.....	91
Figura 10. Espectro de RMN 13C do composto 2, solvente CDCl ₃ obtido a 100 MHz.....	91
Figura 11. Espectro de RMN DEPT-135 do composto 2, solvente CDCl ₃ obtido a 100 MHz.....	92
Figura 12. Espectro de RMN DEPT-90 do composto 2, solvente CDCl ₃ obtido a 100 MHz.....	92
Figura 13. Espectro de RMN 2D HMBC do composto 2, solvente CDCl ₃ obtido a 100 MHz.....	93
Figura 14. Espectro de RMN 2D HSQC do composto 2, solvente CDCl ₃ obtido a 100 MHz.....	93
Figura 15. Espectro de RMN 2D COSY do composto 2, solvente CDCl ₃ obtido a 100 MHz.....	94
Figura 16. Estruturas propostas para os compostos 1 e 2.....	94
Figura 17. Processo de separação do extrato etanólico da raiz de <i>C. pachystachya</i>	98
Figura 18. Processo de separação do extrato etanólico do caule de <i>C. pachystachya</i>	99
Figura 19. Processo de extração e separação do extrato etanólico da casca da raiz de <i>C.pachystachya</i>	100
Figura 20. Processo de fracionamento e isolamento de compostos de amostras provenientes de outras fontes.....	102
Artigo 4: Variabilidade sazonal e quantificação do ácido tormêntico em extratos de <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul.	
Figura 1. Curva de calibração do ácido tormêntico obtida em CLAE C08.....	108
Figura 2. Cromatograma obtido do extrato da raiz de <i>C. pachystachya</i> para o método a frio.	108
Gráfico 1. Resultados da quantificação do ácido tormêntico (µg A.T./mg de extrato) por mês de coleta para cada parte da planta.	109
Gráfico 2. Resultados da quantificação do ácido tormêntico (µg A.T./mg de extrato) por método para cada parte da planta.	111
PATENTE: Processo de obtenção e isolamento do triterpeno ácido tormêntico em material vegetal.	
Quadro 1. Processos existentes para a obtenção do ácido tormêntico.....	120
Figura 1. Fluxograma do processo de partição líquido-líquido do extrato etanólico do tronco de <i>Cecropia pachystachya</i>	141
Figura 2. Processos de separação das frações: Clorofórmio I (F. CHCl ₃ I), Clorofórmio II (F. CHCl ₃ II) e Acetato (F. AcOEt III).....	141
Figura 3. Fluxograma dos processos de separação das frações: Clorofórmio:Acetato (2:1) F2 : Clorofórmio:Acetato (2:1) F (13-14).....	142
Figura 4. Estrutura do triterpeno ácido tormêntico.....	143

Figura 5. Espectro na região do infravermelho do ácido tormêntico em pastilhas de KBr.....	143
Figura 6. Espectro de RMN1H (500 MHz, CD3OD) do ácido tormêntico.....	144
Figura 7. Espectro de RMN13C (125 MHz, CD3OD) do ácido tormêntico.....	145
Figura 8. Cromatograma com detecção no espectro de ultravioleta (Coluna C08; 204 nm) da fração 14, rica no ácido tormêntico.....	146

Lista de Tabelas

Artigo 1: Potential allelopathic effect of *Cecropia pachystachya* Trécul on *Lactuca sativa*.

Table 1. Germination percentage, root length, and shoot length of lettuce submerged in difference embauba extracts..... 50

Artigo 2: Antioxidant capacity in vitro and chemical profile of *Cecropia pachystachya* Trécul extracts.

Table 1. Total phenolics content of phenolic compounds and quantification of flavonoids in extracts of *C. pachystachya*..... 63

Table 2. Antioxidant activity and IC₅₀ of *C. pachystachya* extracts. 67

Table 3. Pearson correlations estimates between the variables related to the antioxidant activities 68

Table 4. Retention times obtained for the standards and detection in the *C. pachystachya* extracts. 70

Artigo 3: Constituintes químicos dos extratos de *Cecropia pachystachya* Trécul.

Tabela 1. Classe de compostos presentes nos extratos etanólicos de *C. pachystachya*..... 82

Tabela 2. Amostras obtidas dos processos de separação do extrato etanólico da raiz de *C. pachystachya*..... 83

Tabela 3. Amostras obtidas nos processos de cromatografia das frações hexano e clorofórmio, provenientes do extrato etanólico do tronco de *C. pachystachya*..... 84

Tabela 4. Amostras obtidas nos processos de cromatografia da fração acetato de etila, provenientes do extrato etanólico da casca da raiz de *C. pachystachya*. 85

Tabela 5. Deslocamento químico de ¹H e ¹³C para o composto 2. 95

Artigo 4: Variabilidade sazonal e quantificação do ácido tormêntico em extratos de *Cecropia pachystachya* Trécul.

Tabela 1. As estimativas de correlação de Pearson (r) entre o teor de ácido tormêntico e dados climáticos..... 110

Tabela 2. Resultados da quantificação do ácido tormêntico (µg A.T./mg de extrato) por parte da planta..... 110

Patente: Processo de obtenção e isolamento do triterpeno ácido tormêntico em material vegetal.

Tabela 1. Rendimento e pureza das amostras obtidas no processo de isolamento do ácido tormêntico..... 133

Lista de Abreviaturas e Siglas

AA%	Porcentagem de atividade antioxidante
AAPH	2,-2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride
AcOET	Acetato
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno
CC	Coluna cromatográfica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl₃	Clorofórmio Deuterado
CHCl₃	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy
DDPH*	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DEPT-135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer - 135°C
DEPT-90	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer – 90 °C
DMSO	Dimetilsulfóxido
DXP	Desoxixilulose fosfato
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
Fe⁺²	Ferroso
Fe⁺³	Férrico
FRAP	Capacidade de redução de metal
GAE	Equivalente de ácido gálico
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

Lista de Abreviaturas e Siglas

HSQC	Heteronuclear Simple Quantum Coherence
IC₅₀	Metade da concentração máxima inibitória
IV	Infravermelho
KOH	Hidróxido de potássio
MeOH	Metanol
MEP	2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato
MVA	Mevalonato
PF	Ponto de fusão
PG	Galato de propila
QE	Equivalente de quercetina
RMN	Ressonância magnética nuclear
TBHQ	Terc-butil hidroquinona
TPC	Conteúdo total de fenóis
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
TROLOX	6-hydroxy-2,5, 7, 8-tetrametilchroman-2-carboxylic acid
UV	Ultravioleta
vas	Estiramento assimétrico
vs	Estiramento simétrico
¹³C	Carbono 13
¹H	Hidrogênio 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	20
3.2	Atividade alelopática.....	21
3.3	Atividade antioxidante	22
3.4	Metabólitos secundários vegetais.....	25
4	REFERÊNCIAS	30
5	ARTIGOS DERIVADOS DA TESE	41
5.1	ARTIGO 01. Potential allelopathic effect of <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul on <i>Lactuca sativa</i>	42
5.2	ARTIGO 02. Antioxidant capacity in vitro and chemical profile of <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul extracts.	54
5.3	ARTIGO 03. Constituintes químicos dos extratos de <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul.....	79
5.4.	ARTIGO 04. Variabilidade sazonal e quantificação do ácido tormêntico em extratos de <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul.....	105
6	PATENTE – Processo de obtenção e isolamento do triterpeno ácido tormêntico em material vegetal.	118
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	147

1 INTRODUÇÃO

A busca por alívio e cura de doenças, pela ingestão de ervas, talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VEIGAS JR et al., 2006).

O uso de plantas com atividades medicinais pela população, bem como, a necessidade de comprovação dessas atividades, incentivou os pesquisadores e a indústria farmacêutica a investirem nas pesquisas de novos fármacos, com o objetivo de minimizar a carência de informações sobre essas plantas (SOUSA et al., 2008).

Plantas e outros produtos naturais, descritos na literatura etnobotânica e etnofarmacológica tornaram-se de grande interesse nos esforços recentes de descoberta de novos fármacos (CARVALHO et al, 2013) e assim, diversas espécies vegetais e compostos isolados destas, tem sido avaliados e estudados, apresentando diversas atividades, como efeito ansiolítico, sedativo, efeito antiofídico, atividades antioxidante, larvicida, anti-inflamatória e antitumoral, dentre outras (GAO et al., 2003; SIMAS et al., 2004; COSTA, 2009; CHANG et al., 2011; NETO et al., 2012; RODRIGUES, 2013; PACHECO et al., 2014; RASLAN et al., 2014).

Dentre tantas espécies e atividades estudadas, a *Cecropia pachystachya*, tem despertado interesse, pelos efeitos cardiovasculares em ratos, provocando hipotensão, hipoglicemia e sedação, além de apresentar atividade antioxidante e ação como anti-inflamatório (CONSOLINI et al, 2006; ARAGÃO et. al, 2010; ARAGAO et al., 2013 e PACHECO et al., 2014).

O gênero *Cecropia* é composto por cerca de 60 espécies, com ampla distribuição, principalmente na Argentina, Brasil, México e Paraguai (PIO-CORRÊA, 1978 e BERG e ROSSELLI, 2005). As espécies deste gênero são conhecidas no Brasil por diversos nomes populares, dentre eles, embaúba, imbaúba, umbaúba e embaúva. O uso popular destas espécies está associado a chás usados nos tratamentos de doenças respiratórias, hipertensão, controle da glicemia, e também como diurético (MORS et al., 2000; DI STASI et al., 2002; LORENZI e MATOS, 2008; COSTA, 2009).

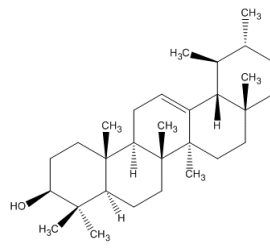
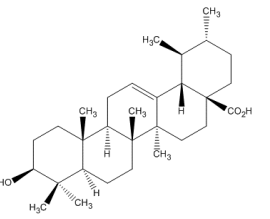
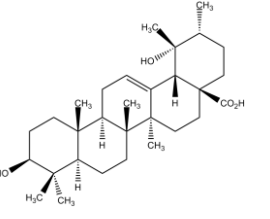
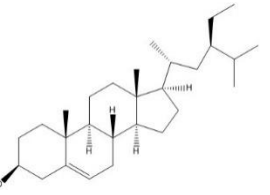
Estudos fitoquímicos realizados com a *C. pachystachya* indicaram a presença de ácido clorogênico, isoorientina, orientina, ácido ursólico, ácido oleanólico, catequina, epicatequina, β -sitosterol, sitostenona, isoquercetina, α -amirina, ácido

pomólico e ácido tormêntico (HIKAWCZUK et al., 1998; LACAILLE-DUBOIS, FRANCK, WAGNER, 2001; UCHOA, 2004; UCHOA et al, 2010; ARAGÃO et al., 2010;).

Todas as atividades relacionadas à espécie *C. pachystachya* e indicação de possíveis substâncias com atividades biológicas, evidenciam a necessidade em aprofundar os conhecimentos sobre a espécie, visando a descoberta de outras atividades, bem como isolar e identificar seus princípios ativos.

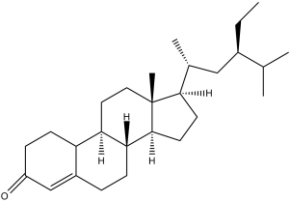
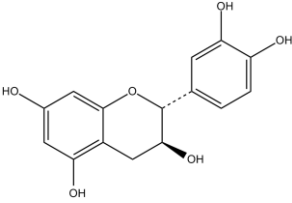
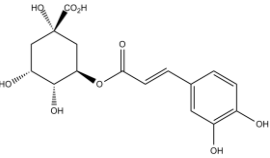
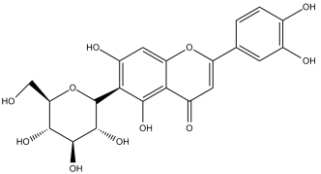
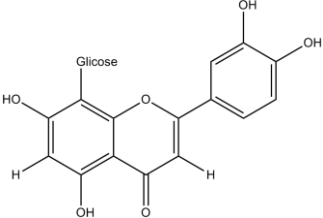
Quadro 1. Estruturas dos principais constituintes químicos isolados de *Cecropia pachystachya* e suas atividades biológicas.

(Continua)

Nome do composto	Estrutura	Atividade biológica	Referência
α -amirina		Citotóxico; sedativo; ansiolítico; efeito analgésico e anti- inflamatório	Aragão et al., 2006; Aragão et al., 2008; Wang et al., 2010.
Ácido ursólico		Atividade anti- inflamatória; Supressor da IL-17	Basappa et al., 2004; Topçu, 2006; Xu et al., 2011;
Ácido pomólico		Citotóxico; antiviral	Kashiwada et al, 2000; Kim et al, 2010
β -sitosterol		Antihiperglicêmico; anti-inflamatória; analgésica	Loizou et al., 2010. Balamurugan, Duraipandiyam, Ignacimuthu 2011;

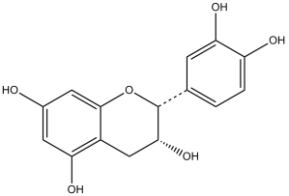
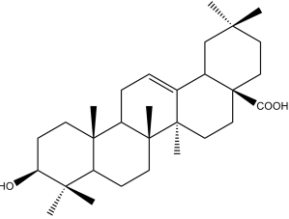
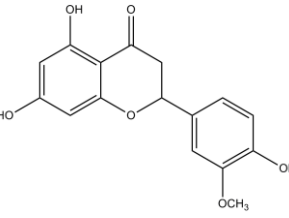
Quadro 1. Estruturas dos principais constituintes químicos isolados de *Cecropia pachystachya* e suas atividades biológicas.

(Continuação)

Nome do composto	Estrutura	Atividade biológica	Referência
Sitostenona		Antituberculose; hipoglicêmica; antiarrítmicos	Saludes et al, 2002; Hotta et al., 2003; Prachayasittikul et al, 2009; García et al, 2012.
(+) -catequina		Herbicida; antioxidante; anti-mutagênica	Kajiya et al, 2004; Geetha et al., 2004; Anggraini, et al., 2011.
Ácido clorogênico		Antioxidante; antibacteriana; anti-amnésica; antiulcerogênica	Kwon et al., 2010; Sato et al., 2011; Lou et al., 2011; Shimoyama et al., 2013.
Isoorientina		Ansiolítico, anti-inflamatorio	Deng et al., 2010;
Orientina		Antioxidante; antiviral; antimicrobiana	Li et al., 2002; Ali e Dixit, 2012; An et al., 2012.

Quadro 1. Estruturas dos principais constituintes químicos isolados de *Cecropia pachystachya* e suas atividades biológicas.

(Conclusão)

Nome do composto	Estrutura	Atividade biológica	Referência
(-) Epicatequina		Antioxidante; Redução de colesterol; Vasodilatador	Rodriguez et al., 2010; Ngamukote et al., 2011; Ottaviani et al., 2011; Iñiguez-Franco et al., 2012.
Ácido oleanólico		Antioxidante; alelopático; hepatoprotetor; anti-inflamatório e anticâncer.	Szakiel et al., 2005; Wang et al., 2010; Pollier e Goossens, 2012.
Isoquercetina		Antidiabético; antifúngico; antiviral	Kim, Narayanan, Chang, 2010; Zhang et al., 2011; Veras et al., 2011;

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Isolar e identificar os princípios ativos da espécie *Cecropia pachystachya* e avaliar suas atividades biológicas, com a finalidade de obtenção de um produto com atividade biológica.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos etanólicos da planta;
- Estudar as atividades antioxidante e alelopática dos extratos;
- Realizar o isolamento e a elucidação da estrutura do(s) princípio(s) ativo(s) desta espécie;
- Padronizar um método de obtenção e isolamento do ácido tormêntico;
- Realizar a análise sazonal da produção do ácido tormêntico em diversas partes da espécie, por diferentes métodos de extração.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Cecropia pachystachya* Trécul

As espécies de *Cecropia*, são árvores encontradas em vegetação secundária, com altura entre 5 e 25 m, um tronco segmentado, ereto e oco, folhas largas, com uma cor distinta e textura variando de acordo com a espécie (BERG e ROSSELLI, 2005). As inflorescências são carnudas, e variam na cor de cinza para vermelho, fornecendo alimento para aves e morcegos (LABOVA et al., 2003).

Além de seu uso na medicina tradicional, as cascas de diferentes espécies também são usadas na indústria de curtimento de couro, devido ao seu alto teor de tanino, enquanto a madeira é utilizada na produção de celulose e na construção de caixas e barcos. O uso de árvores em áreas de desmatamento também é descrito, devido ao seu rápido crescimento, que também ajudou a distribuir estas espécies nas mais diversas regiões do Brasil (SANTOS, 2000).

Diversas atividades biológicas já foram relatadas para a espécie *C. pachystachya* (Figura 1), dentre elas, atividade antioxidante e ação anti-inflamatória, atividade anti-leishmania e atividade antiprotozoária, sobre *Trypanosoma cruzi* e *Trichomonas vaginalis* (MUELAS-SERRANO et al., 2000; ARAGÃO et al., 2010; ARAGÃO et al., 2013; CRUZ et al., 2013; PACHECO et al., 2014).

Os estudos químicos desta espécie, realizado no nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais / IQB - UFAL), relatam a presença de ácido oleanólico, α -amirina, sistotenona e ácido tormêntico (UCHOA, 2004; UCHOA et al., 2010).

Figura 1. Foto da espécie *Cecropia pachystachya*, raiz e tronco.



Fonte: Autora, 2015

3.2 Atividade alelopática

O termo alelopatia refere-se à interação entre plantas e outros organismos mediada por produtos químicos, que são lançados no ambiente pelas plantas doadoras, por lixiviação, exsudação da raiz, volatilização, e decomposição de resíduos vegetais (HIKAWCZUK et al., 1998; LARA-NUÑEZ et al., 2009).

Determinadas espécies vegetais desenvolvem mecanismos de defesa que se baseiam na produção de metabólitos secundários, os chamados aleloquímicos que, quando liberados no ambiente, possuem a capacidade de influenciar direta ou indiretamente no estabelecimento de outros organismos ou podem ainda interferir em alguma etapa do ciclo de vida de outra planta (MORS et al., 2000).

As pesquisas com alelopatia normalmente visam à descoberta de substâncias que provoquem efeito negativo sobre o desenvolvimento de outras plantas, reduzindo assim o impacto ambiental provocado pelos herbicidas sintéticos utilizados na agricultura. Entretanto, os efeitos proporcionados pela alelopatia tanto pode ser negativo quanto positivo em relação a outro organismo. Assim, a inibição ou o estímulo da germinação ou do desenvolvimento de plântulas são evidências da atividade alelopática (MAIRESSE, 2005).

A atividade alelopática já foi relatada em estudos com diversos extratos de espécies vegetais, tais como *Senna obtusifolia*, *Ziziphus joazeiro*, *Hovenia dulcis*, *C.*

pachystachya, *Anadenanthera macrocarpa*, *Astronium graveolens*, indicando efeito de inibição do crescimento, assim como também exercendo efeito de estimulação do crescimento da planta-alvo (HERNÁNDEZ-TERRONES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; DA SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2010; WANDSCHEER et al, 2011).

Verifica-se que estudos sobre alelopatia são importantes tanto devido à necessidade de alternativas viáveis no manejo de plantas daninhas, quanto pela possibilidade de fornecer novas moléculas com potencial para compor novos produtos que possam substituir os herbicidas já existentes, como também pela seleção de espécies vegetais que possam compor os sistemas agroflorestais (SOUZA FILHO et al., 2010).

Portanto, verifica-se que o conhecimento sobre o potencial alelopático de espécies nativas é essencial para o correto planejamento de seu uso nos sistemas agrícolas. Além disso, as pesquisas sobre as propriedades alelopáticas das plantas podem representar uma oportunidade para a descoberta de novos compostos ativos para o uso na agricultura.

3.3 Atividade antioxidante

Os radicais livres, são moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados que nos organismos, são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais quando centrados nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécie reativa de oxigênio (ERO) ou espécie reativa de nitrogênio (ERN) (HALLIWELL, 2000; BARREIROS et al., 2006).

Eles possuem diferentes papéis no organismo e encontram-se envolvidos na produção de energia, atuando como citotoxinas para fagossomos, na regulação do crescimento celular, na sinalização intercelular e na síntese de substâncias importantes biologicamente. Entretanto, seu excesso apresenta efeitos deletérios, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, provocando alterações na estrutura e funções celulares e, dessa forma, estariam envolvidos no processo de envelhecimento precoce e na gênese de diversas doenças, como câncer, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata, disfunções cognitivas, entre outras (BARREIROS et al., 2006; ALVES et al., 2010).

Os radicais livres atuam de maneira deletéria também sobre plantas e alimentos. A peroxidação lipídica é a principal causa da deterioração dos corpos graxos. Ela é responsável pela modificação do odor e sabor dos alimentos, bem como pela perda da qualidade nutricional, acarretando depreciação e/ou rejeição por parte dos consumidores (SILVA et al., 1999 *apud* ALVES et al., 2010).

Algumas substâncias conhecidas como antioxidantes, tem a capacidade de em baixas concentrações, atrasar ou inibir a oxidação de um substrato de maneira eficaz (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; TIVERON, 2010). Eles são conhecidos pela ação em diferentes níveis do processo de oxidação envolvendo moléculas. Eles podem agir diminuindo a concentração de oxigênio; sequestrando íons metálicos; decompondo produtos primários a compostos que não são radicais (SUCUPIRA et al., 2012).

Existem várias maneiras de se classificar um antioxidante, uma delas é dividi-los em antioxidantes sintéticos e antioxidantes naturais. Os antioxidantes sintéticos são os mais utilizados pela indústria alimentícia, e estão sujeitos às legislações específicas de cada país ou normas internacionais. Dentre os antioxidantes sintéticos estão o butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), galato de propila (PG) e terc-butil hidroquinona (TBHQ) (TAKEMOTO et al., 2009; SUCUPIRA et al., 2012).

Apesar de serem muito efetivos e estáveis, os antioxidantes sintéticos apresentam o uso restrito em muitos países devido a possíveis efeitos indesejáveis em enzimas de vários órgãos humanos. Esse efeito gera um grande interesse na obtenção de novos antioxidantes que sejam seguros e provenientes de fontes naturais (NAKATANI, 1996 *apud* TIVERON, 2010).

Dentre os antioxidantes naturais, destacam-se, o ácido ascórbico, os tocoferóis, os carotenóides e compostos fenólicos, que são os antioxidantes mais abundantes da dieta humana (TIVERON, 2010).

O tocoferol faz parte da composição dos óleos vegetais, sendo o α -tocoferol, o mais abundante e distribuído nos tecidos e no plasma. O ácido ascórbico é considerado um dos mais potentes antioxidantes naturais. Os carotenóides são os pigmentos naturais que possuem papel muito importante na fisiologia dos vegetais, conferindo-lhes cor e participando da fotossíntese. No organismo atuam capturando radicais de oxigênio e radicais peroxila, atuando como antioxidante sobre as lipoproteínas LDL e HDL. Os compostos fenólicos, que compõem a grande classe dos fitoquímicos de interesse alimentar, são considerados os antioxidantes mais ativos nos vegetais, encontrados com grande frequência. Estes compostos são

multifuncionais como antioxidantes e se apresentam amplamente distribuídos entre as distintas partes das plantas (PODSEDEK, 2007; TIVERON, 2010; SUCUPIRA et al., 2012).

Há ainda antioxidantes de origem natural provenientes de extratos vegetais, como os extratos das espécies *Camelia sinensis*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Laurus nobilis*, *Ziziphus joazeiro*, *Caesalpinia spinosa*, *Cucumis melo*, *Nelumbo nucifera* (De MORAIS et al., 2009; HUANG et al., 2010; ISMAIL et al., 2010; SILVA et al., 2011; ALVES et al., 2014; SKOWYRA et al., 2014a; SKOWYRA et al., 2014b).

Existem diversos métodos para determinação da atividade antioxidante *in vitro* de produtos naturais, podendo ser classificado em: captura de radicais livres, capacidade de redução de metal, determinação da oxidação de uma molécula e quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (SUCUPIRA, 2012).

Um dos métodos mais utilizados para captura de radicais livres é o do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DDPH^{*}). Esse método, se baseia na capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DDPH, reduzindo-o a hidrazina, provocando mudança de cor, com conseqüente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância (ALVES et al, 2010; SUCUPIRA et al, 2012).

O método para avaliar a capacidade de redução de metal (FRAP), consiste na capacidade da amostra em reduzir o Fe⁺³ em Fe⁺² na presença de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), formando um complexo de coloração azul intensa (SUCUPIRA et al., 2012).

Outra técnica utilizada para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* é a da inibição por lipoperoxidação, na presença de um lipossomo sintético simulador de membrana biológica. O método está fundamentado no decaimento da fluorescência emitida por uma sonda, acoplada ao lipossomo, através do ataque de uma espécie reativa. Após a adição de um antioxidante, observa-se um menor decaimento da fluorescência, indicando que o antioxidante protegeu a membrana do ataque das espécies reativas presentes no meio (OLIVEIRA et al., 2009).

Atualmente, preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas para avaliação da atividade antioxidante que irá refletir a capacidade antioxidante total de uma amostra (SUCUPIRA et al., 2012).

3.4 Metabólitos secundários vegetais

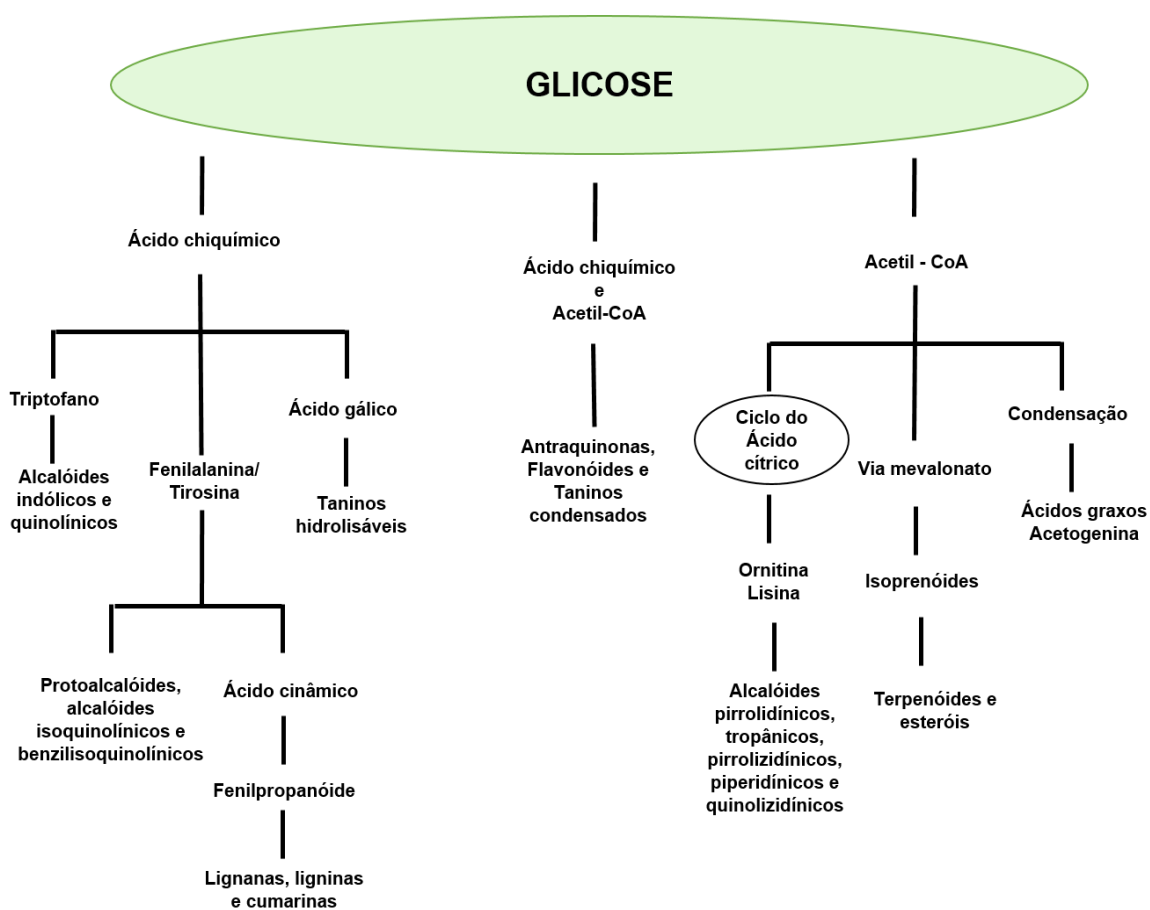
Diversas substâncias químicas são produzidas por plantas, animais e microrganismos, algumas delas não estão diretamente relacionados a manutenção da vida desses organismos. Esse conjunto de substâncias, são denominados de metabólitos secundários, e apesar de não serem essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie (SOUSA, 2007).

Os metabólitos secundários, tem geralmente estrutura complexa, baixo peso molecular, apresentam-se em baixas concentrações e possuem atividades biológicas marcantes, tais como: defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra raios UV, atração de polinizadores, bem como participação em alelopatias, dentre outras atividades (SOUSA, 2007; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

A origem dos metabólitos secundários, ocorre a partir do metabolismo da glicose, por duas vias, a do ácido chiquímico e a do acetato (Figura 2). O ácido chiquímico é percussor das seguintes classes: taninos hidrolisáveis, alcaloides e fenilpropanóides. Os derivados da via do acetato são, alcalóides, terpenóides, esteróides e ácidos graxos. Alguns metabólitos são originados da combinação dos percussores, ácido chiquímico e acetato, as antraquinonas, os flavonóides e os taninos condensados (SIMÕES et al., 2007; LEITE, 2008; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

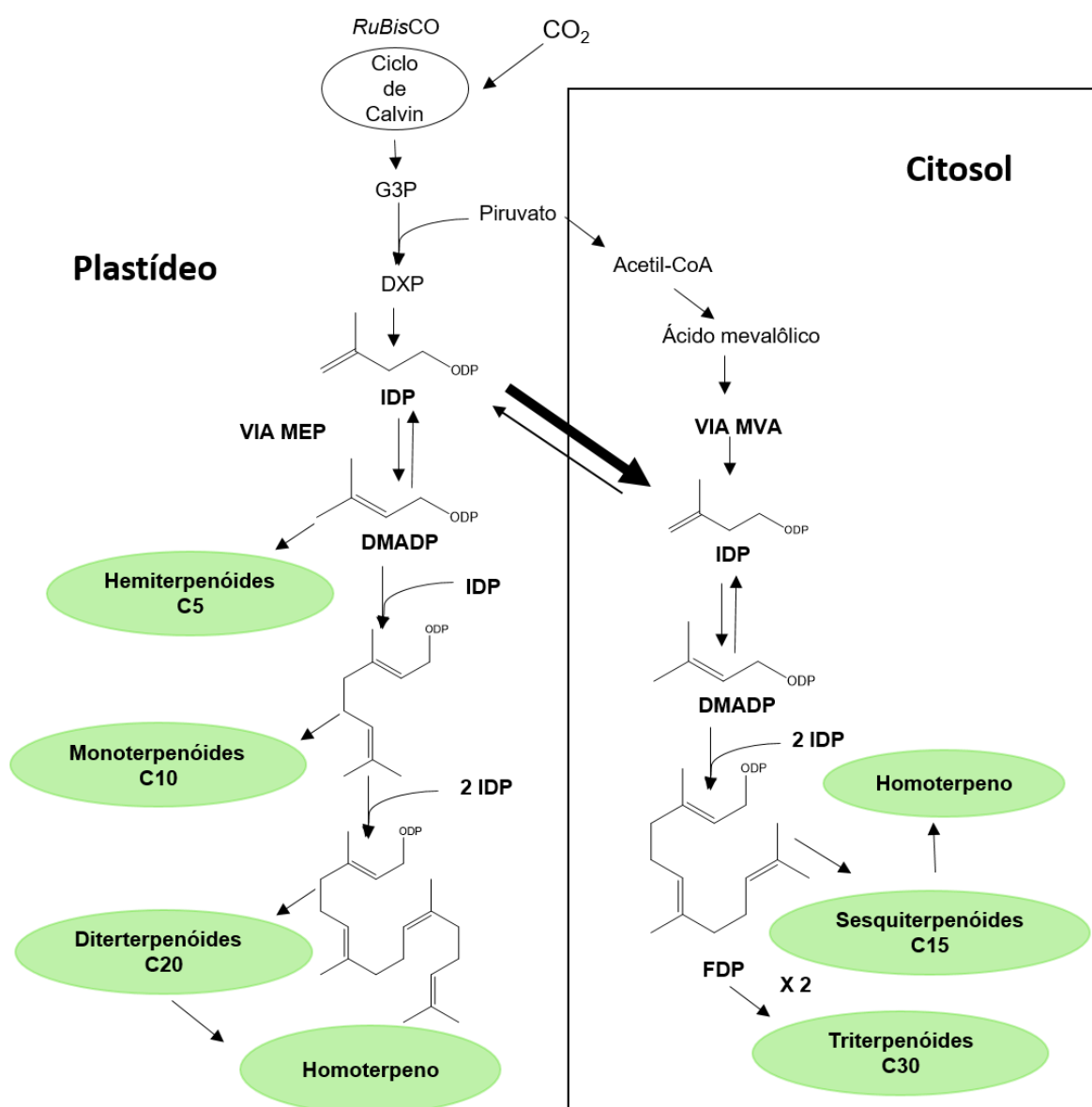
Há ainda outras vias de formação para os metabólitos secundários, especificamente para a formação de terpenos e esteróides, a via do mevalonato (MVA) e a do metileritritol, denominada de via MEP (fosfato de metileritritol). Nas plantas a formação desses compostos ocorre pelas duas vias compartimentalizadas, a via MVA ocorrendo no citosol e a MEP nos cloroplastos. Os sequiterpenos e triterpeno são formados na via MVA, através da formação do ácido mevalônico, a partir de três moléculas de acetil-coenzima A (Figura 3A), enquanto que monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos são formados na via MEP (Figura 3B), através da formação do 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), que ocorre pela condensação do gliceraldeído-3-fosfato e do piruvato e posterior redução ao desoxixilulose fosfato (DXP) (DAVIS, CROTEAU, 2000; DEWICK, 2009).

Figura 2. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.



Fonte: SIMÕES et. al, 2007, modificado.

Figura 3. Biossíntese dos terpenos pelas vias do mevalonato (MVA) e do metileritritol (MEP).



Fonte: NIINEMETS et al., 2013, modificado.

A maior parte dos metabólitos secundários apresenta atividade biológica e farmacológica, tendo importância comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica e da cosmética (SIMÕES et al., 2007).

Os compostos fenólicos, grupo de metabólitos secundários que possuem pelo menos um anel aromático, no qual um ou mais hidrogênios, são substituídos por um grupamento hidroxila, estão amplamente distribuídos no reino vegetal, animal e nos

microrganismos. Algumas classes de compostos fenólicos são: ácido fenólicos, fenilpropanóides, flavonóides, xantonas, taninos e cumarinas. Esses compostos contribuem para o sabor, odor e coloração de alguns vegetais, e tem importantes atividades biológicas, atuando como inibidores da germinação de sementes, agindo como expectorantes, analgésicos tópicos, antioxidantes e antivirais, além de serem utilizados na indústria de tintas e corantes, na indústria farmacêutica e alimentícia (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2007).

Os flavonóides, classificados como compostos fenólicos ou polifenóis, são um grupo de substâncias aromáticas que possuem 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico e apresenta uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos e um heterociclo oxigenado, formando um sistema C6-C3-C6. Eles constituem uma importante classe de metabólitos secundários com relativa abundância nos vegetais (SIMÕES et al, 2007; PEREIRA, CARDOSO 2012;).

Os flavonóides de origem natural, frequentemente apresenta-se oxigenados ou conjugados com açúcares, sendo neste caso, denominados de heterosídeos. A classificação dos flavonóides está relacionada a diversas características estruturais, dentre elas, tipos de ligação, quantidade de grupos hidroxilas, presença ou ausência de grupos cetonas. Algumas classes de flavonóides de interesse são flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonóides (AGUIAR et al., 2007; DORNAS et al., 2008).

Essa classe de compostos apresenta diversas atividade biológicas e farmacológicas bem conhecidas, tais como, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antimicrobiana, antimutagênica, antiúlcera, anti-hemorragica (FILHO et al., 2001; SIMÕES et al, 2007; ARAÚJO, 2008; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Outras classes de metabólitos secundários de importância biológica e farmacológica são os terpenos que formam uma grande e diversa família de produtos naturais que possuem muitas funções no reino vegetal e na saúde humana. Esta classe de substâncias defende muitas espécies de plantas, animais e microrganismos contra predadores, patógenos e competidores, e estão envolvidas na transmissão de mensagens sobre a presença de alimento e organismos nocivos. São formados a partir do mevalonato que é convertido em isopentil-pirosfosfato, ou pirofosfato de

isopentenila, unidade básica na formação de terpenos e esteroides (DEWICK, 2002; SILVA et al., 2014).

A partir da ligação entre uma ou várias moléculas de pirofosfato de isopentenila (C5) são formados os diversos grupos de terpenos a saber: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e polisoprenos (Cn). Os monoterpenos e sesquiterpenos são as principais substâncias que compõem os óleos essenciais, enquanto que os triterpenos e esteroides são componentes estruturais de membranas celulares de plantas e/ou fazem parte das membranas de células animais (SANTOS, 2007; SILVA et al., 2014).

A maioria dos triterpenos são tetracíclicos ou pentacíclicos, mas podem ser ainda, acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos e hexacíclicos. Os triterpenos apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas, atividade antiproliferativa, proapoptótica, anti-inflamatória, analgésica e antipirética, efeito hepatoprotetor e inibidor de HIV (MARTUCCIELLO et al, 2010; ANTONISAMY et al. 2011; DANG et al., 2013; WAN et al., 2013; SILVA et al., 2014).

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou triterpeno policíclicos que possuem em sua estrutura características lipofílicas (porção triterpênica ou esteroídica) e hidrofílicas (açúcares). São compostos que apresentam propriedades detergentes e surfactantes e apresentam elevada massa molecular. As saponinas possuem importantes efeitos no organismo humano, atuando como antioxidantes e apresentando atividades como hemolítica, ação citotóxica sobre células tumorais, atividade anti-helmíntica, atividade anti-inflamatória e antiviral (SCHENKEL et al., 2007; PEREIRA, CARDOSO, 2012).

4 REFERÊNCIAS

AGUIAR, C.L.; de ALENCAR, S.M.; TSAI, S.M.; PARK, Y.K. Transformações enzimáticas de flavonóides. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.25, n. 1, 2007.

ALI, H.; DIXIT, S. In vitro antimicrobial activity of flavanoids of *Ocimum sanctum* with synergistic effect of their combined form. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.2, n. 1, 396-398, 2012.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33(10), p. 2202-10, 2010.

ALVES, M.d.J.; MOURA, A.K.S.; COSTA, L.M.; ARAÚJO, E.J.F.; SOUSA, G.M.; COSTA, N.D.d.J.; FERREIRA, P.M.P.; SILVA, J.d.N.; PESSOA, C.; LIMA, S.G.; CITÓ, A.M.d.J.L. Teor de fenóis e flavonoides, atividades antioxidante e citotóxica das folhas, frutos, cascas dos frutos e sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth (Leguminosae–Mimosoideae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 5, p. 694-700, 2014.

AN, F.; YANG, G.; TIAN, J.; WANG, S. Antioxidant effects of the orientin and vitexin in *Trollius chinensis* Bunge in D-galactose-aged mice. **Neural Regeneration Research**, v.7, n.33, p. 2565-2575, 2012.

ANGGRAINI, T.; TAI, A.; YOSHINO, T.; ITANI, T. Antioxidative activity and catechin content of four kinds of *Uncaria gambir* extracts from West Sumatra, Indonesia. **Afr J Biochem Res**, v. 5, p.33-38, 2011.

ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedel in isolated from *Azima tetraacantha* Lam. in mouse and rat models. **Journal of Pharmacy and Pharmacological**, v.63, 2011.

ARAGÃO, D.M.O, LIMA, I.V.A.; SILVA, J.M.; BELLOZI, P.M.Q.; COSTA, J.C.; CARDOSO, G.M.M.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; SCIO, E.. Anti-Inflammatory, Antinociceptive and Cytotoxic Effects of the Methanol Extract of *Cecropia pachystachya* Trécul. **Phytotherapy Research**. V. 27(6), p. 926-30, 2013.

ARAGÃO, D.M.O.; GUARIZE, L.; LANINI, J.; COSTA, J.C.; GARCIA, R.M.G.; SCIO, E. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p. 629-633, 2010.

ARAGÃO, G.F.; CARNEIRO, L.M.V.; JUNIOR, A.P.F.; VIEIRA, L.C.; BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T.L.G.; VIANA, G.S.B. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.85, n. 4, p.827-834, 2006.

ARAGÃO, G.F.; PINHEIRO, M.C.C.; BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T.L.G.; VIANA, G.S.B. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of the Isomeric Mixture of Alpha- and Beta-Amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Journal of Herbal Pharmacotherapy**, v. 7, n.2, p. 31-47, 2008.

ARAÚJO, J. M. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4. Ed. Viçosa: Editora UFV, 477p, 2008.

BALAMURUGAN, R.; DURAIANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antidiabetic activity of γ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, n.1-3, p. 410-418, 2011.

BARREIROS, A.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, 2006.

BASAPPA; KUMAR, M.S.; SWAMY, S.N.; MAHENDRA, M.; PRASAD, J.S.; VISWANATH, B.S.; RANGAPPA, K.S. Novel delta2-isoxazolines as group II phospholipase A2 inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v.14, n.14, p.3679-3681, 2004.

BERG, C.C.; ROSSELLI, P.F. **Cecropia Flora Neotropica**, The New York Botanical Garden, New York, 2005.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007, p. 519 – 535.

CARVALHO, R.B.F.; ALMEIDA, A.A.C.; SANTOS, P.S.; FREITAS, R.M. Produtos naturais com aplicações em propriedades anestésicas locais: uma prospecção tecnológica. **GEINTEC - Gestão, Inovação e Tecnologias**.v.3, n.4, 2013.

CHANG, C.T.; HUANG, S.S.; LIN, S.S.; AMAGAYA, S.; HO, H.Y.; HOU, W.C.; SHIE, P.H.; WU, J.B.; HUANG, G. J. Anti-inflammatory activities of tormentic acid from suspension cells of *Eriobotrya Japonica* ex vivo and in vivo. **Food Chemistry**, v.127, n.3, p.1131-7, 2011.

CONSOLINI, A.E.; RAGONE, M.I.; MIGLIORI, G.N.; CONFORTI, P.; VOLONTÉ, M.G. Cardiotoxic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, p. 90-96, 2006.

COSTA, P.R.R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Revista Virtual de Química**. v.1,n.1, p. 58-66, 2009.

CRUZ, E.M.; da SILVA, E.R.; do CARMO MAQUIAVELI, C.; ALVES, E.S.S.; LUCON, J.F.; dos REIS, M.B.G et al. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry**, v. 89, p.71-77, 2013.

Da SILVA, J.R.B.; Dos SANTOS, A.F. Efeito Alelopático de Extratos Aquosos de *Senna obtusifolia* (L.) H. Irwin e Barneby. **Floresta e Ambiente**, v.17, n. 2, p. 90-97, 2010.

DANG, Z.; HO, P.; ZHU, L.; QIAN, K.; LEE, K-H.; HUANG, L.; CHEN, C-H. New Betulinic Acid Derivatives for Bevirimat-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type-1. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.56, 2013.

DAVIS, E. M.; CROTEAU, R. Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes. **Topics in Current Chemistry**, v. 209, 2000.

De MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.; COSTA, S.; AGUIAR, L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Braz J Pharmacognosy**, v.19, n.1B, p.315-320, 2009.

DENG, J.; ZHOU, Y.; BAI, M.; LI, H.; LI, L. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 128, n.1, p.148-153, 2010.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. Second ed. John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2002.

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JÚNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. **Medicinal Plants Popularly**, 2002.

DORNAS, W.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n. 3, p. 241-249, 2009.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.D.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-52, 2006.

FILHO, D. W.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: Yunes, R. A. e Calixto, J. B. Plantas Medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Agros, 317-334, 2001.

GAO, H.; WU, L.; KUROYANAGI, M.; HARADA, K.; KAWAHARA, N.; NAKANE, T.; UMEHARA, K.; HIRASAWA, A.; NAKAMURA, Y. Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* KOEHNE and their activities in JB6 mouse epidermal cells. **Chemical and pharmaceutical bulletin**. v. 51, n.11, p. 1318-1321, 2003.

GARCÍA, A.; BOCANEGRA-GARCÍA, V.; PALMA-NICOLÁS, J.P.; RIVERA G. Recent advances in antitubercular natural products. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.49, p.1-23, 2012.

GEETHA, T.; GARG, A.; CHOPRA, K.; PAL KAUR, I. Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.556, n.1-2, p.65-74, 2004.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, v. 47, n.3, p. 410-418, 2000.

HERNÁNDEZ-TERRONES, M.; MORAIS, S.; LONDE, G.; NASCIMENTO, E.; CHANG, R. Ação alelopática de extratos de embaúba (*Cecropia pachystachya*) no crescimento de capim-colonião (*Panicum maximum*). **Planta daninha**, v. 25, n.4, p. 21-26, 2007.

HIKAWCZUK, V. J.; SAAD, J.R.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A. O.; GIORDANO, O.S. Anti-inflammatory activity of natural compounds isolated from *Cecropia pachystachya*. **An. Asociac. Química Argentina**, v. 86, n. 3-6, p. 167-170, 1998.

HOTTA, K.; NOGUCHI, Y.; MATSUNAGA, M.; NISHIBE, K.; UCHIDA, K.; SHIMIZU, K.; *Leonurus heterophyllus* extracts and β -sitostenone as antiarrhythmics. **Journal Plos Pat**, v.138, p. 107-113, 2003.

HUANG, B.; BAN, X.; HE, J.; TONG, J.; TIAN, J.; WANG Y. Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanolic extracts of edible lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) leaves. **Food Chemistry**, v.120, n. 3, p. 873-878, 2010.

IÑIGUEZ-FRANCO, F.; SOTO-VALDEZ, H.; PERALTA, E.; AYALA-ZAVALA, J.F.; AURAS, R.; GÁMEZ-MEZA, N. Antioxidant Activity and Diffusion of Catechin and Epicatechin from Antioxidant Active Films Made of Poly(L-lactic acid). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 26, p. 6515-6523, 2012.

ISMAIL, H.I.; CHAN, K.W.; MARIOD, A.A.; ISMAIL, M. Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. **Food Chemistry**, v.119, n. 2, p. 643-647, 2010.

KAJIYA, K.; HOJO, H.; SUZUKI, M.; NANJO, F.; KUMAZAWA, S.; NAKAYAMA, T. Relationship between antibacterial activity of (+)-catechin derivatives and their interaction with a model membrane. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.52, n.6, p.1514-1519, 2004.

KASHIWADA, Y.; NAGAO, T.; HASHIMOTO, A.; IKESHIRO, Y.; OKABE, H.; COSENTINO, L.M.; LEE, K.H. Anti-AIDS Agents 38. Anti-HIV Activity of 3-O-Acyl Ursolic Acid Derivatives. **Journal of Natural Products**, v.63, n.12, p.1619-1622, 2000.

KIM, K.H.; CHOI, S.U.; LEE, K.R. Bioactivity-guided isolation of cytotoxic triterpenoids from the trunk of *Berberis koreana*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v.20, n.6, p.1944-1947, 2010.

KIM, Y.; NARAYANAN, S.; CHANG, K.O. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. **Antiviral Research**, v.88, n. 2, p. 227-235, 2010.

KWON, S.H.; LEE, H.K.; KIM, J.A.; HONG, S.I.; KIM, H.C.; JO, T.H.; PARK, Y.I.; LEE, C.K.; KIM, Y.B.; LEE, S.Y.; JANG, C.G. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 649, n.1-3, p.210-217, 2010.

LABOVA, T.A; MORI, S.A.; BLANCHARD, F.; PECKHAM, H.; CHARLES-DOMINIQUE, P. Cecropia as a food resource for bats in French Guiana and the significance of fruit structure in seed dispersal and longevity. **American Journal of Botany**, v. 90, p.388-403, 2003.

LACAILLE-DUBOIS, M.A.; FRANCK, U.; WAGNER, H. Search for potential Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-inhibitors from plants. **Phytomedicine**, v. 8, p. 47-52, 2001.

LARA-NUNEZ, A.; SANCHEZ-NIETO, S.; ANAYA, A.L.; CRUZ-ORTEGA R. Phytotoxic effects of *Sicyos deppei* (Cucurbitaceae) in germinating tomato seeds. **Physiologia plantarum**, v.136, n. 2, p.180-92, 2009.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 344p, 2008.

LI, Y.L.; MA, S.C.; YANG, Y.T.; YE, S.M.; BUT, P.P..H. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. **Journal of ethnopharmacology**, v.79, n.3, p. 365-368, 2002.

LOIZOU, S.; LEKAKIS, I.; CHROUSOS, G.P.; MOUTSATSOU, P. β -Sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n.4, p. 551-558, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarium de Estudos da Flora Ltda, 2008.

LOU, Z.; WANG, H.; ZHU, S.; MA, C.; WANG, Z. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. **Journal of Food Science**, v.76, n.6, p.398-403, 2011.

MAIRESSE, L. A. S. **Avaliação da bioatividade de extratos de espécies vegetais, enquanto excipientes de aleloquímicos**. (2005). Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

MARTUCCIELLO, S.; BALESTRIERI, M. L.; FELICE, F.; ESTEVAM, C. S.; SANT'ANA, A. E. G.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Effects of triterpene derivatives from *Maytenus rigida* on VEGF-induced Kaposi's sarcoma cell proliferation. **Chemico-Biological Interactions**, v.183, 2010.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. (2000). **Medicinal Plants of Brazil**. Reference Publications, Algonac.

MUELAS-SERRANO S.; NOGAL, J.; MARTINEZ-DIAZ, R.; ESCARIO, J.; MARTINEZ-FERNÁNDEZ, A.; GÓMEZ-BARRIO, A. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, n.1, p.101-107, 2000.

NETO, J.N.; ALMEIDA, A.; SILVA, O.A.; CARVALHO, R.; SOUSA, D.; FREITAS, R. Avaliação da toxicidade aguda e das propriedades ansiolíticas do nerolidol em camundongos. **Rev Biofar**. v. 8, p. 42-56, 2012.

NGAMUKOTE, S.; MÄKYNEN, K.; THILAWECH, T.; ADISAKWATTANA, S. Cholesterol-Lowering Activity of the Major Polyphenols in Grape Seed. **Molecules**, v.16, n.6, p. 5056-5061, 2011.

NIINEMETS, Ü. ; KÄNNASTE, A.; COPOLOVICI, L. Quantitative patterns between plant volatile emissions induced by biotic stresses and the degree of damage. **Frontiers in plant science**. v.4, 2013.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quimica Nova**, v. 32, p. 689–702, 2009.

OLIVEIRA, A.K.; DIÓGENES, F.E.P.; COELHO, M.d.F.B.; MAIA, S.S.S. Allelopathy caused by fruit extract of juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.-Rhamnaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.23, n.4, p.1186-1189, 2009.

OTTAVIANI, J.I.; MOMMA, T.Y.; HEISS, C.; KWIK-URIBE, C.; SCHROETER, H.; KEEN, C.L. The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v.50, n. 2, p.237-244, 2011.

PACHECO, N.R.; PINTO, N.C.C.; SILVA, J. M.; MENDES, R.F.; COSTA, J.C.; ARAGÃO, D.M.O.; CASTAÑON, M.C.M.N.; SCIO, E. *Cecropia pachystachya*: A Species with Expressive In Vivo Topical Anti-Inflammatory and In Vitro Antioxidant Effects. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 294-301, 2014.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n.4, 2012.

PODSEDEK A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p.1-11, 2007.

POLLIER, J.; GOOSSENS, A. Oleanolic acid. **Phytochemistry**, v.77, p.10-15, 2012.

PRACHAYASITTIKUL, S.; SUPHAPONG, S.; WORACHARTCHEEWAN, A.; LAWUNG, R.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules**, v.14, n. 2, p.850-867, 2009.

RASLAN, D.; OLIVEIRA, A. In Vitro Antitumor Activity of Sesquiterpene Lactones from *Lychnophora trichocarpha*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 16(2), p.275-82, 2014.

RODRIGUES, I.B. Atividade Larvicida de *Bacillus sphaericus* 2362 contra *Anopheles* sp. (Diptera, Culicidae) em rios do Amazonas, Brasil. **BioAssay**, v. 8, 2013.

RODRIGUEZ, M.; DU, G.J.; WANG, C.Z.; YUAN, C.S. Letter to the Editor: Panaxadiol's Anticancer Activity is Enhanced by Epicatechin. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.38, n.6, p.1233-1235, 2010.

SALUDES, J.P.; GARSON, M.J.; FRANZBLAU, S.G.; AGUINALDO, A.M. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae). **Phytotherapy Research**, v.16, n.7, p.683-685, 2002.

SANTOS, F.A.M. Growth and leafed mography of two *Cecropia* species. **Revista Brasileira de Botânica**, 23, 133-141, 2000.

SANTOS, R.I. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007, p. 403 – 434.

SATO, Y.; ITAGAKI, S.; KUROKAWA, T.; OGURA, J.; KOBAYASHI, M.; HIRANO, T.; Sugawara, M.; Iseki, K.; In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v.403, n.1-2, p.136-138, 2011.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. (2007), Saponinas. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R.

Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento, 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1104p, 2007.

SHIMOYAMA, A.; SANTIN, J.; MACHADO, I.; de OLIVEIRA e SILVA, A., De MELO, I.P.; MANCINI-FILHO, J.; FARSKY, S.H.P. Antiulcerogenic activity of chlorogenic acid in different models of gastric ulcer. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 386, n.1, p.5-14, 2013.

SILVA, F.C.; DUARTE, L.P.; VIEIRA FILHO, S.A. Celastráceas: Fontes de Triterpenos Pentacíclicos com Potencial Atividade Biológica. **Revista Virtual de Química**, v.6, n.5, p. 1205-1220, 2014.

SILVA, R.M.G.; SARAIVA, T.S.; SILVA, R.B.; GONÇALVES, L.A.; SILVA, L.P. Potencial alelopático de extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* e *Astronium graveolens*. Allelopathy potential of etanolic extract of *Anadenanthera macrocarpa* and *Astronium graveolens*. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 4, p. 632-637, 2010.

SILVA, T.C.d.L.; ALMEIDA, C.C.B.R.; VERAS FILHO, J.; PEIXOTO SOBRINHO, T.; AMORIN, E.L.C.; COSTA, E.P.; ARAÚJO, J.M. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, n.32, v.2, p. 193-199, 2011.

SIMAS, N.K.; LIMA, E.; CONCEIÇÃO, S.; KUSTER, R.M.; OLIVEIRA FILHO, A.M.; LAGE, C.L.S. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue-atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química nova**. v.27, n.1, p. 46-49, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Florianópolis: Editora da UFSC, 1102p, 2007.

SKOWYRA, M.; FALGUERA, V.; GALLEGGO, G.; PEIRÓ, S.; ALMAJANO, M.P. Antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of tara (*Caesalpinia spinosa*) pods in vitro and in model food emulsions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.94, n. 5, p.911-918, 2014b.

SKOWYRA, M.; GALLEGGO, M.G.; SEGOVIA, F.; ALMAJANO, M.P. Antioxidant properties of *Artemisia annua* extracts in model food emulsions. **Antioxidants**, v. 3, n. 1, p. 116-128, 2014a.

SOUSA, C.D.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.; ARAÚJO, D.S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**. v. 30(2), p. 351-5, 2007.

SOUSA, F.C.; MELO, C.T.; CITÓ, M.C.; FÉLIX, F.H.C.; VASCONCELOS, S.M.; FONTELES, M.M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G.S.B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, p. 642-654, 2008.

SOUZA FILHO, A.P.S.; GUILHON, G.; SANTOS, L.S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório: revisão crítica. **Planta daninha**. v. 28(3),p. 698-7, 2010.

SUCUPIRA, N.R.; Da SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; Da COSTA, J.N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.14, n. 4, p. 263-269, 2014.

SZAKIEL, A.; RUSZKOWSKI, D.; Janiszowska, W. Saponins in *Calendula officinalis* L. – structure, biosynthesis, transport and biological activity. **Phytochem. Rev.**, v. 4, p. 151–158, 2005.

TIVERON, AP. (2010). **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo – USP, Piracicaba, 2010.

TOPÇU, G. Bioactive Triterpenoids from Salvia Species. **Journal of natural products**, v.69, n.3, p.482-487, 2006.

UCHOA VT. (2004) **Avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações das espécies *Cecropia pachystachya* Trécul. (Cecropiaceae) e *Ximenia americana* L. (Olacaceae) e o estudo fitoquímico das *C. pachystachya* guiado pelo bioensaio antimalárico in vivo**. MSc Thesis, Federal University of Alagoas, Recife, Brazil, 2004.

UCHOA, V.T., PAULA, R.C., KRETTLI, L.G., SANTANA, A.E.G., KRETTLI, A.U. Antimalarial activity of compounds and mixed fractions of *Cecropia pachystachya*. **Drug Development Research**, v. 71, p. 82-91, 2010.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, S. V.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v. 29, n. 2, 2006.

WAN, Y.; JIANG, S.; LIAN, L.H.; BAI, T.; CUI, P.H.; SUN, X.T.; JIN, X.J.; WU, Y.L.; NAN, J.X. Betulinic acid and betulin ameliorate acute ethanol-induced fatty liver via TLR4 and STAT3 in vivo and in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 17, 2013.

WANDSCHEER, A.C.D.; BORELLA, J.; BONATTI, L.C.; PASTORINI, L.H. Atividade alelopática de folhas e pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) sobre a germinação de *Lactuca sativa* L.(Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.25, n. 1, p.25-30, 2011.

WANG, P.; OWNBY, S.; ZHANG, Z.; YUAN, W.; LI, S. Cytotoxicity and inhibition of DNA topoisomerase I of polyhydroxylated triterpenoids and triterpenoid glycosides. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v.20, n.9, p. 2790-2796, 2010.

WANG, X.; YE, X.I.; LIU, R.; CHEN, H.L.; BAI, H.; LIANG, X.; ZHANG, X.D.; WANG, Z.; LI, W.L.; HAI, C.X. Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: Possible role of Nrf2 and MAP kinases. **Chemico-Biological Interactions**, v.184, n.3, p. 328-337, 2010.

XU, T.; WANG, X.; ZHONG, B.; NURIEVA, R.I.; DING, S.; DONG, C. Ursolic acid suppresses interleukin-17 (IL-17) production by selectively antagonizing the function of ROR γ t protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 26, p. 22707-22710, 2011.

ZHANG, R.; YAO, Y.; WANG, Y.; REN, G. Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK-A y mice. **Nutrition & metabolism**, v.8, n. 85, p.1-6, 2011.

5 ARTIGOS DERIVADOS DA TESE

A seguir, os artigos e a patente derivados da tese, proveniente dos estudos químicos e biológicos dos extratos etanólicos de várias partes da espécie *Cecropia pachystachya*.

O artigo 1, apresenta o ensaio alelopático realizado frente a *L. sativa*, com os extratos etanólicos da raiz, caule, casca da raiz e casca do caule da espécie *C. pachystachya*.

O artigo 2, discuti a atividade antioxidante e perfil cromatográfico, dos extratos etanólicos da folha, raiz, caule, casca da raiz e casca do caule da espécie *C. pachystachya*.

O artigo 3, descreve os processos de separação, isolamento e elucidação estrutural, dos compostos presentes nos extratos da espécie *C. pachystachya*.

O artigo 4, trata da análise da variação sazonal para a quantificação do ácido tormêntico ao longo de um ano.

A patente relata a padronização de um método de obtenção para a obtenção e isolamento do ácido tormêntico.

**5.1 ARTIGO 01. Potential allelopathic effect of *Cecropia pachystachya*
Trécul on *Lactuca sativa*.**

(Artigo submetido ao Allelopathy Journal / Índice de impacto:0.846)

Potential allelopathic effect of *Cecropia pachystachya* Trécul on *Lactuca sativa*

C. K. B. PEREIRA¹; C. M. CARVALHO¹; I. T. SOUZA¹; N. S. J. SERRA¹; J. G. COSTA² and
A. E. G. SANTANA^{1*}.

1. Institute of Chemistry and Biotechnology (IQB), Federal University of Alagoas -
UFAL, 57072-970 Maceió, Alagoas, Brasil

2. Embrapa Tabuleiros Costeiros / Unidade de Pesquisas Rio Largo
57100-000 Rio Largo, Alagoas, Brasil

Phone (Office): +558232141388, e-mail: aegsal@gmail.com

ABSTRACT

Cecropia pachystachya Trec, also known as embauba, umbauca, imbauba, marsh umbauca, lazy tree, umbauca, sandpaper stick, and white embauba amongst other names, is distributed from Mexico to Argentina. Due to the abundance of this plant in native and restored forested areas it is believed that they have an advantage over other plants including weed species, either through direct interference or allelopathic effects. The aim of this study was to evaluate the allelopathic activity of ethanol extracts from the root, the stem, root bark, and stem bark of *C. pachystachya* on seed germination of *Lactuca sativa*. The ethanol extracts were prepared from milled and dried plants that were solubilized in water and DMSO (0.1%). The concentration of each extract (range 0.4 to 9.58 mg/mL) in agreement with its solubility was calculated and tested. The assays were composed of six different treatments (plant parts, DMSO, and water). Data analyzed using analysis of variance and the Skott-Knott test for comparison of means with a 5% probability. Results showed no significant difference between the various extracts and control (water and DMSO) on germination of *L. sativa*. The stem and stem bark ethanol extracts showed a negative effect on the hypocotyl development of lettuce when compared with the other treatments, suggesting the possible presence of bioactive compounds in this part of the plant.

Key words: inhibitory effect, growth effect, germination, embauba, tormentic acid.

*aegsal@gmail.com, ¹Institute of Chemistry and Biotechnology (IQB)

INTRODUCTION

Some plant species have developed a defense mechanism that involves the production of secondary metabolites, named allelochemicals, which when released into the environment have the ability to either directly or indirectly influence the establishment of other organisms and to interfere at different stages of a plants life cycle (5). Thus, investigation of the allelopathic properties of different plants provides an opportunity to discover new active compounds that could be integrated in agriculture.

Cecropia pachystachya, commonly known as embauba, umbauva, imbauba, embauva, marsh umbauva, sandpaper stick, white umbauva, and lazy tree amongst other names, is commonly found in soils of high moisture, forest borders, open and lightened locations. Their blooming period is between September and October, fruiting between May and June (10). This species is commonly used as a curative tea against respiratory diseases, high arterial pressure, glycaemia control, diabetes mellitus, and as diuretic control (3, 11, 12). Studies have also investigated the cardiovascular effects of *C. pachystachya* in rats, and its sedative hypoglycemic effects (1, 2). Chemical studies have shown the presence of oleanolic acids, α – amirine, sitostenone, and tormentic acid (15).

The abundance of this plant in native and restored forested areas has given them a stronger dominance over other plants including weed species, either through direct interference or allelopathic effects (8). Current literature involving allelopathic effect usually show compounds that negatively affects the development of other plants but reduce the environmental impact created by synthetic herbicides used in agriculture. Hence, the effects created by allelopathy can be both negative and positive in relation to other organisms. Thus, both inhibition and stimulation of germination or development of seedlings are evidence of allelopathic activity (12).

Allelopathic activity is an alternative approach to control weed species, by providing new molecules that have required characteristics to become new products that could substitute current herbicides, and also through the selectiveness of plants that possess agroforestry systalks (15). It is therefore crucial to expand current knowledge of allelopathic potential of native species in agriculture.

The main objective of this study is to evaluate the allelopathic potential of *C. pachystachya* Trec extracts upon *L. sativa* (lettuce).

MATERIAL AND METHODS

I. Plant Extracts

C. pachystachya was collected at the municipality of São Miguel – Alagoas (latitude: 09° 68'5525" S e longitude: 35° 82'5230" W) in March of 2011. The roots and stem were weighted, separated from their barks and put to dry. A voucher specimen (MAC 14.305) was deposited at the IMA (Environmental Institute) Herbarium in the state of Alagoas – Brazil.

The plant materials (root – 1Kg, stem – 1 Kg, root bark – 200g, stem bark – 200g) were milled and extracted with ethanol 90% (2L for each part of the plant) in an iron percolator for 72h. This was conducted three times. The extracts of each part of plant were put together giving a total of 170g root extract (17%); 6.25g of root bark (3,26%); 200g of stem (20%); 3.60g of stem bark (1,8%). All extracts were dried and kept in the freezer (-20°C) until usage.

II. Evaluation of allelopathic activity

The assay was conducted to determine allelopathic potential and to verify the percentage of germination and development of germinating plants. Samples were prepared from the ethanol extracts obtained from root, root bark, stem, and stem bark.

Extracts were weighted and solubilized in a 0.1% DMSO solution in distilled water. The concentration of each extract in agreement its solubility was calculated and tested. The concentrations tested for the root extract were: 8.94; 4.47; 2.24, and 1.12 mg/mL. For the stem extract the following concentrations were tested: 9.58; 4.79; 2.39, and 1.19 mg/mL. For the root bark and stem bark solutions the following concentrations were tested: 3.2; 1.6; 0.8; 0.4 mg/mL and 5.28; 2.69; 1.34, and 0.67 mg/mL, respectively.

Six treatments, extract samples, DMSO (negative control), and distilled water (control) were used in the bioassays. All bioassays were conducted in quadruplicates.

In the germination assays, sterilized petri dish with 9cm diameter padded with filter paper, were used. Each Petri dish was soaked with 7.5mL of the referred treatments. The tests were made in quadruplicate and 30 seeds of *L. sativa* were added onto the soaked filter paper and left at a constant temperature of 25°C in a sterile environment with a photoperiod of 12h for 14 days.

After 7 days the percentage of germination in each treatment was observed and recorded and after 14 days the root and seedling growth was recorded. Seeds were considered to be germinating, hence when protrusion of rootlets through the husk was visible.

The data was analyzed using analysis of variance and the Skott-Knott test for comparison of means with a 5% probability. All the statistical analyses were conducted using SAEG software.

RESULTS AND DISCUSSION

Results of the allelopathic activity of the *C. pachystachya* extracts on *L. sativa* are shown in table 1. Obtained results showed that extracts from different parts of the plant present statistical differences ($p = 5\%$) in comparison with control. The extracts showed the highest inhibitory effect were obtained from the root (8.94 mg / ml) and the shank (9.58 mg / ml) at the highest concentrations tested. These extracts had an effect on germination, development of the radicle and the hypocotyl, acting as a growth and development inhibitor of lettuce seeds.

In relation to germination, all extracts showed inhibitory effect on *L. sativa* seeds. The bark stem extract showed the greatest effect (0.00%), however, it was not statistically different from the herbicide (Sencor 480) that was used as control. An activity decrease was observed when testing the lowest extract concentration (0.67 mg / mL). The root bark extract was the one who showed inhibitory activity only in the highest concentration tested (3.2 mg / mL), this effect was not statistically different from the control.

In relation to growth seedling, the root and stem extracts presented best results when tested at high concentrations. However, only the stem extract exerted an inhibitory effect on the development of the root and hypocotyl growth of *L. sativa*. The root extract inhibited root growth of lettuce seedlings, with no significant effect on the development of the hypocotyl. The root bark extract, although presenting statistical difference compared to the control, inhibited the hypocotyl growth of *L. sativa* seeds (12.10 mm) at the highest concentration used (3.2 mg / ml), while the bark extract stem showed no effect on the development of lettuce seedlings.

(TABLE 1)

The relationship between the concentration of the extract and its effect was determined by regression shown in Figure 1, 2 and 3. The relationship shown in polynomial curve indicates the relationship of the concentration increased, decreased seedling growth.

Figure 1 showed that increasing the concentration of the root, stem, root bark, and bark stem extracts, resulted in a decreased number of germinated seeds. The root extract at 8.94 mg/mL and the stem extract at 9.58 mg/mL fully inhibited germination of lettuce seeds.

(FIGURE 1)

Figure 2 shows the effect of the extracts obtained from different parts of the plant on the development of the shoot length. The polynomial model optimally presented the effect of the extracts on the development of the areal parts of lettuce, verifying that root and root bark extracts only presented a significant effect when used at high concentrations. Extracts obtained from stem and stem bark, which showed significant effects starting at the lowest concentrations. These results show that stem extracts possess a pronounced inhibitory effect in relation to extracts obtained from the root.

(FIGURE 2)

The effect of the extracts obtained from different parts of the plant on the root length of lettuce is shown in Figure 3. Results showed that all extracts besides the one obtained from the stem bark had a significant inhibitory effect only at high concentrations. The effect of the initial concentrations of the root extract is noteworthy as it was approximately three times bigger than those of the control. The extract that presented highest inhibitory effect on the radicle development of the lettuce was the one obtained from stem bark.

(FIGURE 3)

Other vegetable extracts have shown allelopathic effects when tested at high concentrations resulting in germination inhibition of *L. sativa* (9, 13). Wandscheer et al. (18), evaluated the allelopathic activity of *Hovenia dulcis* and found that when tested at high concentrations it had an inhibitory effect on lettuce seeds which agrees with the results obtained in this study. According to Ferreira et al. (7), germination is less sensitive to allelopathic substances than

seedling growth, explaining why the root and stem extracts of *C. pachystachya* only presented an effect when tested at high concentrations.

In relation to radicle and hypocotyl development the root and stem extracts had an inhibitory effect, resulting in a decreased development of lettuce seeds. Previous studies involving *C. pachystachya* mention the inhibitory effects that its extracts have on other seeds such as *Lycopersicon esculentum* and *Panicum maximum* (5, 10), confirming that the species used in this study have an allelopathic activity.

All extracts promoted a decrease in radicle of *L. sativa*, however the root and stem extracts showed higher inhibitory effect. The stem extract did not differ significantly from the herbicide, used as control, showing that this extract has potent activity to inhibit growth of *L. sativa* seeds. The other extracts, root bark and stem bark showed very discreet effect of root inhibition.

The extract obtained from the root, the stem, the root bark and the stem bark showed an interesting allelopathic effect in which extracts from the root and stem caused greatest inhibitory effects preventing germination of lettuce seeds.

When testing these extracts at the highest concentrations they also inhibited the development of areal parts of lettuce seedlings, hence the stem extract showed a stronger inhibitory effect than the root extract. Extracts obtained from the stem bark presented the greatest inhibitory effect on the root development of *L. sativa*. All the extracts that were tested showed an allelopathic effect but the root and stem extracts had the greatest inhibitory effect on lettuce seeds.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the funding organs CAPES and CNPq.

REFERENCES

1. Aragão, D.M.O., Guarize, L., Lanini, J., Costa, J.C., Garcia, R.M.G., Scio, E. (2010). Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 128: 629-633.
2. Consolini, A.E., Ragone, M.I., Migliori, G.N., Conforti, P., Volonté, M.G. (2006). Cardiotoxic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. *Journal of Ethnopharmacology* 106: 90-96.
3. Corsato, J. M.; Fortes, A. M. T.; Santorum, M.; Leszczynski, R. (2010) Efeito alelopático do extrato aquoso de folhas de girassol sobre a germinação de soja e picão-preto. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n. 2, p. 353-360.
4. Costa, G. M. (2009) Estudo fitoquímico comparativo entre *Cecropia glaziovii* Sneth. E *Cecropia pachystachya* Trécul., MSc Thesis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.
5. Di Stasi, L.C., Oliveira, G.P., Carvalhaes, M.A., Queiroz-Júnior, M., Tien, O.S., Kakinami, S.H., Reis, M.S. (2002). *Medicinal plants popularly*.
6. Dias, A.L.B. (2011). Potencial alelopático de extratos da Embaúba (*Cecropia pachystachya*Trec.) sobre a germinação de *Lactuca sativa*, *Brassica oleracea* e *Lycopersicon esculentum*. IX Seminário de Iniciação Científica, VI Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação e Semana Nacional de Ciência e Tecnologia.
7. Ferreira, E.G.B.S., Matos, V. P., Sena, L. H. M., Sales, A. G. F. A. (2010). Allelopathic effect of aqueous extract of *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. in seed germination of *Phaseolus lunatus*. *Revista Ciência Agronômica*, 41: 463-467, jul-set, 2010.
8. Ferreira, A. G. (2004). Interferência: competição e alelopatia. In: *Germinação do básico ao aplicado* (Ferreira AG, Borghetti F, organizadores), pp. 207-222. Artimed, Porto Alegre.
9. Gatti, A.B, Perez, S.C.J.G.D, Lima, M.I.S. (2004). Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia eschscholae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botanica Brasilica*.
10. Hernández-Terrones, M.G., Morais, S.A.L., Londe, G.B., Nascimento, E.A., Chang, R. (2007) Ação alelopática de extratos de embaúba (*Cecropia pachystachya*) no crescimento de capim-colonião (*Panicum maximum*). *Planta Daninha* 25: 763-769.
11. Lorenzi, H., Matos, F.J.A. (2008). *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Instituto Plantarium de Estudos da Flora Ltda, Nova Odessa.
12. Mairesse, L. A. S. Avaliação da bioatividade de extratos de espécies vegetais, enquanto excipientes de aleloquímicos. 2005. 329 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.
13. Oliveira, A.K., Diógenes, F. E.P., Coelho, M.F.B., Maia, S. S. S. (2009). Alelopatia em extratos de frutos de juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart. – Rhamnaceae). *Acta Botanica Brasilica*. 23: 1186-1189.
14. Silva, R. M. G., Saraiva, T. S., Silva, R. B., Gonçalves, L. A., Silva, L. P. (2010). Allelopathypotencial of etanolic extract of *Anadenanther amacrocarpa* and *Astronium graveolens*. *Bioscience Journal* 26: 632-637.
15. Souza-Filho, A. P. da S.; Guilhon, G. M. S. P.; Santos, L. S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório – revisão crítica. *Planta Daninha*, Viçosa, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.
16. Steffen, R.B., Antonioli, Z.I., Steffen, G.P.K. (2010). Efeito estimulante do óleo essencial de eucalipto na germinação e crescimento inicial de mudas de *Eucalyptus grandis*. *Pesquisa Florestal Brasileira* 30: 199-206.

17. Uchoa, V.T., Paula, R.C., Krettli, L.G., Santana, A.E.G., Krettli, A.U. (2010). Antimalarial activity of compounds and mixed fractions of *Cecropia pachystachya*. *Drug Development Research*, 71: 82-91.
18. Wandscheer, A. C. D., Borella, J., Bonatti, L. C., Pastorini, L. H. (2011). Atividade alelopática de folhas e pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). *Acta Botanica Brasilica*, 25: 25-30.

Table 1. Germination percentage, root length, and shoot length of lettuce submerged in difference embauba extracts.

Treatments	Germination (%)	Root length (mm)	Shoot length (mm)
E.E Root (8.94 mg/mL)	0.83 ^d	2.91 ^b	7.99 ^c
E.E Root (4.47 mg/mL)	12.50 ^d	5.99 ^a	19.10 ^b
E.E.Root (2.24 mg/mL)	49.99 ^b	5.20 ^a	24.33 ^a
E.E.Root (1.12 mg/mL)	65.83 ^a	6.43 ^a	25.90 ^a
E.E.Stem (9.58 mg/mL)	0.00 ^d	0.00 ^b	00.00 ^d
E.E.Stem (4.79 mg/mL)	4.17 ^d	6.57 ^a	17.64 ^b
E.E.Stem (2.39 mg/mL)	15.00 ^c	6.17 ^a	21.13 ^b
E.E.Stem (1.19 mg/mL)	34.17 ^b	7.29 ^a	22.13 ^a
E.E.BarkRoot (3.2 mg/mL)	10.83 ^d	5.05 ^a	10.12 ^c
E.E.BarkRoot (1.6 mg/mL)	21.67 ^c	5.28 ^a	21.90 ^a
E.E.Bark Root (0.8 mg/mL)	51.66 ^b	5.62 ^a	22.98 ^a
E.E.Bark Root (0.4 mg/mL)	65.83 ^a	4.79 ^a	23.79 ^a
E.E.Bark Stem (5.38 mg/mL)	4.99 ^d	6.08 ^a	18.41 ^b
E.E.Bark Stem (2.69 mg/mL)	5.00 ^d	5.50 ^a	19.10 ^b
E.E.Bark Stem (1.34 mg/mL)	9.16 ^d	5.83 ^a	20.71 ^b
E.E.Bark Stem (0.67 mg/mL)	26.67 ^c	6.52 ^a	22.10 ^a
Water	62.50 ^a	8.31 ^a	23.18 ^a
SENCOR 480	00.00 ^d	00.00 ^b	00.00 ^d

Averages followed by the same letter, in the column, were not statistically different when using Scott-Knott clustering test with a 5% probability. E.E = Ethanol extract.

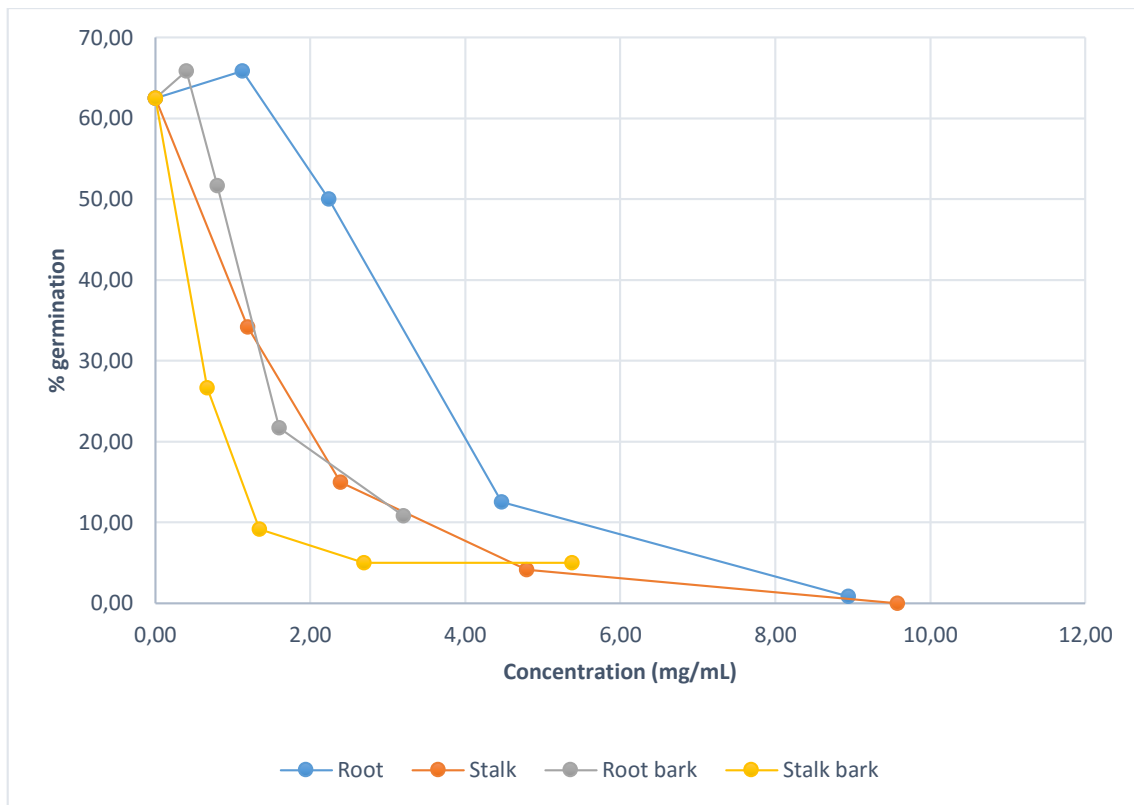


Figure 1. Effect of Embauba plant extracts obtained from different parts of the plant on lettuce seed germination.

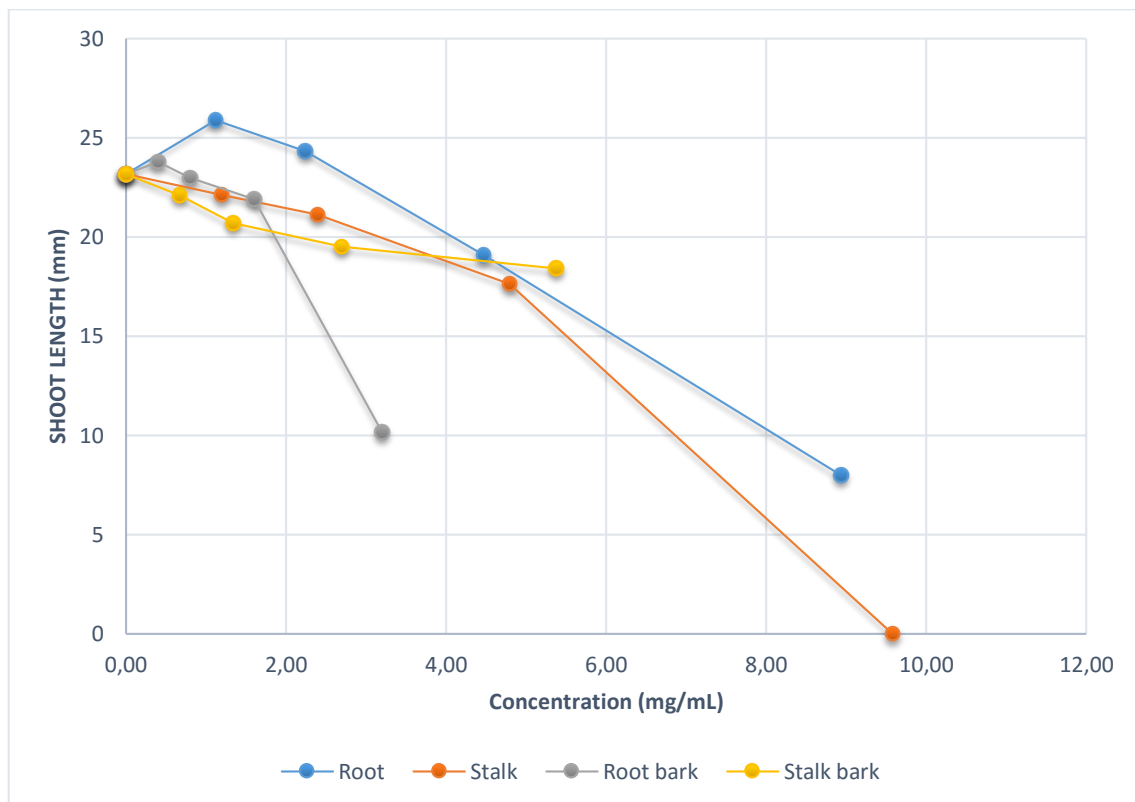


Figure 2. Effect of extracts obtained from of the Embauba plant on the development of the shoot length.

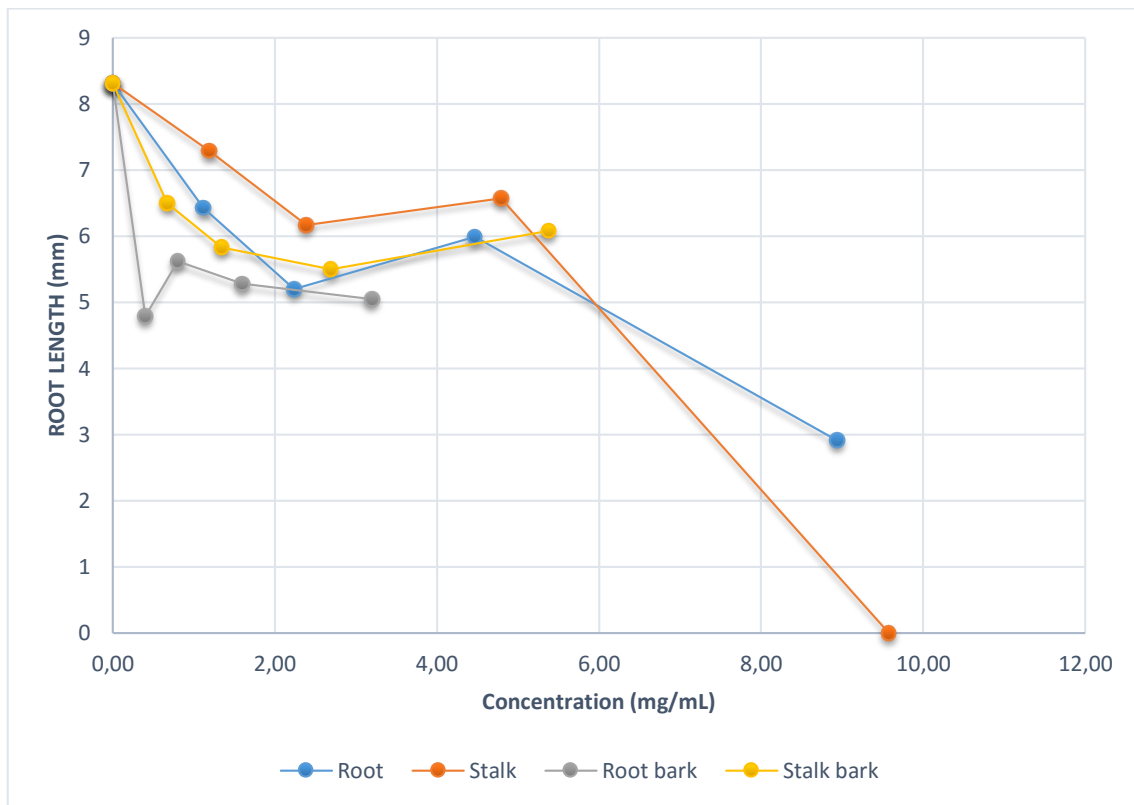


Figure 3. Effect of extracts obtained from different parts of the Embauba plant on the root length of lettuce seedlings.

**5.2 ARTIGO 02. Antioxidant capacity in vitro and chemical profile of
Cecropia pachystachya Trécul extracts.**

(Artigo a ser submetido a Industrial Crops and Products / Índice de impacto:3.208)

Antioxidant capacity in vitro and chemical profile of *Cecropia pachystachya* Trecul extracts.

Carla Karine Barbosa Pereira^a, Jadriane de Almeida Xavier^a, Isis Torres Souza^a, Aldenir Feitosa dos Santos^a, Kelly Barbosa da Silva^c, João Gomes da Costa^c, Iara Barros Valentim^b, Marília Oliveira Fonseca Goulart^a, Antônio Euzébio Goulart Santana^{a,*}.

^a Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Campus Universitário A.C Simões, 57072-970, Maceió/ AL, Brazil

^b Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Alagoas (IFAL), Rua Barão de Atalaia, s/n, Poço, 57020-510 Maceio, -AL, Brazil

^c Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, Tabuleiros Costeiros.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the antioxidant capacity of the ethanolic extracts of leaf, stem, root, root bark and stem bark of *Cecropia pachystachya*, using, for instance, the radical scavenging activity against α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH^{*}), inhibitory activity against lipoperoxydation, in a biomimetic membrane system and as metal reducing agents, through FRAP. The content of flavonoids and phenolic compounds, in extracts, was also determined, together with HPLC analysis, seeking for the presence of standard flavonoids. The results indicate that the extracts of *C. pachystachya* have antioxidant potential in all the performed assays. In addition, *C. pachystachya* extracts had shown high content of phenolic compounds and flavonoids, which may be responsible for the antioxidant activity. HPLC analysis revealed the presence of catechin, epicatechin, chlorogenic acid and quercetin in the used extracts.

Keywords: *Cecropia pachystachya*, phenolic compounds, flavonoids, DPPH.

*Corresponding author. Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Campus Universitário A.C Simões, 57072-970, Maceió/ AL, Brazil
Tel.: +55 82- 3214-1388. E-mail: aegs@gmail.com / aegs@qui.ufal.br (A.E.G. Santana).

1. Introduction

Cecropia pachystachya Trécul (Cecropiaceae) is a tropical tree with rapid growth, height between 5 and 25 m, a segmented, erect and hollow stem, broad leaves with a distinctive color and texture varies according to the species (Berg and Rosselli, 2005). It is found in Central and South America, and is abundant in Brazil. Popularly known by several common names, including, embaúba, imbaúba, umbaúba and embaúva (Pacheco et al., 2014).

The popular use of this species is in the form of teas in respiratory diseases, decreased blood pressure, glycemic control and also as a diuretic (Mors et al., 2000; Costa, 2009; Lorenzi and Matos, 2008; Di Stasi et al., 2002). Some studies of the methanolic and aqueous extracts of the specie *C. pachystachya* reported cardiovascular effects in rats causing hypotensive effect, hypoglycemic effect and sedative effect (Consolini and Migliori, 2005; Aragão et al., 2010; Consolini, 2006).

Recent work showed that the methanolic extract of *C. pachystachya* have hypoglycemic activity and acts as an oral anti-inflammatory (Pacheco et al., 2014; Aragão et al., 2010 and Aragão et al., 2013). Pacheco et al. (2014) demonstrated that the methanolic extract of the leaves of *C. pachystachya* showed antioxidant activity in the following assays: DPPH•, reducing power, blockade of β -carotene and lipid peroxidation assay, reporting the presence of some phenolic compounds such as chlorogenic acid, orientin, and isoorientin. This paper reports the occurrence of some compounds present in the methanolic extract of the leaves of *C. pachystachya* but does not indicate the presence of compounds with antioxidant capacity in other parts of the plant.

Other chemical studies of this specie reported the presence of oleanolic acid, α -amyrin, sistotenona, tormentic acid, chlorogenic acid, isoorientina, orientin acid, catechin, epicatechin, isoquercetin, isovitexin, procyanidin B2, sitosterol and ursolic and pomolic acids (Uchoa,

2004; Uchoa et al., 2010; Aragão, 2010; Lacaille-Dubois, 2001; Hikawczuk, 1998), but none of these studies makes correlation of antioxidant capacity with other parts of the plant (root, stem, root bark and stem bark) and chemical constituents reported for this species.

A great number of substances, originating from various classes of secondary metabolites, such as chlorogenic acid, isoorientina, orientin, ursolic acid, euscaphic acid, corosolic acid, epicatechin, catechin, p-hydroxy benzaldehyde and gallic acid (Pacheco et al., 2014; Choudhary et al., 2013; Velazquez et al., 2003), increasing the interest in the investigation of new compounds in extracts of this plant species.

Although some studies show the antioxidant activity of the leaves of *C. pachystachya*, there are no reports of this activity to other parts of the plant. Thus, the objective of this study was to evaluate the antioxidant capacity of the extracts of leaf, stem, root, root bark and bark *Cecropia pachystachya* stem and correlate the antioxidant capacity with each plant. Also, trace the chemical profile of the extracts by HPLC for the identification of phenolic compounds and phenylpropanoids present in the extracts.

2. Material and methods

2.1. Plant material

C. pachystachya was collected at the city of São Miguel (latitude: 09° 68'5525" S e longitude: 35° 82'5230" W) – Alagoas, in March of 2011. The leaves, roots and stalk were weighted, separated from their barks and put to dry. A voucher specimen (MAC 14.305) was deposited at the IMA (Environmental Institute) Herbarium in the state of Alagoas – Brazil.

2.2. Extraction

The parts of the plant were dried, triturated (4.7 kg of leaves, 1 kg of roots, 1 kg of stem, 200 g of root bark and 200 g of the stem bark) and subjected to extraction with 90% ethanol (20 L for each part the plant) in stainless steel percolator for 72 h for three times. Thus, originating the ethanolic extracts of the leaves (248 g), the root (170 g), the stem (200 g), the root bark (6.52 g) and stem bark (3.60 g).

2.3. Total phenolics content (TPC)

The total phenolics content was determined using the Folin-Ciocalteu reaction described by Scherer and Godoy (2014) with some modifications. An aliquot of 100 μ L of a methanolic solution of extracts (1.0 mg/mL) was added to 500 μ L of Folin-Ciocalteu reagent diluted with water (1/11) and 400 μ L of 7.5% sodium carbonate was added and stirred vigorously in a vortex mixer for 30 seconds. The mixture was maintained for 2 h in the dark at room temperature (22 ± 2 °C). The absorbance was measured at 750 nm and converted to the phenolics content according to a calibration curve made with gallic acid (5-100 μ g/mL). The results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/g of extract.

2.4. Quantification of flavonoids

For quantification of flavonoids, a modified assay was utilized as described by Souza et al. (2001). *C. pachystachya* extracts were diluted to a concentration of 1 mg / mL in methanol, 200 μ L this solution was placed on the plate, along with 100 mL methanol solution of 2% aluminum chloride. After 15 minutes, the reading of samples was performed in a spectrophotometer at 420 nm. This assay was performed in triplicate.

To calculate the flavonoid content of a given quercetin calibration curve was used using different concentrations (1.25- 30 μ g/mL) diluted with methanol. The results were expressed as mg of quercetin equivalents (QE)/ g of extract.

2.5. Antioxidant capacity

The antioxidant assays were performed by different methods, as currently recommends the use of two or more techniques, in order to obtain an overview of the antioxidant capacity of the sample.

2.5.1. Radical scavenging activity of α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl radical (DPPH $^{\bullet}$)

The antioxidant capacity of the extracts was determined by colorimetric technique in microplate where it was evaluated the ability of *C. pachystachya* extracts in DPPH $^{\bullet}$ radical kidnap (Brand-Williams, 1995). The analysis included stock solutions of extracts of 1 mg/mL and standards Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetrametilchroman-2-carboxylic acid) and BHA (butyl hidroxianisol) in concentrations ranging from 2.5 to 500 μ g/mL, used for comparison in statistical analysis. The methanol solution of DPPH $^{\bullet}$ 0.3 mM was prepared. After preparation of the solutions 100 μ L of each solution of the extracts was added to each well of the microplate, and then 40 μ L solution of DPPH $^{\bullet}$ or methanol, used as a control. The absorbance readings

were taken after 30 min of reaction microplate spectrophotometer with incubation at 25 °C, and 518 nm.

The IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) was calculated graphically using a DPPH[•] calibration curve in the linear range plotting the concentration of the extract from the corresponding elimination effect. The AA% (percentage of antioxidant activity) was calculated using the following equation:

$$AA\% = [(100 - (Abs_1 - Abs_0) \times 100) / Abs_c],$$

where Abs₀ is the absorbance of the blank, Abs₁ the absorbance in the presence of the test compound and Abs_c, is the absorbance of the methanol solution DPPH[•].

2.5.2. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

For iron reduction assay 30 µL the methanolic solution of the extracts (1.0 mg mL⁻¹), 90 µL of distilled water and 900 µL FRAP reagent solution was placed in ependorf tubes and homogenized in a shaker. Next, 250 µL test solution were placed in each well of the microplate and reading performed after 30 minutes at 595 nm and a calibration curve was prepared with Trolox® (10-1000 µM). The results are expressed as mM Trolox/g extract, calculated with respect to the original FRAP in mM of Trolox g⁻¹.

2.5.3. Antioxidant capacity in a biomimetic membrane system

2.5.3.1. Preparation of unilamellar vesicles

Unilamellar vesicles of soy phosphatidylcholine (1 mM) were prepared by extrusion in 10 mL of phosphate buffer (50 mmol/L, pH 7.4), as previously described (Macdonald et al., 1991) with the additional incorporation of 10^{-7} mol/L of the peroxy-sensitive fluorescent probe C11-BODIPY^{581/591} (Drummen, Gadella, Post, & Brouwers, 2002). The multilamellar dispersion obtained in this step was transferred to a membrane extrusion system with 100 nm pore diameter operating at 25 °C. The multilamellar dispersion was put through the extruder 15 times to produce BODIPY-labeled unilamellar vesicles with an average diameter of 100 nm.

2.5.3.2. Lipid peroxidation measurements

Fluorescence measurements were carried out at 37 °C in a spectrofluorophotometer by mixing, in a 1 mL-quartz cuvette, 800 µL of unilamellar vesicle suspension, 50 µL of 50 mmol/L phosphate buffer pH 7.4, and 50 µL of sample (0.5 mg/mL dried extract solution) or Trolox (1.9 mg/mL), as positive control. The solvents (methanol and buffer) were used as negative controls. The reaction was initiated with the addition of 100 µL of AAPH (100 mM). The fluorescence decay ($\lambda_{exc}=580$ nm, $\lambda_{em}=600$ nm) was monitored continuously for 30 min.

2.6. Chromatographic analysis by HPLC-DAD

Liquid chromatography was performed using HPLC system (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) was equipped with a pump (LC-10ADvp), controller (SCL-10Avp), degasser (DGU-14A), auto-sampler (SIL-20A HT), and diode-array UV/VIS detector (DAD- $\lambda_{max} = 278$). The sample was applied using an automatic injector and a separate CLC Pack- Shim-C08 column

(M), 150 mm x 4.6 mm to 30 °C. A gradient elution was used with solvent A containing 3% acetic acid in water and solvent B with methanol (grau HPLC). The following gradient program was used: 0-3 min, 5% B; 3-20 min, 20% B; 20-30 min, 25% B; 30-40 min, 30% B; 40-50 min, 40% B; 50-55 min, 50% B; 55-65 min 100% B. The flow rate was 1 mL/min and injection volume 20 µL (adapted of Baydar and Baydar, 2013). The standard samples were prepared at a concentration of 1 mg/mL and then an aliquot of each was collected for co-injection.

The standard quercetin, chlorogenic acid, caffeic acid, catechin and epicatechin were used for comparison with the extracts. The peaks were characterized by comparing the retention time and UV spectra with the reference standards, and by the co-injection of the sample and standards.

2.7. Statistical analyzes

Statistical analyzes were performed with the results of test by the free radical DPPH[•] sequestration method, content of phenolic compounds, quantification of flavonoids and ferric reducing antioxidant power. The data was analyzed using analysis of variance and the Skott-Knott test for comparison of means with a 5% probability. Statistical analyzes were performed using the Genes software (Cruz, 2013).

3. Results and Discussion

3.1. Total phenolics content (TPC) and quantification of flavonoids of the extracts of *C. pachystachya*.

The content of phenolic compounds and the results of the quantification of flavonoids of the extracts are described in Table 1. The values of TPC found for the ethanol extracts of *C. pachystachya* ranged from 366.03 to 1243.01 mg GAE/g extract. The extracts of the root bark and stem bark were those with higher levels of phenols, followed by leaf, root and stem extracts.

Table 1. Total phenolics content of phenolic compounds and quantification of flavonoids in extracts of *C. pachystachya*.

Sample	Phenolic compounds mg of gallic acid equivalents (mg GAE/g extract)	Flavonoids (mg quercetina/g extract)
Leaves	600.30 ± 0.01	148.59 ± 0.03
Root	326.00 ± 0.02	7.70 ± 0.02
Stem	123.00 ± 0.01	7.93 ± 0.01
Root bark	951.00 ± 0.03	26.32 ± 0.05
Stem bark	676.00 ± 0.06	39.91 ± 0.06

The extracts of the root bark and stem bark of the *C. pachystachya* presented TPC values of 951 and 676 mg GAE/g extract, respectively. According to the Silva et al. (2011), the high content of tannins with different structural types found in barks can justify higher concentration of phenolic compounds in this part of the plant. Rufino et al. (2010) claim that extracts with TPC values above 50 mg GAE/g dry extract has high content of polyphenols levels. Our results were higher than those found in the study by Silva et al. (2006) for to bark extracts from the

same genus *Cecropia obtusa* (12.3 GAE/g fresh weight) and *Cecropia palmata* (4.1 mg GAE/g fresh weight).

The quantification of flavonoids performed in ethanol extracts of *C. pachystachya* (Table 1) presented results ranging from 7.70 up to 148.59 mg QE/g of extract. The leaf extract is the one with the highest content of flavonoids (148.59 mg QE/g extract), followed by the extract from the stem bark and root bark (39.91 and 26.32 mg QE/ g of extract, respectively). The lowest values were found for the root (7.70 mg QE/g of extract,) and stem (7.93 mg QE/g of extract,) extracts. The studies of Silva et al. (2006), Harborne and Williams (2000) indicate that high concentrations of polyphenols found in leaf suggest that due the exposure to light the polyphenol biosynthesis is accelerated. In addition to the flavonoids also act in the protection of plants in particular the leaves against the incidence of ultraviolet and visible rays. This may explain the higher concentration of flavonoids in the extract of the leaves of *C. pachystachya*.

Other studies were found for the extracts of other species of the same genus, *Cecropia obtuse* (3.49 mg catechin equivalent/g fresh weight for leaves and 3.14 mg catechin equivalent/g fresh weight for bark) and *Cecropia palmate* (4.95 mg catechin equivalent/g fresh weight for leaves and 0.78 mg catechin equivalent/ g fresh weight for bark), however used catechin as standard (Silva et al., 2006). Thus, flavonoids have been reported as good antioxidant and anti-inflammatory agents, indicating that the high content of flavonoids found in the leaf and bark extracts, may be indicative of good antioxidant activity (Liao et al., 2012; Nijveldt et al., 2001; Meotti et al., 2006).

3.2. Antioxidant activity

3.2.1. Radical scavenging activity of α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl radical (RSA-DPPH^{*}) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

The results of DPPH^{*} assay, IC₅₀ and FRAP are described in Table 2. The leaves (92.39%), root bark (97.05%) and stem bark (96.16%) extracts had the highest percentages of antioxidant activity (AA%) than the other parts (root and stem), in the highest concentrations tested. The standards Trolox and BHA presented AA% of 97.67 and 94.00, in the highest concentration, respectively.

In our study, the AA% values found for the bark extracts were higher than that obtained for the leaf extract. This relationship was also observed for *Terminalia brasiliensis* extracts, where the results obtained for the extracts of the barks (91.36%) was greater than found for the leaf extracts (\cong 85%) (Sousa et al., 2007).

In observing the values AA% found in other studies using the bark extracts (about 20%) and leaf (about 30%) of the *Zizyphus joazeiro*, root extract of the *Echinacea purpurea* (77.7%), ginseng root (69.1%) and root extract of the *Armoracia lapathifolia* (57.4%) (Silva et al., 2011; Velioglu et al., 1998), it was determined that all the extracts tested in our study had values greater than these. These results indicating that *C. pachystachya* extracts have high antioxidant capacity, being effective in the kidnapping of free radical DPPH.

In IC₅₀ analysis, a relationship can be traced, lower IC₅₀ value antioxidant activity higher (Alves et al., 2014.). The best IC₅₀ values were obtained for the root bark extracts: 42.05 $\mu\text{g} / \text{mL}$, stem bark extracts: 46.83 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and leaves extracts: 51.37 $\mu\text{g} / \text{mL}$. For Trolox IC₅₀ value was 2.37 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and BHA IC₅₀ value was 4.53 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

However, all the extracts tested in this study had lower IC₅₀ values than extracts of leaves and bark of *Z. joazeiro* (IC₅₀ = 461.88 and 1743.05 µg / mL) and showed lower IC₅₀ than extracts of leaves of *Cenistigma macrophyllum* (IC₅₀ = 78.45 µg / ml) and *Qualea grandiflora* (50.16 µg / ml) and roots of *Copernicia prunifera* (111.14 µg / ml) (Silva et al., 2011; Sousa et al., 2007).

When investigating the IC₅₀ of the methanol extract of *C. pachystachya* leaves, Pacheco et al. (2014) found IC₅₀ = 3.1 µg / mL, lower than the values found in our study. However, the authors do not mention the concentration of the sample tested, moreover it used only the extract from the leaves to evaluate the antioxidant activity of the species.

These data confirm the good antioxidant capacity demonstrated to the extract of the leaves of *C. pachystachya* (Pacheco et al., 2014; Silva et al., 2011; Sousa et al., 2007). However, the extracts from other parts of the plant, also showed promising results, in the case of the extracts from the root bark and stem bark, the antioxidant capacity was superior in both cases, the results for leaf extract.

Table 2. Antioxidant activity and IC₅₀ of *C. pachystachya* extracts.

SAMPLE	CONCENTRATION (µg/mL)	AA%	IC ₅₀ [µg/mL]	FRAP (mM Trolox/g extract)
LEAVES	125	92.39 ± 0.00A	51.37	14.57 ± 0.03
	50	50.25 ± 0.00C		
	30	36.44 ± 0.01C		
	10	26.46 ± 0.00D		
	2.5	20.69 ± 0.01 D		
ROOT BARK	125	97.05 ± 0.00A	42.05	32.59 ± 0.04
	12.5	36.35 ± 0.01C		
	10	33.55 ± 0.03 D		
	5	26.23 ± 0.00D		
	2.5	26.55 ± 0.00 D		
STEM BARK	125	96.16 ± 0.01A	46.83	18.10 ± 0.00
	100	89.14 ± 0.01A		
	25	41.33 ± 0.08C		
	5	27.76 ± 0.01D		
	2.5	25.10 ± 0.02D		
ROOT	500	80.92 ± 0.01 ^a	231.55	7.42 ± 0.02
	50	29.98 ± 0.03D		
	30	25.90 ± 0.02D		
	10	23.96 ± 0.02D		
	2.5	20.07 ± 0.00D		
STEM	500	82.40 ± 0.00 A	258.55	4.73 ± 0.00
	15	24.48 ± 0.05D		
	10	23.10 ± 0.00D		
	5	18.23 ± 0.02D		
	2.5	17.33 ± 0.02D		
TROLOX	125	97.67 ± 0.00A	2.37	-
	100	62.05 ± 0.01B		
	10	51.28 ± 0.02C		
	5	47.73 ± 0.02C		
	2.5	45.22 ± 0.00C		
BHA	25	93.99 ± 0.00A	4.53	-
	12.5	66.76 ± 0.00B		
	10	62.78 ± 0.00B		
	5	52.53 ± 0.00C		
	2.5	43.44 ± 0.01C		

Average followed by the same letter are not statistically different from each other at 5% probability by Scott-Knott cluster test.

The results obtained for the FRAP assay (Table 2) ranged from 32.59 to 4.73 mM Trolox/g extract. The extracts of the root bark (32.59 mM Trolox/g extract), stem bark (14.57 mM Trolox / g extract) and leaves (18.10 mM Trolox / g extract) showed the highest values in the test FRAP.

Some work with essential oils obtained from some herbs and ethanol extracts, presented FRAP values between 0.5 and 3 mmol Trolox / L for the essential oil of *Ocimum minimum* and 0.25 to 0.5 mmol Trolox / L for *Apium graveolens*, while for the extract from *Camellia*

sinensis leaves the FRAP values found varied from 4.15 to 6.38 mmol TE /g extract (Alves - Silva et al., 2013;. Gadkari et al., 2014).

These results were lower than those found for *C. pachystachya* extracts (except the ethanol extract of the stem: 4.73 mM Trolox / g extract), indicating great potential for reducing extracts.

The results of our study were similar and in some cases higher (ethanol extracts of the root bark: 32.59 mM Trolox / g extract and stem: 14.57 mM Trolox /g extract) to those found for the ethanol extracts of fruit *Genipa american*, *Spondias purpurea* and *Spondias tuberosa* (FRAP value ranging from 16.20 to 0.71 mmol Trolox/ g) (Omena et al., 2012).

A correlation test was performed by comparing the results of antioxidant capacity and the levels of phenolic compounds and flavonoids (Table 3).

Table 3. Pearson correlations estimates between the variables related to the antioxidant activities.

	IC ₅₀	TPC	FLAVONOIDS	FRAP
IC ₅₀	-	-0,9312**	-0,5608	-0,8003*
TPC	-	-	0,4452	0,6457
FLAVONOIDS	-	-	-	0,1015

*,** Significant at the 5% and 1% respectively by t test.

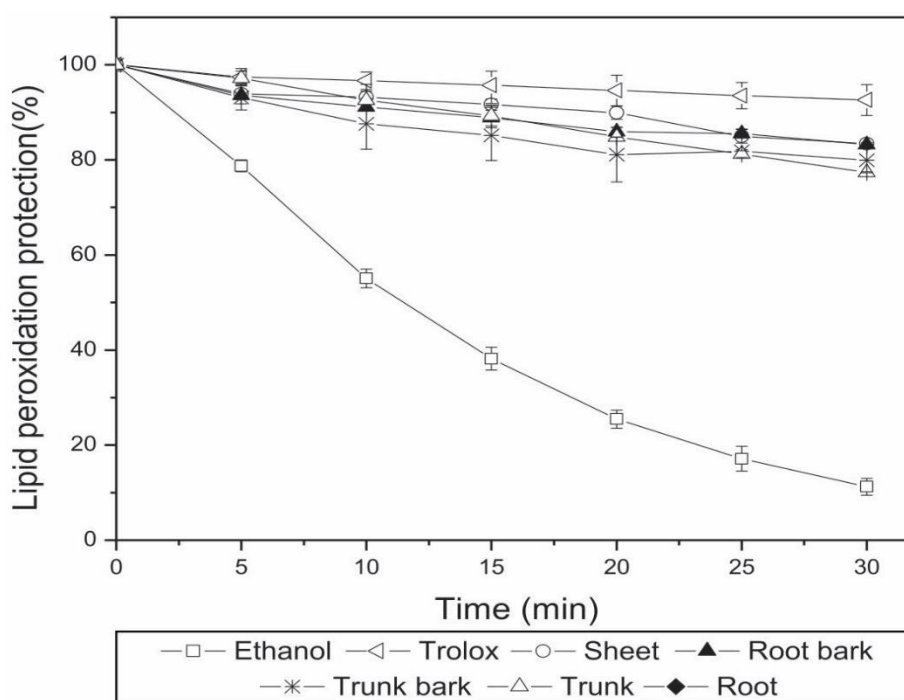
The relationship antioxidant capacity and phenolic content was significant ($p = 5\%$) for the extracts under study, but there was no significance between antioxidant capacity and flavonoid content. Moreover, it was possible to find a correlation between IC₅₀ and FRAP ($p = 1\%$), indicating that the lower the value of IC₅₀ values greater FRAP.

Thus, it is known that natural sources has polyphenols and these are the main responsible for the antioxidant capacity of spices, vegetables, fruits, leaves and bark (Oliveira et al., 2009a; Velioglu et al., 1998).

3.2.2. Antioxidant capacity in a biomimetic membrane system

The Fig.1, present lipid peroxidation protection (%) as a function of time (total time 30 min) of the ethanolic extracts of *Cecropia pachystachya*, in comparison with positive (Trolox) and negative controls.

Figure 1. Lipid peroxidation protection (%) provided by the ethanolic extracts of *Cecropia pachystachya* 0.5 mg/mL and positive control (Trolox 10 μ mol/L).



All *Cecropia pachystachya* ethanolic extract protected the membrane, providing protection around 90% for 20 min. This result was considered close to positive controls (Trolox 10 μ mol/L), indicating that these extracts protect the membrane.

Other studies reported in the literature, using bark extracts, seeds and fruit pulps showed greater than 95% membrane protection for 15 minutes (Omena et al., 2012; Oliveira et al., 2013).

Pacheco et al. (2014) investigated the topical anti-inflammatory and antioxidant activities of the methanolic extract of the *C. pachystachya*. They showed that the topical anti-

inflammatory activity found for the extract could be based on its antioxidant properties. Thus this anti-inflammatory activity can contribute to reducing lipid peroxidation of membranes.

According Niki et al. (2005), this ability to reduce lipid peroxidation of membranes is a process that is related to aging mechanisms and neurodegenerative disorders.

3.3. Chromatographic analysis by HPLC-DAD

The identification of standards, quercetin, catechin, epicatechin, chlorogenic acid and caffeic acid, in the chromatograms of *C. pachystachya* extracts, was performed from comparing the retention times (Table 4).

Table 4. Retention times obtained for the standards and detection in the *C. pachystachya* extracts.

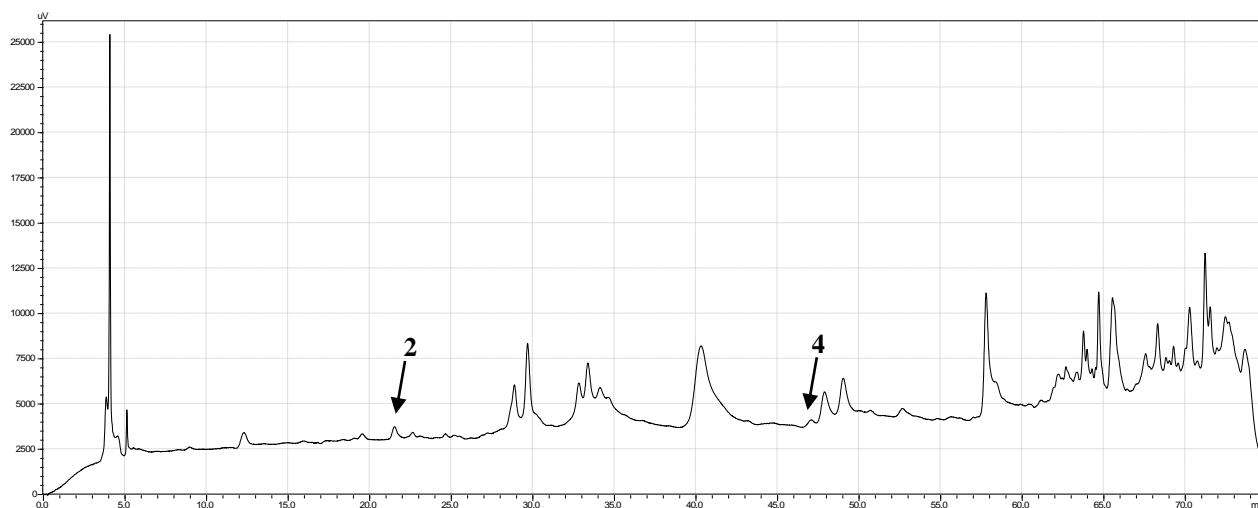
Compounds	RT standard (min)	Extracts				
		Leaf	Root	Stem	Root bark	Stem bark
Catechin	17.11	ND	ND	ND	D	D
Chlorogenic acid	21.31	D	ND	ND	ND	ND
Epicatechin	21.67	ND	ND	D	D	D
Caffeic acid	27.51	ND	ND	ND	ND	ND
Quercetin	47.05	D	D	D	D	D

* D – detected; ND – Not detected.

The chromatograms obtained from the extracts tested were compared to the chromatogram of the standard, with the purpose of identifying phenolic compounds in the leaf, stem, root and the stem and root barks, as shown in Figures 2 to 6. The standards in the

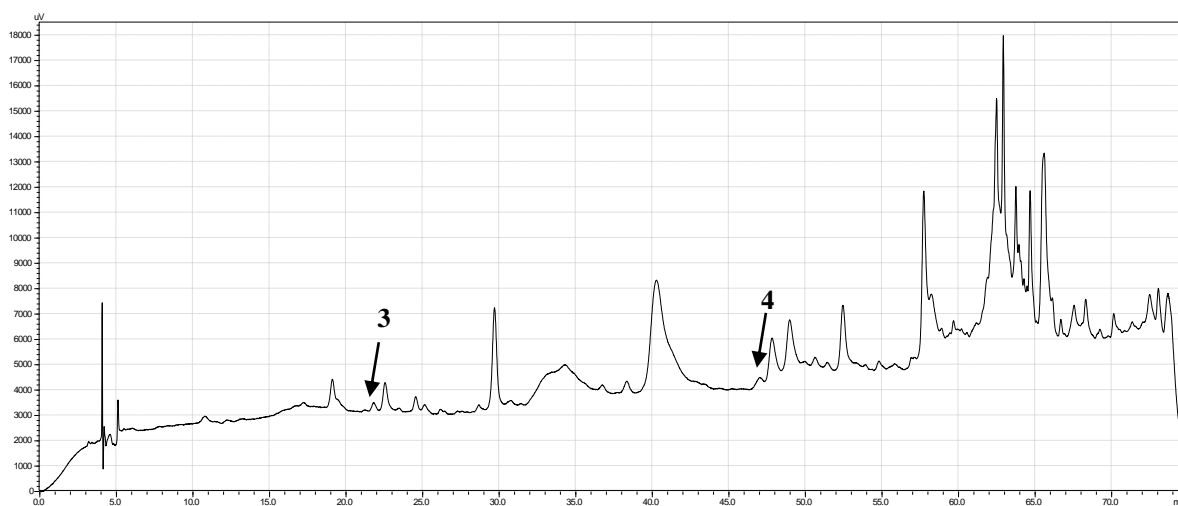
chromatogram were identified as: catechin (1), chlorogenic acid (2); epicatechin (3); quercetin (4) and caffeic acid (5).

Figure 2. Chromatograms of the leaves ethanol extract of *Cecropia pachystachya* and standards.



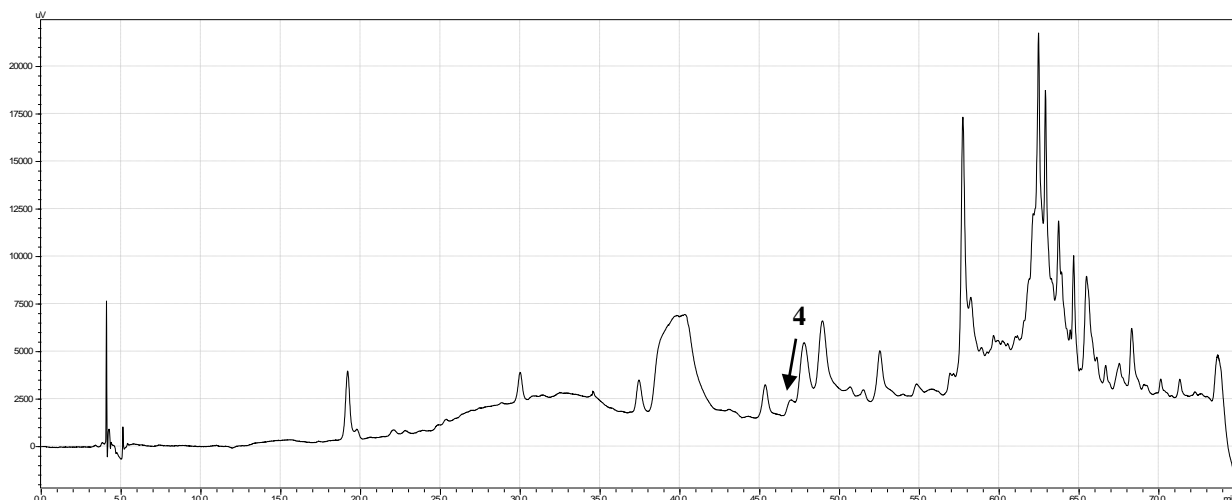
HPLC chromatograms of the ethanol extract of *C. pachystachya* leaves (1 mg/mL) with diode array detection at 278 nm. The peaks were indicating as follows: (2) chlorogenic acid and (4) quercetin. For chromatographic conditions, see material and methods.

Figure 3. Chromatograms of the stem ethanol extract of *Cecropia pachystachya* and standards.



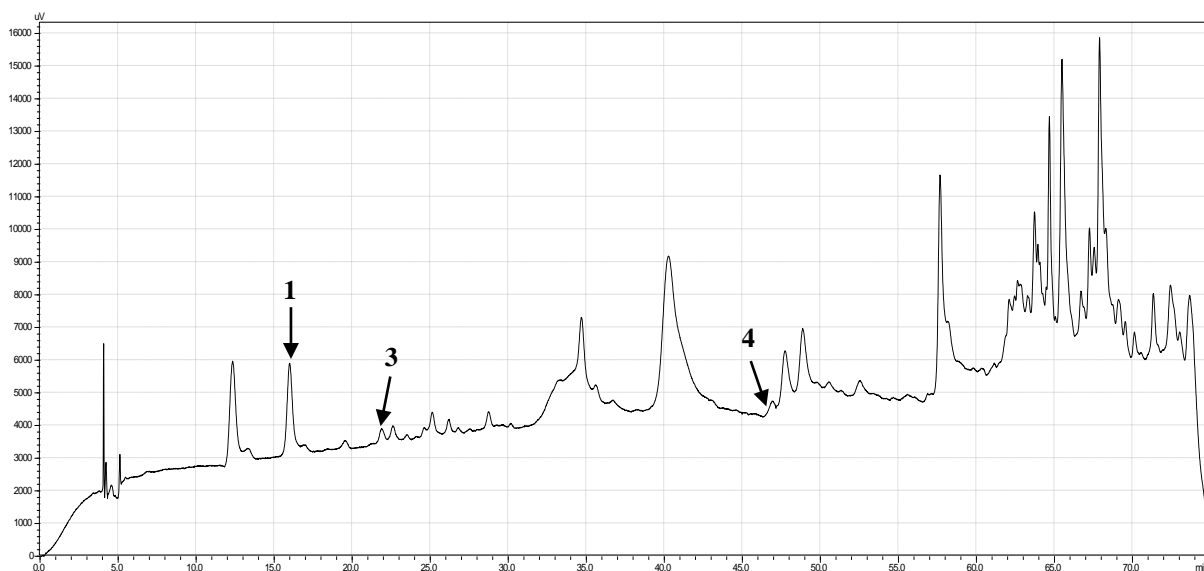
HPLC chromatograms of the ethanol extract of *C. pachystachya* stem (1 mg/mL) with diode array detection at 278 nm. The peaks were indicating as follows: (3) epicatechin and (4) quercetin. For chromatographic conditions, see material and methods.

Figure 4. Chromatograms of the root ethanol extract of *Cecropia pachystachya* and standards.



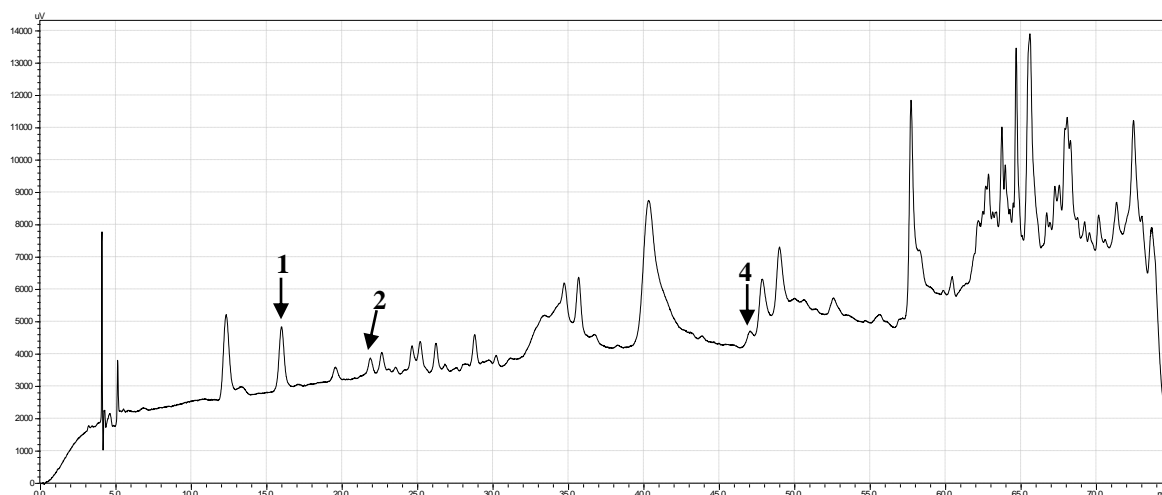
HPLC chromatograms of the ethanol extract of *C. pachystachya* root. (1 mg/mL) with diode array detection at 278 nm. The peaks were indicating as follows: (4) quercetin. For chromatographic conditions, see material and methods.

Figure 5. Chromatograms of the root bark ethanol extract of *Cecropia pachystachya* and standards.



HPLC chromatograms of the ethanol extract of *C. pachystachya* root bark (1 mg/mL) with diode array detection at 278 nm. The peaks were indicating as follows: (1) catechin; (3) epicatechin and (4) quercetin. For chromatographic conditions, see material and methods.

Figure 6. Chromatograms of the stem bark ethanol extract of *Cecropia pachystachya* and standards.



HPLC chromatograms of the ethanol extract of *C. pachystachya* stem bark (1 mg/mL) with diode array detection at 278 nm. The peaks were indicating as follows: (1) catechin; (2) epicatechin and (3) quercetin. For chromatographic conditions, see material and methods.

Therefore, it was determined that the leaf extracts features a quercetin and chlorogenic acid. Stem extract, it was possible to detect the presence epicatechin and quercetin, as the root extract was detected only quercetin. Already in the root and stem bark extracts was possible to indicate the presence of quercetin, catechin and epicatechin.

Although already exist to reports of the presence of caffeic acid in extracts of leaves of *Cecropia glaziovii*, which belongs to the same genus of the species under study (Arend et al., 2011), this compound was not detected in any of the extracts of *C. pachystachya*.

The presence of phenolic compounds, orientin, isoorientina and chlorogenic acid and isoquercitrin were already described in the methanol and aqueous extract of leaf of the *C. pachystachya* (Pacheco et al., 2014; Costa et al., 2011). Flavonoids catechin and epicatechin were described in extracts of leaves of some species of the genus *Cecropia* (Lacaille-Dubois et al., 2001; Li et al., 2013).

4. Conclusion

The presence of phenolic compound as catechin, epicatechin and quercetin in extracts of *C. pachystachya*, can be responsible for the antioxidant potential presented for all tested extracts.

The extracts of the root bark and stem bark showed higher antioxidant capacity in all tests and showed high levels of phenolic compounds. These results are of great importance, since this is the first record of the antioxidant activity of the extracts of the bark of *C. pachystachya*.

The high presence of phenolic compounds and a great free radical sequestration DDPH[•] capacity, high power reduction of iron and the capacity to inhibit lipid lipoperoxidation, have validated the medicinal importance of this species.

Thus, further studies should be performed, seeking to identify and quantify the compounds responsible for the activity presented, serving as a starting point for the development of products or drugs, used in the prevention and treatment of diseases, caused by excess oxidant agents in the body.

References

- Alves, M.D.J, Kenned, S. A., Muratori, L., Ferrreira, E.J., Sousa, G.M., de Jesus N.D., Pinheiro, P.M., Nascimento, J., Pessoa, C., Gonçalo, S., Lopes, A.M.G., 2014. Teor de fenóis e flavonoides, atividades antioxidante e citotóxica das folhas, frutos, cascas dos frutos e sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth (Leguminosae–Mimosoideae). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 13(5).
- Alves-Silva, J.M., dos Santos, S.M.D., Pintado, M.E., Pérez-Álvarez, J.A., Fernández-López, J., Viuda-Martos, M., 2013. Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. Food Control. 32, 371-378.
- Aragao, D. M. O., Guarize, L., Lanini, J., da Costa, J. C., Garcia, R. M. G., and Scio. E. , 2010. Hypoglycemic effects of *Cecropia Pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats, Journal of Ethnopharmacology. 128, 629–633.
- Aragao, D. M. O., Lima, I. V. A., da Silva, J. M. et al., 2013. Antiinflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia Pachystachya* Trécul, Phytotherapy Research. 27, 926–930.
- Arend, D.P., Dos Santos, T.C., Sonaglio, D., Dos Santos, A.L.G., Reginatto, F.H., De Campos, A.M., 2011. Experimental design as a tool to evaluate chlorogenic and caffeic acids extracted from *Cecropia glaziovii* Sneth. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 54, 58-66.
- Berg, C.C.; Rosselli, P.F., 2005. *Cecropia* Flora Neotropica, The New York Botanical Garden, New York.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. Technol. 28, 25-30.
- Choudhary, A., Mittal, A.K., Radhika, M., Tripathy, D., Chatterjee, A., Banerjee, U. C., Singh, I.P., 2013. Two new stereoisomeric antioxidant triterpenes from *Potentilla fulgens*. Fitoterapia. 91, 290–297.
- Costa, G. M., 2009. Estudo fitoquímico comparativo entre *Cecropia glaziovii* Sneth. E *Cecropia pachystachya* Trécul., MSc Thesis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.
- Costa, G.M., Ortmann, C.F., Schenkel, E.P., Reginatto, F.H. 2011. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. Journal of the Brazilian Chemical Society. 22, 1096-1102.
- Costa, G.M., Schenkel, E.P., Reginatto, F.H. 2011. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. Natural product communications. 6, 913-920.
- Cruz, C. D. 2013. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. Acta Scientiarum. Agronomy (Online). 35, 271-276.

Di Stasi, L.C.; Oliveira, G.P.; Carvalhaes, M.A.; Queiroz-Júnior, M.; Tien, O.S.; Kakinami, S.H.; Reis, M.S. 2002. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*.73, 69–91.

Drummen, G. P. C. Van Liebergen, L.C.M., OP Den Kamp, J.A.F., Post, J.A. 2002. C11-BODIPY581/591, an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro) spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radical Biology and Medicine*. 33, 473-490.

Gadkari, P.V., Kadimi, U.S., Balaraman, M.2014. Catechin concentrates of garden tea leaves (*Camellia sinensis* L.): extraction/isolation and evaluation of chemical composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94, 2921-2928.

Harborne, J. B., & Williams, C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55, 481–504.

Haslam, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products*. 59,205-215.

Hikawczuk, V. J., Saad, J. R., Guardia, T., Juarez, A. O., and Giordano, O. S., 1998. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia pachystachya*, *Anales des la Asociacion Quimica Argentina*. 86, 167–170.

Lacaille-Dubois, M. A., Franck, U., and Wagner, H., 2001. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants, *Phytomedicine*. 8, 47–52.

Li, J., Coleman, C.M., Wu, H., Burandt, C.L., Ferreira, D., Zjawiony, J.K. 2013. Triterpenoids and flavonoids from *Cecropia schreberiana* Miq.(Urticaceae). *Biochemical systematics and ecology*. 48, 96-99.

Lorenzi, H.; Matos, F.J.A., 2008. *Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Instituto Plantarium de Estudos da Flora Ltda, Nova Odessa.

MacDonald, R.C., MacDonald, R.I., Menco, B.P.M., Takeshita, K., Subbarao, N.K., Hu L-r. 1991. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1061, 297-303.

Mors, W.B.; Rizzini, C.T.; Pereira, N.A. 2000. *Medicinal Plants of Brazil*. Reference Publications, Algonac.

Naczka, M., Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. 1054, 95-111.

Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N. 2005. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and biophysical research communications*. 338, 668-676.

Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., & Trevisan, M. T. S., 2009a. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quimica Nova*. 32, 689–702.

Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., Barros, M. P., Mano, C. M., et al., 2009b. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruits residues. *Food Chemistry*. 115(2), 469–475 b.

Oliveira, M. B.S., Valentim, I. B., Vasconcelos, C.C., Omena, C.M.B, Bechara, E.J.H., da Costa, J.G., Freitas, M.L., Santana, A.E.G., Goulart, M. O. F. 2013. *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber ethanolic extract: antioxidant capacity and electrochemical investigation. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. 16, 121-129.

Omena, C.M.B., Valentim, I.B., Guedes, G.S., Rabelo, L.A., Mano, C.M., Bechara, E.J.H, Sawaya, A.C.H.F., Trevisan, M.T.S, Costa, J. G., Ferreira, R. C. S., Santana, A.E.G., Goulart, M.O.F. 2012. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits: antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. *Food Research International*. 49, 334-44.

Pacheco, N. R., Pinto, N. C. C., Silva, J. M., Mendes, R. F., Costa, J. C., Aragão, D. M. O., Castañón, M. C. M. N., Scio, E. 2014. *Cecropia pachystachya*: A Species with Expressive *In Vivo* Topical Anti-Inflammatory and *In Vitro* Antioxidant Effects. *BioMed Research International*, 2014.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S., Shahabimajd, N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African journal of biotechnology*. 5(11).

Rufino MSM, Alves RE , Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J. 2010. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem* 121: 996 - 1002.

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J., Saura-Calixto, F. 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*. 32, 407–412.

Scherer, R., Godoy, H. T. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*. 112, 654–658.

Scherer, R.; Godoy, H.T. Effects of extraction methods of phenolic compounds from *Xanthium strumarium* L. and their antioxidant activity. 2014. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas. 16, 41-46.

Shahidi, F., Janitha, P., Wanasundara, P. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. 32, 67-103.

Silva, T.C.L; Almeida, C.C.B.R.; Veras Filho, J.; Peixoto Sobrinho, T.J.S.; Amorim, E.L.C.; Costa, E.P., Araújo, J.M. 2011. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 32, 193-199.

Soares, S.E. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr*. 15, 71-81.

Sousa, C.D.M., Silva, H.R., Vieira-Jr, G.M., Ayres, M.C.C, Costa, C., Araújo, D.S., Cavalcante, L.C.D., Barros, E.D.S., Araújo, P.B.M., Brandão, M.S., Chaves, M. H. 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química nova*. 30, 351-355.

Souza, L.B., Gindri, A.L., Piana, M., Frohlich, J.K., Belke, B.V., Athayde, M.L. 2013. Quantificação de flavonóides nas raízes de *Urera baccifera* Gaudich (URTICACEAE). *Revista Contexto & Saúde*.11, 1287-1290.

Tanae, M.M., Lima-Landman, M.T.R., De Lima, T.C.M., Souccar, C., Lapa, A.J. 2007. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antacid secretion and antidepressant-like activities. *Phytomedicine*. 14, 309-313.

Velazquez, E., Tournier, H.A., Buschiazzo, P.M., Saavedra, G., Schinella, G.R., 2003. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*. 74, 91–97.

Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of agricultural and food chemistry*.46, 4113-4117.

Wang, S.Y., Lin, H-S. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of agricultural and food chemistry*. 48, 140-146.

**5.3 ARTIGO 03. Constituintes químicos dos extratos etanólicos de
Cecropia pachystachya Trécul.**

(Artigo a ser submetido ao Journal of Natural Products / Índice de impacto:3.94)

Constituintes químicos dos extratos etanólicos de *Cecropia pachystachya* Trécul.

C. K. B. PEREIRA¹; A. F. SANTOS¹; A. R., SABINO¹; E. S. BENTO¹; A. E. G. SANTANA^{1*}

1. Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970 Maceió - Al

*E-mail: aegsal@gmail.com

Resumo

O gênero *Cecropia* é composto por cerca de 60 espécies, com ampla distribuição, principalmente na Argentina, Brasil, México e Paraguai. As substâncias mais comumente descritas para as espécies desse gênero são terpenos, esteróides e compostos fenólicos, como as proantocianidinas e flavonóides. Dentre os princípios ativos já isolados, destaca-se o ácido tormêntico, por sua atividade antimalárica. O objetivo do trabalho foi isolar o ácido tormêntico, substância ativa responsável pela atividade antimalárica, visando isolar esse composto em quantidade suficiente para ensaios de toxicidade e genotoxicidade, bem como isolar e elucidar outros compostos presentes na *Cecropia pachystachya*. Os extratos etanólicos foram preparados a partir das raízes, caule, casca da raiz e casca do caule da *C. pachystachya*. Em seguida os extratos foram submetidos ao processo de separação líquido-líquido e, na sequência, submetidos a processos cromatográficos de isolamento e purificação. Os processos cromatográficos foram realizados em coluna aberta, tendo como suporte gel de sílica, para a obtenção de diversas frações, que foram recromatografadas e deram origem a amostras mais puras. Foi possível o isolamento de quatro substâncias, o ácido tormêntico, um derivado do ácido tormêntico que sofreu acetilação e outras duas substâncias, uma molécula com núcleo triterpênico (I.S.I.) e a IFR2, que ainda estão sendo identificadas.

Palavras – chave: *Cecropia pachystachya*, isolamento, elucidação estrutural e extratos vegetais.

INTRODUÇÃO

O gênero *Cecropia* é composto por cerca de 60 espécies, com ampla distribuição, principalmente na Argentina, Brasil, México e Paraguai ^{1,2}. Geralmente as espécies desse gênero são árvores encontradas na vegetação secundária com alturas entre 5 e 25 metros, com cores e texturas distintas de acordo com a espécie ^{3,4}.

O tronco oco de algumas espécies é habitado por formigas, especialmente aqueles do gênero *Azteca*, que é considerado por muitos investigadores uma vantagem para ambos os organismos. A preguiça (*Bradypus* sp.) também faz uso dessa árvore, alimentando-se de suas folhas e os botões ^{4,5}.

As espécies do gênero *Cecropia* são conhecidas no Brasil por diversos nomes populares, dentre eles, embaúba, imbaúba, umbaúba e embaúva. O uso popular destas espécies está associado a chás usados nos tratamentos de doenças respiratórias, hipertensão, controle da glicemia, no tratamento de diabetes mellitus e também como diurético ⁶⁻⁹.

As substâncias mais comumente descritas para as espécies desse gênero são terpenos, esteróides e compostos fenólicos, como as proantocianidinas e flavonóides ¹⁰⁻¹⁴.

Alguns terpenóides, como β -sitosterol, ácidos polômico e oleanólico, α -amirina; sitostenona, ácido tormêntico, alguns flavonóides, como orientina, isoorientina, e outros compostos fenólicos, como ácido protocatequina e ácido clorogênico, tem sido descritos para a espécie *Cecropia pachystachya* ^{11, 13, 15- 17}.

Alguns estudos com a espécie, foram publicados relatando efeitos cardiovasculares em ratos, provocando hipotensão, efeito hipoglicemiante e efeito sedativo, atividade antioxidante e ação como anti-inflamatório oral ^{17- 20}.

Todas as atividades e indicação de possíveis substâncias relacionadas à espécie *Cecropia pachystachya*, levam ao interesse em aprofundar os conhecimentos sobre a espécie, bem como sobre o gênero ao qual ela pertence, que tem mostrado grande ação como antimalárico nos ensaios efetuados pelo nosso grupo de pesquisa.

O objetivo do trabalho foi isolar o ácido tormêntico, substância ativa responsável pela atividade antimalárica, visando isolar esse composto em quantidade suficiente para ensaios de toxicidade e genotoxicidade, bem como isolar e elucidar outros compostos presentes na *Cecropia pachystachya*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Prospecção fitoquímica. Os resultados obtidos na análise qualitativa dos extratos de *C. pachystachya*, estão apresentados na tabela 1. Esses dados assemelham-se aos encontrados por Uchôa ¹⁵, que descreve o isolamento de esteróides e triterpenos nos extratos etanólicos de *C. pachystachya*.

Outros trabalhos corroboram os resultados descritos aqui, indicando a presença de compostos fenólicos como flavonóides, catequinas, epicatequinas, proantocianidinas e isoquercetina em extratos de *C. pachystachya* ^{13-14, 19}.

Tabela 1. Classe de compostos presentes nos extratos etanólicos de *C. pachystachya*.

Amostra	Constituintes	Classe dos compostos
Raiz	Fenóis Flavonas, flavonóis e xantonas Triterpeno pentacíclico	Compostos fenólicos Terpenos
Caule	Fenóis Flavononóis, flavononas, flavonóis e xantonas Triterpeno pentacíclico Taninos condensados	Compostos fenólicos Terpenos
Casca da raiz	Flavononóis, flavononas, flavonóis e Xantonas Antraquinonas Triterpeno pentacíclico Taninos condensados	Compostos fenólicos Terpenos
Casca do caule	Flavonas, flavonóis, xantonas, flavononóis, flavononas Antraquinonas Esteróides livres	Compostos fenólicos Terpenos

Fracionamento e monitoramento do ácido tormêntico nos extratos da raiz e caule de *C. pachystachya*. Os resultados obtidos das análises por CCD, das cinco frações, obtidas do processo de partição do extrato da raiz, indicaram que apenas as frações em CHCl_3 e AcOET, apresentaram o ácido tormêntico (Tabela 2).

Tabela 2. Amostras obtidas dos processos de separação do extrato etanólico da raiz de *C. pachystachya*.

Material	Massa (g)	Rendimento	Composto
Fração Hexano	15,74	20%	Não há presença de ácido tormêntico
Fração Clorofórmio	45,15	58%	Presença de ácido tormêntico
Fração Acetato de etila	2,87	4%	Presença de ácido tormêntico
Fração Butanol	5,51	7%	Não foi possível determinar por CCD
Fração Hidrometanólica	6,32	8%	Não foi possível determinar por CCD

As 10 frações obtidas a partir das cromatografias em coluna, das frações em hexano (31%) e a fração em clorofórmio (36%), do extrato do caule de *C. pachystachya*, foram analisadas por CCD e monitoradas quanto a presença do ácido tormêntico. Em todas as 10 frações foi possível detectar a presença desse composto (Tabela 3). As frações semelhantes foram reunidas para posterior purificação e análise da atividade antimalárica.

A presença do ácido tormêntico nos extratos da raiz e tronco de *C. pachystachya* já foi relatado por Uchôa¹⁵, sendo o ácido isolado da fração em hexano, obtido por processo de cromatografia em coluna com gel de sílica e em cromatografia em gel de Sephadex LH-20. No trabalho de Jung et al.²¹, o isolamento do ácido tormêntico foi realizado a partir da fração acetato de etila, no extrato da raiz de *Rosa rugosa*. Esses dados confirmam a presença desse composto em frações de baixa polaridade, como as obtidas em nosso estudo.

Tabela 3. Amostras obtidas nos processos de cromatografia das frações hexano e clorofórmio, provenientes do extrato etanólico do caule de *C. pachystachya*.

MATERIAL		COMPOSTO
Fração Hexano	Fração Hexano	Detecção do A.T
	Fração Hexano:Clorofórmio(1:1)	Detecção do A.T
	Fração Clorofórmio	Detecção do A.T
	Fração Clorofórmio: metanol(1:1)	Detecção do A.T
	Fração Metanol	Detecção do A.T
Fração Clorofórmio	Fração Hexano	Detecção do A.T
	Fração Hexano:Clorofórmio(1:1)	Detecção do A.T
	Fração Clorofórmio	Detecção do A.T
	Fração Clorofórmio: metanol(1:1)	Detecção do A.T
	Fração Metanol	Detecção do A.T

*A.T. – Ácido tormêntico

Fracionamento do extrato da casca da raiz. Os resultados obtidos para o extrato da casca da raiz estão simplificados na Tabela 4, abaixo. O processo cromatográfico da reunião das frações F1 e F2, deu origem a 71 frações, das quais apenas as frações 19 a 31 apresentaram o ácido tormêntico. Apenas nas frações 18 a 21, provenientes da parte I da Fração 3, e nas frações 19 a 21, oriundas da parte II da da Fração 3, foi possível detectar o ácido tormêntico. A coluna cromatográfica da Fração 4, deu origem as duas frações, fração 5 a 6 e 10 a 12, onde foi possível dectar a presença do ácido tormêntico. No final desse processo foi possível obter cinco frações com o ácido tormêntico provenientes do extrato da casca da raiz.

Essas frações foram reunidas com as demais frações obtidas do fracionamento dos outros extratos de *C. pachystachya* e enviadas para realização de ensaio antimaláricos.

Tabela 4. Amostras obtidas nos processos de cromatografia da fração acetato de etila, provenientes do extrato etanólico da casca da raiz de *C. pachystachya*.

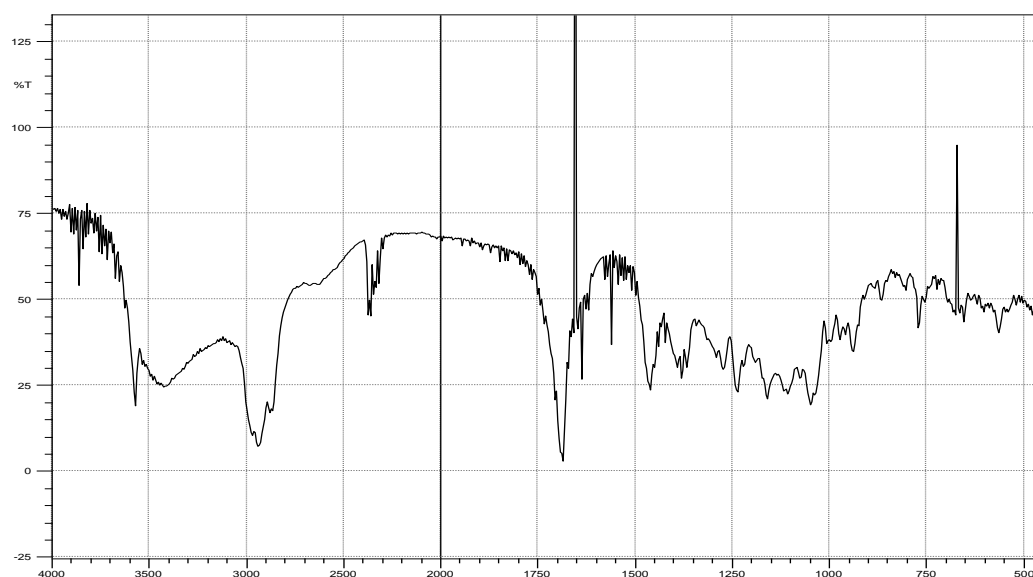
MATERIAL		COMPOSTO
Fração 1 e 2 (71 frações)	Fração 1 a 18	Ausência do A.T
	Fração 19 a 31	Deteccção do A.T
	Fração 32 a 71	Ausência do A.T
Fração 3 parte I (28 frações)	Fração 1 a 17	Ausência do A.T
	Fração 18 a 21	Deteccção do A.T
	Fração 22 a 28	Ausência do A.T
Fração 3 parte II (26 frações)	Fração 1 a 18	Ausência do A.T
	Fração 19 a 21	Deteccção do A.T
	Fração 22 a 26	Ausência do A.T
Fração 4 (26 frações)	Fração 1 a 4	Ausência do A.T
	Fração 5 a 6	Deteccção do A.T
	Fração 7 a 9	Ausência do A.T
	Fração 10 a 12	Deteccção do A.T
	Fração 13 a 26	Ausência do A.T

*A.T. – Ácido tormêntico

Fracionamento e isolamento de compostos de amostras provenientes de outras fontes. O

composto 1, denominado de IF1A foi analisada por IV (Figura 1) e RMN. O espectro na região do infravermelho revelou banda de absorção equivalente ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ de carbonila observado a 1710 cm^{-1} . As bandas de absorção na região de 2900 cm^{-1} são características de estiramento simétrico (ν_s) e estiramento assimétrico (ν_{as}) de ligações C-H. As bandas de absorção na região de $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ são característicos de estiramento O-H.

Figura 1. Espectro na região do infravermelho da amostra I.F.1.A. em ATR.



Os espectros de RMN, obtidos para essa amostra foram: Espectro de RMN ^1H , Espectro de RMN ^{13}C , Espectro de RMN DEPTQ-135; Espectro de RMN 2D HMBC; Espectro de RMN 2D HSQC; Espectro de RMN 2D COSY (Figuras 2 a 7). O espectro de ressonância do ^1H em CDCl_3 mostra um sinal em $\delta 5.34$ ppm de um hidrogênio olefínico (H-12). Os sinais de $\delta 5.24$ ppm e $\delta 4.52$ ppm, referem-se a hidrogênios carbinólicos (C-2 e C-3). A análise conjunta dos dados dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT-135 revelou a presença de átomos de 54 C, sendo quinze CH_3 ; vinte CH_2 ; treze CH e 6 C quaternários. Observou-se um sinal de um grupo carbonila a $\delta 184.05$ ppm (C-28) e sinais a $\delta 138.24$ ppm (C-13) e $\delta 129.07$ ppm (C-12) referentes a carbonos olefínicos. A comparação com dados descritos na literatura^{14,21} permitiu propor para o composto 1, denominado de IFIA, a estrutura básica do ácido tormêntico. Esta molécula deve possuir a estrutura do ácido tormêntico com duas moléculas de hexoses ligadas nas porções C2 e C3 (Figura 16). Este produto de acetilação possui 6 grupos acetilas ($\delta 138$ ppm; 170.68 ppm; 170.82 ppm; 170.90 ppm; 171.08 ppm e 184.05 ppm), corroborando com a presença de duas unidades de açúcar, mas os espectros de RMN, tanto de ^1H quanto de ^{13}C não são conclusivos.

Figura 2. Espectro de RMN ^1H do composto 1, solvente CDCl_3 obtido a 600 MHz.

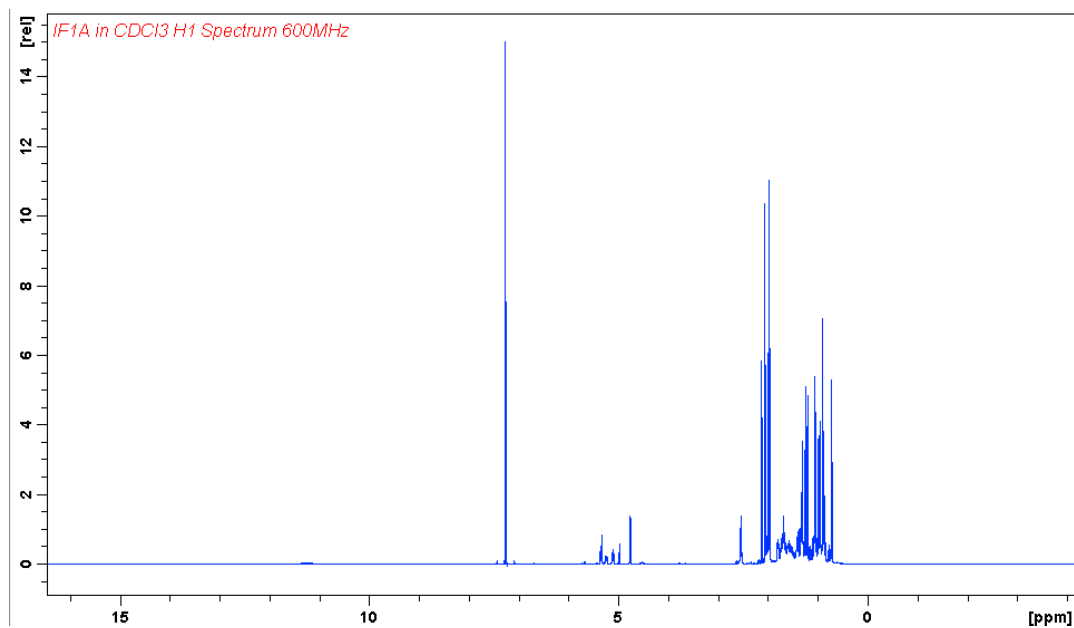


Figura 3. Espectro de RMN ^{13}C do composto 1, solvente CDCl_3 obtido a 600 MHz.

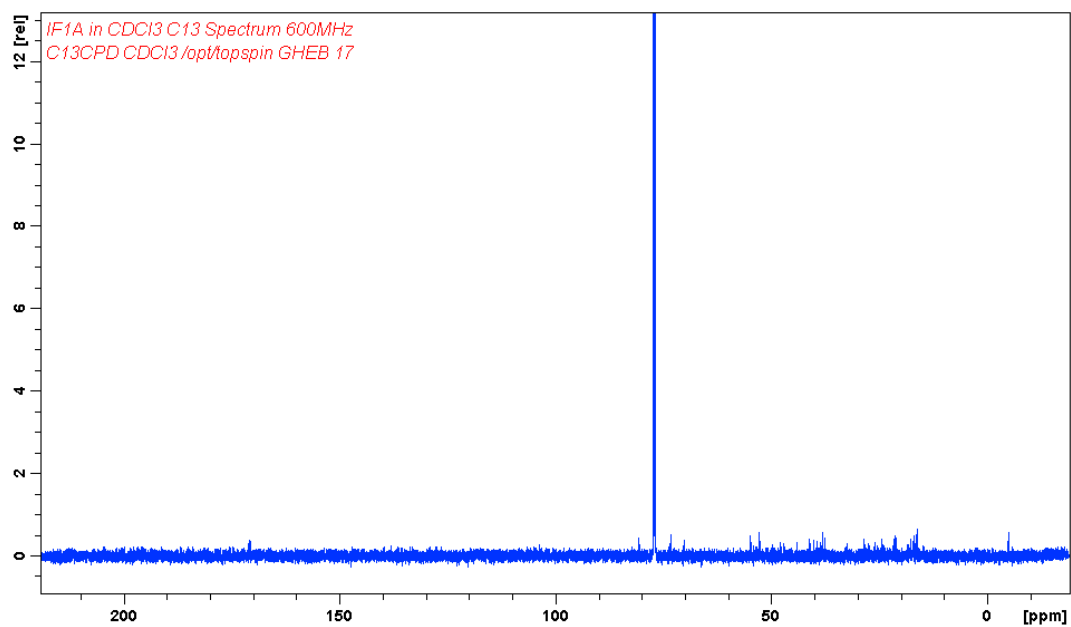


Figura 4. Espectro de RMN DEPTQ-135 do composto 1, solvente CDCl_3 obtido a 600 MHz.

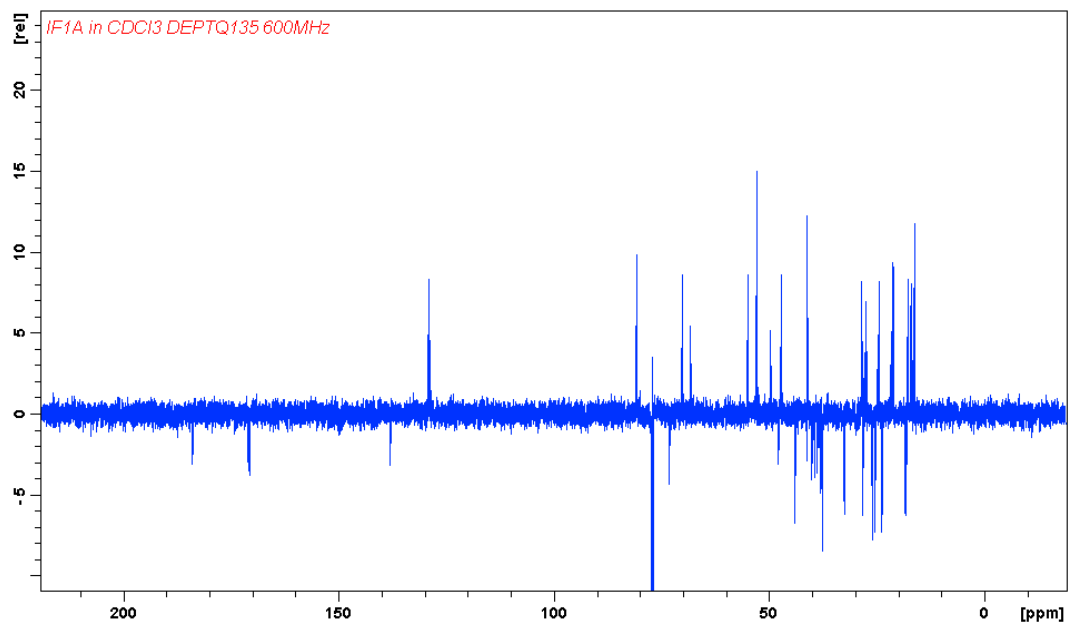


Figura 5. Espectro de RMN 2D HMBC do composto 1, solvente CDCl_3 obtido a 600 MHz.

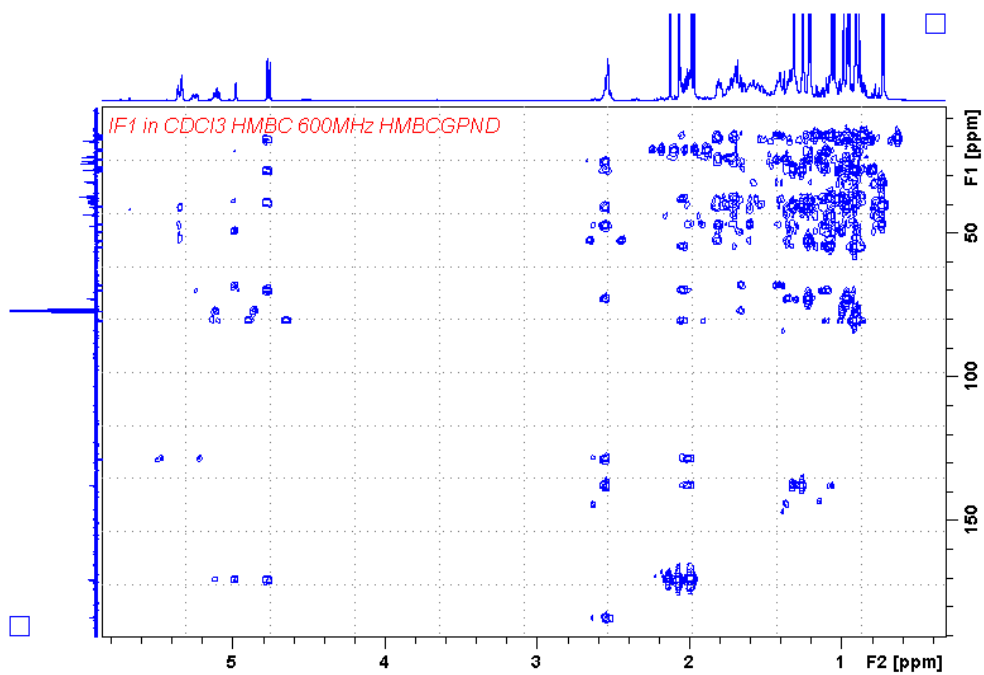


Figura 6. Espectro de RMN 2D HSQC do composto 1, solvente CDCl_3 obtido a 600 MHz.

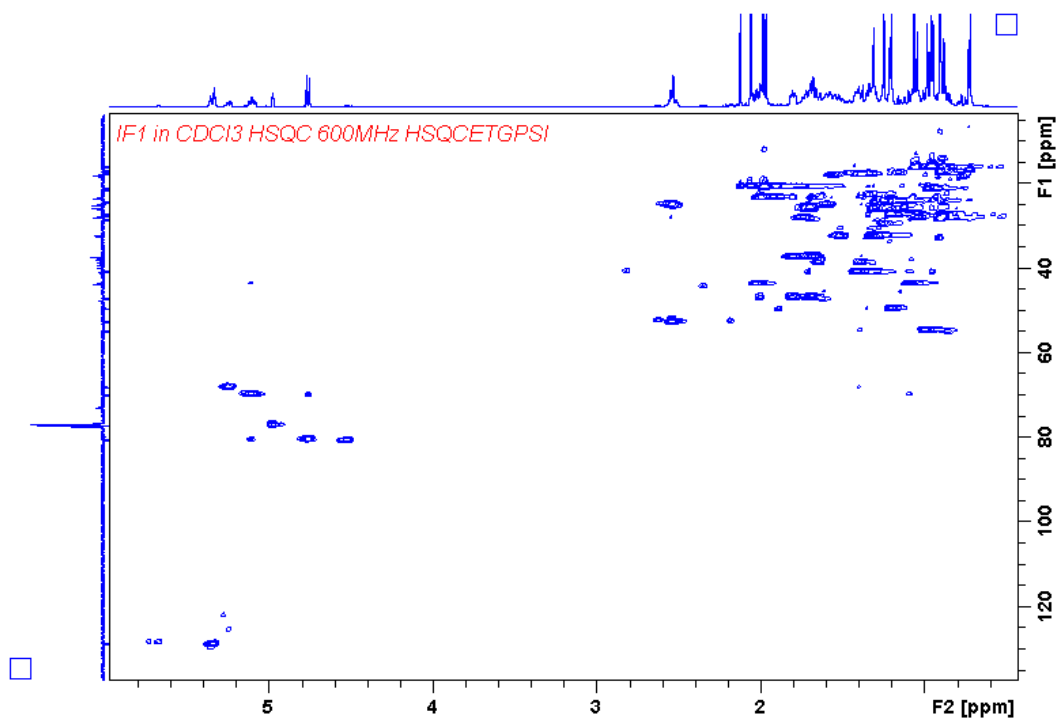
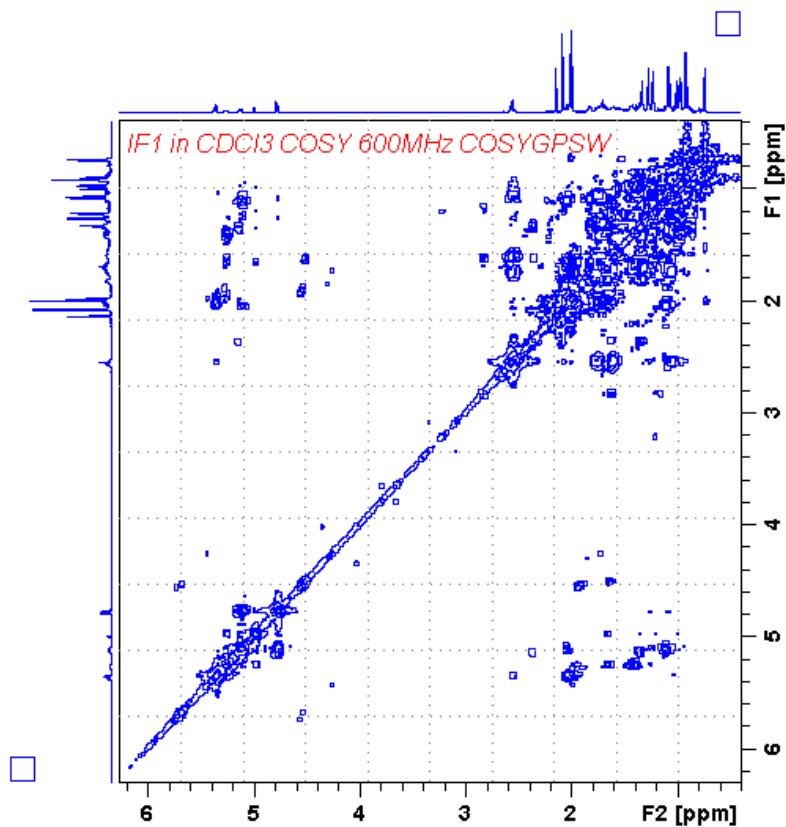


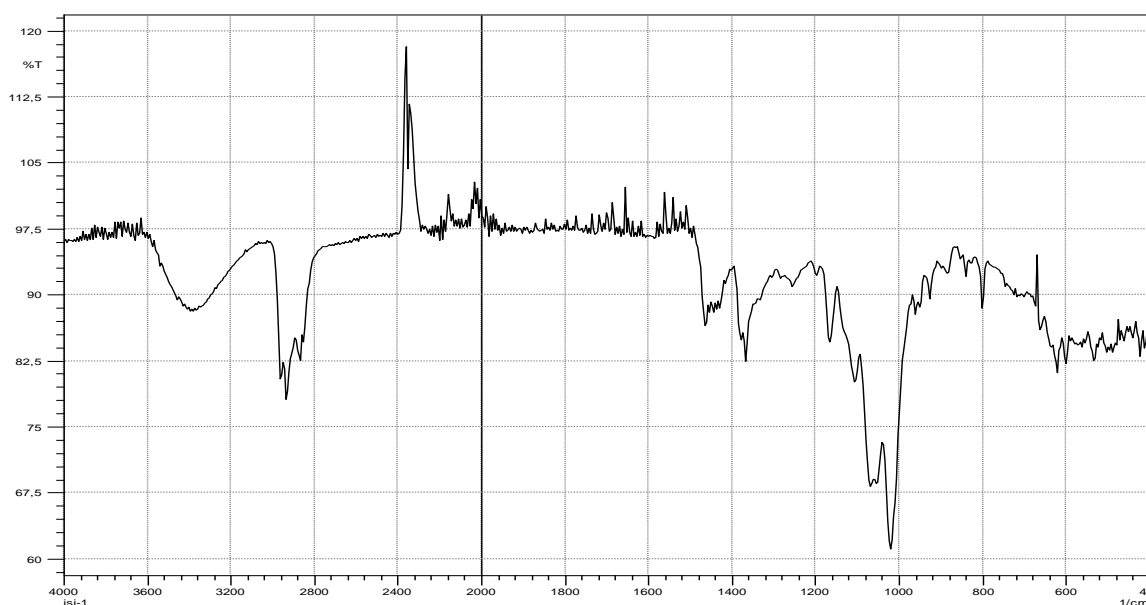
Figura 7. Espectro de RMN 2D COSY do composto 1, solvente CDCl_3 obtido a 600 MHz.



O composto 2, denominado de I.S.I. foi também analisado por Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Na análise por IV (Figura 8), foi possível observar a presença de bandas de absorção na região de 3300-3500 cm^{-1} característicos de estiramento O-H, bandas na região de 2900 a 3000 cm^{-1} , características de estiramento axiais simétricos (vs) e estiramento assimétrico (vas) de ligação C-H, bandas de deformação na região entre 1450 e 1300 cm^{-1} , referente a deformação C-H e bandas nas regiões entre 1300-900 cm^{-1} , referente a estiramento C-O.

Figura 8. Espectro na região do infravermelho da amostra I.S.I., composto 2, usando ATR.



Os espectros de RMN, obtidos para essa amostra foram: Espectro de RMN ^1H , Espectro de RMN ^{13}C , Espectro de RMN DEPT-135; Espectro de RMN DEPT-90, Espectro de RMN 2D HMBC; Espectro de RMN 2D HSQC; Espectro de RMN 2D COSY (Figuras 9 a 15).

A análise conjunta dos dados dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT-135 e DEPT-90, revelou a presença de 30 átomos de C (Tabela 4), sendo seis CH_3 ; nove CH_2 ; onze CH e quatro C.

Para este composto foi proposto um núcleo triterpênico (Figura 16), observando-se sinais em 140.19 ppm (C-13) e δ 122.19 ppm (C-12), referente aos carbonos olefínicos, mas sem sinal referente a carbonila. A estrutura do composto ainda não foi determinada, sendo necessários outros experimentos para obtenção de maiores informações sobre a molécula, visando a elucidação da estrutura. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C precisam ser mais trabalhados pois o

número de grupos metilas encontrado é pequeno e diferente dos triterpeno encontrados nesta planta.

Figura 9. Espectro de RMN ^1H do composto 2, solvente CDCl_3 obtido a 400 MHz.

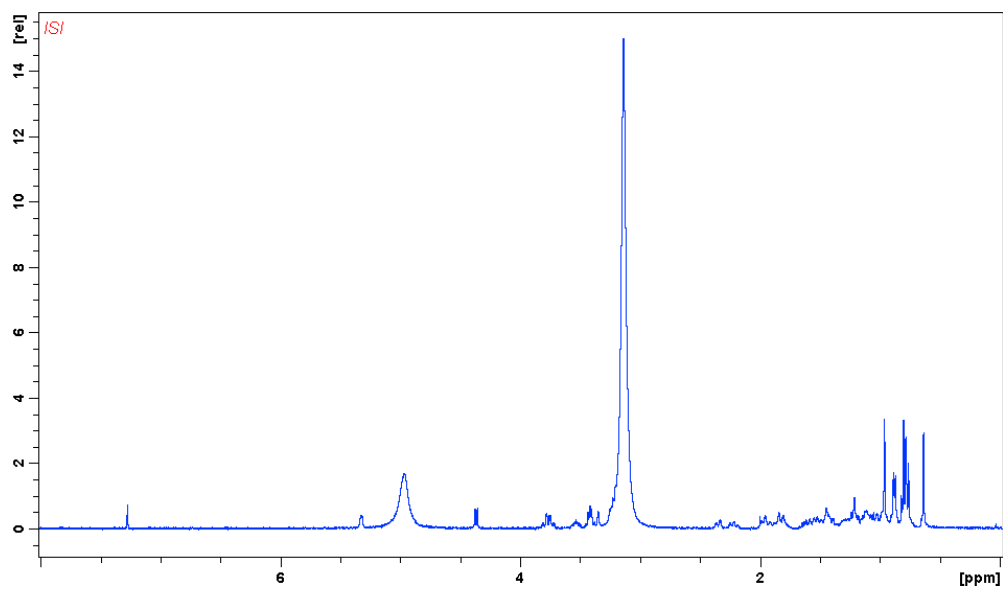


Figura 10. Espectro de RMN ^{13}C do composto 2, solvente CDCl_3 obtido a 100 MHz.

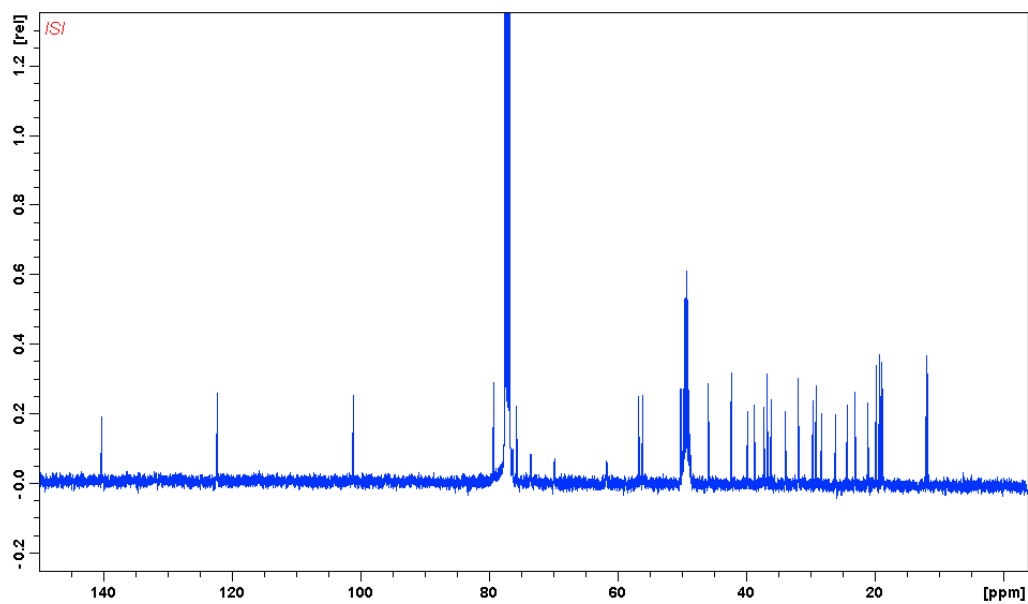


Figura 11. Espectro de RMN DEPT-135 do composto 2, solvente CDCl_3 obtido a 100 MHz.

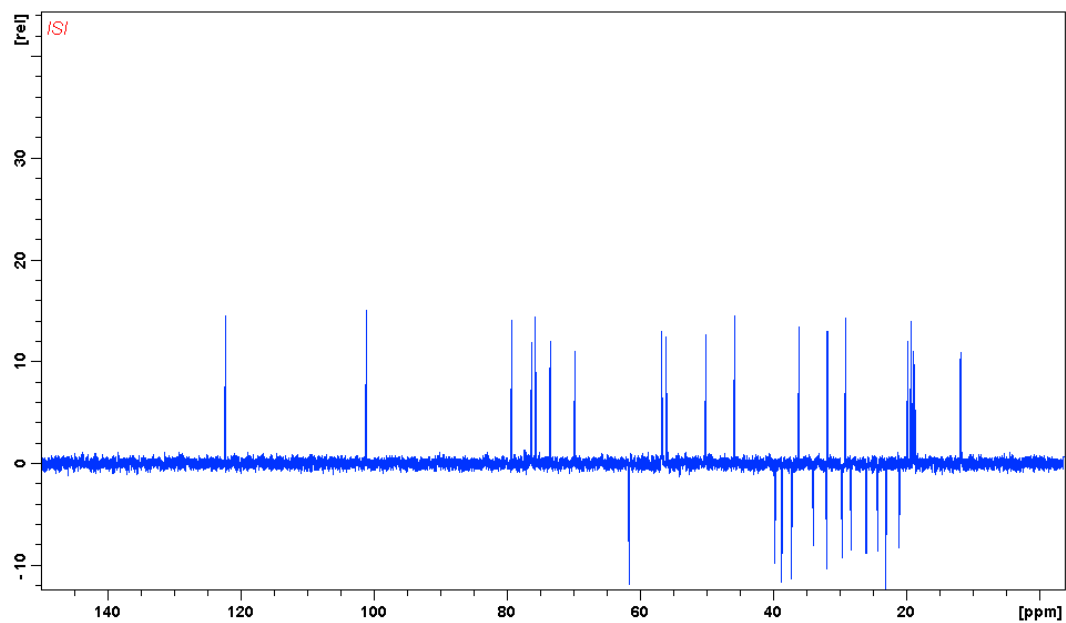


Figura 12. Espectro de RMN DEPT-90 do composto 2, solvente CDCl_3 obtido a 100 MHz.

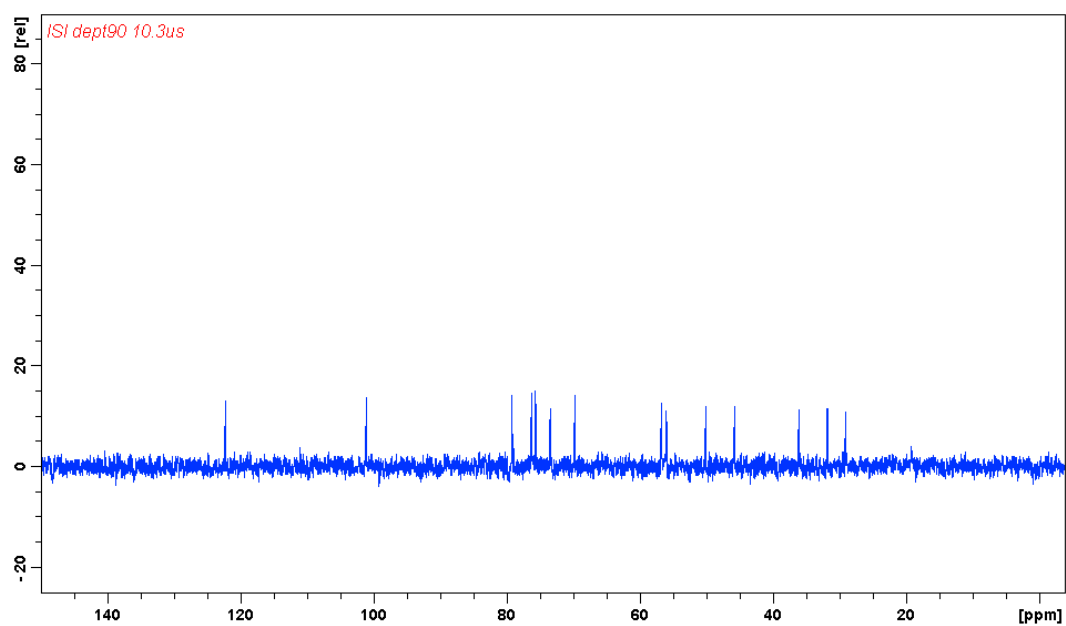


Figura 13. Espectro de RMN 2D HMBC do composto 2, solvente CDCl_3 obtido a 100 MHz.

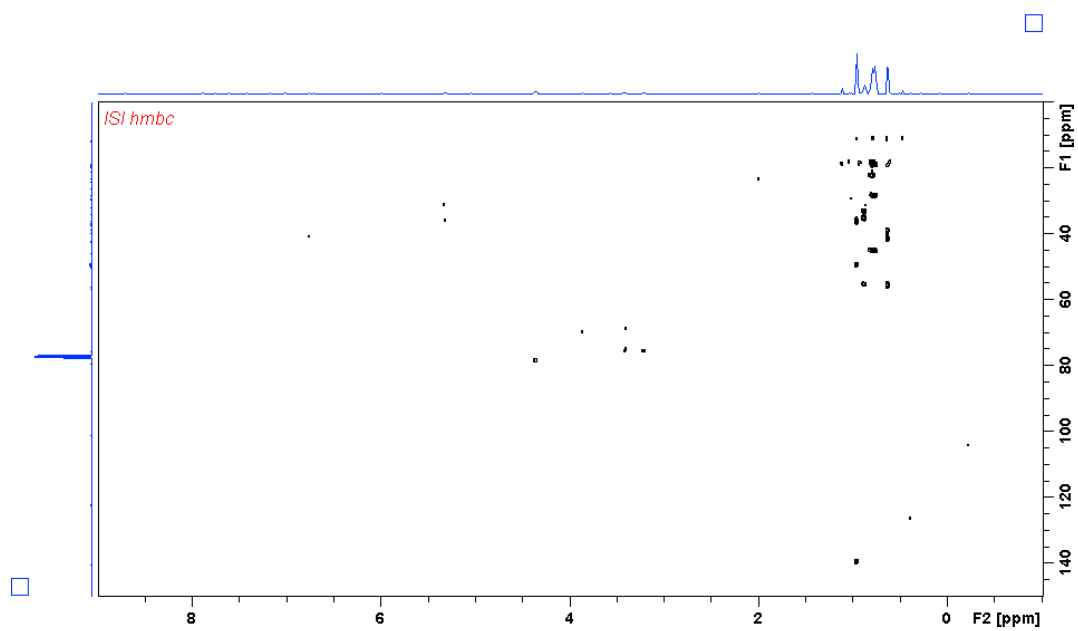


Figura 14. Espectro de RMN 2D HSQC do composto 2, solvente CDCl_3 obtido a 100 MHz.

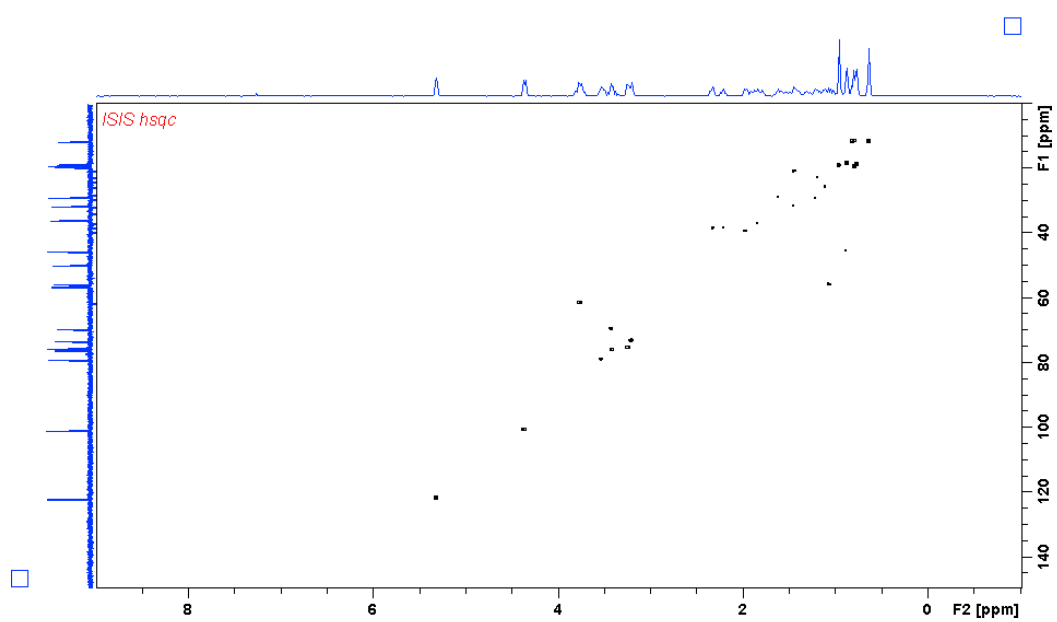


Figura 15. Espectro de RMN 2D COSY do composto 2, solvente CDCl_3 obtido a 100 MHz.

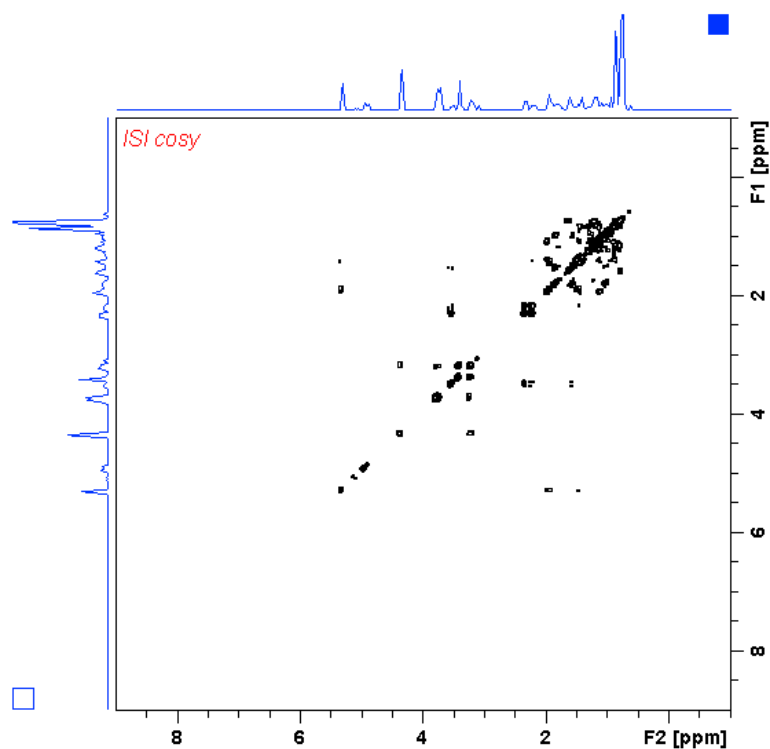
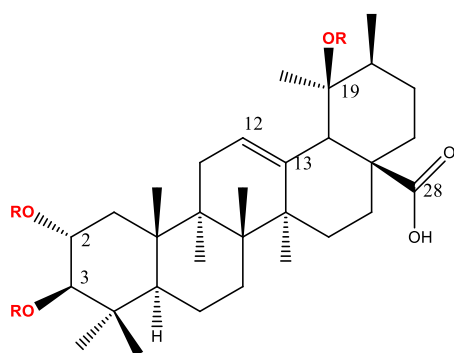
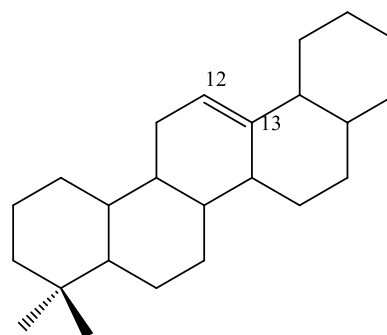


Figura 16. Estruturas propostas para os compostos 1 e 2.



Composto 1



Estrutura básica para o Composto 2

Composto 1: Ácido tormêntico acetilado;

Composto 2: Estrutura com núcleo triterpênico básico.

Tabela 5. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para o composto 2.

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm), Tipo	$\delta^1\text{H}$ (ppm)/multiplicidade
11.77, CH ₃	0.63, s
11.89, CH ₃	0.80, dd
18.70, CH ₃	
18.93, CH ₃	
19.24, CH ₃	0.78 - 1.44
19.72, CH ₃	
20.99, CH ₂	
23.00, CH ₂	
24.22, CH ₂	
26.017, C	
28.17, CH ₂	0.76 - 1.87
29.06, CH	
31.81, CH	
31.89, CH ₂	
33.88, CH ₂	
36.10, CH	1.30
36.67, C	-
37.19, CH ₂	
38.66, CH ₂	0.95 - 1.95
39.71, CH ₂	
42.29, C	
45.79, CH	0.88
50.09, CH	1.11
56.00, CH	1.4
56.70, CH	3.71
75.64, CH	3.3
79.22, CH	3.52
101.02, CH	5.07
122.19, CH	5.25
140.19, C	-

* s- simpleto; d- duplete; dd - duplo duplete; dt - duplo tripleto e m - multiplete.

A amostra IFR2 (composto 3) foi analisada por IR e RMN, sendo os espectros obtidos para essa amostras: Espectro de ^1H , ^{13}C , DEPT-135 e DEPT- 90. Os espectros obtidos nas análises por IV e RMN, para essa amostra estão sendo analisados para elucidação das estruturas. No entanto será necessário submeter a amostra a experimentos de purificação.

Ao final do processo de análise da constituição química dos extratos etanólicos da *C. pachystachya*, foi possível indicar a presença de compostos fenólicos, como flavonóides, xantonas, taninos, antraquinonas e compostos triterpênicos como esteróides e triperpenos pentacíclicos.

Quatro substâncias foram isoladas desses extratos, dentre elas, o ácido tormêntico (15g) e um derivado do ácido tormêntico que teve que ser acetilado para sua solubilização, que serão utilizados nos ensaios antimaláricos, e outras duas substâncias, uma molécula com núcleo triterpênico, ainda sendo identificada, e a IFR2 que estão sendo analisadas para elucidação estrutural.

SEÇÃO EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais. As amostras foram analisadas em Espectrômetro no Infravermelho (IV) por reflectância total atenuada (ATR), em equipamento IR Prestige 21 (Shimadzu). Os espectros de RMN unidimensionais (^1H , ^{13}C , DEPT- 90 e DEPT-135) e bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY e J- resolvido), obtidos em CDCl_3 , foram realizados em equipamento BRUKER AVANCE 400, utilizando-se o sinal do TMS como referencial interno.

Material vegetal. A espécie *C. pachystachya* foi coletada nas proximidades do município de Marechal Deodoro – Alagoas, em março de 2011 (latitude: 09° 68'5525" S e longitude: 35° 82'5230" W). A identificação botânica da espécie foi efetuada pela Dr^a. Rosângela Lemos e uma exsicata foi depositada no Herbário do IMA – Instituto do Meio Ambiente, situado no Estado de Alagoas – Brasil, sob número de registro: MAC 14,305.

O material obtido foi dividido em raiz, casca da raiz, caule e casca do caule, submetido a processo de secagem e em seguida, triturado e pesado para posteriormente ser usado nos processos de extração.

Preparação dos extratos. O material vegetal seco e reduzido a pó (1 kg de raiz, 1 kg de caule, 200g da casca da raiz e 200g da casca do caule) foi submetido à extração em etanol 90% (20L para cada quilo do material vegetal), em percolador de aço inoxidável, por 72 horas, e por três vezes consecutivas. Os extratos etanólicos obtidos foram secos sob pressão reduzida, em evaporador rotativo, dando origem aos extratos da raiz (170g), do tronco (200g), da casca da raiz (6,52g) e da casca do tronco (3,60g).

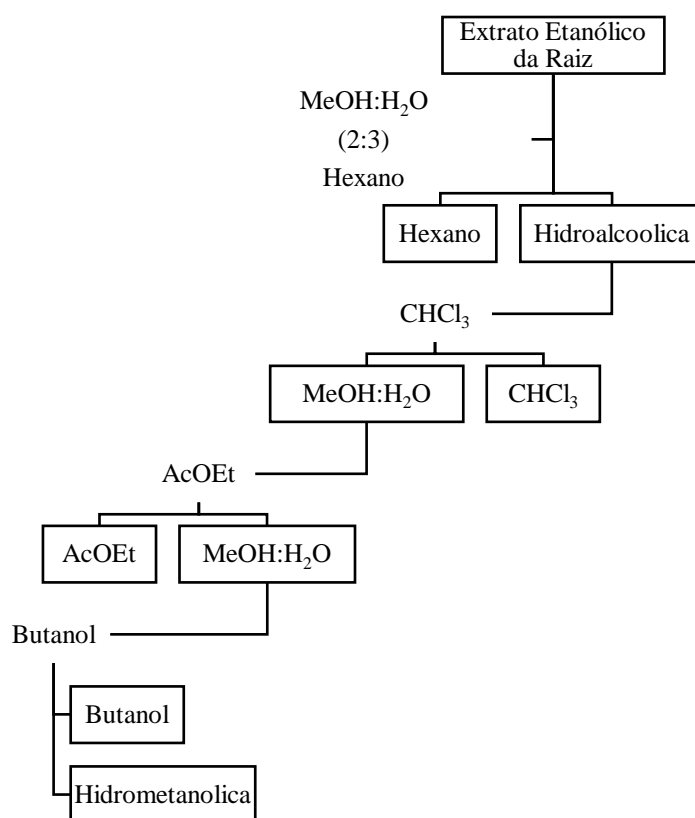
Todos os extratos obtidos foram submetidos a processo de prospecção fitoquímica, mas apenas os extratos da raiz, caule e casca da raiz foram usados para dar sequência aos processos de separação e isolamento. A quantidade obtida para o extrato da casca do tronco, inviabilizou a continuidade do estudo fitoquímico, sendo este extrato utilizado apenas na prospecção fitoquímica e reservado para utilização nos ensaios biológicos.

Prospecção fitoquímica. Os extratos obtidos a partir da espécie *C. pachystachya* foram submetidos a testes qualitativos para identificação dos grupos de metabólitos secundários presentes. Os testes se basearam na observação visual da alteração de cor ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos. A presença das seguintes classes foi

analisada: fenóis e taninos; antocianidinas e flavonóides; leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas; flavonóis, flavanonóis, flavanonas e xantonas; esteróides e triterpenos; saponinas; antraquinonas, antronas e cumarinas e alcalóides.

Fracionamento e monitoramento do ácido tormêntico no extrato da raiz de *C. pachystachya*. O extrato etanólico da raiz (78g) foi solubilizado numa mistura de metanol:água (2:3) e particionado sucessivamente com hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol. As cinco frações (hexano, clorofórmio, acetato, butanol e hidrometanólica) obtidas para o extrato da raiz, foram analisadas por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 17). As placas foram eluidas com a mistura CHCl_3 :AcOEt (1:1) e reveladas em solução de sulfato cérico, seguido de aquecimento em estufa a 100°C , por 10 minutos.

Figura 17. Processo de separação do extrato etanólico da raiz de *C. pachystachya*.



As análises em CCD foram monitoradas com o auxílio de um padrão de ácido tormêntico com a finalidade de determinar a presença deste composto nas frações obtidas. O padrão utilizado foi obtido a partir do extrato etanólico da raiz de *C. pachystachya*, por meio de separação e isolamento em laboratório e identificado por meio de técnicas espectroscópicas.

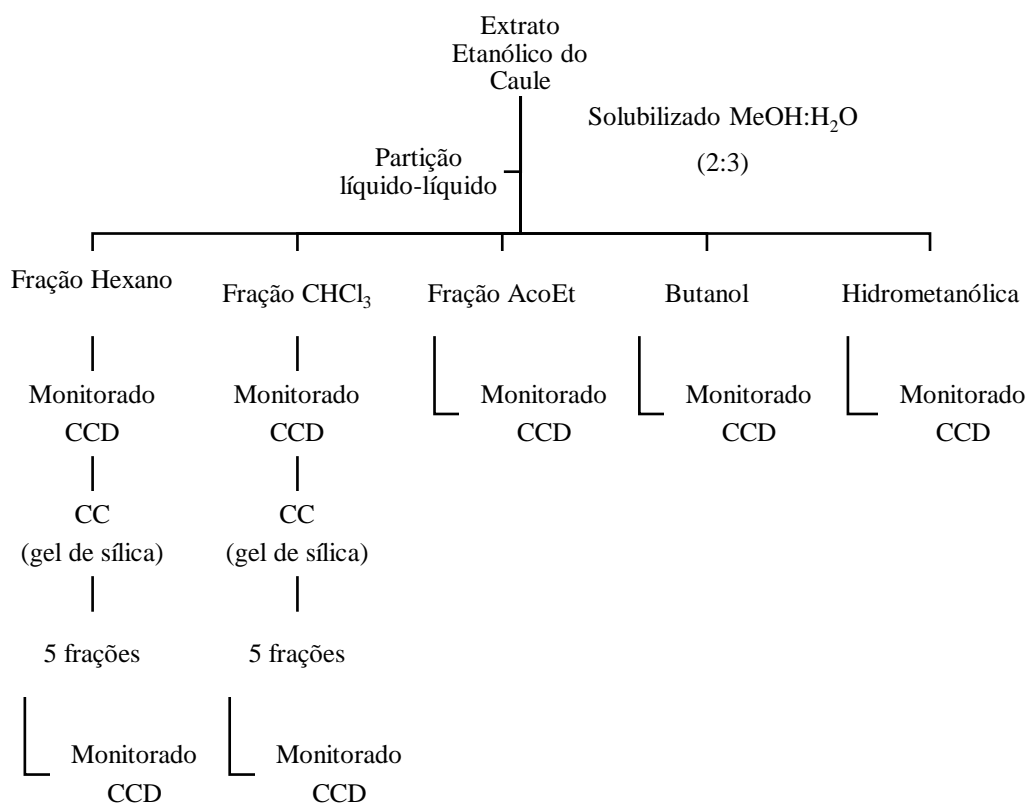
As frações que evidenciaram a presença do padrão foram usadas para dar sequência ao processo de purificação e enviadas posteriormente para ensaios antimaláricos.

Fracionamento e monitoramento do ácido tormêntico no extrato do caule de *C.*

pachystachya. O extrato etanólico do caule (150g), foi submetido a processo de partição, sendo inicialmente solubilizado na mistura metanol:água (2:3) e na sequência, extraído consecutivamente com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol. As frações obtidas nesse processo foram analisadas por CCD, para identificação da presença do ácido tormêntico.

Dentre as frações obtidas, apenas as frações em hexano (46,13g) e em clorofórmio (54,75g) apresentaram o ácido, sendo então submetidas separadamente a cromatografia em coluna aberta, usando como suporte gel de sílica e eluídas com gradiente de solvente C_6H_{14} , $CHCl_3$, CH_3OH e suas misturas, obtendo-se cinco frações em cada processo cromatográfico. Essas frações também foram avaliadas por CCD e monitoradas quanto a presença do ácido tormêntico.

Figura 18. Processo de separação do extrato etanólico do caule de *C. pachystachya*.



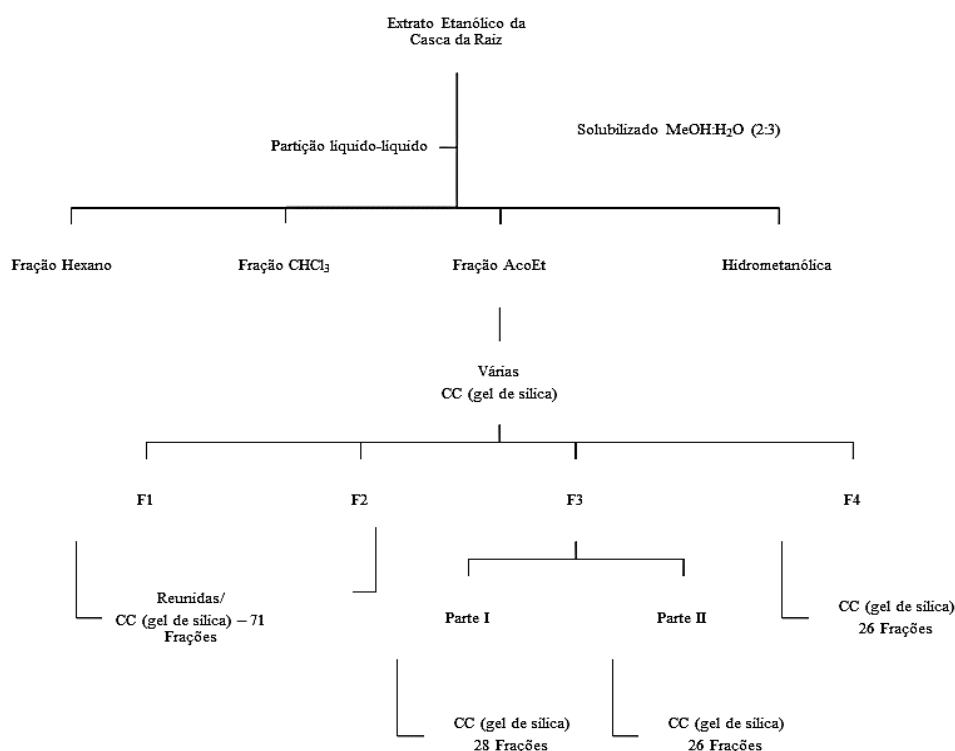
Fracionamento e monitoramento do ácido tormêntico no extrato da casca da raiz de *C.*

pachystachya. O extrato da casca da raiz (5 g), foi inicialmente solubilizado na mistura metanol:água (2:3) e submetido a processo de partição com os solvente hexano, clorofórmio e acetato de etila, originando as frações em hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidrometanólica, que foram analisadas por CCD para determinação da presença do ácido tormêntico. A fração em acetato de etila, foi escolhida para dar sequência ao processo de extração, por conter este composto.

Essa fração foi submetida sucessivamente a várias cromatografias em coluna aberta, usando como suporte gel de sílica, para se obter quatro frações de interesse denominadas de: F1; F2; F3 e F4. As frações F1 e F2 foram reunidas e recromatografadas em coluna aberta, com gel de sílica, originando 71 frações. A amostra F3, foi dividida em duas partes, parte I e parte II que foram submetidas separadamente a cromatografia em coluna aberta, usando como suporte gel de sílica, originando 28 e 26 frações, respectivamente. A amostra F4, foi submetida a sucessivos processos cromatográficos, em coluna aberta com gel de sílica usado como suporte, originando 26 frações.

Todas as frações obtidas nos processos cromatográficos citados, provenientes das frações F1, F2, F3 e F4, foram analisadas por CCD, para a determinação da presença do ácido tormêntico.

Figura 19. Processo de extração e separação do extrato etanólico da casca da raiz de *C.pachystachya*.



Fracionamento e isolamento de compostos de amostras provenientes de outras fontes.

Algumas amostras, oriundas de trabalhos anteriores com a *C. pachystachya*, foram avaliadas por meio de CCD para verificação da presença do ácido tormêntico. Essas amostras foram organizadas em grupos e denominadas de F1, FR2, Grupo 1 e Grupo 2.

A amostra F1 foi solubilizada na mistura metanol:água (2:3), e deu origem a duas frações, uma solúvel na solução hidroalcoólica (FS) e uma insolúvel nessa solução (FI). A amostra solúvel (FS) foi sucessivamente particionada com hexano, cloforórmio e acetato de etila, originando quatro frações. Destas as frações em hexano, clorofórmio e fração hidrometanólica, após análise por CCD, e confirmação da presença do ácido tormêntico, foram reunidas e purificadas e posteriormente usadas nos ensaios de atividade antimalárica.

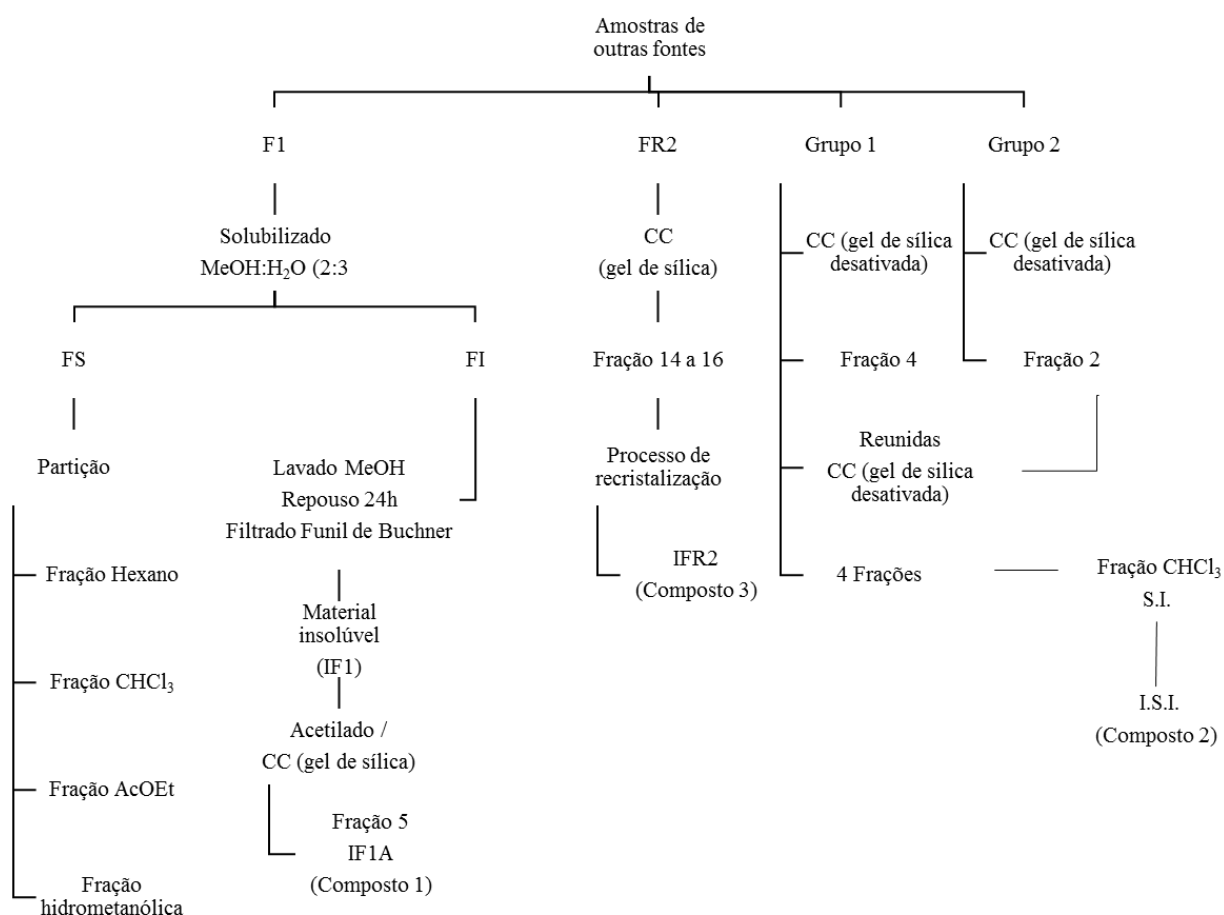
A amostra insolúvel a solução hidroalcoólica (FI), foi lavada em metanol, mantida em repouso por 24 horas e filtrada em funil de Buchner. Após a filtragem, o material insolúvel obtido, denominado de IF1, foi submetido a processo de acetilação, com o intuito de promover sua solubilização. Após esse processo, a amostra foi submetida à cromatografia em coluna aberta com sílica gel, visando sua purificação, dando origem a 5 frações. A fração 5 (denominada de IF1A), deu origem a um sólido branco, amorfo (composto 1). Esse composto foi analisado por espectroscopia no Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

A amostra denominada Grupo 1, foi submetida a cromatografia em coluna aberta, usando como suporte gel de sílica desativado (sílica acrescida com 10% de água destilada). A fração 4 obtida dessa coluna, após análise por CCD, foi usada para dar sequência ao processo de isolamento.

A amostra denominada Grupo 2, também foi submetida a cromatografia em coluna aberta, usando como suporte gel de sílica desativado. A fração 2 obtida dessa coluna, foi analisada por CCD e apresentou perfil semelhante a fração 4, oriunda do Grupo 1. Essas frações por apresentarem perfil cromatográfico semelhantes foram reunidas e recromatografadas em coluna aberta com sílica desativada, dando origem a quatro frações. A fração em clorofórmio, após análise por CCD indicou a ausência do ácido tormêntico, no entanto foi escolhida para dar sequência ao trabalho por apresentar certo grau de pureza. Essa fração foi denominada de S.I. e passou por processo de recristalização, em éter etílico, dando origem a um sólido branco, amorfo denominado de I.S.I. (composto 2). Esse composto também foi analisado por espectroscopia no infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

A amostra denominada FR2, submetida anteriormente a ensaios biológicos, revelou que essa amostra apresentou atividade antimalárica, por esse motivo também foi iniciado o processo de isolamento do princípio ativo dessa amostra, por cromatografia em coluna aberta usando como suporte gel de sílica. As frações 14 a 16, provenientes desse processo cromatográfico, passaram por processo de recristalização dando origem a um sólido branco, denominado de IFR2 (composto 3) que foi analisado por espectroscopia no infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A figura 20, resume o processo de separação e isolamento das amostras provenientes de outras fontes.

Figura 20. Processo de fracionamento e isolamento de compostos de amostras provenientes de outras fontes.



REFERÊNCIAS

1. Berg, C.C., Rosselli, P.F. *Cecropia. Flora Neotropica*, The New York Botanical Garden, New York, **2005**.
2. Pio-Corrêa M. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, **1978**.
3. Labova, T.A; Mori, S.A.; Blanchard, F.; Peckham, H.; Charles-Dominique, P. *Cecropia* as a food resource for bats in French Guiana and the significance of fruit structure in seed dispersal and longevity. *American Journal of Botany*. **2003**, 90, 388-403.
4. Costa, G.M.; Schenkel, E.P.; Reginatto, F.H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. *Natural product communications*. **2011**,6(6),913-20.
5. Backes, P.; Irgang, B.E. *Árvores do Sul: Guia de Identificação & Interesse Ecológico*. Instituto Souza Cruz, São Paulo. **2002**.
6. Mors, W.B.; Rizzini, C.T.; Pereira, N.A. *Medicinal Plants of Brazil*. Reference Publications, Algonac. **2000**.
7. Costa, **Estudo fitoquímico comparativo entre *Cecropia glaziovii* Sneth. E *Cecropia pachystachya* Trécul.**, 112f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, 2009.
8. Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarium de Estudos da Flora Ltda, **2008**.
9. Di Stasi, L.C.; Oliveira, G.P.; Carvalhaes, M.A.; Queiroz-Júnior, M.; Tien, O.S.; Kakinami, S.H.; Reis, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*. **2002**, 73, 69–91.
10. Hikawczuk, V.J.; Saad, J.R.; Guardia, T.; Juarez, A.O.; Giordano, O.S. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia pachystachya*. *Anales de la Asociación Química Argentina*. **1998**, 86, 167-170.
11. Oliveira, R.R.; Leitão, G.G.; Moraes, M.C.C.; Kaplan, M.A.C.; Lopes, D., Carauta, J.P.P. Gradient elution for triterpene separation from *Cecropia lyratiloba* Miguel by HSCCC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology*. **2005**, 28, 1985-1992.
12. Rocha, G.G.; Simões, M.; Lúcio, K.A.; Oliveira, R.R.; Kaplan, M.A.C.; Gattass, C.R. Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2007**, 15, 7355-7360.
13. Lacaille-Dubois, M.A.; Franck, U.; Wagner, H. Search for potential Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine*. **2001**, 8, 47-52.

14. Tanae, M.M.; Lima-Landman, M.T.R.; De Lima, T.C.M.; Souccar, C.; Lapa, A.J. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antacid secretion and antidepressant-like activities. *Phytomedicine*. **2007**, 14, 309-313.
15. Uchoa, VT. (2004) **Avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações das espécies *Cecropia pachystachya* Trécul. (Cecropiaceae) e *Ximenia americana* L. (Olacaceae) e o estudo fitoquímico das *C. pachystachya* guiado pelo bioensaio antimalárico in vivo.** MSc Thesis, Federal University of Alagoas, Recife, Brazil, 2004.
16. Uchoa, V.T.; Paula, R.C.; Krettli, L.G.; Santana, AEG, Krettli AU. Antimalarial activity of compounds and mixed fractions of *Cecropia pachystachya*. *Drug Development Research*. **2010**, 71, 82-91.
17. Aragão, D.M.O.; Guarize, L.; Lanini, J.; Costa, J.C.; Garcia, R.M.G.; Scio, E. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **2010**, 128, 629-633.
18. Consolini, A.E.; Migliori, G. N. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **2005**, 96, 417–422.
19. Pacheco, N.R., Pinto, N.C.C.; Silva, J. M.; Mendes, R.F.; Costa, J. C.; Aragão, D.M.O.; Castañon, M. C.M.N.; Scio, E. *Cecropia pachystachya*: A Species with Expressive In Vivo Topical Anti-Inflammatory and In Vitro Antioxidant Effects. *BioMed Research International*, **2014**.
20. Aragao, D. M. O.; Lima, I. V. A.; Silva, J. M.; Bellozi, P.M.Q.; Costa, J. C.; Cardoso, G. M.M.; Souza-Fagundes, E.M.; Scio, E. Antiinflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trecul, *Phytotherapy Research*. **2013**, 27(6), 926–930.
21. Jung, H.J.; Nam, J.H.; Choi, J.; Lee, K.T; Park, H.J. 19a-Hydroxyursane-Type Triterpenoids: Antinociceptive Anti-inflammatory Principles of the Roots of *Rosa rugosa*. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, 28(1), 101—104.
22. Taniguchi, S.; Imayoshi, Y.; Kobayashi, E.; Takamatsu, Y.; Ito, H.; Hatano, T, et al. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. *Phytochemistry*. **2002**, 59(3), 315-23.

5.4. ARTIGO 04. Variabilidade sazonal e quantificação do ácido tormêntico em extratos de *Cecropia pachystachya* Trécul.

(Artigo a ser submetido a *Molecules* / Índice de impacto:2.095)

Article

Variação sazonal e quantificação do ácido tormêntico em extratos de *Cecropia pachystachya* Trécul

Carla Karine Barbosa Pereira ¹, Isis Torres Souza ¹, João Gomes da Costa ¹ and Antônio Euzébio Goulart Santana ^{1,*}

¹Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970 Maceió, Alagoas, Brasil, E-mail: carlakbp@gmail.com (C.K.B.P.); isinhasouza@gmail.com (I.T.S)

²Embrapa Tabuleiros Costeiros / Unidade de Pesquisas Rio Largo, 57100-000 Rio Largo, Alagoas, Brasil; joo.gomesdacosta@gmail.com (J.G.C).

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: aegs@gmail.com (AEGS); Tel.: +55-82-3214-1388 (AEGS).

Abstract: O gênero *Cecropia* é composto por cerca de 60 espécies, constituídas geralmente por árvores, encontradas com alturas entre 5 a 25 metros, com ampla distribuição, principalmente na Argentina, Brasil, México e Paraguai. O uso popular destas espécies está associado a chás usados nos tratamentos de doenças respiratórias, hipertensão e controle da glicemia. Elas são conhecidas no Brasil por diversos nomes populares, dentre eles, embaúba, imbaúba, umbauá e embaúva. A espécie *C. pachystachya*, pertencente a esse gênero, já foi descrita com diversas atividade biológicas, sendo relatada ação antioxidante e anti-inflamatória, atividade anti-leishmania, efeitos cardiovasculares em ratos, provocando hipotensão, hipoglicemia e sedação. Além disso, estudos fitoquímicos descrevem a presença de diversas substâncias para a espécie, tais como: β -sitosterol, α -amirina, sitostenona, ácido tormêntico, orientina, isoorientina, e outros compostos fenólicos. O objetivo desse trabalho foi quantificar a presença do ácido tormentico nos extratos vegetais de *C.pachystachya*, com a finalidade de definir a parte da planta que apresenta maior teor desse composto, bem como o melhor método para extração e a melhor época de coleta. Além disso, os dados climáticos foram registrados, com a finalidade de avaliar sua influência sobre a produção do ácido tormêntico. A coleta do material foi realizada no período de dezembro de 2013 a novembro de 2014, totalizando 12 meses de coleta. As raízes, troncos e cascas foram pulverizadas e extraídas com etanol na proporção (1:10) por quatro métodos de extração: a frio, a quente, por ultrassom e por micro-ondas. Os extratos obtidos foram analisado por CLAE e o teor de ácido tormentico foi quantificado, sendo expresso em μg de ácido tormêntico/mg de extrato. Os resultado obtidos indicam que o método de extração a frio foi o que apresentou maior teor de ácido tormêntico (230.62 μg A.T./mg extrato). Dentre as partes, a raíz apresentou a maior concentração do composto (207.54 μg A.T./mg extrato), e o mês de maio foi o que apresentou maior produção do composto (325.01 μg A.T./mg extrato).

Keywords: métodos de extração; CLAE; parâmetros climáticos, embaúba.

1. Introdução

A família Urticaceae, que abrange o gênero *Cecropia*, é composta por 42 gêneros e aproximadamente 600 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, tendo sua importância econômica baseada no uso medicinal, extração de fibras e clorofila. As espécies pertencentes a essa família são geralmente herbáceas ou pequenos arbustos, mas em alguns casos, podem chegar a cerca de 3-15 metros de altura [1,2].

O gênero *Cecropia* é composto por cerca de 60 espécies, constituídas geralmente por árvores, encontradas com alturas entre 5 a 25 metros, com ampla distribuição, principalmente na Argentina, Brasil, México e Paraguai. As espécies desse gênero possuem características como tronco oco, segmentado e ereto e folhas largas, com cor distinta e textura, variando de acordo com a espécie [3,4].

O uso popular destas espécies está associado a chás usados nos tratamentos de doenças respiratórias, pressão arterial alta, controle da glicemia, no tratamento de diabetes mellitus e também como diurético. Elas são conhecidas no Brasil por diversos nomes populares, dentre eles, embaúba, imbaúba, umbaúba e embaúva [5-8].

A espécie *C. pachystachya*, pertencente a esse gênero, já foi descrita com diversas atividades biológicas, sendo relatada ação antioxidante e anti-inflamatória, atividade anti-leishmania, efeitos cardiovasculares em ratos, provocando hipotensão, hipoglicemia e sedação [9-13].

Além disso, estudos fitoquímicos descrevem a presença de diversas substâncias para a espécie, tais como: β -sitosterol, α -amirina, sitostenona, ácido tormêntico, orientina, isoorientina, e outros compostos fenólicos [10-11;14-15].

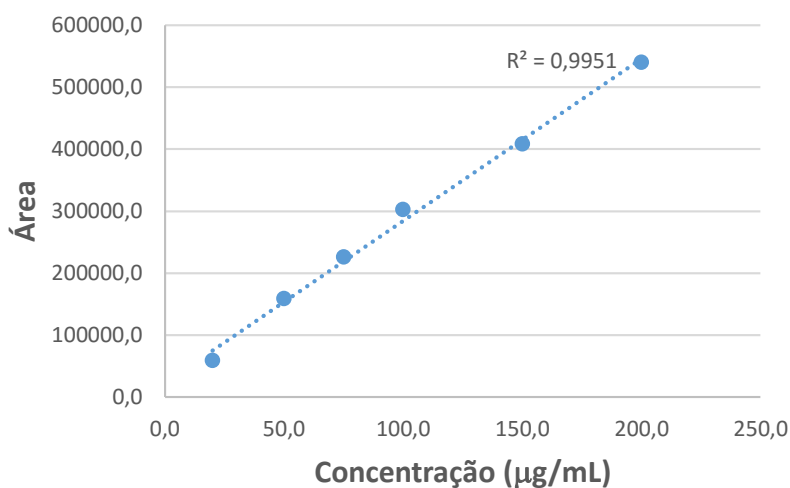
O ácido tormêntico, metabólito secundário pertencente à classe dos triterpenos, isolado da espécie *C. pachystachya*, tem sido reportado com diversas atividades biológicas, dentre elas: antiplaquetária; efeito antiteratogênico; agente antitumoral induzindo apoptose; potencial agente para o tratamento de doenças vasculoproliferativas, controlando a proliferação anormal de células musculares lisas vasculares; potente atividade supressora de tumores; atividade anti-inflamatória; atuando como inibidor de DNA polimerase em mamíferos e apresentando potente efeito inibidor sobre o crescimento de células cancerígenas e atividade genotóxica [16-23].

Em face das atividades biológicas descritas para o ácido tormêntico, a sua presença nos extratos de *C. pachystachya* foi quantificada com a finalidade de definir a parte da planta que apresenta o maior teor desse composto, bem como o melhor método para extração e a melhor época de coleta. Além disso, os dados climáticos foram registrados, com a finalidade de avaliar sua influência sobre a produção do ácido tormêntico.

2. Resultados e Discussão

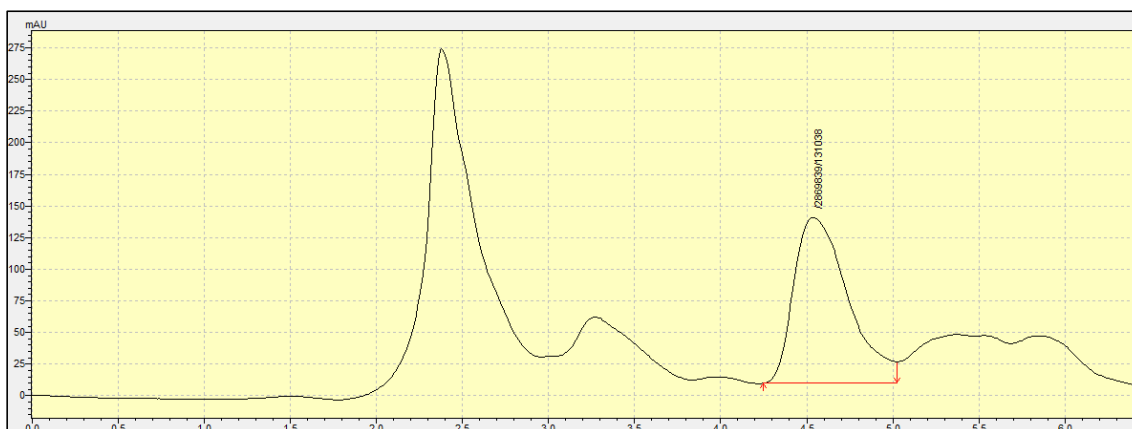
As análises foram realizadas a partir de três variáveis, mês de coleta, tipo de extração e parte da planta usada, com a finalidade de se obter o teor de ácido tormêntico presente. A curva de calibração obtida para o ácido tormêntico, está representada na figura 1. O coeficiente encontrado foi $R^2 = 0,9951$.

Figura 1. Curva de calibração do ácido tormêntico obtida em CLAE C08.



A quantificação do ácido tormêntico foi realizada por comparação das áreas obtidas para o padrão com as áreas do material obtido na extração, conforme cromatograma apresentado na figura 2.

Figura 2. Cromatograma obtido do extrato da raiz de *C. pachystachya* para o método a frio.

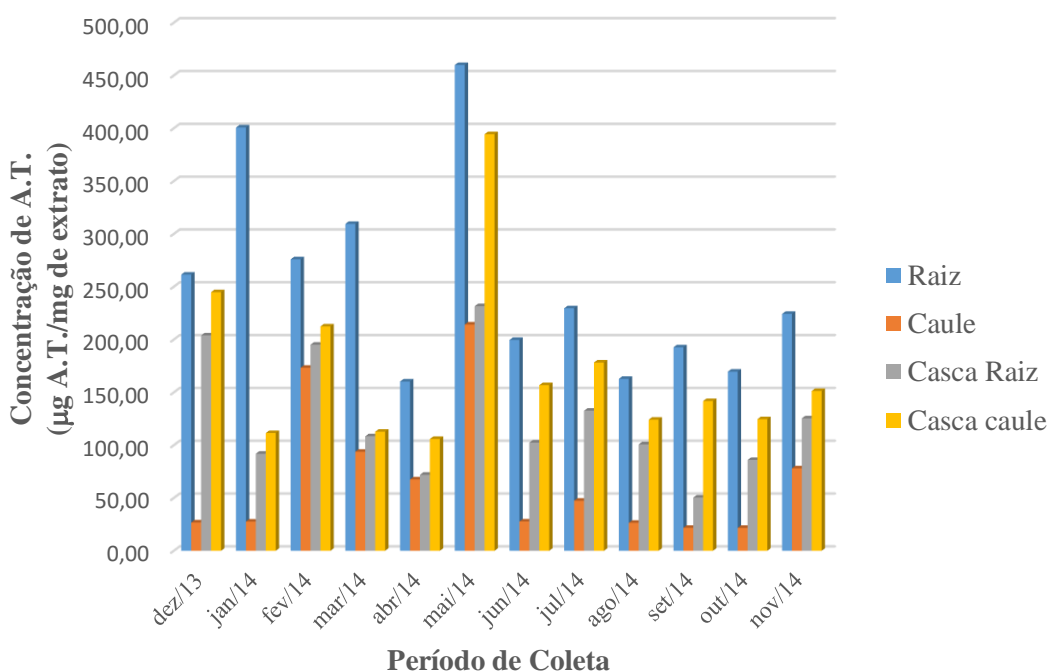


Ao analisar o teor de ácido tormêntico ao longo de todo o período de coleta (dezembro 2013 - novembro 2014), sem fazer distinção por parte da planta, foi possível observar que os extratos obtidos apresentaram maior teor de ácido tormêntico (325.01 $\mu\text{g A.T./mg}$ extrato) no mês de maio de 2014 (coleta 6).

Quando a análise foi realizada comparando-se cada mês de coleta e cada parte da planta, foi possível observar que não houve variação significativa no teor de ácido tormêntico no período investigado, para os extratos da raiz. Nas demais partes, caule, casca da raiz e casca do caule, foi possível observar diferença estatística no teor de ácido tormêntico, apenas nos primeiro mês de coleta (Dezembro 13).

No entanto, apesar dessa variação, a concentração de ácido tormêntico em todas as partes foi maior para o mês de maio de 14 (coleta 6), conforme apresentado no gráfico 1.

Gráfico 1. Resultados da quantificação do ácido tormêntico ($\mu\text{g A.T./mg}$ de extrato) por mês de coleta para cada parte da planta.



A maior produção de ácido tormêntico, no mês de maio de 14 (coleta 6), para todas as partes da planta, pode ser explicado pela atuação de fatores bióticos e/ou abióticos que influenciam na produção de compostos nas plantas. Alguns trabalhos, relatam a influência de fatores climáticos e ambientais, como disponibilidade hídrica, temperatura, altitude, sazonalidade, desenvolvendo, atuando sobre a produção de metabólitos secundários [24-26].

No entanto, verifica-se que não houve uma associação forte entre os dados climáticos e o teor de ácido tormêntico para os extratos de *C.pachystachya* (Tabela 1). Apenas a precipitação apresentou uma certa associação, porém, de baixa magnitude. Portanto, o teor de ácido tormêntico parece não sofrer influência da altitude, temperatura, precipitação e umidade relativa do ar.

Tabela 1. As estimativas de correlação de Pearson (r) entre o teor de ácido tormêntico e dados climáticos.

Concentração de A.T.	Parâmetros Climáticos			
	Altitude	Temperatura	Precipitação	Umidade ar
	-0,069	-0,157	0,358	0,127

Alguns trabalhos relatam que outros fatores podem influenciar na produção e acúmulo de metabólitos secundários, dentre eles, fatores mecânicos, como ferimentos, ou estímulos como vento, areia ou até mesmo ataques de patógenos[27-29]. Além disso, outros fatores, não investigados em nosso estudo, podem também influenciar na produção desses metabólitos, tais como radiação ultravioleta [27,30] e a disponibilidade de nutrientes no meio [29, 31].

Em relação ao teor de ácido tormêntico nas partes da planta, foi possível observar que os extratos da raiz tiveram a maior concentração de ácido tormêntico (207.54 µg A.T./mg extrato). Esse resultado foi aproximadamente 46% superior ao encontrado para a casca da raiz (96.56 µg A.T./mg extrato), que obteve os extratos com menor teor do ácido (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados da quantificação do ácido tormêntico (µg A.T./mg de extrato) por parte da planta.

PARTE	CONCENTRAÇÃO DE A.T. (µg A.T./mg extrato)
Raiz	207.54 ^a
Tronco	171.79 ^b
Casca Raiz	96.56 ^d
Casca Tronco	143.46 ^c

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não foram estatisticamente diferente quando usando o teste de agrupamento de Scott-Knott, com uma probabilidade de 5%.

A alta concentração de ácido tormêntico na raiz, pode estar relacionada a fator fisiológico ou ecológico, como afirma Kartini et. al.(2014) ao estudar a presença de dois triterpeno, ácido ursólico e oleanólico em diferentes partes de *Plantago major*, indicando que essa diferença pode estar relacionada a esses fatores.

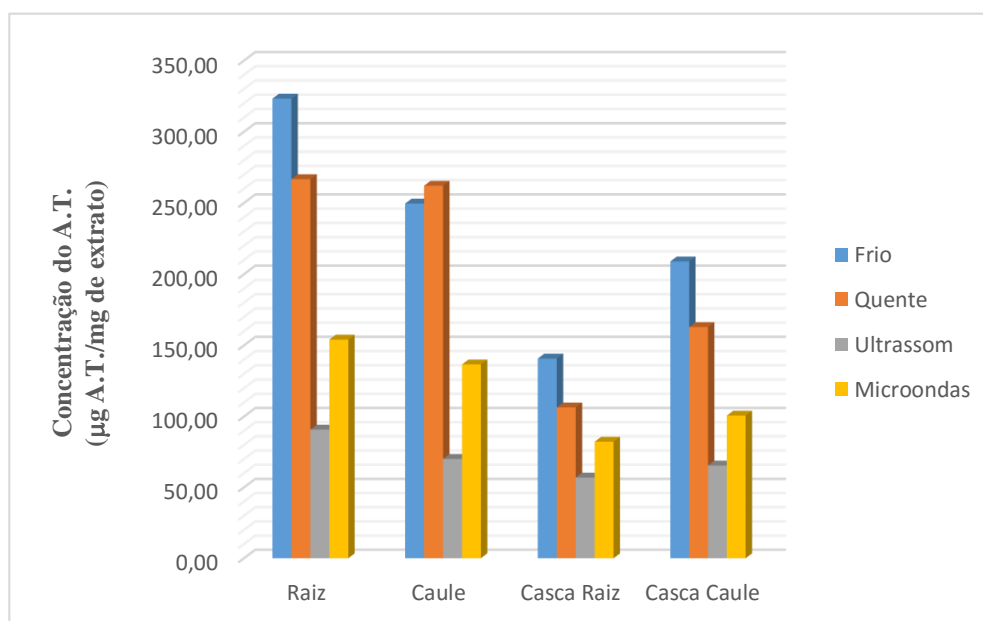
Um fator ecológico importante que pode estar relacionada a regulação da produção do ácido tormêntico em diferentes partes da *C. pachystachya* é o ataque de patógenos ou herbivoria. Há estudos que indicam que plantas, aumentam ou diminuem a produção de metabólitos secundários, em resposta a invasão de patógenos [27, 29]. Essa resposta dada pela planta, pode ter origem local e até mesmo induzir respostas em locais distantes e não estimulados [27].

Em relação ao método utilizado (Gráfico 2), a extração a frio foi o método que obteve extratos com maior teor de ácido tormêntico (230.62 µg A.T./mg de extrato) quando comparado aos demais métodos testados.

Quando foi realizada a comparação do teor de ácido, referente ao método e parte da planta foi possível ver que o método a frio foi o melhor para a extração desse composto na raiz, enquanto que o método a quente foi melhor para caule e casca da raiz, já para a casca do caule os métodos a frio e ultrassom não foram estatisticamente diferentes, ocorrendo o mesmo com os métodos quente e micro-ondas. Logo, de maneira geral, exceto para o caule, o método a frio foi o mais seletivo, para extração do ácido tormêntico em todas as partes da planta usadas.

Apesar dos métodos de ultrassom e micro-ondas serem reportados como métodos mais eficientes para extração de metabólitos secundários [32,33], com menor tempo para a extração, em nosso estudo, a extração a frio foi o que apresentou os maiores teores de ácido tormêntico. Esse resultado pode ser explicado pelo tempo de extração empregados nesse tipo de método, muito superior aos demais métodos, que podem extrair o material até quase o esgotamento da droga [34], podendo indicar que esse método é mais seletivo para a extração do ácido tormêntico na raiz, caule, casca da raiz e casca do caule de *C. pachystachya*.

Gráfico 2. Resultados da quantificação do ácido tormêntico ($\mu\text{g A.T./mg}$ de extrato) por método para cada parte da planta.



3. Secção Experimental

3.1. Coleta do material vegetal e parâmetros climáticos

A coleta do material vegetal da espécie *C. pachystachya* ocorreu no município de Marechal Deodoro, nas proximidades do Polo industrial José Aprígio Vilela, todos os meses, no período de 12 meses (Dezembro de 2013 a Novembro de 2014), no mesmo local e em três pontos de coleta diferentes.

Após a coleta, o material foi levado ao Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais – LPqRN, da Universidade Federal de Alagoas- UFAL, separado em quatro partes, raíz, tronco, casca da raíz e casca do tronco, seco a temperatura de $\pm 28^{\circ}\text{C}$ e triturado.

Para se obter uma representação populacional das espécies do local, cada parte da planta foi coletada em três pontos distintos, referente a cada mês de coleta e reunidas posteriormente, para serem trituradas juntas.

Os parâmetros climáticos e ambientais foram obtidos no local da coleta com auxílio de GPS, para identificação de latitude, longitude e altitude e com medidor de temperatura e umidade. Os dados pluviométricos da região foram obtidos a partir do website: Climate-Data.org.

A identificação botânica da espécie foi efetuada pela Dr^a. Rosângela Lemos e uma exsicata foi depositada no Herbário do IMA – Instituto do Meio Ambiente, situado no estado de Alagoas – Brasil, sob número de registro: MAC 14,305.

3.2. Preparação dos extratos

Após o processo de trituração, as amostras referentes a cada parte da planta, passaram por processo de extração. Inicialmente, foram peneiradas em tamis de 100 mesh (0,149 mm), para a obtenção de um pó fino, contribuindo com a eficiência da extração.

A seguir, as amostras foram submetidas a quatro métodos diferentes de extração: a quente, a frio; ultrassom e micro-ondas. Para cada tipo de extração foi usada uma proporção de 1:10 (p/v), usando etanol como solvente extrator. Cada amostra, proveniente de cada tipo de extração foi submetida à análise por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para quantificação do ácido tormêntico.

3.3. Análise por CLAE e quantificação

As amostras obtidas na extração foram analisadas por CLAE para quantificação do ácido tormêntico. As amostras, na concentração de 1mg/mL, foram solubilizados em metanol (grau HPLC), filtradas em membrana 0,45 μm e analisadas, em triplicata.

As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu Corp. (Kyoto, Japan) equipado com bomba (LC-10ADvp), controladora (SCL-10Avp), degasseificador (DGU-14A), auto injetor (SIL-20A HT), e detector UV/VIS (DAD- $\lambda_{\text{max}} = 204 \text{ nm}$). As amostras foram

separadas em coluna C08 (CLC Shim - Pack, 150 mm x 4.6 mm) utilizando um sistema isocrático: 32% solvente A (Água acidificada com 0,1% de ácido acético) e 68% solvente B (Metanol).

O método utilizado foi validado por Souza [35] e a curva de calibração foi construída com o padrão de ácido tormêntico em concentrações que variaram de 20 a 200 µg/mL, em triplicata. As áreas obtidas foram analisadas e plotadas em gráfico, obtendo coeficiente de correlação e equação da reta.

O padrão do ácido tormêntico foi isolado e purificado no laboratório a partir do extrato etanólico do tronco de *C. pachystachya*. A curva analítica foi construída, para a quantificação dos extratos pelo método do padrão externo, onde foi possível realizar comparação das áreas do padrão isolado em laboratório, com as áreas do material obtido na extração. Os resultados foram expressos em µg A.T. (ácido tormêntico) /mg de extrato.

3.4. Análise estatística

Os dados foram analisados usando análise de variância e teste de Skott-Knott para comparação de médias com 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GENES [36].

4. Conclusão

Na análise sazonal foi possível observar que os maiores teores de ácido tormêntico, foram obtidos na raiz, por meio de extração a frio e no mês de maio de 2014 (coleta 6).

Os resultados obtidos indicam que os fatores climáticos podem não ter tido influência na produção de ácido tormêntico nas partes da planta avaliada, ao longo do período estudado. Outros fatores, tais como, índice de radiação ultravioleta, ataque de herbívoros, fatores mecânicos, que influenciam na produção de metabolitos secundários devem ser avaliados, pois podem justificar os resultados encontrados.

Sendo o ácido tormêntico, uma molécula de grande interesse farmacológico, o estudo apresentado aqui se faz importante na medida que traça um perfil para a extração desse composto em cultivos que visem a exploração desse composto.

No entanto, estudos complementares devem ser traçados para identificar outros fatores biótico e abióticos que não foram explorados aqui, com a função de determinar os fatores que influenciam a produção desse composto na espécie estudada.

Os resultados obtidos podem ser o passo inicial para a determinação de estudos que visam a produção de fármacos produzidos a partir do ácido tormêntico.

Referências

1. Badilla, B.; Mora, G.; Lapa, A.J. Antiinflammatory activity of *Urera baccifera* (Urticaceae) in sprague – dawley rats. *Revista Biologia Tropical*, **1999**, 47, n.3, 365-371.
2. Karsburg, S.V.; Battistin, A. Meiose e número cromossômico de cinco espécies da família Urticaceae do Rio Grande do Sul. *Revista de Ciências Agro-Ambientais, Alta Floresta*, **2006**, 4, n.1, 47-60.
3. Costa, GM, Schenkel, EP, Reginatto, FH. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. *Natural product communications*. **2011**,6(6), 913-20.
4. Berg, C.C.; Rosselli, P.F. **2005**. *Cecropia Flora Neotropica*, The New York Botanical Garden, New York.
5. Mors, W.B.; Rizzini, C.T.; Pereira, N.A. **2000**. *Medicinal Plants of Brazil*. Reference Publications, Algonac.
6. Costa, Estudo fitoquímico comparativo entre *Cecropia glaziovii* Sneth. E *Cecropia pachystachya* Trécul., 112f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, **2009**.
7. Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. *Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarium de Estudos da Flora Ltda, **2008**.
8. Di Stasi, L.C.; Oliveira, G.P.; Carvalhaes, M.A.; Queiroz-Júnior, M.; Tien, O.S.; Kakinami, S.H.; Reis, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*. **2002**,73, 69–91.
9. Consolini, A.E.; Ragone, M.I.; Migliori, G.N.; Conforti, P.; Volonté, M.G. Cardiotoxic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **2006**,106, 90-96.
10. Aragão, D.M.O., Guarize, L., Lanini, J., Costa, J.C., Garcia, R.M.G., Scio, E. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **2010**, 128, 629-633.
11. Pacheco, N.R.; Pinto, N.C.C.; Silva, J. M.; Mendes, R.F.; Costa, J.C.; Aragão, D.M.O.; Castañon, M.C.M.N.; Scio, E. *Cecropia pachystachya*: A Species with Expressive In Vivo Topical Anti-Inflammatory and In Vitro Antioxidant Effects. *BioMed Research International*, **2014**.
12. Aragao, D. M. O.; Lima, I. V. A.; Silva, J. M.; Bellozi, P.M.Q.; Costa, J. C.; Cardoso, G. M.M.; Souza-Fagundes, E.M.; Scio,E. Antiinflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia Pachystachya* Trecul, *Phytotherapy Research*, **2013**, 27 (6), 926–930.
13. Cruz, E.M.; da Silva, E.R.; do Carmo Maquiaveli, C.; Alves, E.S.S.; Lucon, J.F.; dos Reis, M.B.G et al. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. *Phytochemistry*, **2013a**, 89,71-77.
14. Uchoa, VT. Avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações das espécies *Cecropia pachystachya* Trécul. (Cecropiaceae) e *Ximenia americana* L. (Olacaceae) e o estudo fitoquímico das *C. pachystachya* guiado pelo bioensaio antimalárico in vivo. MSc Thesis, Federal University of Alagoas, Recife, Brazil, **2004**.
15. Uchoa, V.T., Paula, R.C., Krettli, L.G., Santana, A.E.G., Krettli, A.U. Antimalarial activity of compounds and mixed fractions of *Cecropia pachystachya*. *Drug Development Research*, **2010**, 71, 82-91.
16. Jin, J.L., Lee, Y. Y., Heo, J.E., LEE, S., Kim, J.M., Yun-Choi, H.S. Anti-platelet pentacyclic triterpenoids from leaves of *Campsis grandiflora*. *Archives of pharmacal research.*, **2004**, 27, n. 4, 376-80.

17. Zhang, Q., Chang, Z., Wang, Q. Ursane triterpenoids inhibit atherosclerosis and xanthoma in LDL receptor knockout mice. *Cardiovascular drugs and therapy*, 2006, 20, n. 5, 349-57, **2006**.
18. Csuk, R., Siewert, B., Dressel, C., Schäfer, R. Tormentic acid derivatives: Synthesis and apoptotic activity. *European journal of medicinal chemistry*, **2012**, 56, 237-45.
19. Fogo, A. S.; Antonioli, E.; Calixto, J. B.; Campos, A. H. Tormentic acid reduces vascular smooth muscle cell proliferation and survival. *European Journal Pharmacology*, **2009**, 615, 50–54.
20. Gao, H., Wu, L., Kuroyanagi, M., Harada, K., Kawahara, N., Nakane, T., et al. Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* KOEHNE and their activities in JB6 mouse epidermal cells. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 52, n. 11, 1318-21, **2003**.
21. Murakami, C., Ishijima, K., Hirota, M., Sakaguchi, K., Yoshida, H., Mizushima, Y. Novel anti-inflammatory compounds from *Rubus sieboldi*, triterpenoids, are inhibitors of mammalian DNA polymerases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **2002**, 1596, n. 2, 193-200.
22. An, H.J.; Kim, I.T.; Park, H.J.; Kim, H.M.; Choi, J.H.; Lee, K.T. Tormentic acid, a triterpenoid saponin, isolated from *Rosa rugosa*, inhibited LPS-induced iNOS, COX-2, and TNF- α expression through inactivation of the nuclear factor- κ b pathway in RAW 264.7 macrophages. *International Immunopharmacology*, **2011**, 11, 504–510.
23. David, J. P.; Silva, E. F.; Moura, D.L.; Guedes, M. L. S.; Assunção, R. J.; David, J. M. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. *Química Nova*, **2001**, 24, n. 6, p. 730-733.
24. Zidorn, C, Stuppner, H. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon* (Asteraceae). *Taxon*, **2001**, 115-33.
25. Grace, S.; Logan B.; Adams, W. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. *Plant, Cell & Environment*. **1998**, 21(5):513-21.
26. Salminen, J.P.; Ossipov, V.; Haukioja, E.; Pihlaja, K. Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens*. *Phytochemistry*. **2001**, 57(1):15-22.
27. Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, **2007**, 30(2), 374.
28. Bowers, M.D.; Stamp, N.E. Effects of plant age, genotype and herbivory on *Plantago* performance and chemistry. *Ecology*. **1993**, 1778-91.
29. Zheng, Z., Wu, M. Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites in *Catharanthus roseus*. *Plant Science*, **2004**, 166(2), 507-14.
30. Karousou, R.; Grammatikopoulos, G.; Lanaras, T.; Manetas, Y.; Kokkini, S. Effects of enhanced UV-B radiation on *Mentha spicata* essential oils. *Phytochemistry*. **1998**, 49(8), 2273-7.
31. Roca-Pérez, L.; Boluda, R.; Gavidia, I.; Pérez-Bermúdez, P. Seasonal cardenolide production and Dop5 β r gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. *Phytochemistry*. **2004**, 65(13), 1869-78.
32. Melecchi, M.I.S. Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus*: estudo comparativo de métodos de extração. Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, **2005**.
33. Pacetta, C.F. Estudo de diferentes metodologias para a obtenção de extratos de folhas de oliveira (*Olea europaea*) contendo oleuropeína. Dissertação (Mestre em Ciências) Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, **2013**.

34. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, Florianópolis: Editora da UFSC, 1102p, **2007**.
35. Souza, I.T. *Isolamento, quantificação e desenvolvimento de método na determinação de compostos em extratos vegetais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)*. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, **2013**.
36. Cruz, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy (Online)*, **2013b**, 35, 271-276.

6 PATENTE – PROCESSO DE OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DO TRITERPENO ÁCIDO TORMÊNTICO EM MATERIAL VEGETAL.

Relatório Descritivo para a patente de invenção: **PROCESSO DE OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DO TRITERPENO ÁCIDO TORMÊNTICO EM MATERIAL VEGETAL**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção está inserida no campo da química de produtos naturais, empregando processos para obtenção e isolamento de metabólito secundário da classe dos triterpenos a partir de extratos de espécies vegetais. Refere-se, especificamente, ao processo de obtenção e isolamento do ácido tormêntico, que tem sido reportado com diversas atividades biológicas, nos extratos de espécies vegetais, usando como exemplo a descrição nos extratos etanólicos da raiz, tronco, casca da raiz e casca do tronco da espécie *Cecropia pachystachya*. Devido a suas muitas atividades biológicas, o ácido tormêntico isolado por esse método, pode ser usado como padrão analítico para identificação e quantificação em diversos métodos cromatográficos com produtos naturais, pode ser usado como padrão biológico para ensaios pré-clínicos *in vitro* - *in vivo* - *ex vivo*, bem como ensaios clínicos com medicamentos fitoterápicos. O processo ora apresentado torna a obtenção desse composto mais simples e rápida, contribuindo para a possibilidade de sua utilização em compostos farmacêuticos e cosméticos, entre outros.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Apesar de outros estudos já citarem o processo de isolamento do ácido tormêntico (OLIVEIRA, R.R.; LEITÃO, G.G.; MORAES, M.C.C.; LOPES, D.; CARAUTA, J.P.P.; KAPLAN, M.A.C. Gradient elution for triterpene separation from *Cecropia lyratiloba* Miquel by HSCCC. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** v. 28, p. 1985–1992, 2005; CHANG C.T.; HUANG, S.S.; LIN, S.S.; AMAGAYA, S.; HO, H.; HOU, W.C.; SHIE, P.H.; WUF, J.B.; HUANG, G.J. Anti-inflammatory activities of tormentic acid from suspension cells of *Eriobotrya japonica* ex vivo and in vivo. **Food Chemistry**.v.127, n. 3, p.1131-1137, 2011), nenhum deles descreve esse processo de obtenção e isolamento nos extratos etanólicos do tronco, casca do tronco, raiz e casca da raiz da espécie *Cecropia pachystachya*.

[003] Não há padronização das etapas de isolamento e obtenção do ácido tormêntico, que tem sido isolado por processos longos e tediosos.

[004] Uchoa et al. (UCHOA, V.T.; PAULA, R.C.; KRETTLI, L. G; SANTANA, A. E. G.; KRETTLI, A.U. Antimalarial Activity of Compounds and Mixed Fractions. **Drug development research.** v. 71, p.82–91, 2010), descrevem o isolamento de compostos no extrato de *Cecropia pachystachya*, dentre eles o ácido tormêntico, mas o processo de isolamento e obtenção não é dirigido especificamente a este composto. Nesse trabalho, o ácido tormêntico foi isolado a partir de uma fração proveniente de um processo cromatográfico utilizando como suporte o Sephadex LH-20 e como eluente apenas metanol, tornando o isolamento mais tedioso, lento e caro. Outros trabalhos, como o de Jung et al. (JUNG, H.J.; NAM, J.H.; CHOI, J.; LEE, K.T; PARK, H.J. 19a-Hydroxyursane-Type Triterpenoids: Antinociceptive Anti-inflammatory Principles of the Roots of *Rosa rugosa*. **Biol. Pharm. Bull.** v.28, n. 1, p. 101—104, 2005) e Rocha et al. (ROCHA, G.G.; SIMÕES, M.; LÚCIO, K. A.; OLIVEIRA, R. R.; KAPLAN, M.A.C.; GATTASS, C. R. Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, p. 7355–7360, 2007), também tratam do isolamento do ácido tormêntico, todavia utilizam procedimentos de alto custo, como o uso de

cromatografia contra-corrente ou métodos longos e cansativos, com uso de diferentes processos de separação cromatográficos.

Quadro 1. Processos existentes para a obtenção do ácido tormêntico.

Referência	Material de obtenção	Métodos usados	Número de etapas
Jung et al. (2005)	Raiz de <i>Rosa rugosa</i>	Partição; Hidrólise; Cromatografia em coluna e Cromatografia em fase reversa	5 etapas
Oliveira et al. (2005)	Raiz da <i>Cecropia lyratiloba</i> Miquel	Cromatografia contra-corrente de alta velocidade (HSCCC)	9 etapas
Rocha et al. (2007)	Cascas de <i>Cecropia lyratiloba</i>	Partição; Cromatografia contra-corrente	4 etapas
Uchoa et al. (2010)	Raiz de <i>Cecropia pachystachya</i>	Partição; Cromatografia em coluna; Cromatografia em Sephadex LH-20; Cristalização	4 etapas
Chang et al. (2014)	Culturas celulares de <i>Eriobotrya japônica</i>	Extração com ultrassom com 50% de MeOH, e com 85% de MeOH; Filtração; Cromatografia em fase reversa; Purificação por HPLC	5 etapas

[005] O método proposto nesta patente tem a função de concentrar todas as etapas do processo de separação e isolamento deste composto de forma específica, utilizando para isso solventes e misturas de solventes apropriados, e usando suporte específico, gel de sílica acrescido de solução de KOH, com características que facilitam a separação desse composto de maneira eficiente. Esse processo é composto de 6 etapas, nas quais apenas um tipo de método é utilizado, a cromatografia em coluna aberta com sílica gel acrescida de solução alcalina de KOH entre 5 a 20%. A adição dessa solução contribui para um melhor processo de separação de substâncias e evita a adsorção destas na sílica, permitindo a separação de compostos ácidos de maneira mais fácil, o que contribui para a obtenção do

produto com maior pureza. Além disso, como citado, é utilizada apenas a cromatografia em coluna aberta, tornando o processo mais simples e eficiente.

[006] *Cecropia pachystachya* Trécul (Cecropiaceae) é uma espécie arbórea tropical de crescimento rápido, encontrada na América Central e do Sul e é abundante em todo o Brasil, sendo conhecida por diversos nomes populares, dentre eles, embaúba, imbaúba, umbaúba e embaúva (BERG, C.C.; ROSSELLI, P.F. *Cecropia Flora Neotropica*, **The New York Botanical Garden**, New York, 2005; LAVOBA et al., *Cecropia as a food resource for bats in French Guiana and the significance of fruit structure in seed dispersal and longevity*. **American Journal of Botany**. v. 90, p. 388-403, 2003).

[007] O uso popular desta espécie é na forma de chás nos tratamentos de doenças respiratórias, pressão arterial alta, controle da glicemia, no tratamento de diabetes mellitus e também como diurético (MORS et al. **Medicinal Plants of Brazil**. Reference Publications, Algonac, 2000; COSTA, **Estudo fitoquímico comparativo entre *Cecropia glaziovii* Sneth. E *Cecropia pachystachya* Trécul.**, 112f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, 2009; LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. **Instituto Plantarium de Estudos da Flora Ltda**, Nova Odessa, 2008; DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JÚNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v.73, p. 69–91, 2002.) Alguns estudos com a espécie *C. pachystachya* foram publicados relatando efeitos cardiovasculares em ratos, provocando hipotensão, efeito hipoglicemiante e efeito sedativo, atividade antioxidante e ação como anti-inflamatório oral (CONSOLINI e MIGLIORI. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 96, p. 417–422, 2005; ARAGAO, D. M. O.; GUARIZE, L.; LANINI, J.; COSTA, J. C.; GARCIA, R. M. G.; SCIO, E. Hypoglycemic effects of *Cecropia Pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 629–633, 2010; PACHECO, N.R., PINTO, N.C.C.; SILVA, J. M.; MENDES, R.F.; COSTA, J. C.; ARAGÃO, D.M.O.; CASTAÑÓN, M. C.M.N.; SCIO, E. *Cecropia pachystachya*: A Species with Expressive In Vivo Topical Anti-Inflammatory and In Vitro Antioxidant

Effects. **BioMed Research International**, 2014; ARAGÃO, D. M. O.; LIMA, I. V. A.; SILVA, J. M.; BELLOZI, P.M.Q.; COSTA, J. C.; CARDOSO, G. M.M.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; SCIO, E. Antiinflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trecul. **Phytotherapy Research**. v. 27, n. 6, p. 926–930, 2013).

[008] O ácido tormêntico é um metabólito secundário, pertencente à classe dos triterpenos. A presença desse composto já foi descrita para outras espécies como *Rubus imperialis* (ALVES, A.B.C.R.; SANTOS, R.S.; CALIL, S. S.; NIERO, R; LOPES, J. S.; PERAZZO, F.F.; ROSA, P.C. P.; ANDRADE, S. F.; CECHINEL-FILHO, V.; MAISTRO, E. L. Genotoxic assessment of *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract in vivo and its potential chemoprevention against cyclophosphamide-induced DNA damage. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 153, p. 694–700, 2014), *Eriobotrya japonica* (CHANG C.T.; HUANG, S.S.; LIN, S.S.; AMAGAYA, S.; HO, H.; HOU, W.C.; SHIE, P.H.; WUF, J.B.; HUANG, G.J. Anti-inflammatory activities of tormentic acid from suspension cells of *Eriobotrya Japonica* ex vivo and in vivo. **Food Chemistry**.v.127, n. 3, p.1131-1137, 2011), *Eriope blanchetii* (DAVID J. P.; SILVA, E. F.; MOURA, D.L.; GUEDES, M. L. S.; ASSUNÇÃO, R. J.; DAVID, J. M. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**, vol. 24, n. 6, p. 730-733, 2001), *Rosa rugosa* (AN, H.J.; KIM, I.T.; PARK, H.J.; KIM, H.M.; CHOI, J.H.; LEE, K.T. Tormentic acid, a triterpenoid saponin, isolated from *Rosa rugosa*, inhibited LPS-induced iNOS, COX-2, and TNF- α expression through inactivation of the nuclear factor-kb pathway in RAW 264.7 macrophages . **International Immunopharmacology**. v. 11, p. 504–510, 2011), sendo também descrito para a *Cecropia pachystachya* (UCHOA, V.T.; PAULA, R.C.; KRETTLI, L. G; SANTANA, A. E. G.; KRETTLI, A.U. Antimalarial Activity of Compounds and Mixed Fractions. **Drug development research**. v. 71, p.82–91, 2010).

[009] Esse composto exibe diversas propriedades, tais como: antiplaquetária; efeito antiteratogênico; agente antitumoral induzindo apoptose; potencial agente para o tratamento de doenças vasculoproliferativas, controlando a proliferação anormal de células musculares lisas vasculares; potente atividade supressora de tumores; atividade anti-inflamatória; atuando como inibidor de DNA polimerase em mamíferos e apresentando potente efeito inibidor sobre o crescimento de células cancerígenas e

atividade citotóxica (JIN JL, LEE YY, HEO JE, LEE S, KIM JM, YUN-CHOI HS. Antiplatelet pentacyclic triterpenoids from leaves of *Campsis grandiflora*. **Archives of pharmacal research**. v. 27, n. 4, p. 376-80, 2004; ZHANG Q, CHANG Z, WANG Q. Ursane triterpenoids inhibit atherosclerosis and xanthoma in LDL receptor knockout mice. **Cardiovascular drugs and therapy**. v. 20, n. 5, p. 349-57, 2006; CSUK R, SIEWERT B, DRESSEL C, SCHÄFER R. Tormentic acid derivatives: Synthesis and apoptotic activity. **European journal of medicinal chemistry**. v. 56, p. 237-45, 2012; FOGO, A. S.; ANTONIOLI, E.; CALIXTO, J. B.; CAMPOS, A. H. Tormentic acid reduces vascular smooth muscle cell proliferation and survival. **European Journal Pharmacology**, 615, 50–54, 2009; GAO H, WU L, KUROYANAGI M, HARADA K, KAWAHARA N, NAKANE T, et al. Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* KOEHNE and their activities in JB6 mouse epidermal cells. **Chemical and pharmaceutical bulletin**. v. 52, n. 11, p.1318-21, 2003; MURAKAMI C, ISHIJIMA K, HIROTA M, SAKAGUCHI K, YOSHIDA H, MIZUSHINA Y. Novel anti-inflammatory compounds from *Rubus sieboldi*, triterpenoids, are inhibitors of mammalian DNA polymerases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**. v. 1596, n. 2, p. 193-200, 2002; AN ,H.J.; KIM, I.T.; PARK, H.J.; KIM, H.M.; CHOI, J.H.; LEE, K.T. Tormentic acid, a triterpenoid saponin, isolated from *Rosa rugosa*, inhibited LPS-induced iNOS, COX-2, and TNF- α expression through inactivation of the nuclear factor-kb pathway in RAW 264.7 macrophages . **International Immunopharmacology**. v. 11,p. 504–510, 2011; DAVID J. P.; SILVA, E. F.; MOURA, D.L.; GUEDES, M. L. S.; ASSUNÇÃO, R. J.; DAVID, J. M. Lignan e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Quimica Nova**, vol. 24, n. 6, p. 730-733, 2001).

[010] Apesar de outros estudos já citarem o processo de isolamento do ácido tormêntico (OLIVEIRA, R.R.; LEITÃO, G.G.; MORAES, M.C.C.; LOPES, D.; CARAUTA, J.P.P.; KAPLAN, M.A.C. Gradient elution for triterpene separation from *Cecropia lyratiloba* Miquel by HSCCC. **J. Liq. Chromatogr.Relat.Technol**, v. 28, p. 1985–1992, 2005; UCHOA, V.T.; PAULA, R.C.; KRETTLI, L. G; SANTANA, A. E. G.; KRETTLI, A.U. Antimalarial Activity of Compounds and Mixed Fractions. **Drug development research**. v. 71, p.82–91, 2010; CHANG C.T.; HUANG, S.S.; LIN, S.S.; AMAGAYA, S.; HO, H.; HOU, W.C.; SHIE, P.H.; WUF, J.B.; HUANG, G.J. Anti-inflammatory activities of tormentic acid from suspension cells of *Eriobotrya Japonica*

ex vivo and in vivo. **Food Chemistry**.v.127, n. 3, p.1131-1137, 2011), nenhum deles descreve esse processo como realizado aqui para os extratos etanólicos da espécie *Cecropia pachystachya*.

[011] O processo de isolamento descrito por Chang et al. (CHANG C.T.; HUANG, S.S.; LIN, S.S.; AMAGAYA, S.; HO, H.; HOU, W.C.; SHIE, P.H.; WUF, J.B.; HUANG, G.J. Anti-inflammatory activities of tormentic acid from suspension cells of *Eriobotrya Japonica* ex vivo and in vivo. **Food Chemistry**.v.127, n. 3, p.1131-1137, 2011) é realizado na espécie *Eriobotrya japonica*, por cromatografia em coluna aberta, utilizando sílica de fase reversa, sendo o produto obtido, purificado por cromatografia líquida de alta eficiência. Este trabalho, não descreve de forma clara os procedimentos de separação usados, além de utilizar diversas técnicas bastante específicas para a obtenção do extrato, que é usado para o isolamento do ácido tormêntico.

[012] No trabalho de Oliveira et al. (OLIVEIRA, R.R.; LEITÃO, G.G.; MORAES, M.C.C.; LOPES, D.; CARAUTA, J.P.P.; KAPLAN, M.A.C. Gradient elution for triterpene separation from *Cecropia lyratiloba* Miquel by HSCCC. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, v. 28, p. 1985–1992, 2005), o ácido tormêntico é isolado da espécie *Cecropia lyratiloba*, pertencente ao mesmo gênero da espécie alvo desta invenção. Nesse processo são utilizadas técnicas distintas às descritas aqui, sendo realizado um processo de extração a frio, para obtenção do extrato e um processo de partição líquido-líquido, para uma separação inicial. Em seguida, é realizado um processo de fracionamento por meio de cromatografia em coluna, utilizando-se gel de sílica, para a obtenção de uma fração contendo uma mistura de triterpenos. Na sequência, um processo de cromatografia contra-corrente extenso e complexo, com vários gradientes de solvente e muitas frações, é utilizado. Esse processo torna-se oneroso e bastante complicado, requerendo muito trabalho e tempo, além da utilização de uma técnica não usual para isolamento de compostos orgânicos, não sendo preconizada para este tipo de estudo.

[013] No processo de isolamento descrito por Jung et al. (JUNG, H.J.; NAM, J.H.; CHOI, J.; LEE, K.T; PARK, H.J. 19a-Hydroxyursane-Type Triterpenoids: Antinociceptive Anti-inflammatory Principles of the Roots of *Rosa rugosa*. **Biol. Pharm. Bull.** v.28, n. 1, p. 101—104, 2005), na espécie *Rosa rugosa*, o ácido

tormêntico é isolado a partir de uma fração acetato que foi hidrolisada, sendo na sequência submetida a processos cromatográficos com gel de sílica e sílica ODS (sílica de fase reversa). Nesse caso, além dos processos de separação, ainda há um processo de hidrólise, tornando o método descrito por estes autores muito longo, com o emprego de várias técnicas, não sendo um método versátil e específico para o isolamento do ácido tormêntico.

[014] Diversos trabalhos têm descrito processos onde este triterpeno tem sido obtido (AN, H.J.; KIM, I.T.; PARK, H.J.; KIM, H.M.; CHOI, J.H.; LEE, K.T. Tormentic acid, a triterpenoid saponin, isolated from *Rosa rugosa*, inhibited LPS-induced iNOS, COX-2, and TNF- α expression through inactivation of the nuclear factor-kb pathway in RAW 264.7 macrophages. **International Immunopharmacology**. v. 11, p. 504–510, 2011; ROCHA, G.G.; SIMÕES, M.; LÚCIO, K. A.; OLIVEIRA, R. R.; KAPLAN, M.A.C.; GATTASS, C. R. Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, p. 7355–7360, 2007; DAVID J. P.; SILVA, E. F.; MOURA, D.L.; GUEDES, M. L. S.; ASSUNÇÃO, R. J.; DAVID, J. M. Lignan e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**, vol. 24, n. 6, p. 730-733, 2001; CHANG C.T.; HUANG, S.S.; LIN, S.S.; AMAGAYA, S.; HO, H.; HOU, W.C.; SHIE, P.H.; WUF, J.B.; HUANG, G.J. Anti-inflammatory activities of tormentic acid from suspension cells of *Eriobotrya Japonica* ex vivo and in vivo. **Food Chemistry**. v. 127, n. 3, p.1131-1137, 2011), no entanto, em muitos deles são empregados métodos de separação caros e complexos. O uso de técnicas de alta sensibilidade e seletividade como LC-MS, Sephadex e Cromatografia contra-corrente, torna esses processos de obtenção bastante onerosos.

[015] Fogo et al. (FOGO, A. S.; ANTONIOLI, E.; CALIXTO, J. B.; CAMPOS, A. H. Tormentic acid reduces vascular smooth muscle cell proliferation and survival. **European Journal Pharmacology**, v. 615, p. 50–54, 2009) destacam a necessidade de se ter melhores processos para a síntese do ácido tormêntico, obtendo rendimentos mais elevados e maior estabilidade, corroborando com a proposta desta patente, que visa a padronização de um método de extração simples, versátil e com alto grau de pureza e rendimento.

[016] Diante das atividades descritas para o ácido tormêntico e dificuldades no processo de obtenção e isolamento, a proposta dessa patente é padronizar um método de obtenção e isolamento deste composto na espécie *Cecropia pachystachya*.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[017] A presente invenção está inserida no campo da química de produtos naturais empregando processos para obtenção e isolamento de metabólito secundário da classe dos triterpenos a partir de extratos de espécies vegetais. Refere-se, especificamente, ao processo de obtenção e isolamento do ácido tormêntico, que tem sido reportado com diversas atividades biológicas, nos extratos de espécies vegetais, usando como exemplo a descrição nos extratos etanólicos da raiz, tronco, casca da raiz e casca do tronco da espécie *Cecropia pachystachya*. Devido a suas muitas atividades biológicas, o ácido tormêntico isolado por esse método, pode ser usado como padrão analítico para identificação e quantificação em diversos métodos cromatográficos com produtos naturais, pode ser usado como padrão biológico para ensaios pré-clínicos *in vitro* - *in vivo* - *ex vivo*, bem como ensaios clínicos com medicamentos fitoterápicos. O processo ora apresentado torna a obtenção desse composto mais simples e rápida, contribuindo para a possibilidade de sua utilização em compostos farmacêuticos e cosméticos, entre outros.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS/DESENHOS

[018] Na **figura 1** encontra-se o fluxograma do processo de partição líquido-líquido do extrato etanólico do tronco de *Cecropia pachystachya*.

[019] Na **figura 2** estão descritos os processos de separação das frações: Clorofórmio I (F. CHCl₃ I), Clorofórmio II (F. CHCl₃ II) e Acetato (F. AcOEt III).

[020] Na **Figura 3** encontra-se o fluxograma dos processos de separação das frações: Clorofórmio:Acetato (2:1) F2 : Clorofórmio:Acetato (2:1) F (13-14).

[021] Na **Figura 4** está apresentada a estrutura do triterpeno ácido tormêntico.

[022] A **Figura 5** mostra o espectro na região do infravermelho do ácido tormêntico em pastilhas de KBr.

[023] Na **Figura 6** encontra-se o espectro de RMN¹H (500 MHz, CD₃OD) do ácido tormêntico.

[024] Na **Figura 7** encontra-se o espectro de RMN¹³C (125 MHz, CD₃OD) do ácido tormêntico.

[025] A **Figura 8** mostra o cromatograma com detecção no espectro de ultravioleta (Coluna C08; 204 nm) da fração 14, rica no ácido tormêntico.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[026] Para o processo de isolamento foram utilizados 2-4 kg de tronco de *Cecropia pachystachya* pulverizados e submetidos a extração com 12-20 L de etanol a 27°C por 72h, filtrado com papel de filtro, sendo o solvente posteriormente removido por evaporação em rotavapor sob pressão reduzida. O material vegetal resultante dessa primeira extração foi re-extraído com a mesma quantidade de etanol por mais duas vezes, de forma a promover o máximo esgotamento da droga vegetal. O extrato obtido foi novamente filtrado e seco, conforme descrito anteriormente. No final desse processo obteve-se 20-30 gramas de extrato bruto.

[027] O extrato etanólico (20-30 g) foi ressuscendido em metanol (200-400mL) e extraído, em funil de separação, com hexano (3 vezes de 200-800mL), obtendo-se as frações em hexano e metanol (Fig.1). Na fração em metanol (2-10g), adicionou-se água (3 vezes de 100-300mL) e foi realizada a extração com clorofórmio (3 vezes de 200-800mL), obtendo-se as frações em clorofórmio e hidrometanólica.

[028] Na sequência a fração hidrometanólica foi extraída com acetato (3 vezes de 200-800mL) dando origem a fração em acetato. As frações obtidas foram submetidas a processo de cromatografia em camada delgada (CCD) em comparação com o padrão de ácido tormêntico, para avaliar a presença do composto.

[029] A fração em clorofórmio (10-20g), denominada de F.CHCl₃ I, foi escolhida para dar sequência ao processo de extração, sendo submetida a uma coluna cromatográfica (CC) filtrante, tendo como suporte sílica gel acrescida de uma solução alcoólica de hidróxido de potássio entre 5% a 25%, preferivelmente entre 6% e 15%, usando um volume entre 5 e 75 mL.

[030] A amostra foi eluída com um gradiente de solvente em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato e metanol-água (1:1). Foram obtidas desse processo 4 frações, fração em hexano, fração em clorofórmio, fração em acetato e fração hidrometanólica, que foram submetidas a análise em CCD, para verificação da presença do ácido tormêntico. A partir dessa etapa, foram selecionadas sempre as frações que apresentaram a maior concentração de ácido tormêntico.

[031] A fração em clorofórmio obtida da etapa anterior (com quantidade entre 2 a 10g), denominada de F.CHCl₃ II, foi escolhida, para dar sequência ao processo de extração, sendo submetida à coluna cromatográfica aberta (CC), com sílica gel acrescida de solução alcoólica de KOH (entre 5 e 25%). A fração foi eluída com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano:clorofórmio (1:1); clorofórmio, acetato e metanol, originando 4 frações, fração hexano:clorofórmio (1:1), em clorofórmio, em acetato e em metanol.

[032] Após análise por CCD, a fração acetato (fração em Acetato III) obtida da etapa anterior (com quantidade entre 2 a 5g) foi escolhida para dar sequência ao processo de isolamento. Essa fração foi submetida a processo de separação por meio de coluna aberta (CC), tendo como suporte sílica gel, acrescida de solução de KOH (entre 5 e 25%) e tendo como eluentes solventes e misturas de solventes em ordem crescente de polaridade: clorofórmio; clorofórmio:acetato (2:1); clorofórmio:acetato (1:1); clorofórmio:acetato (1:2); acetato e metanol. Essa coluna deu origem a 6 frações, sendo a fração 2, em clorofórmio:acetato (2:1), escolhida para dar sequência ao processo de separação, conforme monitoramento por CCD.

[033] A fração 2, obtida da etapa anterior (com quantidade entre 1 a 3g) em clorofórmio:acetato (2:1), foi submetida a novo processo de separação por meio de cromatografia em coluna aberta (CC), também com sílica gel com solução alcoólica de KOH (entre 5 e 25%), utilizando os seguintes solventes: hexano:clorofórmio (1:1); clorofórmio; clorofórmio:acetato (2:1); clorofórmio:acetato (1:1) e metanol. Foram obtidas 24 frações e todas foram monitoradas por CCD para verificação da presença do ácido tormêntico.

[034] As frações 13 e 14, obtidas da etapa anterior (com quantidades entre 0,1 e 2g) em clorofórmio:acetato (2:1), foram reunidas e submetidas a novo processo de separação por cromatografia em coluna (CC) usando o mesmo suporte citado anteriormente. Os solventes usados nessa separação foram: hexano:clorofórmio (1:1); hexano:clorofórmio (1:2); clorofórmio; clorofórmio:acetato (2:1); clorofórmio:acetato (1:1); acetato e metanol.

[035] Nesse processo de separação foram obtidas 20 frações, monitoradas por meio de CCD, e reunidas de acordo com o perfil apresentado. A fração 4 em

hexano:clorofórmio (1:1) e a fração 14 em clorofórmio: acetato (2:1) foram escolhidas para serem analisadas por meio de cromatografia líquida (CLAE), para quantificação da concentração e determinação da pureza do ácido tormêntico nessas frações.

[036] A técnica de cromatografia líquida (CLAE) foi usada com a finalidade de acompanhar o processo de isolamento e quantificar no final do processo a fração com maior teor de ácido tormêntico.

[037] As frações submetidas ao processo de cromatografia líquida (CLAE) foram: F.CHCl₃ I; Fração 4 em hexano:clorofórmio (1:1) e Fração 14 em clorofórmio:acetato (2:1), sendo a fração 14 a escolhida para dar continuidade ao processo de purificação, por apresentar grau de pureza elevado e maior rendimento.

[038] Para análise em CLAE, foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu, Coluna C8 (Shimadzu, Japão) (150 x 4,6 mm; 5 μ m). As análises foram realizadas em sistema isocrático utilizando fase móvel, 0,1% ácido acético em água – 32% (A) e MeOH – 68% (B), vazão de 0,5-1,5mL/min, volume de injeção 10-30 μ L e detector UV-Vis em 204 nm.

[039] Para obtenção da curva padrão do ácido tormêntico, quantidade entre 1 a 5 mg do composto (ácido tormêntico) foi solubilizado em metanol para obtenção de uma solução estoque de 100-600 μ g/mL. Após diluições, as soluções de trabalho obtidas que variaram de 10 a 600 μ g/mL, foram injetadas em cromatógrafo líquido, em triplicata, suas áreas analisadas e plotadas em gráfico, obtendo coeficiente de correlação e equação da reta.

[040] Após a obtenção da curva padrão, as frações foram solubilizadas em metanol e injetadas (10-30 μ L), nas condições citadas acima, e quantificadas. A fração 14 em clorofórmio:acetato (2:1) apresentou a maior concentração de ácido tormêntico (100-300 μ g de ácido tormentico / mg de extrato).

[041] Essa fração foi então purificada por CLAE, nas condições citadas anteriormente, e identificada por meio de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria na região do Infravermelho.

[042] O grau de pureza das amostras foi determinado através de análise cromatográfica pelo *software* LCSolution.

[043] Dessa forma, o processo aqui reivindicado mostra-se eficaz para obtenção do produto, sendo fundamental para a sua posterior utilização.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

[044] O ácido tormêntico foi caracterizado como um sólido amorfo de cor branca, PF na faixa de 242 – 272 °C (Etanol), cujo espectro na região do IV, apresenta bandas em $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3447 (O-H) e 1689 (C=O), (FIG.5).

EXEMPLO 2

[045] O espectro de RMN ^1H em CD_3OD mostra sinal em δ 5,28 (t, $J=3,8$ Hz) de um hidrogênio olefínico (H-12). Em δ 212 3,95 (ddd) e 3,45 (d) referem-se a hidrogênios carbinólicos (C-2 e C-3), respectivamente. (FIG.6).

EXEMPLO 3

[046] O espectro de RMN ^{13}C em CD_3OD possui trinta sinais cujo espectro DEPT permitiu classificá-los como: 8 quaternários, 7 metínicos, 8 metilênicos e 7 metilas (FIG.7).

[047] Observou-se o sinal de um grupo carbonila a δ 181,36 (C-28) e sinais a δ 138,08 (C-13) e a δ 128,35 (C-12) referentes a carbono olefínicos. Os sinais δ 79,11 e 66,17 foram atribuídos aos carbonos carbinólicos (C-3 e C-2). A elucidação dos compostos foi realizada por comparação destes dados com os dados descritos na literatura (TANIGUCHI S, IMAYOSHI Y, KOBAYASHI E, TAKAMATSU Y, ITO H, HATANO T, et al. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. **Phytochemistry**. v. 59, n. 3, p. 315-23, 2002).

EXEMPLO 4

[048] Cromatograma da fração 14 obtida nas condições CLAE-UV padronizadas para determinação da pureza do ácido tormêntico (FIG.8).

EXEMPLO 5

[049] A tabela 1 apresenta os valores de rendimento e de pureza das amostras obtidas no processo de obtenção e isolamento do ácido tormêntico descrito anteriormente e foco dessa invenção.

Tabela 1- Rendimento e pureza das amostras obtidas no processo de isolamento do ácido tormêntico

Amostra	Rendimento (%)	Pureza (%)
Fração em Clorofórmio I (F. CHCl ₃ I)	47	Utilizada para CC/KOH
Fração em Clorofórmio II (F. CHCl ₃ II)	2,2	71
Fração em acetato III	86,14	Utilizada para CC/KOH
Fração em metanol	8,0	97
Fração em Clorofórmio III		
F1	4,64	81
Fração em clorofórmio:acetato (2:1)		
F2	46,20	82 (CC/KOH)
Fração em clorofórmio:acetato (1:1)		
F3	34,27	99
Fração em Clorofórmio		
F (4-12)	10,10	63
Fração em		
clorofórmio:acetato (2:1)	49,47	Utilizada para CC/KOH
F (13-14)		
Fração em		
clorofórmio:acetato (1:1)	2,44	97
F (21-23)		
Fração em Clorofórmio		
F (10-13)	5,28	99
Fração em clorofórmio:acetato (2:1)		
F (14)	30,75	98
Fração em clorofórmio:acetato (1:1)		
F (15-16)	8,50	99

REIVINDICAÇÕES

1- Processo de obtenção e isolamento do triterpeno ácido tormêntico **caracterizado por** compreender as etapas de:

- a. Obtenção do extrato bruto etanólico através da pulverização e maceração do material vegetal de *Cecropia pachystachya*;
- b. Solubilização do extrato bruto e particionamento líquido-líquido utilizando diversos solventes, tais como: hexano, clorofórmio, acetato e metanol;
- c. Fracionamento e isolamento em coluna aberta em gel de sílica acrescida de solução alcoólica de KOH; seguida pelo monitoramento da presença do ácido em CCD em todas as frações obtidas no processo de separação;
- d. Purificação por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- e. Quantificação e determinação do grau de pureza das frações utilizadas no processo de obtenção do composto;
- f. Elucidação estrutural por RMN e FTIR.

2- Processo de obtenção e isolamento do ácido tormêntico de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender as etapas de:

- a. Coleta, identificação botânica e secagem do material vegetal;
- b. Pulverização da raiz ou das cascas das raízes, do tronco ou das cascas do tronco de *Cecropia pachystachya* para obter um pó fino;
- c. Uso de uma quantidade entre 2 a 4 Kg do pó fino de *Cecropia pachystachya* para iniciar o procedimento de extração;
- d. Maceração do pó fino em três etapas sucessivas, utilizando etanol preferivelmente etanol absoluto, podendo também ser utilizado etanol 96°GL em volume entre 10 a 20 Litros;
- e. Obtenção do extrato bruto etanólico na forma de massa sólida, obtida na etapa de maceração utilizando equipamento de evaporador de solvente a pressão reduzida, podendo ainda ser utilizado um liofilizador no processo de evaporação do solvente;
- f. Obtenção do extrato bruto etanólico com rendimento entre 1,0 a 2,0% em relação ao pó fino obtido do material vegetal seco de *Cecropia pachystachya*.

3- Processo de particionamento do ácido tormêntico a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender as etapas de:

- a. Solubilização do extrato bruto etanólico em metanol e água (1:1, v:v) em volume entre 200 e 400 mL;
 - b. Particionamento líquido-líquido do extrato bruto etanólico com solventes orgânicos: hexano (200 a 800mL), clorofórmio (200 a 800mL) e acetato de etila (200 a 800mL);
 - c. Obtenção de 3 frações denominadas de fração em hexano I, fração clorofórmio I e fração em acetato de etila I;
 - d. Monitoramento da presença de ácido tormêntico usando Cromatografia de Camada Delgada (CCD) usando padrão analítico de ácido tormêntico para avaliar a presença ou ausência do triterpeno de interesse, o ácido tormêntico;
- 4- Processo de fracionamento e isolamento do ácido tormêntico a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* de acordo com reivindicação 1, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:
- a. Fração clorofórmica I em quantidade entre 10 e 20 gramas, também denominada F. CHCl₃ I, foi submetida à eluição em coluna cromatográfica (CC) filtrante, tendo como suporte sílica gel adicionada de solução alcoólica de KOH na proporção entre 5 a 25%;
 - b. Uso dos solventes orgânicos hexano, clorofórmio, acetato de etila e sistema de solvente metanol:água (1:1; v:v) (hidrometanólica) para obtenção de 4 frações denominadas de fração hexânica II, fração clorofórmica II (F. CHCl₃ II), fração acetato de etila II e fração hidrometanólica II;
 - c. Monitoramento da presença de ácido tormêntico usando Cromatografia de Camada Delgada (CCD) usando padrão analítico de ácido tormêntico para avaliar a presença ou ausência do triterpeno de interesse, o ácido tormêntico;
 - d. A fração em clorofórmio II (F. CHCl₃ II) em quantidade de 2 a 10 gramas foi utilizada para dar prosseguir processo de isolamento do ácido tormêntico utilizando coluna cromatográfica (CC) filtrante, tendo como suporte sílica gel adicionada de solução alcoólica de KOH na proporção entre 5 a 20%;
 - e. Eluição da F. CHCl₃ II usando sistema de solventes hexano:clorofórmio (1:1); clorofórmio, acetato de etila e metanol, originando 4 frações novas frações denominadas de fração hexano:clorofórmio (1:1), em clorofórmio,

em acetato de etila III e em metanol, os quais foram monitoradas usando CCD;

- f. A fração acetato de etila III em quantidade entre 2 a 5 gramas foi utilizada para prosseguir o processo de isolamento do ácido tormêntico utilizando coluna cromatográfica (CC) filtrante, tendo como suporte sílica gel adicionada de solução alcoólica de KOH na proporção entre 5 a 20%;
- g. Eluição da fração acetato de etila III usando sistema de solventes clorofórmio; clorofórmio:acetato (2:1); clorofórmio:acetato (1:1); clorofórmio:acetato (1:2); acetato e metanol, originando 6 novas frações. A fração 2 usando sistema de solvente clorofórmio:acetato (2:1) foi a escolhida para dar sequência ao processo de separação após monitoramento em CCD;
- h. Fração 2 em quantidade entre 1 a 3 gramas obtida do sistema de solvente clorofórmio:acetato de etila (2:1) foi utilizada para prosseguir processo de isolamento do ácido tormêntico usando coluna cromatográfica (CC) filtrante, tendo como suporte sílica gel adicionada de solução alcoólica de KOH na proporção entre 5 a 20%;
- i. Eluição da fração 2 foi realizada com sistema de solventes hexano:clorofórmio (1:1); clorofórmio; clorofórmio:acetato (2:1); clorofórmio:acetato (1:1) e metanol, obtendo-se 24 frações e todas foram monitoradas por CCD para verificação da presença do ácido tormêntico;
- j. As frações 13 e 14 obtida da etapa anterior (com quantidades entre 0,1 e 2g) da fração 2, foram reunidas e submetidas a novo processo de separação por cromatografia em coluna (CC) usando o mesmo suporte citado anteriormente;
- k. Os solventes usados nessa separação foram: hexano:clorofórmio (1:1); hexano:clorofórmio (1:2); clorofórmio; clorofórmio:acetato (2:1); clorofórmio:acetato (1:1); acetato e metanol.
- l. Foram obtidas 20 frações, as quais foram monitoradas por CCD e reunidas de acordo com perfil de pureza e semelhança de Rf's com o padrão analítico de ácido tormêntico;
- m. A fração 4 obtida em hexano:clorofórmio (1:1) e a fração 14 obtida em clorofórmio: acetato (2:1) foram escolhidas usando CCD pelo grau de pureza para serem analisadas por meio de cromatografia líquida (CLAE),

para quantificação e determinação de pureza do ácido tormêntico nessas frações;

- n. Outras frações ao longo da marcha de fracionamento e isolamento também foram escolhidas para avaliar determinação de teor e o grau de pureza em relação ao ácido tormêntico padrão analítico.

- 5- Processo de identificação químico e estrutural do ácido tormêntico a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* **caracterizado por** compreender técnicas de ponto de fusão e técnica espectroscópicas de FTIR.
- 6- Processo de identificação químico e estrutural de ácido tormêntico a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado por** compreender as características de um composto na forma de um sólido branco, amorfo, com medida de ponto de fusão entre 270,4-272°C (etanol) e apresentar no espectro de FTIR, estiramentos ou bandas em $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3447 (O-H) e 1689 (C=O).
- 7- Processo de identificação químico e estrutural do ácido tormêntico a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* **caracterizado por** compreender técnicas de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ¹H) e de carbono 13 (RMN ¹³C)
- 8- Processo de identificação químico e estrutural do ácido tormêntico a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado por** compreender o uso de técnica de RMN ¹H em metanol deuterado para obter deslocamentos químicos em δ 5,28 ppm (t, J=3,8 Hz) de um hidrogênio olefínico (H-12). Em δ 212 ppm 3,95 (ddd) e 3,45 ppm (d) referem-se a hidrogênios carbinólicos (C-2 e C-3), respectivamente.
- 9- Processo de identificação químico e estrutural do ácido tormêntico a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado por** compreender o uso de técnica de RMN ¹³C em metanol deuterado possui trinta sinais cujo espectro DEPT permitiu classificá-los como: 8 quaternários, 7 metínicos, 8 metilênicos e 7 metilas.
- 10- Processo de identificação químico e estrutural do ácido tormêntico a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* de acordo com reivindicação 7, **caracterizado por** compreender o uso de técnica de RMN ¹³C em metanol deuterado para obter deslocamentos químicos de grupo carbonila a δ 181,36 (C-

- 28) e sinais a δ 138,08 (C-13), a δ 128,35 (C-12) referentes a carbono olefínicos, sinais δ 79,11 e 66,17 foram atribuídos aos carbonos carbinólicos (C-3 e C-2).
- 11- Processo de identificação, quantificação de teor e determinação do grau de pureza do ácido tormêntico a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* **caracterizado por** compreender o uso da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de UV.
- 12- Processo de identificação, quantificação de teor e determinação do grau de pureza do ácido tormêntico a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* de acordo com reivindicação 11 **caracterizado por** compreender comprimento de onda específico de 204 nm em detector UV;
- 13- Processo de identificação, quantificação de teor e determinação do grau de pureza do ácido tormêntico a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* de acordo com reivindicação 11 **caracterizado por** compreender o uso de fase móvel em sistema binário água ultrapura contendo 0,1% de ácido acético como solvente A e metanol como solvente B;
- 14- Processo de identificação, quantificação de teor e determinação do grau de pureza do ácido tormêntico a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* de acordo com reivindicação 11 **caracterizado por** compreender o uso de fase estacionária reversa C8 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) como suporte sólido;
- 15- Processo de identificação, quantificação de teor e determinação do grau de pureza do ácido tormêntico a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* de acordo com reivindicações 11 e 13 **caracterizado por** compreender o uso do modo de eluição isocrático com 32% do solvente A e 68% de solvente B;
- 16- Processo de identificação, quantificação de teor e determinação do grau de pureza do ácido tormêntico a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* de acordo com reivindicação 11 **caracterizado por** compreender o uso de padrão analítico de ácido tormêntico em concentrações entre 10 e 600 μ g/mL e injetados em triplicata para estimativa de concentração de teor e determinação do grau de pureza das diferentes frações obtidas.
- 17- Processo de determinação do rendimento das frações a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* de acordo com reivindicação 11 **caracterizado por** compreender faixa de rendimento percentual entre 2,20% e 86,14%.

- 18- Processo de quantificação de teor ácido tormêntico a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* de acordo com reivindicação 11 **caracterizado por** compreender faixa de teor entre 100 a 500 μ g do ácido tormêntico/mg da fração de *Cecropia pachystachya*.
- 19- Processo de determinação de pureza do ácido tormêntico a partir de material vegetal denominado *Cecropia pachystachya* de acordo com reivindicação 11 **caracterizado por** compreender faixa de pureza entre 63 e 99% de ácido tormêntico.

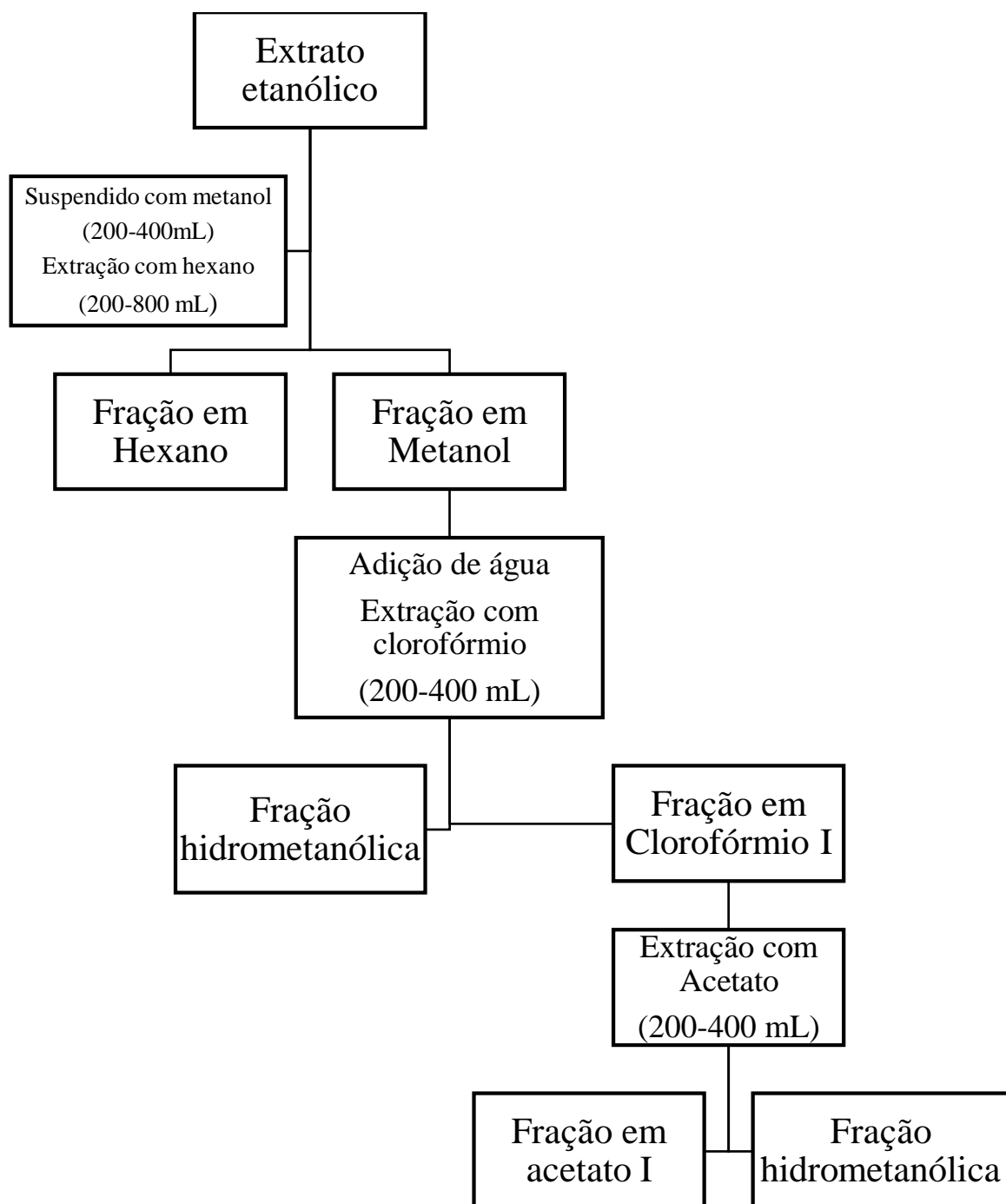


FIG. 1

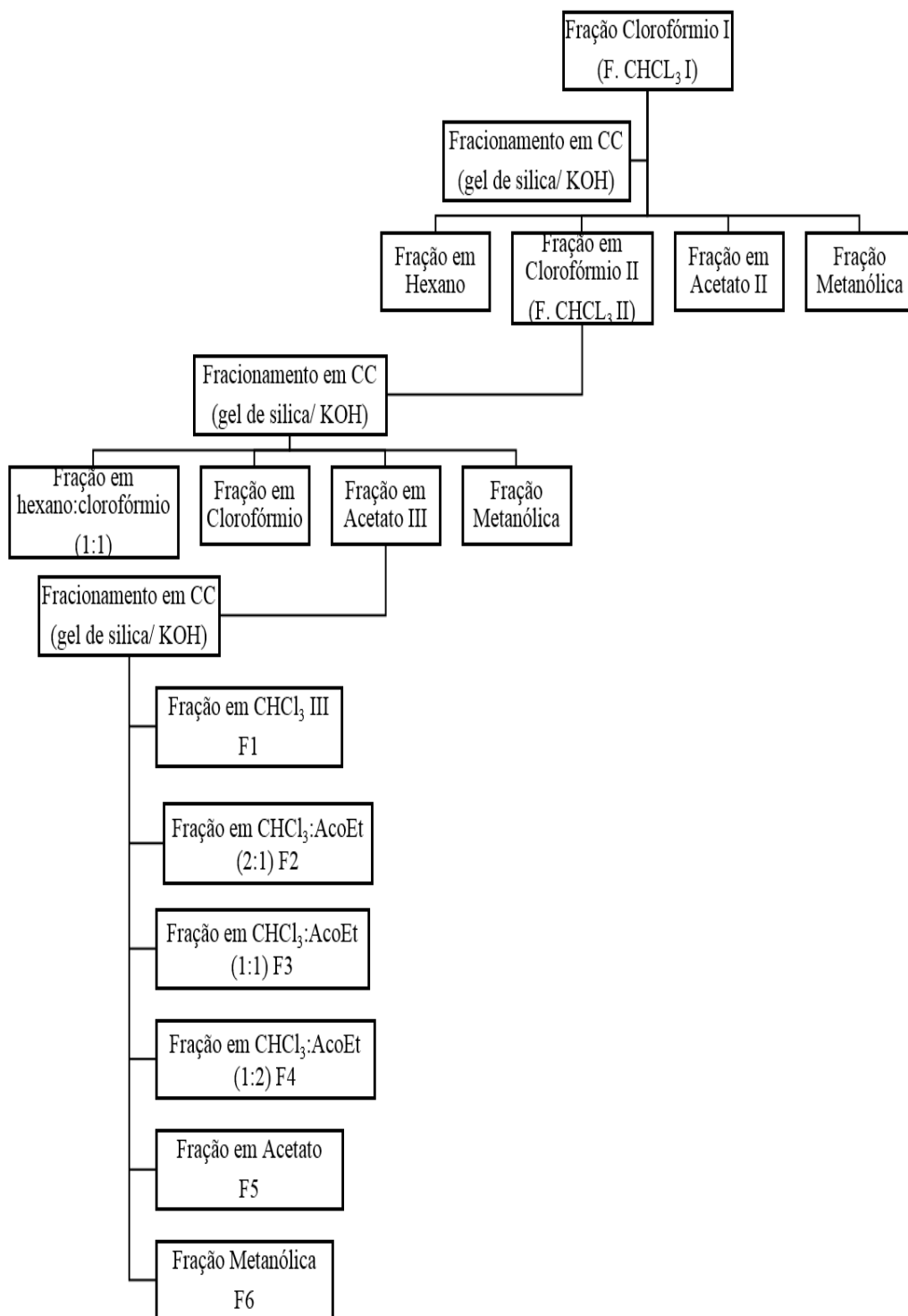


FIG. 2

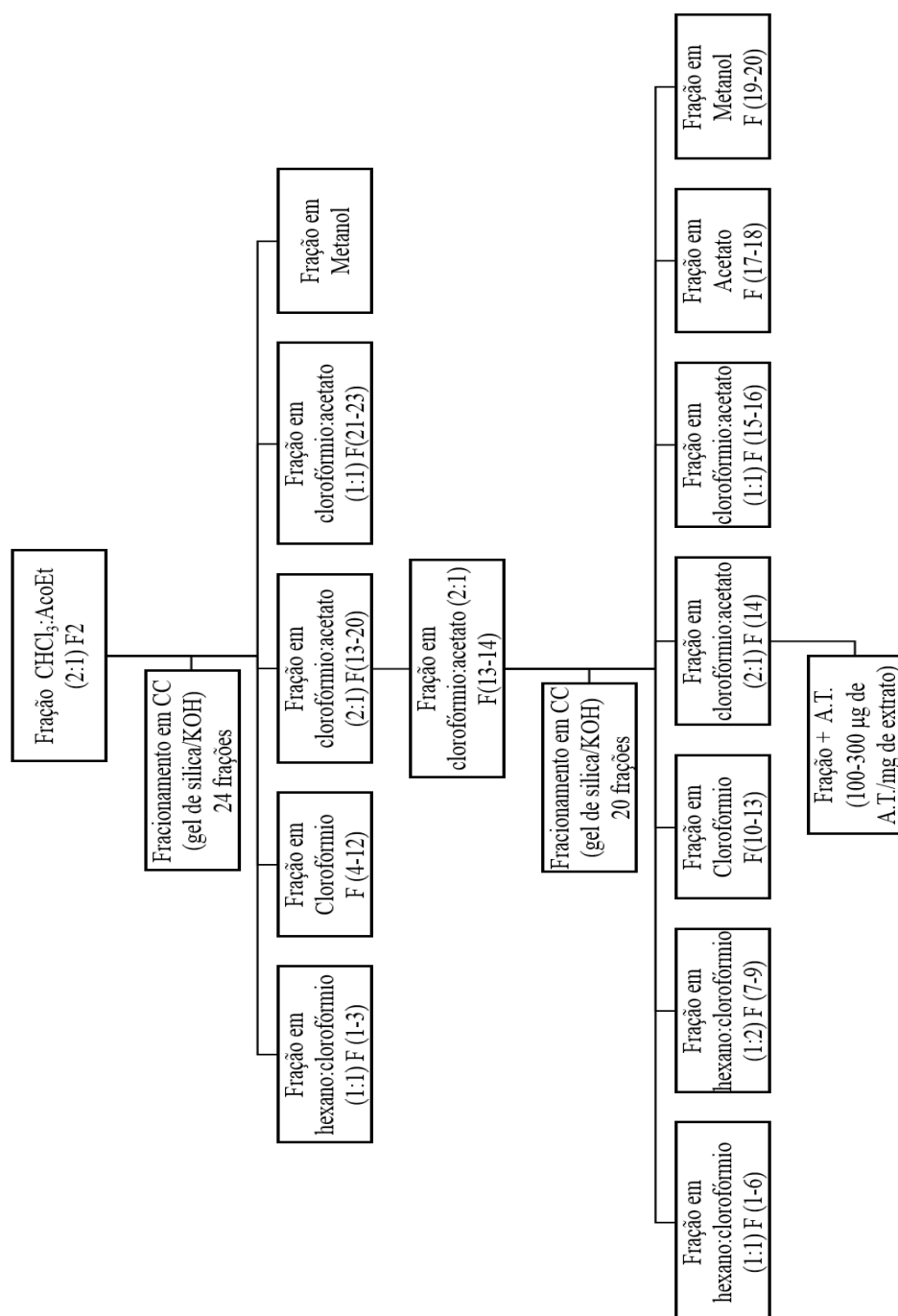


FIG. 3

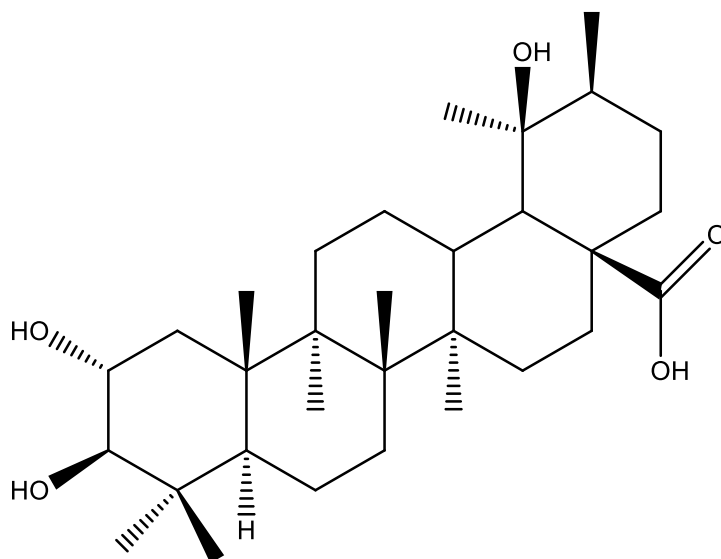


FIG. 4

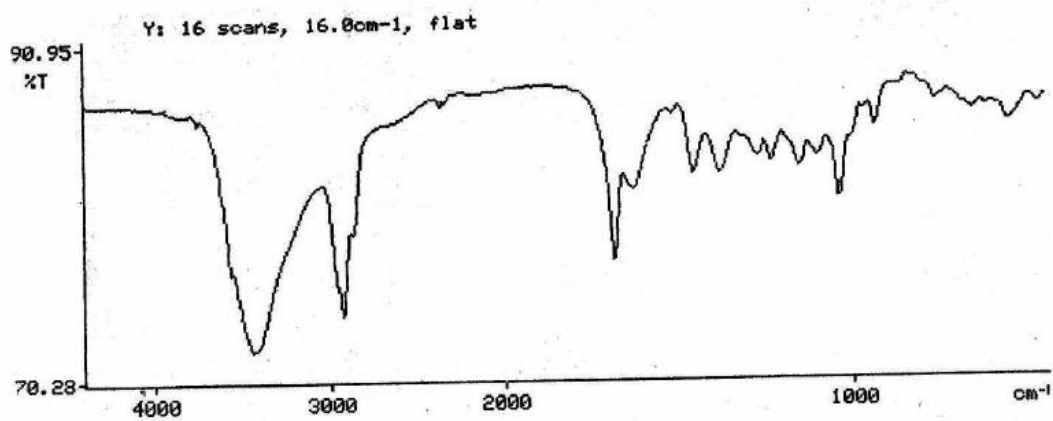


FIG. 5

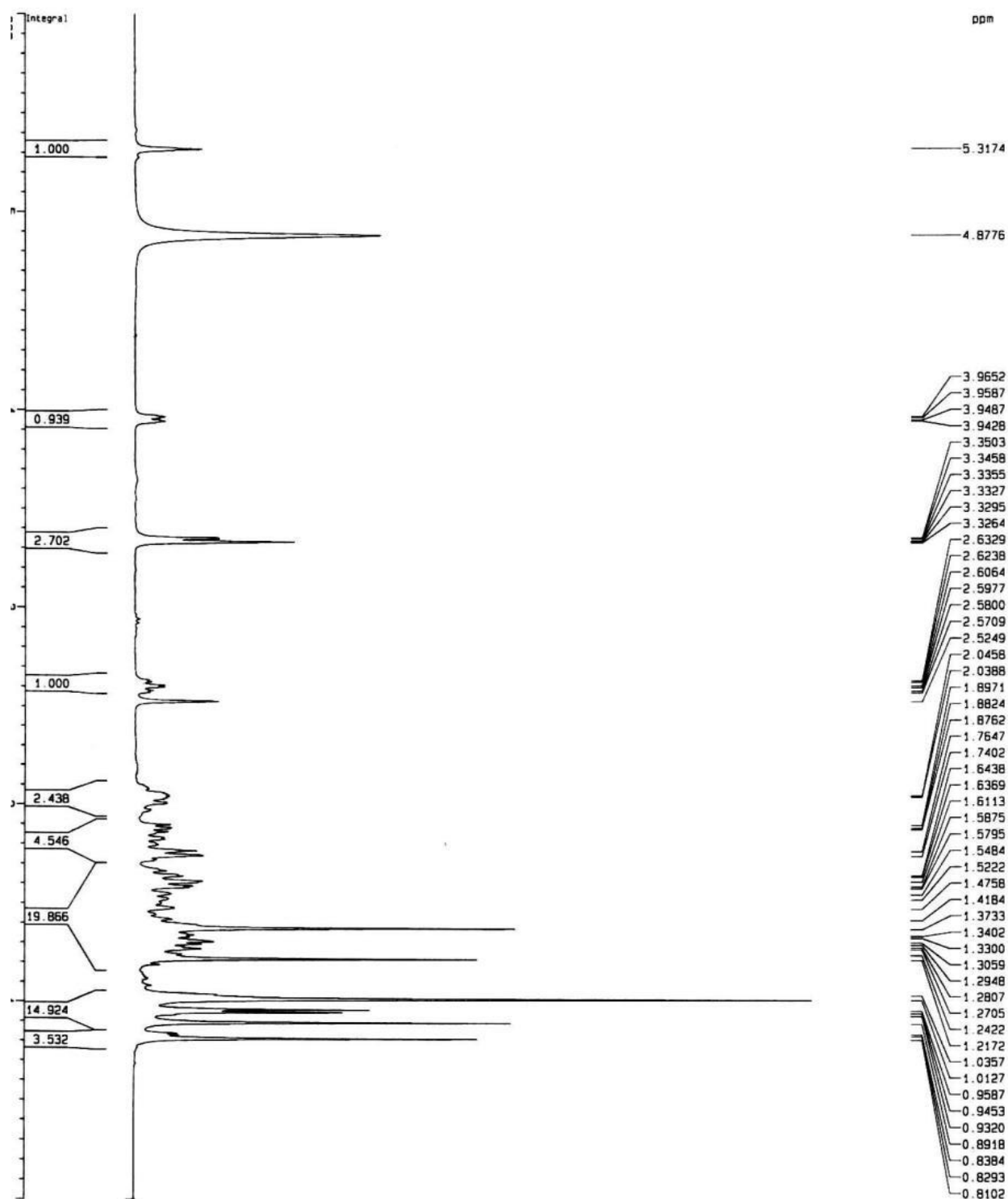


FIG. 6

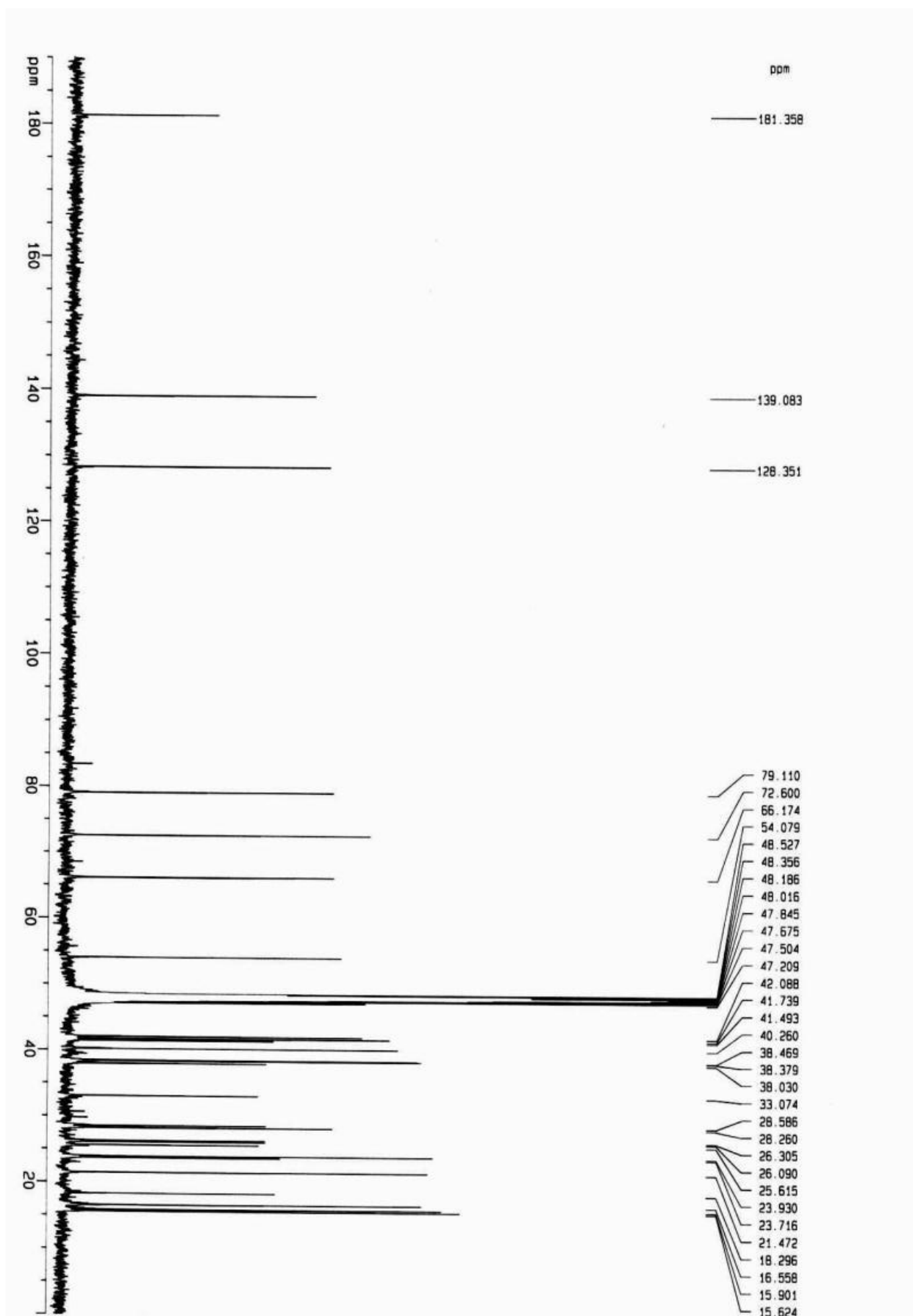
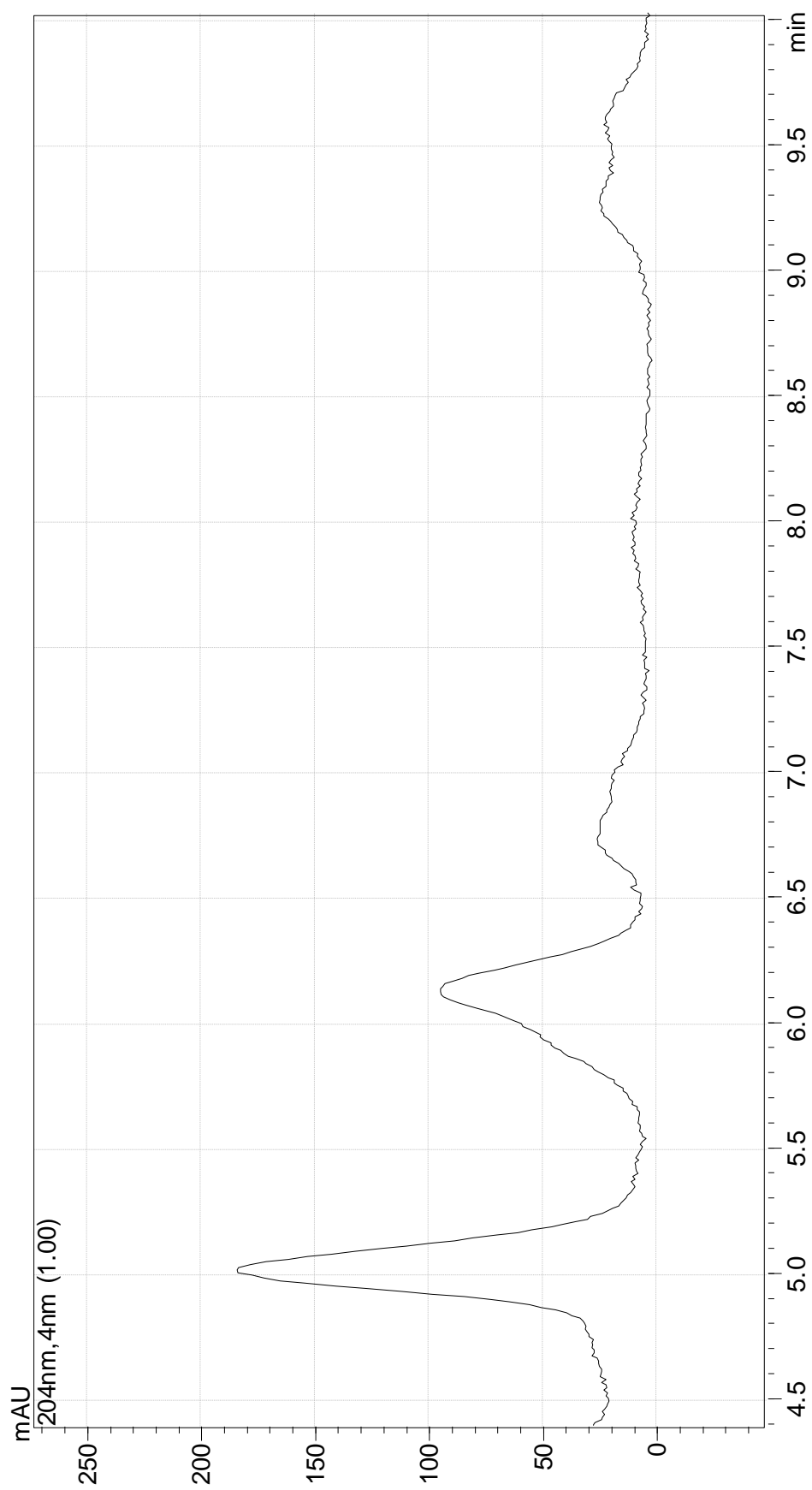


FIG. 7

**FIG. 8**

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico e biológico da espécie *Cecropia pachystachya*, demonstrou que os extratos etanólicos da folha, raiz, caule, casca da raiz e casca do caule, tem atividades biológicas interessantes, que podem estar relacionadas as diversas substâncias presentes na planta. Assim podemos concluir que:

- Os extratos da raiz, caule, casca da raiz e casca do caule, apresentaram efeito alelopático, inibindo a germinação e o crescimento de sementes de alface, fazendo esses extratos possíveis alvos de estudo para novos herbicidas;
- Alguns aleloquímicos, pertencentes as classes de saponinas, taninos e flavonóides, com atividade alelopática, já foram descritos, indicando que os flavonóides e os demais compostos fenólicos, encontrados nos extratos estudados, são os responsáveis pelo efeito alelopático encontrado;
- Os extratos da folha, raiz, caule, casca da raiz e casca do caule demonstraram potente capacidade antioxidante, atuando como sequestrador do radical livre DPPH• e protegendo a membrana lipídica do ataque de espécies reativas;
- Os extratos estudados apresentaram altos teores de compostos fenólicos e flavonóides, dentre eles, a quercetina, os ácidos caféico e clorogênico, catequina e epicaquetina, além do triterpeno, ácido tormêntico. A prospecção fitoquímica, revelou ainda a presença de taninos condensados e esteróides livres;
- Os flavonóides encontrados no estudo podem ser os responsáveis pela capacidade antioxidante dos extratos, já que alguns deles, como a quercetina, tem reconhecida atividade antioxidante;
- O estudo da constituição química dos extratos etanólicos da *C. pachystachya*, indicou a presença de compostos fenólicos, como flavonóides, xantonas, taninos, antraquinonas e compostos triterpênicos como esteróides e triperpenos pentacíclicos. No final desse processo, quatro substâncias foram isoladas desses extratos, dentre elas, o ácido tormêntico e o ácido tormêntico acetilado, que serão utilizados nos ensaios antimaláricos, e outras duas substâncias, ainda não identificadas, que estão sendo analisadas para elucidação estrutural;

- As maiores concentrações de ácido tormêntico estão presentes nos extratos da raiz, obtidos pelo método de extração a frio e mês de maio, referente ao período estudado;
- A variação da produção do ácido tormêntico pela *C. pachystachya* pode ser regulada por fatores bióticos e abióticos diferentes dos estudados em nosso trabalho, indicando que fatores como altitude, latitude, longitude, umidade do ar, temperatura e precipitação, parecem não estar relacionados com a produção desse triterpeno na embaúba.

Diante de todas as atividades apresentadas e da identificação química, de classes de compostos e substâncias para esta espécie, ela pode ser evidenciada como importante fonte biológica e farmacológica, desenvolvendo interesse econômico, e se tornando alvo para novas pesquisas.